

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 09/04/2026.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

ALINE REIS

PRODUÇÃO RECOMBINANTE DO RBD DO VÍRUS SARS-COV-2 E
DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA PARA BIOPROSPECÇÃO DE
INIBIDORES DE FUSÃO

Araraquara, SP

2024

Aline Reis

**PRODUÇÃO RECOMBINANTE DO RBD DO VÍRUS SARS-COV-2 E
DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA PARA BIOPROSPECÇÃO DE
INIBIDORES DE FUSÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área de conhecimento: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Araraquara – SP

2024

R375p Reis, Aline.
Produção recombinante do RBD do vírus SARS-CoV-2 e desenvolvimento de plataforma para bioprospecção de inibidores de fusão / Aline Reis. – Araraquara, 2024.
78 f. : il.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa: Biotecnologia.

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. RBD. 4. ACE2. 5. Proteínas recombinantes. 6. Atividade enzimática. I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Produção recombinante do RBD do vírus SARS -CoV-2 e desenvolvimento de plataforma para bioprospecção de inibidores de fusão

AUTORA: ALINE REIS

ORIENTADOR: PAULO INACIO DA COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área de conhecimento: Biotecnologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. CARLOS ROBERTO PRUDENCIO (Participação Virtual)
Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz

Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 09 de abril de 2024

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001 através de uma bolsa do programa de excelência acadêmica durante 24 meses (processo nº 88887.660895/2022-00) e pelo processo Fundunesp - nº 3119/2020.

RESUMO

A COVID-19 é uma síndrome respiratória aguda grave de origem viral, tendo emergido em 2019 e evoluiu para uma pandemia global com cerca de 670 milhões de casos e 6,8 milhões de mortes registradas até 2023. Seus sintomas principais envolvem febre, tosse seca, fadiga, falta de ar, mialgia e distúrbios gastrointestinais, podendo ser fatal. O agente causador da COVID-19, denominado SARS-CoV-2, é um betacoronavírus envelopado de RNA positivo e dentre suas proteínas estruturais, a proteína Spike (proteína S) desempenha um papel crucial na infecção, ela possui o domínio de ligação ao receptor (RBD) que se liga à enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ACE2), permitindo a fusão do vírus com as células hospedeiras. Apesar do rápido desenvolvimento e aplicação das vacinas, sua eficácia enfrenta desafios, como grupos não vacináveis, baixa adesão a doses de reforço, constante evolução do vírus e o aparecimento de sequelas pós infecção. Nesse cenário, é crucial investir em tecnologias além das vacinas, como antivirais, para combater a infecção e suas sequelas. Os inibidores de fusão são uma classe de antivirais que agem nas primeiras etapas da infecção, bloqueando a ligação e fusão do vírus as células hospedeiras, e desde o início da pandemia houve a busca intensa por esses fármacos. Uma das técnicas utilizadas para essa bioprospecção é a cultura de células com o vírus, que apesar de ser o padrão para testes de antivirais, é trabalhosa, de alto custo e que requer mão de obra especializada, além de representar riscos de biossegurança. Alternativas tecnológicas têm sido desenvolvidas para facilitar a triagem de antivirais, incluindo a plataforma proposta neste estudo. Baseada na atividade carboxipeptidase do receptor ACE2 e sua interação com o RBD, essa plataforma busca contribuir para a bioprospecção de inibidores de fusão contra o SARS-CoV-2, oferecendo uma abordagem, rápida, segura e mais barata. Através da produção recombinante do RBD em plataforma procariótica e ensaios fluorimétricos e enzimáticos o presente trabalho demonstrou que o RBD é capaz de aumentar a atividade enzimática da ACE2 em cerca de 6 vezes e que é possível utilizar essa modulação para realizar a triagem de inibidores de fusão bem como anticorpos neutralizadores.

Palavras Chave: COVID-19; SARS-CoV-2; RBD; ACE2; proteínas recombinantes; atividade enzimática.

ABSTRACT

COVID-19 is a severe acute respiratory syndrome of viral origin, having emerged in 2019 and has evolved into a global pandemic with around 670 million cases and 6.8 million deaths recorded by 2023. Its main symptoms involve fever, dry cough, fatigue, shortness of breath, myalgia and gastrointestinal disorders, which can be fatal. The causative agent of COVID-19, called SARS-CoV-2, is an enveloped betacoronavirus with positive RNA and among its structural proteins, the Spike protein (S protein) plays a crucial role in the infection, it has the receptor binding domain (RBD) that binds to angiotensin-converting enzyme type 2 (ACE2), allowing the virus to fuse with host cells. Despite the rapid development and application of vaccines, their effectiveness faces challenges, such as non-vaccinatable groups, low adherence to booster doses, constant evolution of the virus and the appearance of post-infection sequelae. In this scenario, it is crucial to invest in technologies beyond vaccines, such as antivirals, to combat the infection and its consequences. Fusion inhibitors are a class of antivirals that act in the first stages of infection, blocking the binding and fusion of the virus to host cells, and since the beginning of the pandemic there has been an intense search for these drugs. One of the techniques used for this bioprospecting is the culture of cells with the virus, which despite being the standard for antiviral testing, is labor-intensive, high-cost and requires specialized labor, in addition to posing biosafety risks. Technological alternatives have been developed to facilitate antiviral screening, including the platform proposed in this study. Based on the carboxypeptidase activity of the ACE2 receptor and its interaction with the RBD, this platform seeks to contribute to the bioprospecting of fusion inhibitors against SARS-CoV-2, offering an effective, fast, safe and cheaper approach. Through recombinant production of RBD, fluorimetric and enzymatic assays, the present work demonstrated that RBD is capable of increasing the enzymatic activity of ACE2 by up to 6 times and that it is possible to use this modulation to screen fusion inhibitors as well as antibodies, neutralizers.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; RBD; ACE2; recombinant proteins; enzymatic activity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ACE2	Enzima conversora de angiotensina tipo 2
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
D.O.	Densidade Óptica
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
hACE2	Enzima Conversora de Angiotensina tipo 2 humana
HCl	Ácido Clorídrico
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
LB	Meio Luria Bertani
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaOH	Hidróxido de Sódio
pb	Pares de base
PBS	Tampão Fosfato Salina
PMSF	Inibidor de serina protease fluoreto de fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRBD	Domínio de ligação ao Receptor Recombinante
S	Proteína Spike
S1	Subunidade 1 da Spike
S2	Subunidade 2 da Spike
SDS	Dodecilsulfato de sódio
ssRNA	Molécula simples de RNA positiva
TBE	Solução Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Letra Grega Alfa
β	Letra Grega Beta
γ	Letra Grega Gama
δ	Letra Grega Delta
μ	Letra Grega Mi

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama dos hospedeiros naturais e possíveis intermediários dos sete coronavírus com relevância médica, incluindo morcegos e roedores como hospedeiros naturais, e civetas, camelos e vacas como intermediários.....19
- Figura 2.** Elementos estruturais do vírus SARS-CoV-2, incluindo a proteína de espícula, envelope, membrana, componentes internos - RNA de fita simples viral e proteínas do nucleocapsídeo – e componentes do genoma.....20
- Figura 3.** A glicoproteína Spike do vírus SAR-CoV-2. **A)** Esquema da estrutura primária onde os diversos domínios são representados por cores diferentes. SS - sequência única; NTD - domínio N-terminal; RBD - domínio de ligação ao receptor; SD1 - subdomínio 1; SD2 - subdomínio 2; S1/S2 - sítio de clivagem da protease S1/S2; S2' - sítio de clivagem da protease S2'; FP- peptídeo de fusão; HR1 - repetição 1; CH - hélice central; CD - domínio conector; HR2 – repetição 2; TM - domínio transmembrana; CT - cauda citoplasmática. As setas indicam os sítios de clivagem. **B)** Estrutura do trímero Spike obtida por microscopia crioeletrônica. A direita o estado fechado e a esquerda o aberto.....22
- Figura 4.** Construção do plasmídeo pET-28a/rRBD. São estruturas importantes: KanR - gene que confere resistência ao antibiótico canamicina; Ori - origem de replicação; LacI - gene que codifica a proteína repressora do operon lac; T7 promoter - região promotora para a T7 RNA polimerase; T7 terminator - região terminadora para a T7 RNA polimerase; RBS - sítio de ligação ao ribossomo; RBD - gene sintético da região RBD do vírus SARS-CoV-2.....31
- Figura 5.** Placas seletivas de meio LB contendo Canamicina. **A)** Crescimento de células DH5 α transformadas com o plasmídeo pET-28a/rRBD. **B)** Crescimento de células DH5 α não transformadas.....42
- Figura 6.** Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% do produto de amplificação.....44
- Figura 7.** Sequenciamento do gene RBD e controle de qualidade. **A)** Destaque para a região onde a sequência obtida (S) se alinha com a sequência fornecida do plasmídeo pET-28a/rRBD. **B)** Eletroferograma correspondente ao sequenciamento realizado pela GenOne indicando o início da construção do rRBD.....45
- Figura 8.** Placa seletiva de meio LB contendo Canamicina com o crescimento de células BL21 (DE3) transformadas com plasmídeo pET-28a/rRBD.....46
- Figura 9.** Curvas de crescimento da *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pET-28a/rRBD (BL21 T) e da *E. coli* sem a transformação (BL21) 47
- Figura 10.** Curva de calibração com o padrão de albumina do Kit Micro BCATM Protein Assay para quantificação de proteína total dos extratos proteicos..... 48
- Figura 11.** Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 12%. **A)** Fração insolúvel (*pellet*) do extrato sem indução da expressão. **B)** Fração insolúvel (*pellet*) dos extratos com indução. **C)** Fração solúvel (sobrenadante) dos extratos com indução.....49
- Figura 12.** Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 12%. PM - Padrão de peso molecular; 1 - Fração solúvel (sobrenadante) sem indução; 2 - Fração solúvel (sobrenadante)

com indução; 3 - Fração insolúvel (*pellet*) sem indução; 4 - Fração insolúvel (*pellet*) com indução.....51

Figura 13. Perfil de purificação do rRBD por cromatografia de afinidade por íons imobilizados.....52

Figura 14. Figura 14. Identificação do rRBD pela técnica de Western blot com revelação colorimétrica por DAB. 1) Extrato do cultivo sem indução da expressão por IPTG. 2) Fração solúvel purificada por IMAC.....53

Figura 15. Avaliação da reatividade do rRBD com o pool de anticorpos através da técnica de *dot blot*. (-) extrato do cultivo sem indução. (+) rRBD purificado por IMAC.....54

Figura 16. **A)** Consumo de substrato fluorogênico Mca-APK(Dnp)-OH pela ACE2 na presença de diferentes concentrações do rRBD (500, 50, 5 e 0 nanogramas, respectivamente). **B)** Máximo de fluorescência observado para cada concentração de rRBD utilizada em 100 minutos de reação.....55

Figura 17. Neutralização do rRBD e o efeito na atividade de ACE2. **A)** Curvas cinéticas da reação de ACE2 com o peptídeo fluorogênico Mca-APK(Dnp)-OH na presença de 50 ng de RBD e diferentes concentrações do Inibidor A. **B)** Fluorescência observada para cada concentração de Inibidor A em 120 minutos. **C)** Curvas cinéticas da reação de ACE2 com o peptídeo fluorogênico Mca-APK(Dnp)-OH na presença de 50 ng de RBD e diferentes concentrações do Inibidor B. **D)** Fluorescência observada para cada concentração de Inibidor B em 120 minutos..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de indutor IPTG e tempo de expressão testados em cada cultivo....	36
Tabela 2. Composição dos géis de poliacrilamida para eletroforese.....	38
Tabela 3. Diluição da solução padrão de albumina 2 mg/mL.....	71
Tabela 4. Absorbância e concentração proteica dos extratos obtidos para cada cultivo.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Panorama das vacinas desenvolvidas contra a COVID-19: produtores, tecnologias de desenvolvimento e plataformas utilizadas.....	23
Quadro 2. Ciclos térmicos da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para amplificação do gene de interesse: fases de estabilização, desnaturação, anelamento e extensão, juntamente com temperaturas e tempos correspondentes.....	34
Quadro 3. Ciclos térmicos da PCR para reação de sequenciamento: fases de estabilização, desnaturação, anelamento e extensão, juntamente com temperaturas e tempos correspondentes.....	35
Quadro 4. Reagentes e materiais presentes no kit comercial para extração de DNA plasmidial Concert™ Rapid Plasmid Miniprep System.....	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	CORONAVÍRUS.....	17
2.2	SARS-CoV-2 E COVID-19	18
2.3	A GLICOPROTEÍNA SPIKE: ESTRUTURA, FUNÇÃO E APLICAÇÕES	20
2.4	O RECEPTOR ENZIMÁTICO ACE2	23
2.5	INIBIDORES DE FUSÃO E ANTICORPOS NEUTRALIZADORES.....	23
2.6	A CRISE DE INSUMOS E AUTOSSUFICIÊNCIA NACIONAL DE PRODUÇÃO.....	24
2.7	PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	GERAL	28
3.2	ESPECÍFICOS	28
4	MATERIAS E MÉTODOS	29
4.1	PREPARO DE SOLUÇÕES	29
4.2	LINHAGENS, GENE E VETOR.....	29
4.3	PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES	30
4.4	TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO	31
4.5	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	32
4.6	CONTROLE DE QUALIDADE DA CLONAGEM: ANÁLISE POR PCR E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	32
4.7	CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO	34
4.8	CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO.....	35
4.9	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA	36
4.10	CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES TESTADAS ..	36
4.11	PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC)	37
4.12	DETECÇÃO DO RRBD: WESTERN BLOT	38
4.13	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DO RRBD.....	38
4.14	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO RBD-ACE2 POR FLUORIMETRIA.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

5.1	INDUÇÃO DA COMPETÊNCIA, TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO DA <i>E. COLI</i> DH5A	41
5.2	CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE POR PCR.....	42
5.3	TRANSFORMAÇÃO DA <i>E. COLI</i> BL21 (DE3) E AVALIAÇÃO DO SEU PERFIL DE CRESCIMENTO	44
5.4	CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO.....	47
5.5	PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO RRBD	49
5.6	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DO RRBD.....	52
5.7	PROVA DE CONCEITO DA PLATAFORMA PROPOSTA.....	53
6	CONCLUSÕES.....	58
7	PERSPECTIVAS.....	59
8	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE A.....	68
	APÊNDICE B.....	72
	ANEXO A.....	73
	ANEXO B	74

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma nova forma de síndrome respiratória aguda grave viral que, como o nome sugere, surgiu em 2019 e se transformou em uma pandemia que acumulou quase 670 milhões de casos e 6,8 milhões de mortes em todo o mundo (JOHN HOPKINS UNIVERSITY, 2023). Esta doença infecciosa tem como principais sintomas: febre, tosse seca, fadiga, falta de ar, mialgia, distúrbios gastrointestinais e é potencialmente fatal (SUN *et al.*, 2020). Embora os pulmões sejam o principal órgão afetado pela COVID-19, sabe-se agora que a doença pode afetar e causar danos irreversíveis ao sistema nervoso central, músculo cardíaco e muitos outros tecidos e órgãos (GUPTA *et al.*, 2020).

O novo coronavírus, agente etiológico da COVID-19, foi denominado SARS-CoV-2 devido à sua alta semelhança genômica com o vírus SARS-CoV original, agora oficialmente conhecido como SARS-CoV-1 (GORBALENYA *et al.*, 2020). O SARS-CoV-2, identificado na cidade de Wuhan, na China, é um betacoronavírus envelopado (β CoVs) cujo genoma é uma única molécula de RNA positiva (+ssRNA) com aproximadamente 30.000 bases de comprimento (CHAN *et al.*, 2020). Dentre as proteínas codificadas pelo vírus, 4 são estruturais: (1) fosfoproteína do nucleocapsídeo (N); (2) glicoproteína de membrana (M); (3) proteína do envelope (E); e finalmente, (4) a glicoproteína de superfície, também conhecida como Spike ou proteína S, foco deste trabalho.

Spike, além de ser uma proteína estrutural transmembrana, é uma proteína de fusão classe I cuja função é permitir que o SARS-CoV-2 entre em suas células hospedeiras. Essa glicoproteína é dividida em duas subunidades, S1 e S2, cada uma com função própria (WRAPP *et al.*, 2020). A subunidade S1 contém o domínio de ligação ao receptor (RBD), região responsável pela ligação do vírus à membrana celular por meio de seu receptor, a enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ACE2). Por sua vez, a subunidade S2 participa do processo de fusão do envelope viral com a membrana celular, é nesta subunidade que se localizam o domínio transmembranar, o peptídeo de fusão e o peptídeo de fusão interna (LAN *et al.*, 2020 WRAPP *et al.*, 2020).

Devido à sua localização e função essenciais para o vírus, a Spike é um dos principais alvos da imunidade adaptativa e inata, isto é, adquirida por meio da vacinação, independentemente da tecnologia utilizada (mRNA, vetor não replicante, vírus inativado, etc.) ou por infecção, pois a neutralização dessa proteína por anticorpos pode garantir a não infecção (WAN *et al.*, 2020). Embora o desenvolvimento, a aprovação e a aplicação em

massa das vacinas tenham ocorrido em tempo recorde - fatos que ajudaram a reduzir o número de casos e limitaram a circulação do vírus - eles têm se mostrado insuficientes por si só devido a várias razões: (1) existe uma parcela da população que não pode ser vacinada; (2) baixa adesão às doses de reforço; (3) surgimento de sequelas pós-infecção mesmo em indivíduos vacinados; (4) a evolução constante do vírus, devido ao surgimento alarmante de subvariantes como a BQ, XBB e a Eris, que são mais infecciosas que a própria Ômicron (DYER, 2023; WANG *et al.*, 2022).

Dessa forma, hoje é necessário se pensar não somente na transmissão do vírus, mas também nas consequências da infecção e continuar investindo no desenvolvimento de tecnologias para o combate à COVID-19 e suas sequelas. Além dos imunizantes, os fármacos e biofármacos antivirais merecem a devida atenção, uma vez que são importantíssimos no tratamento da infecção. Dentre as diversas classes de medicamentos antivirais, estão os inibidores de fusão, que atuam nas etapas iniciais da invasão da célula hospedeira e bloqueiam tanto a ligação do vírus à superfície da mesma, quanto à fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática (VIGANT; SANTOS; LEE, 2015).

Desde o início da emergência sanitária em 2020, diversas pesquisas objetivaram o desenvolvimento de potenciais inibidores de fusão contra o vírus SARS-CoV-2, que vão desde de pequenas moléculas orgânicas à peptídeos e anticorpos monoclonais, e tais substâncias têm como alvo a proteína Spike, em especial os domínios NTD, RBD e HR1 (JIANG *et al.*, 2021). Uma característica em comum desses estudos é o emprego de cultura de células para a triagem e teste inicial dos compostos desenvolvidos. Apesar de ser uma ferramenta padrão ouro para este fim, a cultura de células e o emprego de vírus ativo ou pseudovírus é uma técnica laboriosa, com custos elevados de material e capital técnico, que exige mão de obra altamente especializada e treinada, e que além disso, expõe o analista à riscos de biossegurança e que consome um tempo considerável (MÜLLER *et al.*, 2021; GRIGOROV *et al.*, 2011).

Algumas tecnologias alternativas aos métodos que utilizam a cultura de células foram desenvolvidas para facilitar a triagem de novos medicamentos antivirais e já estão disponíveis de forma comercial (TAN *et al.*, 2020). Nesse sentido, o presente trabalho buscou contribuir com o desenvolvimento de uma plataforma para a bioprospecção de inibidores de fusão contra o vírus SARS-CoV-2, baseada na atividade carboxipeptidase do receptor ACE2 e sua interação com o RBD do vírus.

6 CONCLUSÕES

- Os métodos apresentados neste trabalho para transformação e seleção das linhagens *E. coli* DH5a e BL21 (DE3) foram adequados e apresentaram resultados satisfatórios;
- Foi possível produzir o vetor de expressão pET-28a/rRBD, atestar a presença e confirmar a identidade genética do gene alvo;
- As condições de expressões testadas - concentração de indutor IPTG e tempo de cultivo - não apresentaram diferenças significativas entre si e, portanto, as escolhidas foram as encontradas com maior frequência na literatura: 1 mM de indutor e 4 horas de expressão;
- Foi possível produzir o rRBD em plataforma procariótica de forma satisfatória;
- A aplicação da técnica de cromatografia IMAC em conjunto com a diálise em membrana com corte molecular de 10 kDa resultaram na obtenção do rRBD com pureza adequada;
- A presença do rRBD nas frações onde houve a indução da expressão foi confirmada por SDS-PAGE e Western blot;
- A reatividade do rRBD foi confirmada através da técnica de dot blot pela aplicação de um *pool* de anticorpos anti-RBD;
- A atividade enzimática do receptor ACE2 foi aumentada em até 6 vezes pela interação com o rRBD;
- O uso de inibidores da interação rRBD-ACE2 reduziu o aumento na atividade da enzima;
- Fica provada a aplicabilidade da atividade enzimática de ACE2 e sua modulação pela interação com o RBD do vírus SARS-CoV-2 como uma alternativa para a identificação de inibidores dessa interação;

8 REFERÊNCIAS

AKHMEROV, A.; MARBAN, E. COVID-19 and the heart. **Circulation Research**, v. 126, n. 10, 7 abr. 2020. DOI 10.1161/circresaha.120.317055. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32252591/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288–1296, 2009. DOI 10.1590/s0100-40422009000500035. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/Py8KhHJ8Ck7pNbxSvTHY6MK/>. Acesso em: 18 maio. 2021.

CHAN, J. F.-W.; KOK, K.-H.; ZHU, Z.; CHU, H.; TO, K. K.-W.; YUAN, S.; YUEN, K.-Y. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes ; Infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 1 jan. 2020. DOI 10.1080/22221751.2020.1719902. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31987001/>. Acesso em: 6 jan. 2023.

CHUNG, J. Y.; THONE, M. N.; KWON, Y. J. COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 1–25, mar. 2021. DOI 10.1016/j.addr.2020.12.011 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7759095/pdf/main.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2023.

COLLUCCI, C. **Contra falta de remédio, Brasil busca reduzir dependência de importação de insumos farmacêuticos.** 2022. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/eqilibrioesaude/2022/08/contra-falta-de-remedio-brasil-busca-reduzir-dependencia-de-importacao-de-insumos-farmaceuticos.shtml>. Acesso em: 29 jan. 2023.

CORMAN, V. M.; MUTH, D.; NIEMEYER, D.; DROSTEN, C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 100, p. 163–188, 2018. DOI 10.1016/bs.aivir.2018.01.001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7112090/>. Acesso em: 29 jan. 2023.

DUBENDORF, J. W.; STUDIER, F. William. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. **Journal of Molecular Biology**, v. 219, n. 1, p. 45–59, maio 1991. DOI 10.1016/0022-2836(91)90856-2

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283691908562?via%3Dihub>.

DYER, O. Covid-19: Infections climb globally as EG.5 variant gains ground. **BMJ**, v. 382, p. p1900, 16 ago. 2023. DOI 10.1136/bmj.p1900. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/382/bmj.p1900>. Acesso em: 18 ago. 2023.

FANG, L.; KARAKIULAKIS, G.; ROTH, M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, mar. 2020. DOI 10.1016/s2213-2600(20)30116-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32171062/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

GAO, X. *et al.* Expression and functional identification of recombinant SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) from E. coli system. **Preparative Biochemistry; Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 318–324, 30 jun. 2021. DOI 10.1080/10826068.2021.1941106. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826068.2021.1941106?casa_token=pt0OWYrvcqkAAAAA%3A2P4w3knL-M-2nQIDyomHY7tCzO7zzp-RjQadbmmEMlDgOV8_-O2h2NpHsa7bQjucQUlDgR3mZF22Fs. Acesso em: 5 fev. 2023.

GORBALENYA, A. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 1–9, 2 mar. 2020. DOI 10.1038/s41564-020-0695-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>. Acesso em: 6 jan. 2023.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning : a laboratory manual**. V. 1. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GRIGOROV, B. *et al.* Rapid Titration of Measles and Other Viruses: Optimization with Determination of Replication Cycle Length. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24135, 7 set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024135>. Acesso em: 16 set. 2023.

GUO, L. *et al.* Targetable elements in SARS-CoV-2 S2 subunit for the design of pan-coronavirus fusion inhibitors and vaccines. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v.

8, n. 1, 10 maio 2023. DOI 10.1038/s41392-023-01472-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01472-x>. Acesso em: 16 set. 2023.

GUPTA, A. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, jul. 2020. DOI 10.1038/s41591-020-0968-3. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0968-3>. Acesso em: 6 jan. 2023.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1089–1098, 18 set. 2015. DOI 10.3109/07388551.2015.1084264.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, jun. 1983. DOI 10.1016/s0022-2836(83)80284-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283683802848?via%3Dihub>. Acesso em: 19 jan. 2023.

HOMMA, A. *et al.* A Crise das Vacinas e de Insumos e a Produção Local para Enfrentar a Pandemia. **Diplomacia da Saúde - Fiocruz**, v. 11, p. 165–184, 2022. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/images/a-crise-das-vacinas-e-de-insumos-e-a-producao-local-para-enfrentar-a-pandemia.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2023.

JIANG, S.; HILLYER, C.; DU, L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. **Trends in Immunology**, abr. 2020. DOI 10.1016/j.it.2020.03.007.

JIANG, S.; ZHANG, X.; DU, L. Therapeutic antibodies and fusion inhibitors targeting the spike protein of SARS-CoV-2. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, p. 1–7, 17 set. 2020. DOI 10.1080/14728222.2020.1820482. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14728222.2020.1820482>. Acesso em: 30 jan. 2021.

JOHN HOPKINS UNIVERSITY. **Johns Hopkins Coronavirus Resource Center**. c2023. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Acesso em: 6 jan. 2023.

KILBY, J. M. *et al.* The Safety, Plasma Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of Subcutaneous Enfuvirtide (T-20), a Peptide Inhibitor of gp41-Mediated Virus Fusion, in HIV-Infected Adults. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 18, n. 10, p. 685–693, 1 jul. 2002. DOI 10.1089/088922202760072294. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12167274/>. Acesso em: 24 ago. 2023.

LAN, J. *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, v. 581, 30 mar. 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2180-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2180-5>. Acesso em: 6 jan. 2023.

LI, G.; LI, W.; FANG, X.; SONG, X.; TENG, S.; REN, Z.; HU, D.; ZHOU, S.; WU, G.; LI, K. Expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in inclusion bodies and its application in serological detection. **Protein Expression and Purification**, v. 186, p. 105908, maio 2021. DOI 10.1016/j.pep.2021.105908. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592821000917?casa_token=wVkVaagc_qkAAAAA:jp2Di0cAEFXRrgeaKjcL_QLHb4Bk1uD18N3CfDJM58n1Wn3BjlqfBwLPp oIMhk0phG99XO8EjXo. Acesso em: 17 ago. 2023.

LU, J.; SUN, P. D. High affinity binding of SARS-CoV-2 spike protein enhances ACE2 carboxypeptidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, n. 52, p. jbc.RA120.015303, 13 jan. 2021. DOI 10.1074/jbc.ra120.015303. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33122196/>. Acesso em: 3 jan. 2023.

MANDEL, M.; HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. **Journal of Molecular Biology**, v. 53, n. 1, p. 159–162, 14 out. 1970. DOI 10.1016/0022-2836(70)90051-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4922220/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

MÜLLER, K. *et al.* Comparison of two commercial surrogate ELISAs to detect a neutralising antibody response to SARS-CoV-2. **Journal of Virological Methods**, v. 292, p. 114122, jun. 2021. DOI 10.1016/j.jviromet.2021.114122. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114122>. Acesso em: 2 out. 2021.

NIH. **Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Antibodies**. c2023. Disponível em: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/tables/variants-and-susceptibility-to-mabs/>. Acesso em: 16 set. 2023.

OVERTON, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 5, p. 590–601, maio 2014. DOI 10.1016/j.jviromet.2021.114122. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644613004029>.

PALMER, I.; WINGFIELD, P. T. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*. **Current Protocols in Protein Science**, v. 38, n. 1, nov. 2004. DOI 10.1002/0471140864.ps0603s38. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3518028/#:~:text=High%2>

Dlevel%20expression%20of%20many,form%20in%20the%20periplasmic%20space.. Acesso em: 5 fev. 2023.

PASSARINHO, N. É como soco no estômago: anestesista teme cenas de guerra com falta de sedativos para pacientes intubados. 2021. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-56457568>. Acesso em: 29 jan. 2023.

PHUE, J.-N.; LEE, S. J.; TRINH, L.; SHILOACH, J. Modified Escherichia coli B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with Escherichia coli K (DH5 α). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 831–836, 29 maio 2008. DOI 10.1002/bit.21973.

Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.21973-](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.21973-?casa_token=rlC4wNMOPtEAAAAA:uxtYmkaH_6a-qSdL4JyvJ9ODtTWs_YdlqeqG5_Y8rBQOZKJCpCXdnEc5OTZSTiQ1GHxkvUkB5EqGHZI4Pw)

?casa_token=rlC4wNMOPtEAAAAA:uxtYmkaH_6a-qSdL4JyvJ9ODtTWs_YdlqeqG5_Y8rBQOZKJCpCXdnEc5OTZSTiQ1GHxkvUkB5EqGHZI4Pw. Acesso em: 20 jan. 2023.

PLEMPER, R. K. Cell entry of enveloped viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 2, p. 92–100, ago. 2011. DOI 10.1016/j.coviro.2011.06.002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171968/>. Acesso em: 4 nov. 2019.

PRIMROSE, S. B.; TWYMAN, R. M. **Principles of gene manipulation and genomics**. 7. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.

ROBICHON, C. *et al.* Engineering Escherichia coli BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize E. coli Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4634–4646, 1 jul. 2011. DOI 10.1128/AEM.00119-11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3127686/>.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 172, 17 abr. 2014. DOI 10.3389/fmicb.2014.00172. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00172/full>. Acesso em: 5 fev. 2023.

ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update. **Protein Science**, v. 28, n. 8, p. 1412–1422, jul. 2019. DOI 10.1002/pro.3668. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31219641/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

SHEHADUL ISLAM, M.; ARYASOMAYAJULA, A.; SELVAGANAPATHY, P. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. **Micromachines**, v. 8, n. 3, p. 83, 8 mar. 2017. DOI 10.3390/mi8030083. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-666x/8/3/83>. Acesso em: 16 ago. 2023.

SOUTH, A. M.; DIZ, D.; CHAPPELL, M. C. COVID-19, ACE2 and the Cardiovascular Consequences. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 318, n. 5, 31 mar. 2020. DOI 10.1152/ajpheart.00217.2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32228252/>. Acesso em: 16 ago. 2023.

STUDIER, F.*et al.* W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in Enzymology**, v. 185, p. 60–89, 1990. DOI 10.1016/0076-6879(90)85008-c. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2199796/>.

SU, Q.-D. *et al.* Recombinant SARS-CoV-2 RBD with a built in T helper epitope induces strong neutralization antibody response. **Vaccine**, v. 39, n. 8, p. 1241–1247, fev. 2021. DOI 10.1016/j.vaccine.2021.01.044.

SUN, P.; QIE, S.; LIU, Z.; REN, J.; LI, K.; XI, J. Clinical characteristics of 50 466 hospitalized patients with 2019-nCoV infection. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, 11 mar. 2020. DOI 10.1002/jmv.25735. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.25735?casa_token=fBTCs0EkoFAAAAAA%3AMF9fmuavsR0ovx_zeD0fa4Tz_G5W0E1rLVjYf4VHoeBX7SruR4aVGscwO-Dm3Pj43xki1oO1nVvetTRv. Acesso em: 6 jan. 2023.

TAN, C. W.; CHIA, W. N.; QIN, X. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1073–1078, 1 set. 2020. DOI 10.1038/s41587-020-0631-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0631-z>. Acesso em: 5 fev. 2023.

THERMO SCIENTIFIC. **T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers: 260/280 and 260/230 Ratios**. Wilmington: Thermo Fisher Scientific, [2019]. Disponível em: https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf. Acesso em: 5 fev. 2023.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. 420, 20 dez. 2019. DOI

10.3389/fbioe.2019.00420. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6932962/>.

TRIVEDI, R. N. *et al.* High-Level Production of Plasmid DNA by *Escherichia coli* DH5 α Ω *sacB* by Introducing *inc* Mutations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 23, p. 7154–7160, dez. 2014. DOI 10.1128/aem.02445-14 Disponível em:
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.02445-14>. Acesso em: 19 jan. 2023.

VALÉCIO, M. de. **Covid-19:** faltam medicamentos para intubação. 2021. Disponível em:
<https://ictq.com.br/farmacia-hospitalar/1814-covid-19-faltam-medicamentos-para-intubacao>.
 Acesso em: 5 nov. 2021.

VIGANT, F.; SANTOS, N. C.; LEE, B. Broad-spectrum antivirals against viral fusion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 426–437, 15 jun. 2015. DOI 10.1038/nrmicro3475. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro3475>. Acesso em: 16 ago. 2023.

WAN, J.; *et al.* Human-IgG-Neutralizing Monoclonal Antibodies Block the SARS-CoV-2 Infection. **Cell Reports**, v. 32, n. 3, p. 107918, jul. 2020. DOI 10.1016/j.celrep.2020.107918. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124720308998>. Acesso em: 6 jan. 2023.

WANG, Q. *et al.* Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants. **Cell**, dez. 2022. DOI 10.1016/j.cell.2022.12.018. Disponível em:
[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(22\)01531-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867422015318%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(22)01531-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867422015318%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 6 jan. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Convened global study of origins of SARS-CoV-2: China Part.** 2021. Disponível em:
<https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>. Acesso em: 29 jan. 2023.

WISSKIRCHEN, K.; LUCIFORA, J.; MICHLER, T.; PROTZER, U. New pharmacological strategies to fight enveloped viruses. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 9, p. 470–8, 2014. DOI 10.1016/j.tips.2014.06.004. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108320>. Acesso em: 16 set. 2023.

WRAPP, D.; WANG, N.; CORBETT, K. S.; GOLDSMITH, J. A.; HSIEH, C.-L.; ABIONA, O.; GRAHAM, B. S.; MCLELLAN, J. S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 19 fev. 2020. DOI 10.1126/science.abb2507. Disponível em:

<https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.abb2507>. Acesso em: 6 jan. 2023.

WYSOCKI, J.; SCHULZE, A.; BATLLE, D. Novel Variants of Angiotensin Converting Enzyme-2 of Shorter Molecular Size to Target the Kidney Renin Angiotensin System. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 886, 17 dez. 2019. DOI 10.3390/biom9120886. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6995632/>. Acesso em: 17 mar. 2024.

XIA, S. *et al.* Peptide-based pan-CoV fusion inhibitors maintain high potency against SARS-CoV-2 Omicron variant. **Cell Research**, 27 jan. 2022. DOI 10.1038/s41422-022-00617-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41422-022-00617-x>; Acesso em: 18 mar. 2022.

XIAO, F.; BURNS, K. D. Measurement of Angiotensin Converting Enzyme 2 Activity in Biological Fluid (ACE2). **Hypertension**, v. 1527, p. 101–115, 24 jan. 2017. DOI 10.1007/978-1-4939-6625-7_8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7121061/>. Acesso em: 17 mar. 2024.

YAMAGUCHI, T.; HOSHIZAKI, M.; MINATO, T.; NIRASAWA, S. ACE2-like carboxypeptidase B38-CAP protects from SARS-CoV-2-induced lung injury. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 6791, 23 nov. 2021. DOI 10.1038/s41467-021-27097-8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-27097-8>. Acesso em: 16 ago. 2023.

ZHU, Y.; YU, D.; YAN, H.; CHONG, H.; HE, Y. Design of Potent Membrane Fusion Inhibitors against SARS-CoV-2, an Emerging Coronavirus with High Fusogenic Activity. **Journal of Virology**, v. 94, n. 14, jul. 2020. DOI 10.1128/jvi.00635-20.

ZOST, S. J. *et al.* Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 443–449, 15 jul. 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2548-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2548-6>. Acesso em: 29 jan. 2023.