

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus Araraquara

Gabriel Brenner

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS
SARS-CoV-2

Araraquara, Sp
2022

Gabriel Brenner

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: análise clínicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a Danielle Biscaro Pedrolli

Araraquara

2022

Brenner, Gabriel.
B732d Desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico do vírus SARS-CoV-2 / Gabriel Brenner. – Araraquara: [S.n.], 2022.
71 f. : il.

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 concentração: Análises Clínicas.

Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.

1. Biologia sintética. 2. Diagnóstico viral. 3. Circuito genético. 4. Riboreguladores tipo Toehold. 5. Expressão gênica in vitro. I. Pedrolli, Danielle Biscaro, 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: DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSORES PARA IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS SARS-COV-2

AUTOR: GABRIEL BRENNER

ORIENTADORA: DANIELLE BISCARO PEDROLI

COORDINADORA: MILCA RACHEL DA COSTA RIBEIRO LINS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELLE BISCARO PEDROLI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Profa. Dra. NÁDIA MARIA VIEIRA SAMPAIO (Participação Virtual)
Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) / Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM

Prof. Dr. ADRIANO MONDINI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 29 de novembro de 2022

Resumo

O diagnóstico preciso de COVID-19 é feito hoje, principalmente, por técnica de RT-PCR, que demanda equipamentos laboratoriais e mão de obra especializada para a realização do teste, o que encarece o diagnóstico e, principalmente, torna o processo moroso. Além disso, essa dependência de estrutura laboratorial torna o diagnóstico inviável em regiões remotas do Brasil, outra opção é a utilização de testes de antígeno, que são mais rápidos e baratos, porém possuem uma menor eficácia pois eles não conseguem detectar os anticorpos antes do sétimo dia de infecção. Como contrapartida ao teste utilizando a reação de PCR, o desenvolvimento de um riboregulador do tipo *toehold switch* se torna uma alternativa interessante devido ao seu baixo custo, fácil manuseio e alta sensibilidade e especificidade. Este projeto propõe o desenvolvimento de biossensores do tipo para a identificação rápida de RNA viral de Sars-Cov-2. Para tanto, foi construído um dispositivo de RNA regulatório capaz de ativar a expressão de um gene repórter a partir da identificação do RNA viral. Os *toehold switch* construídos à partir das sequências de RNA viral do SARS-CoV-2 foram clonados em um plasmídeo contendo o gene repórter Epic Luciferase através da técnica de digestão e ligação e testados em reações de tradução e transcrição *cell free*, obtendo resultados promissores onde o *switch* 8a apresentou um aumento de expressão de 3 vezes quando comparado o *trigger* específico com os controles. Os resultados obtidos mostram que a utilização de riboreguladores do tipo *toehold switch* para detecção do vírus SARS-CoV-2 é promissora.

Palavras-Chave: Biologia sintética, Diagnóstico viral, Circuito genético, Riboreguladores tipo Toehold, Expressão gênica in vitro

Abstract

The precise diagnosis of COVID-19 is made today, mainly, by the RT-PCR technique, which requires laboratory equipment and specialized labor to carry out the test, which makes the diagnosis more expensive and, above all, makes the process time-consuming. In addition, this dependence on laboratory structure makes the diagnosis unfeasible in remote regions of Brazil, another option is the use of antigen tests like lateral flow immunotherapy tests, which are faster and cheaper, but are less effective because they cannot detect antibodies before the seventh day of infection.. As a counterpart to the test using the PCR reaction, the development of a toehold switch riboregulator becomes an interesting alternative due to its low cost, easy handling and high sensitivity and specificity. This project proposes the development of biosensors of this type for the rapid identification of Sars-Cov-2 viral RNA. To this end, a regulatory RNA device capable of activating the expression of a reporter gene was built from the identification of viral RNA. The toehold switches constructed from the SARS-CoV-2 viral RNA sequences were cloned into a plasmid containing the Epic Luciferase reporter gene through the digestion and ligation technique and tested in cell free translation and transcription reactions, obtaining promising results where switch 8a showed a 3-fold increase in expression when comparing the specific trigger with controls. The results obtained show that the use of toehold switch riboregulators for the detection of the SARS-CoV-2 virus is promising.

Keywords: Synthetic biology, viral diagnosis, genetic circuit, toehold switch, *in vitro* gene expression

1. Introdução	7
1.1 Variantes do SARS-CoV-2	9
1.2 Infecção por SARS-CoV-2	11
1.3 Epidemiologia da Covid-19	12
1.3.1 Covid-19 no Brasil	13
1.4 Diagnóstico	16
1.4.1 RT-PCR	17
1.4.2 Imunocromatografia	18
1.4.3 RT-LAMP	20
1.4.4 Comparação entre os testes comerciais	20
1.4.5 Métodos diagnósticos em desenvolvimento	21
1.5 Toehold Switch	24
1.5.1 Toehold switch para detecção do SARS-CoV-2	32
1.6 Comparação entre os métodos diagnósticos em desenvolvimento	34
2. Objetivo	35
2.1 Objetivos específicos	35
3. Materiais e métodos	35
3.1 Seleção das sequências-alvo para construção dos RNA switches	36
3.2 Design in silico dos biossensores	37
3.3 Construção do sistema de expressão	39
3.4 Síntese dos RNA Triggers	43
3.5 Teste de funcionalidade e especificidade dos RNAs switch	44
4. Resultados e discussão	46\
4.1 Seleção das sequências-alvo para construção dos RNA switches	46
4.2 Design in silico dos biossensores	47
4.3 Construção do sistema de expressão	54
4.4 Teste de funcionalidade e especificidade dos RNAs switch	57
5. Conclusões	63
6. Referências Bibliográficas	64

1. Introdução

A família *Coronaviridae* é composta por vírus de RNA fita simples positiva envelopados e possuem os maiores genomas dos vírus de RNA (27kb a 32kb), estes grandes genomas são possíveis apenas devido a um sistema de *proof-reading* presente nos vírus desta família que evita um grande acúmulo de mutações que poderiam causar erros na replicação viral (ENJUANES, *et al.*, 2022). Este genoma é composto por um conjunto de 4 genes que codificam proteínas estruturais, sendo elas a spike (S), a da membrana (M), o envelope (E) e o nucleocapsídeo (N) e outros 16 genes que codificam proteínas não estruturais (RAABAN, *et al.*, 2020; TAKENOUCHI, *et al.*, 2021). Estes vírus possuem altos níveis de mutação devido à propensão à erros da RNA polimerase e à recombinação frequente entre diferentes cepas de coronavírus, o que possibilita a adaptação do vírus à pressão seletiva do meio levando à um aumento na diversificação do vírus e eventual evolução (ENJUANES, *et al.*, 2021; THAKUR *et al.*, 2021).

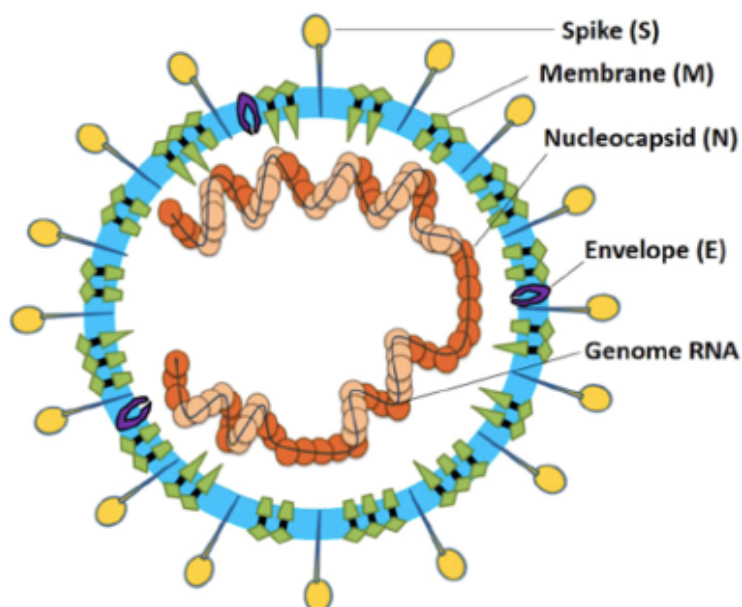
À família *Coronaviridae* possui 3 subfamílias sendo elas *Letovirinae*, *Orthocoronavirinae* e *Pitovirinae* esta última é dividida em 4 gêneros, sendo os únicos que possuem vírus que afetam humanos os gêneros *Alphacoronavirus* através dos vírus HCoV-229E e HCoV-NL63 e os *Betacoronavirus* através dos vírus HCoV-HKU1, HCoV-OC43, MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2 (LIU, *et al.*, 2021). Os vírus HCoV-HKU1, HCoV-OC43, HCoV-229E e HCoV-NL63 são responsáveis por 15% à 30% dos casos de resfriado comum em adultos apresentando sintomas mais leves que podem ser mais fortes em crianças, idosos e pessoas imunossuprimidas, enquanto os vírus SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 apresentam sintomas mais graves (LIU, *et al.*, 2021).

O SARS-CoV-2 é composto por 4 proteínas estruturais sendo elas E, M, N e S (**Figura 1**). A Proteína E é uma proteína transmembrana que forma um canal iônico e tem uma massa molecular aproximada de 8-12 kDa. A sua porção N-terminal localiza-se na parte externa e a C-terminal na parte interna da membrana. Cepas de SARS-CoV recombinantes, com a exclusão da proteína E, demonstraram uma virulência e aptidão competitiva inferiores quando comparadas ao vírus selvagem (NIETO-TORRES, *et al.*, 2014; RAABAN, *et al.*, 2020). A proteína M é uma proteína com uma massa molecular de 25-30 kDa,

sendo encontrada como um dímero. Essa proteína dá formato ao vírus, mantendo a curvatura da membrana e é a peça central na montagem de novas partículas virais, assim como a proteína E, sua porção N-terminal localiza-se na parte externa e a C-terminal na parte interna da membrana (NEUMAN, *et al.*, 2011). A proteína N é formada por 2 domínios, um N-terminal e um C-terminal, é altamente fosforilada, o que aumenta a sua afinidade pelo RNA viral, e sua principal função é o encapsulamento do RNA viral no virião, através de uma interação com a proteína M (HURST, *et al.*, 2013). A proteína spike possui 150-200 kDa e é altamente glicosilada na porção N. Essa proteína é clivada por uma protease do hospedeiro em 2 domínios funcionais, o S1 que se liga ao receptor da membrana celular da célula hospedeira, e o S2 que permite que o vírus faça a fusão com a membrana da célula hospedeira (TANG, *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 possui 16 proteínas não estruturais (*non-structural proteins*, Nsp), essas proteínas possuem diversas funções como à Nsp1 que suprime a síntese de proteínas da célula hospedeira e à resposta à base de interferons, à Nsp3 é uma papain-like protease, à Nsp5 é a protease principal dos coronavírus às Nsp7, 8, 9 e 10 estão associadas ao complexo de replicação juntamente com a Nsp12 que é uma RNA polimerase, à Nsp13 é responsável por separar duplas fitas de DNA para prover o template para a síntese de RNA à Nsp14 é responsável pelo *proofreading* do RNA genômico e às Nsps 15 e 16 tem um importante papel em combater o sistema imune do hospedeiro (LIU *et al.*, 2021).

Figura 1: Figura ilustrativa da composição viral.



1.1 Variantes do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 possui diversas variantes sendo elas divididas entre variantes de interesse (*variants of interest*, VOI) ou variantes de preocupação (*variants of concern*, VOC), para uma variante ser considerada uma VOI ela deve apresentar mutações que são suspeitas ou conhecidas por causar mudanças significativas e têm ampla circulação (muitos grupos infectados ou circulação em diversos países) (OMS, 2022). Essas variantes são observadas continuamente casos elas venham a se tornar VOCs, que por sua vez são variantes que se espalham com maior facilidade, causam sintomas mais graves, evadem à resposta imunológica, mudam à apresentação clínica ou diminuem à efetividade das ferramentas utilizadas no combate da doença (medidas de saúde pública, diagnóstico, tratamentos ou vacinas) (OMS, 2022). Essas diferentes VOCs e VOIs apresentam principalmente mutações na proteína S, podendo ser deleções, substituições ou recombinações, essas alterações podem criar variantes altamente letais e altamente transmissíveis através de alterações na afinidade da ligação com a ACE-2 (THAKUR *et al.*, 2022).

Já foram observadas 9 variantes que foram identificadas como VOI, sendo à de maior interesse entre essas à variante Delta que foi reclassificada como VOC posteriormente, atualmente todas essas variantes já foram desclassificadas não

existindo nenhuma variante classificada como VOI no presente momento (OMS, 2022) (**Tabela 1**). Atualmente existe apenas uma variante classificada como VOC, a Omicron, porém já foram identificadas 5 VOCs diferentes (**Tabela 2**).

Atualmente a única variante que tem sido encontrada nos sequenciamentos realizados de pessoas infectadas é à omicron em 99% dos casos, sendo este o motivo de não existir mais nenhuma variante classificada como VOI e à única VOC ser à própria omicron (OMS, 2022).

Tabela 1: Variantes do SARS-CoV-2 previamente descritas como VOI. Fonte: OMS 2022.

Identificação OMS	Primeira observação	Designação como VOI	Desclassificação
Epsilon	03/2020, EUA	05/03/2021	06/07/2021
Zeta	04/2020, Brasil	17/03/2021	06/07/2021
Eta	12/2020, diversos países	17/03/2021	20/09/2021
Theta	01/2021, Filipinas	24/03/2021	06/07/2021
Iota	11/2020, EUA	24/03/2021	20/09/2021
Delta	10/2020, Índia	04/04/2021	11/05/2021
Kappa	10/2020, Índia	04/04/2021	20/09/2021
Lambda	12/2020, Peru	14/06/2021	09/03/2022
Mu	01/2021, Colômbia	30/08/2021	09/03/2022

Tabela 2: Variantes do SARS-CoV-2 descritas como VOC, à única variante que ainda é descrita como VOC é a Omicron, todas as outras já foram desclassificadas. Fonte OMS, 2022.

Identificação OMS	Primeira observação	Designação como VOC	Desclassificação
Alpha	09/2020, Reino Unido	18/12/2020	09/03/2022
Beta	04/2020, África do Sul	18/12/2020	09/03/2022
Gamma	11/2020, Brasil	11/01/2021	09/03/2022
Delta	10/2020, Índia	11/05/2021	07/06/2022
Omicron	11/2021, diversos países	26/11/2021	-

1.2 Infecção por SARS-CoV-2

Na fase inicial da infecção, o SARS-CoV-2 acessa o parênquima pulmonar onde começa a se proliferar. A porção S1 da proteína spike se liga ao receptor ACE2 da célula hospedeira, proteína de membrana importante para o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Após esta ligação a ACE2 a infecção pode ocorrer de duas maneiras, caso a célula alvo contenha a TMPRSS2, serinoprotease transmembrana II, a proteína S é clivada separando os domínios S1 e S2, o domínio S2 permite então a fusão do virião com a membrana celular da célula alvo (HOFFMANN *et al.*, 2020). Caso o complexo ACE2-SARS-CoV-2 não entre em contato com a TMPRSS2 a partícula viral é internalizada por endocitose e a proteína S é clivada por catepsinas separando os domínios S1 e S2 permitindo assim a fusão do virião com a membrana celular (JACKSON *et al.*, 2021).

À replicação e transcrição do genoma viral ocorre na membrana citoplasmática da célula infectada, onde um complexo formado por até 16 subunidades virais e diversas proteínas celulares coordenam a replicação viral, o virião é montado na membrana celular e após ocorrer a incorporação do RNA viral começa um processo de brotamento, permitindo que o vírus infecte outras células (MOUSAVIZADEH *et al.*, 2020). A replicação e o brotamento viral causam a apoptose de células alveolares do tipo 2 o que provoca uma resposta

inflamatória que, juntamente com o stress oxidativo, causam lesões e necrose de células alveolares (IMAI *et al.*, 2008). Essas lesões no parênquima pulmonar pode levar a diversas complicações como hipóxia, choque séptico, lesões agudas em diversos órgãos como o coração, o fígado e os rins, hemorragia, infecções secundárias, dentre outras (TSANG, *et al.*, 2020).

1.3 Epidemiologia da Covid-19

A transmissão da Covid-19 se dá de pessoa para pessoa através do contato direto com a pessoa infectada ou através de gotículas e aerossóis expelidas através da tosse ou espirros esses aerossóis permanecem viáveis no ar por até três horas, enquanto as gotículas podem viajar até 8 metros de distância e ficam viáveis em superfícies metálicas por até 14 dias e em superfícies plásticas por até 21 dias (HOSSEINI *et al.*, 2021; SALIAN *et al.*, 2021).

No dia 18 de dezembro de 2019 foram identificados os primeiros casos de Covid-19 em Wuhan, China, onde 5 pacientes foram hospitalizados com síndrome respiratória aguda grave, tendo como o ponto epidemiológico em comum um mercado de frutos do mar e animais vivos da cidade (BOGOCH *et al.*, 2020). Um mês após os primeiros casos, já haviam mais de 7000 ocorrências da doença apenas na China e quase 100 casos no resto do mundo em países como Alemanha, Canadá, Estados Unidos, França, Finlândia. O primeiro milhão de casos foi confirmado menos de 5 meses após os primeiros relatos, neste mesmo período de tempo ocorreram mais de 50 mil óbitos, sendo as áreas mais afetadas neste momento a Europa, com mais de 500 mil ocorrências da doença, e as Américas, com mais de 200 mil casos (ROTHAN *et al.*, 2020; OMS, 2020). Em 6 meses foram relatados mais de 4.6 milhões de casos de Covid-19 e mais de 300 mil óbitos. As regiões mais afetadas continuaram sendo a Europa e as Américas, sendo os 2 países mais afetados os EUA com 1,4 milhões de ocorrências da doença e a Rússia com 290 mil casos (OMS, 2020). No primeiro ano da pandemia, foram registrados 75 milhões de ocorrências da doença e 1,6 milhões de óbitos, as regiões mais afetadas ainda eram a Europa e as Américas com mais de 55 milhões de casos somados e 1,3 milhões de óbitos, sendo os países mais

afetados os EUA e o Brasil (OMS, 2021). Dois anos após os primeiros casos reportados, haviam sido identificados mais de 270 milhões de ocorrências da doença e mais de 5 milhões de óbitos, sendo os países que registraram um maior aumento no número de casos os EUA, o Reino Unido e a França, durante este período de tempo foram identificadas 4 novas VOCs sendo elas à Alpha, Beta, Delta e à Gamma (OMS, 2022). Os dados mais recentes mostram um total de 500 milhões de ocorrências da doença e mais de 6 milhões de mortes mundialmente, sendo os países com a maior incidência de novos casos a Coreia do Sul, a Alemanha e a França, sendo identificada uma nova VOC sendo ela à Omicron (John Hopkins University, 2022).

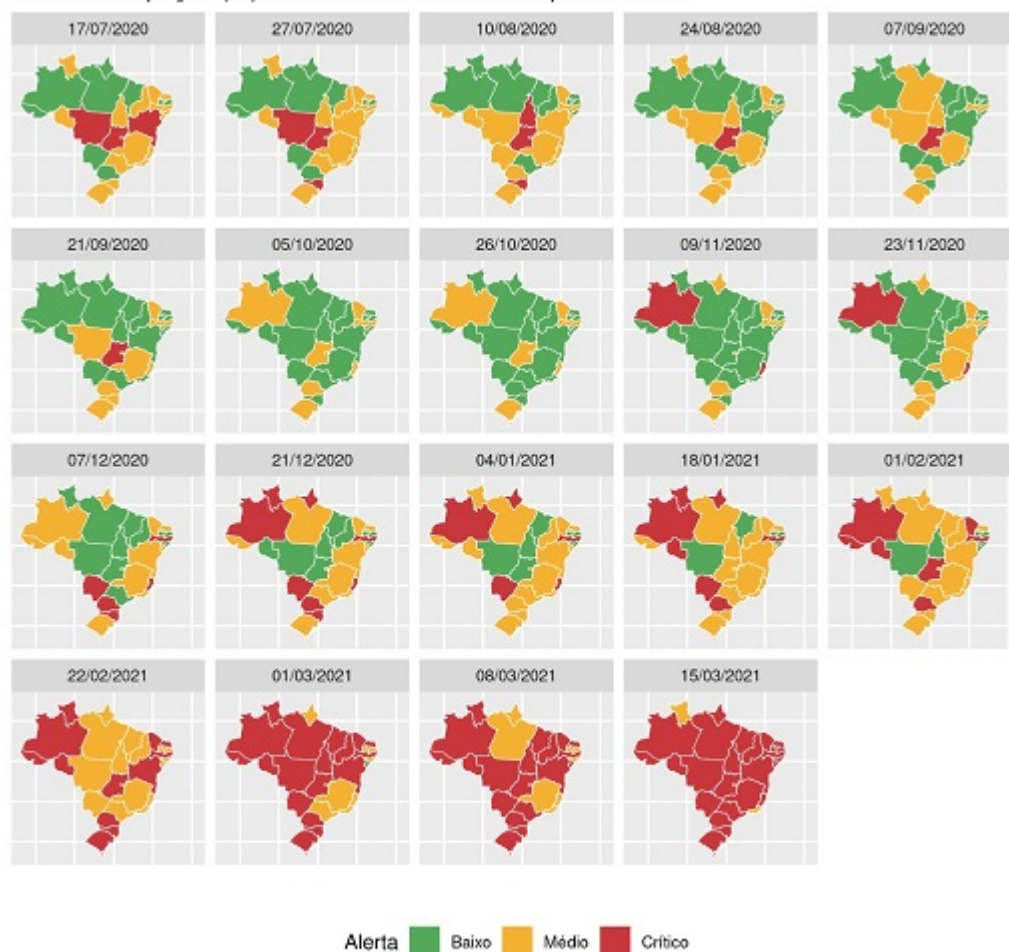
1.3.1 Covid-19 no Brasil

O Brasil teve seu primeiro caso de Covid-19 confirmado no dia 25 de fevereiro de 2020, sendo o primeiro país da América Latina afetado pela doença (Vital Strategies, VS). O Brasil foi fortemente afetado no início da pandemia no final de maio. Três meses após os primeiros relatos de Covid-19 no Brasil, já haviam mais de 500 mil ocorrências no país e quase 30 mil mortes, o que representava mais de 8% dos 6 milhões de casos e dos 370 mil óbitos da doença até o momento, mesmo o Brasil tendo menos de 3% da população mundial total. O único país que havia sido mais afetado que o Brasil durante este período de tempo havia sido os EUA (OMS, 2022).

A segunda onda atingiu o país com ainda mais força, em março de 2021 o país havia acumulado 11,3 milhões de ocorrências da doença e 275 mil óbitos, totalizando quase 10% dos casos e óbitos globais até este momento pela Covid-19, este aumento de casos foi ocasionado principalmente pela identificação de uma nova VOC no país, à variante Gamma (THAKUR *et al*, 2021). Com o aumento no número de casos no país o sistema de saúde ficou sobrecarregado, com todos os estados, com exceção de Roraima, ficando com as taxas de ocupação dos leitos de UTI em estado crítico (**Figura 2**) (Fiocruz, VS).

Figura 2: Evolução dos níveis de ocupação das UTIs do Brasil entre julho de 2020 e março de 2021 (Fiocruz, 2021).

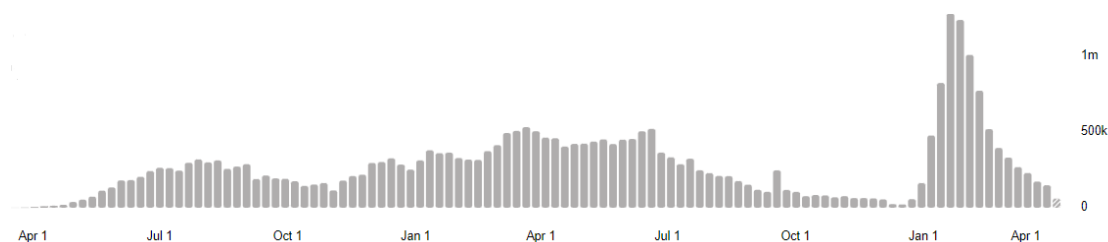
Taxa de ocupação (%) de leitos de UTI Covid-19 para adultos



Observatório Covid-19 | Fiocruz

A quantidade de novos casos no Brasil diminuiu durante o ano de 2022. Após o pico de casos em janeiro de 2022 ocasionado principalmente pelas festas de fim de ano e pela introdução de uma nova VOC, à Omicron, o país vem tendo uma diminuição nos números de novos casos da doença (100,000 ocorrências de Covid-19 por semana), registrando os menores números desde dezembro de 2021 (21,717 casos por semana), quando o país teve seus melhores números desde abril de 2020 (10,567 casos por semana). Até abril de 2022, o Brasil já contabiliza mais de 30 milhões de casos e mais de 660 mil mortes, totalizando 6% dos casos e 10% das mortes globais (**Figura 3**) (OMS, 2022).

Figura 3: Número de casos semanais de Covid-19, Fonte: World Health Organization, 2022.



Porém, estes dados apresentam alguns problemas, pois diversos estudos apontam uma subnotificação de casos no país. Estima-se que haja uma subnotificação de 42% casos no país durante o ano de 2020. Em Curitiba um estudo sorológico estimou uma subnotificação de mais de 47% na cidade durante o ano de 2021, o que indica que o número de 42% de casos não identificados no país é muito próximo da estimativa real (AMARAL *et al.*, 2020; HUERGO *et al.*, 2022). Em 2020 estima-se que houve 42% de subnotificação dos óbitos causados por Covid-19 entre janeiro e junho. A estimativa foi feita através de um estudo que avaliou a quantidade de óbitos por SRAG nos anos anteriores à pandemia com os números obtidos durante os meses de janeiro e junho de 2020, quando foi encontrado um grande aumento nas mortes por SRAG, sendo a única nova fonte de mortes por esse tipo no país a Covid-19 (MARINHO *et al.*, 2021). Essa subnotificação pode ter várias causas, como a dificuldade operacional de se realizar o diagnóstico para identificação da doença, devido a necessidade de equipamentos e mão de obra especializada, o alto custo dos testes que dificulta o acesso da população de baixa renda, a escassez de insumos no país, principalmente nos períodos iniciais da pandemia e a recomendação do governo de apenas realizar testes caso a pessoa esteja com sintomas graves, o que causa uma subnotificação de casos de leve e média gravidade (BASTOS *et al.*, 2020; MARINHO *et al.*, 2021; PRADO *et al.*, 2020;). Ter uma estimativa real do número de casos é de extrema importância para realizar um manejo adequado dos recursos utilizados para combater a pandemia e de medidas de distanciamento pessoal e de controle da doença (MARINHO *et al.*, 2021; PRADO *et al.*, 2020).

Como pode ser observado os casos e óbitos relacionados a Covid-19 no Brasil vem diminuindo no ano de 2022, essa diminuição se dá principalmente devido à vacinação da população (MOURA *et al.*, 2022). À vacinação teve início à partir da terceira semana epidemiológica de 2021, embora à vacinação tenha começado de forma simultânea em todas as regiões do país à evolução da cobertura vacinal se deu de formas distintas, às regiões sul e sudeste apresentaram uma evolução mais rápida quando comparada ao restante do país, enquanto à região sudeste alcançou uma cobertura vacinal de 50% da população na 38ª semana epidemiológica à região norte alcançou esta marca apenas na 48ª semana epidemiológica, está diferença se dá principalmente pelas proporções continentais do país, onde áreas mais remotas e com menos recursos possuem uma maior dificuldade em realizar os manejos adequados dos recursos (AQUINO *et al.*, 2020; MOURA *et al.*, 2022). Ao final do ano de 2021 a cobertura vacinal do país era de aproximadamente 70% da população, subindo para 82,7% da população em dezembro de 2022 (CNS, 2022; MOURA *et al.*, 2022).

1.4 Diagnóstico

Como pudemos analisar anteriormente, o Brasil tem tido dificuldades para diagnosticar efetivamente a doença, por ser um país de proporções continentais os recursos do país são distribuídos de formas desiguais, sendo assim áreas mais remotas do país possuem pouco ou nenhum acesso à infraestrutura necessária para realização da testagem adequada para obtenção de dados mais precisos sobre a pandemia (AQUINO *et al.*, 2020). Uma das causas dessa dificuldade são os métodos diagnósticos disponíveis no mercado, sendo os principais testes utilizados para o diagnóstico da Covid-19 o RT-PCR, testes de antígeno utilizando o ensaio de fluxo lateral e o RT-LAMP. O RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), que é um método extremamente específico e sensível, sendo considerado o padrão ouro para detecção do vírus causador da doença. Porém, este tipo de diagnóstico apresenta alguns problemas como a necessidade de equipamento especializado e profissionais treinados para realizar o teste, além do alto custo e tempo de processamento das amostras. A alternativa são os testes de imunocromatografia para identificação de antígenos do vírus ou para detecção de anticorpos, que costumam ter um custo menor e

uma maior disponibilidade. Porém, possuem baixa sensibilidade, o que o torna uma opção menos confiável (FILCHAKOVA *et al.*, 2022).

Como discutido anteriormente, a necessidade de um diagnóstico preciso da doença é importante para a tomada de decisão do governo e de outras instituições de saúde quanto às medidas para diminuição do impacto na economia e no bem-estar das pessoas causado pela pandemia, e impedir uma maior disseminação do vírus. Portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos capazes de prover um diagnóstico preciso de alta sensibilidade e baixo custo (MAJUMDER *et al.*, 2021; PRADO *et al.*, 2020). Com este objetivo em mente, diversos estudos estão buscando o desenvolvimento de novas técnicas para os diagnósticos *point-of-care* custo-efetivo, alguns exemplos recentes são a RT-LAMP (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification), CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) e dPCR (Digital PCR) (SHARMA *et al.*, 2021). Para o desenvolvimento de um teste com alta sensibilidade é importante avaliar a carga viral dos diferentes tipos de amostra disponíveis para utilização, com essa finalidade foram realizados diversos estudos para avaliar a carga viral presente em diversos tipos de amostra, levando em conta às amostras utilizadas com maior frequência, o esfregaço de garganta possui uma carga viral de aproximadamente $7,99 \times 10^4$ cópias por mL, o escarro possui uma carga de $7,5 \times 10^5$ cópias por mL, já saliva e o *swab* nasal possuem uma média de carga viral de $6,76 \times 10^5$ cópias por mL (PAN *et al.*, 2020; WÖLFEL *et al.*, 2020; YOKOTA *et al.*, 2021)

1.4.1 RT-PCR

O RT-PCR é o padrão ouro para o diagnóstico da Covid-19, sendo uma técnica extremamente específica devido a utilização de primers específicos para o vírus, apresentando uma especificidade de 100% uma sensibilidade de 95% Esta técnica também é utilizada para o diagnóstico de outras doenças virais, além da Covid-19, como a Zika, Dengue e HPV (ARBYN, *et al.*, 2015; CORMAN *et al.*, 2016; CORMAN *et al.*, 2020; FILCHAKOVA *et al.*, 2022).

Para realização do teste, primeiramente é realizada a extração de RNA viral da amostra, em seguida é utilizada uma enzima para a transcrição reversa do RNA viral, que gera uma fita simples de DNA complementar. O cDNA é amplificado pela reação de PCR através de ciclos de desnaturação, anelamento e

extensão, utilizando primers específicos para genes do SARS-COV-2, transformando então esse cDNA em um DNA dupla fita. A reação é desenvolvida em um termociclador, o que aumenta o custo de estrutura necessária para o diagnóstico, devido ao alto valor do equipamento (KEVADYA *et al.*, 2021). A principal forma de coleta de amostra para este tipo de teste é o swab nasofaríngeo. Porém, alternativas já foram testadas como soro, saliva, sangue, swab nasal e escarro, com variados níveis de sucesso (CARTER *et al.*, 2020). O principal molde utilizado para criação dos primers é a região que codifica a proteína S, porém existem kits que utilizam primers para as regiões codificadoras ORF1ab e OR1a e das proteínas RdRp, E e N (AIELENE *et al.*, 2022).

Embora tenha alta especificidade, sensibilidade e versatilidade, a técnica de RT-PCR possui algumas desvantagens como seu alto custo devido a necessidade de mão de obra e equipamentos especializados, o que acaba limitando os laboratórios e hospitais capazes de realizar os testes causando uma carência em locais mais remotos. Além disso, o processamento das amostras é demorado devido a quantidade de etapas presentes no processo.

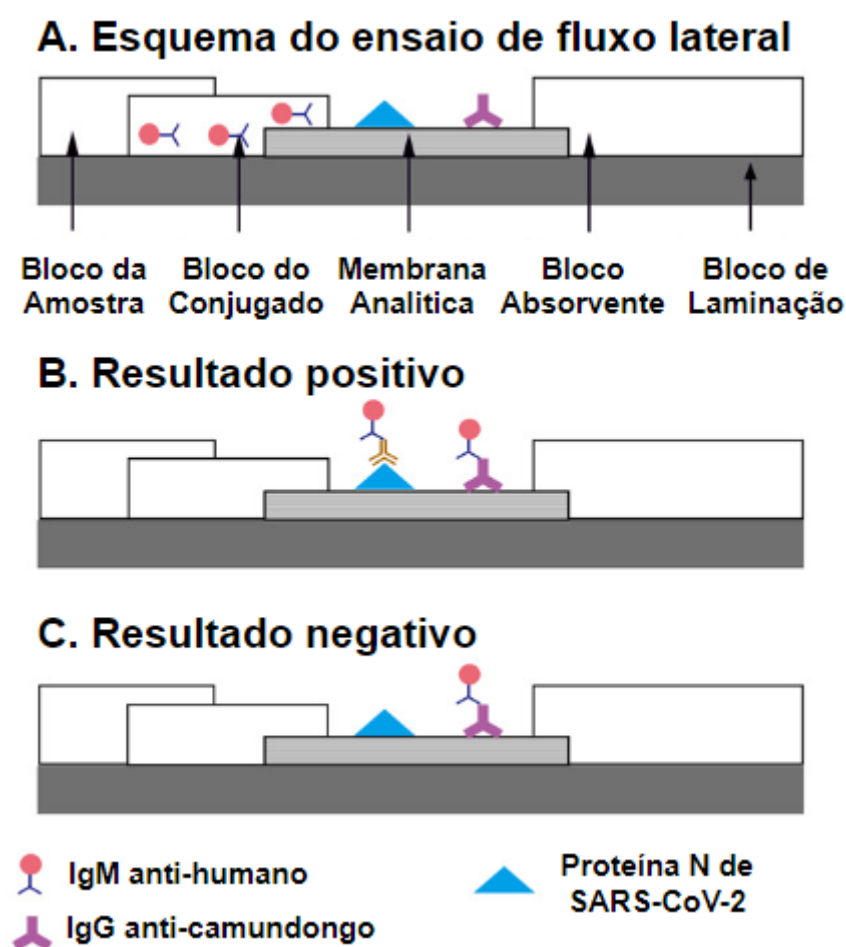
1.4.2 Imunocromatografia

Os testes que utilizam a imunocromatografia, mais especificamente o ensaio de fluxo lateral, são a outra opção comercial de métodos diagnósticos para Covid-19. Estes testes utilizam o princípio da imunocromatografia e do ensaio de fluxo lateral para identificação de amostras contendo anticorpos contra o vírus (IgG e IgM). As principais vantagens são o baixo tempo necessário para a realização do teste, variando de 10 a 30 minutos, baixo custo quando comparado com o RT-PCR e facilidade para a realização e obtenção do resultado, já que não são necessários equipamentos ou mão de obra altamente qualificada, possibilitando assim a sua utilização para triagem de uma grande quantidade de pessoas.

O teste é composto por um cassete contendo uma membrana de nitrocelulose com uma *pad* para aplicação da amostra, uma *pad* imobilizada com anticorpos IgM anti-humano conjugados com nanopartículas de ouro coloidal, uma membrana analítica que contém as 2 fitas visíveis no dispositivo, uma com um antígeno do SARS-CoV-2, sendo os principais antígenos utilizados neste tipo

de teste são a proteína N e a proteína S, e outra com um anti-*mouse* que serve como controle negativo da reação. Alguns testes utilizam uma fita para detecção de IgG e outra para detecção de IgM, utilizando anticorpos específicos para cada alvo além da fita controle (**Figura 4**). Estes testes possuem uma especificidade de 90% a 99% e sensibilidade 73% a 100%, nas condições ideais, variando de acordo com a fabricante do kit (HUANG *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020).

Figura 4: Esquema do cassete de ensaio de fluxo lateral para detecção do SARS-CoV-2 (HUANG *et al.*, 2020).



Embora tenha baixo custo e facilidade de manuseio, este tipo de método diagnóstico possui algumas limitações. O teste não consegue detectar anticorpos antes do sétimo dia de infecção, e antes do 14º dia de infecção a sensibilidade

deste teste ainda é relativamente baixa chegando aos 80% (FILCHAKOVA *et al.*, 2022).

1.4.3 RT-LAMP

RT-LAMP é uma das técnicas mais recentes a ser aprovada para o diagnóstico de Covid-19, eles se baseiam na amplificação isotérmica do material genético do vírus utilizando *primers* específicos sendo assim similar a técnica de RT-PCR. Porém, as maiores diferenças são que todo o processo do teste é realizado em uma mesma temperatura, sem a necessidade de se empregar um termociclador, sendo a reação incubada em um banho-maria ou termobloco. O tempo para realização do teste é muito inferior quando comparado ao RT-PCR, demorando entre 40 a 50 minutos para se obter o resultado, e o resultado do teste se dá através de uma reação colorimétrica ou através da leitura da fluorescência emitida como é o caso do kit diagnóstico desenvolvido pela Abbott (AIELENE *et al.*, 2022; LU *et al.*, 2020).

O único kit diagnóstico comercial para diagnóstico da Covid-19 que utiliza o RT-LAMP é o ID NOW™ desenvolvido pela Abbott, este kit recebeu autorização de emergência da FDA para sua utilização. Este kit é composto por um tampão de eluição próprio, os *primers* específicos para o gene Rdrp liofilizados e um cartucho para a realização da reação, esse kit diagnóstico necessita de um equipamento específico fornecido pela Abbott para leitura do resultado, o que acaba encarecendo este método diagnóstico, este teste apresenta uma sensibilidade de 84% e uma especificidade de 99,8% (ABBOTT, 2022; TU *et al.*, 2021).

1.4.4 Comparação entre os testes comerciais

Como visto anteriormente os principais métodos diagnósticos comerciais utilizados para o diagnóstico da Covid-19 são o RT-PCR, testes de antígeno utilizando o ensaio de fluxo lateral e o RT-LAMP, esses testes possuem uma grande variação de preço e de sensibilidade e especificidade (**tabela 3**) (FILCHAKOVA *et al.*, 2022).

Tabela 3: comparação entre os testes comerciais disponíveis. Os dados de tempo para obtenção do resultado e o preço foram orçados pela Padrão medicina

diagnóstica personalizada no dia 07/10/2022, os dados de especificidade e sensibilidade foram obtidos na literatura (FILCHAKOVA *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2020; TU *et al.*, 2021)

Tipo do teste	Tempo para obtenção do resultado	Especificidade	Sensibilidade	Preço
RT-PCR	2 dias	100%	95%	R\$186,00
Teste sorológico	1 hora	90% a 99%	73% a 100%	R\$74,00
ID NOW™	3 horas	99,8%	84%	R\$326,00

1.4.5 Métodos diagnósticos em desenvolvimento

Como visto anteriormente existe uma carência de testes diagnósticos comerciais que combinem uma boa sensibilidade e especificidade para detecção da doença no início da infecção, baixo custo e que não necessitem de equipamento e mão de obra especializada para viabilizar a sua utilização em regiões mais remotas. Com isto em mente existem diversos estudos que buscam novas formas de detecção da doença. Algumas das metodologias mais promissoras são a CRISPR, sensores de nanomateriais, *nanoscaffolds* de DNA e *Toehold switches* (FILCHAKOVA *et al.*, 2022; JIAO *et al.*, 2020).

O uso do CRISPR vem sendo aplicado no desenvolvimento de métodos diagnósticos para Covid-19 (FILCHAKOVA *et al.*, 2022). As duas principais variações utilizadas são a DETECTR (*DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter*) e a SHERLOCK (*Specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking*). As maiores vantagens destas técnicas são o baixo custo por amostra, o baixo tempo para obtenção do resultado e a dispensa de equipamentos de alto custo. Porém, ainda é necessário mão de obra especializada para realização do teste (HOU *et al.*, 2020). Zhang e colaboradores (2020) desenvolveram um teste diagnóstico utilizando a técnica de SHERLOCK, que consiste, primeiramente, na extração do RNA viral da amostra do paciente. Então, é realizada uma

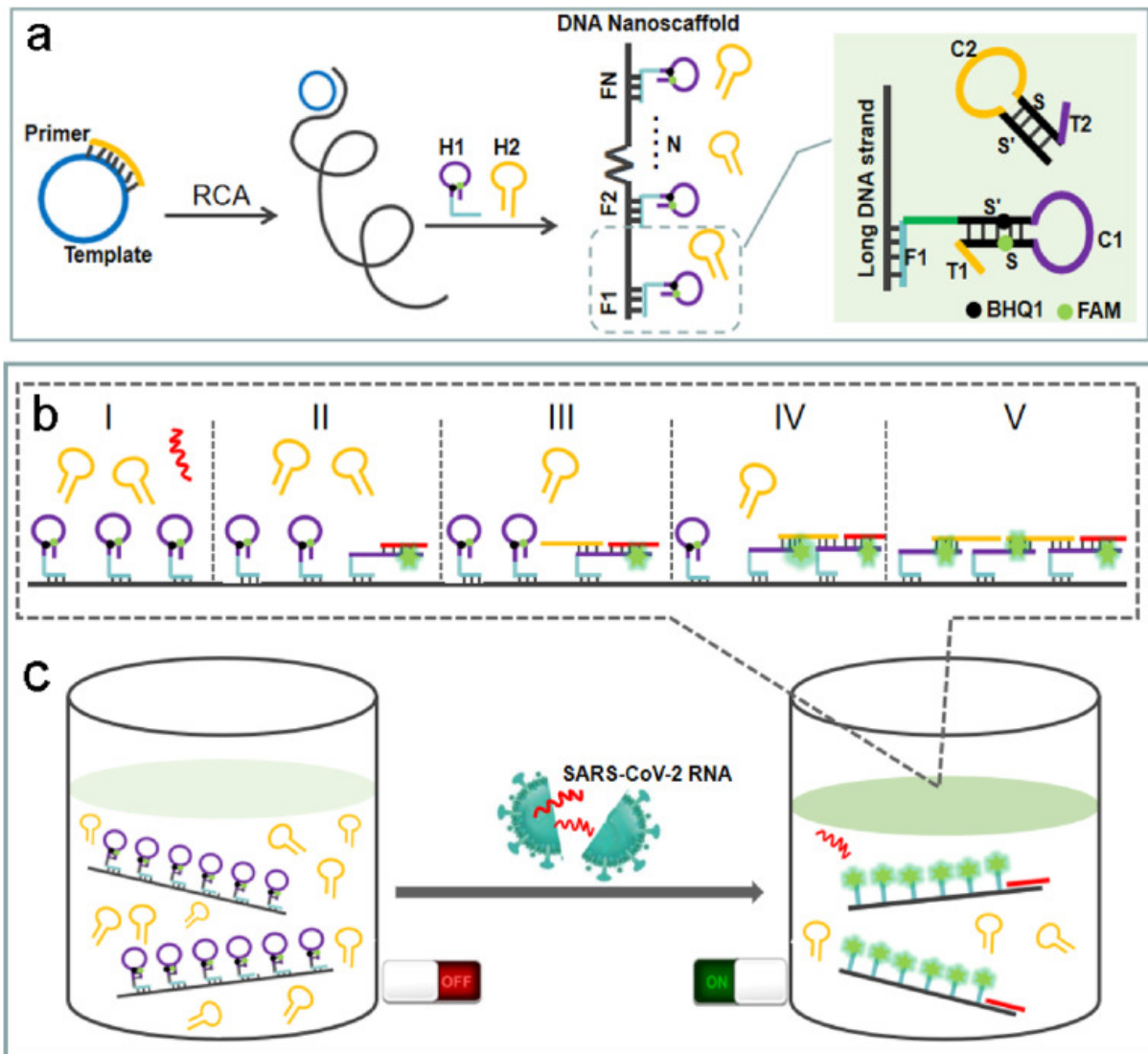
amplificação isotérmica do RNA utilizando um kit de RPA (*recombinase polymerase amplification*). Após, são realizadas duas reações utilizando a enzima Cas13, uma para detecção do gene S e outra para o gene Orf1ab. Quando o RNA viral está presente na amostra, a Cas13 cliva uma molécula repórter, que é identificada utilizando um kit para ensaios de fluxo lateral da *HybriDetect*. Esse procedimento foi testado apenas utilizando fragmentos de RNA. Porém, ele apresentou resultados promissores nestes ensaios iniciais, sendo necessário ainda a validação utilizando amostras de pacientes (ZHANG *et al.*, 2020). Broughton e colaboradores (2020) utilizaram a técnica DETECTR para o desenvolvimento de um diagnóstico para Covid-19, que consiste, primeiramente, em uma reação de RT-LAMP para amplificação do RNA viral extraído da amostra do paciente infectado. Esse RNA é então utilizado em duas reações contendo a enzima Cas12, uma utilizando um RNA guia para a detecção de SARS-CoV-2 e outra para detecção de outros vírus da família coronavírus. Nas reações positivas, a molécula repórter é clivada e o resultado é visualizado através de um ensaio de fluxo lateral. Foram realizados testes iniciais com 60 amostras, 30 negativas e 30 positivas, sendo verificada uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 100% (BROUGHTON *et al.*, 2020).

Nanomateriais podem ser utilizados de diversas formas para diagnóstico da Covid-19, seja conjugado com biossensores ou outras moléculas para aumento da efetividade dos testes. Exemplos são os ensaios de fluxo lateral que utilizam nanomateriais conjugados com moléculas repórteres ou como testes inteiros (KEVADIYA *et al.*, 2021). Shan e colaboradores desenvolveram uma matriz de sensores baseados em nanomateriais para detecção do SARS-CoV-2 no ar exalado pela respiração das pessoas. O aparelho é formado por 8 quimioresistores com núcleos formados por nanopartículas esféricas de ouro, um sensor para detecção do ar exalado e sensores auxiliares de temperatura e umidade. Os quimioresistores detectam compostos orgânicos voláteis relacionados à infecção por SARS-CoV-2 e emitem sinais elétricos. Com a análise da frequência dos sinais elétricos, podem se obter diversos resultados como infecção por SARS-Cov-2, pessoa em estágio de recuperação da doença, curado, negativo ou infecção pulmonar por outros motivos. Esse teste se mostrou muito promissor, apresentando uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 90% nos testes iniciais, e de 61% em um segundo teste (SHAN *et al.*, 2020).

Nanoscaffolds são biossensores capazes de reconhecer RNA, suas maiores vantagens são o baixo tempo para realização do teste e baixo custo por amostra. Porém, ainda é necessário um leitor de fluorescência para avaliação do resultado. Este biossensor é formado por uma fita repetitiva longa de DNA, que possui uma área de ancoramento para uma sequência complementar e um *hairpin* que captura uma molécula repórter, além de uma área de ancoragem para um oligo complementar. Quando este biossensor entra em contato com o RNA alvo, ele ativa uma reação em cascata através da abertura de um dos *hairpins* que se liga com um dos oligos complementares, desfazendo assim os *hairpins* presentes no biossensor. O resultado é a emissão de fluorescência capaz de ser captada por equipamentos específicos (**Figura 5**), sendo assim uma alternativa para o diagnóstico da Covid-19 (JIAO *et al.*, 2020). Jiao e colaboradores (2020) desenvolveram *nanoscaffolds* capazes de detectar o RNA viral do SARS-CoV-2. Quando o RNA viral é reconhecido pelo biossensor, o corante fluorescente 5-carboxyfluorescein (FAM) presente dentro do *hairpin* do *nanoscaffold* é liberado, gerando o resultado que pode ser lido utilizando uma leitora de fluorescência. A especificidade foi testada utilizando sequências com 1 a 4 bases com *mismatches* em comparação à sequência alvo. Já a sensibilidade foi testada utilizando diversos comprimentos de onda, obtendo ótimos resultados em ambos os quesitos. Porém, ainda não foram testadas amostras clínicas. Outra limitação desta técnica é a necessidade de um equipamento especializado para realizar a leitura do resultado, o que acaba limitando o número de locais capazes de realizar o teste (JIAO *et al.*, 2020).

Figura 5: esquema do funcionamento dos *nanoscaffolds* para detecção do RNA de SARS-CoV-2. a: Síntese dos *nanoscaffolds*, através da hibridização do molde de DNA com as sondas H1 que possuem a FAM que emite fluorescência quando ativada e à sequência BHQ1 que serve para inibir a fluorescência do sensor no estado OFF, o oligo H2 possui sequências complementares ao H1 (T2 e C2). b: esquema da ativação do *nanoscaffold*, o RNA viral desfaz um dos *hairpins* do *nanoscaffold* ativando uma cascata onde o oligo H2 se liga à sequência H1 aberta e desfaz o restante dos *hairpins* presentes no *nanoscaffold*. c: exemplo de uma reação no estado OFF onde não há a molécula e não ocorre a reação em cascata

e uma reação no estado ON onde o RNA viral se liga ao H1 ativando a reação em cascata que gera a fluorescência (JIAO *et al.*, 2020).



1.5 Toehold Switch

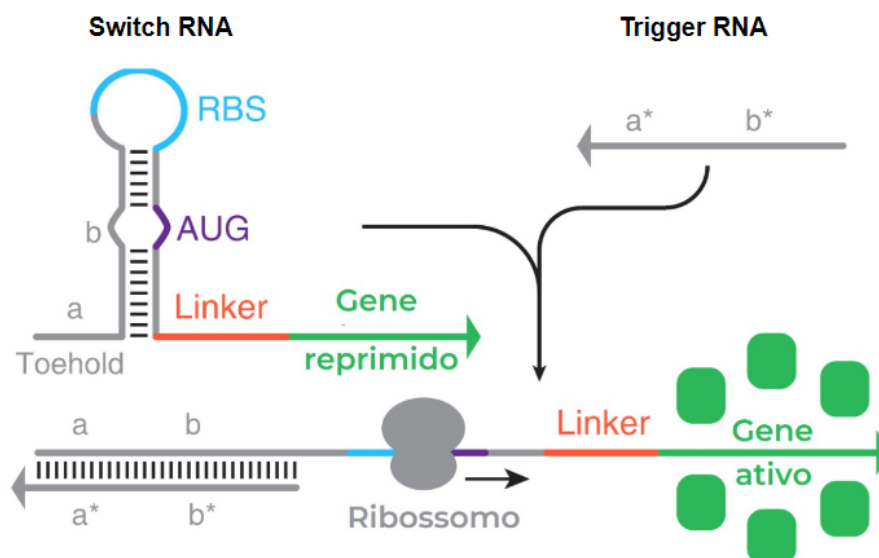
Como visto anteriormente, existe uma carência de métodos diagnósticos comerciais que possuam um baixo custo por amostra, não necessitem de equipamentos específicos, sejam de fácil realização e possuam uma boa eficácia. Apesar de haver diversos estudos para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, a maioria destes testes não consegue preencher todos estes requisitos. Sendo assim, o desenvolvimento de um método diagnóstico que utilize como base biossensores do tipo *toehold switch* é interessante, pois estes são extremamente custo-eficiente, de fácil armazenamento e distribuição, e devido a flexibilidade da escolha do gene repórter, podem ser utilizados métodos

colorimétricos para leitura do teste. A tecnologia de *toehold switches* já foi estudada para o desenvolvimento de métodos diagnósticos para diversas doenças virais, como dengue, zika, ebola e norovírus. As maiores vantagens destes testes são o baixo custo, alta sensibilidade e especificidade (CHAU *et al.*, 2020).

Toehold switches são RNAs regulatórios projetados com base em estudos que descrevem a influência de estruturas secundárias na tradução do mRNA e conhecimento de termodinâmica e cinética de RNAs para cumprir essa função. Eles são capazes de alternar entre duas estruturas secundárias, uma que previna (estado off) e outra que promove a tradução (estado on), a partir da ligação de um RNA cognato transativador. O RNA é projetado para promover um deslocamento de fita a partir de um ponto de ancoragem linear. Neste sistema, as interações entre as espécies reativas são controladas cineticamente por *hairpins* ou complexos multifitas, que possuem domínios de fita simples expostos, os quais servem como ponto de ancoragem (*toehold*) (GREEN *et al.*, 2014). Um sistema de *Toehold switch* é composto por duas fitas de RNA, denominadas *switch* (interruptor) e *trigger* (gatilho). O RNA *switch* é inserido na extremidade 5'-UTR do RNA mensageiro que contém a sequência codificadora do gene. O *switch* consiste em um módulo capaz de formar um *hairpin* que sequestra um sítio de ligação do ribossomo (RBS) e o códon inicial do gene. Este é ligado ao *switch* por uma sequência conectora (*linker*) de 21 nucleotídeos, que codificam aminoácidos de baixa massa molecular, fusionados à sequência N-terminal do gene repórter (GREEN *et al.*, 2014). O RNA *switch* também contém a sequência de ancoragem que servirá de sítio para pareamento inicial do RNA *trigger*. O RNA *trigger*, por sua vez, é uma sequência de RNA fita simples capaz de se ligar ao RNA *switch*, desestruturar o *hairpin*, e expor as sequências do RBS e do códon inicial para que a transcrição do gene repórter seja ativada (**Figura 6**) (GREEN *et al.*, 2014).

Figura 6: Esquema ilustrando o funcionamento do Riboregulador. O RNA *switch* mantém a transcrição do gene repórter reprimida até que o RNA *trigger* seja adicionado à reação. O RNA *trigger* pareia com o RNA *switch* a partir da sequência de ancoragem (*toehold*) desestruturando o *hairpin* e liberando tanto o sítio de ligação do ribossomo (RBS) quanto o códon inicial do gene repórter.

Desta forma, a tradução é ativada. As sequências variáveis são mostradas em cinza (GREEN et al. 2014).



A primeira aplicação de *toehold switches* para o diagnóstico de doenças virais foi por Pardee e colaboradores (2014) que desenvolveram uma “*Paper-based Synthetic Gene Networks*”, onde um *switch* é adsorvido em um papel filtro juntamente com uma mistura pronta para expressão gênica *in vitro*. A adição da amostra viral reidrata essa mistura e ativa o sistema de tradução e transcrição *in vitro*. Esse sistema se mostrou extremamente estável, mantendo atividade mesmo após 1 ano estocado a -80°C (**Figura 7**) (PARDEE et al., 2014). Esse sistema construído por Pardee e colaboradores apresentou ótimos resultados, permitindo diferenciar 2 cepas diferentes de Ebola com uma diferença de expressão de até 77 vezes, e detectar o RNA viral em concentração de 30 nM. Algumas outras vantagens deste sistema são o baixo custo por amostra, que foi estimado entre 35 a 65 centavos de dólar, e o método colorimétrico, que possibilita a visualização do resultado a olho nú, sem necessidade de equipamentos para a sua leitura (**Figura 8**). Este sistema foi construído em menos de um dia, mostrando a agilidade para o desenvolvimento deste tipo de sensor quando comparado com anticorpos para testes de ELISA e afins, que podem demorar de 2 a 6 meses para a sua construção (PARDEE et al., 2014). Este sistema se mostra extremamente promissor para o desenvolvimento de testes diagnósticos para doenças virais devido ao seu baixo custo, facilidade de

armazenamento e transporte e rapidez para o desenvolvimento de novos sistemas, o que é extremamente importante para doenças emergentes como a Covid-19.

Figura 7: Comparação da fluorescência emitida pelo sistema de expressão entre uma amostra nova e uma amostra que passou um ano estocada a -80°C (PARDEE *et al.*, 2014)

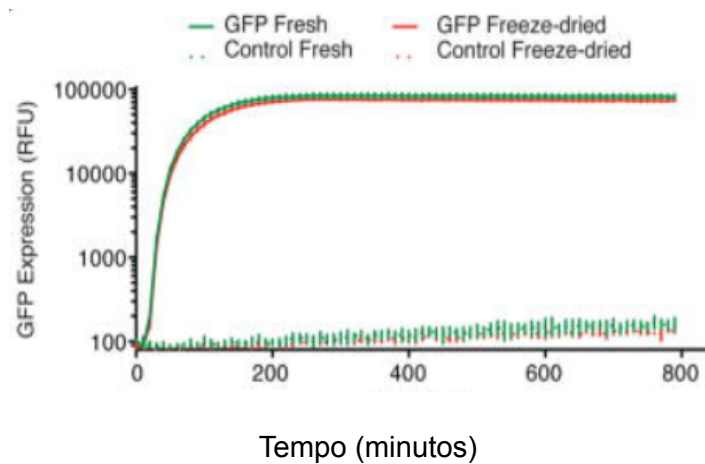
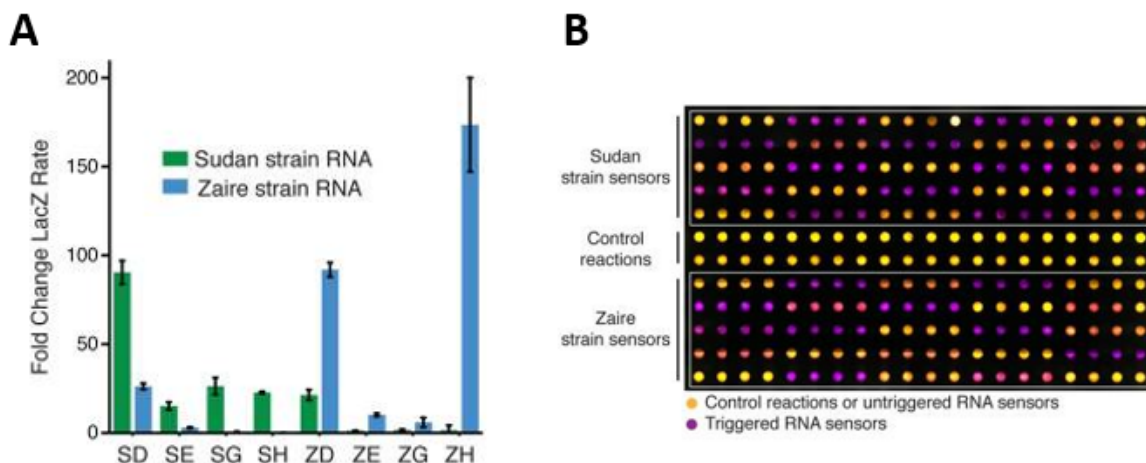
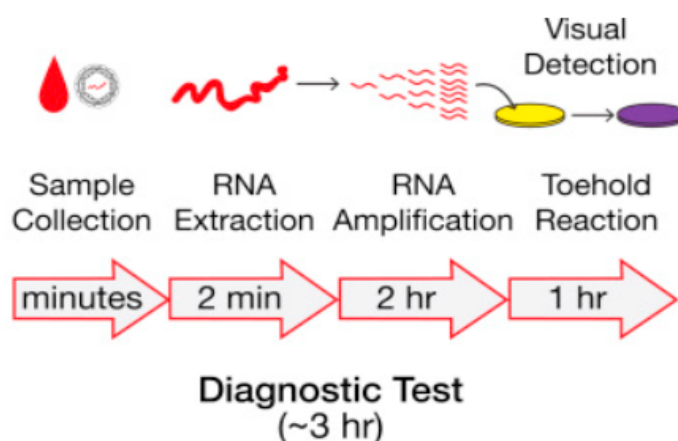


Figura 8: (A) teste de especificidade dos *switches* (SD, SE, SG e SH são *switches* específicos para a cepa de ebola do sudão e ZD, ZE, ZG e ZH para à cepa do Zaire) que obtiveram os melhores resultados utilizando as duas cepas de ebola. (B) teste colorimétrico dos *switches* onde as amostras amarelas são os controles e os *switches* que não foram ativados e o roxo são os *switches* ativados (PARDEE *et al.*, 2014)



Pardee e colaboradores (2016) também desenvolveram um *toehold switch* para o diagnóstico do zika vírus. O sistema utilizado é similar ao construído para detecção do vírus ebola, sendo a maior diferença e adição de uma etapa de amplificação prévia do RNA viral através da técnica de NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*). A técnica de NASBA faz a amplificação do RNA em dois passos, um primeiro a 65°C para ligação dos *primers*, e um segundo a 41°C para uma amplificação isotérmica. Este segundo passo é necessário pois a carga viral presente nas amostras (1,2 fM a 365 fM) é abaixo do nível de sensibilidade do *switch* (30 nM). Como o teste utiliza um volume de microlitros do produto da NASBA, o custo do teste se mantém baixo e ocorre um aumento significativo na sensibilidade do teste diagnóstico. A única desvantagem da adição deste passo é o tempo da reação de amplificação, que adiciona aproximadamente 2 horas no tempo de desenvolvimento do teste (**Figura 9**) (PARDEE *et al.*, 2016). A adição de uma etapa de amplificação do RNA viral traz um grande aumento de sensibilidade ao teste. Porém, esta etapa pode trazer alguns problemas, como o aumento do tempo de realização, possibilidade de contaminação da amostra durante a reação de NASBA e a possibilidade de diminuição na especificidade do teste devido a reações cruzadas que podem ocorrer com os *primers* (PARDEE *et al.*, 2016)

Figura 9: *Workflow* da realização do teste para detecção do zika vírus desenvolvido por Pardee e colaboradores (PARDEE *et al.*, 2016)



Zocca (2018) desenvolveu um *toehold switch* para a identificação do vírus da dengue. Para os testes com este *switch*, foi desenvolvido um vetor plasmidial utilizando a luciferase como gene repórter. Nos testes realizados, não foi possível avaliar a resposta a olho nú, porém foi avaliado um aumento de mais de 11 vezes de expressão gênica quando o *switch* está no seu estado ON comparado com o OFF. A proporção ideal para a reação foi a de 1:100 do plasmídeo contendo o *switch* em relação ao *trigger* específico (**Figura 10**). Nos testes com amostras clínicas, foram testadas amostras de pacientes infectados com Dengue e com Zika para avaliar a especificidade dos *switches* (**Figura 11**). Porém, devido ao baixo volume amostral e a baixa concentração viral das amostras (DENV-1 210 ng, DENV-4 64 ng e ZIKV 112 ng) não foi possível padronizar os testes. Mesmo assim, o *switch* apresentou uma maior afinidade pelas amostras de dengue, principalmente a DENV-4 (ZOCCA *et al.*, 2018). Apesar da necessidade de uma leitora de luminescência para ler o resultado da reação de transcrição e tradução *in vitro*, o teste se mostrou efetivo na identificação de amostras virais de dengue e apresentou uma boa especificidade, mostrando novamente que esta tecnologia é muito promissora para o desenvolvimento de ferramentas para detecção de vírus de RNA.

Figura 10: Amplitude de ativação do *switch* DENV10550(2) em reações com diferentes proporções de DNA plasmidial e RNA viral. Entre parênteses no eixo X é mostrado quantas vezes mais de *trigger* há em relação ao DNA plasmidial em ng. A barra vertical representa o desvio padrão (ZOCCA *et al.*, 2018).

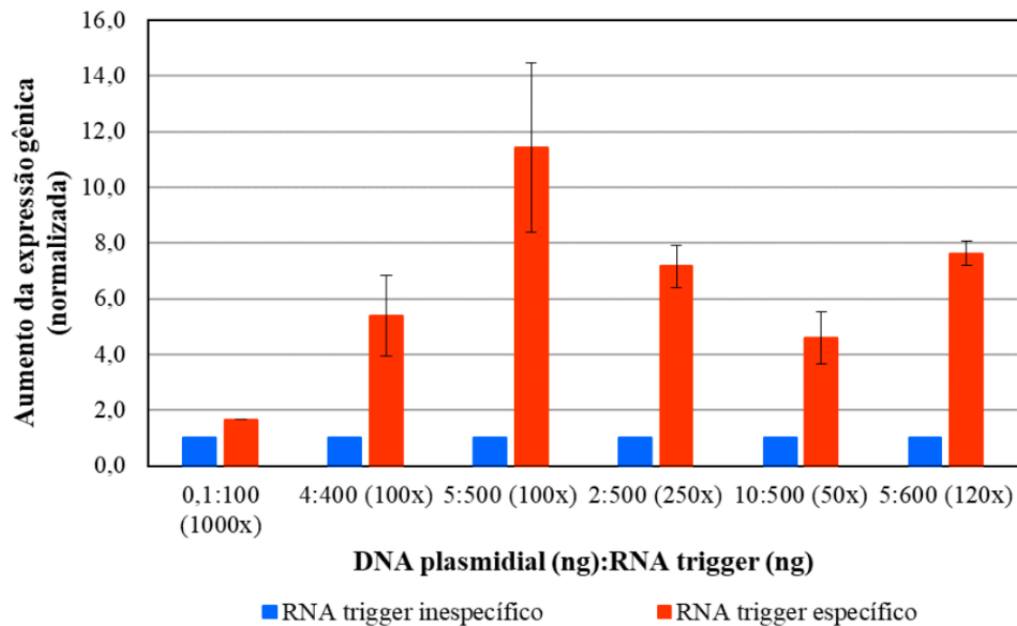
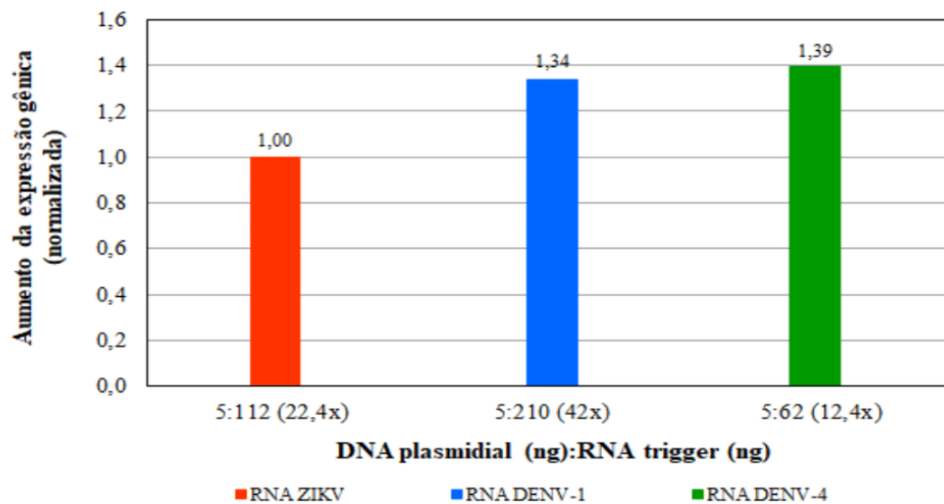


Figura 11: Ativação da expressão gênica, sob controle do *Switch* DENV10550(2), em reação com diferentes proporções entre DNA plasmidial e RNA viral (DENV-1, DENV-4 e ZIKV) extraído de amostras humanas. Entre parênteses, no eixo x, é mostrado quantas vezes mais RNA há na reação em relação ao DNA plasmidial em ng (ZOCCA *et al.*, 2018).



Ma e colaboradores (2018) desenvolveram um sistema utilizando *toehold switches* para a detecção do Norovirus, usando uma metodologia similar a que Pardee e colaboradores utilizaram para detecção do Zika vírus. Nos dois casos uma amostra viral é amplificada através de NASBA e aplicada em um dispositivo

contendo o RNA *switch* e a mistura para tradução e transcrição *in vitro*. A principal diferença da técnica aplicada por Ma e Pardee é a adição de uma etapa onde *synbodies*, peptídeos sintéticos com afinidade a um antígeno específico similar a um anticorpo monoclonal, ligados à *beads* magnéticas, são utilizados para concentrar as moléculas virais para aumentar a sensibilidade do teste (**Figura 12**). Por esse método, foi reportado um aumento de 1000 vezes na sensibilidade (**Figura 13**). Porém, a adição desta etapa aumenta consideravelmente o preço médio estimado do teste de menos de um dólar para o teste utilizando apenas o sistema baseado em papel para aproximadamente três dólares com a adição da etapa de amplificação por NASBA para quase nove dólares com a adição dos *synbodies* ligados às *beads* magnéticas (MA *et al.*, 2018; PARDEE *et al.*, 2016). Este estudo mostra novamente a versatilidade da tecnologia de *toehold switches*, que pode ser empregada com outras técnicas para aumentar sua eficiência de detecção e as formas como ela pode ser empregada, devido a possibilidade de se utilizar diferentes genes repórteres podendo ser utilizada em testes colorimétricos ou de fluorescência.

Figura 12: Etapas do teste para detecção de Norovírus desenvolvido por Ma e colaboradores (MA *et al.*, 2018).

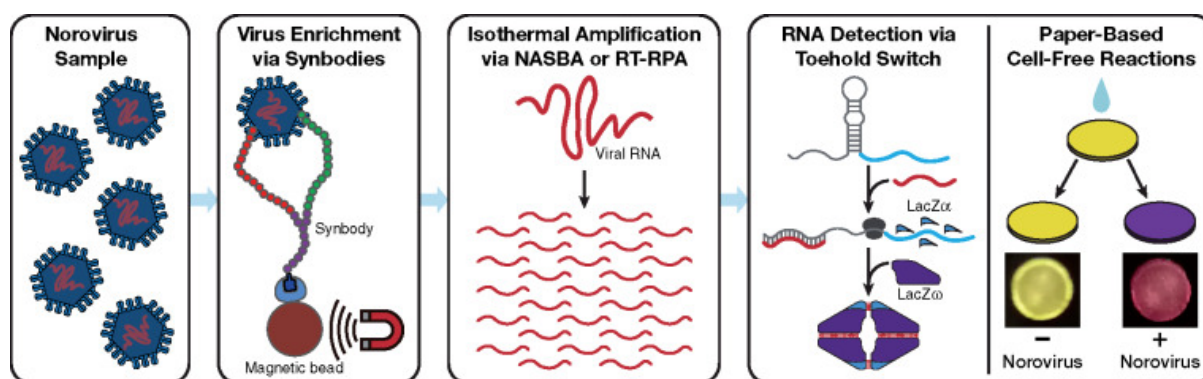
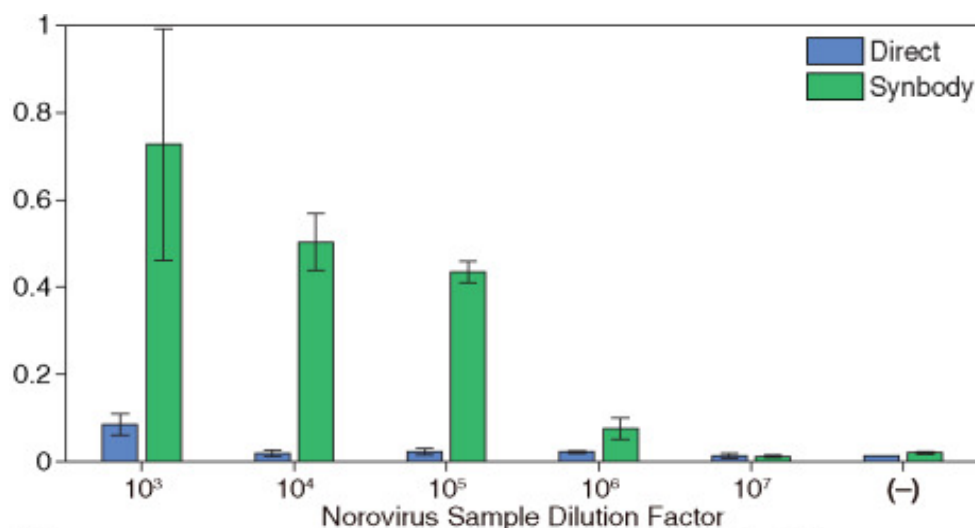


Figura 13: Amplitude de ativação do *switch* para norovírus em reações com diferentes concentrações virais, onde o eixo X é o fator de diluição da amostra, as colunas em azul são o teste direto sem a contração utilizado os *synbodies* e as colunas verdes são com a contração utilizando os *synbodies*.



Como visto previamente, a tecnologia de *toehold switch* é utilizada para o diagnóstico de diversas doenças virais, de rápido desenvolvimento, baixo custo, de fácil armazenamento e transporte, possui uma excelente sensibilidade, se mostra extremamente específica e possui uma alta versatilidade, podendo ser utilizada em conjunto com diferentes técnicas, sendo assim muito interessante para o desenvolvimento de kits diagnósticos para Covid-19.

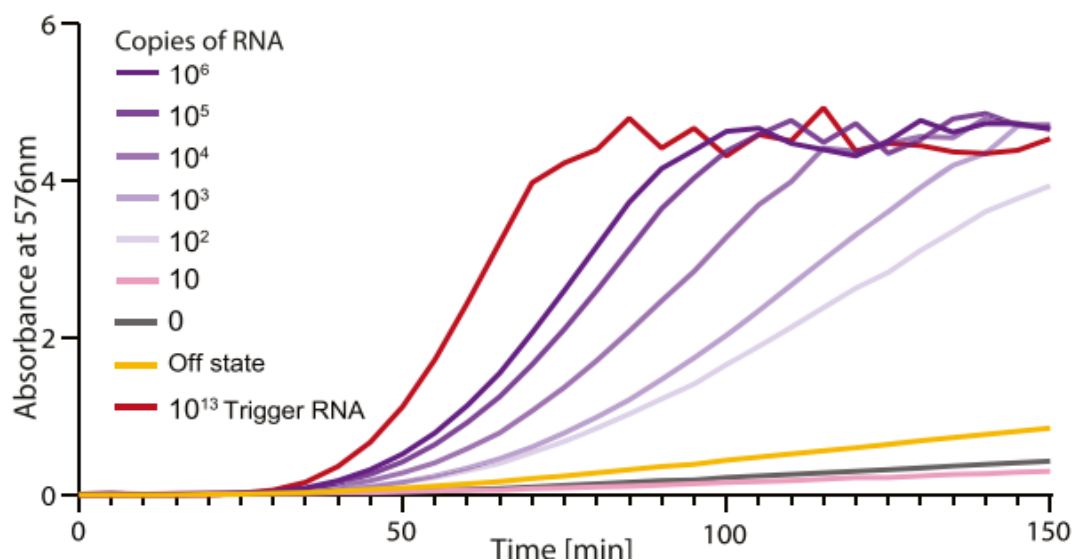
1.5.1 *Toehold switch* para detecção do SARS-CoV-2

Atualmente existem diversos estudos utilizando a tecnologia de *Toehold switch* para o desenvolvimento de testes diagnóstico para SARS-CoV-2, estes estudos utilizaram amostras de *swab* nasofaríngeal e de saliva e utilizaram diferentes técnicas em conjunto com o *toehold switch* mostrando assim a versatilidade desta tecnologia (GERALDI *et al.*, 2022).

Chakravarty e colaboradores (2021) desenvolveram um sistema chamado de PHANTOM (PHAsed NASBA-Translation Optical Method) onde a amostra viral obtida do paciente é amplificada utilizando NASBA com *primers* específicos para a ORF1ab, e então o produto desta NASBA é utilizado em uma reação de transcrição e tradução *in vitro* juntamente com um *toehold switch*, o resultado obtido deste teste pode ser avaliado tanto por olho nu como pela utilização de equipamentos de leitura de luminescência (CHAKRAVARTY *et al.*, 2021). Este sistema foi capaz de detectar o vírus em uma quantidade de até 100 cópias mostrando então uma capacidade de

detectar o vírus em quantidades extremamente baixas (**Figura 14**), e obteve uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 100% utilizando amostras de *swab* nasofaríngeal mostrando-se uma tecnologia promissora (CHAKRAVARTY *et al.*, 2021).

Figura 14: Teste do sistema PHANTOM utilizando diferentes quantidades de RNA *trigger*. Fonte: CHAKRAVARTY *et al.*, 2021.



Park e colaboradores (2021) desenvolveram um sistema utilizando o *toehold switch* em conjunto com RT-LAMP para amplificação da amostra viral, para este teste foi utilizada a saliva como amostra, primeiramente foi adicionado um tampão para estabilizar o Ph da saliva juntamente com a proteinase K, essa solução com a saliva foi então colocada em um termobloco para realizar a inibição térmica da amostra, após essa inibição a amostra foi amplificada utilizando RT-LAMP, o produto desta amplificação foi então adicionado a uma reação de transcrição e tradução *cell free*, utilizando esta metodologia foi possível detectar o vírus com apenas 120 cópias, mostrando-se assim uma metodologia muito promissora (PARK *et al.*, 2021).

Hunt e colaboradores (2022) desenvolveram um sistema para detecção do SARS-CoV-2 utilizando o *toehold switch* liofilizado adsorvido em papel juntamente com o sistema de transcrição e tradução *cell free* e um inibidor de RNases que permite a adição da saliva no sistema sem que as RNases presentes na amostra interfiram no teste, após a adição da amostra ao sistema a reação ocorre

rapidamente se obtendo o resultado em até 30 minutos, esse teste foi capaz de detectar amostras com até 10 nM de RNA e um preço de fabricação de aproximadamente 0,50 centavos de dólar (HUNT *et al.*, 2022).

1.6 Comparação entre os métodos diagnósticos em desenvolvimento

Tabela 4: Comparação entre os diversos métodos diagnósticos em desenvolvimento apresentados. Os dados de sensibilidade e especificidade foram retirados dos artigos previamente.

Teste	Especificidade	Sensibilidade	Amplificação	Pontos positivos	Pontos negativos
DETECTR	100%	95%	Sim	Baixo custo, rápida execução, não necessita de equipamentos	Mão de obra especializada
SHERLOCK	-	-	Sim		
Sensores a base de nanomateriais	61%-90%	100	Não	Fácil execução; resultado rápido	Baixa especificidade ; resposta cruzada com infecções pulmonares
Nanoscaffolds	-	-	Não	Resultado rápido; Baixo custo	Mão de obra especializada; equipamento para leitura do resultado
PHANTOM	100%	85%	Sim	Baixo custo; Não necessita de equipamentos	Mão de obra especializada
<i>Toehold</i> + RT-LAMP	-	-			

				especializados	
<i>Paperbased Toehold</i>	-	-	Não	Baixo custo; Não necessita de mão de obra especializada; resultado rápido	-

2. Objetivo

Desenvolvimento de um riboregulador do tipo *toehold switch* para a detecção do vírus SARS-CoV-2

2.1 Objetivos específicos

- Desenhar os riboreguladores do tipo *toehold switch*;
- Analisar *in silico* os *toehold switches*;
- Construir os vetores de expressão contendo os *toehold switches* e o gene repórter;
- Confirmar a funcionalidade do sistema através de testes de transcrição e tradução *in vitro*

3. Materiais e métodos

Os cultivos de *E. coli* top 10 foram realizados em meio de cultura Luria-Bertani (LB) com a adição do antibiótico cloranfenicol para triagem dos clones recombinantes. A linhagem foi utilizada para construção dos plasmídeos, armazenamento e propagação dos mesmos.

3.1 Seleção das sequências-alvo para construção dos RNA *switches*

Nesta primeira etapa foram identificadas sequências-alvo no genoma do vírus Sars-Cov-2 através de alinhamentos realizados com o software *CLC genomics workbench*. Foram alinhados os genomas das principais cepas de Sars-Cov-2 encontradas na América Latina para anotação das principais mutações e as áreas mais conservadas do genoma destas cepas. Após esta análise, foi realizado o alinhamento com os genomas de cepas dos vírus HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, MERS-Cov e Sars-Cov (**Tabela 5**), para anotação das áreas onde ocorre sobreposição entre os genomas. Essa análise foi realizada para evitar a resposta cruzada dos *switches* desenhados para o reconhecimento do Sars-Cov-2 com o RNA dos vírus previamente citados.

Os principais parâmetros escolhidos para os alvos foram sequências que são traduzidas para proteínas por serem trechos com uma menor taxa de mutação, áreas conservadas entre as principais cepas de Sars-Cov-2 encontradas na América Latina, trechos onde não ocorre a sobreposição com os outros vírus previamente mencionados.

Tabela 5: Identificação das sequências genômicas virais utilizadas nos alinhamentos

Vírus	Código de identificação (NCBI)	País de origem
SARS-CoV-2	MT126808	Brasil
SARS-CoV-2	MT350282	Brasil
SARS-CoV-2	MT256924	Colômbia
SARS-CoV-2	MT470219	Colômbia
SARS-CoV-2	MT263074	Peru
SARS-CoV-2	MT466071	Uruguai
SARS-CoV	NC_004718	Canadá
MERS-CoV	NC_019843	-

HCoV-229E	NC_002645.1	-
HCoV-HKU	NC_006577.2	-
HCoV-NL63	NC_005831.2	Holanda
HCoV-OC43	NC_006213.1	USA

3.2 Design *in silico* dos biossensores

Os *Toehold switches* foram desenhados *in silico* usando o pacote de design e análise de RNAs NUPACK (Zadeh et al. 2011), a partir de dois scripts desenvolvidos para este tipo de biossensor, à diferença entre estes scripts está na utilização de um sítio de ligação do ribossomo diferente e um pequeno espaçador adicionado ao script otimizado (**Figura 15a** e **Figura 15b**). Após o desenho *in silico*, foram realizados cálculos utilizando o *software* RBS *calculator* para se obter níveis aproximados da expressão gênica sob controle dos *switches* no seu estado ON e OFF, e da energia necessária para a ligação do ribossomo. Após as clonagens iniciais e dos testes para determinar a amplitude dinâmica de ativação, novas sequências de RNA *switches* foram projetadas utilizando um *script* otimizado.

Figura 15: Scripts desenvolvidos para o design dos *toehold switches* no pacote NUPACK. A) Primeiro *script*, utilizado para projetar os primeiros *Toehold switches*, incluindo o 7, 8 e 13. B) *Script* otimizado utilizado para o *design* dos *Toehold switches* 79 e 84.

NUPACK design Toehold switch

design a toehold switch

design material, temperature (C), and trials

material = rna temperature = 37.0

trials = 6

target structures

structure switch = U20 D18 (U3 D5 U10 U3)

structure trigger = U40

structure detect = D40 + U42

sequence domains

a* is the trigger; a is the reverse complement of the trigger

domain c = RBS + codon inicial

AUA at the end of the RBS may be exchanged for any 3 nt combination of A and U

domain a = N40

domain b = N6

domain c = N3 AGGAGGAAUA N2 ATG #18

domain d = N18

thread sequence domains onto target structures

switch.seq = a b c d

trigger.seq = a*

detect.seq = a* a b c d

specify stop conditions for normalized ensemble defect

default: 1.0 (percent) for each target structure

trigger.stop = 5.0 # larger defect for unpaired structures

prevent sequence patterns

prevent = AAAA, CCCC, GGGG, UUUU, KKKKKK, MMMMMM, RRRRRR,
SSSSSS, WWWWWW, YYYYYY

```

NUPACK design Toehold switch 2
# design a toehold switch
# design material, temperature (C), and trials
material = rna
temperature = 37.0
trials = 10
# target structures
structure switch = U20 D18 (U3 D5 U15 U3)
structure trigger = U40
structure detect = D40 + U47
# sequence domains
# a* is the trigger; a is the reverse complement of the trigger
# domain c = RBS + codon initial
# RBS may be exchanged by a sequence of purines RRRRRRR
domain a = N40
domain b = N6
domain c = N3 VVVVVAGAGGAGWWW N2 AUG #23
domain d = N18
# thread sequence domains onto target structures
switch.seq = a b c d
trigger.seq = a*
detect.seq = a* a b c d
# specify stop conditions for normalized ensemble defect # default: 1.0 (percent) for
each target structure trigger.stop = 5.0 # larger defect for unpaired structures
# prevent sequence patterns
prevent = AAAA, CCCC, GGGG, UUUU, KKKKKK, MMMMMM, RRRRRR, SSSSSS,
WWWWWW, YYYYYY

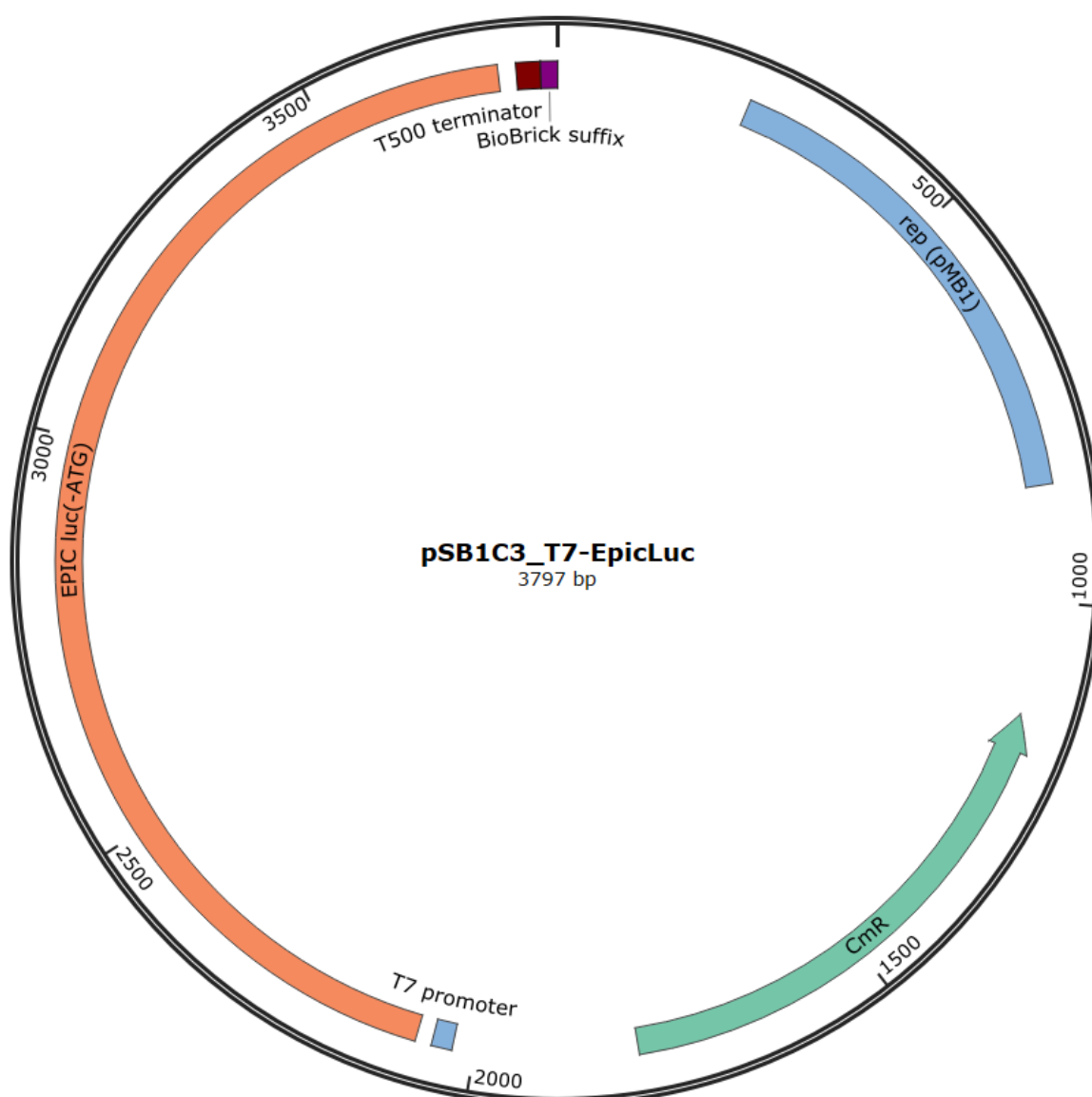
```

3.3 Construção do sistema de expressão

Os RNAs *switch* desenhados *in silico* foram comprados como sequências de DNA sintéticas em dupla fita diretamente, como *gBlocks*, ou como oligonucleotídeos de fita simples, fita direta e fita reversa, que foram então anelados. Cada sequência

correspondente a um RNA *switch* foi clonada no plasmídeo pSB1C3_T7-EpicLuc (**Figura 16**), sob controle do promotor forte T7 e fusionadas ao gene repórter através da reação de *Golden gate* ou através de reações de digestão e ligação. Como gene repórter foi usada a Epic Luciferase, que realiza uma reação de oxirredução para gerar luminescência quando adicionado o substrato luciferina.

Figura 16: Mapa do plasmídeo pSB1C3_T7-EpicLuc (3797 pb). O plasmídeo possui o promotor T7, o gene repórter EPIC Luciferase, terminador T500 e o gene de resistência a cloranfenicol. Figura construída usando o software SnapGene



O plasmídeo pSB1C3_T7-EpicLuc foi utilizado em reações de *golden gate* (**Tabela 6**) juntamente com os oligos dos *switches* desenhados, utilizando o primeiro *script* descrito para inserção dos *switches* no plasmídeo. Porém, devido às dificuldades encontradas para a transformação do plasmídeo utilizando esta técnica, os novos oligos para os *switches* desenhados utilizando o *script* otimizado foram construídos com o sítio de ligação da enzima de restrição *Sall* ao final do *switch*, permitindo a utilização das reações tradicionais de digestão e ligação para clonagem dos oligos no plasmídeo alvo (**Tabela 7 e 8**). Essa reação foi então utilizada no protocolo de transformação de *E. coli* por choque térmico, utilizando os 20 µl da reação de *Golden Gate* ou de ligação e 50 µl de *Escherichia coli* Top10 quimicamente competente. Essa reação foi então incubada em gelo por 30 minutos, após este tempo a reação foi colocada em banho maria à 42 °C por 30 segundos e incubada em gelo novamente por 2 minutos. Após este tempo, foi então adicionado 250 µl de meio SOC (5g de extrato de levedura, 20g de triptona, 0,584 g NaCl, 0,186 g KCl, 2,4 g MgSO₄ e 20 ml de glucose 20% por litro). A mistura foi incubada por 1h à 37 °C sob agitação de 220 rpm. Após a incubação foram plaqueados 100 µl de reação em uma placa de meio LB sólido com adição de cloranfenicol.

Tabela 6: Reação de *Golden Gate*. As reações foram incubadas a 37°C por 5 minutos e 16°C por 5 minutos por 60 ciclos, e incubação final a 65°C por 5 minutos.

Componentes	Volume
Plasmídeo	25 ng
Inserto	500 ng
Buffer 10x	2 µl
T4 DNA Ligase	0,5 µl
RE <i>Bsa</i> I (Fastdigest)	0,5 µl
H ₂ O MiliQ	QSP. 20 µl
Volume Total	20 µl

Tabela 7: Reação de digestão por enzimas de restrição. As reações foram incubadas a 37°C por 2 horas seguida por 80°C por 20 minutos para inativação das enzimas de restrição.

Componentes	Volume
Plasmídeo ou inserto	600 ng
Buffer 10x	2 µl
RE <i>Xba</i> I (Fastdigest)	1 µl
RE <i>Sa</i> II (Fastdigest)	1 µl
H ₂ O MiliQ	QSP. 20 µl
Volume Total	20 µl

Tabela 8: Reação de ligação de DNA, foi utilizado a proporção de 1:20 de vetor (3893 pb) para inserto (151 pb). As reações foram incubadas a 22°C por 2 horas ou 16°C por *overnight*.

Componentes	Volume
Plasmídeo	60 ng
Inserto	46 ng
Buffer 10x	2 µl
T4 DNA Ligase	0,5 µl
H ₂ O MiliQ	QSP. 20 µl
Volume Total	20 µl

Para a confirmação dos clones recombinantes foi feita a extração plasmidial através do kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* da Promega, para a primeira triagem foi feita uma reação de digestão enzimática utilizando enzimas específicas

para cada *Switch* (**Tabela 9**). Os plasmídeos potencialmente positivos foram submetidos ao sequenciamento de DNA pelo método de Sanger para confirmar se as construções estavam corretas e posteriormente foram realizados os alinhamentos das sequências esperadas dos plasmídeos contendo os *switches* com a sequência obtida através do sequenciamento através do software Benchling [Biology Software]. (2022).

Estes plasmídeos transformados foram primeiramente propagados e clones recombinantes de *E. coli* portando o plasmídeo foram estocados em glicerol a -80°C. Amostras desses plasmídeos contendo os *switches* foram então utilizadas para os testes de funcionalidade dos *Toehold Switches*.

Tabela 9: Reação de digestão enzimática para triagem dos clones recombinantes. As reações foram incubadas a 37°C por 2 horas para a digestão e 65°C por 20 minutos ou 80°C por 10 minutos para inativação das enzimas.

Componentes	Volume
Plasmídeo	600 ng
Buffer 10x	2 µl
Enzima de restrição I	1 µl
Enzima de restrição II	1 µl
H2O MiliQ	QSP. 20 µl
Volume Total	20 µl

3.4 Síntese dos RNA *Triggers*

A síntese dos RNAs triggers foi realizada por reação de transcrição *in vitro*, utilizando a T7 RNA polimerase (Promega) e os oligos de DNA molde dos anelados em fita dupla (**Tabela 10**). Após a transcrição *in vitro*, foi realizada a degradação do molde de DNA utilizando DNase I (Promega), onde foi adicionado 5 µl de DNase, 6,5 µl do buffer da DNase e 3,5 µl de H₂O RNase free ao tubo da reação de transcrição, essa reação foi então incubada à 37 °C por 1 hora a 400 rpm. Após a degradação do molde, foi realizado o protocolo de precipitação com etanol para

purificação da amostra de RNA. Primeiramente foi adicionado 10% do volume total (6,5 µl para uma reação de 65 µl) de acetato de sódio 3 M e 3 vezes o volume de etanol 100% (214,5 µl para 71,5 µl de reação) à reação. A mistura foi incubada à -80°C por 30 minutos à uma hora, dependendo do tamanho do inserto (quanto menor o inserto maior o tempo de incubação), após este tempo a reação foi centrifugada à 4°C por 30 minutos à 17.000 G. O sobrenadante foi então descartado, adicionados 50 µl de etanol 70% e realizada outra centrifugação de 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi seco por 10 minutos a 40°C em um termobloco. Após este tempo, o pellet foi ressuscendido em 20 µl de H₂O RNase free. Os plasmídeos contendo os *toehold switches* passaram por este mesmo processo de purificação através de precipitação com etanol para remoção de qualquer contaminação por RNAses. Todo o processo foi realizado utilizando reagentes RNase free e tomando os devidos cuidados para não contaminar as amostras com RNAses.

Tabela 10: Reação de transcrição *in vitro*. As reações foram incubadas a 37°C por 16h sob agitação de 400 rpm em termobloco.

Componentes	Volume
DNA	500 ng
Buffer para transcrição 5X	10 µl
DTT 100mM	5 µl
T7 RNA Polimerase	40 U
H ₂ O MiliQ	QSP. 50 µl
Volume Total	50 µl

3.5 Teste de funcionalidade e especificidade dos RNAs *switch*

A funcionalidade dos RNAs *switch* foi testada contra sequências sintéticas correspondentes aos RNAs virais delimitados como sequências *trigger*. Por uma questão prática, inicialmente não foram testados RNAs virais completos, que seriam difíceis de produzir em quantidades adequadas *in vitro*, já que o sistema de

transcrição com a T7 polimerase é mais eficiente para sequências curtas. Usar sequências curtas de RNA *trigger* não deve distorcer os resultados já que, segundo *Pardee et al.* (2014), pequenos RNAs *trigger* fornecem uma indicação representativa da função dos sensores. Assim, a partir das medidas de ativação de expressão gênica geradas por cada RNA *switch* testado, serão calculadas as amplitudes dinâmicas de ativação.

A especificidade de cada RNA *switch* construído foi testada a partir da incubação da reação de expressão gênica *in vitro* com RNAs não específicos, ou seja, em reações cruzadas onde o RNA alvo de um *switch* foi tentado com outro *switch*.

A reação de expressão *in vitro* foi realizada utilizando o *Trigger* de RNA obtido na etapa 3.4, os *switches* de RNA previamente construídos e o kit *E. coli* T7 S30 *extract system for circular RNA* (Promega). O kit contém um extrato de *E. coli* BL21 que possui a T7 RNA polimerase para a transcrição e todos os componentes necessários para este processo e para a tradução de proteínas, exceto os aminoácidos que foram adicionados separadamente à reação.

Os testes de funcionalidade foram realizados com amostras sintéticas de RNA, que representam os alvos escolhidos no genoma do Sars-CoV 2. Foram testadas diferentes concentrações de plasmídeo contendo o *switch* para padronização da reação. Já a quantidade de *trigger* utilizada na reação foi de 1:100 (plasmídeo-*switch*:RNA-*trigger*), a qual foi padronizada em experimentos previamente realizados pelo grupo de pesquisa. A reação foi incubada em banho maria a 30°C por até 3 horas, com coleta de alíquotas nos tempos de 30 minutos, 1 hora e 2 horas. As reações foram paradas com a adição de BSA 1% (m/v) numa proporção de 1:10 (reação:BSA) para inibir a reação.

Após a reação de expressão *in vitro*, foram realizadas as reações de produção de luminescência utilizando luciferina como substrato para a enzima Epic Luciferase, controlada pelo *switch*. Esta reação foi realizada em uma placa branca de 96 poços, a qual foram adicionados aos poços 50 µl de solução de luciferina e 10 µl da reação contendo a luciferase. A reação foi realizada na leitora de placas Infinite® M200 Pro (Tecan) a uma temperatura de 25°C em 15 ciclos de 5 segundos a uma agitação de 158 rpm e com um tempo de integração de 1000 ms.

4. Resultados e discussão

4.1 Seleção das sequências-alvo para construção dos RNA *switches*

Nesta primeira etapa foi realizado o alinhamento de sequências de diferentes cepas de Sars-Cov-2 com Sars-Cov e MERS-Cov para identificação de possíveis sequências-alvo para o desenho dos biossensores. Através dos alinhamentos, foi possível identificar diversas áreas do genoma do Sars-Cov-2 que se mostravam conservadas entre diferentes cepas do vírus, possibilitando assim a identificação de diversos alvos para o desenho de *Toehold switches*. Estes alvos apresentam uma baixa similaridade entre si e com as sequências dos vírus previamente descritos, sendo assim possível realizar o desenho de biossensores que sejam específicos para o SARS-CoV-2 e que não apresentem reações cruzadas com vírus similares. Dentre eles, foram escolhidos inicialmente 15 alvos, os alvos 1 a 9 tem como base à Orf1Ab Polyprotein e os alvos 10 a 15 tem como base à o gene da proteína S (Tabela 11).

Tabela 11: alvos do genoma de Sars-Cov-2 escolhidos após a análise dos alinhamentos dos genomas para o desenho dos biossensores.

Alvos	Sequência
Alvo 1	TCGAACTGCACCTCATGGTCATGTTATGGTTGAGCTGGTA
Alvo 2	TTACCCGTGAACTCATGCGTGAGCTTAACGGAGGGGCATA
Alvo 3	CCTTCTAGCACGTGCTGGTAAAGCTTCATGCACTTTGTCC
Alvo 4	TATGAATTGCAGACACCTTTTGAAATTAAATTGGCAAAGA
Alvo 5	CGAATACCATAATGAATCTGGCTTGAAAACCATTCTTCGT
Alvo 6	GGTGGACAAATTGTCACCTGTGCAAAGGAAATTAAGGAGA
Alvo 7	TTGTACAGAAAGTGTGTTAAATCCAGAGAAGAACTGGCC
Alvo 8	TTTACAACCATTAGAACCAACCTACTAGTGAAGCTGTTGAA
Alvo 9	CAACTACTATTCAAACAATTGTTGAGGTTCAACCTCAATT

Alvo 10	ACATGTCTCTGGGACCAAAGGTACTAAGAGGTTTGATAAC
Alvo 11	AAAACAACAAAAGTTGGATGGAAAGTGAGTTCAGAGTTTA
Alvo 12	GAATATTGATGGTTATTTTAAAATATATTCTAAGCACACG
Alvo 13	CTCAGAAACAAAGTGTACGTTGAAATCCTTCACTGTAGAA
Alvo 14	AAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGTA
Alvo 15	TCAGACTAATTCTCCTCGGCGGGCACGTAGTGTAGCTAGT

4.2 Design *in silico* dos biossensores

Após a escolha destes alvos, foi utilizado o *software* NUPACK para o desenho dos *Toehold switch*. Foram desenhados dois biossensores para cada uma das 15 sequência-alvo utilizando o código desenvolvido. Após o desenho dos *switches*, o comportamento dos mesmos sozinhos e em solução com os RNAs alvo foi simulado. Os *switches* desenhados apresentaram a estrutura secundária desejada, ocultando o RBS e códon inicial do gene repórter. Ainda, todos os *switches* formaram o pareamento programado com seus respectivos RNAs-alvo, de forma a liberar o RBS e ATG inicial, com 100% de complexo sendo previsto para o equilíbrio (**Figura 17** e **18**). Após desenho e análise dos biossensores, foram realizados testes utilizando o *software* RBS *calculator* para avaliar os níveis de expressão e energia necessária para ligação do RBS nas variações ON e OFF dos biossensores, onde a variação ON seria o nível de expressão com o *hairpin* desfeito pelo RNA *trigger* e a OFF com o *hairpin* ativo (**Tabela 12**). Após estes testes *in silico*, foram escolhidos os 3 biossensores mais promissores para a realização de testes *in vitro* (**Tabela 13**). Os *Toehold switches* escolhidos apresentam altas taxas de tradução quando ativados e quantidades quase nulas de tradução quando inativados, mostrando resultados promissores para os testes *in vitro*. Estes *Switches* foram então comprados como oligos contendo os *switches* e o promotor T7 para clonagem em plasmídeo.

Devido a dificuldades para a clonagem dos *switches* alvo, foi realizado o *design* de 10 novos biossensores para os alvos 7 e 8 utilizando um *script* otimizado, que apresentaram melhores resultados nos testes *in silico* do primeiro grupo de *switches* desenhados. Os biossensores que utilizam este novo *script* apresentaram

uma melhora considerável em todos os parâmetros avaliados (**Tabela 14**), sendo o *switch* mais promissor para cada um destes 2 alvos comprados como oligos (**Figura 19, 20 e Tabela 15**). Os oligos construídos para estes novos *switches* tiveram o sítio de ligação da enzima de restrição *Sall* adicionado entre a estrutura do biossensor e o gene EPIC luciferase. Essa alteração foi realizada para possibilitar a utilização do método tradicional de digestão e ligação para a clonagem destes alvos no vetor de expressão alvo, ao invés da inserção por método de Golden Gate.

Figura 17: Análise *in silico* dos biossensores escolhidos através do NUPACK. Do lado direito está uma escala com a probabilidade de formação das estruturas no equilíbrio. quanto maior o número na escala, maior a probabilidade da interação ocorrer no equilíbrio. A) estrutura alvo dos *switches*. B) estrutura do *switch* 7b. C) estrutura do *switch* 8b D) estrutura do *switch* 13a.

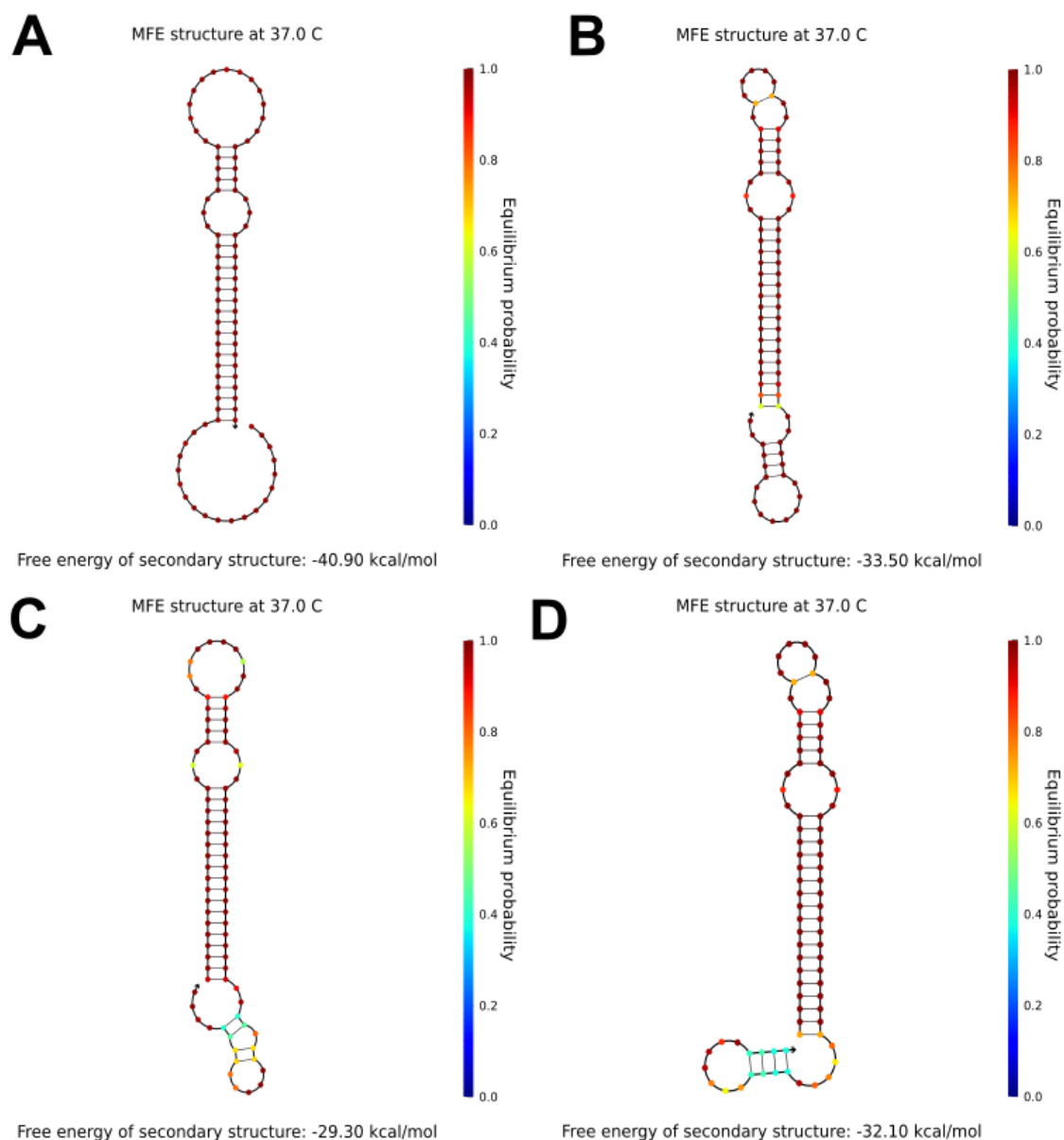


Figura 18: Análise *in silico* dos biossensores escolhidos através do NUPACK. Do lado direito está uma escala com a probabilidade de formação das estruturas no equilíbrio. quanto maior o número na escala, maior a probabilidade da interação ocorrer no equilíbrio. A) estrutura alvo dos complexos *switch* + *trigger*. B) estrutura do complexo formado pelo *switch* 7b ligado ao *trigger* específico. C) estrutura do complexo formado pelo *switch* 8b ligado ao *trigger* específico. D) estrutura do complexo formado pelo *switch* 13a ligado ao *trigger* específico.

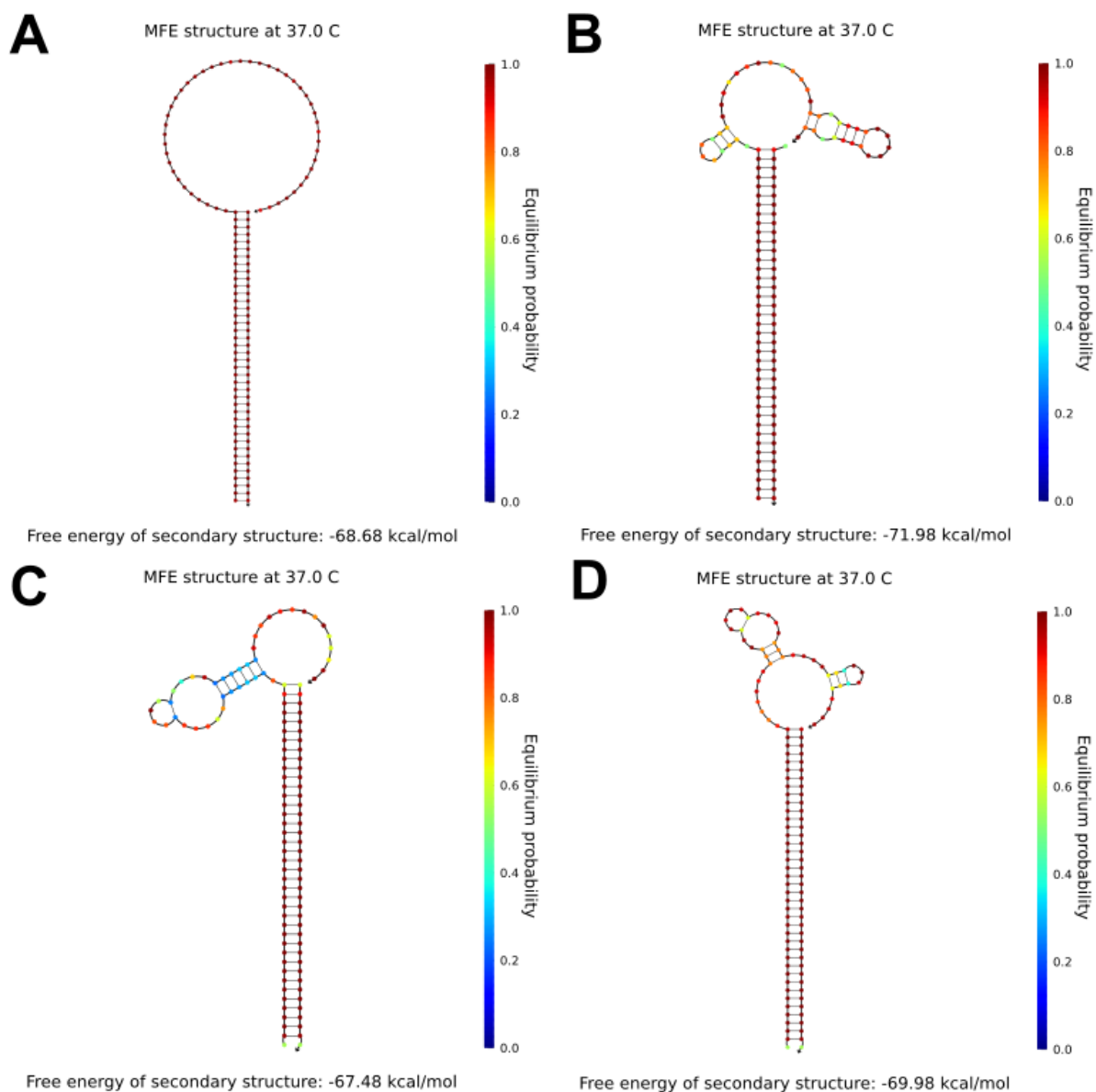


Tabela 12: Simulação com o software RBS Calculator dos três *switches* desenhados. TR off - taxa de tradução off, ΔG_t Off - energia para ligação do ribossomo off, TR on - taxa de tradução on, ΔG_t On - energia para ligação do ribossomo on.

Alvo	TR Off	ΔG_t Off	TR On	ΔG_t On
s7b	8,00	1,00	11286	-4,92
s8a	2,46	3,82	6630	-3,74

s13a	6,23	1,75	7067	-3,38
------	------	------	------	-------

Tabela 13: Sequências de RNA dos *Toehold Switches* projetadas utilizando o *script* otimizado para o NUPACK.

Alvo	Switch
Alvo s7b	GGCCAGUUUCUUCUCUGGAUUUAACA CACUUUCUGUACAAGCUUAUAGCAGG AGGAAUAAGAUGGUACAGAAAGUGUG UUAA
Alvo s8b	UUCAACAGCUUCACUAGUAGGUUGUU CUAAUGGUUGUAAACCUUAUGAUAGG AGGAAUAAGAUGUACAACCAUUAGAA CAAC
Alvo s13a	UUCUACAGUGAAGGAUUUCAACGUAC ACUUUGUUUCUGAGGCUUAUAGCAG GAGGAAUAAGAUGCAGAAACAAAGUG UACGU

Tabela 14: Simulação com o software RBS Calculator dos dois *switches* mais promissores desenhados com o *script* otimizado. TR off - taxa de tradução off, ΔG_t Off - energia para ligação do ribossomo off, TR on - taxa de tradução on, ΔG_t On - energia para ligação do ribossomo on.

Alvo	TR Off	ΔG_t Off	TR On	ΔG_t On
s79	2,14	14,13	45514	-8,02
s84	0,76	16,42	19095	-6,09

Figura 19: Análise *in silico* dos biossensores escolhidos através do NUPACK. Do lado direito está uma escala com a probabilidade de formação das estruturas no

equilíbrio. quanto maior o número na escala, maior a probabilidade da interação ocorrer no equilíbrio. A) estrutura alvo dos *switches*. B) estrutura do *switch* 79. C) estrutura do *switch* 84.

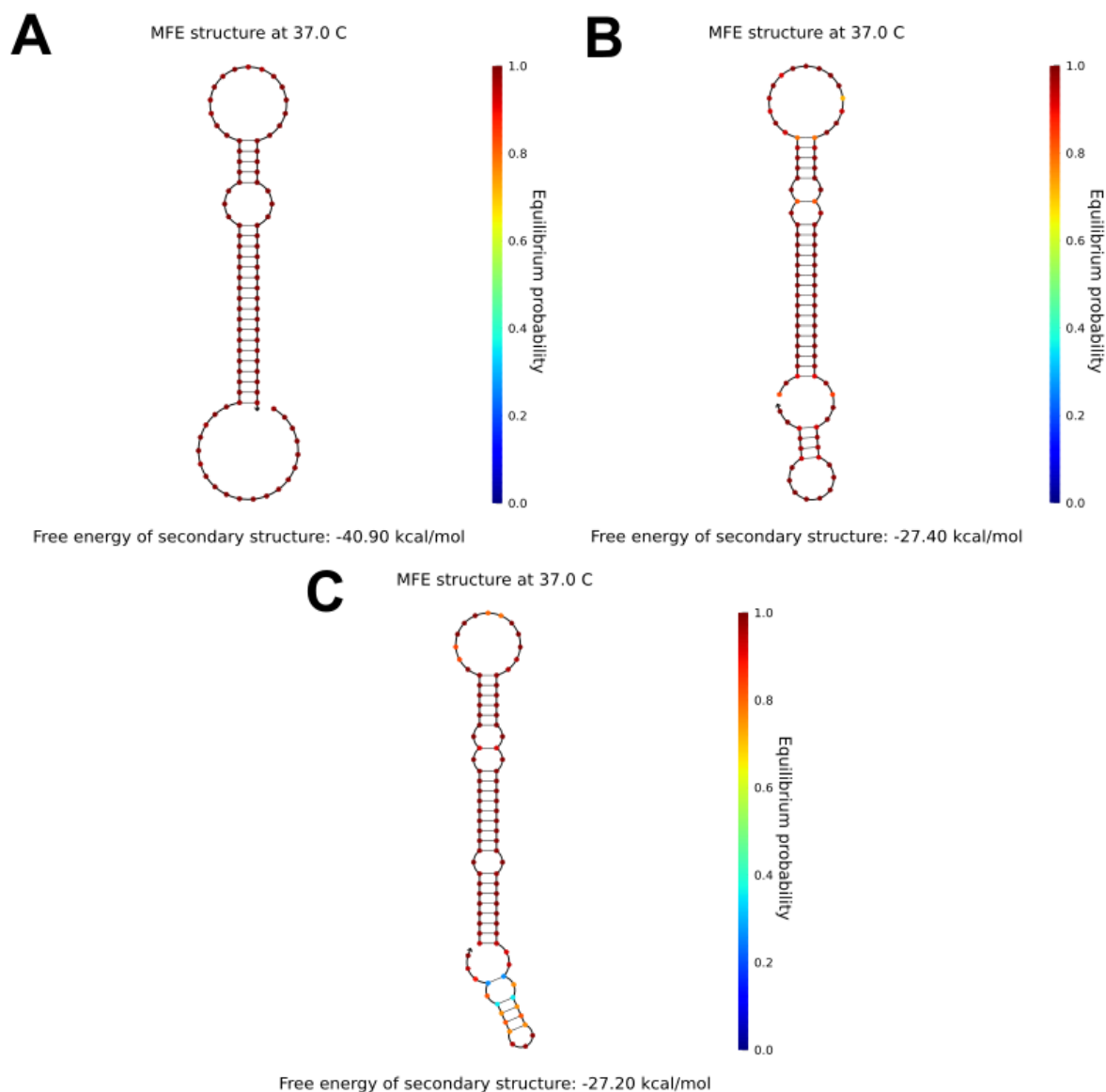


Figura 20: Análise *in silico* dos biossensores escolhidos através do NUPACK. Do lado direito está uma escala com a probabilidade de formação das estruturas no equilíbrio. quanto maior o número na escala, maior a probabilidade da interação ocorrer no equilíbrio. A) estrutura alvo dos complexos *switch* + *trigger*. B) estrutura do complexo formado pelo *switch* 79 ligado ao *trigger* específico. C) estrutura do complexo formado pelo *switch* 84 ligado ao *trigger* específico.

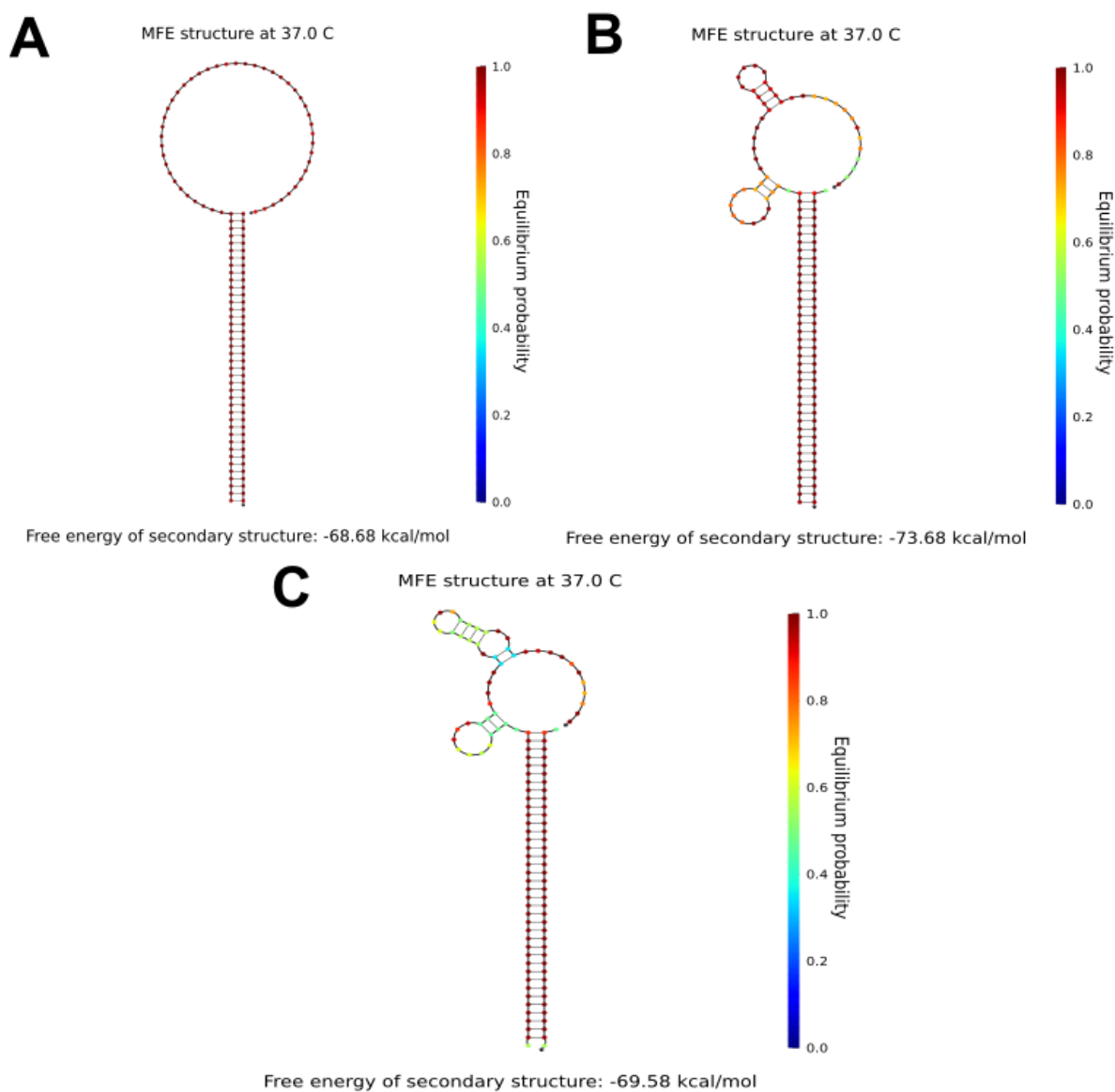


Tabela 15: Sequências de RNA dos *Toehold Switches* desenhados utilizando o *script* otimizado.

Alvo	Switch
Alvo s79	GGCCAGUUUCUUCUCUGGAUUUAACA CACUUUCUGUACAAGCUAUAAGACAG GCAGAGGAGUAUAGUGGUACAGAAAG UGUGUUUA
Alvo s84	UUCAACAGCUUCACUAGUAGGUUGUU CUAAUGGUUGUAAAGCUAUACGGGAG CCAGAGGAGUAUAAUGUACAACCAUA AGAACAAC

4.3 Construção do sistema de expressão

A clonagem dos *switches* iniciais através da técnica de *Golden gate* se mostrou desafiadora sendo possível realizar apenas a clonagem de um dos três alvos propostos. Utilizando essa técnica, o único *switch* clonado foi o s7b (**Figura 21**). Após realizada a troca para os oligos desenhados para serem clonados através da metodologia tradicional de digestão e ligação, técnica mais simples e bem descrita na literatura, foi possível realizar a clonagem de dois de três dos *switches* propostos (**Figura 22** e **Figura 23**). As metodologias de digestão e ligação se mostraram eficientes para a clonagem dos vetores de expressão, assim como a transformação dos alvos através da técnica de choque térmico possibilitando a rápida clonagem dos *switches* nos vetores de expressão.

A triagem através da digestão enzimática se mostrou eficiente para a seleção dos clones recombinantes, sendo possível observar as bandas nos tamanhos esperados no gel de agarose após a eletroforese.

O sequenciamento pelo método de Sanger possibilitou a confirmação da construção dos vetores de expressão realizados até o momento (**Figuras 24, 25 e 26**), possibilitando o avanço para as próximas etapas onde foram realizados os testes para avaliar a funcionalidade dos *switches* construídos. Para tanto, foi realizada a análise do nível de expressão da proteína EPIC luciferase em testes de cinética, utilizando os *triggers* específicos e inespecíficos.

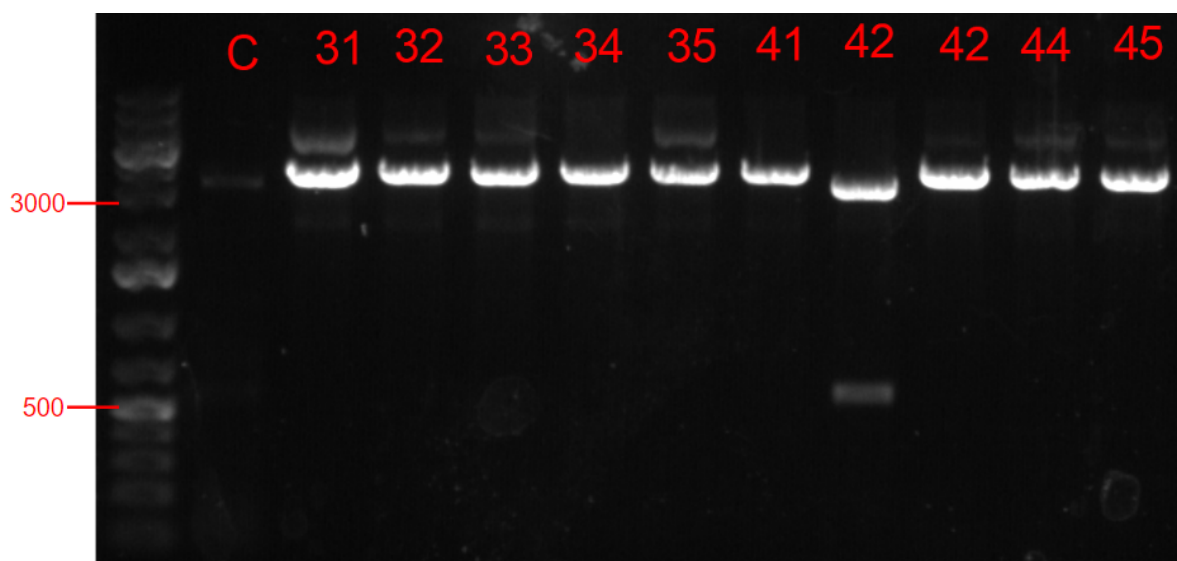


Figura 21: Eletroforese em gel de agarose para triagem dos clones recombinantes contendo o plasmídeo pSB1C3_T7-EpicLuc ligado ao *Switch* 7b através da reação de *golden gate*. Todas as amostras foram digeridas com a enzima de restrição *Hind*III. C–Controle negativo, plasmídeo pSB1C3_T7-EpicLuc não transformado. 31–35 e 41–45 amostras das transformações de *E. coli* com a reação de *Golden gate*. Neste gel, a única colônia potencialmente positiva foi a 42, que apresentou duas bandas de tamanhos aproximados de 3267 pb e 593 pb.

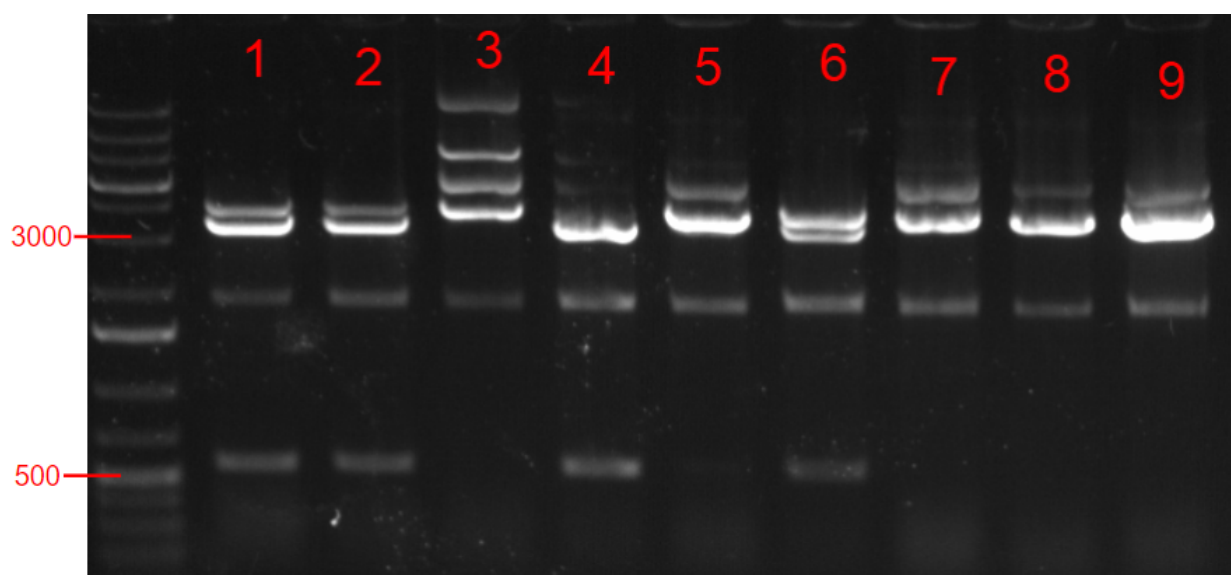


Figura 22: Eletroforese em gel de agarose para triagem dos clones recombinantes contendo o plasmídeo pSB1C3_T7-EpicLuc ligado ao *Switch* 8a através de reações de restrição e ligação. Todas as amostras foram digeridas com as enzimas de restrição *Spe*I e *Hind*III. 1 a 9) plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* transformantes. Neste gel, as colônias potencialmente positivas foram a 1, 2, 4 e 6, as quais apresentam uma banda de 618 pb.

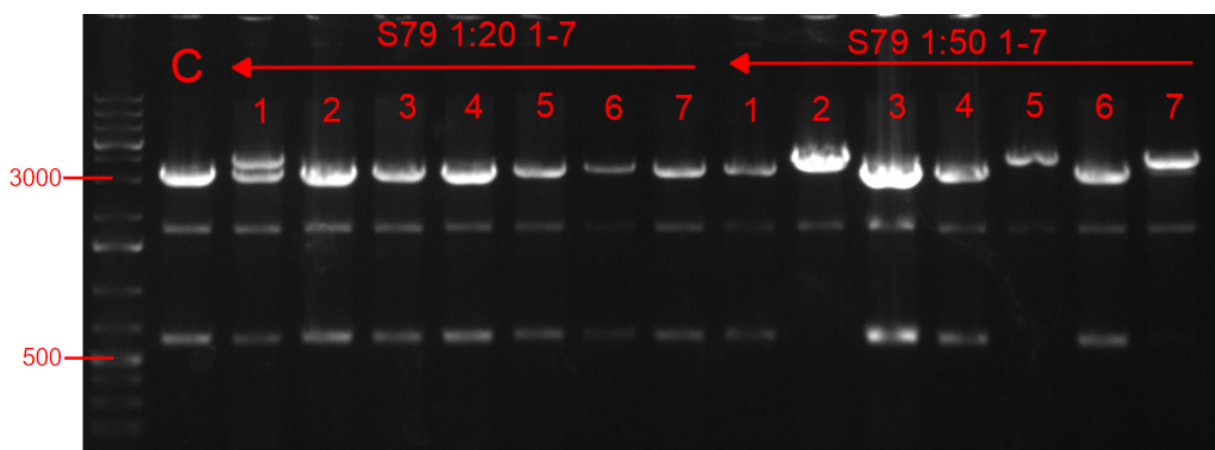


Figura 23: Eletroforese em gel de agarose para triagem dos clones recombinantes contendo o plasmídeo pSB1C3_T7-EpicLuc_s8a ligado ao *switch* 79. Todas as amostras foram digeridas com as enzimas de restrição *SpeI* e *HindIII*. C - Amostra do plasmídeo pSB1C3_T7-EpicLuc_s8a digerido e utilizado como controle negativo. As amostras identificadas como s79 1:50 1-7 e s79 1:20 1-7 correspondem aos plasmídeos extraídos das colônias de *E. coli* transformantes. Neste gel as colônias potencialmente positivas foram a s79 1:50 2, 5 e 7, que não apresentam a banda de 618 pb.

Figura 24: Alinhamento da sequência do pSB1C3_T7-EpicLuc contendo o *Switch* 7b com as sequências obtidas através do sequenciamento das fitas direta e reversa, por método de Sanger, da amostra “42”, apresentada na figura 21 (Benchling).



Figura 25: Alinhamento da sequência do pSB1C3_T7-EpicLuc contendo o *Switch* 8a com as sequências obtidas através do sequenciamento por método de Sanger da amostra 2 obtida após a triagem por digestão enzimática (Benchling).

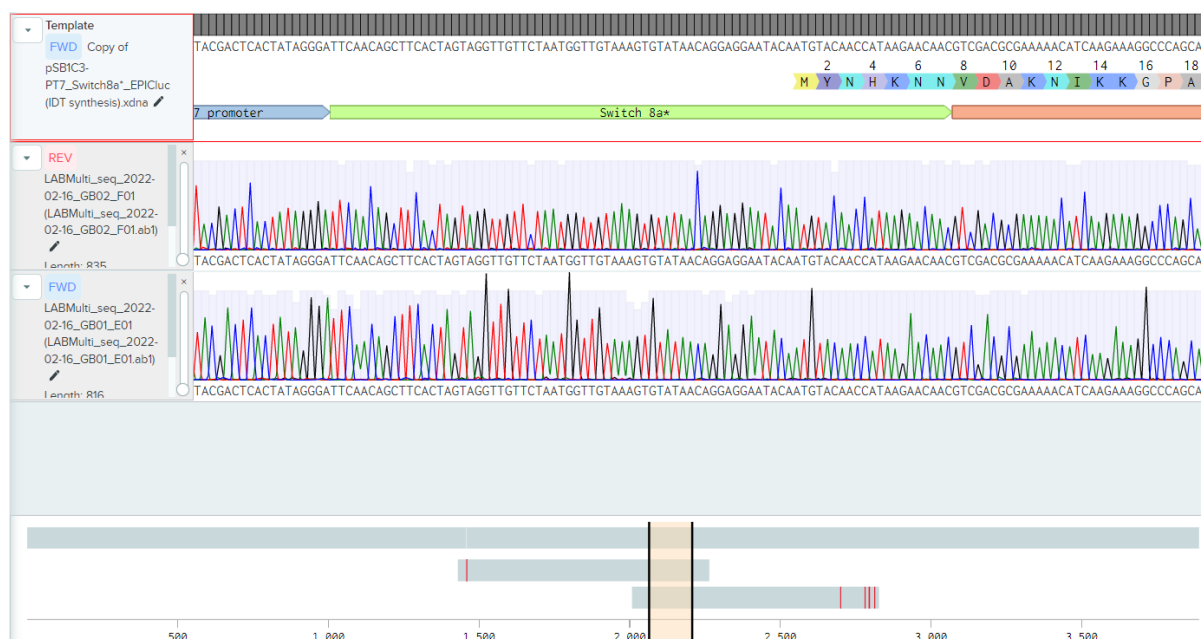


Figura 26: Alinhamento da sequência do pSB1C3_T7-EpicLuc contendo o *Switch* 79 com as sequências obtidas através do sequenciamento por método de Sanger das 3 amostras positivas (2, 5 e 7) apresentadas na figura 23 (Benchling).



4.4 Teste de funcionalidade e especificidade dos RNAs *switch*

O primeiro *switch* a ter sua funcionalidade avaliada foi o s7b, que utiliza como base a sequência alvo 7. Primeiramente, foi feita a padronização da quantidade de plasmídeo necessária para uma ativação satisfatória do *switch*.

Neste primeiro teste, demonstrou-se expressão gênica adequada utilizando apenas 30 ng de plasmídeo, sendo então utilizada como padrão para a realização dos testes de especificidade (**Figura 27**). Considerou-se como uma expressão gênica adequada para o controle níveis correspondentes a atividade luciferase de até 500 unidades arbitrárias de luminescência emitida (u.a.). Isso corresponde a um valor pouco maior do que uma reação em branco (sem molde), que apresenta resultado de até 100 u.a. Após esta padronização, foi realizado o teste utilizando *triggers* inespecíficos para avaliar a especificidade do *switch*. O teste foi realizado de forma cruzada, utilizando o *switch* 7b com o *trigger* 8. O resultado obtido foi negativo, com as quantificações indicando nenhuma diferença com o *trigger* específico (**Figura 28**). Porém, neste novo teste, o *trigger* específico não apresentou o resultado positivo obtido anteriormente sendo assim descartado.

Figura 27: Resultados da reação de expressão *in vitro* da luciferase sob controle do *switch* 7b, contida no plasmídeo pSB1C3_T7-Switch7b-EpicLuc. A) reação utilizando 10 ng de plasmídeo contendo o *switch* e *trigger* na proporção de 1:100 (aproximadamente 9.79×10^{13} cópias) . B) reação utilizando 20 ng de plasmídeo contendo o *switch* e *trigger* na proporção de 1:100 (aproximadamente 1.96×10^{14} cópias). C) reação utilizando 30 ng de plasmídeo contendo o *switch* e *trigger* na proporção de 1:100 (aproximadamente 2.93×10^{14} cópias) D) reação utilizando 50 ng de plasmídeo contendo o *switch* e *trigger* na proporção de 1:100. A reação com 30 (aproximadamente 4.89×10^{14} cópias) ng de plasmídeo se mostrou a mais eficiente sendo utilizada para o teste com *triggers* inespecíficos.

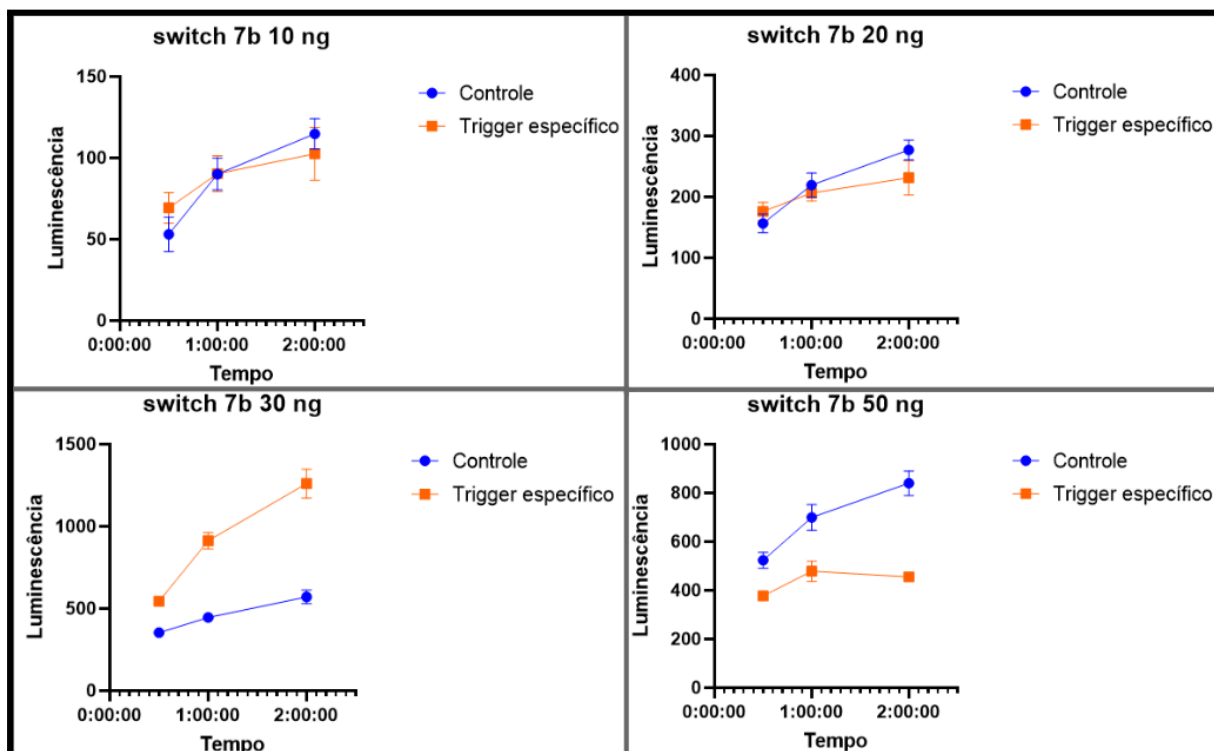
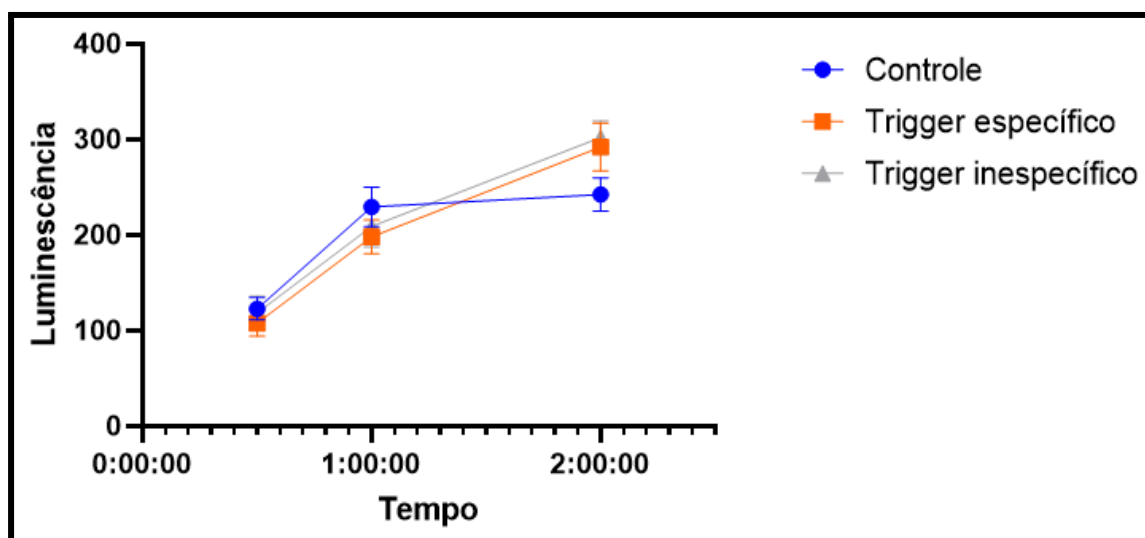


Figura 28: Resultados da reação de expressão *in vitro* da luciferase sob controle do *switch* 7b, contida no plasmídeo pSB1C3_T7-Switch7b-EpicLuc. Neste teste foi utilizada uma quantidade de 30 ng do plasmídeo, que se mostrou a quantidade mais eficiente, e uma proporção de 1:100 (aproximadamente 2.93×10^{14} cópias) de plasmídeo para *trigger*. Na reação controle foi utilizado apenas o *switch* sem adição do *trigger*. Como *trigger* específico foi utilizado o *trigger* 7 e como *trigger* inespecífico foi utilizado o *trigger* para o alvo 8.



Foram realizados dois testes para avaliação do sistema s8a, um utilizando uma quantidade de 80 ng de plasmídeo e outro utilizando 20 ng de plasmídeo. A quantidade de 80 ng resultou em um aumento de quase 3 vezes no nível de luminescência, sendo possível observar um aumento no nível de expressão do *switch* já com 30 minutos. Porém, não foi analisado o nível de expressão com 2 horas pois os níveis de luminescência com uma hora já se apresentavam bastante elevados. Sendo assim necessária a repetição do teste com quantidade menor de plasmídeo para avaliar a viabilidade deste *switch*. Ainda assim, foi possível identificar que este biossensor se mostra promissor, apresentando atividade luciferase pelo menos três vezes maior para o *trigger* específico em relação ao controle (**Figura 29**). Foram então realizados novos testes utilizando 20 ng de plasmídeo contendo o *toehold switch* s8a, este novo teste apresentou resultados promissores, gerando um alto nível de expressão gênica a partir do *switch* quando adicionado o *trigger* específico e um nível adequado de repressão do gene repórter nos controles utilizados, apresentando uma luminescência de até 3 vezes maior na reação utilizando o *trigger* específico quando comparado à reação controle no tempo de 1 hora (**Figura 30**).

Figura 29: Resultados da reação de expressão *in vitro* da luciferase sob controle do *switch* s8a, contida no plasmídeo pSB1C3_T7-Switch8a-EpicLuc utilizando 80 ng do plasmídeo contendo o *switch* em uma proporção de 1:100 (aproximadamente 7.83×10^{14} cópias) de *switch* para *trigger*. A reação utilizando o *trigger* específico mostrou um aumento no nível de luminescência já aos 30 minutos de reação.

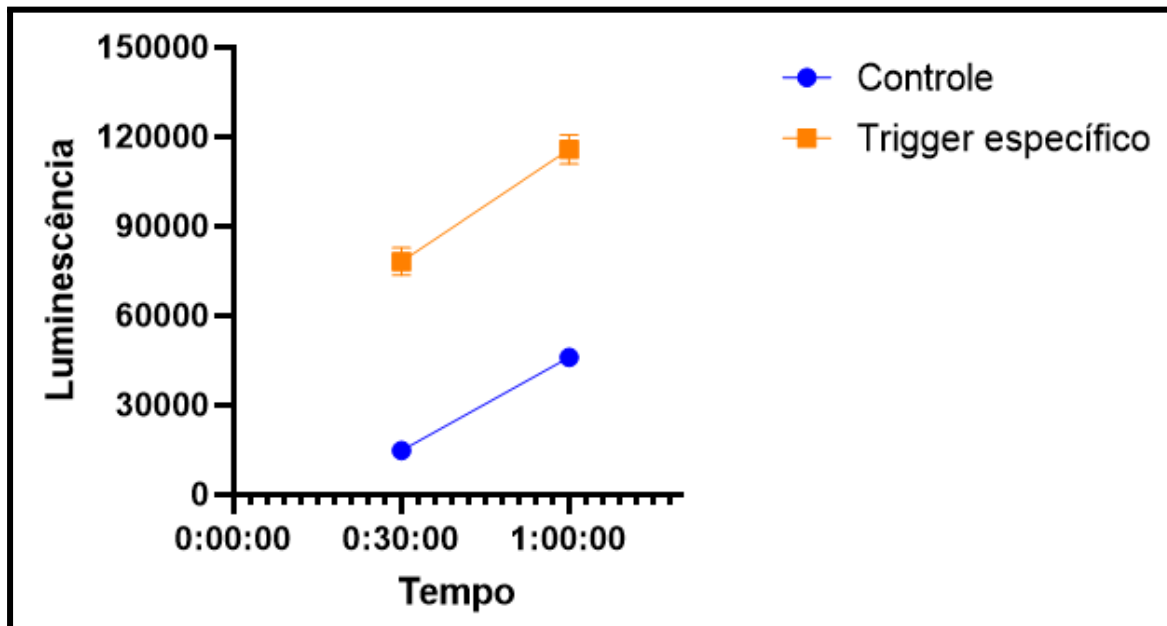
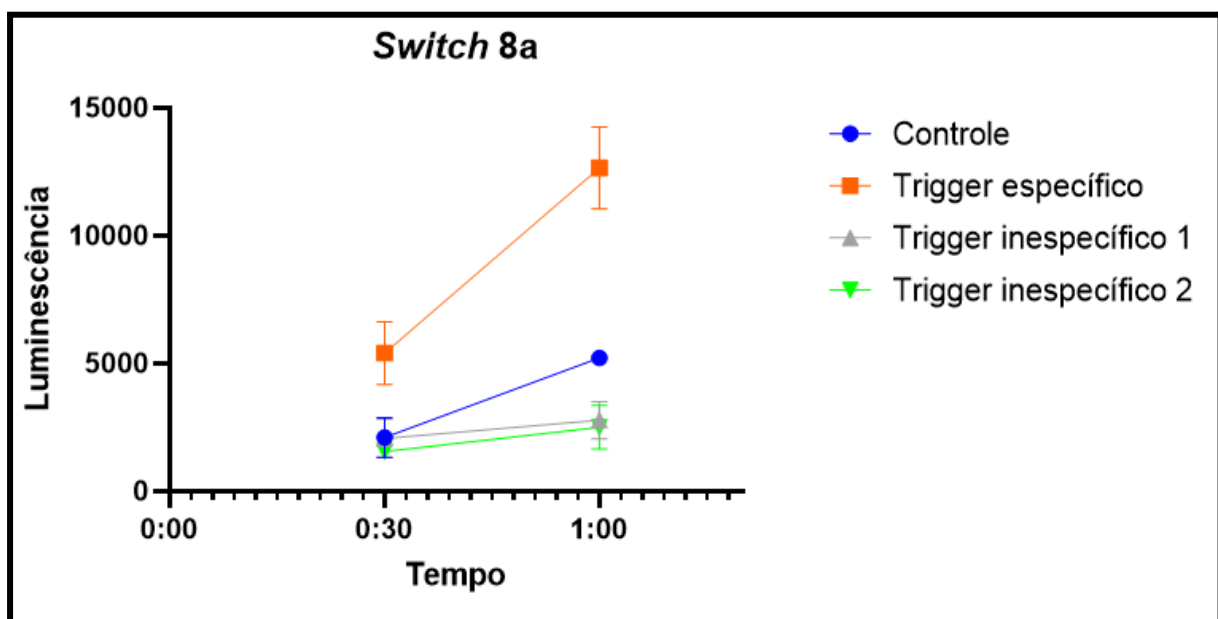
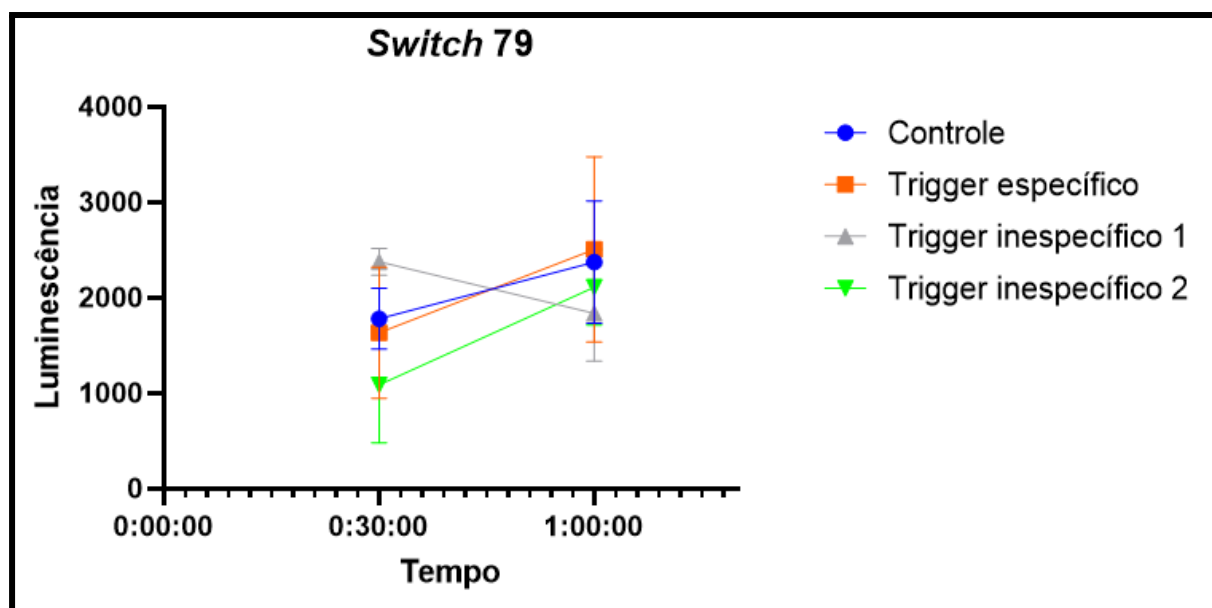


Figura 30: Resultados da reação de expressão *in vitro* da luciferase sob controle do *switch* s8a, contida no plasmídeo pSB1C3_T7-Switch8a-EpicLuc utilizando 20 ng do plasmídeo contendo o *switch* em uma proporção de 1:100 (aproximadamente 1.96×10^{14} cópias) de *switch* para *trigger*. A reação utilizando o *trigger* específico mostrou um aumento no nível de luminescência já aos 30 minutos de reação. Como *trigger* específico foi utilizado o *trigger* 8, o *trigger* inespecífico 1 é o *trigger* para o alvo 13 e um *trigger* inespecífico 2 é um *trigger* para um *switch* para detecção do vírus DENV.



O *switch* 79 não apresentou bons resultados nos testes de especificidade, não sendo capaz de distinguir o *trigger* específico do controle e dos inespecíficos não sendo possível obter resultados satisfatórios ao utilizar este *switch* em testes diagnósticos pois ocasionaria falsos positivos devido ao alto vazamento da expressão basal (**Figura 31**). Este resultado pode ser atribuído ao vazamento da expressão do gene repórter controlado pelo *switch* 79. Assim, os níveis de expressão basal se aproximaram do nível de expressão induzido pelo *trigger* específico.

Figura 31: Resultados da reação de expressão *in vitro* da luciferase sob controle do *switch* 79, contido no plasmídeo pSB1C3_T7-Switch79-EpicLuc. Neste teste foi utilizada uma quantidade de 10 ng do plasmídeo e uma proporção de 1:100 (aproximadamente 9.79×10^{13} cópias) de plasmídeo para *trigger*. Na reação controle foi utilizado apenas o *switch* sem adição do *trigger*. Como *trigger* específico foi utilizado o *trigger* 7, o *trigger* inespecífico 1 é o *trigger* para o alvo 13 e um *trigger* inespecífico 2 é um *trigger* para um *switch* para detecção do vírus DENV.



5. Conclusões

Após a análise dos resultados *in silico* é possível concluir que o desenvolvimento de biossensores do tipo *Toehold switch* para detecção de Sars-Cov-2 é viável com o script otimizado e mostra-se um método promissor.

O alinhamento do genoma de SARS-CoV-2 com os diferentes tipos de coronavírus que afetam humanos ajudou a identificar sequências similares que poderiam levar a resposta cruzada com estes outros vírus. Enquanto o alinhamento de diversas cepas de SARS-CoV-2 possibilitou a seleção de sequências conservadas do genoma, o que aumenta a probabilidade do teste funcionar também em cepas de SARS-CoV-2 mutantes.

O desenho dos biossensores através do NUPACK possibilitou uma visualização prévia da provável estrutura do *Toehold switch* e da sua viabilidade para testes *in vitro*. Já os cálculos feitos no RBS Calculator forneceram dados que ajudaram na seleção dos *switches* mais promissores através das previsões de taxa de tradução nos estados ON e OFF dos *Toehold switch*.

A construção e clonagem dos sistemas de expressão se mostraram desafiadoras devido ao pequeno tamanho do inserto a ser inserido no plasmídeo na reação de *Golden gate*. Porém, após as mudanças no protocolo para utilizar a metodologia de digestão e ligação para clonagem, foi possível realizar a construção dos plasmídeos.

O teste de funcionalidade do *switch 7b* se mostrou promissor, porém o teste de especificidade do *switch* apresentou incapacidade deste em distinguir os *triggers* específicos e inespecíficos. O *switch 79* não apresentou capacidade de distinção entre o *trigger* específico e os inespecíficos, não apresentando boa capacidade de conter a expressão gênica na ausência do *trigger* específico, gerando alta expressão basal. Os testes do *switch 8a* se mostraram extremamente promissores. Quando utilizada a quantidade de 20 ng de plasmídeo, foi possível observar um aumento expressivo na expressão gênica controlada pelo *switch* no estado ativo sendo possível observar um aumento de luminescência de até 3 vezes o valor obtido no controle sem *trigger* e uma repressão forte dessa expressão no controle negativo e nos controles utilizando *triggers* inespecíficos.

Conclui-se que os objetivos deste trabalho foram alcançados com sucesso, tendo sido desenvolvido um *toehold switch* (s8a) funcional e com alta especificidade para a detecção de RNA do vírus SARS-CoV-2.

6. Referências Bibliográficas

- AILENI, M.; ROHELA, G.K.; JOGAM P; SOUJANYA, S.; ZHANG, B.; Biotechnological Perspectives to Combat the COVID-19 Pandemic: Precise Diagnostics and Inevitable Vaccine Paradigms. **Cells**. v. 31 March 2022. doi: 10.3390/cells11071182.
- ARBYN, M.; SNIJDERS, P.J.; MEIJER, C.J.; BERKHOF J, CUSCHIERI K, KOCJAN BJ, POLJAK M. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? **Clin Microbiol Infect**. v. 21-9 september 2015 Sep. doi: 10.1016/j.cmi.2015.04.015.
- AMARA, U.; RASHID, S.; MAHMOOD, K.; NAWAZ, M.H.; HAYAT, A.; HASSAN, M. Insight into prognostics, diagnostics, and management strategies for SARS CoV-2. **RSC Adv**. v.12-13 p. 8059-8094, 2022. doi: 10.1039/d1ra07988c
- AQUINO, E.M.L.; SILVEIRA, I.H.; PESCARINI, J.M. Social distancing measures to control the COVID-19 pandemic: potential impacts and challenges in Brazil. Medidas de distanciamento social no controle da pandemia de COVID-19: potenciais impactos e desafios no **Brasil**. **Cien Saude Colet**. v. 25 p. 2423-2446, 2020. doi:10.1590/1413-81232020256
- BASTOS, S.B.; CAJUEIRO, D.O. Modeling and forecasting the early evolution of the Covid-19 pandemic in Brazil. **Sci Rep**. v.10 2020 Nov . doi: 10.1038/s41598-020-76257-1
- Benchling** [Biology Software]. (2022). Retrieved from <https://benchling.com>.
- BOGOCH, I.I.; WATTS, A.; THOMAS-BACHLI, A.; HUBER, C.; KRAEMER, M.U.G.; KHAN, K. Potential for global spread of a novel coronavirus from China. **J Travel Med**. v. 12 2020. doi: 10.1093/jtm/taaa011
- BROUGHTON, J.P.; DENG, X.; YU, G. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. **Nat Biotechnol**. v. p. 870-874 2020. doi: 10.1038/s41587-020-0513-4
- Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, *et al*. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. **ACS Cent Sci**. 2020 May 27;6(5):591-605. doi: 10.1021/acscentsci.0c00501

CHAKRAVARTHY, A.; NANDAKUMAR, A.; GEORGE, G. Engineered RNA biosensors enable ultrasensitive SARS-CoV-2 detection in a simple color and luminescence assay. **Life Sci Alliance**. v. 30 2021 . doi: 10.26508/lsa.202101213..

CHAU, T.H.T.; MAI, D.H.A.; PHAM, D.N.; LE, H.T.Q.; LEE, E.Y. Developments of Riboswitches and Toehold Switches for Molecular Detection-Biosensing and Molecular Diagnostics. **Int J Mol Sci**. v. 21 2020. doi:10.3390/ijms21093192

Conselho nacional de saúde, **Vacinometro**
<https://conselho.saude.gov.br/vacinometro>, acessado em 22/12/2022

CORMAN, V.M.; RASCHE, A.; BARONTI, C. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. **Bull World Health Organ**. 2016. doi: 10.2471/BLT.16.175950

CORMAN, V.M.; LANDT, O.; KAISER, M. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR [published correction appears in Euro Surveill. 2021 Feb;26(5):]. **Euro Surveill**. v. 25, 2020. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at **Johns Hopkins University** (JHU),
<https://www.arcgis.com/apps/dashboards/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>
 acessado no dia 14/04/2022

ENJUANES, L.; SOLA, I.; ZÚÑIGA, S. Nature of viruses and pandemics: Coronaviruses. **Curr Res Immunol**. v. 3, p. 151-158, 2022. doi: 10.1016/j.crimmu.2022.08.003.

GERALDI, A.; PUSPANINGSIH, N.N.T.; KHAIRUNNISA, F. Update on the Development of Toehold Switch-Based Approach for Molecular Diagnostic Tests of COVID-19. **J Nucleic Acids**. v. 9, p. 925-938 2022. doi: 10.1155/2022/7130061.

GREEN, A.A.; SILVER, P.A.; COLLINS, J.J.; YIN, P. Toehold Switches: de-novo designed regulators of gene expression. v. 159, **Cell**. 2014 doi:10.1016/j.cell.2014.10.002

GREEN, A.A.; SILVER, P.A.; COLLINS, J.J.; YIN, P. Toehold switches enable wide dynamic range and highly orthogonal regulation of gene expression. **Cell**. 2014

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**. 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052

- HUERGO, L.F.; PAULA, N.M.; GONÇALVES, A.C.A. SARS-CoV-2 Seroconversion in Response to Infection and Vaccination: a Time Series Local Study in Brazil. **Microbiology Spectrum**. v. 10, 2022. DOI: 10.1128/spectrum.01026-22.
- HUNT, J.P.; ZHAO, E.L.; FREE, T.J. Towards detection of SARS-CoV-2 RNA in human saliva: A paper-based cell-free toehold switch biosensor with a visual bioluminescent output. **N Biotechnol**. v. 25 p. 53-60 2022. doi: 10.1016/j.nbt.2021.09.002.
- HUANG, C.; WEN, T.; SHI, F.J.; ZENG, X.Y.; JIAO, Y.J. Rapid Detection of IgM Antibodies against the SARS-CoV-2 Virus via Colloidal Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Assay. **ACS Omega**. v. 5 p. 12550-12556, 2020. doi:10.1021/acsomega.0c01554
- HOSSEINI, M.; BEHZADINASAB, S.; BENMAMOUN, Z.; DUCKER, W.A.; The viability of SARS-CoV-2 on solid surfaces. **Curr Opin Colloid Interface Sci**. v. 55. 2021. doi:10.1016/j.cocis.2021.101481
- HURST, K.R.; KOETZNER, C.A.; MASTERS, P.S. Characterization of a critical interaction between the coronavirus nucleocapsid protein and nonstructural protein 3 of the viral replicase-transcriptase complex. **J Virol**. v. 87 p. 9159-9172 2013. doi:10.1128/JVI.01275-13
- IMAI, Y.; KUBA, K.; NEELY, G.G.; Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. **Cell**. v.133 235-249 2008. doi:10.1016/j.cell.2008.02.043
- JACKSON, C.B.; FARZAN, M.; CHEN, B.; CHOE, H.; Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 23 p. 3-20, 2022. doi: 10.1038/s41580-021-00418-x.
- JIAO J.; DUAN, C.; XUE, L.; LIU, Y.; SUN, W.; XIANG, Y. DNA nanoscaffold-based SARS-CoV-2 detection for COVID-19 diagnosis. **Biosens Bioelectron**. v. 167, 2020. doi:10.1016/j.bios.2020.112479
- KEVADIYA, B.D.; MACHHI, J.; HERSKOVITZ, J.; OLEYNIKOV, M.D.; BLOMBERG, W.R.; BAJWA, N.; SONI, D.; DAS, S.; HASAN, M.; PATEL, M.; SENAN, A.M.; GORANTLA, S.; MCMILLAN, J.; EDAGWA, B.; EISENBERG, R.; GURUMURTHY, C.B.; REID, S.P.M.; PUNYADEERA, C.; CHANG, L.; GENDELMAN, H.E. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. **Nat Mater**. v. 20 p. 593-605 2021.;

- LI, Z.; YI, Y.; LUO, X.; Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. **J Med Virol.** v. 92, p. 1518-1524, 2020. doi:10.1002/jmv.25727
- LIU, D.X.; LIANG, J.Q.; FUNG, T.S. Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). **Encyclopedia of Virology.** v. 428 2021. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X.
- LU, R.; WU, X.; WAN, Z. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. **Virol Sin.** v. 35, p. 344-347, 2020. doi:10.1007/s12250-020-00218-1
- MA, D.; SHEN, L.; WU, K.; DIEHNELT, C.W.; GREEN, A.A. Low-cost detection of norovirus using paper-based cell-free systems and synbody-based viral enrichment. **Synth Biol (Oxf).** v. 3, 2018. doi:10.1093/synbio/ysy018
- MAJUMDER, J.; MINKO, T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. **AAPS J.** v.23 2021 doi:10.1208/s12248-020-00532-2
- MARINHO, P.R.D.; CORDEIRO, G.M.; COELHO, H.F.C.; BRANDÃO, S.C.S. Covid-19 in Brazil: A sad scenario. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 58, p. 51-54 2021. doi:10.1016/j.cytogfr.2020.10.010
- MOURA, E.C.; CORTEZ-ESCALANTE, J.; CAVALCANTE, F.V.; BARRETO, I.C.H.C.; SANCHEZ, M.N.; SANTOS, L.M.P. Covid-19: temporal evolution and immunization in the three epidemiological waves, Brazil, 2020-2022. **Rev Saude Publica.** v. 56, 2022. doi:10.11606/s1518-8787.2022056004907
- MOUSAVIZADEH, L.; GHASEMI, S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. **J Microbiol Immunol Infect.** v. 54, p. 159-163, 2021. doi:10.1016/j.jmii.2020.03.022
- NEUMAN, B.W.; KISS, G.; KUNDING, A.H. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **J Struct Biol.** v. 174, p. 11-22, 2011. doi:10.1016/j.jsb.2010.11.021
- NIETO-TORRES, J.L.; DEDIEGO, M.L.; VERDIÁ-BÁGUENA, C. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. **PLoS Pathog.** v. 10, 2014. doi:10.1371/journal.ppat.1004077
- Padrão Medicina Diagnóstica Personalizada. **Padrão medicina diagnostica**, 2022 testes de covid disponível em

<https://www.padrao.com.br/teste-covid/teste-rapido-molecular-coronavirus-sars-cov-2-id-now-covid-19> acessado em 07/10/2022

PARDEE, K.; GREEN, A.A.; FERRANTE, T. Paper-based synthetic gene networks. **Cell**. v. 159, p 940-954, 2014. doi:10.1016/j.cell.2014.10.004

PARDEE, K.; GREEN, A.A.; TAKAHASHI, MK. Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. **Cell**. v. 165, p. 1255-1266, 2016. doi:10.1016/j.cell.2016.04.059

PAN, Y.; ZHANG, D.; YANG, P.; POON, L.L.M.; WANG, Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. **Lancet Infect Dis**. v. 20, p. 411-412, 2020. doi:10.1016/S1473-3099(20)30113-4

PRADO, M.F.; ANTUNES, B.P.A.; BASTOS, L.S.L. Análise da subnotificação de COVID-19 no Brasil, **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** 2020. doi:10.5935/0103-507X.20200030

RABAAN, A.A.; AL-AHMED, S.H.; HAQUE, S. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. **Infez Med**. v. 28, p. 174-184 2020.

ROTHAN, H.A.; BYRAREDDY, S.N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. **J Autoimmun**. v. 109, 2020. doi:10.1016/j.jaut.2020.102433

SALIAN, V. S.; WRIGHT, J. A.; VEDELL, P. T.; NAIR, S.; LI, C.; KANDIMALLA, M.; TANG, X.; CARMONA PORQUERA, E. M.; KALARI, K. R.; KANDIMALLA, K. K. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. **Molecular pharmaceutics**, 2021

SHAN, B.; BROZA, Y.Y.; LI, W. Multiplexed Nanomaterial-Based Sensor Array for Detection of COVID-19 in Exhaled Breath. **ACS Nano**. v. 14, p. 12125-12132, 2020. doi:10.1021/acsnano.0c05657

SHARMA, A.; AHMAD FAROUK, I.; LAL, S.K. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. **Viruses**. v. 13, 2021. doi:10.3390/v13020202

SnapGene software (www.snapgene.com) acessado em 2022.

TAKENOUCHI, T.; IWASAKI, Y.W.; HARADA, S. Clinical Utility of SARS-CoV-2 Whole Genome Sequencing in Deciphering Source of Infection. **J Hosp Infect**. v. 107, p. 40-44, 2020. doi:10.1016/j.jhin.2020.10.014

TANG, T.; BIDON, M.; JAIMES, J.A.; WHITTAKER, G.R.; DANIEL, S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. **Antiviral Res.** v. 178 2020. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104792

Tsang HF, Chan LWC, Cho WCS, et al. An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy.** v. 19, p. 877-888, 2021. DOI: 10.1080/14787210.2021.1863146

TU, Y.P.; IQBAL, J.; O'LEARY, T. Sensitivity of ID NOW and RT-PCR for detection of SARS-CoV-2 in an ambulatory population. **Elife.** v. 10 2021. doi:10.7554/eLife.65726
Vital Strategies Revisão científica semanal 41 — 03 – 17 MARÇO 2021

WÖLFEL, R.; CORMAN, V.M.; GUGGEMOS, W. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature.** v. 581, p.465-469, 2022. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.

World Health organization Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 75, 4 de Abril de 2020.

World Health organization Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 119, 18 de Maio de 2020.

World Health organization Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 134

World Health organization COVID-19 weekly epidemiological update, 22 December 2020

World Health organization COVID-19 weekly epidemiological update, 16 March 2021

World Health organization COVID-19 weekly epidemiological update, edition 71, 21 December 2021

World Health organization. WHO, acessado em 08/10/2022. Pagina de emergências, informações sobre o Novel coronavirus-2019 <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>

YOKOTA, I.; HATTORI, T.; SHANE, P.Y. Equivalent SARS-CoV-2 viral loads by PCR between nasopharyngeal swab and saliva in symptomatic patients. **Sci Rep.** v. 24, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-84059-2.

ZADEH, J.N.; STEENBERG, C.D.; BOIS, J.S. NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems. **J Comput Chem.** v. 32, p. 170-173 2011. doi:10.1002/jcc.21596

ZHANG, F.; ABUDAYYEH, O.O.; GOOTENBERG, J.S. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics, 2020.

ZOCCA, V.F.B. **Desenvolvimento de sensores de RNA para identificação dos vírus da dengue**. Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli. 2018. 82 f. TCC (Graduação) Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017