UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG) /
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CATALÃO (UFCAT) em implantação
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Vânia de Avelar Lucas

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS LIGANTES À 5’-UTR DO GENOMA VIRAL DE SARS-CoV-2

Catalão-GO
2022

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a titulo de divulgação da produção cientifica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[X] Dissertação [ ] Tese [ ] Outro*:_____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Vânia de Avelar Lucas

3. Título do trabalho

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS LIGANTES À 5'-UTR DO GENOMA VIRAL DE SARS-CoV-2

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [ ] SIM [X] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista cientifica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Adriana Freitas Neves**, **Professora do Magistério Superior**, em 10/08/2022, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Vânia De Avelar Lucas**, **Técnico de Laboratório**, em 10/08/2022, às 15:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3096246** e o código CRC **A0B3489B**.

Referência: Processo nº 23070.039476/2022-26 SEI nº 3096246

Vânia de Avelar Lucas

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS LIGANTES À 5’-UTR DO GENOMA VIRAL DE SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Goiás (UFG) / Universidade Federal de Catalão (UFCAT) em implantação, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química. Linha de pesquisa: Química de Produtos Naturais e Biomoléculas

Orientador (a): Profa. Dra. Adriana Freitas Neves

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (*in memoriam*)

Catalão - GO
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFCAT.

Lucas, Vânia de Avelar
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS LIGANTES À 5'-UTR DO GENOMA VIRAL DE SARS-CoV-2 / Vânia de Avelar Lucas. - 2022.
87, XVIII f.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Freitas Neves; co-orientador Prof. Luiz Ricardo Goulart Filho.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Catalão, Instituto de Química, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão, 2022.

1. Vírus de RNA. 2. Selex. 3. região não traduzida. 4. oligonucleotídeos. I. Neves, Adriana Freitas , orient. II. Título.

CDU 54

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 16 da sessão de Defesa de Dissertação de **Vânia de Avelar Lucas**, que confere o título de Mestre (a) em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química da UFCAT.

Ao/s vinte e nove dias do mês de julho de dois mil e vinte e dois, a partir das 08:00 horas, por videoconferência do google meet (https://meet.google.com/vmz-bjif-gvc), realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **"ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS LIGANTES À 5'-UTR DO GENOMA VIRAL DE SARS-CoV-2"** na área de concentração em Química. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professor Doutora Adriana Freitas Neves (PPGQ | UFCAT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora DoutoraProf. Dra. Vivian Alonso Goulart (IBTEC | UFU), membro titular externo; Professora Doutora Jocélia Pereira de Carvalho Oliveira (PPGQ | UFCAT), membro titular interno cujas participações ocorreram por meio de videoconferência. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestões de pequenas alterações e complementações no trabalho final. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Adriana Freitas Neves, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Não houve alteração no título

Documento assinado eletronicamente por **Adriana Freitas Neves**, **Professora do Magistério Superior**, em 29/07/2022, às 10:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart**, **Usuário Externo**, em 29/07/2022, às 10:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Jocélia Pereira De Carvalho Oliveira**, **Professor do Magistério Superior**, em 29/07/2022, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3064543** e o código CRC **03235567**.

Referência: Processo nº 23070.039476/2022-26 SEI nº 3064543

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe, **Divina**, pelo carinho, amor, compreensão e confiança.
Aos meu esposo, **Éric André**, pelo apoio durante toda a vida.
Aos meus filhos, **Éric e João André**, por dar sentido às minhas conquistas e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, com amor, pelo dom da vida e por iluminar o meu caminho.

À Profª Dra. Adriana Freitas Neves, minha orientadora, por todo o auxílio, parceria, dedicação, paciência, confiança, disposição, habilidade, positividade e perseverança diante de tantos obstáculos enfrentados.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (*in memoriam*) pela parceria, apoio, otimismo e confiança, que foram de suma importância para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT-TeraNano) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo apoio concedido.

Ao professor Dr. Aristólteles Góes-Neto do Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos (LBMCF) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela realização do sequenciamento e auxílio no trabalho.

A todos os docentes e técnicos do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Catalão, pelo estímulo que contribuíram na minha formação.

Agradeço a Dra. Amanda Gabrielle da Silva por todo auxílio ao desenvolvimento deste projeto e aos colegas de pesquisa do LaBioMol/ UFCAT que contribuíram, cada um a sua maneira, na realização deste trabalho.

Aos muitos amigos que conquistei ao longo de todo o percurso no LaBioMol/UFCAT, Amanda, Írlei, Rívia, Elismar, Evellyn, Débora, Henrique, Laislla, Leonardo, Mariana, Milena, Ricardo, Valdemir e Vitória. Obrigada pelos momentos de descontração e por muitas vezes segurarem as minhas lágrimas.

Aos meus amigos (as) mestrandos (as), Wygny, Débora, Laislla e Vitória que permitiram que eu chegasse ao final deste trabalho.

À minha mãe, em especial, pelos momentos de incentivo, amor, esperança e confiança.

Ao meu amado esposo, Éric André, e filhos, Éric e João André, com amor e carinho, pela compreensão de minha ausência em vários momentos, sem o amor de vocês eu não conseguiria.

Aos estimados amigos e familiares que estiveram presentes em todos os momentos e me ampararam nos momentos difíceis. Agradeço imensamente, também senti a falta de vocês.

Às minhas amadas tias, Maria das Mercês (*in memoriam*) e Luzia (*in memoriam*), não teve sequer um só dia que deixei de pensar em vocês.

Ao Curso de Ciências Biológicas/ UFCAT pela oportunidade de aperfeiçoamento.

A todos aqueles colegas técnicos, pessoal da limpeza, manutenção, portaria e vigilância da UFCAT pelo apoio recebido e contribuição para que esta pesquisa fosse realizada.

“Tudo é possível quando se tem dedicação e habilidade. Grandes trabalhos são realizados não pela força, mas pela perseverança.”

Autor desconhecido

RESUMO

O desenvolvimento de tecnologias como o método SELEX voltadas para a investigação de biomoléculas denominadas aptâmeros, vêm sendo aplicadas para fins teranósticos e relacionadas à produção de novos materiais para alvos orgânicos e inorgânicos. Tendo como alvo a região 5'-UTR do genoma do vírus SARS-CoV-2, no presente trabalho foram selecionados aptâmeros de ssDNA. Para a obtenção do alvo 5'-UTR de SARS-CoV-2, a sequência desta região foi inserida no plasmídio pUC18, para a amplificação, por PCR simétrica e assimétrica, e produção do ssDNA contendo biotina complexada na extremidade 5'. De modo semelhante, a biblioteca sintética de ligantes foi produzida por PCR simétrica e assimétrica, para obtenção das fitas de dsDNA e ssDNA, respectivamente, cujos fragmentos selecionados e purificados variaram em tamanho em torno de 100-pb. A seleção iniciou-se com a imobilização do ssDNA 5'-UTRbio de SARS-CoV-2 em uma plataforma magnética, seguida de incubação com a biblioteca de ssDNA contendo potenciais oligonucleotídeos ligantes. Após a retirada das moléculas não ligantes ao alvo, cada *round* de seleção foi finalizado com a amplificação dos ligantes por PCR, simétrica e assimétrica para o próximo *round*. Doze *rounds* de seleção foram realizados e o enriquecimento do *pool* de ligantes ao alvo foi avaliado por *dot-blot*, indicando haver afinidade e especificidade destes aptâmeros pela sequência 5'-UTR do SARS-CoV-2. Aptâmeros do décimo segundo *round* foram sequenciados, apresentando cerca de 23 milhões de sequências dos dados brutos, sendo que doze ligantes foram analisados, *in silico,* numa caracterização preliminar, dentre os quais o Apta01-5UTR-hCoV-2, Apta03-5UTR-hCoV-2, Apta03'-5UTR-hCoV-2 e Apta07-5UTR-hCoV-2 apresentaram interação com porções do SL 4.5 e SL 5 da 5'-UTR de SARS-CoV-2. Estes resultados indicam que tais aptâmeros anti-SARS-CoV-2 podem ser avaliados como ferramentas teranósticas a partir de sínteses e/ou modificações químicas dos oligonucleotídeos selecionados para realização de testes moleculares e celulares.

Palavras-chave: Vírus de RNA, Selex, região não traduzida, oligonucleotídeos

ABSTRACT

The development of technologies such as SELEX method for biomolecules investigation as those called aptamers has been applied for the purposes of theranostic and to produce new materials for organic and inorganic targets. Targeting the 5'-UTR region of the SARS-CoV-2 virus genome, ssDNA aptamers were selected in the present work. To obtain the sequence of SARS-CoV-2 as the target, the 5'-UTR of the virus genome was inserted in the pUC18 plasmid, for amplification, by symmetric and asymmetric PCR, and the production of ssDNA containing biotin complexed at its 5'-end. Similarly, the synthetic library of ligands was produced by symmetric and asymmetric PCR to obtain dsDNA and ssDNA, respectively, where the fragmenucleotídeos selected and purified presented a length of around 100 bp. Selection started with immobilizing the ssDNA 5'-UTRbio de SARS-CoV-2 on a magnetic platform, followed by incubation with the ssDNA library containing the potential oligonucleotides as ligands. After the removal of non-ligands, each round of selection was ended with symmetric and asymmetric PCR amplification of the ligands to the next round. Twelve selection rounds were performed, and the enrichment of the ligands to the target was evaluated by dot-blot, indicating affinity and specificity to the sequence of 5'-UTR of SARS-CoV-2. Aptamers from the twelfth round were sequenced, presenting about 23 million raw data of sequences. Twelve ligands were analyzed in silico in a preliminary characterization, among which Apta01-5UTR-hCoV-2, Apta03-5UTR-hCoV-2, Apta03'-5UTR-hCoV-2, and Apta07-5UTR-hCoV-2 interacted with portions of SL 4.5 and SL 5 of the 5'-UTR of SARS-CoV-2. These results indicate that the aptamers anti-SARS-CoV-2 can be evaluated as theranostic tools from synthesis and/or chemical modifications of the oligonucleotides selected to perform new and complementary molecular and cellular tests.

Keywords: RNA virus, Selex, untranslated region, oligonucleotid

LISTA DE ILUSTRACÕES

FIGURA 1: Diagrama de classificação taxonômica do vírus de RNA de SARS-CoV-2.....19
FIGURA 2: Principais números de casos e óbitos no mundo relacionados ao vírus SARS-CoV-2 até janeiro de 2022.....22
FIGURA 3: Representação esquemática da organização do genoma de RNA de SARS-CoV-2.....25
FIGURA 4: Modelo representativo das estruturas conservadas das regiões 5' e 3'-UTR dos Coronavírus.....29
FIGURA 5: Semelhança entre as sequências líderes e a alta conservação da Sequência Regulatória da Transcrição (TRS) na região 5'-UTR entre SARS-CoV e SARS-CoV-2.....34
FIGURA 6: Modelo representativo das estruturas funcionais dos *stem-loops* (SL1, SL2, SL3, SL4, SL4.5 e SL5) da região 5'-UTR de SARS-CoV-2.....34
FIGURA 7: Representação da posição da uORF na região 5'-UTR de SARS-CoV-2 e da sequência da nsp 1.....35
FIGURA 8: Esquema ilustrativo da funcionalidade dos aptâmeros.....43
FIGURA 9: Diagrama representativo da Metodologia SELEX.....46
FIGURA 10: Estruturas secundárias e tridimensionais do aptâmero anti-dengue selecionado pelo grupo do LaBioMol/ UFCAT.....48
FIGURA 11: Representação esquemática da Biblioteca de DNA utilizada no SELEX.....55
FIGURA 12: Esquema da Reação em Cadeia da Polimerase (simétrica e assimétrica) em Termociclador BIO-RAD T100 para amplificação da biblioteca.....56
FIGURA 13: Esquema da Reação em Cadeia da Polimerase em 7500 Real Time PCR System para amplificação do alvo 5'-UTR SARS-CoV-2.....58
FIGURA 14: Esquema representativo do teste de incorporação com biotina ao alvo na membrana de náilon Hybond-N+.....60

FIGURA 15: Representação do SELEX genômico.....63
FIGURA 16: Representação do *dot-blot* para análise da afinidade entre o alvo (ssDNA 5'-UTRbio) de SARS-CoV-2 e o pool de aptâmeros do terceiro ao décimo segundo *round*.....64
FIGURA 17: Representação do *dot- blot* para análise da afinidade entre o pool de aptâmeros do décimo segundo *round* e o alvo 5'-UTR de SARS-CoV-2.....65
FIGURA 18: Representação do *dot-blot* para análise da afinidade entre os *primers* 1 e 2, os produtos brancos de PCR simétrica e assimétrica, o *pool* de aptâmeros do nono e décimo segundo *round* e o alvo 5'-UTR de SARS-CoV-2 (ssDNA5'-UTRbio).....66
FIGURA 19: Obtenção da região alvo 5'-UTR de SARS-CoV-2.....68
FIGURA 20: Produção da biblioteca de ssDNA e *rounds* de seleção contra a 5'-UTR de SARS-CoV-2.....71
FIGURA 21: *Dot-blot* para avaliação do enriquecimento e afinidade entre o alvo (ssDNA 5'-UTRbio) e o *pool* de aptâmeros do 3º aos 12º *rounds*.....77
FIGURA 22: *Dot-blot* com indicação de afinidade e especificidade da biblioteca de ligantes com a 5'-UTR de SARS-CoV-2.....80
FIGURA 23: Eletroforese em gel de agarose 1.2% e *dot blot* para avaliação da afinidade entre o alvo (ssDNA 5'-UTRbio) de SARS-CoV-2 e ligantes.....81
Figura 24: Quatro ligantes identificados em análise prévia de sequenciamento de aptâmeros do décimo segundo *round* e as respectivas regiões de interação dos ligantes a região 5'-UTR de SARS-CoV-2.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seleção preliminar pós-sequenciamento NGS de aptâmeros anti-5'-UTR de SARS-CoV-2 do décimo segundo *round*.....83

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	porcentagem
2019-nCoV	*novel coronavirus 2019* (novo coronavírus 2019)
ACE2	*Angiotensin-Converting Enzyme 2* (enzima conversora de angiotensina 2)
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BcoV	*Bovine coronavirus*
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de controle de prevenção de doenças)
cDNA	*complementary DNA* (ácido desoxirribonucleico complementar)
COVID-19	*Coronavirus Disease 2019* (Infecção respiratória aguda causada pelo coronavírus SARS-CoV-2)
CoVs	Coronavírus
CS	sequência central variável
DDX	*helicase dead box*
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
dNTPS	desoxiribonucleotídeos fosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
dsDNA	*double-stranded* DNA (DNA de fita dupla)
E	envelope
F	*foward*
FDA	*Food and Drug Administration*
HIV-1	*Human Immunodeficiency Virus* (vírus da imunodeficiência humana)
HVR	*hyper variable region* (região hipervariável)
INCT-TeraNano	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia
kb	quilobases
kDa	kiloDalton

LaBioMol/UFCAT	Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Catalão
LBMCF	Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos
M	proteína de membrana
M	molar
mAb	anticorpo monoclonal
MERS-CoV	*Middle East respiratory syndrome coronavirus* (Síndrome Respiratória do Oriente Médio causada por Coronavírus)
MHV	*Murine hepatitis virus* (vírus da hepatite de camundongo)
miRNA	microRNA
mL	mililitro
mM	micromolar
mRNA	*messenger RNA* (RNA mensageiro)
N	proteína do nucleocapsídeo
NBT	nitroazul tetrazólio
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
ng	nanogramas
NGS	*Next-Generation Sequencing* (sequenciamento de nova geração)
nm	nanômetros
nsp	proteínas não estruturais
^{o}C	graus celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	*open reading frame* (sequência codificante)
PABP	*polyadenylate-binding protein*
pb	pares de bases
PCR	*Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
pmoles	picomoles

ppla	poliproteína a
pplb	poliproteína b
PTB	*polypyrimidine tract binding protein* (proteína de ligação ao trato de polipirimidina)
QC	Química Combinatória
r	coeficiente de correlação
RBD	*Receptor Binding Domain* (domínio de ligação ao receptor)
RBPs	*RNA Binding Protein* (proteínas de ligação ao RNA do hospedeiro)
RdRp	*RNA dependent RNA polymerase*
RNA	*Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
RNAse P	*Ribonuclease P* (ribonuclease p)
rpm	rotações por minutos
RTC	*replicase-transcriptase complex*
RT-PCR	*Reverse transcription polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase reversa)
S	proteína *spike*
S1	subunidade 1
S2	subunidade 2
SARS	*Severe Acute Respiratory Syndrome*
SARS -CoV	*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (Síndrome Respiratória Aguda Grave causada por Coronavírus)
SARS-CoV-2	*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (Síndrome Respiratória Aguda Grave causada por Coronavírus 2)
SDRA	*Respiratory Distress Syndrome*
SELEX	*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (Evolução Sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial)
SL	*stem loop*

ssDNA	*single-stranded* DNA (ácido desoxirribonucleico de fita simples)
ssRNA	*single-stranded* RNA (ácido ribonucleico de fita simples)
ssDNA 5’-UTRbio de SARS-CoV-2	ssDNA biotinilado da 5’-UTR de SARS-CoV-2
Taq	*Thermus aquaticus*
TARDBP	*TAR DNA binding protein*
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TMPRSS2	*Transmembrane serine protease 2*
TRS	*transcriptional regulatory sequence*
U	unidade de enzima
UFCAT	Universidade Federal de Catalão
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
uORF	u *open reading frame*
UTR	*untranslated region* (região não traduzida do DNA)
UV	ultravioleta
V	volts
WHO	*World Health Organization*
ZIKV	zika vírus
βCoVs	betacoronavírus
µL	microlitros

SUMÁRIO

1 – Introdução 19

1.1 – Aspectos epidemiológicos 19

1.2 – Transmissão viral e aspectos clínicos de SARS-CoV-2 23

1.3 – Aspectos moleculares de SARS-CoV-2: estrutura e respostas celulares à infecção 25

1.4 – Aspectos estruturais e moleculares das regiões não traduzidas (UTRs) dos genomas dos Coronavírus (CoVs) 29

1.5 – Aspectos estruturais, moleculares e interações da região 5'-UTR de SARS-CoV-2 33

1.6 – Variantes de SARS-CoV-2 36

1.7 – Diagnóstico e terapias 38

1.8 – SELEX Genômico 42

1.9 – Aptâmeros em doenças infecciosas 47

2 – Objetivo Geral 52

2.1 – Objetivos Específicos 52

3 – Materiais 53

4 – Parte Experimental 54

4.1 – Análise, design e obtenção das sequências 5'-UTR de SARS-CoV-2 54

4.1.1 – Análise, design e obtenção dos Plasmídeos 54

4.1.2 – Produção da biblioteca de oligonucleotídeos de ssDNA 55

4.1.3 – Eletroforese em gel de agarose e purificação dos produtos de PCR da biblioteca de oligonucleotídeos de ssDNA 56

4.1.4 – Obtenção do alvo 5'-UTR de SARS-CoV-2 57

4.1.5 – Teste de marcação com biotina 59

4.2 – *Round*s de seleção dos ligantes ao alvo 60

4.3 – Ensaios de hibridação por *dot-blot* 63

4.4 – Sequenciamento e análises *in silico* 67

5 – Resultados e Discussão 68

5.1 – Obtenção das sequências 5’-UTR de SARS-CoV-2 68

5.2 – Obtenção dos aptâmeros de ssDNA ligantes ao alvo 5’-UTR de SARS-CoV-2 71

5.3 – Caracterização dos aptâmeros ligantes à 5’-UTR de SARS-CoV-2 por ensaios de hibridação por *dot-blot* 76

5.4 – Sequenciamento e análises *in silico* 82

6 – Considerações Finais 86

7 – Referências 88

1 – Introdução

1.1- Aspectos epidemiológicos

Nos últimos 20 anos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020b), surgiram doenças emergentes de vírus de RNA que impactaram a sociedade e trouxeram sérios problemas de saúde pública. Se destacaram o SARS-CoV (Síndrome Respiratória Aguda Grave causada por Coronavírus) na China, em 2002 a 2003, o H1N1 (Influenza H1N1), no México, em 2009, o MERS-CoV (Síndrome Respiratória do Oriente Médio causada por Coronavírus), no Oriente Médio, em 2012, o EBOV (Vírus Ebola), na África, em 2014, o ZIKV (Vírus Zika), no Brasil, em 2015 e o surto mais recente, em 2019, causado por SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave causada por Coronavírus 2) (CASCELLA et al., 2020; THAO et al., 2020).

Os coronavírus (CoVs), patogênicos aos seres humanos, são pertencentes a ordem *Nidovirale*s, a família *Coronaviridae* e a subfamília *Coronavirinae* (FEHR & PERLMAN, 2015; ANDERSEN et al., 2020; LANA et al., 2020; MOUSAVIZADEH & GHASEMI, 2021), apresentando na subfamília a terminologia relacionada a estrutura externa do vírus com aspecto de coroa solar. São divididos em: alphacoronavírus (α), betacoronavírus (β), gammacoronavírus (γ) e deltacoronavírus (δ) (Figura 1) (FEHR & PERLMAN, 2015; YANG & LEIBOWITZ, 2015; ANDREWS et al., 2020; JIN et al., 2020; SHEREEN et al., 2020). O gênero betacoronavírus é dividido em quatro linhagens, A (BCoV, MHV, HCoV OC43, HCoV HKU1), B (SARS-CoV, SARS-CoV-2), C (BtCoV-HKU4 e BtCoV-HKU5, MERS-CoV) e D (CoVs de morcego-BtCoV-HKU9).

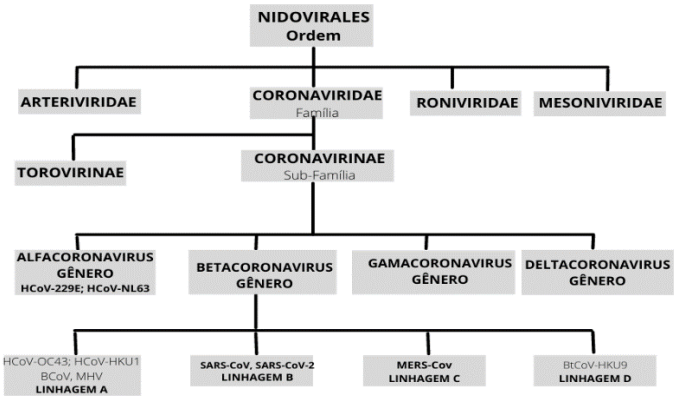

Figura 1: Diagrama de classificação taxonômica do vírus de RNA de SARS-CoV-2. Adaptado de PAL et al., 2020.

São conhecidos sete CoVs patogênicos aos seres humanos (YADAV et al., 2021). Em humanos, assim como dois vírus pertencentes ao gênero alphacoronavírus, HCoV 229E, HCoV NL63, dois vírus da linhagem A de βCoVs (HCoV-OC43, HCoV-HKU1) causam doenças respiratórias leves a moderadas e em imunocomprometidos ocasionam infecções no trato respiratório (YADAV et al., 2021). A linhagem B (SARS-CoV, SARS-CoV-2) e C (MERS-CoV) é responsável por epidemias com elevados índices de mortalidade (YANG & LEIBOWITZ, 2015; CASCELLA et al., 2020; SUN et al., 2021a).

Os CoVs apresentam estrutura esférica, visualizada por microscopia criogênica, com diâmetro de cerca de 125 nm, com nucleocapsídeo, RNA de fita simples e uma variação no comprimento de 26 a 32 kbs (BÁRCENA, et al., 2009; YANG & LEIBOWITZ, 2015; SHEREEN et al., 2020). Na última metade do século XX, foram causadores de síndromes graves (HE et al., 2014), responsáveis por complicações respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas (FEHR & PERLMAN, 2015; YANG & LEIBOWITZ, 2015; JIN et al., 2020; PAL et al., 2020). Nas células pulmonares, o vírus ocasiona pneumonia com lesão alveolar grave e a Síndrome do Desconforto Respiratório (SDRA) (PEIRIS et al., 2003). Em alguns casos foi identificado elevação nos níveis de citocinas no soro de pacientes infectados, evoluindo para o agravamento da doença (LAW et al., 2005; SHEREEN et al., 2020).

A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) ocorreu na província de Guangdong, na China, no período de 2002-2003 e foi considerada doença grave e causada por CoVs do grupo 2bβ-coronavírus, SARS-CoV, levando a óbito cerca de 9% da população, na maioria idosos, e levando a perdas econômicas em 20 países, dentre eles países da Ásia e América do Norte (GUAN et al., 2003). SARS-CoV apresentou circulação comprovada em morcegos e estudos apontaram entre outros animais não identificados, as civetas como fonte zoonótica (CASCELLA et al., 2020). Uma das principais fontes de disseminação foram os manipuladores de animais (pangolins, morcegos) e via paciente-corpos de saúde. A infecção foi contida por conjuntos de prevenção, incluindo isolamento nos domicílios e hospitais (GUAN et al., 2003; SHI & HU, 2008; PAL et al., 2020).

Em 2012 surgiu um novo vírus na Arábia Saudita, em Jeddah na Jordânia, originando a Síndrome Respiratória do Oriente Médio-CoV (ZAKI et al., 2012; YADAV et al., 2021). O vírus apresentou alta patogenicidade e a taxa de mortalidade foi de quase 40%, e assim como em SARS-CoV, alguns indivíduos doentes tiveram lesões respiratórias leves a graves, e em alguns casos, chegando a pneumonia e/ou SDRA (FEHR & PERLMAN, 2015; SHEREEN et al., 2020). MERS-CoV, pertencente ao grupo 2cβ-coronavírus, apresentou circulação comprovada em morcegos e estudos recentes apontaram o camelo também como fonte zoonótica¸ nas proximidades da Arábia Saudita (MEMISH et al., 2013; AZHAR et al., 2014; PADEN et al., 2018; JIN et al., 2020; YADAV et al., 2021).

Análises de 53 sequências estimaram que no dia 13 de dezembro de 2019 iniciou-se a circulação do vírus SARS-CoV-2 na espécie humana, com um período de duplicação da epidemia de 7,1 dias (VOLZ et al., 2020). Em 31 de dezembro de 2019, um surto de SARS-CoV-2 foi detectado em Wuhan, província de Hubei, na China (CASCELLA et al., 2020; MUKHERJEE & GOSWAMI, 2020). Os primeiros indivíduos infectados tiveram histórico em comum de terem frequentado o mercado de frutos do mar, embora tenha sido descrito que o comércio de Wuhan possa não ter sido o local da fonte inicial de contaminação (HU et al., 2021), alguns relatórios e evidências indicaram que a infecção detectada por SARS-CoV-2 originou-se nesse local (ZHU et al. 2020b).

Na data de 12 de janeiro de 2020, o genoma do vírus tornou-se disponível e foi submetido ao GenBank (número de acesso MN908947.2; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947,2) (ABDULJALI & ABDULJALI, 2020). Em 16 de janeiro de 2020 o vírus foi detectado no Japão e ao final desse mesmo mês, diversos países confirmaram a ocorrência do vírus, incluindo Estados Unidos, Canadá e Austrália (LANA et al., 2020).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020b) declarou emergência internacional em 30 de janeiro de 2020 (LANA et al., 2020; SONG et al., 2020) e em março de 2020, foi declarada uma pandemia. Desde então, os governos mundiais trabalham para conter os efeitos devastadores da infecção e conjuntos de prevenção e quarentena vem sendo aplicados (SHEREEN et al., 2020.

O vírus, inicialmente chamado de novo coronavírus 2019 (2019-nCov) (HELMY et al., 2020), foi classificado como membro do grupo βCoVs e posteriormente, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) o denominou como SARS-CoV-2 e a doença como COVID-19 (MIAO et al., 2021). De acordo com SHEREEN et al. (2020), SARS-CoV (2003) infectou 8.098 indivíduos com taxa de mortalidade de 9,6%, em 26 países do mundo. SARS-CoV-2, nos primeiros dois meses, infectou cerca de 123.882 indivíduos, com taxa de mortalidade de 3,61%.

Até o mês de junho de 2020, 7,21 milhões de pessoas em todo o mundo foram infectadas (MUKHERJEE & GOSWAMI, 2020). Segundo HU et al. (2021), em outubro de 2020, 34 milhões de pessoas contraíram a doença, com cerca de 1 milhão de mortes. Segundo o 98º Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2022), se destacaram em números de casos e óbitos, os países Estados Unidos, Índia e Brasil (Figura 2) e até o dia 29 de janeiro de 2022, foram confirmados 372.553.400 de casos, com 5.658.543 de óbitos no mundo.

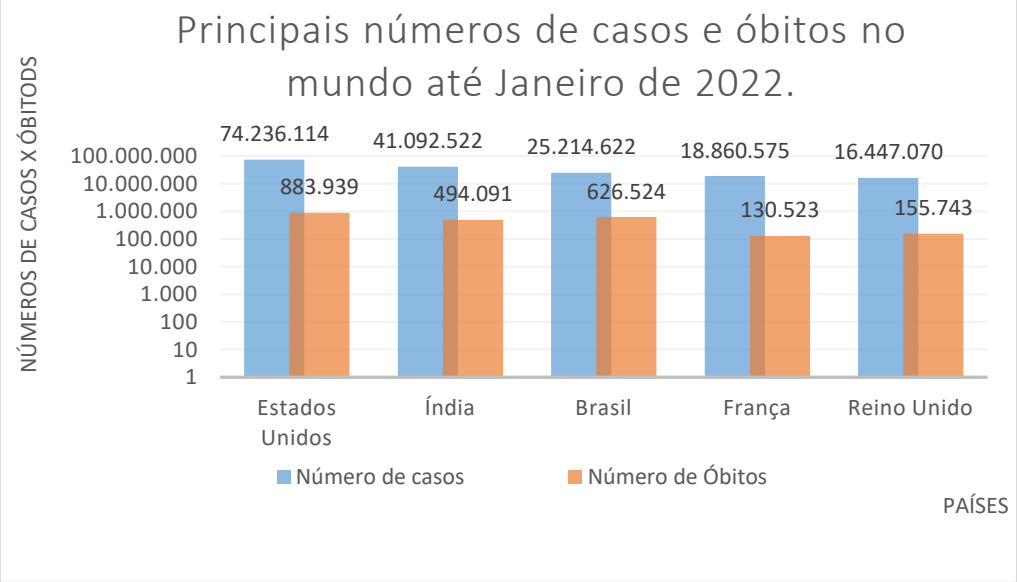

Figura 2: Principais números de casos e óbitos no mundo relacionados ao vírus SARS-CoV-2 até janeiro de 2022. Adaptado do 98º Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, 2022.

De acordo com a universidade de JOHN HOPKINS UNIVERSITY & MEDICINE, em 26 de julho de 2022, foram mais de 572 milhões de infecções com SARS-CoV-2, com mais de 6.388.331 de mortes em todo o mundo. Nesse sentido, a elevada taxa de transmissão de SARS-CoV-2 no mundo foi

demonstrada, com valores reprodutivos (R_0), representando o número de indivíduos infectados por pessoa positiva ao vírus (ABDULJALI & ABDULJALI, 2020), que é estimado em 3,28 e em relação a SARS-CoV, esse valor correspondeu a 2,2 no ano de 2002 (LIU et al., 2020b).

Análises filogenéticas indicaram que SARS-CoV-2 apresentou 79,5% e 50%, respectivamente, de semelhança genômica em relação a SARS-CoV e MERS-CoV (JIN et al., 2020; ZHOU et al., 2020b; YADAV et al., 2021). Acredita-se que o genoma de SARS-CoV-2 evoluiu de uma linhagem encontrada em morcegos, morcego-SLCoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21, com semelhança de 88%, e ainda, o SARS-CoV humano com 82% de semelhança (LU et al., 2020; YADAV et al., 2021).

Diferentes animais (civetas, morcegos, pangolins e cobras) podem ter sido hospedeiros intermediários, se é que houve algum, e que facilitaram a disseminação do vírus SARS-CoV-2 (ABDULJALI & ABDULJALI, 2020), os estudos de XIAO et al. (2020) indicaram os pangolins como participante na disseminação viral, infectando sequentemente morcegos e posteriormente humanos (SHARMA et al., 2021). Até o momento um CoV detectado nos morcegos *Rhinolophus affinis,* denominado “RaTG13” apresentou 96,2% de semelhança com o genoma de SARS-CoV-2, inclusive nas regiões mais variáveis (ZHOU et al., 2020b), se destacando também o morcego “RmYN02” com 93.3% de semelhança com as sequências de SARS-CoV-2, apoiando dessa forma, a hipótese de os morcegos serem os precursores diretos do vírus (YADAV et al., 2021), mas não os progenitores (ZHOU et al., 2020a).

1.2- Transmissão viral e aspectos clínicos de SARS-CoV-2

Levando em consideração a transmissão zoonótica, tem-se a suspeita da evolução do vírus, *in vivo* (SHEN et al., 2020), sendo que a disseminação da COVID-19 vem ocorrendo principalmente por contato pessoa a pessoa por meio de gotículas respiratórias, oriundas da tosse e espirros, e também através da formação de aerossóis em locais com pouca ventilação. Existem indícios que o vírus é eficientemente disseminado por indivíduos assintomáticos, caracterizando a doença como tendo uma dispersão descontrolada e silenciosa (CASCELLA et al., 2020; SHEN et al., 2020).

Sobre o potencial de contaminação por vias indiretas, SARS-CoV-2 é mais estável em plásticos e aço e tem a capacidade de resistir por até 72 horas nessas superfícies (LIU et al., 2020a). É semelhante a outros CoVs na capacidade de ser inativado por raios UV, temperaturas acima de 56 ^{o} C e sensibilidade a solventes lipídicos, tais como etanol, desinfetante com cloro, a éter e ao clorofórmio (CASCELLA et al., 2020; JIN et al., 2020).

Em humanos, o tempo de incubação pode durar até duas semanas, mas geralmente é de 3 a 7 dias, com manifestação dos sintomas até 21 dias. A evolução clínica é dependente da idade, das comorbidades respiratórias, cardiovasculares e diabéticas (CASCELLA et al., 2020; JIN et al., 2020). No Brasil, de março a setembro do ano de 2020, destacou-se à mortalidade nos indivíduos que possuíram complicações cardiovasculares (36,36%) e diabéticas (30,77%) (LIMA, DE OLIVEIRA MAIA & DE SOUZA BELO, 2020).

Apesar de não termos relatos de transmissão sexual de SARS-CoV-2, estudos detectaram SARS-CoV-2 no sêmen, e no sangue, via transfusão sanguínea, e mesmo sendo raros, existem estudos que demonstram a transmissão vertical de mãe para feto (ZHOU et al., 2022). A detecção dos vírus nas fezes e urina também pode ocorrer, implicando assim em outra forma de transmissão oral-fecal (JIN et al., 2020; LIU et al., 2020a; ZHOU et al., 2022). Relatos também mostram que adultos e idosos são mais susceptíveis a infecção, com uma leve predominância em homens (ABDULJALI & ABDULJALI, 2020; HU et al., 2021). Mesmo com poucas evidências, o grupo das crianças são menos afetadas e alguns pesquisadores inferem que além de vias respiratórias mais saudáveis, o sistema imune desenvolve tempestades de citocinas mais brandas (ABDULJALI & ABDULJALI, 2020).

Os sintomas podem ser brandos, com febre e tosse seca e/ou evoluir para pneumonia e SARS, e além disso, podem haver manifestações sistêmicas, acompanhadas de lesões no sistema digestório, neural, cardiovascular, renal (ZHOU et al., 2022) e até infecções generalizadas ou múltiplas síndromes de disfunção orgânica (MODS) (CASCELLA et al., 2020; JIN et al., 2020; PARASHAR et al., 2020; HU et al., 2021; MIAO et al., 2021; ZHOU et al., 2022). A recuperação é de 2 semanas para infecções mais leves e 3 a 6 semanas para mais graves, sendo que além de opacificações, que lembram

vidro fosco nos pulmões, o coração, o fígado e rins podem apresentar graves complicações, podendo ocasionar a morte do indivíduo (ABDULJALI & ABDULJALI, 2020; HU et al., 2021).

1.3- Aspectos moleculares de SARS-CoV-2: estrutura e respostas celulares à infecção

Assim como outros CoVs, os SARS-CoV-2 são esféricos, com cerca de 80-120 nm de diâmetro, com RNA de cadeia simples, envelopados em uma bicamada lipídica (YADAV et al., 2021), com senso positivo, de aproximadamente 30Kb (29.884 a 29.891 nucleotídeos), que codifica 9680 aminoácidos (FEHR & PERLMAN, 2015; ABDULJALI & ABDULJALI, 2020; ANDREWS et al., 2020; ZHAO et al., 2020; RAHIMI, MIRZAZADEH & TAVAKOLPOUR, 2021).

O RNA viral é composto por duas regiões não traduzidas, que flanqueiam as regiões de codificação do RNA (RAHIMI, MIRZAZADEH & TAVAKOLPOUR, 2021), a 5'-UTR, constituída por 265 nucleotídeos (CASCELLA et al., 2020) e a 3'-UTR, formada por 228 nucleotídeos (ZHAO et al., 2020; RAHIMI, MIRZAZADEH & TAVAKOLPOUR, 2021; YADAV, et al., 2021), seguida de uma cauda poli-A e relacionada com a replicação viral (Figura 3) (MIAO et al., 2021). Não possui o gene hemaglutinina-esterase que é detectado em alguns βCoVs (RAHIMI, MIRZAZADEH & TAVAKOLPOUR, 2021).

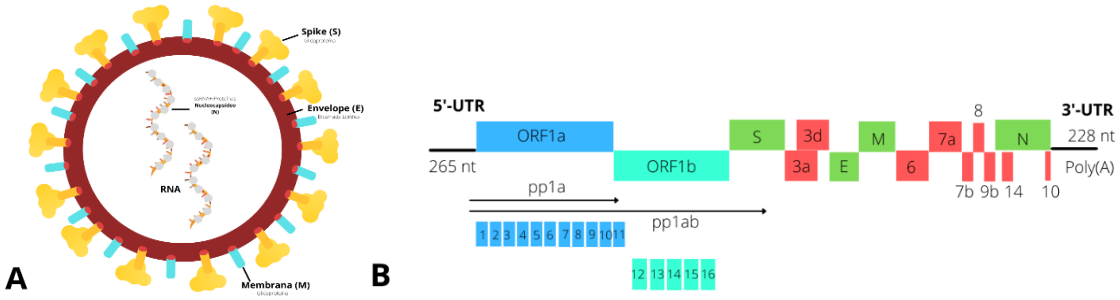

Figura 3: Representação esquemática da organização do genoma de RNA de SARS-CoV-2. A) Organização da estrutura viral. B) Representação da 5'-UTR, fase aberta de leitura com os genes estruturais e não estruturais e extremidade poliadenilada 3'-UTR. Adaptado de YADAV et al., 2021.

A maquinaria das células humanas é utilizada para realizar a tradução das sequências de fase aberta de leitura ou ORFS (do inglês, *open*

reading frame) que codificam 27 proteínas, sendo que a ORF1a e a ORF1b ocupam dois terços do genoma, 20kb (YADAV et al., 2021), apresentando a maior região de codificação das poliproteínas (pp1a/ab) e originando 16 proteínas não estruturais (nsp1-16) (FEHR & PERLMAN, 2015; CASCELLA et al., 2020). As nsp são responsáveis pelos primeiros eventos da infecção e são necessárias para a replicação, a transcrição e codificação das proteínas durante o processo de multiplicação viral (FEHR & PERLMAN, 2015; CASCELLA et al., 2020; MIAO et al., 2021). Dentre as várias funções das proteínas não estruturais, se destaca a nsp 1, primeira proteína produzida da ORF1ab com a capacidade de interromper a tradução do hospedeiro, bloqueando a subunidade menor 40S do ribossomo, e regular, de forma ainda investigada, a tradução viral (HUANG et al., 2011). Destaca-se também a nsp 12, uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) essencial para a transcrição e replicação viral (ZHAO et al., 2020).

A região restante de cerca de 10kb (YADAV et al., 2021) é compreendida por quatro genes que codificam proteínas estruturais, incluindo spike (S), envelope (E), membrana (M), proteínas do nucleocapsídeo (N), com funções relacionadas a transcrição do RNA (AHMAD et al., 2021) e responsáveis pela morfogênese do vírus (FEHR & PERLMAN, 2015; ANDREWS et al., 2020; CASCELLA et al., 2020; JIN et al., 2020; LI et al., 2020b ; SHEREEN et al., 2020; ZHAO et al., 2020; MIAO et al., 2021. As demais sequências ORFS codificam nove proteínas acessórias, envolvidas nas interações com as proteínas do hospedeiro (VANKADARI, JEYASANKAR & LOPES, 2020; YADAV et al., 2021), como ORF3a, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF 10 e ORF14 (ZHAO et al., 2020; RAHIMI, MIRZAZADEH & TAVAKOLPOUR, 2021; YADAV, et al., 2021).

Particularidades de SARS-CoV-2 são encontrados os genes da proteína S e ORF3b. A ORF3b acredita-se estar relacionada a patogênese viral (ABDULJALI & ABDULJALI, 2020). A proteína S estrutural glicosilada N-ligada transmembrana I (YADAV et al., 2021) por sua vez, é responsável pelo reconhecimento, ligação e entrada do vírus na célula hospedeira humana, por meio de interação com receptores da enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2) (ABDULJALI & ABDULJALI, 2020; JIN et al., 2020; YADAV et al., 2021). A proteína S de SARS-CoV-2 parece ter afinidade 10 a 20 vezes maior a ACE2

do que SARS-CoV (JIN et al., 2020; WRAPP et al., 2020), apresentando ainda consideráveis inserções de aminoácidos (HU et al., 2021).

Assim como para SARS-CoV, o domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês, *Receptor Binding Domain*) da proteína spike de SARS-CoV-2 utiliza os receptores da ACE2 das células epiteliais (WRAPP et al., 2020), para interagir e infectar as células (MOUSAVIZADEH & GHASEMI, 2021). Considerado como a parte mais variável do genoma de SARS-CoV-2, o RBD liga-se à proteína ACE2 humana (WRAPP et al., 2020), proteína de membrana tipo I amplamente expressa nos epitélios do trato respiratório superior (cavidade nasal e faringe), inferior e mucosa gastrointestinal com alta afinidade (JIN et al., 2020; TROTTEIN & SOKOL, 2020). Seis aminoácidos do RBD, demonstraram ser importantes na ligação aos receptores da ACE2 ao SARS-CoV, diferindo cinco desses seis resíduos entre SARS-CoV-2 (L455, F486, Q493, S494, N501 e Y505), e SARS-CoV (Y442, L472, N479, D480, T487 e Y4911) (ANDERSEN et al., 2020).

Considerando que a proteína S apresenta um papel crucial na interação e entrada do vírus na célula, a enzima Serino Protease Transmembranar 2 humana (TMPRSS2), altamente expressa nas células nasais, pulmões e ramos brônquicos (HU et al., 2021), cliva a proteína S entre as unidades S1 e S2, no sítio de ligação 682RRAR685, auxiliando a fusão do motivo de ligação RBD da subunidade S1 de SARS-CoV-2 com o receptor da ACE2 das células do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2020; KUMAR et al., 2020; YADAV et al., 2021), e uma modificação na unidade S2 em uma conformação pós-fusão mais estável (WRAPP et al., 2020; HU et al., 2021).

Outras proteases humanas também podem atuar na clivagem da proteína S, dentre elas a furina e a catepsina L (HU et al., 2021; YADAV et al., 2021). Tanto a furina, encontrada em processos patológicos, quanto outras proteases tem a capacidade de clivar entre a unidade S1 e S2 da proteína S, expondo assim o RBD e auxiliando na adesão e fusão vírus-célula, garantindo maior capacidade de acesso e interação com os receptores de ACE2, levando a liberação e infecção do citosol da célula do hospedeiro com o RNA viral (ALMEIDA et al., 2020; ANDERSEN et al., 2020; YADAV et al., 2021). O local de clivagem na proteína S do vírus pela furina, diferentemente de SARS-CoV e de

MERS-CoV, pode ser o responsável pela rápida disseminação de SARS-CoV-2 (GLOWACKA e al., 2010).

Seguinte a esta ligação, após a dissociação da proteína N dentro da célula, o vírus libera o seu genoma no citoplasma na forma de estruturas secundárias (ssRNA) (FEHR & PERLMAN, 2015; KADAM et al., 2021), então o RNA serve como mRNA que codifica duas ORFs, expressando duas poliproteínas, ppla e pplab, a partir da troca de quadro ribossômicos (FEHR & PERLMAN, 2015; YANG & LEIBOWITZ, 2015; HOFFMANN et al., 2020; SHEREEN et al., 2020; YADAV et al., 2021). A poliproteína ppla processa as proteínas não-estruturais (nsp 1-nsp 11). Em seguida ocorre uma ligação entre a nsp 1 expressa com a subunidade ribossomal 40S do hospedeiro, responsáveis pela síntese das proteínas dos vírus, ativando uma nuclease ainda não identificada e degradando os transcritos de RNA expressos e o mRNA endógeno do hospedeiro, ocasionando então uma forte inibição da síntese proteica do hospedeiro e, enquanto isso o RNA do vírus vai sendo traduzido (MIAO et al., 2021).

As outras proteínas não estruturais do CoV (nsp 12- nsp 16) se reúnem no complexo replicase- transcriptase (RTC) (YADAV et al., 2021) e são responsáveis pela replicação e transcrição de RNA e formação dos RNA sub-genômicos (FEHR & PERLMAN, 2015; YANG & LEIBOWITZ, 2015; SHEREEN et al., 2020). Após a replicação e a síntese dos RNAs sub-genômicos, a maioria das proteínas acessórias e as proteínas estruturais virais, S, E e M são traduzidas pelos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso (ER), enquanto que outras e a proteína N são sintetizadas por ribossomos citosólicos. Em seguida a montagem dos vírus ocorrem no Complexo de Golgi (CG) (YADAV et al., 2021). Nesta organela, os genomas virais são encapsulados pela proteína N, contendo proteínas estruturais e saem das membranas do CG sendo transportados para a superfície celular, liberados por exocitose e se espalhando por todo o organismo (PLANT & DINMAN, 2008; FEHR & PERLMAN, 2015; SHEREEN et al., 2020; YADAV et al., 2021).

Em suma, os processos de síntese de RNA dos CoVs, da sub-família Coronavirinae, ocorrem no citoplasma e são regulados por proteínas dos hospedeiros (BALDASSARRE et al., 2020). Apresentam um padrão único e

diferenciado da síntese de RNA, descontínua e contínua. Na síntese contínua ocorre a produção de RNA genômico, onde as fitas de RNA formam cópias para a geração de genomas dos descendentes (SOLA et al., 2015). Na transcrição descontínua são adicionadas cópias da sequência líder, localizada na 5'-UTR, seguida de uma sequência reguladora da transcrição, caracterizando como região essencial para a replicação do vírus (MOHAMMADI-DEHCHESHMEH et al., 2021). Os ribossomos dos hospedeiros humanos são os responsáveis pela síntese das proteínas dos vírus e estes mecanismos exatos, envolvidos na replicação e patogenicidade, ainda pouco compreendidos, são regulados pelas regiões não traduzidas, a 5'-UTR e 3'-UTR (MUKHERJEE & GOSWAMI, 2020; MIAO et al., 2021; MOHAMMADI-DEHCHESHMEH et al., 2021).

1.4- Aspectos estruturais e moleculares das regiões não traduzidas (UTRs) dos genomas dos Coronavírus (CoVs)

De acordo com CHEN & OLSTHOORN (2010), a região 5'-UTR dos coranavírus pertencentes ao gênero beta (βCoVs) possui cerca de 420 nucleotídeos e apresenta conservação em quatro *stem-loop* (SL), SL1, SL2, SL4 e SL5ABC (Figura 4). Análises funcionais em MHV (Vírus da Hepatite de Camundongo) e BCoV (Coronavírus bovino) indicaram que mutações no SL1 do vírus MHV podem levar a letalidade, destacando importância da região para a replicação do vírus da linhagem A (YANG & LEIBOWITZ, 2015). Entre os βCoVs, SL1 e SL2 apresentam conservações, com SL2 contendo a maior delas e direcionada para a síntese de RNA (MADHUGIRI et al., 2014).

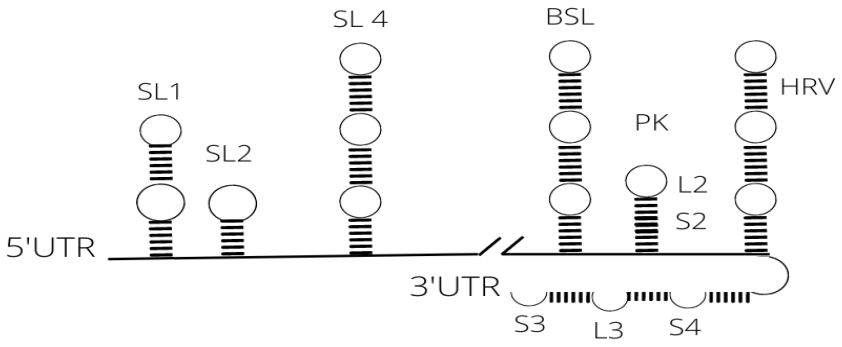

Figura 4: Modelo representativo das estruturas conservadas dos *stem-loops* (SL1, SL2, SL4) da região 5' e os *stem-loops* S3, L3 e S4 que flanqueiam os *stem-loops* S2 e L2, juntamente com o tronco abaulado (BSL), o pseudo-nó (PK) e a região hipervariável (HVR) da 3'-UTR dos Coronavírus. Adaptado de YANG & LEIBOWITZ, 2015.

O SL3 apresenta conservação em alguns βCoVs, tais como SARS-CoV (Linhagem B) e BCoV (Linhagem A), com estabilidade em HCoV-OC43 e em SARS-CoV, com *stem-loop* apresentando dobra da sequência reguladora da transcrição (TRS) líderes (TRS-L), com destaque na síntese de RNA subgenômico, diferentemente de MHV (Linhagem A) que não apresentou estabilidade a 37 ^{o}C (LIU et al., 2007; LIU & LEIBOWITZ, 2010). A TRS constitui assim em sequências sinais para a transcrição de RNA subgenômico (RANGAN, et al., 2020), exibindo uma sequência central variável (CS), variando de hexâmeros a octâmeros, dependente do tipo viral. A sequência CS de SARS-CoV é 5'-ACGAAC-3', diferindo dos demais pertencentes ao seu grupo dos βCoVs (ROTA et al., 2003).

O SL4 contém uma ORF curta (uORF), não essencial para a replicação, localizada antes da ORF1ab com função de atenuar a transcrição da região codificadora de proteínas (MADHUGIRI et al., 2014). SL5 apresenta envolvimento no empacotamento viral dos βCoVs, contém o códon de início AUG para ORF1ab, que codifica a poliproteína replicase / transcriptase viral, além de penta loops no SL5a e SL5b e um tetraloop no SL5c (CHEN & OLSTHOORN, 2010). Estudos de BROWN et al. (2007), descreveram que uma vez danificada a porção SL5C ocorrem falhas na replicação do vírus.

A 3'-UTR de CoVs possui cerca de 300-500 nucleotídeos seguida de uma cauda poli (A), sendo que em SARS-CoV-2 é constituída por 228 nucleotídeos (Figura 4) (YANG & LEIBOWITZ, 2015; HELMY et al., 2020; MUKHERJEE & GOSWAMI, 2020). Em MHV, uma sequência conservada de octanucleotídeos, 5'GGAAGAGC-3', não essencial para replicação, está localizada próxima a região hipervariável (HVR) relacionada a patogenicidade dos vírus (GOEBEL et al., 2007). Estudos de LIU et al. (2013) mostraram que as hastes S3 e S4 flanqueiam o stem *loop* S2-L2, sendo que a S3 estabiliza a região e é essencial para a replicação. Em SARS-CoV-2 contém vários domínios em *cis* para regulação da síntese de RNA e consequentemente a tradução (ZHAO et al., 2020). É constituído de um pseudo-nó e loop tronco, seguidos da HVR, ainda sem informação funcional. O motivo S2 é bem conservado nos CoVs e SARS-CoV-2, mas com função ainda desconhecida (RANGAN et al., 2020).

As pesquisas de HUSTON et al. (2021) indicaram a importância dos elementos estruturais conservados que exercem um papel de regulação da replicação do vírus. Em comparação com outros coronavírus, a região não traduzida 5’ do SARS-CoV-2 é mais estruturada quanto aos elementos secundários do que a 3’ (SANCHES et al., 2019; VANDELLI et al., 2020; MIAO et al., 2021), por possuir grandes quantidades de RNA de fita dupla (dsRNA), vindo a interagir com proteínas responsáveis por recrutar elementos transcricionais e pós-transcricionais do hospedeiro (VANDELLI et al., 2020). Após a entrada do vírus na célula humana, a 5’-UTR e a 3’-UTR são, desta forma, responsáveis pela regulação da transcrição e da replicação viral através de interações de RNA-RNA e ligação do RNA do vírus com proteínas do hospedeiro. Estudos já indicaram que existem mais de 100.000 interações entre proteínas humanas e o vírus (VANDELLI et al., 2020).

VERMA et al. (2021) demonstraram que de 57 proteínas do hospedeiro humano analisadas, 47 interagiram somente com a 5’-UTR, interferindo nos mecanismos das vias metabólicas do hospedeiro e recrutando estes elementos para atuar na transcrição e pós-transcrição, promovendo assim a replicação viral (VANDELLI et al., 2020). Destas 57 proteínas do hospedeiro envolvidas com a replicação e que interagem com as UTRs, 55 são expressas nas células epiteliais pulmonares e intestinais. Nestes mesmos epitélios, indivíduos infectados com SARS-CoV-2 tem elevados níveis expressos de ACE2, ressaltando que as proteínas expressas do hospedeiro pós-infecção podem ter papel essencial na replicação do vírus (VERMA et al., 2021).

Entre as proteínas do hospedeiro que interagem a 5’-UTR de SARS-CoV-2 estão as helicases dependentes de ATP com funções de RNA (*RNA helicase dead box* - DDX1 e DDX3X), *tyrosine-protein Kinase* (HCK), proteína quinase ativada por *Double Strand RNA* também conhecida como fator de iniciação de tradução de eucarioto afa quinase 2 (PKR ou EIF2AK2) e *polypyrimidine tract-binding protein 1* (PTBP1). Estas estão entre as proteínas que são recrutadas em nível transcricional e pós-transcricional nas células dos hospedeiros para atuar na replicação dos vírus (VANDELLI et al., 2020). Estudos demonstraram que a DDX1 atua na regulação da transcrição até o início da tradução, além de influenciar na replicação do RNA do vírus por meio de

interação com a proteína nsp14 do coronavírus (SQUEGLIA et al., 2020). Além de proteínas e microRNAs (miRNAs) do hospedeiro, algumas proteínas sintetizadas pelo vírus tem a capacidade de interação com a 5'-UTR nos CoVs, como N e nsp1, e na 3'-UTR, como nsp 8 e nsp 9 (LIU & LEIBOWITZ, 2010; YANG & LEIBOWITZ, 2015).

As proteínas codificadas por SARS-CoV-2 também podem interagir com proteínas de ligação a RNA (RBPs) humanas. Corroborando aos achados de SQUEGLIA et al. (2020), em seus estudos, SRIVASTAVA et al. (2020) demonstraram que proteínas expressas no pâncreas, tecidos gonadais e adrenais e células imunes atuam como reguladores pós-transcricionais de genes virais por interagirem com locais de ligação ao RNA de SARS-CoV-2. A formação de complexos de ribonucleoproteínas encontradas no citoplasma do hospederiro tem o papel de influenciar a tradução com o RNA poliadenilado do vírus, tais como a *polypyrimidine tract-binding protein 4* (PABP-4) e outras mais relacionadas ao *splicing* no núcleo das células hospedeiras, mas com função de interagir com o RNA de SARS-CoV-2 no citoplasma, que são *as heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* (hnRNPA1), PTBP, os fatores de *splicing* ricos em serina e arginina (SRSF7) e o homólogo alfa da proteína *Transformer-2* (TRA2A). Demonstraram ainda que assim como as proteínas, alguns miRNAs do hospedeiro tem capacidade de ligação ao genoma viral. A expressão exarcerbada de miRNAs em células imunes infectadas com SARS-CoV-2 caracteriza como uma justificativa para a célere progressão e consequentemente, regulação da doença no organismo humano (SRIVASTAVA et al., 2020). Estudos envolvendo o MHV mostraram algumas proteínas do hospedeiro interagindo com as regiões não traduzidas, como a proteína de ligação poli (A) (PABP) na cauda poli A e a proteína de ligação ao trato de polipirimidina (PTB) e a proteína ribonucleoproteína nuclear heterogênea (hnRNP) ligando a região 5'-UTR do MHV, se mostrando críticas para a transcrição e replicação (LIU & LEIBOWITZ, 2010).

Análises de MUKHERJEE & GOSWAMI (2020) identificaram 28 variantes das UTRs de SARS-CoV-2 e verificou-se que a capacidade de ligação de RBPs dos hospedeiros tais como CUG-BP (proteína de ligação à região rica em CUG), TARDBP (Proteína de Ligação ao DNA TAR), RBMS3 (Proteína 3 de

Interação de Fita Simples com Motivo de Ligação a RNA), HNRNPA1 (Ribonucleoproteína Nuclear Heterogênea A1) e SRSF5 (Fator de Splicing Rico em Serina e Arginina 5) ao genoma viral permaneceu inalterada frente às mutações nestas regiões regulatórias, demonstrando o papel importante de ligação de tais proteínas na manipulação da sua maquinaria e a do hospedeiro. Na 5', um sítio de ligação da proteína TARDBP foi formado mesmo após uma substituição da base "U" na posição 241, auxiliando na tradução de proteínas e possivelmente interferindo na infectividade do vírus. Em relação a 3', mesmo tendo um deslocamento de base, outra ligação não deixou de ocorrer, entre a proteína hnRNPA1 e a região 3'-UTR (MUKHERJEE & GOSWAMI, 2020).

1.5- Aspectos estruturais, moleculares e de interações da região 5'-UTR de SARS-CoV-2

Considerando que a replicação do RNA de SARS-CoV-2 requer a síntese de RNA viral de fita negativa, que serve como molde para a replicação do RNA genômico viral e transcrição do RNA de fita positiva subgenômica (V'KOVSKI et al., 2021) e apesar desse mecanismo de transcrição viral ser pouco compreendido, sabe-se que os mRNAs subgenômicos sem a sequência líder presentes na região 5'-UTR, em SARS-CoV, não são capazes de se replicar (SAWICKI, SAWICKI & SIDDELL, 2007), fator importante na busca por estratégias de inibição da replicação viral (BALDASSARRE et al., 2020).

Com uma semelhança de 88,76% na região 5'-UTR de SARS-CoV e SARS-CoV-2, existe também uma alta conservação dos primeiros 90 nucleotídeos da sequência líder, como também na sequência reguladora da transcrição, localizada entre o 40º e 85º nucleotídeo (BALDASSARRE et al., 2020), apresentando no 56º nucleotídeo a região crucial de início da transcrição (Figura 5) (BRIAN & BARIC, 2005).

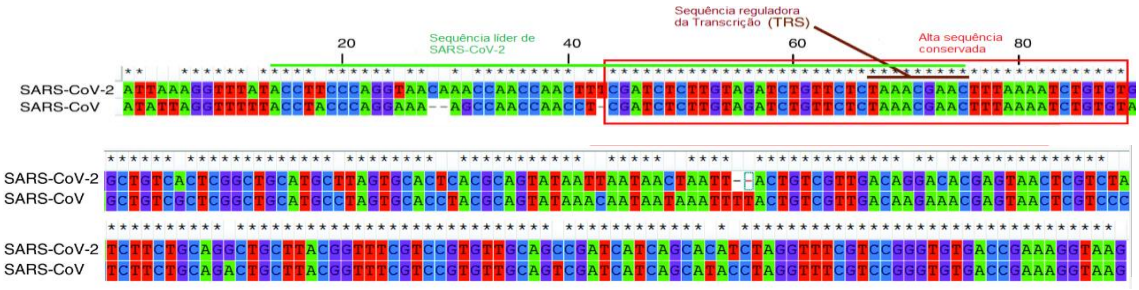

Figura 5: Semelhança entre as sequências líderes e a alta conservação da Sequência Regulatória da Transcrição (TRS) na região 5'-UTR entre SARS-CoV e SARS-CoV-2. Adaptado de BALDASSARRE et al., 2020.

De acordo com a sequência de referência de Wuhan (HELMY et al., 2020; MUKHERJEE & GOSWAMI, 2020), o comprimento da região 5'-UTR é de 265 nucleotídeos. Formada pelos *stem-loop* SL1 a SL5 (WACKER et al., 2020; RANGAN et al., 2021), e o SL4.5, localizado entre o SL4 e o SL5, que pode estar relacionado com o início da tradução das proteínas virais (Figura 6) (WACKER et al., 2020; MIAO et al., 2021).

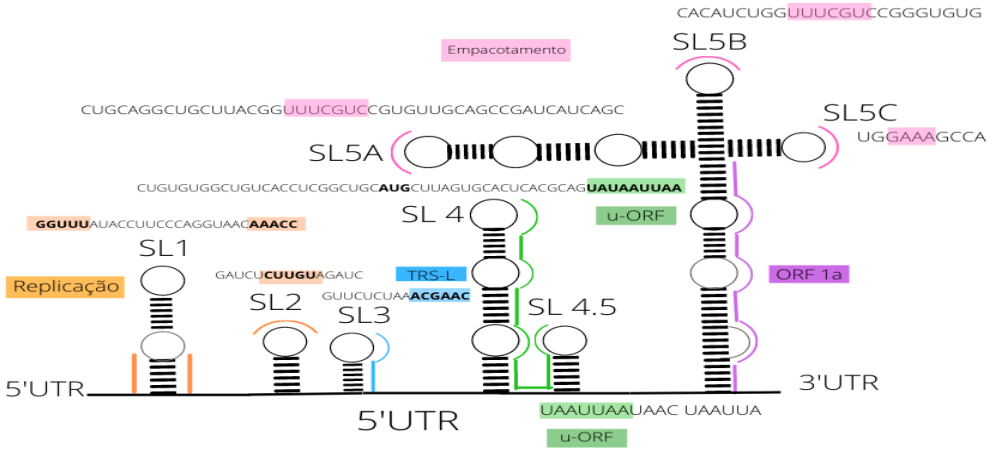

Figura 6: Modelo representativo das estruturas funcionais dos *stem-loops* (SL1, SL2, SL3, SL4, SL4.5 e SL5) da região 5'-UTR de SARS-CoV-2. Adaptado de RANGAN et al., 2021.

O SL1 está localizado próximo a extremidade 5', abrange os nucleotídeos 7-33 (WACKER et al., 2020), apresenta instabilidade pela alta proporção de bases AU e UA (RANGAN et al., 2020; MIAO et al., 2021) e não é conservada em variantes de SARS-CoV-2. Este *stem-loop* é estabilizado por um par de bases GC para facilitar a transcrição viral (WACKER et al., 2020). Possui dois nucleotídeos, AC, na porção média de SL1, indicando baixa eficiência para a replicação do vírus (MIAO et al., 2021), embora os estudos de YANG &

LEIBOWITZ, (2015) mostraram que mutações no SL1 do vírus MHV induzem a letalidade e tem importância na replicação do vírus. Em SARS-CoV a interação de SL1 com nsp 1 tem papel na proteção do RNA na degradação viral (TANAKA et al., 2012).

O SL2 abrange os nucleotídeos 45-59 (WACKER et al., 2020), segundo YANG & LEIBOWITZ (2015); RANGAN et al. (2020) apresenta a maior conservação das estruturas em CoVs e em βCoVs, respectivamente. Em SARS-CoV-2 a estrutura em forma de gancho (CUUGU), semelhante a SL3 de BCoV, tem um motivo em forma de U, denominada tetra-*loop*, com destaque no papel com a replicação do vírus (LIU et al., 2007), possuindo o C50 e G53 pouco acessíveis, mas o U54 com elevada acessibilidade envolvido no complexo de replicação (LIU et al., 2009) seguindo os estudos de LIU et al. (2007), este loop tem importância na replicação do βCoV MHV, em camundongos.

O SL3 abrange os nucleotídeos 61-65 (WACKER et al., 2020), possui uma sequência líder (TRS-L) (5'-ACGAAAC-3') (CHEN e OLSTHOORN, 2010), de forma semelhante aos βCoVs, BCoV e SARS-CoV (LIU et al., 2007; YANG et al., 2015; RANGAN et al., 2020), funcionando como sinal para a transcrição de mRNAs subgenômicos (LIU & LEIBOWITZ, 2010; MADHUGIRI et al., 2018). SL4 abrange os nucleotídeos 86-125 (WACKER et al., 2020), apresenta conservação nos CoVs e βCoVs com um códon inicial de uORF, que se sobrepõe até SL4.5, com poucas evidências de tradução nessa região (CHEN & OLSTHOORN, 2010), mesmo sendo modificada, a uORF produz vírus viáveis (WU et al., 2014). A conservação da uORF pode caracterizar como região regulatória e que possa ser traduzida pelo ribossomo do hospedeiro (Figura 7) (ORR et al., 2020).

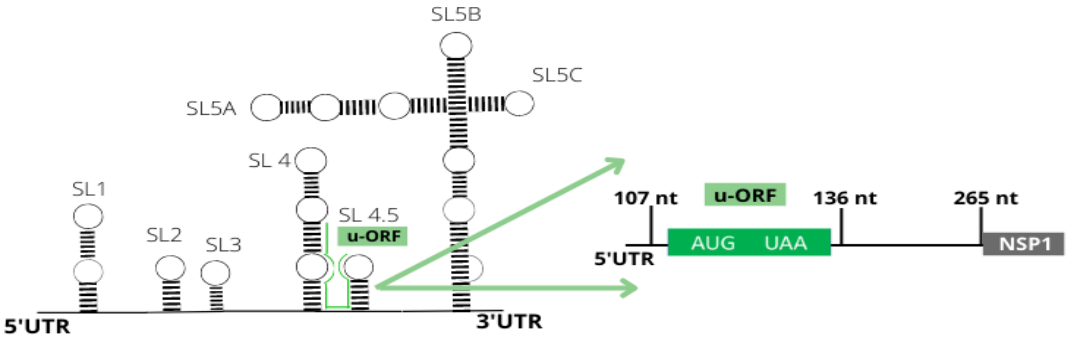

Figura 7: Representação da posição da uORF na região 5'-UTR de SARS-CoV-2 e da sequência da nsp 1. Adaptado de WACKER et al., 2020.

Anteriormente, BABENDURE et al. (2006) já haviam demonstrado que *stem-loops* estáveis da 5'-UTR de CoVs tem a capacidade de modular a eficiência da iniciação da tradução. Nesse sentido, pesquisas são essenciais para entender o mecanismo de iniciação da tradução viral determinada pelas estruturas secundárias da região 5'-UTR de CoVs e consequentemente de SARS-CoV-2 (MIAO et al., 2021).

O *stem-loop* SL5 abrange os nucleotídeos 149-294 (WACKER et al., 2020), assim como em todos CoVs, é formado por SL5a, SL5b e SL5c, apresenta estabilidade e está relacionado com o empacotamento de RNA (RANGAN et al., 2021), mas o mecanismo utilizado pelas estruturas em relação a tradução da poliproteína a ainda é desconhecido, já que o códon de início AUG de nsp1 está localizado no SL5. O hairpin SL5a contém 10 pares de bases GC, caracterizando a sua estabilidade em condições de desnaturação (MIAO et al., 2021). O domínio SARS-CoV-2 SL5 tem características comuns com o domínio em outros betacoronavírus do grupo IIb, por exemplo, incluindo pentaloops UUCGU em SL5a e SL5b e um tetraloop GAAA em SL5c (RANGAN et al., 2020).

Estudos sobre os elementos estruturais e mutações de SARS-CoV-2 podem estar relacionadas com a rapidez de transmissão ao hospedeiro, sendo que as regiões estruturais com maior estabilidade e/ou conservação podem contribuir com diagnósticos e terapias futuras.

1.6- Variantes de SARS-CoV-2

Com o alto número de infecções, estudos realizados por TANG et al. (2020) identificaram variantes iniciais a partir das análises de 103 genomas de SARS-CoV-2, as 'S' e 'L', com diferencial quanto a mutações nas posições genômicas, de 8.782 (ORF 1ab) e 28.144 nucleotídeos (ORF 8), respectivamente, sendo que em janeiro de 2020 o tipo 'L' foi o prevalente. KIM et al. (2020), por alinhamento de várias sequências indicaram três clados, determinados por mutações, S (L84S/ ORF8), V (G251V/ ORF3a) e G (D614G /S), além de várias outras mutações em ORF1a, ORF1b e N. A partir de sequências do genoma de SARS-CoV-2, KHAILANY, SAFDAR & OZASLAN (2020) mostraram mutações na ORF1ab, no gene ORF8 e no gene N.

Sucessivas mutações e vários processos de recombinações tem sido encontrada em SARS-CoV-2, o que exige estudos criteriosos sobre a transmissibilidade do vírus e que possam colaborar com a terapêutica e vacinação já obtidos (ABDULJALI & ABDULJALI, 2020; CASCELLA et al., 2020). As mutações são características dos vírus e novas linhagens eram esperadas desde o surgimento da pandemia, algumas com capacidade de prejudicar o vírus e outras facilitam a propagação e patogenicidade. Nesse sentido, monitorar tais variantes podem identificar disseminações virais e/ou alterações que alterem a sensibilidade aos testes de diagnóstico ou a efetividade das vacinas (FREITAS, GIOVANETTI & ALCANTARA, 2021).

Nesse sentido e de acordo com a OMS, até a data de 22/06/21 foram identificadas quatro variantes preocupantes, *variant of concern* (VOCs), apresentando de oito a dez mutações nos domínios da proteína S, e denominadas Alfa, Beta, Gama e Delta, sendo a Beta a responsável pela segunda onda mortal de COVID-19 em abril de 2021 na Índia (CASCELLA et al., 2020).

Em 20 de setembro de 2020 as variantes trouxeram sérias preocupações quanto a capacidade de transmissibilidade. Foram identificadas duas cepas emergentes e independentes, com a variante Alfa, do Reino Unido (B.1.1.7) (VOLOCH et al., 2021; ZHOU et al., 2022) e a variante Beta, da África do Sul (B.1.351) contendo cada uma delas oito substituições de aminoácidos na proteína S, com a mutação N501Y semelhante detectadas nas duas variantes (TEGALLY et al., 2020).

No Brasil, duas variantes, B.1.1.33 e B.1.1.28, foram detectadas em vários estados do país em fevereiro de 2021. A Gama P1, B.1.1.28.1, foi identificada em cidades japonesas por indivíduos procedentes do Amazonas (NAVECA et al., 2021; VOLOCH et al., 2021). A variante P.2, também denominada B.1.1.28.2, foi detectada em outubro de 2020 no Rio de Janeiro e até fevereiro de 2021 correspondeu, juntamente com a P1, a 75% das linhagens sequenciadas no Brasil (FREITAS, GIOVANETTI & ALCANTARA, 2021).

De acordo com PAPANIKOLAOU et al. (2022) outra variante, a Omicron (B.1.1529), foi detectada em 26/11/21. O sequenciamento genético demonstrou um conjunto de deleções, inserções e substituições no genoma de

SARS-CoV-2 resultando em alterações nos aminoácidos, com modificações principalmente em regiões da proteína S (S1/RBD e S2). Estas mutações foram entendidas como ajustes desenvolvidos pelo vírus em consequência do avanço das vacinas e a maneira encontrada por eles para continuar a se propagar e elevar a patogenicidade. O impacto desta variante sobre a morbimortalidade ainda está sob investigação, apesar das taxas de infectividade e reinfecção serem elevadas. Pesquisas atuais mostraram que o vírus evoluiu para mais de 800 subtipos, com mais de 1000 variantes (ZHOU et al., 2022).

1.7- Diagnóstico e terapias

A OMS disponibiliza vários protocolos do diagnóstico para SARS-CoV-2 (WHO, 2020a) a partir da coleta de amostras do trato respiratório superior e inferior, armazenamento em laboratório até à amplificação do material genético, que é realizado através da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), padrão ouro para detecção do vírus, envolvendo a síntese das moléculas de DNA a partir de um molde de RNA (CASCELLA et al., 2020; CHAN et al., 2020; HELMY et al., 2020).

O CDC (Centro de Controle de Prevenção de Doenças dos EUA), (2020) indicou que amostras de líquido de lavagem broncoalveolar tem resultados positivos em 93% em comparação com outras amostras, tais como: escarro (72%), esfregaço nasal (63%), esfregaço faríngeo (32%) e fezes (29%) (WANG, et al., 2020). Exames laboratoriais podem ser realizados, indicando possíveis alterações nos linfócitos, na coagulação, nas enzimas hepáticas, LDH, do inglês *Lactate DeHydrogenase* (Desidrogenase Láctica), enzimas musculares, proteínas C-reativas, linfopenia, dímero D e tomografias dos pulmões (CASCELLA et al., 2020; HU et al., 2021).

Além deste diagnóstico, concomitamente, foram desenvolvidos testes de detecção de ácidos nucleicos e a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou kits fluorescentes e sistemas de sequenciamento (JIN et al., 2020). Muitas técnicas vêm sendo desenvolvidas e melhoradas para corroborar com o diagnóstico da COVID-19, como por exemplo, a investigação de KUDO et al. (2020), em um ensaio RT-qPCR multiplex para detectar SARS-CoV-2, com conjuntos de primers e sondas N1, N2 e RP existentes no CDC, com substituição

dos fluoróforos (FAM, HEX e fluoróforos Cy5) para permitir a multiplexação do ensaio, como alternativa para a detecção de SARS-CoV-2, detectando satisfatoriamente 2 segmentos gênicos.

PETRILLO et al. (2020) e LUCAS et al. (2022) realizaram a comparação de ensaio singleplex e multiplex, onde amostras de RNA de pacientes positivos para SARS-CoV-2 foram analisadas com os dois métodos, avaliando as duas regiões-alvo virais, N1, N2 e o gene humano RNase P, incluído como controle interno, com sensibilidade comparada entre ambos os métodos. ZHEN E BERRY (2020) desenvolveram ensaios comparativos entre um teste RT-PCR multiplex por PCR em tempo real para detecção de SARS-CoV-2 no Laboratório do Northwell Health Laboratories (NWHL LDT). Obtiveram uma detecção específica de SARS-CoV-2 em amostras, sendo mais rápido, eficiente e econômico em comparação com o ensaio CDC modificado. DHARAVATH et al. (2020), compararam a detecção baseada em qRT-PCR de SARS-CoV-2 usando sondas SYBR Green I e Taqman. O protocolo baseado em sonda TaqMan pode detectar até 15 cópias de moléculas de RNA viral / reação.

Entre outras técnicas moleculares, a LAMP (Amplificação Isotérmica mediada por *Loop*) foi desenvolvida por YAN et al. (2020) para detecção de SARS-CoV-2 em indivíduos com COVID-19. Foram projetados cinco conjuntos de primers para avaliação da sensibilidade e especificidade que ficaram próximas de 100%.

Quanto à terapia, ainda não existem medicamentos seguros para o controle de SARS-CoV-2, tendo-se alguns compostos testados em síndromes anteriores com possível redirecionamento de drogas, que vão desde a utilização dos efeitos sinérgicos do IFN-α leucocítico com ribavirina e IFN-β com ribavirina contra a replicação do SARS-CoV, utilização de anticorpo monoclonal (mAb) para a neutralização do SARS-CoV, inibição da formação de sincícios entre células que expressam a proteína S e aquelas que expressam o receptor ACE2 do SARS-CoV-2 (SHEREEN et al., 2020; YADAV et al., 2021; ZHOU et al., 2022). Estudos sugerem que o mesilato de camostat inibe a clivagem da proteína S do vírus pela TMPRSS2, evitando assim a ligação do motivo RBD com a ACE2 das células hospedeiras (ZHOU et al., 2022).

Até outubro de 2020 haviam 405 drogas em desenvolvimento e 318 utilizadas em testes clínicos em humanos (HU et al., 2021). Dentre elas, o anti-inflamatório Tocilizumabe mostrou resultado aceitável na melhoria dos sintomas dos pacientes infectados (RAHIMI, MIRZAZADEH & TAVAKOLPOUR, 2021). Outras drogas vêm sendo empregadas para reduzir a carga viral, sendo que o remdesivir mostrou-se promissor (CASCELLA et al., 2020; RAHIMI, MIRZAZADEH & TAVAKOLPOUR, 2021), aprovado pela FDA para uso emergencial em casos graves (SENGER et al., 2020). O remdesivir em associação com a cloroquina ou o interferon-beta bloquearam significativamente a replicação de SARS-CoV-2 (RAHIMI, MIRZAZADEH & TAVAKOLPOUR, 2021).

A partir de testagens contra HIV, SARS-CoV e MERS-CoV, o composto Lopinavir/ritonavir apresentaram destaque (SENGER et al., 2020) e o nelfinavir foram recomendados para COVID-19. A cloroquina apresentou-se como potencial inibidor em SARS-CoV por interferir na ligação com a ACE2 e poderia inibir a replicação em SARS-CoV-2, *in vitro* (JIN et al., 2020), mas atualmente nenhum consenso foi obtido sobre sua eficácia no tratamento contra a COVID-19 (HU et al., 2021).

Mesmo desconhecida a segurança dos anti-virais, estão sendo testados: Arbidol, Nafamostat, Nitazoxanida, Ribavirina, Penciclovir, Favipiravir, Ritonavir, inibidor da AAK1 (*Adaptor-associated protein kinase 1*) e Baricitinibe, exibindo resultados moderados em testes, *in vitro*, (SHEREEN et al., 2020), com destaque para o Arbidol (umifenovir), já utilizado em outras infecções respiratórias e com resultados satisfatórios em evitar a fusão do vírus a célula hospedeira (HU et al., 2021; ZHOU et al., 2022), juntamente com Bictegravir, Dolutegravir e Tizoxanida, pequenas moléculas inibidoras, com alta capacidade de se ligarem a proteína S do vírus (ZHOU et al., 2022).

Em Xangai, o plasma sanguíneo de pacientes recuperados da COVID-19 foi isolado e injetado em pacientes infectados, apresentando resultados satisfatórios, mas com a possibilidade de efeitos adversos, como infecções e reações alérgicas (HU et al., 2021). Outras terapias envolvendo plasma de indivíduos, convalescentes e já recuperados, estão sendo testados pelo uso dos anticorpos policlonais para auxiliar na neutralização do vírus,

através de múltiplos mecanismos imunológicos, ou ao menos na tentativa de diminuir a viremia e período de hospitalização (YADAV et al., 2021).

A proteína S representa um alvo para a neutralização mediada por anticorpos para o bloqueio da ligação com a proteína ACE2 e/ou o desenvolvimento de vacinas (CASCELLA et al., 2020), mas tais estratégias precisam ser melhor avaliadas (HU et al., 2021). Nesse sentido, identificou-se que o mAb CR3022 tem a capacidade de se ligar ao RBD da proteína S de SARS-CoV-2, destacando-se como potencial terapêutico para tratamento de COVID-19 (JIN et al., 2020; SHEREEN et al., 2020), no entanto, o alto custo e a limitação da produção podem restringir tal terapia (HU et al., 2021). Receptores dos hospedeiros humanos vêm sendo investigados, incluindo a ACE2, a TMPRSS2, o agrupamento de diferenciação 147 (CD147), o receptor de tirosina-proteína quinase OVNI (AXL) e cadeia pesada de miosina IIA não muscular (MYH9), como alvos promissores no combate a COVID-19 (ZHOU et al., 2022).

Outra perspectiva, seria o mapeamento dos genes do SARS-CoV-2 para a compreensão das suas estruturas, mutações e sequências nucleotídicas. Com esse objetivo, o banco de dados internacional do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI/GenBank) vem depositando sequências de SARS-CoV-2 para auxiliar na compreensão da estrutura genômica e desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas (CASCELLA et al., 2020).

A partir de várias plataformas de desenvolvimento das vacinas, utilizando vetores recombinantes, DNA, mRNA em nanopartículas, vírus inativados, vírus atenuados e subunidades de proteínas (CASCELLA et al., 2020; HU et al., 2021; ZHOU et al., 2022), no final de 2019, as vacinas que mais apresentaram avanços foram desenvolvidas pela Universidade de Oxford associada à farmacêutica britânica AstraZeneca e a desenvolvida pela empresa chinesa Sinovac, posteriormente produzidas no Brasil pelo Bio-Manguinhos, na Fiocruz, e pelo Instituto Butantã, em São Paulo.

Em setembro de 2020, 27 vacinas estavam na fase 1, 15 na fase 2, nove na fase 3 e cinco foram aprovadas para uso limitado, mas nenhuma aprovação foi concedida pela FDA/Estados Unidos. Em outubro de 2020, 174 vacinas formam descritas para atuar contra a COVID-19 e 51 estavam em

ensaios clínicos (HU et al., 2021). Em 30 de março de 2021 12 vacinas foram autorizadas/aprovadas, 38% delas de vírus inativados e cerca de 58 em várias fases de testes (YADAV et al., 2021), sendo duas vacinas de RNA (a Pfizer–BioNTech e a Moderna), quatro inativadas convencionais (BBIBP-CorV, CoronaVac, Covaxin e CoviVac), quatro de vetor viral (Sputnik V, a Oxford–AstraZeneca, a Convidecia e a Janssen da Johnson & Johnson) e duas de subunidade proteica (EpiVacCorona e RBD-Dimer). Até abril de 2022, segundo ZHOU et al. (2022) foram desenvolvidas mais de 322 vacinas em diferentes estágios pré-clínicos (Fase 1 a 4) registradas.

Outros métodos vêm para contribuir com o diagnóstico e a terapêutica causada pela COVID-19 (GUIMARÃES, 2020). A busca por avanços nos diagnósticos, técnicas mais sensíveis, com diminuição dos custos e melhorias no tratamento da COVID-19 poderão auxiliar na queda da disseminação do vírus da atual e possíveis futuras pandemias.

Nesse sentido, técnicas da biologia molecular tais como a PCR e suas variações, eletroforese e *dot-blot,* sequenciamento e da química combinatória (QC) pelo uso do método do SELEX poderão auxiliar na avaliação da interação entre os ligantes selecionados a um alvo, pela caracterização e isolamento de potenciais aptâmeros ligantes a importantes regiões regulatórias do vírus SARS-CoV-2, usadas como ferramentas teranósticas alternativas.

1.8- SELEX genômico

A QC representa uma grande ferramenta que vem sendo utilizada para o desenvolvimento de novas tecnologias com enfoque na investigação de novas moléculas com aplicações voltadas a novos materiais e alvos terapêuticos. Técnicas envolvendo variadas plataformas teranósticas vem sendo aplicadas para fins de diagnóstico e tratamento de doenças envolvendo uma classe de moléculas denominadas aptâmeros (STOLTENBURG, REINEMANN, & STREHLITZ, 2007).

Uma das classes de macromoléculas que podem ser aplicadas são os ácidos nucleicos, pois tem a capacidade de se dobrar em diferentes estruturas secundárias e terciárias, podendo circundar totalmente um alvo e ainda, por técnicas moleculares, podem ser ampliados por síntese enzimática

(STOLTENBURG, REINEMANN & STREHLITZ, 2007). Uma das técnicas para o desenvolvimento dos aptâmeros é o SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) genômico, que consiste na seleção de ligantes específicos a uma molécula alvo, que podem ser peptídeos, íons ou até células, por interação com bibliotecas combinatórias de oligonucleotídeos (Figura 8) (ULRICH & WRENGER, 2009).

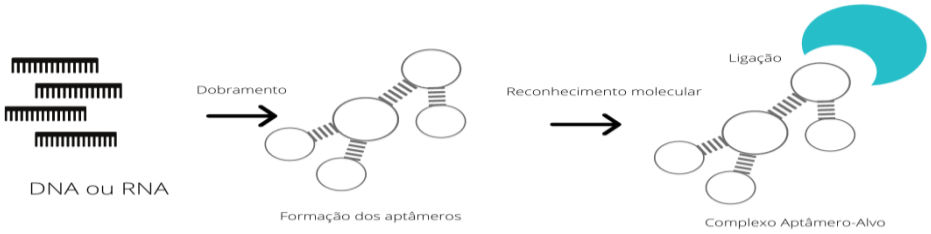

Figura 8: Esquema ilustrativo da funcionalidade dos aptâmeros. Fonte: Adaptado de WANG et al., 2016.

Na década de 90 três grupos de pesquisadores descreveram métodos de seleção para a obtenção de ácidos nucleicos, *in vitro*. TUERK & GOLD (1990) buscaram compreender como seria a interação ácido nucléico-proteína a partir de vários sítios de ligação das moléculas. ELLINGTON & SZOSTACK (1990), avaliaram a capacidade de moléculas de RNA de se ligarem especificamente a outras pequenas moléculas, ambos utilizando aptâmeros de RNA não modificados. ROBERTSON & JOYCE (1990) descreveram RNAs que apresentaram atividade catalítica (aptazimas) através da seleção, *in vitro*.

As interações entre os oligonucleotídeos e as moléculas de DNA ou RNA baseiam-se na formação de sítios de ligação específicos aos alvos determinados, podendo ser bem pequenos, e tais ligações ocorrem por interações de Van der Waals entre as cadeias de açúcar e grupamento fostato, interações eletrostáticas entre grupos carregados, interações de emparelhamento entre compostos aromáticos das bases dos aptâmeros, complementaridade de bases e ligações de hidrogênio entre os aminoácidos do alvo e a cadeia do aptâmero (HERMANN & PATEL, 2000), assim através de sínteses químicas podem ser feitas mudanças conformacionais para elevar a especificidade e a capacidade de resistência contra a degradação (DHIMAN et al., 2017), permitindo adaptação e obtenção de uma estrutura tridimensional ao alvo, o chamado complexo alvo-aptâmero (HERMANN & PATEL, 2000).

Nesse sentido, os aptâmeros vem sendo considerados como moléculas com alta afinidade e especificidade a um alvo selecionado, capaz de formar estruturas tridimensionais, de se dobrar e se ligar a proteínas, carboidratos, células inteiras e até íons (HERMANN & PATEL, 2000), também sendo explorados como ferramentas envolvendo ensaios teranósticos e como biossensores (STOLTENBURG, REINEMANN & STREHLITZ, 2007; PARASHAR et al., 2020; SONG et al., 2020) e reconhecimento de patógenos de origem alimentar, como *Streptococcus* spp., *Listeria monocytogenes* , *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Vibrio parahaemolyticus, Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa* (KOLM et al., 2020).

Diferentemente das especificidades dos anticorpos e proteínas, os aptâmeros podem ser facilmente sintetizados, *in vitro,* e conjugados a moléculas terapêuticas (MAGALHÃES, et al. 2012). Apresentam tamanho pequeno (~2nm) em comparação aos anticorpos (~15nm), e tal característica permite uma maior capacidade de ligação a alvos menores (BANERJEE & NILSEN-HAMILTON, 2019). O termo aptâmero advém da palavra latina “aptus” que significa encaixe e “meros” que vem do grego que significa partícula (ELLINGTON & SZOSTAK, 1990).

Aptâmeros são pequenos fragmentos de oligonucleotídeos de cadeia simples (ssDNA ou RNA) funcionais de 10-100 nucleotídeos de comprimento, que apresentam aplicabilidades em situações emergentes, com alta especificidade e seletividade de ligação ao alvo, que incluem proteínas, carboidratos, antibióticos, ácidos nucleicos ou células e são responsáveis pelas interações intramoleculares (STOLTENBURG, REINEMANN &STREHLITZ, 2007; KANWAR et al., 2010), podendo ser facilmente internalizados nas células através da conjugação a componentes terapêuticos (MAGALHÃES, et al., 2012; PARASHAR et al., 2020).

Pela capacidade dos aptâmeros formarem uma estrutura tridimensional estável, com a capacidade de serem comparados a anticorpos, devido às suas especificidades, podem então exibir várias vantagens, que vão desde a sua produção, que pode ser elaborada, *in vitro*, e na possibilidade de introdução dos mesmos ao compartimento interno das células por transfecção a uma variedade de frações terapêuticas, para fins de aplicação em doenças

infecciosas (MIYAZAKI & FUJITA, 2012). De acordo YOON & ROSSI (2018), os aptâmeros reconhem os epítopos das estruturas intracelulares e a forma como podem ser internalizados depende do alvo, mas normalmente ocorre por endocitose ou macropinocitose. Após a internalização, a maioria dos aptâmeros são transportados para endossomos, lisossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndrias e autofagossomos.

Os aptâmeros podem ser modificados, *in vitro*, independendentes de linhagens celulares, e sem perda da funcionalidade, além da possibilidade da técnica SELEX ser modificada de acordo com o objetivo da seleção dos aptâmeros. Vários ciclos repetitivos do SELEX, conhecidos por *rounds* e podendo variar de 6 a 20, exigem o uso inicial de uma biblioteca de RNA ou DNA e uso da PCR resulta a seleção de aptâmeros, com capacidade de interação específica com a molécula alvo (STOLTENBURG, REINEMANN & STREHLITZ, 2007).

A PCR foi descrita por Kary Mullis na década de 80 e é imprescindível nas investigações da medicina forense e até na realização de diagnósticos voltados a enfermidades. Consiste na amplificação, *in vitro,* de sequências de DNA ou RNA, na presença da enzima DNA polimerase, a partir de um substrato com desoxiribonucleotídeos (dNTPs). São necessários dois *primers* (oligonucleotídeos), na PCR simétrica, iniciadores da reação, sintéticos e complementares as extremidades 5’ e 3’ do fragmento de amplificação gerando uma região estendida de DNA de fita dupla (ŚPIBIDA et al., 2017).

Na técnica de PCR, a fita de DNA é desnaturada em temperaturas elevadas, em seguida em temperaturas mais baixas ocorre a hibridação do DNA com os *primers* e no final do processo a enzima DNA Polimerase (ZHU et al., 2020a), isolada da bactéria *Thermus aquaticus* e que não é afetada por altas temperaturas, adiciona os desoxiribonucleotídeos (dNTPs), possibilitando a extensão da fita e amplificação do fragmento de interesse (ŚPIBIDA et al., 2017; ZHU et al., 2020a).

Uma das estratégias de produção de ssDNA, a partir de dsDNA, segundo CITARTAN et al. (2012) é considerada como uma etapa essencial e dependente na elaboração do SELEX, envolvendo moléculas de DNA. Esta é uma das variações da PCR e é denominada de PCR assimétrica, onde podem

ser utilizadas concentrações desiguais de *primers* na reação ou até um único iniciador de reação, recurso indicado para obtenção de DNA de fita simples de boa qualidade na geração de aptâmeros de DNA.

Os protocolos do SELEX são definidos de acordo com as condições do alvo, da biblioteca e aplicabilidade dos alvos selecionados. O método se inicia com a construção de uma biblioteca de oligonucleotídeos sintéticos, que se for voltado para a seleção de aptâmeros de DNA não exige nenhum pré-tratamento, diferentemente de aptâmeros de RNA que necessitam de uma modificação para cDNA, e consiste de uma variedade de 10^{15} fragmentos de *pool* de ssDNA sintéticos e aleatórios, incubados diretamente com o alvo em repetidas etapas de seleção (Figura 9) (STOLTENBURG, REINEMANN & STREHLITZ, 2007).

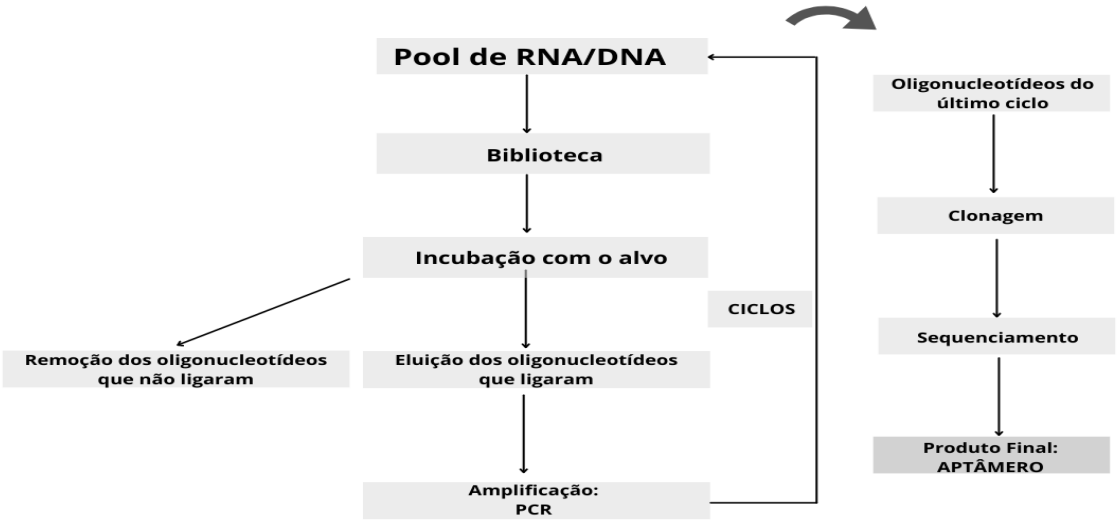

Figura 9: Diagrama representativo da Metodologia SELEX. Fonte: Adaptado de SANTOS, 2014.

Nesse sentido, no primeiro *round* a biblioteca de oligonucleotídeos de fita simples produzida é incubada com o alvo, os oligonucleotídeos não ligados são removidos por etapas de lavagem e os que permaneceram ligados ao alvo (Complexo Aptâmero/Alvo) são eluídos e logo após são realizados o enriquecimento dos oligonucleotídeos, ou seja, amplificações por PCR simétrica e assimétrica, seguidas de purificação, para serem utilizados novamente em cada *round* para obtenção dos oligonucleotídeos selecionados. Após a seleção, os aptâmeros ligantes e com maior afinidade são amplificados para serem sequenciados (STOLTENBURG, REINEMANN & STREHLITZ, 2007).

1.9- Aptâmeros em doenças infecciosas

Uma vez que os aptâmeros são selecionados e identificados, podem ser sintetizados, e serem facilmente modificados por vias químicas através de alterações iônicas e de pH. Podem ter fins diagnósticos e/ou terapêuticos, que vão por exemplo desde a inibição de entrada e replicação do vírus HIV (BANERJEE & NILSEN-HAMILTON, 2019), ligantes específicos na detecção dos patógenos*T. cruzi, Plasmodium* e *Leishmania, Salmonella* e até no desenvolvimento de biomarcadores para diagnóstico de doenças no sangue (LI et al., 2020a). O tamanho reduzido e a possibilidade de identificação por plataformas de sensores trazem uma infinidade de aplicações voltadas a teranóstica, como soluções promissoras para identificação de patógenos, principalmente de doenças que precisam de diagnósticos rápidos e de dispositivos fáceis de manipulação (BANERJEE & NILSEN-HAMILTON, 2019).

Algumas técnicas de seleção baseada em aptâmeros de RNA foram utilizadas para identificação de células inteiras, se ligando a marcadores de antígenos de membrana da próstata, do inglês, *Prostate Specific Membrane Antigen* (PSMA), (MAGALHÃES et al., 2012). Aptâmeros virais foram utilizados para inibir a infecção viral na replicação do *Human Immunodeficiency Virus* (HIV-1) contra a glicoproteína120 (gp120), reduzindo a carga viral tanto, *in vitro,* quanto, *in vivo,* (MAGALHÃES, et al., 2012; PARASHAR et al., 2020).

De acordo com os estudos de WANG, JIANG & LIU, (2000) foram desenvolvidos aptâmeros L13 e L19 com a capacidade de se ligar as glicoproteínas B e H do *Human Cytomegalovirus* (HCMV), inibindo a replicação. NG et al. (2006) descreveram um dos primeiros aptâmeros aprovados pela FDA que foi o Macugen®, *Eyetech Pharmaceuticals*, Inc., New York, NY, com a função de melhorar a acuidade visual através da interação com o alvo do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF165) inibindo assim a sua ligação com o receptor de superfície de membrana, VEGFR1 ou VEGFR224, causador de cegueira em pessoas com mais de 50 anos de idade.

CNOSSEN e colaboradores (2017) selecionaram aptâmeros ligantes a importantes regiões regulatórias do vírus da dengue, se destacando como potencial estudo funcional, que pode colaborar na aplicação teranóstica da infecção viral. A Figura 10 representa o aptâmero anti-dengue selecionado pelo

grupo do LaBioMol/UFCAT em diferentes condições iônicas e de temperatura (SILVA & NEVES, 2019).

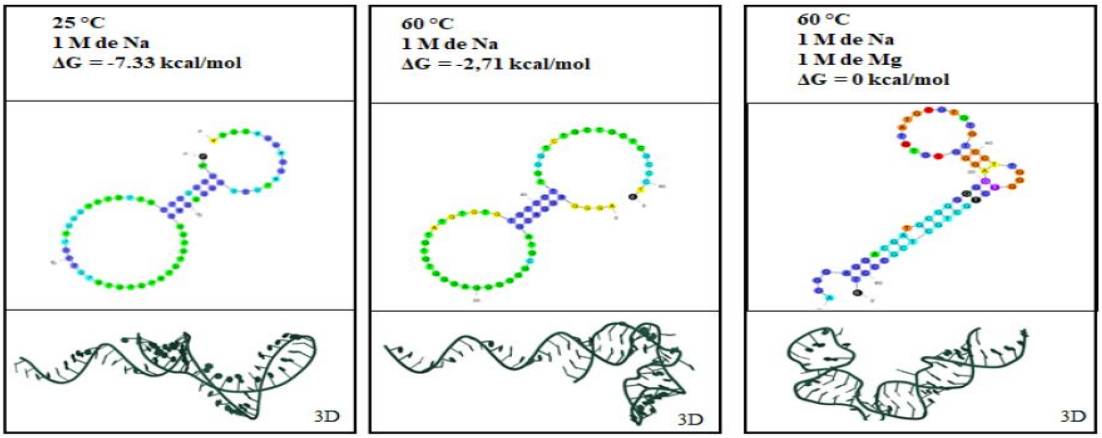

Figura 10: Estruturas secundárias e tridimensionais do aptâmero anti-dengue selecionado pelo grupo do LaBioMol/ UFCAT, em diferentes condições iônicas e de temperatura. Fonte: SILVA & NEVES, 2019.

FERREIRA et al. (2017) desenvolveram pesquisas, em fase de testes em animais (pré-clínicos), envolvendo aptâmeros específicos obtidos pela técnica SELEX, como radiofármacos para diagnóstico de infecções após a realização de procedimentos cirúrgicos, como inserção de próteses ou enxertos. BYUN (2021) descreveu que, até o mês de janeiro de 2021, nove aptâmeros de RNA e cinco de DNA foram submetidos a ensaios clínicos para o tratamento de várias patologias, como degeneração macular, coagulação, oncologia e inflamação. Ainda sobre estudos recentes, envolvendo aptâmeros envolvendo doenças infecciosas, até 27/07/22, de acordo com o *Clinical Trials,* quatro pesquisas envolvendo aptâmeros (Doença de Chagas e HIV) estavam em andamento.

No contexto de vírus CoVs, AHN et al. (2009) selecionaram aptâmeros com afinidade pela proteína N do SARS. Através de um imunoensaio de quimioluminescência foi possível perceber a capacidade do aptâmero de se ligar à proteína N viral. Essa capacidade de detecção à proteína N também foi demonstrada por microscopia confocal para o aptâmero de RNA conjugado com partículas conjugadas a aptâmeros (QDs-supported) (ROH & JO, 2011). O potencial terapêutico de um aptâmero de RNA contra a proteína do nucleocapsídeo foi também redirecionada para SARS-CoV-2, pois apresenta

uma região carregada positivamente em seu domínio N-terminal e possui afinidade por moléculas ssDNA, dsDNA e ssRNA (MCBRIDE, VAN ZYL & FIELDING, 2014).

De modo semelhante, nas pesquisas de PARASHAR et al. (2020), para auxiliar na terapêutica contra COVID-19 foi utilizado aptâmeros de RNA resistentes à nuclease e com capacidade de interação com a proteína do nucleocapsídeo de SARS-CoV-2, tornando esses aptâmeros como fortes agentes terapêuticos contra a COVID-19. Diante das variantes que vem surgindo da proteína S de SARS-CoV-2 os aptâmeros terapêuticos que se liguem a ACE2 poderiam ser um alvo de estudos a fim de se inibir a ligação com o vírus e infecção da célula (VILLA et al., 2022).

De fato, a maioria dos estudos com aptâmeros tendo como alvo SARS-CoV-2 são direcionados à interação contra a proteína S e ACE2. Pesquisas com resultados satisfatórios envolvendo a proteína S de SARS-CoV-2, quanto a interfência e/ou interrupção da ligação entre a proteína do hospedeiro ACE2 e a região RDB da proteína S também foram conduzidas em outros estudos (PARASHAR et al., 2020). CLERI et al. (2021), LIU et al. (2021) e SCHMITZ et al. (2021) também proporam que a interação com S e RBD são alvos para terapia, prevenção e tratamento da COVID-19 desenvolvendo aptâmeros com a capacidade de “imitar” SARS-CoV-2 e desta forma bloquear/ neutralizar a interação S / RBD na célula hospedeira.

VILLA et al. (2022) obteve dois aptâmeros de oligonucleotídeos com a capacidade de reconhecer o resíduo K353 da ACE2 e através de estudos, *in silico*, poder ser este ligante um obstáculo para a interação da subunidade S1 da proteína S de SARS-CoV-2, inibindo assim a infecção deste e outros CoVs.

SONG et al. (2020) identificaram dois aptâmeros voltados a proteína S, na região RBD de SARS-CoV-2 (CoV2-RBD-1C e CoV2-RBD-4C), sugerindo regiões semelhantes com a ACE 2, corroborando assim com a teranóstica em relação a SARS-CoV-2. Assim como as pesquisas de WEISSHOFF et al. (2020) descreveram um aptâmero anteriormente desenvolvido, denominado BC 007, com a capacidade de interação com o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína S e também com proteínas

mediadoras da replicação do vírus, a RdRp de SARS-CoV-2, interferindo assim na interação e replicação, *in vivo*.

DEVI & CHAITANYA (2021) desenvolveram estudos, *in silico,* de aptâmeros peptídicos, semelhantes a ACE2, e interações com a proteína S de SARS-CoV-2, com o objetivo de inibir a entrada do vírus nas células do hospedeiro. Este novo complexo aptâmero-domínio de ligação ao receptor foi considerado estável no tratamento terapêutico para SARS-CoV-2, com características não antigênicas, não alergênicas, não hemolíticas, não inflamatórias, com alta afinidade para ACE2 e estudos futuros, *in vivo,* serão realizados.

SUN et al. (2021b) descreveram o aptâmero CoV2-6 com a capacidade de agir como competidor com a ACE2 e auxiliar na interrupção da infecção. Foi feita uma nova projeção, denominado CoV2-6C3 (cb-CoV2-6C3), para avaliação em testes futuros com a região RBD da proteína S. Estudos de DEVI & CHAITANYA (2021) proporam um aptâmero de peptídeo, que quando comparado com o RBD da proteína Spike, apresentou boa alternativa de inibição da interação que ocorre na célula hospedeira ACE2 e na proteína Spike de SARS-CoV-2.

A utilização da tecnologia de desenvolvimento de aptâmeros por meio do isolamento e caracterização de ligantes específicos de moléculas de RNA ou DNA pode auxiliar no diagnóstico, na identificação e validação de drogas, na terapêutica, na elucidação das funções de genes e evolução das diversas doenças, tais como a dengue e tendo como alvo a 5’-UTR (CNOSSEN, 2014). A seleção de novos aptâmeros contra novos alvos dos ácidos nucleicos foram destacados por (SILVA, 2015) na investigação das propriedades modulares e personalizáveis destes aptâmeros anti-dengue em UTRs, podendo assim identificar uma possível molécula teranóstica contra SARS-CoV-2.

Diante do exposto, a partir dos ensaios que serão apresentados neste trabalho estão sendo desenvolvidas pesquisas para isolamento e caracterização de aptâmeros ligantes ao genoma de SARS-CoV-2. Particularmente, a extremidade 5’-UTR foi o alvo, por atuar como uma região necessária para a replicação e a transcrição dos RNAs subgenômicos virais, numa perspectiva de que os potenciais aptâmeros isolados como ligantes a

importantes regiões regulatórias do SARS-CoV-2 poderão auxiliar na compreensão de vias moleculares envolvidas nos eventos celulares pré e pós-infecção viral. A caracterização dos aptâmeros utilizando análises, *in silico,* e técnicas de biologia molecular podem auxiliar na avaliação da interação entre os ligantes selecionados ao alvo, e neste estudo utilizamos a PCR e suas variações, eletroforese e *dot-blot*.

2-Objetivo Geral

- Realizar o isolamento e a caracterização de aptâmeros ligantes à 5’-UTR do genoma do vírus SARS-CoV-2.

2.1- Objetivos específicos

- Produzir a sequência biotinilada da 5’-UTR de SARS-CoV-2, como alvo de seleção, na forma de ssDNA (do *inglês, single strand DNA*) para ligação à estreptavidina complexada à partículas paramagnéticas a fim de realizar os *rounds* de seleção, em fase líquida, dos ligantes de oligonucleotídeos e produzir sondas de hibridação para *dot-blot*;
- Produzir uma biblioteca combinatória de oligonucleotídeos de ssDNA, para realizar os *rounds* de ligação ao alvo e seleção dos aptâmeros de oligonucleotídeos;
- Caracterizar os aptâmeros ligantes por meio de análises *in silico* e moleculares tais como a PCR e suas variantes e ensaios de hibridação entre ácidos nucleicos, a fim de verificar a afinidade e a especificidade de interação com o alvo;
- Produzir um banco de aptâmeros de ssDNA ligantes à 5’-UTR do genoma de SARS-CoV-2 para fins de validações em plataformas diagnósticas e/ou terapêuticas.

3- Materiais

Os reagentes utilizados para preparar as soluções foram: Tris 99% (Hidroximetil Amino Metano) da InLab de São Paulo, Cloreto de Magnésio da Neon de São Paulo, Cloreto de Potássio da Synth de São Paulo, Cloreto de Cálcio da Dinâmica de São Paulo, Azida de Sódio e Hidróxido de Sódio da Isofar do Rio de Janeiro, Acetato de Sódio e Citrato de Sódio da Proquímios do Rio de Janeiro, Álcool Etílico da Isofar do Rio de Janeiro, Fenol, Cloreto de Sódio e Tween 20 da Vetec do Rio de Janeiro, Clorofórmio da Emsure- Alemanha, Álcool Isoamílico Dinâmica de São Paulo, Tris HCl [Tris (Hydroxymethyl) amino methane Hydrochloride], EDTA da Invitrogen de Carlsbad, CA, USA.

Os *primers* foram enviados para a síntese e importados pela GENONE do Rio de janeiro, a realização de PCR por Taq Platinum^{TM} da Invitrogem de São Paulo, Kit Easy Taq DNA Polimerase LGC- Biotecnologia de São Paulo, Kit da Solis Biodyne 5X Hot FirePol Evagreen q PCR Supermix, Conjuntos de dNTPs importados dos Estados Unidos pela Sinapse de São Paulo, os marcadores de 50 e 100 pb da Invitrogen de Carlsbad, CA, USA, Oligonucleotídeos (primers 1 e 2) IDT da Trilink Biotechonologies.

Brometo de etídeo da Ludwig Biotec de Alvorada-RS, Agarose da Argagem de Curitiba-PR, Membrana Hybond-N+ da GE Healthcare Life Sciences (São Paulo, Brasil). O kit Alkaphos Direct Labellings Reagenucleotídeos da Sinapse Biotecnologia Ltda, o Kit Biotin Chromogenic Detection foi obtido da Thermo Scientific (Sinapse Biotecnologia), *Beads* (Streptavidin MagnSphere Paramagnetic Particles) da Promega Corporation dos Estados Unidos.

4- Parte Experimental

4.1- Análise, design e obtenção das sequências 5’-UTR de SARS-CoV-2

O banco de dados de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) foi utilizado para obtenção das sequências alvo de 5’-UTR de SARS-CoV-2 previamente depositadas. As sequências foram alinhadas utilizando o *webserver* Clustal Omega para organização de um consenso. Os pares de *primers* para amplificação da região 5’-UTR utilizados como alvo no processo foram desenhados utilizando o software *Primer Express 3.0* (Applied Biosytems) no Laboratório de Biologia Molecular (LaBioMol) / Universidade Federal de Catalão (UFCAT).

Posteriormente, os *primers* foram adquiridos pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT/TeraNano) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com financiamentos provenientes do CNPQ, FAPEG, CAPES, e sintetizados através da empresa *GenOne Biotechnologies* (Rio de Janeiro-RJ).

Os *primers* foram denominados 2019-nCoV-5UTR-N1-R (*Reverse*) 2019- nCoV- 5UTR-N1-Fout-Bio (*Foward* com biotina) e 2019-nCoV-5UTR-N1-Fout (*Foward*). Por sigilo metodológico associado a possível processo de patenteamento do método, as sequências dos oligos não foram aqui apresentadas. A diluição das soluções estoque seguiram as recomendações do fabricante, os cálculos para utilização foram pré-estabelecidos através das otimizações realizadas no Laboratório, seguidas de preparação das soluções de trabalho.

4.1.1- Análise, design e obtenção dos Plasmídeos

O vetor de clonagem (plasmídeo), pUC-18, com os insertos desejados foram desenhados/adaptados no Laboratório de Biologia Molecular (LaBioMol) /UFCAT (Universidade Federal de Catalão) e adquiridos pelo INCT-TeraNano através da empresa WATSONBI por importação feita pela empresa GENONE (Rio de janeiro), denominado 2019 nCoV- Subgen. A diluição das soluções estoque dos plasmídeos foi realizada seguindo as instruções do fabricante. O cálculo do número de cópias do alvo da pesquisa (plasmídeos) para a diluição das soluções de trabalho foi otimizado e ajustado no Laboratório

de Biologia Molecular (LaBioMol) /UFCAT (Universidade Federal de Catalão) partindo de uma concentração de 50ng/µl, seguidas de uma diluição seriada.

4.1.2- Produção da biblioteca de oligonucleotídeos de ssDNA

Na seleção de aptâmeros ssDNA foi utilizada uma biblioteca comercial adquirida pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT/TeraNano) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sintetizada pela empresa Trilink Biotechonologies, flanqueada por sequências (*primers*) de 20 nucleotídeos e cerca de 45 nucleotídeos com sequências desconhecidas (Figura 11). Os *primers* foram usados para amplificação através de PCR simétrica e assimétrica das fitas de dsDNA e ssDNA da biblioteca em cada ciclo de seleção do SELEX. As condições de termociclagem foram padronizadas para 29 ciclos para as reações simétricas e assimétricas. Cada ciclo da amplificação foi definido em 94°C por 3 min; 94°C por 20 s; 59°C por 40 s, 72°C por 40 s e ao final seguido de 10 minutos para a extensão final com 72 °C realizadas em termociclador e seguidas de purificação com acetato de amônio 7,5M e acetato de sódio 3M, para PCR simétrica e assimétrica, respectivamente.

Figura 11: Representação esquemática da Biblioteca de DNA utilizada no SELEX.

A PCR e suas variações (simétrica e assimétrica) foi utilizada para amplificação da biblioteca em termociclador (BIO-RAD T100 Thermal Cycler) com o Kit *Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase*. Para a amplificação simétrica de dsDNA (do inglês, *double strand*) foram utilizados 2 µL de cDNA, 1X de tampão, 1 U da enzima Platinum Taq DNA Polymerase, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,3 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada primer (forward e *reverse*). O volume final das reações foi de 50 µL. As condições de amplificação foram semelhantes para a PCR assimétrica, contudo sem a adição do *primer reverse* (Figura 12).

As condições de termociclagem foram padronizadas para 29 ciclos para as reações simétrica e assimétrica. Cada ciclo da amplificação foi definido em 94°C por 3 min; 94°C por 20 s; 59°C por 40 s, 72°C por 40 s e ao final seguido de 10 minutos para a extensão final com 72 °C.

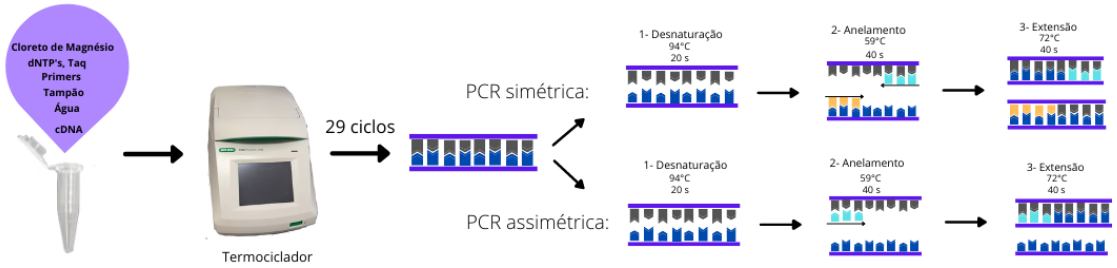

Figura 12: Esquema da Reação em Cadeia da Polimerase (simétrica e assimétrica) para amplificação da biblioteca de fita dsDNA e ssDNA. Nas reações de amplificação foram utilizados: o tampão de reação, o(s) *primer(s)*, cloreto de magnésio, água, cDNA e a Taq em 29 ciclos (94°C-3 min; 94°C-20 s; 59°C- 40 s; 72°C por 40 s e ao final 72 °C -10 min para a extensão final) no Termociclador. Através do aumento da temperatura o DNA sofreu desnaturação, anelamento e extensão da fita, gerando inúmeras cópias a partir do DNA molde.

4.1.3- Eletroforese em gel de agarose e purificação dos produtos de PCR da biblioteca de oligonucleotídeos de ssDNA

Os géis utilizados foram preparados com o polissacarídeo agarose em concentração de 1,2 % na presença de tampão TBE 0,5 X contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada em tampão TBE em uma tensão elétrica de 120V por cerca de 40 minutos. Os produtos de PCR aplicados no gel, com cerca de 85 pb, foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator, Loccus Biotecnologia) e os géis foram observados e fotografados por dispositivo celular.

Em seguida, os produtos de PCR simétrica obtidos por eletroforese em gel de agarose foram purificados com o auxílio da lã de vidro. Para isso, as bandas do gel foram cortadas na região específica do alvo com lâmina de bisturi limpa e em seguida colocadas em microtubos de 0,6 mL, contendo ao fundo lã de vidro, e com um pequeno furo na parte inferior. Os microtubos de 0,6mL foram colocados dentro de microtubos de 1,5 mL, sendo submetidos a centrifugação a 13000 rpm (Centrífuga 5424 – Eppendorf) por 25 minutos. A amostra centrifugada foi coletada dos microtubos de 1,5 mL e adicionou-se acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto (3:1).

As amostras foram incubadas *overnight* (15h) a uma temperatura de -20 °C e posteriormente foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e descartado. Adicionou-se 100 µL de etanol 70% ao precipitado. As amostras foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 13000 rpm, o líquido foi retirado e o *pellet* foi ressuspenso em 15 µL de água ultrapura. A quantificação foi realizada através da leitura no quantificador L-QUANT (Loccus Biotecnologia) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. Posteriormente, os produtos obtidos por PCR assimétrica, foram purificados utilizando acetato de sódio e etanol absoluto.

As amostras foram incubadas por 30 minutos, a uma temperatura de -70 °C e posteriormente foram centrifugadas a 13000 rpm (Centrífuga Hermle Labortechnik GmbH – Z 326 K) por 30 minutos a -4 °C. O líquido sobrenadante foi retirado e descartado e lavado com etanol 70%. A amostra foi centrifugada novamente por 10 minutos a 13000 rpm, o líquido sobrenadante foi retirado e o *pellet* permaneceu em temperatura ambiente para secar durante 30 minutos e em seguida foi ressuspenso em 10 µL de água ultrapura e colocado por 5 minutos a 37 °C no banho seco.

A quantificação foi realizada através da leitura no quantificador L-QUANT (Loccus Biotecnologia) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm.

4.1.4- Obtenção do alvo 5’-UTR de SARS-CoV-2

A seleção de aptâmeros de DNA com afinidade e especificidade é dependente de molécula alvo, presente em quantidade suficiente e com alta pureza. Os alvos biotinilados foram produzidos no termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) a partir de dois *primers*, sendo um deles biotinilado (*Foward*), e em seguida acoplados às partículas magnéticas para captura dos potenciais ligantes em fase líquida.

A amplificação da molécula alvo 5’-UTR com biotina com sequência de 228-pb foi realizada utilizando o *Kit da Solis Biodyne* 5X Hot FirePol Evagreen q PCR Supermix para incorporação de uracila ao invés de timina e produção de moléculas de ssDNA do tipo RNA-*like*. As concentrações da reação, juntamente com as diluições dos *primers* e plasmídeos foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante e os cálculos para a realização da PCR

determinadas em concentrações pré-estabelecidas e otimizadas no LaBioMol /UFCAT.

As condições determinadas pelo fabricante do Mix foram de 4 µL do *Kit da Solis Biodyne* (5X Hot FirePol Evagreen qPCR Supermix), 7 µM de cada primer (*Foward* com biotina e *reverse*) e 10^6 cópias do DNA molde-plasmídeo (2019 nCoV- Subgen). O número de cópias foi calculado usando a equação: número de moléculas = concentração do plasmídeo (ng/µL) x 6,02 x 10^{23}/comprimento do plasmídeo (3581) x 649 (g/mol = 1pb) (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/cms_042486.pdf), completando-se com um volume final de água ultrapura de 20 µL (Figura 13).

As condições de termociclagem para a amplificação foram padronizadas com 40 ciclos (50°C – 2 min; 95°C – 10 min; 95°C – 15 s; 60°C – 1 min) no equipamento 7500 Real Time PCR System da Applied Biosystems.

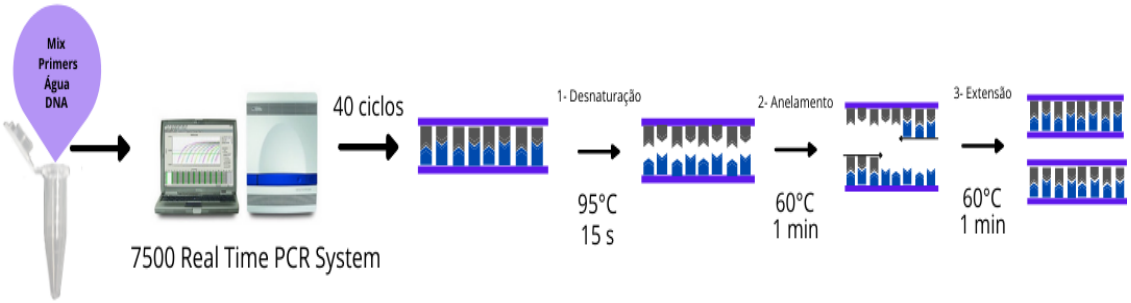

Figura 13: Esquema da Reação em Cadeia da Polimerase em 7500 Real Time PCR System para amplificação do alvo 5'-UTR SARS-CoV-2. Na amplificação foram utilizados o mix de reação, os *primers* e plasmídeos em equipamento 7500 Real Time PCR System em 40 ciclos (50°C – 2 min; 95°C – 10 min; 95 °C – 15 s; 60°C – 1 min). Através do aumento da temperatura, o DNA sofreu desnaturação, anelamento e extensão da fita, gerando várias cópias a partir do DNA molde.

Os géis utilizados foram preparados com o polissacarídeo agarose em concentração de 1,2% na presença de tampão TBE 0,5 X contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo. A corrida feita em tampão TBE sob tensão elétrica de 120V por cerca de 40 minutos. Os produtos de PCR aplicados no gel, com tamanho esperado de 228-pb, foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator, Loccus Biotecnologia) e os géis foram observados e fotografados por dispositivo celular.

Em seguida, os produtos de PCR do alvo biotinilado (5’-UTR) foram purificados a partir do gel de agarose, as bandas do gel foram cortadas com lâmina de bisturi limpa na região específica do alvo e em seguida colocadas em microtubos de 0,6 mL, contendo ao fundo lã de vidro, e um pequeno furo na parte inferior do tubo. Em seguida foram colocados dentro de um microtubo de 1,5 mL, e foram submetidos a centrifugação de 13000 rpm (Centrífuga 5424 – Eppendorf) por 15 minutos. A amostra centrifugada foi coletada no microtubo de 1,5 mL e a precipitação foi feita com acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto. As amostras foram incubadas *overnight* (15h) a uma temperatura de -20 °C e posteriormente foram centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos. O *pellet* foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 15 µL de água ultrapura. A quantificação foi realizada através da leitura no quantificador L- QUANT (Loccus biotecnologia) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm.

4.1.5- Teste de marcação com biotina

Para a imobilização do alvo nas partículas paramagnéticas, revestidas com estreptavidina é necessário que a biotina esteja incorporada nas moléculas dos ácidos nucleicos. Com esse intuito de verificar se o alvo estava biotinilado foi realizado o teste de marcação com biotina. Nesse sentido foi utilizado uma membrana de náilon carregada positivamente, Hybond-N+. Na membrana (Figura 14 A) foram colocadas 10 µL em iguais concentrações (500ng/µl) do controle positivo biotinilado, controle negativo e amostra biotinilada e purificada da região 5’-UTRbio de SARS-CoV-2. A figura 14 B demonstra um esquema representativo baseado na afinidade existente entre a biotina e a estreptavidina, onde o alvo biotinilado se liga à estreptavidina, que estava conjugada a enzima fosfatase alcalina permitinado a ocorrência de reações colorimétricas e a formação de precipitado azul.

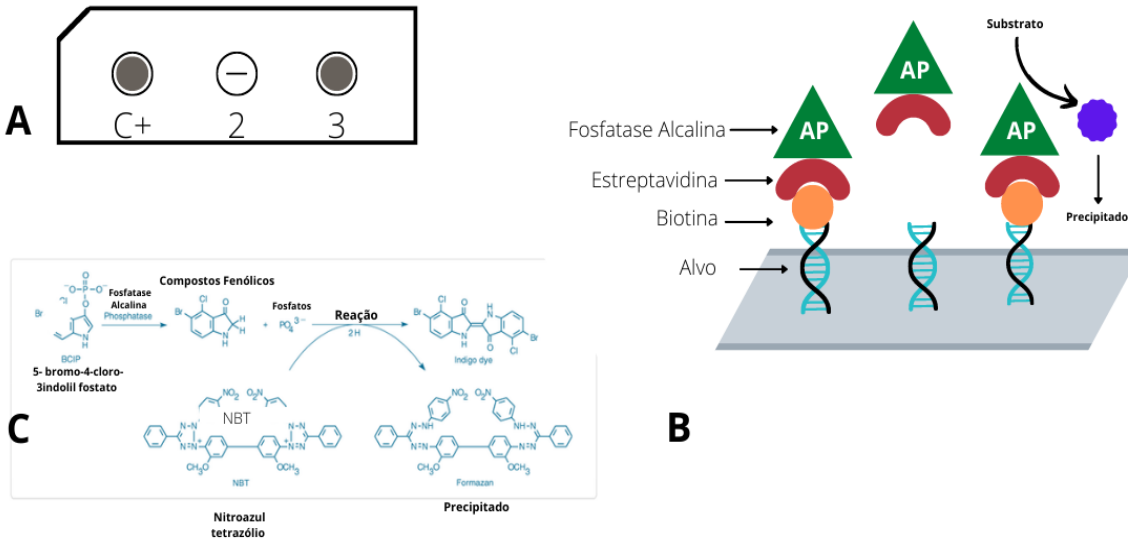

Figura 14: Esquema representativo do teste de incorporação com biotina ao alvo na membrana de náilon Hybond-N+. A-Representação das amostras colocadas na membrana de náilon Hybond-N+: C+: Controle positivo 5'-UTR (Primer *Foward* biotinilado 5'-UTR); 2: Controle negativo de amostra sem biotina (dsDNA) e 3: Amostra da 5'-UTRbio de SARS-CoV-2; B-Representação das reações colorimétricas do teste do alvo biotinilado indicada pela formação do precipitado azul. C- Reação Colorimétrica da fosfatase alcalina por NBT-BCIP. Fonte: https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/enzyme-substrates/detecting-enzymes-that-metabolize-phosphates-and-polyphosphates.html.

As reações colorimétricas são iniciadas pela clivagem do grupamento fosfato presente no substrato BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) pela fosfatase alcalina em compostos fenólicos e fosfatos. Os fenóis reagem com o NBT (nitroazul tetrazólio), produzindo um próton que reduz o NBT a um produto final insolúvel NBT (diformazano) em forma de precipitado na cor azul (Figura 14 C) (FERRO, 2014), indicando assim a presença da biotina (biotinilação) do alvo.

4.2- *Rounds* de seleção dos ligantes ao alvo

A seleção por SELEX iniciou-se com a imobilização do alvo biotinilado em uma plataforma magnética, seguida da incubação deste juntamente com a biblioteca ssDNA de oligonucleotídeos. Após eluição das moléculas não ligantes ao alvo, o *round* da seleção terminou com a amplificação dos ligantes por PCR, utilizando processo previamente descrito. Esses passos foram repetidos por doze *round*s.

O passo inicial de cada *round* representou a construção do *pool*, *in vitro,* da biblioteca de DNA diluída de acordo com as instruções do fabricante e através de reações de PCR simétrica e assimétrica. Cinco nanomoles da biblioteca a 10^{15} oligonucleotídeos foram utilizadas no primeiro *round* de seleção dos aptâmeros.

Para cada *round* houve a imobilização do alvo nas partículas paramagnéticas (*beads*) revestidas com estreptavidina, incubação da biblioteca com o alvo para ocorrer a seleção dos aptâmeros e precipitação destes ligantes, seguidos de amplificação simétrica e assimétrica para iniciar um novo *round*.

Para a primeira etapa da imobilização do alvo foram utilizados 200 µM do alvo 5'-UTR de SARS-CoV-2 biotinilado e purificado, sendo que essa quantidade de alvo foi mantida nos doze *rounds* de seleção. A cada *round* o alvo foi desnaturado a 90°C por 10 minutos, depois resfriado a 4°C durante 10 minutos, seguido de uma curta incubação de sete minutos a temperatura ambiente anteriormente a reação de ligação.

Uma alíquota de 1,5 x 10^4 ng/mL das *beads* revestidos com estreptavidina foi lavada três vezes com o tampão SSC 0,5 X (Solução Salina de Citrato de Sódio - NaCl 3M, Citrato de Sódio 0,34M) pH 7,0 e uma vez como o tampão de ligação (NaCl 0.1 M, Tris 0.02 M pH 7.6, $MgCl_2$ 0.004 M, KCl 0.005 M, $CaCl_2$ 0.03 M, Tween 20 0.02%) utilizando no processo uma plataforma de separação magnética *New England BioLabs* (Número de Série 11210-10) entre as lavagens.

Em seguida, adicionou-se o alvo 5'-UTR de SARS-CoV-2 Bio às *beads* magnéticas, juntamente com 1X do tampão de ligação e a ligação foi efetuada a 36°C durante 30 minutos com agitação suave e incubação em banho seco. A interação entre a biotina-estreptavidina possibilitou a imobilização do alvo às partículas magnéticas e formação do complexo partículas magnéticas / estreptavidina + alvo.

Após a imobilização, o complexo partículas magnéticas / estreptavidina + alvo foi eluído com um volume de 0,1M NaOH durante dois minutos para remover os produtos amplificados não ligados. Em seguida, este complexo foi lavado por duas vezes com um volume de tampão de lavagem (Tris 0.1 M, NaCl 2.5 M, NaN_3 0,02% pH 8.0).

Na segunda etapa realizou-se a etapa de incubação do alvo com a biblioteca de oligonucleotídeos e posteriormente a precipitação dos ligantes. O complexo partículas magnéticas / estreptavidina + alvo foi ressuspenso em tampão de ligação contendo em todos os *rounds* acima de 10 µM da biblioteca randômica de ssDNA, em uma incubação a 36 °C por cerca de uma hora em banho seco, com intervalo de agitação manual a cada cinco minutos. Com o auxílio da plataforma magnética, as sequências dos não ligantes foram removidas utilizando quatro lavagens com o tampão de ligação. Em sequência, os oligonucleotídeos ligantes foram eluídos por incubação do complexo de ligação com 0,1M NaOH a 36 °C por 10 minutos com agitação por inversão. Este passo foi repetido por sete vezes, obtendo desta forma as moléculas de ligantes selecionadas.

Na terceira etapa, as moléculas selecionadas foram então precipitadas em três passos, utilizando uma solução de 8 partes de fenol tamponado com solução TE pH 8, 1,6 partes de clorofórmio e 0,06 partes de álcool isoamílico no primeiro passo. No segundo passo 9,6 partes de clorofórmio e 0,4 de álcool isoamílico foram utilizados. No último passo foi utilizado o etanol e acetato de sódio 3M, na proporção de 10:1. Após 5 minutos a -20 ^{o}C a 13.000 rpm na centrífuga durante 10 minutos, foi descartado o sobrenadante e utilizado 1mL de 70% etanol para lavar o *pellet,* que após 15 minutos de secagem foi ressuspenso em 10 µL de água.

Durante o processo do SELEX, as moléculas ssDNA selecionadas e precipitadas de cada *round* foram amplificadas por PCR simétrica e assimétrica utilizando os *primers* 1 (Oligo 1) e 2 (Oligo 2). Dessa forma um novo pool de ssDNA para o próximo *round* do SELEX foram então gerados (Figura 15).

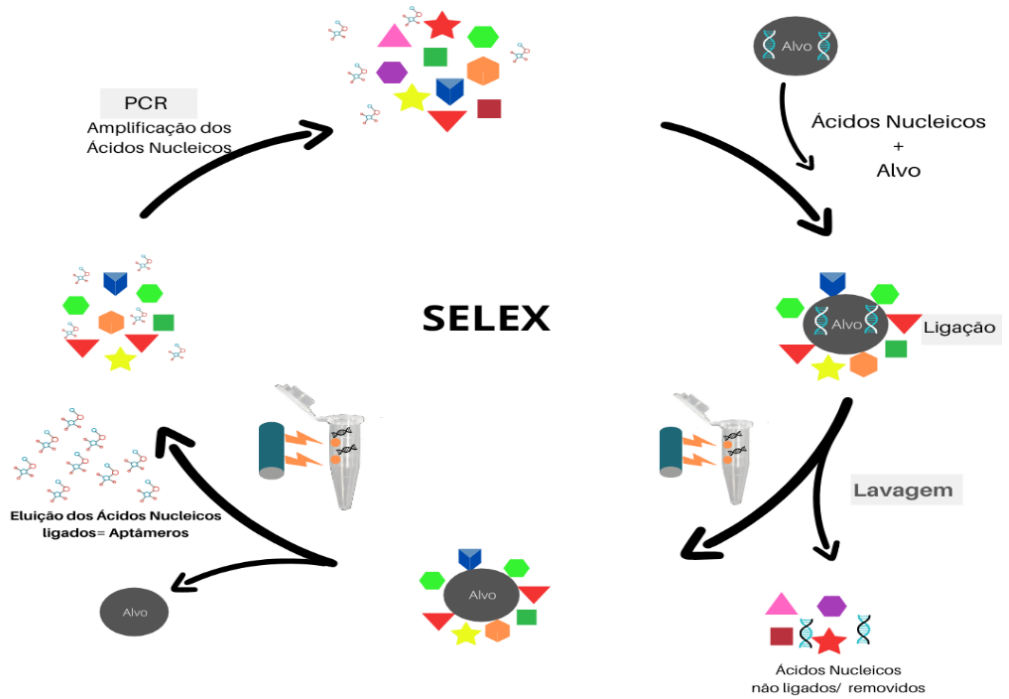

Figura 15: Representação do SELEX genômico- A biblioteca combinatória de DNA foi incubada com o complexo-alvo para ligação através da seleção (ligação, lavagem e eluição), seguintes de amplificação e purificação. Nos *rounds* a biblioteca e as moléculas alvo são incubadas para a ligação, os oligonucleotídeos não ligados são removidos e os oligonucleotídeos alvo ligados são eluídos e amplificados por PCR. Um novo pool enriquecido de oligonucleotídeos selecionados é gerado e utilizados para o próximo *round* de seleção. Adaptada de RAY & WHITE, 2010.

Ao final de cada PCR foi realizada a quantificação deste *pool* de DNA através da leitura em quantificador L- QUANT (Loccus biotecnologia) em comprimento de onda de 260 nm, para análise quantitativa do enriquecimento da biblioteca de oligonucleotídeos ao longo dos doze *rounds* de seleção. Para obter a quantidade da biblioteca recuperada no fim de cada *round* foi realizado o seguinte cálculo: Concentração da biblioteca (µg/ µL) x 10^6 (constante) / n° de pb do alvo x 325 (constante) = pmoles/ µL (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_042487.pdf).

4.3- Ensaios de hibridação por *dot-blot*

Para avaliar o enriquecimento e verificar a afinidade dos aptâmeros ao alvo através dos *rounds* de seleção do SELEX foi realizado a técnica denominada *dot-blot* em três fases. Um *pool* dos produtos purificados assimetricamente do alvo 5'-UTRbio de SARS-CoV-2 foi utilizado como sonda,

a qual numa concentração de 1000 ng de ssDNA foi desnaturada a 95 °C por 10 minutos.

Na primeira fase uma membrana de náilon carregada positivamente foi lavada em 1X SSC por um minuto, para evitar a adsorção de componentes inespecíficos (LARA, 2002) e o excesso de umidade foi retirado utilizando papel de filtro. Em seguida, foram fixados na membrana dos alvos de sondagem: 250 ng de dsDNA 5'-UTR sem biotina como controle positivo (C+); 500 ng de 5'-UTR de dengue (DENV) como controles negativos (C-); 500 ng de produtos de PCR da biblioteca do terceiro ao décimo segundo *round* não ligantes eluídos e de ligantes com e sem purificação (Figura 16). Todas as amostras foram aplicadas separadamente na membrana com o auxílio de um aparato de *dot-blot*, Dot- Blotter, 96 *Sample Innovative Life Sciences Tools*, acoplado a uma bomba à vácuo, após secagem a 80°C e exposição à luz ultravioleta durante 1 minuto para melhor fixação das moléculas na membrana de náilon.

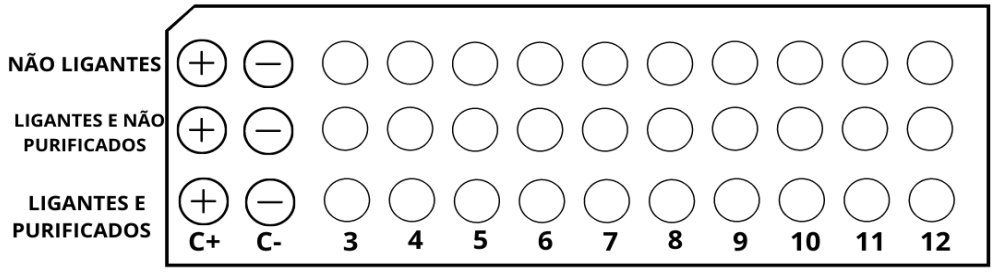

Figura 16: Representação do *dot-blot* para análise da afinidade entre o alvo (ssDNA 5'-UTRbio) e o pool de aptâmeros do 3º ao 12º *round*. C+: Controle Positivo dsDNA 5'-UTR de SARS-CoV-2; C-: Controle Negativo dsDNA 5'-UTR DENV; 3-12: Amostras dos não-ligantes e ligantes (purificados e não-purificados) do 3º ao 12º *round,* respectivamente.

Em seguida, a membrana foi hidratada com 10 mL do tampão de hibridação por 15 minutos a temperatura ambiente. Então, a sonda biotinilada foi adicionada ao tampão para a reação de hibridação com o material imobilizado na membrana. A etapa de hibridação ocorreu por 18 h em temperatura ambiente e com leve agitação. Após a finalização desta etapa, foi realizada a lavagem para retirada dos excessos de sondas (LARA, 2002) e detecção colorimétrica, seguindo as recomendações do fabricante, foi utilizada a estreptavidina conjugada com a fosfatase alcalina e o substrato conjugado desta enzima, o NBT - BCIP para a detecção através da revelação por reação colorimétrica.

Na segunda fase, para verificar se os aptâmeros obtidos através do SELEX tinham afinidade e especificidade ao alvo 5’-UTR de SARS-CoV-2, foi produzida uma sonda biotinilada da biblioteca dos aptâmeros do 12º *round*, por PCR. Este *pool* de aptâmeros, purificados assimetricamente e marcados com biotina (ssDNABio) foi ligado com a estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina. A sonda numa concentração de 1000 ng de ssDNA biotinilado foi desnaturada a 95 °C por 10 minutos. A membrana de náilon carregada positivamente foi lavada em 1X SSC por um minuto e o excesso de umidade foi retirado utilizando papel de filtro. Em seguida, foram colocados separadamente na membrana: 500 ng dos ligantes purificados do 3º *round*, 250 ng dos ligantes purificados do 12º *round* como controle positivo (C+), 500 ng de dsDNA 5’-UTR SARS-CoV-2, 500 ng de dsDNA 5’-UTR Dengue, 500 ng de dsDNA 5’-UTR Zika (ZIKV), 500 ng de dsDNA PRF SARS-CoV-2 e PBS 1X. As amostras foram fixadas com o auxílio de uma bomba à vácuo e após secagem a 80°C foi exposta à luz ultravioleta durante 1 minuto para *crosslinking* (Figura 17).

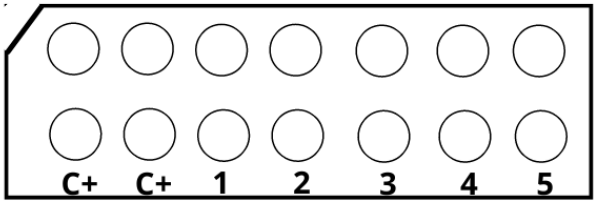

Figura 17: Representação do *dot-blot* para análise da afinidade e especificidade entre o pool de aptâmeros do 12º *round* e o alvo 5’-UTR de SARS-CoV-2. C+: Controle positivo; C+: Controle positivo; 1- dsDNA 5’-UTR de SARS-CoV-2; 2- dsDNA 5’-UTR DENV; 3- dsDNA 5’-UTR Zika; 4- dsDNA PRF de SARS-CoV-2; 5- PBS 1X.

Os demais passos de hibridação e revelação foram feitos como descritos anteriormente. A terceira fase foi realizada para observação de possível interação do alvo 5’-UTR do DNA de SARS-CoV-2 com os *primers* 1 e 2 da biblioteca de ligantes, e com produtos brancos de PCR, tanto simétrico quanto assimétrico pertencentes ao nono e décimo segundo *rounds*, os quais na eletroforese apresentaram um perfil de banda. Dessa forma, a sonda 5’-UTRbio de SARS-CoV-2 foi ligada com a estreptavidina conjugada e numa concentração de 1000 ng foi desnaturada a 95 °C por 10 minutos.

Após preparada, na membrana foram fixados 250 ng de dsDNA 5'-UTR sem biotina como controle positivo (C+), 500 ng de moléculas do nono *round*, na seguinte sequência de produtos purificados simétricos, produtos não purificados assimétricos e produtos de PCR brancos, assimétricos e simétricos, respectivamente. Foram também inseridas na membrana de náilon 500 ng das moléculas do décimo segundo *round*, na sequência de produtos de PCR purificados simétricos, produtos purificados assimétricos, produtos não purificados assimétricos e produtos de PCR brancos, assimétricos e simétricos, respectivamente. Todas as amostras foram aplicadas separadamente na membrana com o auxílio de uma bomba à vácuo conforme descrito anteriormente (Figura 18).

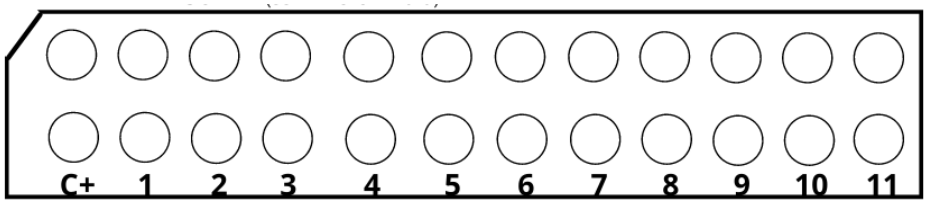

Figura 18: Representação do *dot-blot* para análise da afinidade entre os *primers* 1 e 2, os produtos brancos de PCR simétrica e assimétrica da biblioteca, o pool de aptâmeros do nono e décimo segundo *round* e a sonda ssDNA 5'-UTRbio de SARS-CoV-2. C+: dsDNA 5'-UTR de SARS-CoV-2; 1- pool de aptâmeros purificados simétricos do 9º *round*; 2- pool de aptâmeros não purificados assimétricos do 9º *round*; 3- produtos de PCR brancos simétricos do 9º *round*; 4- produtos de PCR brancos assimétricos do 9º *round*; 5- pool de aptâmeros purificados simétricos do 12º *round*; 6- pool de aptâmeros purificados assimétricos do 12º *round*; 7- pool de aptâmeros não purificados assimétricos do 12º *round*; 8- produtos de PCR brancos simétricos do 12º *round*; 9- produtos de PCR brancos assimétricos do 12º *round*; 10- *Primer* 1; 11- *Primer* 2.

Os demais passos de hibridação e revelação foram seguidos conforme descritos na primeira fase.

4.4- Sequenciamento e análises *in silico:*

O sequenciamento de Nova Geração, do inglês, *Next-Generation Sequencing* (NGS) foi realizado a partir de amostras de aptâmeros oriundas de doze *round*s de SELEX, obtidas por PCR simétrica, seguida de purificação com acetato de sódio 3M e PCR assimétrica em uma concentração de cerca de 1 µg/µl em um volume de 50 µL cujo produto foi enviado para um laboratório localizado na Alemanha, em parceria com o professor Dr. Aristólteles Góes-Neto

do LBMCF do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. A biblioteca foi sequenciada em plataforma automatizada *Agilent*. Os aptâmeros foram selecionados com base no enriquecimento e nos motivos encontrados não correspondentes após exclusão das sequências fixas. A possível interação do complexo alvo-aptâmero foi realizada por análises, *in silico,* com doze aptâmeros e o oligo 2 foi utilizado como sequência *scramble* na análise de interações biomoleculares, utilizando o *webserver RNA de Freiburg Bioinformatics Group*, disponível em https://rna.informatik.uni-freiburg.de/. O oligo 2 foi utilizado por não ter apresentado sinal de interação ao alvo por *dot-blot* e as regiões de possível pareamento linear entre aptâmeros-alvo pelo IntaRNA foi anotada e apresentada na forma de tabela e imagens de hibridação por ligações de Watson & Crick.

5- Resultados e Discussão

5.1- Obtenção e análises da sequência alvo 5’-UTR de SARS-CoV-2

Pesquisas de MUKHERJEE & GOSWAMI (2020), de acordo com a sequência de referência de Wuhan, indicaram que o comprimento da região 5’-UTR de SARS-CoV-2 é de 265 nucleotídeos, apresentando principalmente nos 90 primeiros nucleotídeos uma alta similaridade entre os coronavírus do grupo SARS e englobando desta forma, entre o nucleotídeo 40 e 85º, a sequência reguladora da transcrição (TRS) (BALDASSARRE et al., 2020).

Na Figura 19 estão apresentadas as etapas de obtenção do alvo, a 5’-UTR de SARS-CoV-2. Uma das sequências alinhadas para a construção do plasmídeo contendo o genoma viral continha os 265 nucleotídeos esperados para região do alvo obtida do banco de dados de nucleotídeos do NCBI a partir de isolado de indivíduo infectado com SARS-CoV-2, da sequência de referência MT161607.1.

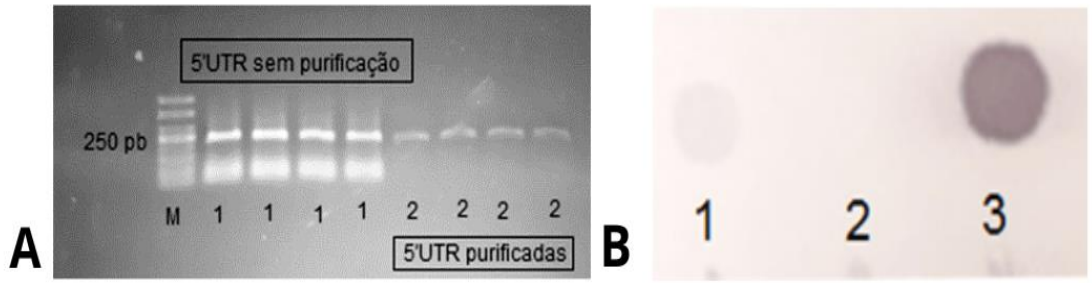

Figura 19: Obtenção da região alvo 5’-UTR de SARS-CoV-2 a partir da sequência de referência MT161607.1 do GenBank/NCBI do alvo viral utilizados com os *primers* para delimitar o amplicon. A) Tamanho esperado de 228-pb para o produto de PCR, obtida da amplificação do DNA plasmidial, com e sem purificação, conforme indicado na imagem. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1.2%, corado com brometo de etídio. M- Marcador de peso molecular de 50-pb. B) Teste positivo para o alvo biotinilado. A reação de detecção foi colorimétrica pela ação da enzima fosfatase alcalina sobre o substrato NBT-BCIP. 1- Primer *Foward* biotinilado; 2- Controle negativo (amostra do alvo dsDNA sem biotina); 3- Amostra do alvo dsDNA biotinilada, em que se observa uma marcação mais intensa.

Delimitando-se o alvo nesta sequência o amplicon de 228-pb para a reação de amplificação específica, a PCR do DNA plasmidial, foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1.2% corado com brometo de etídeo obtendo o tamanho esperado. O corante brometo de etídeo foi intercalado entre as bases

empilhadas dos ácidos nucléicos e desta forma, emitiu fluorescência vermelho-alaranjada quando iluminado com luz ultravioleta e fotodocumentado (Figura 19A), permitindo assim a detecção do DNA, conforme descrito previamente (OLIVEIRA et al., 2007).

Investigações diagnósticas e até a medicina forense são aplicações que podem ser utilizadas através da técnica PCR, que foi descoberta por Kary Mullis na década de 80 e que consiste na amplificação, *in vitro,* de sequências de DNA ou RNA, dependentes de oscilações de temperaturas, da presença da enzima DNA polimerase, e desoxiribonucleotídeos (dNTPs). São necessários também dois *primers* (oligonucleotídeos), iniciadores da reação, sintéticos e complementares as extremidades 5’ e 3’ do fragmento de amplificação gerando uma região estendida de DNA de fita dupla (dsDNA) (ŚPIBIDA et al., 2017). O alvo 5’-UTR de SARS-CoV-2 foi assim amplificado a partir do inserto desta região no plasmídeo puC18, utilizando uma das variações da PCR pela incorporação do nucleotídeo uracila ao invés de timina no amplicon e de biotina pelo *primer* senso, gerando sequências RNA-*like* biotiniladas.

As bandas, pré e pós-purificação da região 5’-UTRbio de SARS-CoV-2, indicaram que a separação obtida através da utilização de lã de vidro, constituída principalmente por silício (SiO_2) juntamente com acetato de amônio e um conjunto de centrifugações foi capaz de purificar o DNA alvo do polissacarídeo agarose (Figura 19A).

Em acordo com métodos descritos por SAMBROOK & RUSSELL (2001), e seguindo os protocolos otimizados do LaBioMol/UFCAT, foram realizadas as etapas de purificação para a retirada de oligonucleotídeos não utilizados, *primers*, dímeros de *primers*, excesso de dNTPs e DNA polimerase, evitando dessa forma a influência desses componentes nos próximos passos do processo. Para a precipitação dos ácidos nucleicos, além de concentrar o DNA, foi utilizado o álcool etílico absoluto e o álcool etílico 70%, para auxiliar na remoção de sais (OLIVEIRA et al., 2007).

Os produtos amplificados e purificados da região 5’-UTR biotinilados, os controles negativos e amostras não biotiniladas, quando analisadas em membrana de náilon, carregada positivamente, indicou eficiência na incorporação da biotina da molécula da região 5’-UTR de SARS-CoV-2

(Figura 19B). A biotina ou vitamina H tem um papel essencial nas vias metabólicas da maioria dos organismos. Ela funciona como uma coenzima nos processos metabólicos como a quebra de ácidos graxos, na expressão gênica e glicogênese (BECKETT, 2018).

A estreptavidina é uma proteína de 60 kDa que pode ser isolada de bactérias *Streptomyces avidinii* ou obtida comercialmente, livre ou conjugada. A ligação entre a biotina e a estreptavidina apresenta uma forte interação não-covalente com alta afinidade, com aplicações biológicas que vão desde o desenvolvimento de sensores, análises de imagem, purificação de proteínas e desenvolvimento de sondas (LAKSHMIPRIYA, GOPINATH & TANG, 2016).

O teste apresentado na Figura 19B baseou-se neste princípio de interação biotina do alvo biotinilado com a estreptavidina, que estava conjugada a fosfatase alcalina. Os precipitados observados na membrana de náilon são oriundos de uma reação redox, onde a fostatase alcalina, uma enzima com peso molecular de 100 kDa, cliva o BCIP produzindo compostos fenólicos e fosfatos. Os fenóis reagem com os sais cromogênios NBT formando o diformazano como um precipitado visível azul escuro ou azul-violeta (LARA, 2002; FERRO, 2014), indicando, desta forma, um sinal colorimétrico de interação da 5'-UTR de SARS-CoV-2-biotina- estreptavidina- fostatase alcalina com o substrato NBT/BCIP, indicando a eficiente incorporação da biotina na molécula de ácido nucleico.

Pelo mesmo princípio de interação entre a biotina e a enzima conjugada estreptavidina com partículas magnéticas, a 5'-UTR de SARS-CoV-2 foi utilizada para interações com os ligantes e separação dos não ligantes de oligonucleotídeos, por meio de plataforma magnética, para os *rounds* do SELEX e obtenção dos aptâmeros.

5.2- Obtenção dos aptâmeros de ssDNA ligantes ao alvo 5'-UTR de SARS-CoV-2

Técnicas que tenham a capacidade de identificação de aptâmeros que se ligam com oligonucleotídeos funcionais podem gerar moléculas com potencial diagnóstico e terapêutico para o tratamento de doenças que acometam a saúde humana, além da possibilidade da técnica SELEX ser modificada de

acordo com o objetivo da seleção dos aptâmeros (STOLTENBURG, REINEMANN & STREHLITZ, 2007; MAGALHÃES, et al., 2012; PARASHAR et al., 2020).

Na Figura 20 estão apresentados os *rounds* de seleção e as concentrações de ligantes pré e pós-seleção dos aptâmeros anti-5'-UTR de SARS-CoV-2, ambos na forma de ssDNA, uma vez que na seleção de ligantes específicos a uma molécula alvo é necessária a incubação com biblioteca combinatória de oligonucleotídeos de fita simples, para, desta forma remover aqueles que não possuem afinidade ao alvo, eluir e amplificar os oligonucleotídeos que possuem alta afinidade e especificidade com o alvo (STOLTENBURG, REINEMANN & STREHLITZ, 2007; MARANGONI et al., 2015; CNOSSEN et al., 2017).

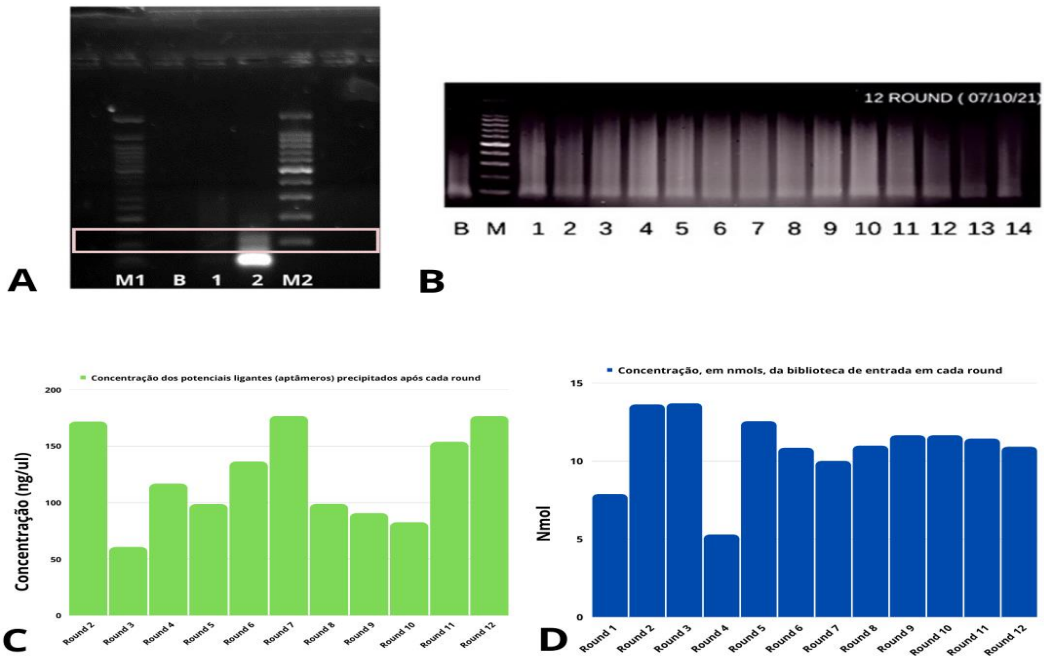

Figura 20- Produção da biblioteca de ssDNA e *rounds* de seleção contra a 5'-UTR de SARS-CoV-2. **A**- Eletroforese em gel de agarose 1.7% corada com brometo de etídeo do primeiro produto de PCR simétrica e assimétrica da biblioteca utilizada no início do SELEX. M1- Marcador de peso molecular de 50 pb. B-Branco. 1-Produto amplificado da biblioteca assimétrica apresentando cerca de 85 pb. 2- Produto amplificado da biblioteca simétrica contendo cerca de 100 pb (marcação bege). M2- Marcador de peso molecular de 100pb. Observa-se a formação de dímeros de primers. **B**- Eletroforese em gel de agarose 1.2% referente ao pool de ligantes (aptâmeros) do décimo segundo *round* do SELEX. B- Branco. M- Marcador de peso molecular de 100 pb. 1-14: Produto de amplificação do décimo segundo *round* com produtos de tamanhos variáveis. O tamanho de cerca de 100 pb foi purificado. **C**- Concentração em ng/µL dos potenciais

ligantes precipitados após cada *round* de seleção SELEX. **D**- Concentração, em nmols, da biblioteca de entrada em cada *round* do SELEX.

Na Figura 20A estão apresentadas as bandas da primeira amplificação da biblioteca produzida no início da seleção para incubação, posterior, com o alvo, observadas em eletroforese em gel de agarose 1.7% e corado com brometo de etídeo. Assim como para o alvo, o produto da biblioteca de ssDNA foi produzido por PCR assimétrica a partir de um produto dsDNA. De acordo com CITARTAN et al. (2012), a amplificação da PCR simétrica apresenta 90% de eficiência na produção de sequências dsDNA, enquanto que a PCR assimétrica apresenta sequências de dsDNA e ssDNA, representando 60 a 70% de eficácia na produção de sequências ssDNA. Nesse sentido, exige-se métodos bem seletivos para purificação das sequências ssDNA para o início do ciclo do SELEX. Assim, ponderou TIAN et al. (2016) que a geração de ssDNA de alta pureza é considerada como fator chave para a obtenção de aptâmeros com alta afinidade e seletividade.

Neste sentido, após a realização da PCR assimétrica para a obtenção das sequências ssDNA da bilblioteca foram realizadas as purificações em cada *round*, já pré-definidas no LaBioMol, das sequências de oligonucleotídeos com acetato de sódio, sendo que o reagente utilizado possui aplicações em outras pesquisas, contendo boa eficácia e semelhança de purificação com acetato de amônio, de acordo com OLIVEIRA et al. (2007).

Os produtos obtidos ao final de doze *rounds* de seleção estão apresentados na Figura 20B. Observa-se que além do tamanho esperado de cerca de 85-pb produzido pelas sequências fixas (oligos) e variável, houve a formação de um arraste indicando a formação de produtos com tamanhos maiores ao esperado, provavelmente por combinações dos *primers* aos ligantes que estavam sendo produzidos a cada *round*; mesmo com a purificação das bandas diretamente da agarose. Além disso, o branco de reação apresentou um produto de amplificação de dímeros de *primers*, o que pode indicar diferentes interações entre ligantes e oligos das sequências fixas durante o processo de síntese da biblioteca.

Ensaios semelhantes também foram desenvolvidos nas pesquisas de VILLA et al. (2022), que utilizaram uma biblioteca de ssDNA contendo uma sequência central randomizada de 40 nucleotídeos flanqueada em ambos os lados por duas sequências fixas com 18 nucleotídeos cada uma. TIAN et al. (2016) também produziram uma biblioteca de ssDNA de tamanho esperado de 85 nucleotídeos de comprimento, com uma região central de 40 nucleotídeos aleatórios flanqueados por dois sítios de ligação dos *primers* das sequências fixas. Nesta pesquisa, após cada rodada de seleção, a biblioteca geral de ssDNA foi amplificada usando dois tipos de PCR: o método de PCR simétrico para a produção de dsDNA e o método de PCR assimétrico para a preparação de ssDNA.

Nas Figuras 20C e 20D estão apresentados o enriquecimento dos ligantes específicos ao alvo, pré e pós-seleção, acompanhado durante todos os *rounds*. Primeiramente por meio da quantificação dos aptâmeros selecionados e precipitados de cada *round* obtida em espectrofotometria em nanogramas por microlitros (Figura 20C) e, posteriormente pela quantificação da biblioteca obtida via PCR assimétrica e purificada antes de ocorrer o novo *round* de incubação com o alvo, em nanomoles. O enriquecimento das moléculas específicas e ligantes ao alvo foi acompanhado a partir do segundo *round* de seleção, através da quantificação das moléculas precipitadas (aptâmeros) ao final de cada *round*.

Para AVCI-ADALI et al. (2010) o produto amplificado da PCR assimétrica é uma mistura de ssDNA e dsDNA, que exige métodos eficientes de purificação para o ssDNA, mas mesmo assim nesses métodos podem ocorrer falhas na purificação da biblioteca. Outra pesquisa atual, de VILLA et al. (2022) foi semelhante à nossa pesquisa para a quantidade estipulada de biblioteca incubada com o alvo na seleção de aptâmeros em diagnóstico contra a COVID-19, os quais utilizaram quatro nmols em incubação com o alvo ACE2, apresentando com o diferencial de utilizar apenas um *round* de SELEX para verificar a capacidade de ligação de cada aptâmero selecionado ao peptídeo ACE2 humano.

Os valores referentes a quantificação dos produtos de PCR assimétrica da biblioteca incubadas com o alvo e que foram utilizadas em todos os *rounds* do SELEX mostraram que no quarto *round* do SELEX ocorreu uma

diminuição da concentração da biblioteca incubada com o alvo para a obtenção dos ligantes (Figura 20D), se relacionando provavelmente ao processo pouco eficiente de purificação do produto de ssDNA, anteriormente a incubação com o alvo. A concentração, de cerca de 5 nmoles, ainda se manteve como pré-definida em protocolos anteriores no LaBioMol e utilizadas em outros trabalhos envolvendo o SELEX.

Nos trabalhos de CNOSSEN (2014), a diminuição da concentração da biblioteca esperada foi explicada pois os oligonucleotídeos não ligantes foram sendo eliminados nos *rounds* iniciais, de forma que a cada *round* os oligonucleotídeos apresentaram maior afinidade e especificidade com o alvo. Contudo, os resultados obtidos nesta seleção de ligantes para a 5'-UTR de SARS-CoV-2, assim como a seleção para a 3'-UTR de dengue realizada por SILVA (2015), não apresentaram esta particularidade, pois a concentração correspondente aos oligonucleotídeos da biblioteca foi mantida em todos os *rounds* em torno de 5 nmoles para dengue e acima de 9 nmoles para SARS-CoV-2, a partir do segundo *round*.

Um dos resultados esperados era que, a partir do segundo *round*, a concentração dos oligonucleotídeos apresentasse uma certa diminuição, devido ao fato da metodologia ser semelhante a aplicada por CNOSSEN (2014) para a seleção de aptâmeros de RNA contra a região 5'-UTR do vírus da dengue, mas essa redução não ocorreu em todos os *rounds*, estando em acordo também com as pesquisas desenvolvidas por SILVA (2015).

Assim, o que se observou foi uma variação quanto ao enriquecimento dos ligantes específicos obtidos e precipitados (Figura 20C). Na pesquisa atual foi utilizado acima de 9 nmoles da biblioteca de oligonucleotídeos em cada *round*, com exceção do primeiro (*round* inicial) e quarto *round* (Figura 20D). Para STRACHAN & READ (2013), este tipo de variação pode também ocorrer devido a modificações nas concentrações quanto a estrigência de ligação das moléculas da biblioteca e alvo selecionados. WILSON et al. (2014) descreveram uma comparação de aptâmeros para trombina por SELEX e seleção de etapa única. A estringência utilizada para a obtenção das sequências no SELEX foi iniciada alta e os resultados mostraram semelhanças nos

aptâmeros obtidos, indicando a possibilidade de seleção de aptâmeros de ácidos nucleicos com o uso de menos *rounds* de seleção.

De acordo com STRACHAN & READ (2013) a estringência alta implica na formação de sequências heterodupléx, ou seja, sequências perfeitamente similares com maior capacidade de pareamento. Este princípio foi utilizado na pesquisa de MARANGONI (2011), onde a estringência no SELEX começou baixa e elevou-se posteriormente, para a seleção de aptâmeros ligantes ao gene PCA3, marcador de tumor prostático.

Para a nossa seleção de ligantes contra a 5'-UTR de SARS-CoV-2 a estringência iniciou-se elevada no início dos *rounds* do SELEX para aumentar a seleção por afinidade na interação com o alvo logo nos primeiros *rounds* conforme proposto por STRACHAN & READ (2013), com diminuição do sétimo ao décimo *round*, o que pode justificar a diminuição na concentração de ligantes, e novo aumento no décimo primeiro *round*, para manter apenas os potenciais ligantes e nova redução da estringência no décimo segundo *round*, para obtenção de ligantes diferentes quanto as suas sequências-alvo, mas que pudessem ainda apresentar uma crescente similaridade estrutural de interações e dessa forma, observamos elevação nas concentrações das moléculas selecionadas (Figura 20C).

Nossa pesquisa indicou que no nono *round* a biblioteca enriquecida atingiu o seu máximo e foi mantendo um patamar próximo da estabilidade, no sentido de ser constituída por aptâmeros com maior afinidade ao alvo e de acordo com o nosso objetivo foram sendo selecionados. Concordando assim com TIAN et al. (2016), que produziu aptâmeros capazes de detectar substâncias tóxicas de brevetoxinas, onde a biblioteca específica de aptâmeros foi gradualmente enriquecida e atingiu seu máximo no décimo segundo *round* e então se estabilizou. Portanto, conforme a ligação atinge um patamar, a afinidade atinge a saturação e os aptâmeros de alta afinidade enriquecidos respondem pela maioria da biblioteca de ssDNA.

Em relação à quantidade de *rounds* do processo de SELEX, observa-se que é variável entre os diferentes ensaios. Pesquisas sobre a primeira descrição e caracterização de aptâmeros direcionados a 5'-UTR do vírus da Dengue de CNOSSEN et al. (2017) utilizaram oito *rounds* para a seleção

de aptâmeros. Aptâmeros, TnIApt 23, com especificidade e seletividade à proteína troponina I, indicador de infarto do miocárdio, foram selecionados através do SELEX a partir de sequências conjugadas com biotina e biblioteca aleatória de DNA (ssDNA) através de 11 *rounds* (DORRAJ et al., 2015).

Os produtos obtidos da amplificação da biblioteca dos aptâmeros selecionados até o décimo segundo *round* apresentaram uma variação de cerca de 100 pb (Figura 20B), indicando que o tamanho dos aptâmeros divergiram em poucos nucleotídeos, semelhantes em tamanho com os produtos da seleção obtidos por SILVA (2015) da região 3'-UTR do vírus da dengue, com uma variação entre 80 e 100pb. Os aptâmeros caracterizados por CNOSSEN (2014) para a 5'-UTR do vírus da dengue, apresentaram tamanhos variando de 41 a 187 nucleotídeos, considerando as sequências randômicas e fixas (*primers*).

A purificação com acetato de amônio / acetato de sódio e precipitação do dsDNA e ssDNA feita neste trabalho é umas das formas indicadas para evitar que o sequenciador venha a apresentar linhas de bases sujas advindas das amostras precipitadas e não purificadas (CASTRIGNANO, DERGOVICS & NAGASSE-SUGAHARA, 2015). Embora tanto o cloreto de sódio, como o acetato de sódio e o acetato de amônio sejam eficazes na precipitação do DNA, é mais difícil remover o cloreto de sódio, em razão da sua menor solubilidade em etanol (OLIVEIRA et al., 2007).

5.3- Caracterização dos aptâmeros ligantes à 5'-UTR de SARS-CoV-2 por ensaios de hibridação por *dot-blot*

Em uma reação de hibridação, *dot-blot* ou *Southern blot*, realizada na presença de uma membrana e de uma sonda, ocorre a formação de uma molécula de dupla fita, denominada de reação de renaturação DNA-DNA, baseada na especificidade das interações de Watson & Crick, onde o nucleotídeo adenina emparelha com a timina e a citosina com a guanina. Altamente sensível na detecção, estes ensaios podem auxiliar na elucidação de estruturas de moléculas, na determinação de doenças, na resolução de crimes e agentes patogênicos (LARA, 2002). A técnica de hibridação por *dot-blot* desenvolvida por MOREIRA, GASPAR & KUNIYUKI, (2005) utilizou sondas de ácidos nucleicos para detecção de vírus do gênero *Vitivirus,* constituindo

alternativa específica e sensível no diagnóstico molecular na detecção viral em videiras.

Especificamente em relação ao teste de *dot-blot*, este pode ser utilizado para verificar a afinidade dos aptâmeros selecionados com um alvo, utilizando amostras de DNA ou RNA purificadas, aplicadas em uma membrana de náilon ou nitrocelulose para detecção por sondas marcadas (STRACHAN & READ, 2013), denominadas estas de sondas “frias” em função da manipulação mais fácil e segura do pesquisador (LARA, 2002).

Para LARA (2002) é essencial que seja utilizada um excesso de sonda no processo de renaturação para que ocorra a hibridação proporcional a quantidade de moléculas de DNA presas à membrana. Partindo deste conceito, no primeiro ensaio por *dot-blot* dos ligantes ao alvo, a sonda ssDNA 5’-UTRbio de SARS-CoV-2, hibridizou em condições sem e com vácuo, conforme resultados apresentados nas Figuras 21A e 21B, respectivamente. Em ambas situações o controle positivo apresentou interação com a sonda observada pela detecção colorimétrica da reação da enzima fosfatase alcalina sobre o substrato NBT/BCIP. Houve assim a formação do híbrido entre a sonda e a fita complementar formando um dsDNA 5’-UTR de SARS-CoV-2.

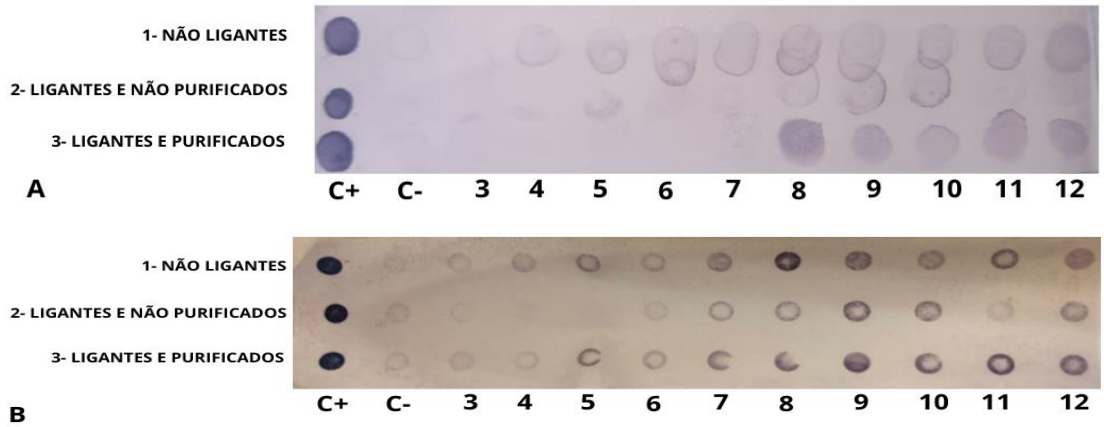

Figura 21: *Dot-blot* para avaliação do enriquecimento e afinidade entre a ssDNA 5’-UTRbio de SARS-CoV-2 e o *pool* de aptâmeros do 3º aos 12º *rounds* (A-sem vácuo e B-com vácuo). Linha 1 (Não-ligantes) - C+: Controle Positivo- dsDNA 5’-UTR de SARS-CoV-2. C-: Controle Negativo- dsDNA 5’-UTR DENGUE. 3-12: moléculas não ligantes do 3º ao 12º *round*. Linha 2 (Ligantes sem purificação) - C+: Controle Positivo- ds DNA 5’-UTR de SARS-CoV-2. C-: Controle Negativo- ds DNA 5’-UTR Dengue. 3-12: aptâmeros sem purificação do 3º ao 12º *round*. Linha 3 (Ligantes Purificados) - C+: Controle Positivo- dsDNA 5’-UTR de SARS-CoV-2. C-: Controle Negativo- dsDNA 5’-UTR DENGUE. 3-12: aptâmetos purificados do 3º ao 12º *round*.

Considerado como um indicador necessário, o controle positivo demonstra a importância e a confiabilidade do teste, e desta forma alcançar uma noção mais precisa do DNA presente na membrana (LARA, 2002). Além disso, o teste demonstrou a afinidade do alvo pelos ligantes visto que houve uma coloração menos intensa de hibridação entre a sonda de 5'-UTR de SARS-CoV-2 (C+) e a 5'-UTR de DENV usada como controle negativo (C-), por não termos uma outra porção 5'-UTR de outro Coronavirus para ser utilizado como controle negativo. A 5'-UTR de DENV foi escolhida pela disponibilidade no LaBioMol e por ser vírus do genero Flavivirus, que possui essa região também estruturalmente conformacionada com *stem loops*. Observa-se ainda uma intensidade semelhante do nono *round* ao décimo segundo *round* indicando a saturação no enriquecimento dos ligantes, a qual foi aumentando em função do enriquecimento de ligantes durante os *rounds* de seleção, aqui demonstrados do terceiro ao nono *round*, o que está em acordo com dados publicados anteriormente (TIAN et al., 2016).

A partir do décimo *round* a afinidade atingiu uma saturação, verificada através dos sinais colorimétricos no teste 21B e confirmado através do teste 21A que, mesmo quando as amostras foram plotadas na membrana sem a presença de vácuo, em que ocorreu uma difusão deste material, mas ainda é possível identificar e comparar a estabilidade quanto a afinidade dos aptâmeros selecionados com o alvo a partir do nono *round*. De acordo com as pesquisas de TIAN et al. (2016) a biblioteca específica de aptâmeros foi gradualmente enriquecida. No entanto, a absorbância aumentou e atingiu seu máximo na décima segunda rodada e então se estabilizou. Portanto, conforme as ligações atingem um patamar, a afinidade atinge a saturação e os aptâmeros de alta afinidade enriquecidos respondem pela maioria da biblioteca de ssDNA.

Observou-se uma semelhança no resultado do teste de *dot-blot,* quanto a maior especificidade dos ligantes purificados do nono *round* em relação a concentração da biblioteca obtida em nanomoles (Figura 20D). Esses dados podem indicar que quanto maior a concentração da biblioteca incubada com alvo há maior interação da biblioteca purificada de aptâmeros, sobretudo do nono *round* com o alvo como observado por *dot-blot* (Figura 21B) e, posteriormente manteve-se uma estabilidade nos *rounds* finais.

Foi possível inferir que na técnica de hibridação por *dot-blot* está ocorrendo a renaturação dos ligantes com a sonda ssDNA e assim identificar o enriquecimento e a afinidade do pool de aptâmeros com o alvo, pois formou-se um complexo entre a sonda ssDNA 5'-UTRbio de SARS-CoV-2 e a amostra que foi previamente desnaturada durante o ensaio. Como os aptâmeros não são linearmente complementares ao alvo ssDNA de SARS-CoV-2, verifica-se que são ligantes pela mudança conformacional que permite que ocorra esta interação, tais como por ligações de hidrogênio e forças de Wan der Walls.

Os precipitados formados nas duas membranas de náilon são produtos de uma reação redox, onde a fosfatase alcalina cliva o grupo fosfato presente no substrato BCIP, produzindo um precipitado (diformazano), indicando assim uma interação das amostras com a sonda ssDNA 5'-UTRbio de SARS-CoV-2, como verificada em maior intensidade nos ligantes purificados do nono *round*, na linha três, seguidos de uma estabilidade, correspondente a produtos de PCR purificados com acetato de sódio no décimo ao décimo segundo *round.*

As marcações colorimétricas dos não-ligantes comparada aos ligantes com e sem purificação das Figuras 21A e 21B, indicam ter havido saturação da sonda ssDNA 5'-UTRbio de SARS-CoV-2 pelos ligantes durante os *rounds* de seleção; ou seja, todas as moléculas do alvo e sítios de interação alvo-aptâmero foram ocupados, e os ligantes por estarem em excesso pelo processo de enriquecimento foram recuperados também junto aos não-ligantes (linha 1), resultando em comportamento similar entre as três situações analisadas.

Os aptâmeros obtidos no último *round* foram específicos para a 5'-UTR de SARS-CoV-2 conforme reação observada no *dot-blot* reverso (Figura 22). A sonda biotinilada dos aptâmeros do décimo segundo *round* apresentou ligação entre os ligantes e os dois controles-alvo da membrana, indicando que no terceiro *round* já existiam os aptâmeros que foram sendo enriquecidos e se mantiveram até o décimo segundo *round,* conforme identificado pela capacidade de interação com a sonda. A reação colorimétrica mais intensa dos controles positivos indicou a maior afinidade dos aptâmeros tanto entre tais moléculas como com o alvo, dada pela interação entre ácidos nucleicos. Sondas envolvendo oligonucleotídeos permitem a diferenciação de ácidos nucleicos em apenas um nucleotídeo, mesmo em sequências complexas (LARA 2002).

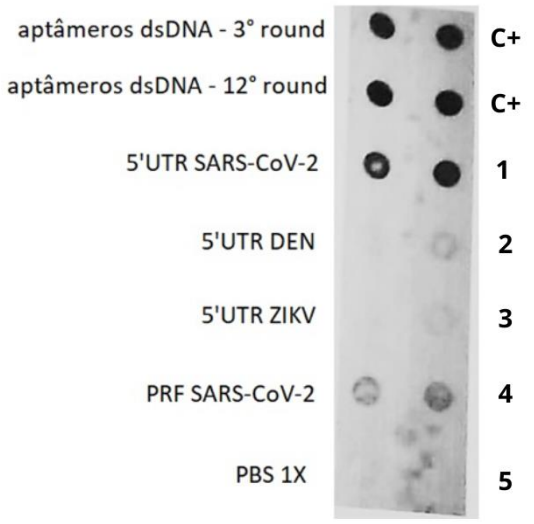

Figura 22: *Dot-blot* com indicação de afinidade e especificidade da biblioteca de ligantes com a 5'-UTR de SARS-CoV-2. C+) Aptâmeros dsDNA do 3º round e do 12º round. 1) dsDNA 5'-UTR SARS-CoV-2. 2) dsDNA 5'-UTR DENV. 3) dsDNA 5'-UTR ZIKV. 4- dsDNA PRF SARS-CoV-2. 5- PBS 1X.

Por outro lado, as moléculas de 5'-UTR de DENV e 5'-UTR de ZIKV apresentaram apenas um *background* de sinal, indicando a especificidade dos aptâmeros à 5'-UTR de SARS-CoV-2. Já para a molécula de outro segmento do genoma do vírus demonstrou neste ensaio, *in vitro,* alguma interação com os aptâmeros anti-5'-UTR de SARS-CoV-2, podendo indicar que esses ligantes podem ter um papel de dupla interação pela similaridade estrutural entre porções do RNA viral. Outros testes são necessários para melhor compreensão da interação observada.

A afinidade de interação entre os ligantes e o alvo foi confirmada pela ausência de sinal entre os amplicons dos brancos de reação; sobretudo, visualizadas no nono (B1 e B2) e décimo segundo *rounds* (B3 e B4), das PCRs simétricas e assimétricas, da Figura 23A e B, comparado ao dado da Figura 23C. Pode ter ocorrido interações entre os *primers* 1 e 2 durante as reações de PCR simétrica e assimétrica que levaram à formação de dímeros de *primers* não ligantes ao alvo, cujo peso molecular era próximo ao tamanho da biblioteca.

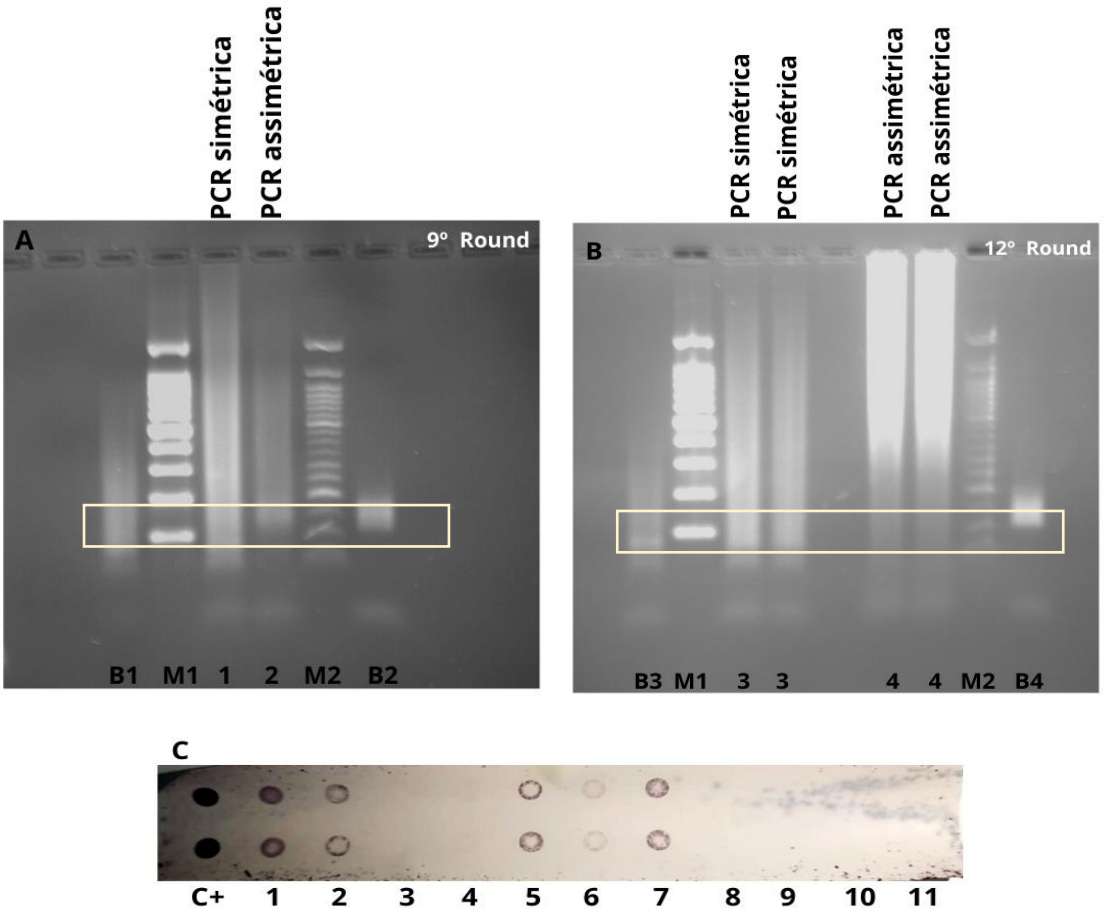

Figura 23: Eletroforese em gel de agarose 1.2% e *dot-blot* para avaliação de afinidades entre o alvo ssDNA 5'-UTRbio de SARS-CoV-2 e os ligantes. **A**- Eletroforese em gel de agarose 1.2% correspondente ao pool de ligantes do nono *round*. B1- Branco de PCR simétrica do nono *round*. M1- Marcador de 100 pb. 1- PCR simétrica do nono *round*. 2- PCR assimétrica do nono *round*. M2- Marcador de 50 pb. B2- Branco de PCR assimétrica do nono *round*. **B**- Eletroforese em gel de agarose 1.2% referente ao pool de ligantes do décimo segundo *round*. B3- Branco de PCR simétrica do décimo segundo *round*. M1- Marcador de 100 pb. 3- PCR simétrica do décimo segundo *round*. 4- PCR assimétrica do décimo segundo *round*. M2- Marcador de 50 pb. B4- Branco de PCR assimétrica do décimo segundo *round*. Retângulo: indica a região purificada ao longo dos *rounds* em função dos subprodutos de ligantes que foram serem construídos durante as PCRs e interações com os *primers* da biblioteca. **C**- *Dot- blot* para análise da afinidade entre a sonda ssDNA 5'-UTRbio de SARS-CoV-2 e os *primers*. 1- Aptâmeros dsDNA do 9º *round* purificados. 2- Aptâmeros ssDNA do 9º *round* não-purificados. 3- Produtos brancos de PCR simétrica do 9º *round*. 4- Produtos brancos de PCR assimétrica do 9º *round*. 5- Aptâmeros dsDNA do 12º *round* purificados. 6- Aptâmeros ssDNA do 12º *round* purificados. 7- Aptâmeros ssDNA do 12º *round* não- purificados. 8- Produtos brancos de PCR simétrica do 12º *round*. 9- Produtos brancos de PCR assimétrica 12º *round*. 10- Oligo 1. 11- Oligo 2.

Este dado foi confirmado por *dot-blot*, pelas ausências de marcações dos produtos dos brancos de PCR, bem como ausência de interação com os próprios *primers* que geraram as sequências fixas dos ligantes, o que indica a não interação com o alvo/sonda de ssDNA 5'-UTRbio de SARS-CoV-2 e afinidade pela sequência variável. Por outro lado, combinações dos *primers* com sequências variáveis podem levar à produção de ligantes. De acordo com a Figura 23C verificamos marcação colorimética no controle positivo por serem fitas complementares à sonda ssDNA 5'-UTRbio de SARS-CoV-2.

Marcações colorimétricas foram obtidas novamente entre a mesma sonda e os ligantes selecionados do nono e décimo segundo *rounds*, tanto simétricos quanto assimétricos indicando assim a existência de aptâmeros selecionados e com afinidade com o alvo, provavelmente pela formação de ligações de hidrogênio, e outras interações não covalentes, tais como Van der Walls e eletrostáticas, entre a sonda e os aptâmeros selecionados do nono e décimo segundo *rounds*.

5.4- Sequenciamento e análises *in silico:*

O sequenciamento NGS dos aptâmeros isolados do décimo segundo *round* apresentou cerca de 23 milhões de sequências. Em uma análise prévia obtida deste sequenciamento foram avaliadas cerca de $1{,}38X10^6$ (6%) das sequências. Destas sequências, cerca de 70% foram de interações entre os *primers* 1 e 2, tais como dímeros combinados e o restante pode indicar os ligantes à 5'-UTR de SARS-CoV-2. Doze sequências que se repetiram 16 ou mais vezes no sequenciamento e correspondendo a 1,4% daquelas contendo regiões variáveis estão representadas na Tabela 1.

As ligações de hidrogênio das sequências de quatro motivos lineares, sendo estes Apta 01-5UTR-hCoV2, Apta, Apta03-5UTR-hCoV2, Apta 03'-5UTR-hCoV2 e Apta 07-5UTR-hCoV2, em relação a regiões específicas do alvo, foram analisadas para predição de interações biomoleculares aptâmeros-5'-UTR de SARS-CoV-2.

Aptâmeros	NCBI- Nucleotide Search database	Frequência	Interação com o alvo*
Apta 01-5UTR-hCoV2	Não	16	126-135
Apta 02-5UTR-hCoV2	Não	988	Nenhuma interação RNA-RNA
Apta 03-5UTR-hCoV2	Não	35	128-138 187-193
Apta 04-5UTR-hCoV2	Não	951	Nenhuma interação RNA-RNA
Apta 05-5UTR-hCoV2	Não	542	Nenhuma interação RNA-RNA
Apta 06-5UTR-hCoV2	Não	448	Nenhuma interação RNA-RNA
Apta 07-5UTR-hCo2	Não	220	178-184
Apta 08-5UTR-hCoV2	Não	466	Nenhuma interação RNA-RNA
Apta 09-5UTR-hCoV2	Não	963	Nenhuma interação RNA-RNA
Apta 10-5UTR-hCoV2	Não	49	Nenhuma interação RNA-RNA
Apta 11-5UTR-hCoV2	Não	656	Nenhuma interação RNA-RNA
Apta 12-5UTR-hCoV2	Rato doméstico	371	Nenhuma interação RNA-RNA
Primer 2 (Oligo 2)	Não	15.801	Nenhuma interação RNA-RNA

Tabela 1- Seleção preliminar pós-sequenciamento NGS de aptâmeros anti-5'-UTR de SARS-CoV-2 do décimo segundo *round*.

* *Webser RNA de Freiburg Bioinformatics Group.*

Os motivos lineares dos aptâmeros Apta01-5UTR-hCoV-2 e Apta03-5UTR-hCoV-2 (Figura 24) interagiram com os nucleotídeos 126-135 e 128-138, respectivamente correspondentes a porções do SL4.5 da 5'-UTR de SARS-CoV-2. Esta região de interação, segundo a descrição de MIAO et al. (2021) corresponde ao SL4.5, conservada entre os Betacoronavírus (WACKER et al., 2021), e está localizada entre os nucleotídeos 130 e 148 (MIAO et al., 2021).

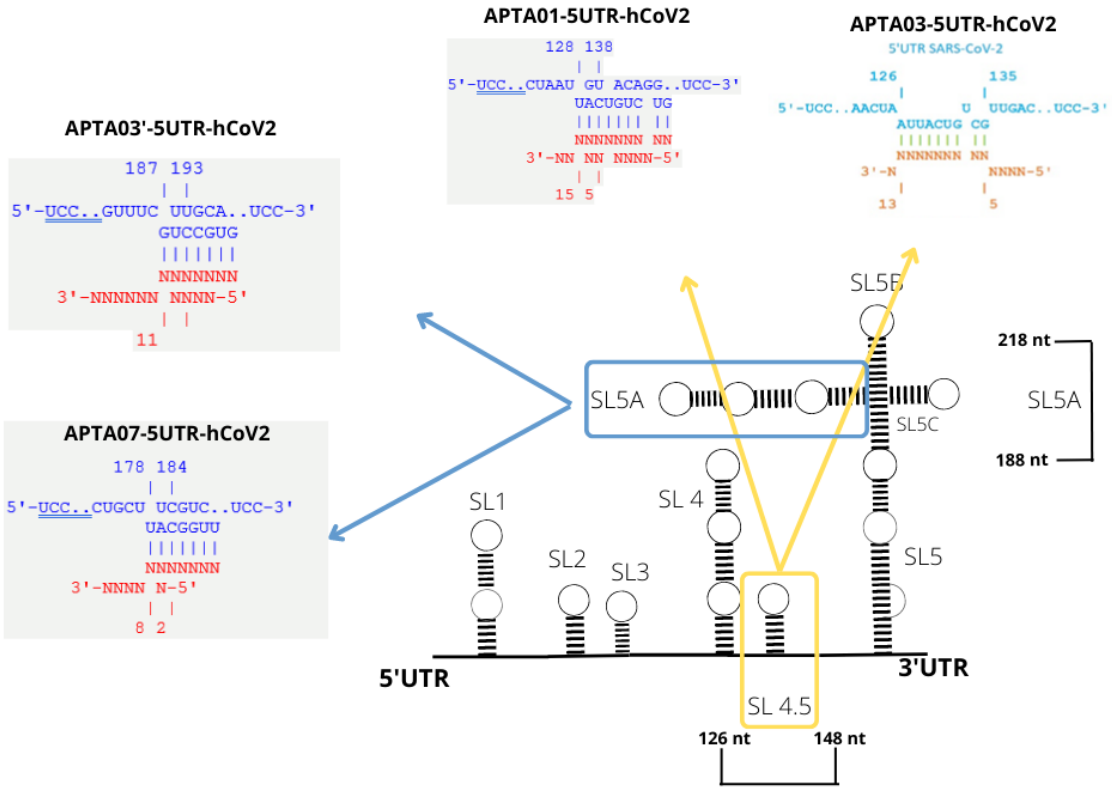

Figura 24: Quatro ligantes identificados em análise prévia de sequenciamento de aptâmeros do décimo segundo *round* e as respectivas regiões de interação dos ligantes a região 5'-UTR de SARS-CoV-2.

De acordo com as pesquisas, nesta região é encontrada uma estrutura conservada, uORF, caracterizada como região regulatória e que pode ser traduzida pelo ribossomo do hospedeiro (ORR et al., 2020). Segundo MIAO et al. (2021) a localização e a sequência de uAUG são conservadas, sendo que em algumas variantes, o codon de parada UAA é modificado, mas o uORF está presente e conservado em todas as variantes. Estudos futuros são essenciais para entender o mecanismo de iniciação da tradução viral determinada pelas estruturas secundárias da região 5'-UTR e especificamente a uORF (MIAO et al., 2021).

De modo semelhante, os motivos lineares dos aptâmeros Apta03'-5UTR-hCoV-2 e Apta07-5UTR-hCoV-2 (Figura 24) interagiram com os nucleotídeos 187-193 e 178-184, respectivamente, correspondentes a SL5a da 5'-UTR de SARS-CoV-2. O SL5, localizado entre os nucleotídeos 150 e 265 (MIAO et al., 2021), apresenta envolvimento no empacotamento viral dos βCoVs,

contém o codon de início AUG para ORF1ab, que codifica a poliproteína replicase/transcriptase viral, além de penta*loops* no SL5a e SL5b e um tetra*loop* no SL5c (CHEN e OLSTHOORN, 2010; MIAO et al., 2021).

Através dos estudos de MIAO et al. (2021), o SL5a, localizado entre os nucleotídeos 183 e 227, é uma região estruturalmente estável que não é cortada pela RNase T1 em condições desnaturantes, contendo 10 pares de bases GC, provavelmente explicando sua resistência à digestão de RNase T1 mesmo em condições desnaturantes. O mecanismo usado pelo vírus ainda é desconhecido e uma questão importante a ser investigada seria a função do SL5 (SL5a, SL5b, SL5c) no mecanismo envolvendo a tradução da poliproteína de SARS-CoV-2, a partir do codon de início AUG subgenômico posicionado após SL5c, a partir do nucleotídeo A266 (WACKER et al., 2021).

De acordo com MIAO et al. (2021) é possível que a tradução viral utilize todos esses mecanismos em fases distintas do processo infeccioso. Uma vez que a região 5'-UTR é considerada como essencial ao processo de replicação e/ou transcrição dos vírus, principalmente diante da ligação específica de proteínas dos hospedeiros para completar o ciclo viral. Assim, estes resultados indicam que os aptâmeros aqui selecionados podem regular regiões conservadas de *stem-loop* na estrutura da 5'-UTR de SARS-CoV-2, cuja pesquisa abre caminhos para mais estudos na compreensão de suas funções no ciclo da infecção viral e podem ser potenciais voltados a estudos da expressão de genes dos vírus, em proposição de novas terapias bem como adaptação em plataformas diagnósticas.

6- Considerações Finais

Tecnologias emergentes utilizam aptâmeros devido a boa especificidade, sensibilidade, baixo custo, detecção, repetibilidade, reutilização e vem sendo aplicadas em diferentes plataformas teranósticas nas doenças causadas por patógenos bacterianos, protozoários e virais. Aptâmeros são usados como ligantes específicos de patógenos para capturar e facilitar a detecção, no sangue, de *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium* e *Leishmania*. Estudos envolvendo aptâmeros podem ser direcionadas a antígenos de superfície ou células inteiras de bactérias, como por exemplo *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*. Outras aplicações potenciais podem ser realizadas no diagnóstico de infecções virais, como vírus HIV-1, vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), papiloma vírus humano (HPV), vírus influenza, norovírus ou SARS-CoV (LI et al., 2020a).

As pesquisas sobre o vírus da dengue, de CNOSSEN et al. (2017), mostraram o enriquecimento de aptâmeros selecionados através de análises por *dot-blot* e predição, *in silico,* das estruturas secundárias, demonstrando a afinidade e especificidade dos ligantes para todos os sorotipos dos vírus da dengue. Este trabalho é do nosso grupo de pesquisa e foi citado pela Organização Mundial de Saúde, em seu boletim de número 41 de 2020, a qual elencou os aptâmeros como promissoras moléculas teranósticas para a dengue, cujo agente etiológico é também um vírus de RNA senso positivo (WHO, 2020c).

De modo semelhante, infere-se que a ligação dos aptâmeros aqui obtidos em relação à região 5’-UTR de SARS-CoV-2 tem a capacidade de modificar a conformação da região alvo, especificamente nas regiões SL4.5 e SL5a podendo levar, *in vitro,* e, *in vivo*, a alterações nessa região, já descrita como vital para o ciclo de vida viral. Além disso, as proteínas do hospedeiro ou do próprio vírus associadas a replicação e transcrição viral por interação com a 5’-UTR podem sofrer pertubações de interação pelos aptâmeros, os quais podem alterar a afinidade de interações de forma competitiva a esta região, visto que é considerada ser essencial e bem mais estruturada para recrutar elementos transcricionais e pós-transcricionais do hospedeiro (VANDELLI et al., 2020).

Os resultados aqui alcançados poderão contribuir com estudos dos possíveis ligantes a 5’-UTR de SARS-CoV-2, podendo ser utilizados como

ferramentas diagnósticas e/ou terapêuticas, pois a interação do aptâmero com o alvo pode levar a uma mudança conformacional do vírus e desta forma, impedir ou dificultar a interação da 5’-UTR com as proteínas do hospedeiro e interferir na replicação do vírus. Dentre as perspectivas futuras estão as análises das estruturas secundárias dos aptâmeros, juntamente com as condições de estabilidade das sequências obtidas e possível síntese das moléculas selecionadas para realização de futuros testes moleculares e celulares.

7-Referências

ABDULJALI, J. M. & ABDULJALI, B. M. “Epidemiology, genome and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view”. *New Microbes and New Infections*., 35: 100672, **2020**.

AHMAD, S.; WAHEED, Y.; ISMAIL, S.; ABBASI, S. W. & NAJMI, M. H. “A computational study to disclose potential drugs and vaccine ensemble for COVID-19 conundrum”. *Journal of molecular liquids*., 324: 114734, **2021**.

AHN, D. G.; JEON, I. J.; KIM, J. D.; SONG, M. S.; HAN, S. R.; LEE, S. W.; JUNG, H. & OH, J. W. “RNA aptamer-based sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein”. *Analyst*., 134: 1896-1901, **2009**.

ALMEIDA, J. O.; DE OLIVEIRA, V. R. T.; AVELAR, J. L. S.; MOITA, B. S. & LIMA, L. M. “COVID-19: Fisiopatologia e Alvos para Intervenção Terapêutica”. *Rev. Virtual Quim*., 12:(6), **2020**.

ANDERSEN, K.G.; RAMBAUT, A.; LIPKIN, W.I.; HOLMES, E. C. & GARRY, R. F. “The proximal origin of SARS-CoV-2”. *Nature Medicine*., 26(4): 450–452, **2020**.

ANDREWS, R. J.; PETERSON, J.M.; HANIFF, H.S.; CHEN, J.; WILLIAMS, C.; GREFE, M.; DISNEY, M.D. & MOSS, W.N. “An in silico map of the SARS-CoV-2 RNA Structurome”. *BioRxiv*., **2020**.

Applied Biosystems-Quantitative Analysis of the PCR Reaction, 2021< http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_042487.pdf>Acesso em: 12 de novembro de 2021.

Applied Biosystems- Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR, 2021. < https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/cms_042486.pdf> Acesso em: 15 de dezembro de 2021.

AVCI-ADALI, M.; PAUL, A.; WILHELM, N.; ZIEMER, G.; WENDEL, H. P. “Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation”. *Molecules*, 15: 1-11, **2010**.

AZHAR, E.I.; EL-KAFRAWY, S.A.; FARRAJ, S.A.; HASSAN, A.M.; AL-SAEED, M.S.; HASHEM, A.M. & MADANI, T.A. “Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus”., *N Engl J Med*., 370: 2499-505, **2014**.

BABENDURE, J.R.; BABENDURE, J.L.; DING, J.H. & TSIEN, R. Y. “Control of mammalian translation by mRNA structure near caps”. *RNA*., 12: 851-861, **2006**.

BALDASSARRE, A.; PAOLINI, A.; BRUNO, S. P.; FELLI, C.; TOZZI, A. E. & MASOTTI, A. “Potential use of noncoding RNAs and innovative therapeutic strategies to target the 5’-UTR of SARS-CoV-2”. *Epigenomics*., 12: 1349–1361, **2020**.

BANERJEE, S. & NILSEN-HAMILTON, M. “Aptamers for Infectious Disease Diagnosis. In E. Coli Infections-Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment”. *IntechOpen*., **2019**.

BÁRCENA, M.; OOSTERGETEL, G.T.; BARTELINK, W.; FAAS, F.G.; VERKLEIJ, A.; ROTTIER, P.J.; KOSTER, A. J.; & BOSCH, B.J. “Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: insights into the structure of the coronavirion”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*., 106: 582-587, **2009**.

BECKETT D. “Specificity and selectivity in post-translational biotin addition”. *Biochemical Society transactions*, 46: 1577–1591, **2018**.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL | Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde, 2022. Disponível em:< https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-no-98-boletim-coe-coronavirus.pdf/view Acesso em: 20 de abril de 2022.

BRIAN, D. A. & BARIC, R. S. “Coronavirus Genome Structure and Replication. Em: Enjuanes L. (eds) Coronavirus Replication and *Reverse* Genetics”. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg., 287: 1-30, **2005**.

BROWN, C.G.; NIXON, K.S.; SENANAYAKE, S.D. & BRIAN, D.A. “An RNA stem-loop within the bovine coronavirus nsp1 coding region is a cis-acting element in defective interfering RNA replication”. *J. Virol*., 81: 7716–7724, **2007**.

BYUN, J. “Recent Progress and Opportunities for Nucleic Acid Aptamers”. *Life*, 11: 193, **2021**.

CASCELLA, M.; RAJNIK, M.; CUOMO, A.; DULEBOHN, S. C. & DI NAPOLI, R. “Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19)”. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. *StatPearls*., 2020.

CASTRIGNANO, S.B.; DERGOVICS, F. L. & NAGASSE-SUGAHARA, T.K. “Preparo de DNA para reação de sequenciamento: comparação entre duas técnicas”. Bol Inst Adolfo Lutz., 25(1): 9-11, **2015**.

Centers for Disease Control and Prevention. Research use only 2019-novel Coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR primer and probe information, 2020. < https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-detection-instructions.html > Acesso em: 20 de março de 2020.

CHAN, J.F.; 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*., 9: 221-236, **2020**.

CHEN, SC. & OLSTHOORN, R. CL. “Group-specific structural features of the 5'-proximal sequences of coronavirus genomic RNAs”. *Virology*., 401(1): 29-41, **2010**.

CITARTAN, M.; TANG, T. H.; TAN, S. C.; HOE, C. H.; SAINI, R.; TOMINAGA, J. & GOPINATH, S. C. “Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production”. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*., 34(2): 125-131, **2012**.

CLERI, F.; LENSINK, M. F. & BLOSSEY, R. “DNA Aptamers Block the Receptor Binding Domain at the Spike Protein of SARS-CoV-2”. *Frontiers in molecular biosciences*., 8: **2021**.

CNOSSEN, E. DE J. N. Seleção e caracterização de aptâmeros de RNA ligantes à região 5’-UTR do genoma do vírus da dengue. Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química - UFG, 2014. Dissertação de Mestrado. 71-75 p.

CNOSSEN, E. J. N.; SILVA, A. G.; MARANGONI, K.; ARRUDA, R. A. R.; SOUZA, E. G.; SANTOS, F. A. A.; FUJIMURA, P. T.; YOKOSAWA, J.; GOULART, L. R. & NEVES, A. F. “Characterization of oligonucleotide aptamers targeting the 5’-UTR from dengue vírus”. *Future Medicinal Chemistry*.; 9(6): 541-552, **2017**.

DEVI, A. & CHAITANYA, N. S. “Designing of peptide aptamer targeting the receptor-binding domain of spike protein of SARS-CoV-2: an in silico study”. *Molecular Diversity*., 1-13, **2021**.

DHARAVATH, B.; YADAV, N.; DESAI, S.; SUNDER, R.; MISHRA, R.; KETKAR, M.; BHANSHE, P.; GUPTA, A.; REDHU, A.K.; PATKAR, N.; DUTT, S.; GUPTA, S. & DUTT, A. “A one-step, one-tube real-time RT-PCR based assay with an automated analysis for detection of SARS-CoV-2”. *Heliyon*., 6(7): e04405, **2020**.

DHIMAN, A.; KALRA, P.; BANSAL, V.; BRUNO, J.G. & SHARMA, T.K. “Plataformas de diagnóstico point-of-care baseadas em aptamer”. Sensors and Actuators B: *Chemical*., 246: 535-553, **2017**.

DORRAJ, G. S.; RASSAEE, M. J.; LATIFI, A. M.; PISHGOO, B. & TAVALLAEI, M. “Selection of DNA aptamers against Human Cardiac Troponin I for colorimetric sensor based dot blot application”. *Journal of biotechnology*., 208: 80-86, **2015**.

ELLINGTON, A.D. & SZOSTAK, J.W. “In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands”. *In: Nature*., 346: 822, **1990**.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. “Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis”. *In Coronaviruses*., 1282: 1-23, **2015**.

FERREIRA, I. M.; DE SOUSA LACERDA, C. M.; DOS SANTOS, S. R.; DE BARROS, A. L. B.; FERNANDES, S. O.; CARDOSO, V. N. & DE ANDRADE, A. S. R. “Detection of bacterial infection by a technetium-99m-labeled peptidoglycan aptamer”. *Biomedicine & Pharmacotherapy*., 93: 931-938, **2017**.

FERRO, A. B. Imunohistoquímica. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL), 2014.

Freiburg RNA Tools IntaRNA – Results, 2022 < https://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp > Acesso em: 20 de junho de 2022.

FREITAS, A.R.R.; GIOVANETTI, M. & ALCANTARA, L.C.J. “Variantes emergentes do SARS-CoV-2 e suas implicações na saúde pública”. *InterAmerican Journal of Medicine and Health*., 4: 1-8, **2021**.

GLOWACKA, I.; BERTRAM, S.; HERZOG, P.; PFEFFERLE, S.; STEFFEN, I.; MUENCH, M.O.; SIMMONS, G.; HOFMANN, H.; KURI, T.; WEBER, F.; EICHLER, J.; DROSTEN, C. & POHLMANN. S. “Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63”. *Journal of virology*., 84(2): 1198-1205, **2010**.

GOEBEL, S.J.; MILLER, T.B.; BENNETT, C.J.; BERNARD, K.A. & MASTERS, P.S. “A hypervariable region within the 3cis-acting element of the murine coronavirus genome is nonessential for RNA synthesis but affects pathogenesis”. *J. Virol*., 81(3): 1274–1287, **2007**.

GUAN, Y.; ZHENG, B.J.; HE, Y.Q.; LIU, X.L.; ZHUANG, Z.X.; CHEUNG, C.L.; LUO, S.W.; LI, P.H.; ZHANG, L.J.; GUAN, Y.J.; BUTT, K.M.; WONG, K.L.; CHAN, K.W.; LIM, W.; SHORTRIDGE, K.F.; YUEN, K.Y.; PEIRIS, J.S.M. & POON, L.L.M. “Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China”. *Science*., 302: 276–278, **2003**.

GUIMARÃES, R. “Vacinas anticovid: um olhar da saúde coletiva”. *Ciência & Saúde Coletiva*., 25: 3579-3585, **2020**.

HE, B.; ZHANG, Y.; XU, L.; YANG, W.; YANG, F.; FENG, Y.; XIA, L.; ZHOU, J.; ZHEN, W.; FENG, Y.; GUO, H.; ZHANG, H. & TU, C. “Identification of diverse alphacoronaviruses and genomic characterization of a novel severe acute respiratory syndrome-like coronavirus from bats in China”. *J Virol*., 88(12): 7070–7082, **2014**.

HELMY, Y.A.; FAWZY, M.; ELASWAD, A.; SOBIEH, A.; KENNEY, S.P. & SHEHATA, A. A. “The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control”. *J Clin Med*., 9(4): 1225, **2020**.

HERMANN, T. & PATEL, D. J. “Adaptive recognition by nucleic acid aptamers”. *Science*., 287(5454): 820-825, **2000**.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; KRÜGER, N.; HERRLER, T.; ERICHSEN, S.; SCHIERGENS, T.S.; HERRLER, G.; WU, N.H.; NITSCHE, A.; MÜLLER, M.A.; DROSTEN, C. & PÖHLMANN, S. “SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor”. *Cell*., 181(2): 271-280, **2020**.

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P. & SHI, ZL. “Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19”. *Nat Rev Microbiol*., 19(3): 141–154, **2021**.

HUANG, C.; LOKUGAMAGE, K. G.; ROZOVICS, J. M.; NARAYANAN, K.; SEMLER, B. L. & MAKINO, S. “SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage”. *PLoS Pathog*., 7(12): e1002433, **2011**.

HUSTON, N. C.; WAN, H.; STRINE, M.S.; TAVARES, R.D.C.A.; WILEN, C.B. & PYLE, A. M. “Comprehensive in vivo secondary structure of the SARS-CoV-2 genome reveals novel regulatory motifs and mechanisms”. *Molecular Cell*., 81(3): 584- 598, **2021**.

JIN, Y.; YANG, H.; JI, W.; WU, W.; CHEN, S.; ZHANG, W., & DUAN, G. “Review Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19”. *Viruses*., 12(4): 372, **2020**.

JOHN HOPKINS UNIVERSITY & MEDICINE. Centro de Recursos de Coronavírus: Painel COVID-19 do Centro de Ciência e Engenharia de Sistemas (CSSE) da Universidade Johns Hopkins (Jhu), 2021. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> Acesso em: 26 de julho de 2022

KADAM, S.B.; SUKHRAMANI, G.S; BISHNOI, P.; PABLE, A.A. & BARVKAR, V.T. “SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: molecular and structural insights”. *J Basic Microbiol*., 61(3): 180-202, **2021**.

KANWAR, J.R.; MOHAN, R.R.; KANWAR, R.K.; ROY, K. & BAWA, R. “Applications of aptamers in nanodelivery systems in cancer, eye and inflammatory diseases”. *Nanomedicine*., 5: 1445, **2010**.

KHAILANY, R. A.; SAFDAR, M. & OZASLAN, M. “Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2”. *Gene reports*., 19: 100682, **2020**.

KIM, J. S.; JANG, J. H.; KIM, J. M.; CHUNG, Y. S.; YOO, C. K. & HAN, M. G. “Genome-Wide Identification and Characterization of Point Mutations in the SARS-CoV-2 Genome”. *Osong public health and research perspectives*., 11(3): 101–111, **2020**.

KOLM, C.; CERVENKA, I.; ASCHL, U. J.; BAUMANN, N.; JAKWERTH, S.; KRSKA, R.; MACH, R. L.; SOMMER, R.; DEROSA, M. C.; KIRSCHNER, A.; FARNLEITNER, A. H. & REISCHER, G. H. “DNA aptamers against bacterial cells can be efficiently selected by a SELEX process using state-of-the art qPCR and ultra-deep sequencing. *Scientific reports*., 10(1): 20917, **2020**.

KUDO, E.; ISRAELOW, B.; VOGELS, C.B.; LU, P.; WYLLIE, A.L.; TOKUYAMA, M.; VENKATARAMAN, A.; BRACKNEY, D.E.; OTT, I.M.; PETRONE, M.E.; EARNEST, R.; LAPIDUS, S.; MUENKER, M.C; MOORE, A.J.; CASANOVAS-MASSANA, A.; OMER, S.B.; DELA CRUZ, C. S.; FARHADIAN, A.; GRUBAUGH, N.D. & IWASAKI, A. “Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RT-qPCR.” *PLoS biology*., 18(10): e3000867, **2020**.

KUMAR, S.; NYODU, R.; MAURYA, V.K. & SAXENA, S.K. “Morphology, genome organization, replication and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)”. *Doença de Coronavírus 2019* (COVID-19)., 23, **2020**.

LAKSHMIPRIYA, T.; GOPINATH, S. C. & TANG, T. H. “Biotin-Streptavidin Competition Mediates Sensitive Detection of Biomolecules in Enzyme Linked Immunosorbent Assay”. *PloS one*., 11(3): e0151153, **2016**.

LANA, R. M.; COELHO, F. C.; GOMES, M. F. D. C.; CRUZ, O. G.; BASTOS, L. S.; VILLELA, D. A. M. & CODEÇO, C. T. “Emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva”, *Cadernos de Saúde Pública*., 36: e00019620, **2020**.

LARA, F. J.S. Hibridação de Ácidos Nucleicos, 2ª Edição. Ribeirão Preto: Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Genética. 2002.

LAW, H.K.; CHEUNG, C.Y.; NG, H.Y.; SAI, S.F.; CHAN, Y.O.; LUK, W.; NICHOLLS, J.M.; PEIRIS, J.S. & LAU, Y.L. “Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells”. *Blood*., 106(7): 2366-74, **2005**.

LI, H. Y.; JIA, W. N.; LI, X. Y.; ZHANG, L.; LIU, C. & WU, J. “Advances in detection of infectious agenucleotídeos by aptamer-based Technologies”. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1): 1671-1681, **2020a**.

LI, X.; GENG, M.; PENG, Y.; MENG, L. & LU, S. “Molecular immune pathogenesisand diagnosis of COVID-19”. *Journal of Pharmaceutical Analysis*.,10(2): 102-108, **2020b**.

LIMA, A. R.; DE OLIVEIRA MAIA, H. & DE SOUZA BELO, P. K. “Caracterização epidemiológica dos casos de covid-19 no mundo e Brasil”. *Revista Cathedral*., 2(4): 61-73, **2020**.

LIU, K.; CHEN, Y.; LIN, R. & HAN, K. “Clinical feature of COVID-19 in elderly patienucleotídeos: a comparison with young and middle-aged patienucleotídeos”. *Journal of Infection*., 80(6): e14-e18, **2020a**.

LIU, P. & LEIBOWITZ, J. “RNA Higher-Order Structures Within the Coronavirus 5′ and 3′ Untranslated Regions and Their Roles in Viral Replication”. *Molecular Biology of the SARS-Coronavirus*., 47–61, **2010**.

LIU, P.; YANG, D.; CARTER, K.; MASUD, F. & LEIBOWITZ, J.L. “Functional analysis of the stem loop S3 and S4 structures in the coronavirus 3UTR”. *Virology*., 443(1): 40–47, **2013**.

LIU, P.; LI, L.; KEANE, SC.; YANG, D.; LEIBOWITZ, JL. & GIEDROC, DP. “Mouse hepatitis virus Stem-Loop 2 Adopts a uYNMG(U)a-Like Tetraloop Structure That Is Highly Functionally Tolerant of Base Substitutions”. *J Virol*., 83(23): 12084–12093, **2009**.

LIU, P.; LI, L.; MILLERSHIP, JJ.; KANG, H.; LEIBOWITZ, JL. & GIEDROC, DP. “A U-turn motif-containing stem–loop in the coronavirus 5′ untranslated region plays a functional role in replication. *RNA*., 13(5): 763-780, **2007**.

LIU, Y.; GAYLE, A.A.; WILDER-SMITH, A. & ROCKLÖV, J. “The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus”. *J Travel Med*., 1-4, **2020b**.

LIU, X.; WANG, Y. L.; WU, J.; QI, J.; ZENG, Z.; WAN, Q.; ZHENGHU, C.; MANANDHAR, P.; CAVENER, V.S.; BOYLE, N. R.; FU, X.; SALAZAR, E.; KUCHIPUDI, S,V.; KAPUR, V.; ZHANG, X.; UMETANI, M.; SEM, M.; WILSON, R.C.; CHEN, S-H. & ZU, Y. “Neutralizing aptamers block S/RBD-ACE2 interactions and prevent host cell infection”. *Angewandte Chemie International Edition*., 60(18): 10273-10278, **2021**.

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P.; YANG, B.; WU, H.;WANG, W.; CANÇÃO, H.; HUANG, B.; ZHU, N.; BI, Y.; MA, X.; ZHAN, F.; WANG, L.; HU, T.; ZHOU, H.; HU, Z.; ZHOU, W. & TAN, W. “Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding”. *The lancet*., 395(10224): 565-574, **2020**.

LUCAS, V.A.; JULIÃO, J.A.S.; LIMA, I.L.; ARAÚJO, T.G.; NEVES, A.F. & GOULART, L.R. “SARS-CoV-2 genome RNA detection based on multiplex Real-Time RT-PCR assay”. *J Health Biol Sci*.,10(1): 1-7, **2022**.

MADHUGIRI, R.; FRICKE, M.; MARZ, M. & ZIEBUHR, J. “RNA structure analysis of alphacoronavirus terminal genome regions”. *Virus Res*., 194: 76-89, **2014**.

MADHUGIRI, R.; KARL, N.; PETERSEN, D.; LAMKIEWICZ, K.; FRICKE, M.; WEND, U.; SCHEUER, R.; MARZ, M. & ZIEBUHR J. “Structural and functional conservation of cis-acting RNA elemenucleotídeos in coronavirus 5′-terminal genome regions”. *Virology*., 517: 44–55, **2018**.

MAGALHÃES, M. LB.; BYROM, M.; YAN, A.; KELLY, L.; LI, N.; FURTADO, R.; PALLISER, D.; ELLINGTON, A.D. & LEVY, M. “A general RNA motif for cellular transfection”. *Molecular Therapy*., 20(3): 616-624, **2012**.

MARANGONI, K. “Desenvolvimento e caracterização de aptâmeros ligantes específicos ao gene PCA3 e implicações na modulação da expressão gênica de células tumorais transfectadas”. Uberlândia-MG, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica- UFU, 2011. Tese de Doutorado, 21 p.

MARANGONI, K.; NEVES, A.F.; ROCHA, R.M.; FARIA, P.R.; ALVES, P.T.; SOUZA, A.G.; FUJIMURA, P.R.; SANTOS, F.A.A.; ARAÚJO, T.G.; WARD, L.S. & GOULART, L.R. “Prostate-specific RNA aptamer: promising nucleic acid antibody-like cancer detection”. *Scientific reports*., 5(1): 1-13, **2015**.

MCBRIDE, R.; VAN ZYL, M. & FIELDING, B.C. “The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein”. *Viruses*., 6(8): 2991–3018, **2014**.

MEMISH, Z. A.; COTTEN, M.; MEYER, B.; WATSON, S.J.; ALSAHAFI, A.J.; RABEEAH, A., A.AL.; CORMAN, V.M.; SIEBERG, A.; MAKHDOOM, H.Q.; ASSIRI, A.; MASRI, M.AL.; ALDABBAGH, S.; BOSH, B-J.; BEER, M.; MULLER, M.A.; KELLAM, M.A.; DROSTEN, C. “Human infection with MERS coronavirus after exposure to infected camels, Saudi Arabia”. *Emerging infectious diseases*., 20 (6): 1012, **2013**.

MIAO, Z.; TIDU, A.; ERIANI, G. & MARTIN, F. “Secondary structure of the SARS-CoV-2 5’-UTR”. RNA biology., 18(4): 447–456, **2021**.

MIYAZAKI, Y. & FUJITA, M. “Commentary on aptamers for virus research”. *Front. Microbio*., 3: 52, **2012**.

MOHAMMADI-DEHCHESHMEH, M.; MOGHBELI, S.M.; RAHIMIRAD, S.; ALANAZI, I.O.; SHEHRI, Z.S.A.& EBRAHIMIE, E. A. “Transcription Regulatory Sequence in the 5 'Untranslated Region of SARS-CoV-2 Is Vital for Virus Replication with an Altered Evolutionary Pattern against Human Inhibitory MicroRNAs”. *Cells*., 10(2): 319, **2021**.

MOREIRA, A. E.; GASPAR, J. O. & KUNIYUKI, H. “Detecção do Grapevine virus A e Grapevine virus B por hibridação" dot-blot" com sondas moleculares não radioativas”. *Fitopatologia Brasileira*., 30, 538-542, **2005**.

MOUSAVIZADEH, L. & GHASEMI, S. “Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis”. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*., 54(2): 159-163, **2021**.

MUKHERJEE, M. & GOSWAMI, S. “Global cataloguing of variations in untranslated regions of viral genome and prediction of key host RNA binding protein-microRNA interactions modulating genome stability in SARS-CoV-2”. *PLoS One*., 15(8): e0237559, **2020**.

NAVECA, F.; NASCIMENTO, V.; SOUZA, V.; CORADO, A.; NASCIMENTO, F.; COSTA, A.; DUARTE, D.; SILVA, G.; MEJLA, M.; PESSOA, K.; GONÇALVES, L.; BRANDÃO,M. J.; JESUS, M.; FERNANDES, C.; PINTO, R.; SILVA, M.; MATTOS, T.; WALLAU, G. L.; SIQUEIRA, M.M.; RESENDE, P. C.; DELATORRE, E.; GRAF, T.; BELLO, G. “Phylogenetic relationship of SARS-CoV-2 sequences from Amazonas with emerging Brazilian varianucleotídeos harboring mutations E484K and N501Y in the Spike protein”. *Virological. Org*., 1: 1-8, **2021**.

NG, E.W.; SHIMA, D.T.; CALIAS, P.; CUNNINGHAM, E.T.JR.; GUVER, D.R. & ADAMIS, A.P. “Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease”. *In: Nat Rev Drug Discov*., 5: 132, **2006**.

OLIVEIRA, M. C. de S.; REGITANO, L. C. de A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCINIO, E. do; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMOTEO, W. H. B.; BELICUAS, S. N. J. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. EMPRAPA 2007.

ORR, M.W.; MAO, Y.; STORZ, G.; QIAN, S-B. “Fs and small ORFs: shedding light on the dark proteome”. *Nucleic Acids Res*., 48(3):1029–1042, **2020**.

PADEN, C. R.; YUSOF, M. F. B. M.; AL HAMMADI, Z. M.; QUEEN, K.; TAO, Y.; ELTAHIR, Y. M.; ISSA, Z.B.; PRADEEP, K.; ELSALEH, F.N.; IMAMBACCUS, H.; SASSE, J.; WEBER, S.; SHI, M.; ZHANG, J.; PHAN, H.; KIM, L.; HALL, A. J.; GERBER, S.I.; HOSANI, FI. AL.; TONG, S. & AL MUHAIRI, S. S. M. “Zoonotic origin and transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the UAE”. *Zoonoses and public health*., 65(3): 322-333, **2018**.

PAL, M.; BERHANU, G.; DESALEGN, C. & KANDI, V. “Severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An update”. *Cureus*., 12(3): **2020**.

PAPANIKOLAOU, V.; CHRYSOVERGIS, A.; RAGOS, V.; TSIAMBAS, E.; KATSINIS, S.; MANOLI, A.; PAPOULIAKOS, S.; ROUKAS, D.; MASTRONIKOLIS, S.; PESCHOS, D.; BATISTATOU, A.; KYRODIMOS, E.; MASTRONIKOLIS, N. “From Delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined varianucleotídeos”. *Gene*., 814: 146134, **2022**.

PARASHAR, N. C.; PODDAR, J.; CHAKRABARTI, S. & PARASHAR, G. “Repurposing of SARS-CoV nucleocapsid protein specific nuclease resistant

RNA aptamer for therapeutics against SARS-CoV-2". *Infection, Genetics and Evolution*., 85: 104497, **2020**.

PEIRIS, J.S.; CHU, C.M.; CHENG, V.C.; CHAN, M.R.; HUNG, I.F.; POON DPHIL, L.L.; LAW, K.I.; TANG, B.S.; HON, T.Y.; CHAN, C.S.; CHAN, K.H.; NG, J.S.; ZHENG, B.J.; NG, W.L.; LAI, R.W.; GUAN, Y. & YUEN, K.Y. "Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study". *Lancet*., 361(9371): 1767-1772, **2003**.

PETRILLO, S.; CARRÀ, G.; BOTTINO, P.; ZANOTTO, E.; DE SANTIS, M.C.; MARGARIA, J.P.; GIORGIO, A.; MANDILI, G.; MARTINI, M.; CAVALO, R.; BARBERIO, D. & ALTRUDA, F. "A Novel Multiplex qRT-PCR Assay to Detect SARS-CoV-2 Infection: High Sensitivity and Aumented Testing Capacity." *Microorganisms*., 8(7): 1064, **2020**.

PLANT, E. P. & DINMAN, J. D. "The role of programmed-1 ribosomal frameshifting in coronavirus propagation". *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*.,13: 4873, **2008**.

Quantitative Analysis of the PCR Reaction

RAHIMI, A.; MIRZAZADEH, A. & TAVAKOLPOUR, S. "Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection". *Genomics*, 113(1): 1221–1232, **2021**.

RANGAN, R.; WATKINS, A. M.; CHACON, J.; KRETSCH, R.; KLADWANG, W.; ZHELUDEV, I. N.; TOWNLEY, J.; RYNGE, M.; THAIN, G. & DAS, R. "De novo 3D models of SARS-CoV-2 RNA elemenucleotídeos from consensus experimental secondary structures". *Nucleic acids research*., 49 (6): 3092–3108, **2021**.

RANGAN, R.; ZHELUDEV, IN.; HAGEY, R.J.; PHAM, E.A.; WAYMENT-STEELE, H.K. & GLENNJS, DAS. R. "RNA genome conservation and secondary structure in SARS-CoV-2 and SARS-related viruses: a first look". *RNA*., 26: 937–959, **2020**.

RAY, P. & WHITE, R. R. "Aptamers for targeted drug delivery". *Pharmaceuticals*., 3(6): 1761-1778, **2010**.

ROBERTSON, D. L. & JOYCE, G. F. "Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA". *Nature*., 344: 467-468, **1990**.

ROH, C. & JO, S. K. "Quantitative and sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein using quantum dots-conjugated RNA aptamer on chip". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*., 86(12): 1475-1479, **2011**.

ROTA, PA.; OBERSTE, MS.; MONROE, SS.; NIX, WA.; CAMPAGNOLI, R.; ICENOGLE, JP.; PENARANDA, S.; BANKAMP, B.; MAHER, K.; CHEN, MH.;

TONG, S.; TAMIN, A.; LOWE, L.; FRACE, M.; DERISI, JL.; CHEN, Q.; WANG, D.; ERDMAN, DD.; PERET, TC.; BURNS, C.; KSIAZEK, TG.; ROLLIN, PE.; SANCHEZ, A.; LIFFICK, S.; HOLLOWAY, B.; LIMOR, J.; MCCAUSTLAND, K.; OLSEN-RASMUSSEN, M.; FOUCHIER, R.; GUNTHER, S.; OSTERHAUS, AD.; DROSTEN, C.; PALLANSCH, MA.; ANDERSON, LJ. & BELLINI, WJ. "Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome". *Science*., 300(5624): 1394–1399, **2003**.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, DW. "Molecular cloning - a laboratory manual". 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001.

SANCHEZ DE GROOT, N.; ARMAOS, UMA.; GRAÑA-MONTES, R.; ALRIQUET, M.; CALLONI, G.; VABULAS, R.M. & TARTAGLIA, G.G. "RNA structure drives interaction with proteins". *Nat. Comum*., 10: 3246, **2019**.

SANTOS, S.R. Avaliação de aptâmetos marcados ^{99m}Tc para identificação de focos infecciosos de *Staphylococcus aureus*. Belo Horizonte-MG, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais CDTN, 2014. Dissertação de Mestrado, 43 p.

SAWICKI, S. G.; SAWICKI, D. L. & SIDDELL, S. G. "A contemporary view of coronavirus transcription". *Journal of virology*, 81(1): 20-29, **2007**.

SENGER, M. R.; EVANGELISTA, T. C. S.; DANTAS, R. F.; SANTANA, M. V. D. S.; GONÇALVES, L. C. S.; DE SOUZA NETO, L. R.; FERREIRA, S.B.& SILVA-JUNIOR, F. P. "COVID-19: molecular targets, drug repurposing and new avenues for drug Discovery". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*., 115, **2020**.

SCHMITZ, A.; WEBER, A.; BAYIN, M.; BREUERS, S.; FAMULOK, M. & MAYER, G. "A SARS-CoV-2 spike binding DNA aptamer that inhibits pseudovirus infection in vitro by an RBD independent mechanism". *Angew.Chem.Int.Ed*., 60(18): 10279–10285, **2021**.

SHARMA, I.; KUMARI, P.; SHARMA, A. & SAHA, S. C. "SARS-CoV-2 and the reproductive system: known and the unknown.!!" Middle East Fertility Society Journal., 26(1): 1-9, 2021.

SHEN, Z.; XIAO, Y.; KANG, L.; MA, W.; SHI, L.; ZHANG, L.; ZHOU, Z.; YANG, J.; ZHONG, J.; YANG, D.; GUO, L.; ZHANG, G.; LI, H.; XU, Y.; CHEN, M.; GAO, Z.; WANG, J.; REN, L. & LI, M. "Genomic Diversity of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2 in Patienucleotídeos With Coronavirus Disease 2019". Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America., 71(15): 713–720, **2020**.

SHEREEN, M. A.; KHAN, S.; KAZMI, A.; BASHIR, N.; SIDDIQUE, R. "COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses". *Journal of Advanced Research*., 24: 91-98, **2020**.

SHI, Z. & HU, Z. “A review of animal reservoir studies of the SARS coronavirus”. *Virus Res*., 133(1): 74–87, **2008**.

SILVA, A. G. Isolamento de aptâmeros ligantes à sequência 3’-UTR do RNA do vírus da dengue. Catalão-GO, Programa de Pós-Graduação em Química-UFG/RC, 2015. Dissertação de Mestrado, 25 p.

SILVA, A. G. & NEVES, A. F. “Aplicabilidade dos Aptâmeros de Oligonucleotídeos”. *Revista Processsos Químicos*., 13(26): 113-118, **2019**.

SOLA, I.; ALMAZÁN, F.; ZÚÑIGA, S. & ENJUANES, L. “Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses”. *Annual review of virology*., 2(1): 265–288, **2015**.

SONG, Y.; SONG, J.; WEI, X.; HUANG, M.; SUN, M.; ZHU, L. LIN, B.; SHEN, H.; ZHU, Z. & YANG, C. “Discovery of aptamers targeting the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein”. *Analytical Chemistry*., 92(14): 9895-9900, **2020**.

ŚPIBIDA, M.; KRAWCZYK, B.; OLSZEWSKI, M. & KUR, J. (2017). “Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting”. *Journal of Applied genetics*., 58 (1): 133-142, **2017**.

SQUEGLIA, F.; ROMANO, M..; RUGGIERO, A.; MAGA, G. & BERISIO, R. “Host DDX Helicases as Possible SARS-CoV-2 Proviral Factors: A Structural Overview of Their Hijacking Through Multiple Viral Proteins”. *Frontiers in ChemistryFrontiers Media S.A*., 8: **2020**.

SRIVASTAVA, R.; DAULATABAD, S. V.; SRIVASTAVA, M. & JANGA, S. C. “SARS-CoV-2 contributes to altering the post-transcriptional regulatory networks across human tissues by sponging RNA binding proteins and micro-RNAs”. *BioRxiv.*, **2020**.

STOLTENBURG, R.; REINEMANN, C. & STREHLITZ B. “SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands”. *Biomolecular engineering*., 24(4): 381-403, **2007**.

STRACHAN, T. & READ, A. “Genética molecular e Humana. Editora Artmed, 4ª Edição., 192-195, 2013.

SUN, L.; LI, P.; JU, X.; RAO, J.; HUANG, W.; REN, L.; ZHANG, T.X.; XU, K.; ZHOU, X.; GONG, M.; MISKA, E.; DING, Q.; WANG, J. & ZHANG, Q. C. “In vivo structural characterization of the SARS-CoV-2 RNA genome identifies host proteins vulnerable to repurposed drugs”. *Cell*., 184(7): 1865- 1883, **2021a**.

SUN, M.; LIU, S.; WEI, X.; WAN, S.; HUANG, M.; SONG, T.; LU, Y.; WENG, X.; LIN, Z.; CHEN, H.; SONG, Y. & YANG, C. “Aptamer Blocking Strategy Inhibits SARS-CoV-2 Virus Infection”. *Angewandte Chemie*., 133(18): 10354-10360, **2021b**.

TANAKA T.; KAMITANI W.; DEDIEGO M.L.; ENJUANES L. & MATSUURA Y. “Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 facilitates efficient propagation in cells through a specific translational shutoff of host Mrna”. *J. Virol*., 86: 11128–11137, **2012**.

TANG, X.; WU, C.; LI, X.; SONG, Y.; YAO, X.; WU, X.; DUAN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; QIAN, Z.; CUI, J.; LU, J. “On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2”. *Nacional Science Review*., 7(6): 1012–1023, **2020**.

TEGALLY, H.; WILKINSON, E.; GIOVANETTI, M.; IRANZADEH, A.; FONSECA, V.; GIANDHARI, J.; DOOLABH, D.; PILLAY, SAN, E.J.; MSOMI, N.; MLISANA, K.; GOTTBERG, A.V.; WALAZA, S.; ALLAM, M.; ISMAIL, A.; MOHALE, T.; GLASS, A.; ENGELBRECHT, S.; ZYL, G.V.; PREISER, W.; PETRUCCIONE, F.; SIGAL, A.; HARDIE, D.; MARAIS, G.; HSIAO, M.; KORSMAN, S.; DAVIES, M-A.; TYERS, L.; MUDAU, I.; YORK, D.; MASLO, C.; GOEDHALS, D.; ABRAHAMS, S.; LAGUNA-AKINGBA, O.; ALISOLTANI-DEHKORDI, A.; GODZIK, A.; WIBNER, C. K.; SEWELL, B. T.; LOURENÇO, J.; ALCANTARA, L.C.J.; POND, S.L.K.; WEAVER, S.; MARTIN, D.; LESSELLS, R.J.; BHIMAN, J. N.; WILLIAMSON, C. & OLIVEIRA, T. “Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa”. *MedRxiv*., **2020**.

THAO, T. T. N.; LABROUSSAA, F.; EBERT, N.; V’KOVSKI, F.; STALDER, H.; PORTMANN, J.; KELLY, J.; STEINER, S.; HOLWERDA, M.; KRATZEL, A.; GULTOM, M.; SCHMIED, K.; LALOLI, L.; HUSSER, L.; WIDER, M.; PFAENDER, S.; HIRT, D.; CIPPÀ, V.; CRESPO-POMAR, S.; SCHÖDER, S.; MUTH, D.; NIEMEYER, D.; CORMAN, V. M.; MULLER, M.A.; DROSTEN, C.; DIJKMAN, R.; JORES, J. & THIEL, V. “Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform”. Cold Spring Harbor Laboratory. *Nature*., 582(7813): 561-565, **2020**.

TIAN, R. Y.; LIN, C.; YU, S. Y.; GONG, S.; HU, P.; LI, Y. S.; WU, Z.C.; GAO, Y.; ZHOU, Y.; LIU, Z.S.; REN, H.L. & LU, S. Y. “Preparation of a specific ssDNA aptamer for brevetoxin-2 using SELEX”. *Journal of analytical methods in chemistry*., 2016: **2016**.

TROTTEIN, F. & SOKOL, H. “Potential causes and consequences of gastrointestinal disorders during a SARS-CoV-2 infection”. *Cell Reports*., 32: 107915, **2020**.

TUERK, C. & GOLD, L. “Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase”. *In: Science*., 249: 510, **1990**.

ULRICH, H. & WRENGER, C. “Disease-specific biomarker discovery by aptamers”. *CytometryA*., 75(9): 727-733, **2009**.

U.S National Library of Medicine. Clinical Trials.gov, 2022 <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Infectious+Disease&term=aptamers&cntry=&state=&city=&dist=> Acesso em: 27 de julho de 2022.

V'KOVSKI, P.; KRATZEL, A.; STEINER, S.; STALDER, H. & THIEL, V. "Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2". *Nature Reviews Microbiology*., 19(3): 155-170, **2021**.

VANDELLI, A.; MONTI, M.; MILANETTI, E.; ALEXANDROS ARMAOS, A.; RUPERT, J.; ZACCO, E.; BECHARA, E.; PONTI, R. D. & TARTAGLIA, G. G. "Structural analysis of SARS-CoV-2 genome and predictions of the human interactome". *Nucleic Acids Research*, 48(20): 11270–11283, **2020**.

VANKADARI, N.; JEYASANKAR, N. N. & LOPES, W. J. "Structure of the SARS-CoV-2 Nsp1/5'-Untranslated Region Complex and Implications for Potential Therapeutic Targets, a Vaccine, and Virulence". *The journal of physical chemistry letters*., 11(22): 9659–9668, **2020**.

VERMA, R.; SAHA, S.; KUMAR, S.; MANI, S.; MAITI, T. K. & SURJIT, M. "RNA-Protein Interaction Analysis of SARS-CoV-2 5′ and 3′ Untranslated Regions Reveals a Role of Lysosome-Associated Membrane Protein-2a during Viral Infection". *Msystems*., 6(4): e00643-21, **2021**.

VILLA, A.; BRUNIALTI, E.; DELLAVEDOVA, J.; MEDA, C.; REBECCHI, M.; CONTI, M.; DONNICI, L.; DE FRANCESCO, R.; REGGIANI, A.; LIONETTI, V. & CIANA, P. "DNA aptamers masking angiotensin converting enzyme 2 as an innovative way to treat SARS-CoV-2 pandemic". *Pharmacological research*., 175: 105982, **2022**.

VOLOCH, C. M.; DA SILVA FRANCISCO JR, R.; DE ALMEIDA, L. G.; CARDOSO, C. C.; BRUSTOLINI, O. J. GERBER, A. L.; GUIMARÃES, A.P.; MARIANI, D.; COSTA, R.M.; FERREIRA JR. O.C.; COVID19-UFRJ WORKGROUP, LNCC WORKGROUP, CAVALCANTI, A.C.; FRAUCHES, T.S.; MELLO, C. M.; LEITÃO, I. C.; GALLIEZ,R. M.; FAFFE, D.S.; CASTIÑEIRAS, T. MPP.; TANURI, A.; VASCONCELOS, A. T. R. "Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil". *Journal of virology*., 95(10): e00119-21, **2021**.

VOLZ, E.; BAGUELIN, M.; BHATIA, S.; BOONYASIRI, A.; CORI, A.; CUCUNUBÁ, Z.; CUOMO-DANNENBURG, G.; DONNELLY, C.A.; DORIGATTI, I.; FITZJOHN, R.; FU, H.; GAYTHORPE, K.; GHANI, A.; HAMLET, A.; HINSLEY, W.; IMAI, N.; LAYDON, D.; NEDJATI-GILANI, G.; OKELL, L.; RILEY, S.; VAN ELSLAND, S.; WANG, H.; WANG, Y.; XI, X. & FERGUSON, N. M. "Report 5: phylogenetic analysis of SARS-CoV-2". *MRC Cent. Glob. Infect. Dis. Anal*., **2020**.

WACKER, A.; WEIGAND, J. E.; AKABAYOV, S. R.; ALTINCEKIC, N.; BAINS, J. K.; BANIJAMALI, E.; BINAS, O.; CASTILLO-MARTINEZ, J.; CETINER, E.;

CEYLAN, B.; CHIU, L. Y.; DAVILA-CALDERON, J.; DHAMOTHARAN, K.; DUCHARDT-FERNER, E.; FERNER, J.; FRYDMAN, L.; FÜRTIG, B., GALLEGO, J.; GRÜN, J. T., HACKER, C.; HADDAD, C.; HAHNKE, M., HENGESBACCH, M.; HILLER, F.; HOHMANN, K.F.; HYMON, T.; JESUS, V.; JONKER, H.; KELLER, H.; KNEZIX, B.; LANDGRAF, T.; LOHR, F.; LUO, L.; MERTINKUS, K.R.; MUHS, C.; NOVAKOVIC, M.; OXENFARTH, A.; PALOMINO-SCHATZLEIN, M.; PETZOLD, K.; PEDRO, S. A.; PIPER, D.J.; QURESHI, N. S.; RIAD, M.; RICHTER, C.; SAXENA, K.; SCHAMBER, T.; SCHERF, T.; SCHLAGNITWEIT, J.; SCHLUNDT, A.; ZETZSCHE, H. “Secondary structure determination of conserved SARS-CoV-2 RNA elemenucleotídeos by NMR spectroscopy”. *Nucleic acids research*., 48(22): 12415–12435, **2020**.

WANG, J.; JIANG, H. & LIU, F. “In vitro selection of novel RNA ligands that bindhuman cytomegal virus sand block viral infection”. *RNA*., 6: 583, **2000**.

WANG, R.; LU, D.; BAI, H.; JIN, C.; YAN, G.; YE, M.; QIU, L.; CHANG, R.; CUI, C.; LIANG, H. & TAN, W. “Using modified aptamers for site specific protein–aptamer conjugations”. *Chemical science*., 7(3): 2157-2161, **2016**.

WANG, W.; XU, Y.; GAO, R.; LU, R.; HAN, K.; WU, G. & TAN, W. “Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens”. *Jama*., 323(18): 1843-1844, **2020**.

WEISSHOFF, H.; KRYLOVA, O.; NIKOLENKO, H.; DÜNGEN, H. D.; DALLMANN, A.; BECKER, S.; GÕTTEL, P.; MULLER, J. & HABERLAND, A. “Aptamer BC 007-Efficient binder of spreading-crucial SARS-CoV-2 proteins”. *Heliyon*., 6(11): e05421, **2020**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Orientação técnica da doença de coronavírus (COVID-19): testes laboratoriais para 2019-nCoV em humanos, 2020a.< https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>Acesso em: 10 de março de 2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19, 2020b. < https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---16-march-2020> Acesso em: 16 de março de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue Bulletin, Volume 41, December 2020. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia; 2020c. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/dengue-bulletin-vol-41>. Acesso em 02 de março de 2022.

WILSON, R.; BOURNE, C.; CHAUDHURI, R. R.; GREGORY, R.; KENNY, J. & COSSINS, A. “Single-step selection of bivalent aptamers validated by

comparison with SELEX using high-throughput sequencing". *PLoS One*., 9(6): e100572, **2014**.

WRAPP, D.; WANG, N.; CORBETT, K. S.; GOLDSMITH, J. A.; HSIEH, C. L.; ABIONA, O.; GRAHAM, B.; MCLELLAN, J. "Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation". *Science*., 367: 1260–1263, **2020**.

WU, H. Y.; GUAN, B. J.; SU, Y. P.; FAN, Y. H. & BRIAN, D. A. "Reselection of a genomic upstream open reading frame in mouse hepatitis coronavirus 5′-untranslated-region mutanucleotídeos". *Journal of virology*., 88(2): 846-858, **2014**.

XIAO K.; ZHAI J.; FENG Y.; ZHOU N.; ZHANG X.; ZOU J.-J.; LI N.; GUO Y.; LI X.; SHEN, X.; ZHANG, Z.; SHU, F.; HUANG, W.; LI, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, R.A.; WU, Y-J.; PENG, S-M..; HUANG, M.; XIE, W-J.; CAI, Q-H.; HOU, F-H.; CHEN, W.; XIAO, L. & SHEN, Y. "Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins". *Nature*., 583: 286–289, **2020**.

YADAV, R.; CHAUDHARY, J. K.; JAIN, N.; CHAUDHARY, P. K.; KHANRA, S.; DHAMIJA, P.; SHARMA, A.; KUMAR, A. & HANDU, S. "Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19". *Cells*., 10(4): 821, **2021**.

YAN, C.; CUI, J.; HUANG, L.; DU, B.; CHEN, L.; XUE, G.; LI, S.; ZHANG, W.; ZHAO, L.; SUN, Y.; YAO, H.; LI, N.; ZHAO, H.; FENG, Y.; LIU, S.; ZHANG, Q.; YANG, D.; LIU, P.; WUDECK, E.V.; GIEDROC, D.P.; LEIBOWITZ, J.L. "SHAPE analysis of the RNA secondary structure of the Mouse Hepatitis Virus 5 untranslated region and N-terminal nsp1 coding sequences". *Virology*., 475: 15–27, **2015**.

YANG, D. & LEIBOWITZ, J. L. "The structure and functions of coronavirus genomic 3′ and 5′ ends". *Virus research*., 206: 120-133, **2015**.

ZAKI, A.M.; VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T.M.; OSTERHAUS, A. D.M.E. & FOUCHIER, R. A. M. "Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia". *N Engl J Med*., 367: 1814–1820, **2012**.

YOON, S. & ROSSI, J. J. "Aptamers: Uptake mechanisms and intracellular applications". *Advanced drug delivery reviews*., 134: 22-35, **2018**.

ZHEN, W. & BERRY, G.J. "Development of a New Multiplex Real-Time RT-PCR Assay for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Detection". *J Mol Diagn*., 22(12): 1367-1372., **2020**.

ZHAO, J.; QIU, J.; ARYAL, S.; HACKETT, J. L. & WANG, J. "The RNA Architecture of the SARS-CoV-2 3'-Untranslated Region". *Viruses*., 12(12): 1473, **2020**.

ZHOU, H.; CHEN, X.; HU, T.; LI, J.; SONG, H.; LIU, Y.; WANG, P.; LIU, D.; YANG, J.; HOLMES, E.C.; HUGHES, A.C.; BI, Y. & SHI, W. “A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein”. *Current biology*, 30(11): 2196-2203, **2020a**.

ZHOU, H.; NI, W. J.; HUANG, W.; WANG, Z.; CAI, M.; SUN, Y. C. “Advances in Pathogenesis, Progression, Potential Targets and Targeted Therapeutic Strategies in SARS-CoV-2-Induced COVID-19”. *Front. Immunol*., 13: 834942, **2022**.

ZHOU, P.; YANG, XL.; WANG, XG.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, HR.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, CL.; CHEN, HD.; CHEN, J.; LUO, Y.; GUO, H.; JIANG, RD.; LIU, MQ.; CHEN, Y.; SHEN, XR.; WANG, X.; ZHENG, XS.; KHAO, K.; CHEN, QJ.; DENG, F.; LIU, LL.; YAN, B.; ZHAN, FX.; WANG, YY. & SHI, ZL. “A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin”. *Nature*., 579(7798): 270-273, **2020b**.

ZHU, H.; ZHANG, H.; XU, Y.; LAŠŠÁKOVÁ, S.; KORABEČNÁ, M. & NEUŽIL, P. “PCR past, present and future”. *BioTechniques*., 69(4): 317–325, **2020a**.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X., YANG, B., SONG, J.; ZHAO, X.; HUANG, B.; SHI, W.; LU, R.; NIU, P.; ZHAN, F.; TAN, W. (2020). “A Novel Coronavirus from Patienucleotídeos with Pneumonia in China, 2019”. New England *Journal of Medicine*, 382(8): 727–733, **2020b**.