



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

ALINE REIS

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

Araraquara, SP

2024

Aline Reis

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

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Araraquara – SP

2024

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

Orientador: Paulo Inácio da Costa.

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

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

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

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: ALINE REIS

ORIENTADOR: PAULO INACIO DA COSTA

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

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

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

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

Araraquara, 09 de abril de 2024

AGRADECIMENTOS

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

LISTA DE SÍMBOLOS

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE QUADROS

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CORONAVÍRUS

Os coronavírus constituem um grupo diversificado de vírus de RNA, capazes de infectar uma ampla variedade de mamíferos e aves. Ao se estabelecerem nos hospedeiros, esses vírus podem provocar uma série de alterações no sistema nervoso, respiratório e gastrointestinal. Essas alterações resultam em uma sintomatologia de espectro variado que pode ser leve, grave ou até fatal (WEISS; LEIBOWITZ, 2011; CUI, LI; SHI, 2018).

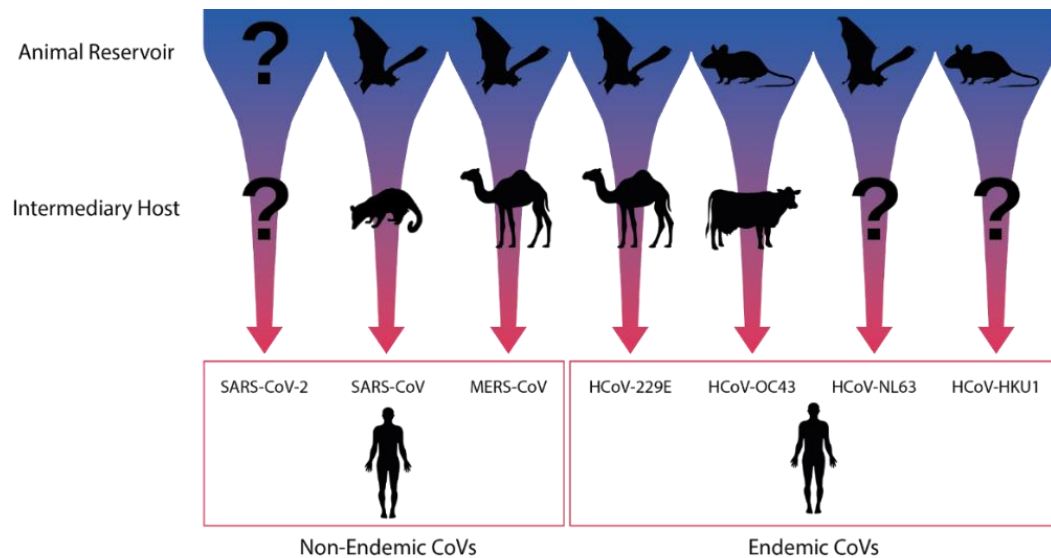
Esses vírus têm uma ampla gama de hospedeiros, como os morcegos, que emergiram como um importante reservatório natural. Esses mamíferos voadores têm sido reconhecidos como portadores desses vírus devido à sua complexa coevolução (CUI, LI; SHI, 2018). Além dos morcegos, ruminantes, roedores e até mesmo cetáceos, como as baleias, podem servir como hospedeiros para diferentes espécies de coronavírus, evidenciando a diversidade e a grande capacidade de adaptação desses patógenos (WEISS; LEIBOWITZ, 2011).

A família Coronaviridae abriga os coronavírus de maior relevância em termos de saúde pública, e eles são categorizados em quatro principais gêneros: Alfacoronavírus (α CoVs), Betacoronavírus (β CoVs), Gamacoronavírus (γ CoVs) e Deltacoronavírus (δ CoVs). Cada gênero exibe características específicas e uma grande variedade de vírus, alguns dos quais se tornaram notórios devido ao seu impacto na saúde humana.

Até dezembro de 2019, a literatura reconhecia seis espécies de coronavírus com potencial patogênico para os seres humanos, com destaque para os gêneros α CoV e β CoV. O contato direto com animais selvagens e de criação representa uma das principais vias de transmissão desses vírus para o homem (SU *et al.*, 2016; CUI, LI; SHI, 2018; ZHU *et al.*, 2020).

A família β CoV, por exemplo, engloba os vírus MERS-CoV e SARS-CoV-1, que causaram surtos graves de doenças respiratórias com alta taxa de mortalidade. Em contrapartida, os coronavírus 229E, OC43, NL63 e HKU1, são causadores de resfriados comuns e são frequentemente transmitidos por morcegos e roedores (SU *et al.*, 2016; CUI, LI e SHI, 2018; ZHU *et al.*, 2020). A Figura 1 esquematiza os hospedeiros e reservatórios destes vírus.

Figura 1. Diagrama dos hospedeiros naturais e possíveis intermediários dos sete coronavírus com relevância médica, incluindo morcegos e roedores como hospedeiros naturais, e civetas, camelos e vacas como intermediários.



Fonte: adaptado de CORMAN et al, 2018 ; The Native Antigen Company, 2020.

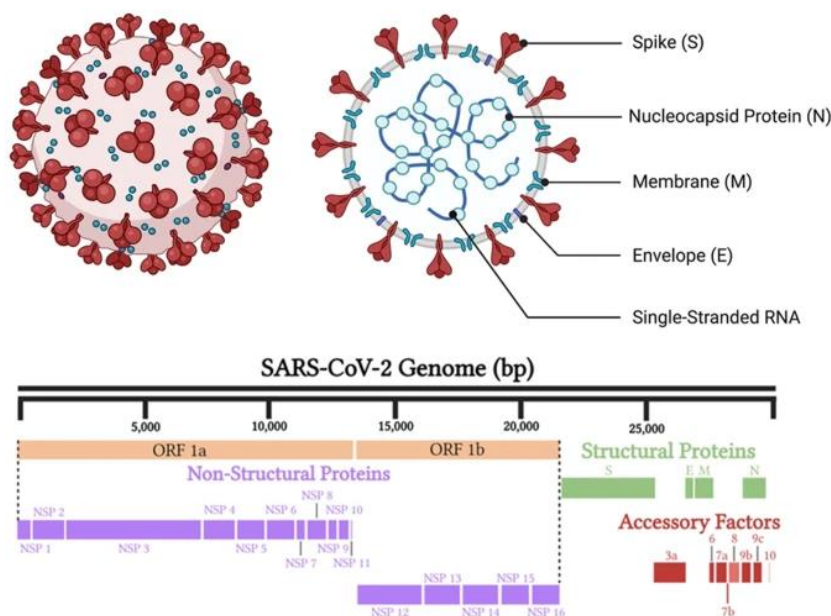
2.2 SARS-COV-2 E COVID-19

Como mencionado anteriormente, no final de 2019, autoridades de saúde na China detectaram um surto misterioso de pneumonia em Wuhan, que logo se revelou ser causado por um novo coronavírus. A rápida disseminação dessa doença levou à sua classificação oficial como COVID-19, uma abreviação para *Coronavirus Disease 2019* (Doença por Coronavírus de 2019, em tradução livre) (ZHU *et al.*, 2020). O vírus responsável, agora conhecido como SARS-CoV-2, desencadeou uma pandemia global sem precedentes, resultando em uma série de desafios médicos, sociais e econômicos.

O SARS-CoV-2 pertence à família dos Betacoronavirus (β CoVs) e compartilha semelhanças com outros coronavírus causadores de doenças humanas, como o SARS-CoV-1 e o MERS-CoV. Seu genoma de RNA de fita simples (+ssRNA) contém duas regiões principais: a região 5'-replicase, que codifica proteínas essenciais para a replicação viral, e a região 3'-estrutural, que codifica proteínas estruturais, incluindo a proteína de superfície (S), a proteína do envelope (E), a proteína de membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (Figura 2) (CHAN *et al.*, 2020).

Figura 2. Elementos estruturais do vírus SARS-CoV-2, incluindo a proteína de espícula, envelope, membrana, componentes internos - RNA de fita simples viral e proteínas do nucleocapsídeo – e componentes do genoma.

Human SARS-CoV-2 Structure



Fonte: adaptado de JAMISON *et al.*, 2022

A origem exata do SARS-CoV-2 continua sendo um enigma em aberto e um tópico de intenso debate na comunidade científica, mas é interessante - e importante - ressaltar que todos os coronavírus capazes de causar doenças em humanos têm origem zoonótica, com reservatórios naturais na vida selvagem (CUI, LI; SHI *et al.*, 2019). Análises de sequenciamento genético indicam que o SARS-CoV-2 provavelmente tem origem em morcegos, com 96,2% de identidade genética com a espécie BatCoV RaTG13, detectada na China, e cerca de 80% de similaridade com o SARS-CoV-1 (ZHOU *et al.*, 2020). A hipótese de uma origem sintética carece de evidências científicas substanciais até o momento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A doença causada pelo SARS-CoV-2, a COVID-19, é uma patologia infecciosa que têm como principais sintomas: febre, tosse seca, fadiga, dispneia, mialgia e distúrbios gastrointestinais, como diarreia e náusea, porém, casos mais graves podem levar a falta de ar, formação de coágulos, encefalite e perda parcial ou total do olfato e paladar (SUN *et al.*, 2020). Exames laboratoriais realizados em pacientes com COVID-19 revelam elevados níveis de proteína C-reativa, lactato desidrogenase e marcadores de inflamação, bem como anormalidades em contagens de células sanguíneas, tais como linfocitopenia e

trombocitopenia, refletindo uma resposta inflamatória viral (GUAN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). Alterações características também são observadas em imagens de tórax, incluindo opacidades em vidro fosco e opacidades irregulares bilaterais, indicativas de danos pulmonares (GUAN *et al.*, 2020).

O diagnóstico da COVID-19 pode ser realizado através da reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR), que detecta o RNA viral ou por testes imunocromatográficos, que detectam antígenos ou anticorpos. Ambos os métodos são associados a avaliação médica (GUO *et al.*, 2020; WU; MCTIGUE, 2020).

O tratamento da COVID-19 inclui o uso de analgésicos, anti-inflamatórios e antivirais, como o remdesivir, e anticorpos monoclonais, como o tocilizumabe. O principal objetivo do tratamento é controlar a resposta inflamatória exagerada, principalmente nos casos graves. A vacinação em larga escala tem sido uma estratégia vital para conter a disseminação do vírus (PAREEK *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021).

2.3 A GLICOPROTEÍNA SPIKE: ESTRUTURA, FUNÇÃO E APLICAÇÕES

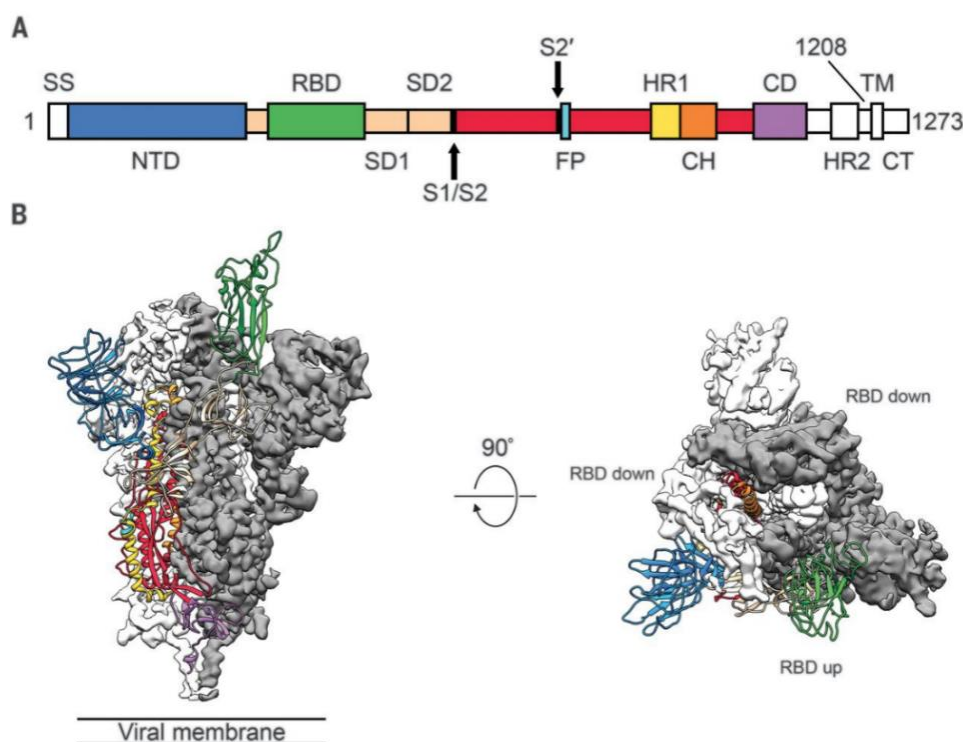
A Spike, ou proteína S, é uma glicoproteína transmembrana que desempenha um papel vital na entrada do vírus nas células hospedeiras, ela possui aproximadamente 1273 aminoácidos e é organizada na forma de homotrímeros, três protômeros idênticos que se associam, conferindo uma estrutura tridimensional de alta complexidade. Essa organização é essencial para sua função (WRAPP *et al.*, 2020; CHENG *et al.*, 2020).

A proteína S é fisicamente dividida em duas subunidades funcionais distintas: a subunidade S1 e a subunidade S2 (WRAPP *et al.*, 2020; CHENG *et al.*, 2020). Essa divisão ocorre especificamente no retículo endoplasmático da célula infectada. A protease furina desempenha um papel crítico nesse processo, clivando cada protômero da Spike entre os aminoácidos arginina 685 e serina 686. Essa clivagem ocorre antes da liberação do vírion maduro e isto confere ao SARS-CoV-2 uma vantagem evolutiva frente a SARS-CoV-1, que não possui o sítio de clivagem da furina e a divisão física de sua proteína Spike só ocorre na superfície da célula hospedeira durante o processo de entrada. Esse fato torna o SARS-CoV-2 mais infeccioso que seu antecessor (ANDERSEN *et al.*, 2020).

Aprofundando a discussão das subunidades, S1 da proteína Spike compreende os primeiros 685 aminoácidos e contém o Peptídeo Sinal (SP, aa 1 - 13), que direciona a proteína

S para o retículo endoplasmático; o Domínio N-terminal (NTD, aa 14 – 305); e o Domínio de Ligação ao Receptor (RBD, aa 319 – 541), que se liga ao receptor ACE2 nas células hospedeiras. A subunidade S2, formada pelos aminoácidos restantes, contém o Peptídeo de Fusão (FP), Heptad Repeats 1 e 2 (HR1 e HR2), Domínio Transmembranar (TMD) e a porção citoplasmática (CP) (WRAPP *et al.*, 2020; CHENG *et al.*, 2020). A Figura 3 ilustra a estrutura geral da proteína Spike.

Figura 3. A glicoproteína *Spike* do vírus SAR-CoV-2. **A)** Esquema da estrutura primária onde os diversos domínios são representados por cores diferentes. SS - sequência única; NTD - domínio N-terminal; RBD - domínio de ligação ao receptor; SD1 - subdomínio 1; SD2 - subdomínio 2; S1/S2 - sítio de clivagem da protease S1/S2; S2' - sítio de clivagem da protease S2'; FP - peptídeo de fusão; HR1 - repetição 1; CH - hélice central; CD - domínio conector; HR2 - repetição 2; TM - domínio transmembranar; CT - cauda citoplasmática. As setas indicam os sítios de clivagem. **B)** Estrutura do trímero *Spike* obtida por microscopia crioelétrica.



Fonte: adaptado de WRAPP *et al.*, 2020.

Em relação à função que cada subunidade desempenha, S1 é responsável pelo reconhecimento do receptor ACE2 e pela ligação do vírus na superfície da célula a ser infectada (LAN *et al.*, 2020), e S2 âncora a proteína S no envelope viral e sustenta o restante da estrutura em uma orientação favorável para o processo de fusão entre o envelope viral e a membrana celular, permitindo a liberação do material genético do SARS-CoV-2 no citoplasma e início dos processos de replicação e tradução das proteínas virais (WRAPP *et al.*, 2020; CAI *et al.*, 2020).

Dada sua função essencial no processo de infecção, a proteína S, é o principal alvo da imunidade natural, obtida através da infecção, e da imunidade induzida por vacinas, ela também se tornou uma ferramenta valiosa na pesquisa científica, diagnóstico e desenvolvimento de terapias. A compreensão de sua estrutura e função permitiu o design de vacinas que direcionam a resposta imunológica contra essa proteína, com destaque para o bloqueio do RBD, que impossibilita a ligação ao receptor ACE2 e, portanto, impede a infecção (CHUNG; THONE; KWON, 2021; ZOST *et al.*, 2020). O Quadro 1 apresenta as principais vacinas desenvolvidas/em desenvolvimento contra o SARS-CoV-2, o seu produtor e a tecnologia empregada, com destaque para o uso da proteína S e do RBD do vírus.

Quadro 1. Panorama das vacinas desenvolvidas contra a COVID-19: produtores, tecnologias de desenvolvimento e plataformas utilizadas.

Produtor	Tecnologia	Plataforma
Moderna / NIAID	mRNA	mRNA da proteína S estabilizada na estrutura de pré-fusão
Takara Bio / Osaka University	DNA	DNA plasmidial expressando a proteína S com adjuvante
Oxford / AstraZeneca	Vetor viral não replicante	Adenovírus de chimpanzé expressando a proteína S na superfície
Janssen Pharmaceutical	Vetor viral não replicante	Adenovírus do sorotipo 26 expressando a proteína S na superfície
Xiamen University	Vetor viral replicante	Vacina intranasal baseada em vírus influenza expressando o RBD
Sinovac / Instituto Butantan	Vírus inativado	Vírus inteiro fragmentado e inativado adsorvido em adjuvante
Sanofi Pasteur/ GSK	Subunidade	Proteína S inteira
West China Hospital / Sichuan University	Subunidade	RBD recombinante
Instituto Finlay de Vacunas	Subunidade	RBD recombinante + adjuvante
Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceuticals	Subunidade	RBD dimérico + adjuvante

Fonte: adaptado de CHUNG; THONE; KWON, 2021.

2.4 O RECEPTOR ENZIMÁTICO ACE2

A ACE2 é uma enzima transmembrana com atividade carboxipeptidase, presente nas células de diversos tecidos e como dito no tópico anterior, a ligação da proteína S do SARS-CoV-2 - através do RBD - à ACE2 é um evento chave na infecção viral. A entrada do vírus nas células hospedeiras ocorre após essa ligação que desencadeia uma série de eventos intracelulares que levam à replicação viral. A expressão de ACE2 em diferentes tecidos pode explicar a variabilidade na sintomatologia da COVID-19, já que a presença da enzima em órgãos como pulmões e coração pode contribuir para os sintomas respiratórios e cardiovasculares observados (FANG; KARAKIULAKIS; ROTH, 2020).

Além de sua importância na infecção por SARS-CoV-2, a ACE2 desempenha um papel crucial no sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), um sistema hormonal que regula o equilíbrio eletrolítico, a pressão arterial e a função cardíaca. A conversão do peptídeo angiotensina II em angiotensina 1-7, pela ACE2, resulta em efeitos vasodilatadores, contrabalançando as ações vasoconstritoras da angiotensina II (AKHMEROV; MARBAN, 2020; SOUTH; DIZ, 2020).

Ademais, existem estudos que investigaram a ligação entre a Spike e ACE2 e observaram que esta interação aumentou a atividade proteolítica da ACE2, o que reforça a hipótese que relaciona a sintomatologia da COVID-19 e a presença da ACE2 em diferentes tecidos (YAMAGUCHI *et al.*, 2021; LU; SUN, 2020).

2.5 INIBIDORES DE FUSÃO E ANTICORPOS NEUTRALIZADORES

Para infectar uma célula, diversas espécies de vírus envelopados precisam fundir sua membrana com a membrana da célula hospedeira. Essa fusão dá ao vírus acesso ao citosol e permite que ele libere seu material genético, objetivando a replicação (PLEMPER, 2011). Os inibidores de fusão são um grupo de fármacos e biofármacos projetados para interferir nesse processo de fusão. Eles têm como alvo proteínas ou estruturas virais específicas que são

essenciais para a fusão do vírus a membrana da célula. Ao bloquear a fusão, estes inibidores interrompem o ciclo de infecção numa fase inicial (WISSKIRCHEN *et al.*, 2014).

Os inibidores de fusão são utilizados como abordagem terapêutica para o tratamento de infecções virais, de forma isolada ou em combinação com outros medicamentos a fim de aumentar a eficácia do tratamento (WISSKIRCHEN *et al.*, 2014). Por exemplo, no contexto do HIV, um inibidor de fusão bem conhecido é o Enfuvirtide (nome comercial Fuzeon), ele tem como alvo a proteína viral gp41, que está envolvida na fusão do vírus com células imunológicas (KILBY *et al.*, 2002). No caso do vírus SARS-CoV-2, o desenvolvimento de inibidores de fusão tem sido explorado como potencial tratamento, visando particularmente a proteína Spike, que desempenha um papel crucial no processo de fusão (ZHU *et al.*, 2020; XIA *et al.*, 2022; GUO *et al.*, 2023).

Além de pequenas moléculas orgânicas e peptídeos, proteínas também podem ser utilizadas como inibidores de fusão, e o melhor exemplo são os anticorpos, glicoproteínas altamente específicas projetadas para se ligarem aos antígenos na superfície dos patógenos. Os anticorpos neutralizantes são um subconjunto destes que apresentam a propriedade de, ao interagirem com seu alvo, interferir na sua capacidade de infectar as células hospedeiras. Para os vírus, isso geralmente significa impedir que eles se liguem aos seus receptores na superfície celular (JIANG; HILLYER; DU, 2020).

No contexto da COVID-19, dentre os poucos medicamentos antivirais disponíveis no mercado estão os inibidores de fusão bamlanivimab, etesevimab, casirivimab, bebtelovimab e imdevimab (NIH, 2023). Todos estes são anticorpos monoclonais direcionados contra a proteína S, em especial, contra o RBD. Apesar de disponíveis, sua eficácia depende da variante do vírus em circulação, fato relacionado a alta especificidade dos anticorpos. Mudanças na estrutura e composição da Spike levam a perdas na capacidade de ligação desses biofármacos. Enquanto o vírus evoluir, faz-se necessária a constante e ininterrupta busca por novos tratamentos.

2.6 A CRISE DE INSUMOS E AUTOSSUFICIÊNCIA NACIONAL DE PRODUÇÃO

A propagação global da COVID-19 gerou uma demanda exponencial por medicamentos, vacinas, suprimentos descartáveis e matérias-primas essenciais. Essa crise sanitária expôs de forma impactante a vulnerabilidade dos sistemas de saúde em escala

mundial, destacando a dependência excessiva de um reduzido número de produtores globais (HOMMA *et al.*, 2022). Um exemplo emblemático dessa situação foi a escassez do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), necessário para a fabricação de vacinas, bem como de sedativos cruciais para pacientes que requerem intubação, os quais enfrentam os estágios mais severos da doença (PASSARINHO, 2021; VALÉCIO, 2021).

Até o ano de 1980, o Brasil mantinha uma produção interna de aproximadamente 50% dos insumos farmacêuticos ativos, importando os 50% restantes. No entanto, esse cenário evoluiu significativamente, e os números atuais, conforme relatados pela Anvisa, indicam que o país hoje é responsável por apenas 5% da produção, os outros 95% são importados, majoritariamente, da China e da Índia (COLLUCCI, 2022).

Nações mais desenvolvidas, incluindo Alemanha, Estados Unidos e Reino Unido, concentraram esforços substanciais no fortalecimento de suas indústrias farmacêuticas e centros de pesquisa, conquistando uma presença dominante no mercado global. Países emergentes, como Rússia, China e Índia, também direcionaram investimentos significativos para o desenvolvimento e produção de vacinas. Contudo, a emergência da pandemia de COVID-19 levou esses países a adotarem políticas comerciais mais protecionistas e agressivas, priorizando o suprimento interno e, em consequência, desequilibrando as dinâmicas comerciais globais, deixando outras nações à mercê das circunstâncias. No Brasil, em 2021, a dependência excessiva dessas nações afetou diretamente a fabricação e distribuição de doses de várias vacinas (HOMMA *et al.*, 2022).

Dado que o Brasil ostenta a sexta maior população mundial, torna-se imperativo reduzir a dependência de importações e buscar um nível de autossuficiência em pesquisa científica, capacidade de produção e desenvolvimento tecnológico, a pandemia de COVID-19 evidenciou ainda mais essa necessidade. É nesse contexto que o presente trabalho também propõe a produção recombinante do Domínio de Ligação ao Receptor (RBD), indo além da simples aquisição comercial, como uma medida importante para fortalecer a independência e resiliência da nação diante dos desafios de saúde global.

2.7 PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS

As proteínas constituem a base do setor biofarmacêutico, desempenhando papéis cruciais como biofármacos e contribuindo ativamente no processo de descoberta e validação

de novas drogas. Essa relevância é ressaltada pelo fato de que grande proporção dos fármacos atua sobre alvos proteicos. Além disso, as proteínas desempenham um papel essencial no desenvolvimento de testes diagnósticos, na produção de vacinas e terapias e em diversos campos da pesquisa científica. Diferente dos insumos químicos e fármacos tradicionais, as proteínas - devido à sua complexidade estrutural e funcional - não podem ser obtidas por meio de síntese química. Assim, a produção de proteínas requer abordagens biológicas, frequentemente ocorrendo dentro de células hospedeiras, embora, existam técnicas de expressão *cell-free*, que não envolvem células completas (OVERTON, 2014).

No contexto dessa produção, destaca-se a abordagem recombinante, também conhecida como heteróloga, pois geralmente envolve a produção da proteína em uma espécie diferente da original, usando DNA recombinante ou modificado. Um ponto de decisão crucial nesse processo é a seleção da célula hospedeira. Dentre as opções, bactérias emergem como escolha comum, representando mais de 30% de todas as plataformas de produção recombinante industriais. Especificamente, a *E. coli* é frequentemente escolhida devido ao profundo conhecimento bioquímico e genético, rápido crescimento, alto rendimento e baixo custo. Entretanto, essa plataforma tem limitações em termos de modificações pós-traducionais apropriadas (apesar de algumas cepas de *E. coli* serem capazes de realizar glicosilação) e pode resultar na formação de corpos de inclusão, aglomerados proteicos que se acumulam no citoplasma ou periplasma bacteriano. Essa questão pode ser mitigada pela adição de diferentes *tags* na região N- ou C-terminal da proteína, as quais também facilitam a purificação (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019; GUPTA; SHUKLA, 2015).

No estágio subsequente à escolha da célula, têm-se a seleção do vetor de expressão. Esses vetores são plasmídeos que carregam o gene codificador da proteína de interesse. Eles devem conter os elementos necessários para a expressão gênica, como o promotor - uma sequência que recruta o complexo transcricional e inicia a transcrição do gene em mRNA, controlando a expressão do gene clonado - e o sítio de ligação ao ribossomo - uma sequência que recruta os ribossomos e cofatores para início da tradução do mRNA em proteína. Adicionalmente, esses vetores devem incluir uma marca de seleção, frequentemente correspondendo a um gene que confere à célula uma característica selecionável e útil, forçando-a a manter o vetor de expressão, como por exemplo resistência a um antibiótico específico (PRIMROSE; TWYMAN, 2013).

Um dos vetores mais utilizados para a obtenção de proteínas recombinantes em *E. coli* é o vetor pET, que possui o promotor T7 indutível. Nesse sistema, a transcrição - e consequentemente a tradução - é iniciada pela adição de um indutor, como a lactose ou seu

análogo o IPTG, estes se ligam à proteína repressora LacI, liberando o promotor T7 para o complexo de transcrição (DUBENDORF; STUDIER, 1991; STUDIER *et al.*, 1990).

Após a indução da expressão e a produção da proteína de interesse é necessário realizar o rompimento das células, pois em geral as proteínas são produzidas intracelularmente. Esse processo é comumente realizado por técnicas de congelamento/descongelamento e sonicação na presença de detergentes (SHEHADUL; ARYASOMAYAJULA; SELVAGANAPATHY, 2017). Por fim, é necessário realizar a purificação, para proteínas que contam com a tag de histidina, o método mais comum é a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Essa técnica se baseia na forte afinidade entre íons de níquel e a histidina, permitindo que proteínas com essa cauda se liguem seletivamente à resina de níquel imobilizada na coluna. As proteínas que não possuem a sequência de histidina são eluídas, enquanto a proteína de interesse é retida. Após a ligação, a proteína alvo é eluída utilizando imidazol, um ligante que compete com a histidina pela interação com o níquel (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

A produção de proteínas recombinantes representa um eixo central na biotecnologia contemporânea e, longe de ser trivial, é caracterizada por desafios em todas as suas etapas, desde a escolha das células hospedeiras até os processos de expressão, purificação e além. Os países que detêm proficiência nessa técnica usufruem de maior independência na indústria biofarmacêutica, capacitando-se a exportar produtos de alto valor agregado. O engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, quanto profissional multidisciplinar, é indispensável para otimização e escalonamento deste processo.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O presente trabalho objetivou a produção recombinante do RBD do vírus SARS-CoV-2 e sua aplicação no desenvolvimento de uma plataforma para bioprospecção de inibidores de fusão baseada na interação entre o RBD e a enzima ACE2.

3.2 ESPECÍFICOS

- Preparo de células DH5 α e BL21 (DE3) quimiocompetentes, transformação com o vetor pET-28a/rRBD e seleção dos transformantes.
- Propagação do plasmídeo, confirmação da presença e da identidade do inserto.
- Avaliação do crescimento das células BL21 transformadas.
- Determinação da concentração de indutor e do tempo de expressão.
- Produção recombinante do RBD e purificação por cromatografia de afinidade.
- Avaliação da antigenicidade do rRBD produzido.
- Avaliação da interação entre o rRBD e a enzima ACE2 na presença e ausência de inibidores de fusão.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 PREPARO DE SOLUÇÕES

A composição, concentração e o preparo das soluções utilizadas no trabalho encontram-se descritas no apêndice A.

4.2 LINHAGENS, GENE E VETOR

As linhagens bacterianas *E. coli* DH5 α , empregada para a amplificação do vetor, e *E. coli* BL21 (DE3), utilizada para a expressão da proteína, foram obtidas da Thermo Fisher Scientific e mantidas em coleção em ultrafreezer a -80 °C. O gene sintético correspondente à região RBD do vírus SARS-CoV-2 (NCBI YP_009724390.1) foi adquirido da empresa GenOne Brasil (Rio de Janeiro, RJ) previamente clonado no vetor de expressão pET-28a+ (pET-28a/rRBD), que incorpora um gene de resistência à canamicina, um sistema de indução por IPTG e uma sequência de histidina na extremidade C-terminal, possibilitando sua utilização futura para a purificação da proteína. O esquema do plasmídeo construído está apresentado na Figura 4. Os primers comerciais T7 promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e T7 terminator (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'), empregados na etapa de amplificação, foram obtidos da Thermo Fisher Scientific. A enzima conversora de angiotensina tipo II humana (hACE-2) recombinante foi adquirida da Sigma-Aldrich (SAE0064-10UG).

obtido durante a noite, e esse cultivo foi crescido por aproximadamente de 2 horas. Após a fase de crescimento, as células foram submetidas a uma centrifugação a 12000 xg durante 3 minutos, resultando na separação do sobrenadante, que foi descartado, e do pellet celular remanescente. Este último foi submetido a duas etapas de lavagem utilizando uma solução gelada de CaCl_2 100 mM. Em seguida, o pellet foi ressuspenso na mesma solução e submerso em gelo por 30 minutos. Após essa incubação, a suspensão celular passou por uma nova centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado, e as células foram delicadamente ressuspensas em um volume de 300 μL de CaCl_2 100 mM, sendo subsequentemente separadas em alíquotas de 100 μL e congeladas até a próxima etapa, a transformação (GREEN ; SAMBROOK, 2012).

4.4 TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO

Uma alíquota contendo células competentes foi devidamente descongelada em banho de gelo. A ela foi adicionado um volume aproximado de 1 μL da solução de plasmídeo recombinante (pET-28a/rRBD), equivalente a 50 ng do vetor. A reação permaneceu em gelo por mais 25 minutos, sendo posteriormente submetida a um choque térmico de 90 segundos em um banho a 42 °C, após o qual foi prontamente devolvida ao banho de gelo, onde foi mantida por mais 5 minutos. Após esse período de repouso, uma quantidade de 1 mL de meio LB fresco foi adicionada ao tubo, e as bactérias foram então incubadas em um shaker a 37 °C, com agitação de 240 rpm, por aproximadamente 1 hora, com o intuito de permitir a recuperação das células. Após a fase de recuperação, 100 μL do cultivo foram dispostos em uma placa de LB-Ágar, contendo canamicina, para a seleção dos transformantes. Simultaneamente, células não transformadas também foram plaqueadas como controle. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C até a formação visível de colônias (GREEN ; SAMBROOK, 2012).

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

A extração de DNA plasmidial, ou miniprep do plasmídeo bacteriano, foi executada utilizando o kit comercial *Concert™ Rapid Plasmid Mineprep* (Life Technologies) conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Em resumo, uma colônia de *E. coli* DH5 α transformada foi cultivada durante a noite em 5 mL de meio LB suplementado com canamicina, a 37 °C, sob agitação constante de 240 rpm. A partir deste cultivo, 3 mL foram submetidos a centrifugação a 12000 xg por 5 minutos, seguido pelo descarte do sobrenadante e ressuspensão das células em 210 μ L do tampão G1 contendo RNase A. Em sequência, foi adicionado 210 μ L do tampão G2, e a mistura foi homogeneizada por inversão, mantendo o tubo a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, 280 μ L da solução G3 foram adicionados, o tubo foi novamente homogeneizado por inversão e submetido a uma centrifugação de 10 minutos a 12000 xg. O sobrenadante obtido foi transferido para uma coluna de ligação, acoplada a um tubo de coleta, e centrifugado a 12000 xg por 1 minuto. O conteúdo do tubo de coleta foi descartado, e a coluna foi lavada com 750 μ L do tampão G4. Após a lavagem, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL livre de DNase e RNase, e o DNA plasmidial foi eluído com a adição de 70 μ L de solução TE. O DNA plasmidial extraído foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop e posteriormente armazenado em freezer a -20 °C.

4.6 CONTROLE DE QUALIDADE DA CLONAGEM: ANÁLISE POR PCR E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

Para verificar a presença do inserto (gene rRBD) no plasmídeo isolado das células transformadas, a amplificação do gene foi realizada através da técnica de PCR convencional, e a identificação do produto amplificado foi efetuada por meio de eletroforese em gel de agarose. Para isso, 1 μ L do DNA molde, 1 μ L de cada primer (0,5 μ M) e 0,2 μ L da enzima Taq DNA polimerase (2,5 U) foram adicionados a 20 μ L do Master Mix e submetidos a ciclos térmicos no termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems), conforme o Quadro 2.

Quadro 2. Ciclos térmicos da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para amplificação do gene de interesse: fases de estabilização, desnaturação, anelamento e extensão, juntamente com temperaturas e tempos correspondentes.

Repetição	Fase	Temperatura	Tempo
1x	Estabilização	94 °C	3-5 min
30x	Desnaturação	94 °C	45 seg
	Anelamento	55 °C	30 seg
	Extensão	72 °C	1 min 30 seg
1x	Estabilização	72 °C	5 min
	Manutenção	4 °C	-

Fonte: Própria Autora.

Após a conclusão dos ciclos térmicos, um gel de agarose a 1,5% foi preparado de acordo com o apêndice A. Após a polimerização do gel, o pente foi retirado e a cuba foi preenchida com TBE 1X. Em seguida, a régua molecular Quick Load 100pb (BioLabs) e o produto da PCR, diluído em tampão de amostra na proporção 2:1, foram aplicados nos poços. Uma diferença de potencial de 100 V foi aplicada para a migração do DNA até que o fronte de migração se aproximasse do centro do gel. Após a corrida eletroforética, o gel foi documentado usando o sistema de fotodocumentação L-Pix (Loccus) para análise.

A confirmação da identidade genética do gene presente no plasmídeo pET-28a/rRBD foi realizada por meio de sequenciamento de terminação da cadeia (método dideoxi). Após a extração e quantificação do DNA plasmidial, uma reação de PCR foi conduzida para sequenciar o gene de interesse, empregando os reagentes do kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) conforme as instruções do fabricante. Em um microtubo de 200 µL, foram combinados 500 ng do pDNA molde, 1 µL do primer T7 promoter (3,2 µM), 1 µL do reagente BigDye™ Terminator e 3,5 µL do tampão de sequenciamento 5x. O volume da reação foi ajustado para 20 µL com água ultrapura. As condições de reação estão detalhadas no Quadro 3.

Quadro 3. Ciclos térmicos da PCR para reação de sequenciamento: fases de estabilização, desnaturação, anelamento e extensão, juntamente com temperaturas e tempos correspondentes.

Repetição	Fase	Temperatura	Tempo
1x	Estabilização/ <i>Hot Start</i>	94 °C	3 min
30x	Desnaturação	94 °C	45 seg
30x	Anelamento	55 °C	30 seg
30x	Extensão	72 °C	1 min 30 seg
1x	Estabilização	72 °C	5 min
1x	Manutenção	4 °C	-

Fonte: Própria Autora.

Finalizada a reação, foi realizada a purificação do produto de PCR utilizando o kit BigDye™ X-Terminator (Applied Biosystems). Em suma, foram pipetados 45 µL do tampão SAM e 10 µL da resina de precipitação de DNA sobre 10 µL do produto da reação de PCR. O microtubo foi deixado em agitação vigorosa por 30 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, foi centrifugado por 2 minutos a 1000 xg. Após centrifugação, as amostras foram aplicadas no aparelho sequenciador 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Todo o processo de sequenciamento de DNA foi realizado de forma terceirizada pelo Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.

4.7 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Com o propósito de elucidar o padrão de crescimento da cepa *E. coli* BL21 transformada com o plasmídeo pET-28a/rRBD, extraído da *E. coli* DH5α, a obtenção de uma curva de crescimento se fez necessária. Para tal, foi realizado o preparo de um inóculo em 5 mL de meio LB adicionado de canamicina, contido em um tubo Falcon. O inóculo foi submetido a um crescimento noturno sob agitação a 240 rpm e temperatura de 37 °C. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL desse cultivo foi transferida para um volume de 50 mL de meio fresco contendo antibiótico. Esse novo cultivo foi incubado nas mesmas condições do inóculo anterior. A densidade ótica (D.O.) do cultivo foi monitorada em intervalos de 20

minutos por meio de um espectrofotômetro Biowave DNA (WAP), até que a D.O. atingisse o valor de 1,0.

4.8 CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO

Neste estágio, visando otimizar as condições de expressão, uma análise foi conduzida com três concentrações de indutor e três tempos do processo de expressão. Inicialmente, um inóculo de *E. coli* BL21 transformada foi preparado em 20 mL de meio LB acrescido de canamicina. Este foi submetido a um crescimento durante a noite, sob agitação de 240 rpm e temperatura de 37 °C. No dia subsequente, foram estabelecidos dez cultivos com volume de 150 mL cada, que foram incubados sob as mesmas condições do inóculo até que atingissem uma densidade ótica (D.O.) de 0,4. Nesse ponto, procedeu-se com a indução da expressão mediante a adição de uma solução de IPTG e o abaixamento da temperatura para 28 °C. Os cultivos então prosseguiram em incubação por diferentes intervalos de tempo. As diversas condições experimentais avaliadas estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de indutor IPTG e tempo de expressão testados em cada cultivo.

Cultivo	IPTG (mM)	Tempo de Expressão (h)
1	0,0	0
2	0,5	2
3	0,5	4
4	0,5	6
5	1,0	2
6	1,0	4
7	1,0	6
8	1,5	2
9	1,5	4
10	1,5	6

Fonte: Própria Autora.

4.9 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

Após o término do período de expressão, o meio de cultura foi submetido a uma centrifugação a 1600 xg por 10 minutos a 4 °C, resultando na separação do sobrenadante e da biomassa. O sobrenadante foi descartado, e a massa celular foi submetida a uma lavagem com tampão apropriado. Para a obtenção do extrato proteico, o pellet foi ressuspensionado em 3 mL de tampão de lise e submetido ao rompimento celular com ultrassom de ponteira por um período de 5 minutos, com intermitências de 30 segundos, sempre mantendo o tubo em ambiente resfriado. Posteriormente, o lisado foi submetido a centrifugação a 2200 xg por 10 minutos a 4 °C, permitindo a separação do sobrenadante, que foi devidamente reservado, e do pellet, que foi novamente ressuspensionado em tampão de lise. Ambas as frações foram armazenadas a uma temperatura de -20 °C até a etapa subsequente. A quantificação da proteína total presente em cada fração (pellet e sobrenadante) foi executada através da utilização do kit comercial Micro BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante. De forma sucinta, 100 µL de cada amostra ou padrão de proteína foram adicionados a poços de uma microplaca, sendo também adicionados 100 µL do reagente de trabalho. A placa foi agitada durante 30 segundos, vedada e então incubada a 37 °C por um período de 2 horas. Após a conclusão da incubação, a absorbância foi medida a 562 nm por meio do leitor de placas GO accuSkan (Fisher Scientific).

4.10 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO E AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES TESTADAS

Com o objetivo de verificar a expressão do rRBD e identificar as condições mais propícias, os extratos proteicos foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Para a preparação deste gel de resolução, os componentes listados na Tabela 2 foram cuidadosamente combinados e introduzidos no aparato de fundição do gel. Em seguida, uma camada de etanol foi aplicada sobre a superfície do gel, evitando a formação de menisco, e o sistema foi deixado em repouso durante 30 minutos. Posteriormente, o excesso de etanol foi eliminado utilizando-se um papel filtro, e os componentes do gel de empilhamento foram

dispostos sobre o gel de resolução. O pente foi inserido para criar os poços, e o gel de empilhamento foi mantido em repouso por 1 hora.

Tabela 2. Composição dos géis de poliacrilamida para eletroforese.

	1 Gel de Resolução 12%	1 Gel de Empilhamento 4%
Água Ultrapura	2,8 mL	3,9 mL
Tampão do gel de Resolução	2,6 mL	-
Tampão do gel de Empilhamento	-	500,0 µL
Acrilamida-Bis Acrilamida 37,5:1 (40%)	2,4 mL	500,0 µL
SDS 20%	200,0 µL	100,0 µL
Persulfato 10%	20,0 µL	16,0 µL
TEMED	8,0 µL	8,0 µL

Fonte: Própria Autora.

Com o fim do repouso, o gel foi inserido na cuba de eletroforese que foi preenchida com tampão de corrida e o pente foi retirado. As amostras foram diluídas 3:1 em tampão de amostra e fervidas em bloco seco por 5 min a 95 °C e então aplicadas nos poços. A corrida eletroforética ocorreu a 100 V para o gel de empilhamento e 200 V para o gel de separação, totalizando cerca de 1h30min. O gel foi então transferido para um recipiente com solução de coloração diluída 1:9 e foi deixado sob agitação overnight. Após coloração, a solução colorante foi substituída por solução de descoloração 1x e o gel foi deixado sob agitação até as bandas estarem evidentes.

4.11 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC)

A fim de purificar o rRBD produzido foi conduzida uma purificação cromatográfica com a coluna HisTrap™ High Performance (Cytiva 17-5247-01) de 5 mL. Primeiramente, a coluna foi lavada com 15 mL de água ultrapura, a fim de retirar a solução de estoque (etanol

20%). Em seguida, a mesma foi equilibrada por meio da introdução de 25 mL de solução de ligação para preparar o leito cromatográfico. A amostra, acrescida de 20 mM de imidazol, foi filtrada por uma membrana de 0,22 μm e então aplicada na coluna. Para remover as proteínas não ligadas, realizou-se uma lavagem com 50 mL de solução de ligação. A eluição das proteínas ligadas ocorreu em um passo único através da injeção de 50 mL de solução de eluição contendo 500 mM de imidazol. Após a etapa de eluição, a coluna foi novamente lavada com 50 mL de água ultrapura e armazenada em etanol 20% para sua preservação e futuras purificações.

Para a construção do perfil cromatográfico, foram recolhidas amostras a cada 5 mL eluidos da coluna. A concentração de proteínas foi determinada pelo kit comercial Micro BCATM Protein Assay (Thermo Scientific) conforme item 4.9.

4.12 DETECÇÃO DO RRBD: WESTERN BLOT

Para a detecção do rRBD, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida, e finalizada a corrida, deu-se início a transferência semiseca das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose de 0,45 μm , esta foi realizada no equipamento Multiphor II Electrophoresis System (Pharmacy), a uma tensão de 0,8 $\text{mV}\cdot\text{cm}^{-2}$ por 1 hora, utilizando papéis filtros embebidos em tampão de transferência para envolver a membrana e o gel. A qualidade da transferência e a eventual presença de bolhas foi avaliada com corante Ponceau S. O bloqueio da membrana foi realizado com solução de bloqueio por 2 horas sob agitação.

Após bloqueio, a membrana foi incubada com solução contendo o anticorpo monoclonal primário anti-6xHisTag conjugado com HRP (3D5) (Thermo Fisher, Catálogo: R931-25) na diluição de 1:3000, à temperatura ambiente por cerca de 16h. As membranas foram então lavadas três vezes com PBS-T, e submetidas a revelação com solução de DAB (0,06%) e peróxido de hidrogênio (0,03%) em PBS. Uma vez detectado o aparecimento das bandas, a membrana foi lavada com água purificada para cessar a reação de revelação, e o excesso de água foi removido com papel filtro. A membrana foi então fotodocumentada.

4.13 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DO RRBD

Com o objetivo de avaliar a reatividade do rRBD nas amostras, bem como reafirmar a sua expressão, foi empregada a técnica de imunodot. Para tal, foram aplicados 3 µL de cada amostra sobre membranas de nitrocelulose, as quais foram posteriormente secas à temperatura ambiente e transferidas para tubos de 2 mL. Para o procedimento de bloqueio, as membranas foram tratadas com uma solução bloqueadora por um período de 2 horas. Após o bloqueio as membranas foram então incubadas durante a noite a 4 °C com agitação constante, utilizando o um pool de anticorpos neutralizadores anti-RBD da empresa Abbott diluídos 1:100 em solução de bloqueio. No dia subsequente, as membranas foram submetidas a 3 lavagens e, posteriormente, foram incubadas com o Anticorpo Secundário (anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase) por um período de 1 hora. Mais uma vez, repetiu-se o procedimento de lavagem e as membranas foram incubadas com solução de revelação até que os pontos de interesse se tornassem visíveis. A reação foi interrompida mediante a lavagem com água ultrapura.

4.14 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO RBD-ACE2 POR FLUORIMETRIA

Esta etapa foi conduzida em microplacas pretas em temperatura ambiente, com um volume final de 200 µL em cada poço. Inicialmente, foram adicionados 1 ng de ACE2 em tampão de ensaio (75 mM de Tris-HCl e 300 mM de NaCl, pH 7,5). Posteriormente, foram acrescentados 10 µL da solução contendo o rRBD e/ou Inibidores em diferentes diluições, os quais foram incubados a 37 °C por 30 minutos. A ativação das reações ocorreu com a adição de 160 µM do substrato (peptídeo fluorogênico Mca-APK(Dnp)-OH). As unidades relativas de fluorescência (RFU) foram registradas utilizando um leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek), com comprimentos de onda (λ) de excitação e emissão ajustados para 320 nm e 405 nm, respectivamente. A leitura foi realizada no modo cinético, com intervalos de 20 minutos ao longo de aproximadamente 2 horas.

Neste experimento são utilizados - como modelo de inibidores de fusão - dois controles positivos do kit comercial SARS-CoV-2 IgG Quant Architect da Abbott (cód. H13810R02). Este kit é utilizado para a determinação qualitativa e quantitativa de anticorpos IgG contra o SARS-CoV-2. Os controles contêm plasma humano positivo para esses anticorpos e apresentam valores de concentração alvo de aproximadamente de 600 AU/mL.

O teste t de *Student* foi utilizado para determinar a significância estatística nas comparações entre as médias. Cada experimento foi realizado pelo menos em duplicata. Um nível de significância estatística de 0,05 foi empregado e todo p -valor $\leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

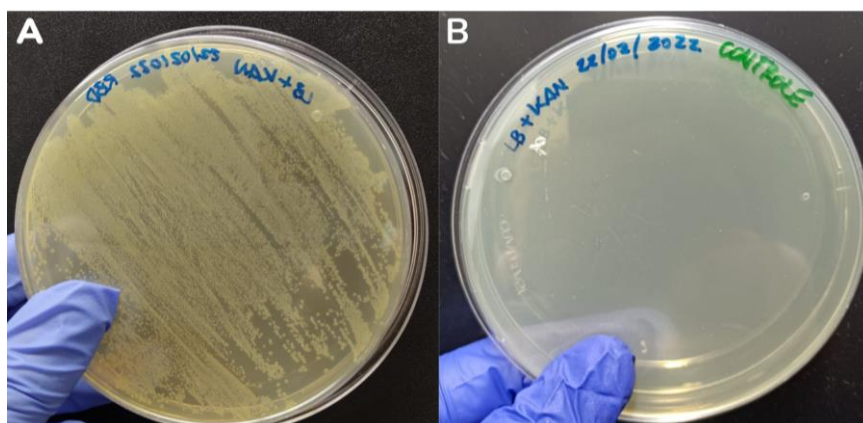
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INDUÇÃO DA COMPETÊNCIA, TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO DA E. COLI DH5A

Diversas espécies bacterianas, por natureza, não apresentam a competência para a captação de material genético, o que torna necessário induzir essa habilidade artificialmente (HANKE, 1995). Entre os métodos mais comuns, destaca-se a utilização do cloreto de cálcio (CaCl_2), cuja função é a modificação da membrana celular e a estabilização das cargas negativas do DNA para que sua entrada seja facilitada (HANKE, 1995; MANDEL; HIGA, 1970).

As etapas de indução da competência e subsequente transformação da linhagem bacteriana DH5 α foram executadas conforme detalhado nos tópicos 4.3 e 4.4. Essas etapas foram executadas com sucesso. A eficiência foi evidenciada pelo notável crescimento de clones nas placas seletivas (Figura 5A). Além disso, a funcionalidade do antibiótico empregado foi confirmada, uma vez que as células não transformadas não demonstraram crescimento no meio seletivo (Figura 5B).

Figura 5. Placas seletivas de meio LB contendo Canamicina. **A)** Crescimento de células DH5 α transformadas com o plasmídeo pET-28a/rRBD. **B)** Crescimento de células DH5 α não transformadas.



Fonte: Própria Autora.

O grande rendimento observado (Figura 5A) é coerente com as expectativas, uma vez que essa cepa foi meticulosamente modificada para maximizar a eficiência de transformação. Idealizada pelo biólogo Douglas Hanahan, essa linhagem abarca duas mutações cruciais. A primeira delas diz respeito à mutação *recA1*, que consiste na alteração pontual do gene que codifica a proteína *recA*, levando à substituição da glicina 160 por uma asparagina. Essa mutação resulta na inativação de diversas recombinases e, conseqüentemente, da recombinação homóloga. Isso confere estabilidade ao material genético exógeno. A segunda mutação, denominada *endA1*, também é pontual e afeta o gene que codifica a endonuclease-1. Nesse caso, a substituição do ácido glutâmico 208 por uma lisina leva à inativação dessa enzima, protegendo o plasmídeo contra degradação (TRIVEDI *et al.*, 2014; HANAHAN, 1983). Tais características justificam a seleção dessa linhagem para a amplificação e preservação do plasmídeo pET-28a/rRBD na coleção do laboratório.

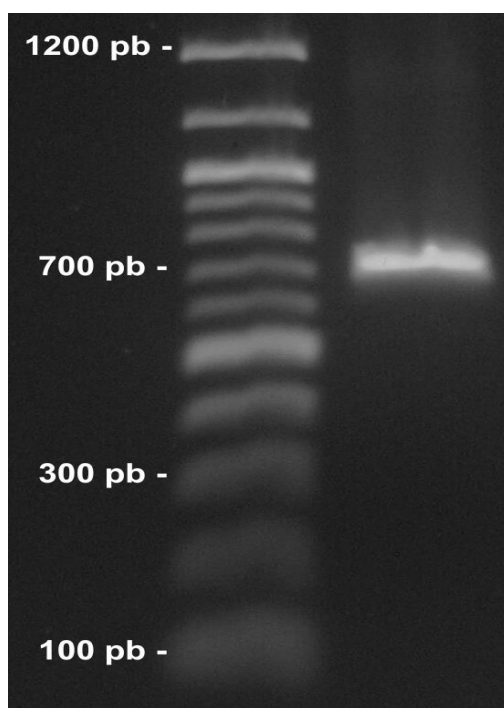
5.2 CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE POR PCR

Após a transformação, foi conduzido um cultivo para verificar a presença do inserto e assegurar que os clones selecionados não carregavam vetores vazios, o que inviabilizaria a produção. O cultivo de 5 mL foi realizado com meio LB contendo canamicina, seguido da extração do DNA plasmidial conforme procedimento delineado na seção 4.5. Como resultado foi obtida uma solução com volume aproximado de 70 μ L.

A avaliação do êxito e da qualidade da extração foi conduzida por meio de leituras no espectrofotômetro NanoDrop. Este instrumento permite a quantificação da absorbância da amostra em diferentes comprimentos de onda e a obtenção das relações entre eles. Na análise de DNA, três comprimentos de onda são relevantes: (1) 260 nm, associado aos ácidos nucleicos, (2) 280 nm, relacionado às proteínas e a alguns compostos fenólicos, e (3) 230 nm, relativo a componentes como carboidratos e guanidina. A relação entre a absorbância a 260 nm e as outras permite inferir sobre a presença de contaminantes na amostra e a qualidade da extração. Valores de A_{260}/A_{280} maiores ou iguais a 1,8 e valores de A_{260}/A_{230} entre 1,8 e 2,2 são considerados indicativos de pureza para amostras de DNA (THERMO SCIENTIFIC, 2019). A solução de DNA plasmidial, proveniente do cultivo apresentou A_{260}/A_{280} de 1,8, A_{260}/A_{230} de 2,1 e concentração de DNA de 57,5 ng/ μ L. Dessa forma, pôde-se concluir que a extração foi bem-sucedida e que foi obtido material genético de boa qualidade.

Após a confirmação da extração, foi realizado um ensaio de PCR convencional, e os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, ambos conforme detalhado na seção 4.6. Ao término da eletroforese e da análise do gel em um transiluminador, observou-se a presença de uma banda intensa na amostra (Figura 6), cujo tamanho correspondeu ao esperado, aproximadamente 700 pb. Esses resultados confirmam a presença do gene de interesse no clone selecionado.

Figura 6. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% do produto de amplificação.

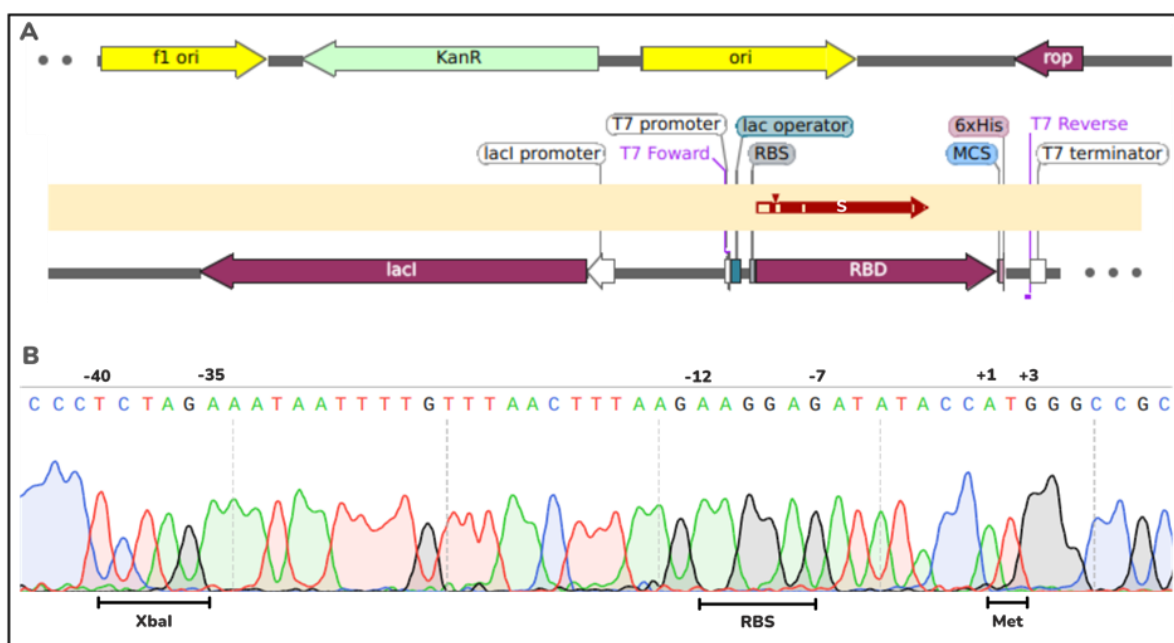


Fonte: Própria Autora.

Para confirmar a identidade genética do inserto, procedeu-se o sequenciamento do amplicon, conforme descrito na seção 4.6. Vale ressaltar que, como parte do controle de qualidade, o fornecedor GenOne realizou o sequenciamento completo do plasmídeo, disponibilizando os respectivos arquivos para análise. Na Figura 7A, é evidente que a sequência obtida por meio do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares se alinha com a região correspondente ao rRBD no plasmídeo pET-28a/rRBD, confirmando sua identidade. Na Figura 7B, é exibido o eletroferograma fornecido pela GenOne, destacando-se o sítio da enzima XbaI, o sítio de ligação ao ribossomo (RBS) e o códon que codifica a metionina (Met), primeiro aminoácido do rRBD, bem como os demais códons subsequentes. A presença de picos nítidos no eletroferograma denota a alta qualidade do sequenciamento.

Ao comparar ambas as sequências (fornecedor e própria), pode-se concluir que o processo de síntese e clonagem do gene RBD transcorreu de forma satisfatória. A sequência recebida coincide com a solicitada, e todo o processo de construção do plasmídeo transcorreu sem introdução de mutações ou códons de terminação prematuros (TGA, TAG, TAA), os quais poderiam interromper precocemente a expressão e comprometer a integridade da biomolécula a ser produzida.

Figura 7. Sequenciamento do gene RBD e controle de qualidade. **A)** Destaque para a região onde a sequência obtida (S) se alinha com a sequência fornecida do plasmídeo pET-28a/rRBD. **B)** Eletroferograma correspondente ao sequenciamento realizado pela GenOne indicando o início da construção do rRBD.



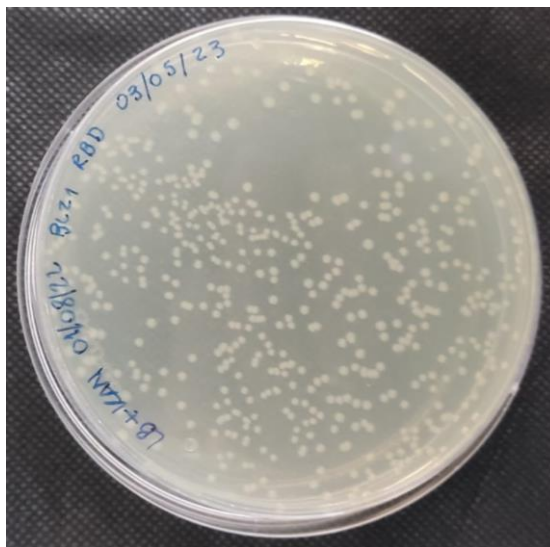
Fonte: Própria Autora.

Esses resultados estão em consonância com o relatório de qualidade fornecido pela GenOne, juntamente com o vetor, que certifica a excelência do produto. O relatório detalhado, o eletroferograma completo e o alinhamento das sequências estão disponibilizados no Anexo A, Anexo B e Apêndice B, respectivamente.

5.3 TRANSFORMAÇÃO DA *E. COLI* BL21 (DE3) E AVALIAÇÃO DO SEU PERFIL DE CRESCIMENTO

Após a confirmação da presença do gene e da qualidade do vetor, conduziu-se a indução da competência, transformação e seleção das células BL21 (DE3), conforme seção 4.3 e 4.4, utilizando a solução de DNA plasmidial extraída da *E. coli* DH5 α . Estas etapas foram conduzidas com sucesso, conforme observa-se na Figura 8.

Figura 8. Placa seletiva de meio LB contendo Canamicina com o crescimento de células BL21 (DE3) transformadas com plasmídeo pET-28a/rRBD.



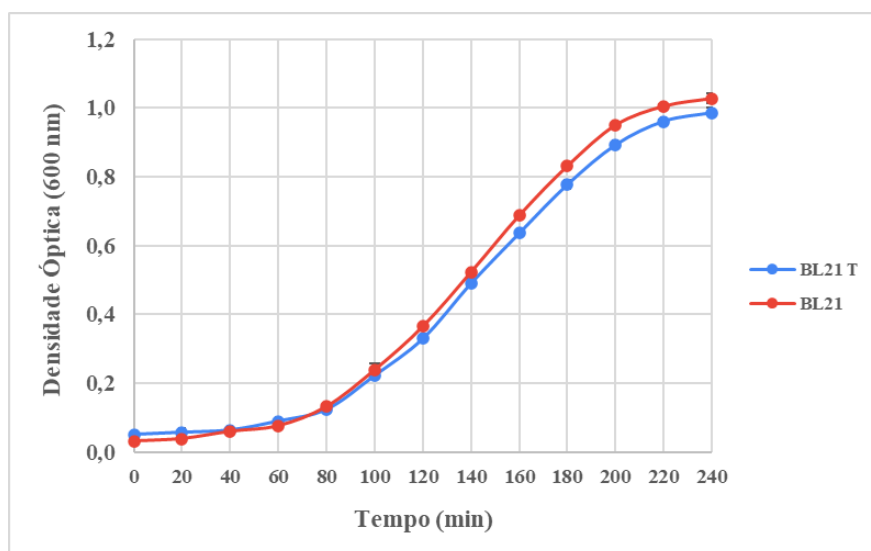
Fonte: Própria Autora.

A linhagem *E. coli* BL21 (DE3), diferentemente da DH5 α , não apresenta as mutações *recA1* e *endA1*. Por consequência, essa linhagem não é ideal para a propagação e manutenção de plasmídeos estáveis (pDNA). No entanto, uma vez transformada, demonstra notável aptidão para a expressão de proteínas heterólogas. Esta característica é respaldada por sua deficiência em diversas proteases, o que reduz a degradação das proteínas recombinantes. Adicionalmente, a BL21 apresenta alta velocidade de crescimento e habilidade para atingir elevadas densidades celulares (ROBICHON *et al.*, 2011; PHUE *et al.*, 2008).

A fim de avaliar o perfil de crescimento do clone escolhido e determinar o melhor momento para a indução da expressão, foi realizado um cultivo desse clone de BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pET-28a/rRBD e um de BL21 (DE3) não transformada, conforme descrito na seção 4.7. Através da elaboração das curvas de crescimento, considerando os valores de D.O. e o tempo (Figura 9), pode-se concluir que a introdução do plasmídeo não exerceu impacto negativo sobre o padrão de crescimento celular em meio seletivo, uma vez que o perfil de crescimento entre a linhagem transformada e não

transformada permaneceu o mesmo. Ambos os perfis apresentam as fases de crescimento esperadas: latência, logarítmica e estacionária.

Figura 9. Curvas de crescimento da *E. coli* BL21(DE3) transformada com o plasmídeo pET-28a/rRBD (BL21 T) em meio seletivo, e da *E. coli* sem a transformação (BL21) em meio não seletivo.



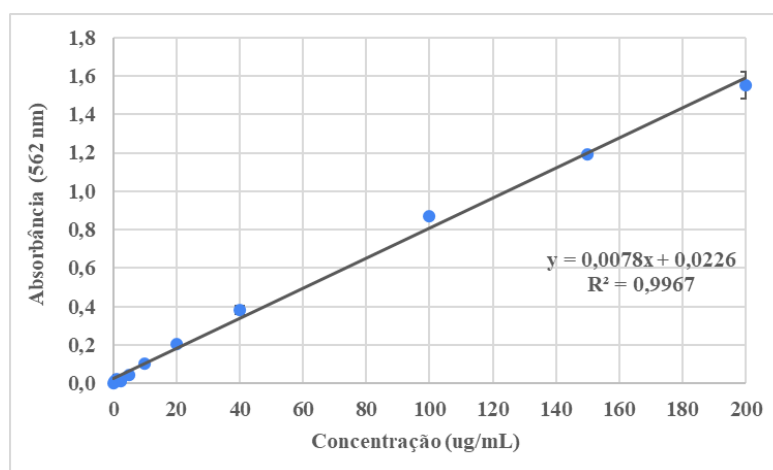
Fonte: Própria Autora.

Com base na análise do perfil de crescimento da BL21 (DE3) transformada, foi determinado que o período mais adequado para a indução da expressão situa-se entre 2h e 2h30min após a inoculação. Durante esse intervalo, as células alcançaram uma densidade ótica (D.O.) entre 0,4 e 0,6, indicativo do meio da fase logarítmica (*mid-log*), caracterizada pela máxima velocidade de crescimento e alta capacidade de tradução proteica. Nesse contexto, a população bacteriana apresenta um grande contingente de células em pleno processo de tradução, o que é fundamental para a produção eficiente do rRBD. A realização da indução fora dessa janela temporal pode resultar na queda do rendimento final, uma vez que na fase de latência as células ainda estão se adaptando às condições do ambiente de cultivo e contam com uma população diminuta. Por outro lado, na fase estacionária, a população celular já alcançou seu pico de crescimento, levando a uma taxa significativa de mortalidade e a uma competição por recursos escassos (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Portanto, o momento de indução escolhido otimiza a produção do rRBD.

5.4 CONDIÇÕES DE EXPRESSÃO

A produção do domínio de ligação ao receptor (RBD) do vírus SARS-CoV-2 em *E. coli* tem sido objeto de pesquisa na literatura científica, onde a maioria dos trabalhos utiliza temperaturas de crescimento muito próximas, cerca de 37 °C, e quase sempre após a indução da expressão, a temperatura é abaixada para favorecer o enovelamento do rRBD (GAO *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021 ; SU *et al.*, 2021 ; YANG *et al.*, 2020). No entanto, existe uma divergência quanto a concentração de indutor e o tempo de expressão. Neste cenário, foram conduzidos 10 cultivos distintos com o intuito de investigar a melhor concentração de IPTG, o melhor tempo de expressão e a possível influência desses fatores na produção do rRBD. Esses cultivos seguiram o protocolo delineado na seção 4.8. Após a conclusão de cada ensaio, procedeu-se à obtenção do extrato proteico por meio da lise celular e separação do sobrenadante seguindo os procedimentos detalhados na seção 4.9. Para a quantificação de proteína total foi elaborada uma curva utilizando-se albumina como padrão de referência, representada na Figura 10.

Figura 10. Curva de calibração com o padrão de albumina do Kit Micro BCA™ Protein Assay para quantificação de proteína total dos extratos proteicos.



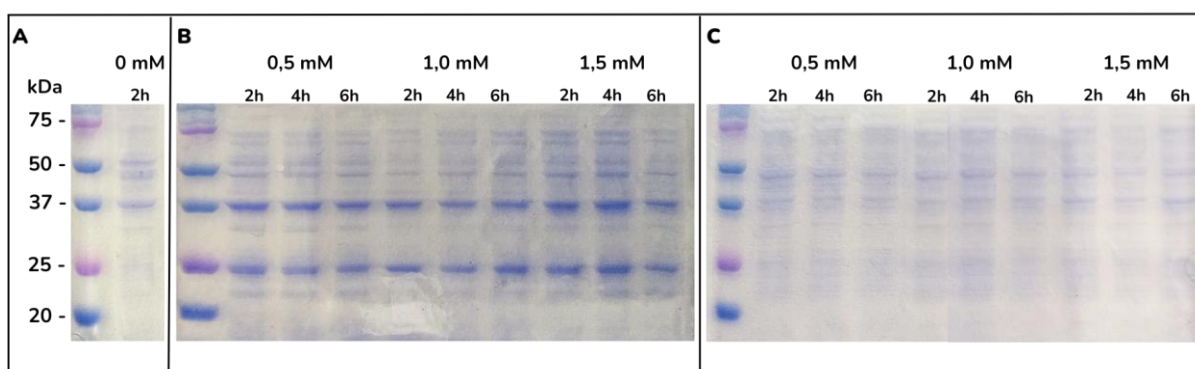
Fonte: Própria Autora.

Conforme evidenciado na Figura 10, a regressão linear aplicada aos dados experimentais gerou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9967, indicando um ajuste satisfatório da linha aos pontos observados e assim a equação resultante, $y = 0,0078x + 0,0226$ (1) demonstrou-se apropriada para a determinação da concentração proteica dos

extratos. Com a curva-padrão estabelecida, as amostras foram submetidas aos procedimentos delineados na seção 4.9: diluição, adição dos reagentes, incubação e mensuração da absorbância em triplicata a 562 nm. Com as médias das absorbâncias e a aplicação da equação supracitada, a concentração total de proteína em cada extrato foi estimada. Os resultados obtidos foram compilados e estão apresentados no Apêndice B.

Para avaliar os efeitos das diferentes condições testadas, os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e subsequentemente corados com solução de azul de Coomassie. Através da padronização das quantidades de proteína total carregadas em cada poço, tornou-se possível a comparação das bandas correspondentes ao rRBD e, assim, a análise das condições avaliadas. Com base nas concentrações estimadas, estabeleceu-se a aplicação de 40 µg de proteína total para a fração *pellet* (insolúvel) dos extratos e 4 µg para as frações de sobrenadante (solúveis), uma vez que a presença proteica nessa última fração é reduzida e há uma limitação no volume que pode ser aplicado no gel. O procedimento de corrida eletroforética se deu conforme descrito na seção 4.10, resultando na obtenção de três géis distintos, os quais são apresentados na Figura 11.

Figura 11. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 12%. **A)** Fração insolúvel (*pellet*) do extrato sem indução da expressão. **B)** Fração insolúvel (*pellet*) dos extratos com indução. **C)** Fração solúvel (sobrenadante) dos extratos com indução.



Fonte: Própria Autora.

Na análise dos géis de poliacrilamida nota-se a presença de uma banda em 37 kDa em todos os cultivos, esta banda refere-se à enzima aminoglicosídeo transferase (KanR), responsável pela resistência ao antibiótico canamicina, marca de seleção presente no plasmídeo. No cultivo sem indução (Figura 11A), o controle negativo do experimento, não se observa a presença de bandas em 25 kDa, peso molecular correspondente ao rRBD. Já nos cultivos onde houve a indução observa-se essa banda na fração *pellet* (Figura 11B), o que

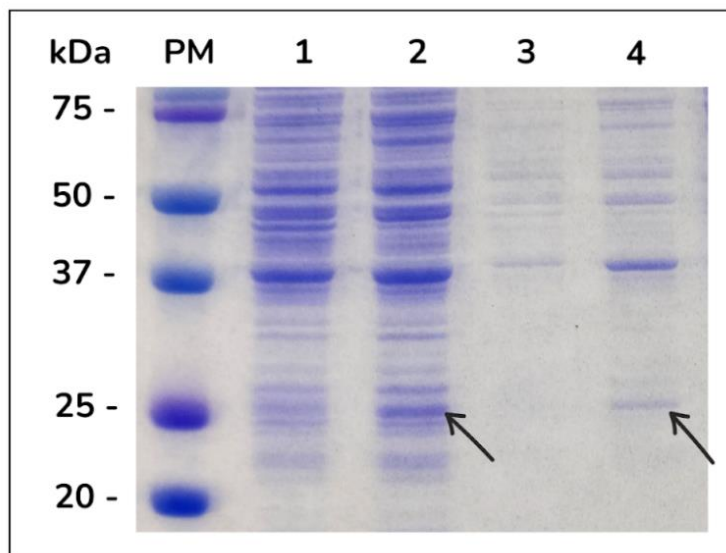
indica a presença do rRBD. Na fração sobrenadante (Figura 11C), as bandas em 25 kDa não são claramente definidas, devido a baixa presença de proteínas totais nesta fração. A maior concentração de proteínas totais é encontrada na fração pellet, o que, de certa forma, é o esperado tratando-se da produção recombinante em sistema procarioto (OVERTON, 2014; GUPTA ; SHUKLA, 2015). Por esse motivo, o tampão de lise utilizado nas etapas seguintes foi melhorado pela adição de lisozima (4 mg/mL), TritonX-100 (2% v/v) e um coquetel inibidor de protease (ThermoFisher – 78429) (10 uL/mL). Todos os cultivos exibiram uma presença satisfatória e similar da banda correspondente ao rRBD, isto é, as condições testadas não apresentaram diferenças significativas entre si. Por isso, com base na prevalência da literatura, definiu-se a utilização de 1 mM de indutor IPTG e 4 horas de expressão para a produção do rRBD (GAO *et al.*, 2021; SU *et al.*, 2021).

A corrida das amostras no gel de poliacrilamida é uma etapa indicada para o controle de qualidade do processo de expressão, uma vez que ela torna possível constatar a presença de bandas proteicas de tamanhos específicos, que podem ou não estar relacionadas ao produto de interesse. Dessa forma, um gel corado por coomassie não confirma a presença efetiva da biomolécula alvo, este fato só pode ser constatado ao aplicar-se uma técnica de identificação com especificidade suficiente para identificar a presença inequívoca do alvo, o que foi realizado e está apresentado na seção 5.5.

5.5 PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO RRBD

A produção do rRBD se deu conforme descrito no item 4.8 com as condições determinadas no item 5.4. Após a conclusão do cultivo, procedeu-se à obtenção do extrato proteico conforme detalhado na seção 4.9 com a aplicação do novo tampão de lise. Para atestar a produção, os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e subsequentemente corados com solução de azul de Coomassie. O procedimento de corrida eletroforética ocorreu conforme descrito no item 4.10, e o resultando é apresentado na Figura 12.

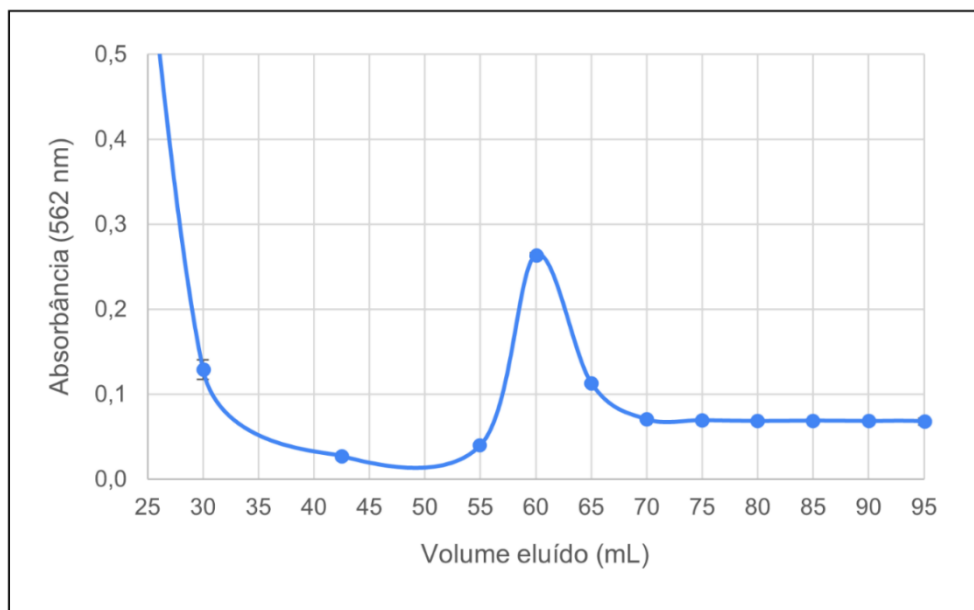
Figura 12. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 12%. PM - Padrão de peso molecular; 1 - Fração solúvel (sobrenadante) sem indução; 2 - Fração solúvel (sobrenadante) com indução; 3 - Fração insolúvel (*pellet*) sem indução; 4 - Fração insolúvel (*pellet*) com indução.



Fonte: Própria Autora.

O novo tampão de lise se mostrou efetivo, como observado na Figura 12, a maior fração de proteínas totais se encontra agora no sobrenadante, tornando possível a purificação do RBD a partir dessa fração. Após a expressão e rompimento celular, a fração solúvel (Figura 12-2) foi então submetida a purificação em coluna de níquel conforme item 4.13. O perfil de cromatográfico desta etapa pode ser dividido em 3 momentos: aplicação da amostra/ligação das proteínas a resina, eluição das proteínas não ligadas e finalmente eluição da proteína de interesse. Conforme observa-se na Figura 13, até o volume de 50 mL, têm-se a lavagem das proteínas não ligadas, e assim é possível observar a densidade óptica se aproximar de zero, indicando sua remoção. A partir dos 50 mL até os 70 mL de volume processado, têm-se a eluição da proteína de interesse, fato indicado pelo pico na absorbância.

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

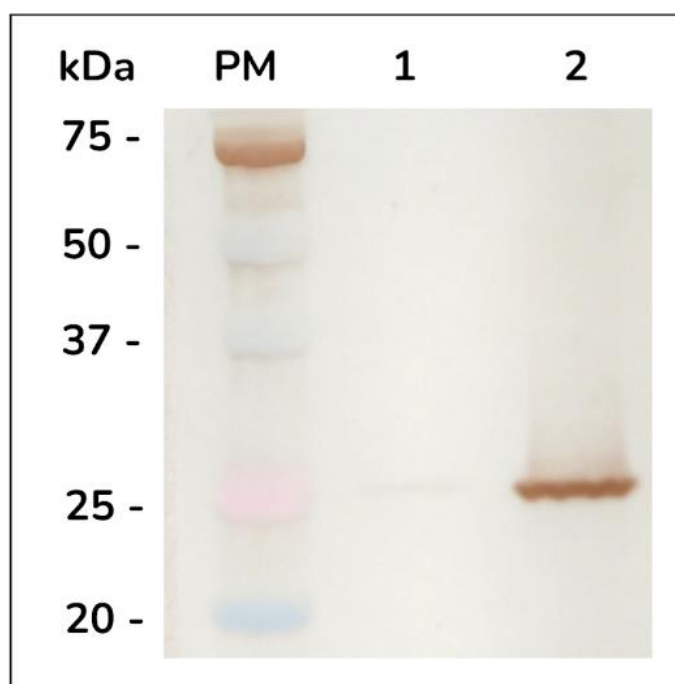


Fonte: Própria Autora.

As frações de 50 a 70 mL de volume eluído, onde encontra-se o rRBD, foram combinadas e submetidas a uma etapa de diálise em membrana de 10kDa objetivando remover o excesso de imidazol e promover a renaturação do rRBD trocando o solvente para PBS.

Após a diálise, uma amostra da solução de rRBD foi submetida novamente a SDS-PAGE com posterior imunodeteção por western blot, conforme item 4.11. O resultado está apresentado na Figura 14. No poço 1, foi aplicada uma amostra de extrato proteico não submetido a indução, onde não pode ser observada a marcação de nenhuma proteína. No poço 2, uma única banda na altura esperada foi marcada com anticorpo específico, logo, pode-se concluir que o rRBD foi produzido, purificado e identificado de forma satisfatória. Por fim, estimou-se a concentração da solução de rRBD purificado em 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, conforme descrito na seção 4.9 e pela aplicação da Equação 1.

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

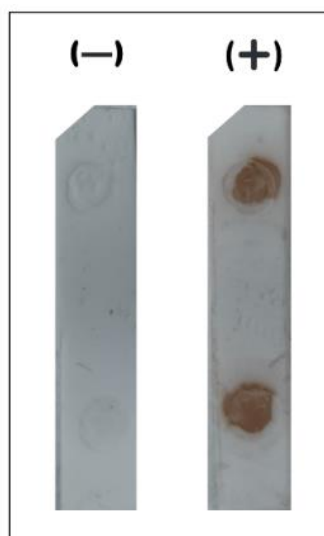


Fonte: Própria Autora.

5.6 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DO RRBD

Para avaliar a reatividade do rRBD produzido e purificado, uma amostra da solução e uma amostra de extrato proteico sem indução da expressão foram submetidas ao dot blot conforme item 4.12. O resultado encontra-se na Figura 15. No grupo controle, sem indução, não foi observada nenhuma reatividade com os anticorpos neutralizadores presente no *pool* utilizado, o que sugere a ausência do rRBD no controle. Por outro lado, na amostra contendo o rRBD purificado, a reação com o *pool* foi claramente evidenciada, demonstrando a reatividade do rRBD com anticorpos neutralizadores anti-RBD. Além da produção e purificação, fica provada a reatividade esperada do produto.

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



Fonte: Própria Autora.

5.7 PROVA DE CONCEITO DA PLATAFORMA PROPOSTA

O presente trabalho objetivou inovar o processo de desenvolvimento de inibidores de fusão contra o vírus SARS-CoV-2 desenvolvendo uma plataforma para a bioprospecção destes medicamentos. Atualmente, o processo padrão ouro é laboroso e necessita do uso de cultura de células. No mercado, há algumas tecnologias disponíveis para escalar e simplificar o fluxo de trabalho, como é o caso dos kits *cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit* (GenScript) e *SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies Detection Kit* (AdipoGen). Estes métodos são desenhados para detectar especificamente anticorpos neutralizadores, um dos grupos de medicamentos que podem ser aplicados como inibidores de fusão, em amostras de soro, através da atividade da enzima HRP, conjugada com o RBD ou com a ACE2 (MÜLLER *et al.*, 2021; TAN *et al.*, 2020; GRIGOROV *et al.*, 2011).

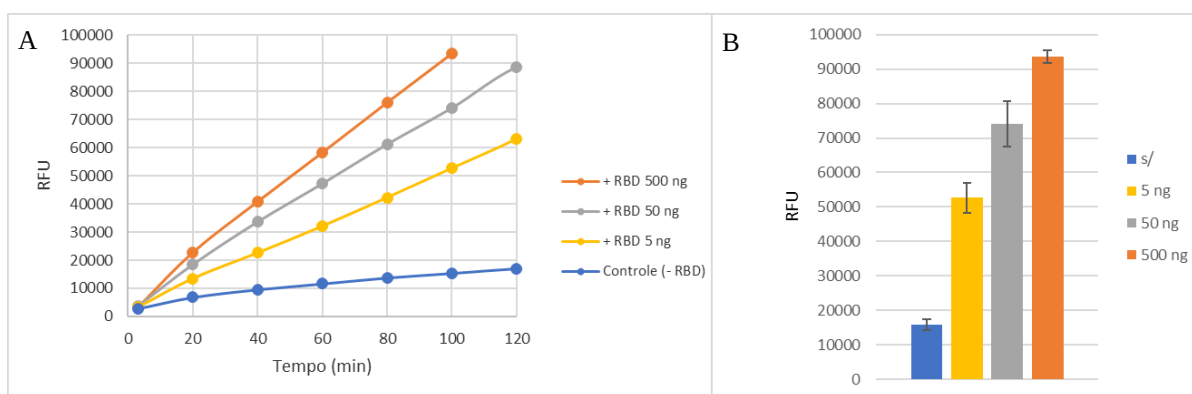
Também é interessante pontuar que ACE2 por si só é uma enzima carboxipeptidase muito bem caracterizada na literatura científica, com diversos métodos disponíveis para que sua atividade seja avaliada empregando peptídeos fluorogênicos (WYSOCKI; SCHULZE; BATLLE, 2019; XIAO; BURNS, 2017). Um dos métodos utilizados têm como base o

peptídeo Mca-APK(Dnp)-OH, que ao ser hidrolisado por ACE2, permite a detecção desta atividade pela emissão do fluoróforo Mca (ácido 7-metoxicoumarin-4-acético) em 380 nm.

O conceito central da plataforma proposta no presente trabalho gira em torno desta atividade peptidase de ACE2 e de sua modulação pela interação com o RBD do vírus SARS-CoV-2. Na literatura, um estudo publicado por Lu e Sun (2021) demonstrou uma influência direta tanto da Spike do SARS-CoV-2 quanto do SARS-CoV-1 na atividade enzimática da ACE2. Diversas consequências fisiológicas podem ser teorizadas com essa descoberta, como uma possível explicação para os problemas cardiovasculares decorrentes da COVID-19, que vem sendo estudados, entretanto, o presente trabalho buscou explorar outro lado desta: a aplicação do aumento na atividade como base para identificar potenciais inibidores da interação RBD-ACE2.

Para à prova de conceito da plataforma, ACE2 foi aplicada na placa de reação sem a presença de nenhum inibidor ou do rRBD anteriormente produzido, a fim de obter-se uma curva basal do consumo do substrato fluorogênico, e em um segundo momento, o rRBD foi adicionado ao sistema a fim de avaliar sua influência sobre a atividade de ACE2. Os dados podem ser conferidos na Figura 16.

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



Fonte: Própria Autora.

Na Figura 16A, a curva “Controle” apresenta o consumo de substrato por ACE2 na ausência do rRBD, e pode-se observar que a fluorescência máxima alcançada é de aproximadamente 17 mil RFU em 120 minutos, que será considerado o consumo basal da enzima para o presente trabalho. Em um segundo momento, a atividade de ACE2 foi testada

na presença do rRBD em diferentes concentrações. Como esperado, ao incluirmos o rRBD, foi possível observar um aumento expressivo no consumo de substrato por ACE2. Para a maior concentração de rRBD adicionada (500 ng), as leituras em 120 minutos não puderam ser determinadas pois excederam o limite superior do equipamento, logo, optou-se por analisar os dados em 100 minutos de reação. Nesse tempo, o consumo de substrato no controle foi de aproximadamente 16 mil RFU.

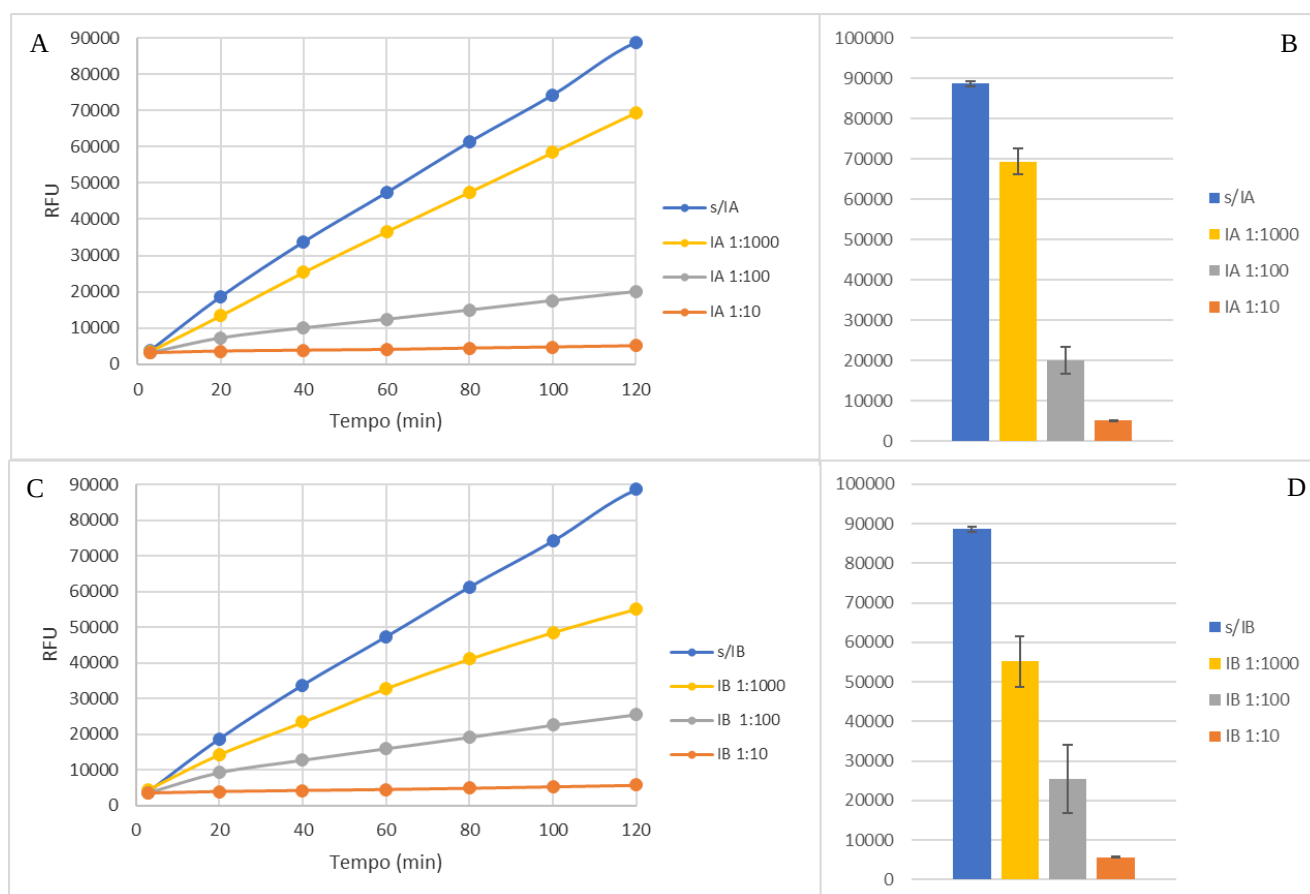
Nesta concentração (500 ng de rRBD), o aumento atingiu 5,9 vezes ($p = 0,01$) o consumo basal do substrato, alcançando mais de 93 mil RFU (Figura 16B). Na concentração intermediária (50 ng de rRBD), o aumento foi de 4,7 vezes ($p = 0,03$), e na menor concentração de rRBD aplicada (5 ng), o aumento no consumo foi de cerca de 3,3 vezes ($p = 0,048$). Esse experimento confirma os dados da literatura, baseados na proteína Spike e no RBD, e demonstra que o rRBD produzido é um potente modulador da atividade de ACE2. É interessante, e importante, ressaltar que o peptídeo Mca-APK(Dnp)-OH se mostrou adequado para essa aplicação, uma vez que ele não foi utilizado no estudo original.

Por fim, um terceiro experimento buscou testar a hipótese de que, ao bloquearmos a interação entre o rRBD e a ACE2, o consumo de substrato retornaria para níveis próximos ao basal anteriormente observado. Para tal, o rRBD foi previamente neutralizado com dois *pools* de anticorpos anti-RBD descritos no item 4.14. Aqui, a concentração de 50 ng de rRBD foi escolhida para os testes, sendo ela a diluição de partida para a neutralização e a utilizada como controle positivo do ensaio. Esses dados podem ser consultados na Figura 17.

Ao neutralizarmos o rRBD antes de sua incubação com ACE2, o aumento do consumo de substrato foi fortemente afetado. Na menor diluição utilizada dos inibidores A e B (1:10), os valores de RFU chegaram a no máximo 6 mil ($p = 0,02$ para ambos), valor inferior ao basal observado. Na diluição intermediária (1:100), o consumo de substrato atingiu de 20 a 25 mil RFU ($p = 0,02$ e $p = 0,03$ para A e B, respectivamente), enquanto que na maior diluição, a variação em RFUs ficou de 55 a 70 mil ($p = 0,05$ para A e $p = 0,02$ para B).

Os resultados confirmam que a prévia neutralização do rRBD com anticorpos reduz sua capacidade de modular a atividade de ACE2 e afetar o consumo do substrato fluorogênico. Tal diminuição observada é proporcional à concentração de anticorpos neutralizadores aplicados na placa de ensaio. Apenas o inibidor A na diluição de 1:1000 não atingiu significância estatística, o que não invalida o resultado, uma vez que, quanto maior a diluição, mais próximos são os resultados do valor controle.

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



Fonte: Própria Autora.

O conjunto de dados do presente trabalho não só confirma resultados prévios da literatura, demonstrando que a atividade de ACE2 é efetivamente afetada pela interação com o vírus SARS-CoV-2 ou com partes da proteína S, como o rRBD produzido, mas também confirma a possibilidade de se utilizar essa modulação como uma ferramenta na busca de substâncias que possam romper tal interação, os denominados inibidores de fusão. Como os inibidores testados foram anticorpos anti-RBD, a aplicação da plataforma para fins de avaliação da neutralização viral também se mostra viável.

Os resultados também sugerem que, de alguma forma, a aplicação de uma quantidade muito grande de anticorpos neutralizadores pode afetar negativamente a atividade de ACE2

por mecanismos além da quebra de sua interação com o rRBD de SARS-CoV-2, fato interessante que poderá ser futuramente elucidado e melhor caracterizado pelo grupo de pesquisa.

6 CONCLUSÕES

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

7 PERSPECTIVAS

- Apesar de o trabalho encontrar-se concluído perante os objetivos preconizados, para que a plataforma venha a se tornar um produto, é necessário que se realize a padronização e a validação dos parâmetros de utilização, bem como determinar o limite de detecção, a especificidade, exatidão, precisão, entre outros. Todo este processo irá demandar a atenção e o tempo de um novo mestrado ou doutorado.

8 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICE A

Indução da Competência, Transformação e Seleção

- Preparo da Solução Estoque de Cloreto de Cálcio 1M: Diluir 1,1 g de CaCl_2 em 10 mL de água ultrapura. Esterilizar por filtração com membrana de poro de 0,22 μm .
- Preparo do Glicerol 70% v/v: Com auxílio de proveta misturar 70 mL glicerol com 30 mL água. Esterilizar por autoclavação e armazenar em geladeira.
- Preparo do Meio de Cultivo Luria-Bertani (LB): Dissolver 30,5 g do meio comercial (L3272 - Sigma) em água ultrapura. Corrigir o pH para 7,0 com solução de NaOH concentrada. Ajustar o volume final para 1 L. Esterilizar em autoclave.
- Preparação do Meio Sólido LB-Ágar: Dissolver 15,5 g do meio em 1 L de água ultrapura. Autoclavar o meio. Adicionar 25 mg de Canamicina. Distribuir o meio em placas de petri de 25 mL. Solidificar sob fluxo de ar. Selar as placas com parafilme. Armazenar em geladeira até o uso.

Miniprep

- Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o kit comercial Concert™ Rapid Plasmid Miniprep System® (Life Technologies), o mesmo é composto pelos reagentes e materiais descritos no Quadro a seguir

Quadro 4. Reagentes e materiais presentes no kit comercial para extração de DNA plasmidial Concert™ Rapid Plasmid Miniprep System®.

Item	Descrição/Composição
Solução G1	Tampão para suspensão de células / Tris-HCl 50 mM e EDTA 10mM.
RNAse A	Ribonuclease pancreática bovina A / Sem composição
Solução G2	Solução para lise celular / 200 mM NaOH e 1% SDS
Solução G3	Tampão de Neutralização / Acetato e Hidroclorato de guanidina
Solução G4	Solução para lavagem / Acetato, Hidroclorato de guanidina e EDTA
Solução TE	Tampão para eluição / Tris-HCl 10mM e EDTA 0,1 mM
Tubos	Tubos para lavagem e recuperação / Material plástico estéril livre de DNases, RNAases e pirogênios, com e sem filtro.

Fonte: Própria Autora.

- Preparo do tampão de corrida Tris-Borato-EDTA (TBE): Diluir 121,1 g de tris base, 55,6 g de ácido bórico anidro e 3,7 g de EDTA sódico em água ultrapura. Corrigir o pH para 7,0 com HCl 1M e ajustar o volume para 1 L.
- Preparo do gel de 1,5%: Dissolver 1,5 g de agarose em 100 mL de TBE. Aquecer a mistura no microondas até ferver e resfriar à temperatura ambiente. Despejar no molde apropriado, inserir o pente para formar os poços.
- Aplicar as amostras no gel de agarose usando o tampão BlueJuice™ com adição do marcador GelRed.

Expressão e recuperação da Biomassa

- Preparo da solução estoque de 200 mM do indutor Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG): Dissolver 238 mg de IPTG em 5 mL de água ultrapura.
- Esterilizar a solução por filtração com membrana de 0,22 μ m.
- Preparo da solução de lavagem (Tris-HCl 100 mM e EDTA 10mM): Dissolver 12,1 g de Tris base e 2,79 g de EDTA sódico em água ultrapura.
- Corrigir o pH para 8,0 com solução de HCl 1M e ajustar o volume para 1 L.

Rompimento Celular e Concentração de Proteína total

- Preparo da solução de lise (NaCl 0,01 M; NaH₂PO₄ 0,05 M; PMSF 0,001 M; Tris-HCl 0,01 M, EDTA 0,001 M e DTT 5 mM): Dissolver 58,4 mg de NaCl, 600 mg de NaH₂PO₄, 174,2 mg de PMSF (em 1 mL de isopropanol), 1 mL de Tris-HCl 1M, 1 mL de EDTA 0,1 M e 77 mg de DTT em água ultrapura. Ajustar o volume para 100 mL e estocar em geladeira.
- Utilizar o kit comercial Micro BCATM Protein Assay (Thermo Scientific) para quantificação de proteína total após o rompimento celular.
- Preparo da solução de trabalho do kit: misturar 25 partes de MA, 24 partes de MB e 1 parte do reagente MC.
- Preparo do conjunto de padrões de proteína: diluir a solução padrão conforme Tabela.

Tabela 3. Diluição da solução padrão de albumina 2 mg/mL.

Tubo	Volume de Diluente (µL)	Volume de Proteína (µL)	Concentração Final (µg/mL)
A	900	100	200
A1*	925	75	150
A2*	950	50	100
B	1600	400 de A	40
C	800	800 de B	20
D	800	800 de C	10
E	800	800 de D	5
F	800	800 de E	3
G	960	640 de F	1
H	800	800 de G	0,5
I	1600	0	0

* Diluições extras preparadas além do indicado pelo manual do kit Micro BCA™ Protein Assay.

Fonte: Própria Autora.

Eletroforese em gel de Poliacrilamida

- Preparo do Tampão do Gel de Resolução: Dissolver 22,69 g de Tris base em água ultrapura, ajustar o pH para 8,8 com HCl concentrado e finalizar o volume em 125 mL.
- Preparo do Tampão do Gel de Empilhamento: Dissolver 15,14 g de Tris base em água ultrapura, ajustar o pH para 6,8 com HCl concentrado e finalizar o volume em 125 mL.
- Preparo do Tampão de Corrida: Dissolver 7,58 g de Tris base, 36 g de glicina e 2,5 g de SDS em 2,5 L de água ultrapura.
- Preparo da Solução de Coloração: Dissolver 0,25 g de Coomassie Brilliant Blue-R-250 (FastBlue) em 37,5 mL de etanol, adicionar 12,5 mL de ácido acético glacial e 75 mL de água ultrapura.
- Preparo da Solução de Descoloração: Misturar 300 mL de etanol, 100 mL de ácido acético glacial e 600 mL de água ultrapura.
- Preparo da Solução de Polimerização: Dissolver 50 mg de persulfato de amônio em 5 mL de água ultrapura.

- Preparo do Tampão de Amostra: Misturar 1 mL de Tris-HCl pH 6,8, 2 mL de glicerol, 2 mL de SDS 20%, 1 mL de β -mercaptoetanol, 5 mg de azul de bromofenol e 3,75 mL de água ultrapura.

Western Blot

- Preparo do Tampão de Transferência: Dissolva 3,47 g de glicina ultrapura, 3,63 g de Tris-HCl em 200 mL de metanol. Complete o volume até 1 litro com água ultrapura.
- Preparo da solução de Ponceau S: Dissolva 500 mg de Ponceau S. em 25 mL de ácido acético anidro. Complete o volume até 500 mL com água ultrapura.
- Preparo do Material: Cortar uma membrana de nitrocelulose do tamanho do gel.

Dot Blot

- Solução de Lavagem: Preparar a partir de 200 mL de PBS adicionando 100 μ L de Tween 20 (PBS-T).
- Solução de Bloqueio: Adicionar 1,5 g de albumina a 100 mL da solução de lavagem
- Solução de Revelação: Preparar imediatamente antes do uso dissolvendo 2,5 mg de DAB em 4 mL de PBS e adicionando 4 μ L de peróxido 30%.
- Preparação do Material: Cortar uma membrana de nitrocelulose em tiras de 0,5 x 2,0 cm.

Purificação

- Solução de ligação: dissolver 1,2 g de NaH_2PO_4 (20 mM), 14,61 g de NaCl (500mM) e 0,681 de Imidazol (20 mM) em 500 mL água ultrapura.
- Solução de eluição: dissolver 1,2 g de NaH_2PO_4 (20 mM), 14,61 g de NaCl (500mM) e 8,51 de Imidazol (500 mM) em 500 mL de água ultrapura.
- Solução de diluição: dissolver 1,2 g de NaH_2PO_4 (20 mM) e 14,61 g de NaCl (500mM) em 500 mL de água ultrapura.

Ensaio de Fluorimetria

- Tampão de ensaio: dissolver aproximadamente 4,54 gramas de Tris (75 mM) e 8,77 gramas de NaCl (0,3 M) em 400 mL de água ultrapura. Corrigir o pH para 7,5 com solução de HCl concentrado e acertar o volume para 500 mL.

APÊNDICE B

Tabela 4. Absorbância e concentração proteica dos extratos obtidos para cada cultivo.

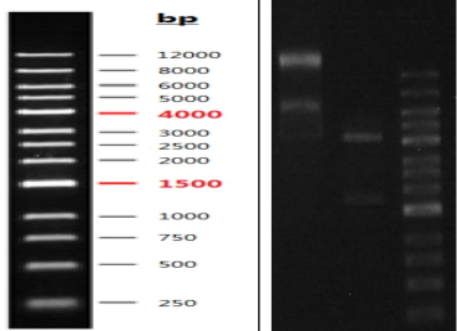
Cultivo	<i>Pellet</i>			Sobrenadante		
	Absorbância Média*	Desvio Padrão	Concentração (ug/uL) **	Absorbância Média*	Desvio Padrão	Concentração (ug/uL) **
1	0,521	0,032	6,390	0,458	0,014	0,558
2	0,664	0,025	8,223	0,589	0,021	0,726
3	0,813	0,068	10,133	0,668	0,032	0,827
4	1,015	0,056	12,723	0,766	0,025	0,953
5	0,684	0,031	8,479	0,557	0,033	0,685
6	0,879	0,054	10,979	0,671	0,048	0,831
7	1,103	0,057	13,851	0,802	0,022	0,999
8	0,689	0,027	8,544	0,526	0,024	0,645
9	0,856	0,036	10,685	0,641	0,032	0,793
10	0,997	0,071	12,492	0,725	0,055	0,901

- *valores já descontado o branco
- ** valores já corrigidos pela diluição

ANEXO A



Gene Synthesis QA Report

Gene Name	pET28a-RBD	Order ID	725256-3
Lot#	MF45169	Cloning Vector	pET-28a(+)
Length (bp)	683	Cloning Sites	NcoI(CCATGG)- XhoI(CTCGAG)
Quality Control			
Test Items	Specifications	Results	
Sequencing Alignment	Sequencing data consistent with target	Pass	
Vector Sequence	Flanking sequence of cloning sites are correct	Pass	
Restriction Digest	Insert size is correct and no contaminated bands	Pass	
ORF Across Junction	Correct and consistent with target	Pass	
PCR Amplification	Correct and no contaminated bands	Pass	
Endotoxin Level	Verified, <0.1 EU/μg (Endo-Free Preps Only)	N/A	
Appearance	Clear, no foreign particles	Pass	
DNA Purity	Purity (A 260/A280 = 1.8 - 2.0)	Pass	
DNA Quantity	Actual yield (by A 260)	5ug	
Restriction Digestion			
		Gene name: pET28a-RBD Clone ID#: MF45169 RES: Apal-XhoI	

ANEXO B

