

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA BULHÕES DOS SANTOS

ISOLAMENTO DE DOMÍNIO VARIÁVEL DE ANTICORPO DE CADEIA PESADA E
ANÁLISE DE INTERAÇÃO COM O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR DA
PROTEÍNA S DO VÍRUS SARS-CoV-2.

CURITIBA

2022

MARIANA BULHÕES DOS SANTOS

ISOLAMENTO DE DOMÍNIO VARIÁVEL DE ANTICORPO DE CADEIA PESADA E
ANÁLISE DE INTERAÇÃO COM O DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR DA
PROTEÍNA S DO VÍRUS SARS-CoV-2.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães.

Coorientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin.

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Santos, Mariana Bulhões dos

Isolamento de domínio variável de anticorpo de cadeia pesada e análise de interação com o domínio de ligação ao receptor da proteína S do vírus SARS-CoV-2 / Mariana Bulhões dos Santos. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães.

Coorientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin.

1. COVID-19 (doença). 2. SARS-CoV-2. 3. Anticorpos de domínio unico. 4. Evolução molecular direcionada. I. Guimarães, Beatriz Gomes. II. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIANA BULHÕES DOS SANTOS** intitulada: **Isolamento de Domínio Variável de Anticorpo de Cadeia Pesada e Análise de Interação com o Domínio de Ligação ao Receptor da Proteína S do Vírus SARS-CoV-2**, sob orientação da Profa. Dra. BEATRIZ GOMES GUIMARAES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Maio de 2022.

Assinatura Eletrônica

27/05/2022 17:21:19.0

BEATRIZ GOMES GUIMARAES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

21/06/2022 15:57:43.0

PRYSCILLA FANINI WOWK

Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Assinatura Eletrônica

27/05/2022 17:17:41.0

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 187700

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jspe>
insira o código 187700

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, meu agradecimento eterno, que me fortaleceu e cuidou ao longo desse caminho.

A minha família, que sempre me amou e me sustentou de todas as formas. A minha mãe Ivete que foi minha maior incentivadora e que acreditou na minha capacidade mais do que eu mesma. Ao meu pai Jandinei, pelo exemplo acadêmico e apoio. A minha irmã Maressa pelas palavras de ânimo e consolo.

Aos orientadores Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães e Dr. Nilson Ivo Zanchin agradeço a paciência, ensino e competência. Minha admiração pela forma como conduziram este projeto.

A Eloise Pavão Guerra Slompo pela imensa dedicação, ensino e cuidado durante a etapa mais crítica do trabalho, meu agradecimento carinhoso.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Estrutural e Engenharia de Proteínas (LBEP) pelos conselhos e apoio, em especial a Dayane Sereno, Vanessa Zulkievicz por gentilmente oferecerem grande ajuda.

Aos membros da banca Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos, Profa. Dra. Pryscilla Fanini Wowk e Profa. Dra. Ana Luiza Pamplona Mosimann, pela disponibilidade em aceitarem o convite tão prontamente.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo fomento da minha bolsa de pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuírem e me acompanharam durante esta etapa.

“Quanto mais eu estudo a natureza, mais me maravilho com a obra do Criador.”
“Ciência aproxima o homem de Deus.”

Louis Pasteur.

RESUMO

A pandemia de COVID-19 criou uma situação dramática a nível mundial. O número de mortes era superior a 6 milhões em 220 países até maio de 2022, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). De acordo com o Ministério da Saúde, em maio do mesmo ano o Brasil era o segundo país em número total de mortes. Apesar da redução de óbitos e casos graves graças à aplicação em massa das vacinas, estas não protegem 100% contra a infecção com o agravante de que algumas variantes são capazes de escapar à imunidade gerada pela vacina. As medidas farmacológicas que no início da pandemia estavam restritas à amenização dos sintomas passaram a dispor de alguns medicamentos e anticorpos, os quais, no Brasil, são recomendados apenas para os casos graves. Ademais, a circulação de variantes do vírus SARS-CoV-2 tende a perdurar, impondo a necessidade continuada da detecção das infecções ativas por testes rápidos como os de captura de antígenos virais. Neste projeto, avaliamos domínios variáveis de anticorpos de cadeia pesada (denominados VHH) descritos na literatura, isolados contra o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína S de SARS-CoV-2. VHHs possuem características de estabilidade e baixa complexidade estrutural que tornam o seu uso contra alvos virais vantajoso. Através da análise das estruturas tridimensionais disponíveis dos complexos RBD-VHH, assim como de dados da interação RBD-VHHs disponíveis na literatura, um candidato, o VHH Sb#68, foi selecionado para prosseguimento dos trabalhos. A sequência deste VHH serviu de arcabouço em uma estratégia para a geração de variantes com maior afinidade para o RBD da proteína S de SARS-CoV-2. A geração de variantes foi realizada por evolução dirigida, onde oligonucleotídeos contendo mutações específicas promoveram substituições na sequência original através de reações de PCR. Após a indução da expressão das variantes, sua ligação ao RBD foi testada pela técnica de ELISA e 59 clones foram selecionados para sequenciamento do DNA. Diversas variantes mostraram resultados positivos de interação, uma delas com sinal superior ao obtido com o Sb#68 original, em nossas condições de ensaio. A análise da substituição de aminoácidos combinada com uma análise estrutural permitiu sugerir o efeito de algumas mutações na diminuição ou aumento de afinidade de variantes geradas para o VHH Sb68 ao domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2.

Palavras-chave: COVID-19; SARS-CoV-2; Anticorpos tipo VHH; Sb68; Evolução Dirigida.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has created a dramatic situation worldwide. The number of deaths exceeded 6 million in 220 countries by April 2022, according to the World Health Organization (WHO). According to the Ministry of Health, in April of the same year Brazil was the second country in terms of total number of deaths. Despite the reduction in deaths and severe cases due to the mass application of vaccines, they do not protect 100% against infection and some variants are capable of escaping the immunity generated by the vaccines. At the beginning of the pandemics, the pharmacological measures were restricted to alleviation of symptoms. With time, some antiviral drugs and therapeutic antibodies were made available, although in the Brazilian medical system they are recommended for severe cases only. Furthermore, circulation of SARS-CoV-2 virus variants tends to persist, imposing the continued need for the detection of active infections by rapid tests such as those for capturing viral antigens. In this project we evaluated variable domains of heavy chain antibodies (called VHH) described in the literature, isolated against the receptor binding domain (RBD) of the S protein of SARS-CoV-2. VHHs have characteristics of stability and low structural complexity that make their use against viral targets advantageous. Through the analysis of the available three-dimensional structures of RBD-VHH complexes, as well as data on the RBD-VHHs interaction available in the literature, a candidate, the VHH Sb#68, was selected for further work. The sequence of this VHH served as a framework in a strategy for the generation of variants with higher affinity for the RBD of the S protein of SARS-CoV-2. The generation of variants was performed by directed evolution, where oligonucleotides containing specific mutations promoted substitutions in the original sequence through PCR reactions. After inducing the expression of the variants, their binding to RBD was tested by the ELISA technique and 59 clones were selected for DNA sequencing. Several variants showed positive interaction results, one of them with a signal superior to that obtained with the original Sb#68, under our test conditions. The analysis of amino acid substitution combined with a structural analysis allowed us to suggest the effect of some mutations in decreasing or increasing the affinity of variants generated for the VHH Sb68 to the RBD domain of the S protein of SARS-CoV-2.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, VHH antibodies, Sb68, directed evolution.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DO SARS-CoV-2	22
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VIRION SARS-CoV-2	23
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA SPIKE (S) DE SARS-CoV-2	25
FIGURA 4 - MUDANÇA CONFORMACIONAL DA PROTEÍNA SPIKE DE SARS-CoV-1, COM O DOMÍNIO RBD (EM ROSA) NAS CONFORMAÇÕES “DOWN” E “UP”	26
FIGURA 5 - SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS NO DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE DIFERENTES VARIANTES DE SARS-CoV-2	28
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ANTICORPO IgG E SUAS REGIÕES DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO	30
FIGURA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE A ESTRUTURA DE UMA IMUNOGLOBULINA G (IgG) E UM ANTICORPO DE CADEIA PESADA (HCAbs)	31
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO DOMÍNIO VARIÁVEL DE ANTICORPOS DE CADEIA PESADA VHH	32
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRÊS TIPOS BÁSICOS DE ELISA	36
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA E SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DE INTERESSE DO VETOR pET28A-Sb68-SGFP2	42
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA E SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DE INTERESSE DO VETOR pET28A-Sb68-GOF	44
FIGURA 12 - ESQUEMA REPRESENTANDO GERAÇÃO DE VARIANTES	45
FIGURA 13 - ESQUEMA DE ETAPAS ENVOLVIDAS NOS ENSAIOS ELISA	54
FIGURA 14 - ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE SEQUÊNCIAS DE VHHS ANTI-SARS-CoV-2	61
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE SEQUÊNCIAS DOS VHHS EM FORMATO LOGO	62

FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DOS COMPLEXOS DO DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2 E ANTICORPOS TIPO VHH.....	63
FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REGIÕES DE INTERAÇÃO E DAS ESTRUTURAS DOS VHHS Sb#68 E Sb#15 EM COMPLEXO COM O RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2.....	66
FIGURA 18 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE Sb#68, LR1 E LR5	67
FIGURA 19 - PROPORÇÃO ESPERADA DOS RESÍDUOS NAS POSIÇÕES DAS CDRS 2 E 3 SUJEITAS A MUTAÇÕES	71
FIGURA 20 - ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,0% DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR	73
FIGURA 21 - COMPARAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA.....	74
FIGURA 22 - COLÔNIAS DA LINHAGEM BL21 Star-DE3 APÓS TRANSFORMAÇÃO DA LIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR COM O VETOR pET28A-Sb68-GOF.....	75
FIGURA 23 - COLÔNIAS DA LINHAGEM BL21 Star-DE3 APÓS TRANSFORMAÇÃO COM A LIGAÇÃO DE Sb68-GOF COM O PRODUTO DE PCR CDR2-3	76
FIGURA 24 - COLÔNIAS DA LINHAGEM BL21 Star-DE3 APÓS SELEÇÃO POR FLUORESCÊNCIA.....	77
FIGURA 25 - ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE PCR DE COLÔNIA.....	78
FIGURA 26 - ESQUEMA DA RELIGAÇÃO DO VETOR pET28A-Sb68-GOF SEM A INCLUSÃO DO INSERTO CORRETO.....	80
FIGURA 27 - ANÁLISE DOS EXTRATOS PROTEICOS OBTIDOS ATRAVÉS DE CHOQUE OSMÓTICO	81
FIGURA 28 - EXEMPLO DO DESENHO EXPERIMENTAL E RESULTADO OBTIDO APÓS ENSAIO DE ELISA DIRETO E INDIRETO.....	82
FIGURA 29 - RESULTADO DOS ENSAIOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DO VHH Sb68 E O RBD PELO MÉTODO DE ELISA.....	84

FIGURA 30 - REPRESENTAÇÃO NO FORMATO LOGO DO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DAS VARIANTES DE VHH Sb68 NA REGIÃO DAS CDRs 2 e 3.....	86
FIGURA 31 - REPRESENTAÇÃO, NO FORMATO LOGO, DO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS VARIANTES DE VHH Sb68 ..	87
FIGURA 32 - CORRELAÇÃO ENTRE A COMBINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E OS RESULTADOS DE INTERAÇÃO POR ENSAIOS DE ELISA.....	89
FIGURA 33 - CORRELAÇÃO ENTRE A COMBINAÇÃO DE SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS NAS CDRs 2 E 3 E OS RESULTADOS DE INTERAÇÃO POR ENSAIOS DE ELISA.....	90
FIGURA 34 - COMPARAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE A INTERFACE DO DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2 COM O VHH Sb68 ORIGINAL E VARIANTE Sb68-E08.4	93
FIGURA 35 - MAPEAMENTO DAS MUTAÇÕES OBSERVADAS NO DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2 NAS CHAMADAS VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO.	97
FIGURA 36 - ANÁLISE ESTRUTURAL DO EFEITO DAS MUTAÇÕES PRESENTES NO DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DA VARIANTE ÔMICRON DE SARS-CoV-2 NA SUA INTERAÇÃO COM O VHH Sb68.	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ADQUIRIDOS PARA GERAÇÃO DE VARIANTES DO VHH Sb68.....	46
TABELA 2 - PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO. ...	56
TABELA 3 - RESUMO DOS DADOS SOBRE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO VHHS PARA SARS-CoV-2 DESCRITOS NA LITERATURA.	59
TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS DA SUPERFÍCIE DE INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS VHH-RBD	64
TABELA 5 - PLANEJAMENTO DA PROPORÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS PARA SUBSTITUIÇÃO DE AMINOÁCIDOS	68
TABELA 6 - PLANEJAMENTO INICIAL DE SUBSTITUIÇÕES DE RESÍDUOS DAS CDRS 2 E 3 DO VHH Sb68.....	69
TABELA 7 - SEQUÊNCIA DO OLIGONUCLEOTÍDEO CDR3-R ADQUIRIDO ERRONEAMENTE E DO OLIGONUCLEOTÍDEO DESEJADO.....	69
TABELA 8 - SUBSTITUIÇÕES ESPERADAS DE RESÍDUOS DAS CDRS 2 E 3 DO VHH Sb68	70
TABELA 9 - COMPARAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS PLANEJADA E OBTIDA NAS POSIÇÕES DAS CDRS 2 E 3 SUJEITAS A SUBSTITUIÇÕES	88
TABELA 10 - RESÍDUOS ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO DO VHH Sb68 COM O DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2.	91
TABELA 11 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DAS CDRS 2 E 3 DO VHH Sb68 ORIGINAL E VARIANTE Sb68-E08.4.....	92
TABELA 12 - MUTAÇÕES DE AMINOÁCIDOS NO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR (RBD)DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2 OBSERVADAS NAS CHAMADAS VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO, EM RELAÇÃO À CEPA PARENTAL (WUHAN).....	96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 A COVID-19 E SEU AGENTE ETIOLÓGICO	21
2.1.1 Variantes de SARS-CoV-2	27
2.2 ANTICORPOS CONVENCIONAIS DO TIPO IMUNOGLOBULINA.....	28
2.3 DOMÍNIO VARIÁVEL DE ANTICORPOS DE CADEIA PESADA (VHH).....	30
2.4 APLICAÇÕES DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO FABS E VHHS NO RECONHECIMENTO DE SARS-CoV-2.....	33
2.5 TECNOLOGIAS UTILIZANDO ANTICORPOS APLICADAS EM DIAGNÓSTICOS E EXEMPLOS DE APLICAÇÕES	35
2.5.1 Ensaios de imunoabsorção (ELISA) que Utilizam Anticorpos para Detecção de Antígenos	35
2.5.2 Ensaios de captura de antígenos aplicados a diagnóstico	36
2.6 MATURAÇÃO DA AFINIDADE DE ANTICORPOS.....	37
3 METODOLOGIA	39
3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	39
3.2 LEVANTAMENTO E ANÁLISES <i>in silico</i> DOS VHHS CONTRA SARS-CoV-2...40	40
3.3 DEFINIÇÃO E OBTENÇÃO DO VHH INICIAL PARA ESTE ESTUDO	40
3.4 ESTRATÉGIA PARA GERAÇÃO DE VARIANTES DO VHH Sb68.....	41
3.4.1 Desenho dos vetores de expressão para seleção de variantes do VHH Sb68	41
3.4.2 Geração de variantes do VHH Sb68	45
3.4.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos	45
3.4.2.2 Amplificação e purificação dos produtos de PCR.....	47

3.4.2.3 Digestão e ligação enzimática de DNA	47
3.4.2.4 Transformação em <i>Escherichia coli</i>	48
3.5 SELEÇÃO INICIAL DE VARIANTES DO VHH Sb68	48
3.5.1 Seleção inicial pela análise de fluorescência	48
3.5.2 Avaliação dos clones das variantes por digestão de DNA plasmideal e PCR de colônias	49
3.6 ENSAIOS DE ELISA PARA AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DAS VARIANTES DE Sb68 COM O RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2.....	50
3.6.1 Preparação de extratos proteicos por choque osmótico	50
3.6.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA indireto	51
3.6.2.1 Padronização dos ensaios	51
3.6.2.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA indireto	52
3.6.2.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA direto.....	53
3.6.3 Tratamento e normalização dos dados	54
3.7 DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS CLONES DAS VARIANTES DO VHH Sb68.....	55
3.7.1 Extração de DNA plasmidial.....	55
3.7.2 Sequenciamento de DNA.....	56
3.8 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DAS VARIANTES	56
3.9 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS REGIÕES DA INTERAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DO VHH Sb68 COM O RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2.....	57
4 RESULTADOS	58
4.1 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE VHHs QUE RECONHECEM O RBD DE SARS-CoV-2 E ANÁLISES ESTRUTURAIS	58
4.2 ESCOLHA DO VHH PARA EXPRESSÃO E EVOLUÇÃO MOLECULAR	65
4.3 PLANEJAMENTO DAS MUTAÇÕES A SEREM INTRODUZIDAS NO VHH SB68 VISANDO AUMENTO DE AFINIDADE À PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2	66
4.3.1 Desenho dos primers	68

4.4 CONSTRUÇÃO DA MINIBIBLIOTECA DE VARIANTES DO VHH Sb68	72
4.4.1 Amplificação dos fragmentos de DNA por PCR	72
4.4.2 Clonagem dos produtos de PCR das variantes em vetor de expressão e seleção direta dos clones recombinantes	73
4.5 SELEÇÃO DOS CLONES DE VARIANTES DE Sb68 POR ENSAIO DE INTERAÇÃO COM O RBD	77
4.5.1 Pré-triagem dos clones fluorescentes por PCR de colônia	77
4.5.2 Preparação dos extratos por choque osmótico	81
4.5.3 Seleção de variantes de Sb68 pela interação com o domínio RBD	82
4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DAS VARIANTES DO VHH Sb68.....	85
4.6.1 Correlação das mutações com os resultados dos ensaios de ELISA	88
4.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DA INTERFACE DO COMPLEXO ENTRE VHH Sb68 E O DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2.....	91
4.7.1 Potencial impacto das substituições de resíduos na interface de interação.....	91
4.7.2 Análise da região de interação entre VHH Sb68 e o domínio RBD da proteína S de variantes de SARS-CoV-2.....	95
5 DISCUSSÃO	99
5.1 TESTES DE CAPTURA DE ANTÍGENOS COMO FERRAMENTAS NO COMBATE DA COVID-19	99
5.2 METODOLOGIA PARA A GERAÇÃO DE VARIANTES	100
5.3 AFINIDADE AO ANTÍGENO	103
5.4 PERSPECTIVAS	103
6 REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

Em 29 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o contágio pelo vírus SARS-CoV-2 como emergência de saúde pública de interesse internacional (OMS, 2020). De acordo com a atualização mais recente da OMS, no dia 13 de maio de 2022, o número de casos confirmados em todo o mundo chegou a 517.648.631, totalizando 6.261.708 mortes e com contágios confirmados em 222 países (OMS, 2022). No Painel Coronavírus disponibilizado pelo Ministério da Saúde, no mesmo período o Brasil registrava 30.664.739 casos confirmados e 664.780 óbitos com a letalidade em 2,2%.

A COVID-19 é causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave). Pessoas infectadas podem apresentar diversos sintomas variando da forma leve até a doença severa onde há necessidade de internação. Os sintomas mais comuns são: febre ou calafrios, tosse, falta de ar ou dificuldade para respirar, fadiga, dores musculares ou corporais, dor de cabeça, perda da sensação de sabor ou cheiro, dor de garganta, congestão ou nariz escorrendo, náusea ou vômito e diarreia (CDC, 2022). Entretanto, a prevalência e característica dos sintomas pode diferir dependendo da variante responsável pela infecção (MENNI *et al.*, 2022; JEWELL, 2021). Os casos mais graves requerem hospitalização, com tratamento que pode incluir oxigênio suplementar, ventilação assistida e outras medidas de suporte. Ademais, muitos pacientes apresentam “COVID prolongada” (síndrome pós-COVID) que se refere à persistência ou surgimento de novos sintomas várias semanas ou meses após a recuperação da infecção (YONG, 2021). No Brasil, os medicamentos para intervenção farmacológica disponíveis e recomendados pelo Ministério da Saúde se restringem a pacientes adultos em progressão para casos graves ou já hospitalizados, de modo que não há tratamento para os infectados assintomáticos ou com sintomas leves em situação de não internação (FALAVIGNA *et al.*, 2021).

A vacinação, por outro lado, tem sido disponibilizada gradualmente a toda a população acima de cinco anos. Em dezembro de 2020, o Ministério da Saúde divulgou o Plano Nacional de Operacionalização da Vacinação contra a COVID-19,

sendo essa uma importante etapa em resposta ao enfrentamento da pandemia (BRASIL, 2020). No Brasil, até atualização de maio de 2022, mais de 165 milhões de doses haviam sido aplicadas, o que equivale à imunização de 77,7% da população (BRASIL, 2022). Entretanto, embora as vacinas confirmam imunidade reduzindo o risco de internação e morte (ZHENG *et al.*, 2022; MOHAMMED *et al.*, 2022), elas não apresentam 100% de eficácia, não impedindo a ocorrência de infecção em todos os vacinados. Além do mais, o surgimento de novas variantes diminuiu a eficácia das vacinas e aumentou o risco de reinfecção (ARAF *et al.*, 2022). Outra dificuldade na implementação da vacinação é que países subdesenvolvidos não possuem condições financeiras para adquirirem vacinas em quantidade suficiente para sua população, nem estrutura para armazenamento, distribuição e aplicação. Apenas 15,3% das pessoas em países de baixa renda receberam pelo menos uma dose de vacina (RITCHIE *et al.*, 2022). Por outro lado, em países desenvolvidos uma grande parcela da população se recusa a se imunizar por razões pessoais.

A transmissão da COVID-19 ocorre principalmente de pessoa a pessoa, através de gotículas respiratórias produzidas por tosse, espirro ou durante a fala. Um dos fatores que dificulta o controle da disseminação do vírus é a transmissão por portadores assintomáticos. Também pode ocorrer disseminação pelo contato com superfícies e/ou objetos contaminados, seguido de contato na boca, nariz e olhos (CDC, 2020). Pelas formas de transmissão, falta de medicamento específico, demora na vacinação, e pelo fato de que a circulação de variantes do vírus SARS-CoV-2 tende a perdurar, existe a necessidade continuada da detecção das infecções ativas. Uma limitação grave que dificulta esta detecção é a falta de testes rápidos em número suficiente para toda a população, impossibilitando um controle do número real de casos. Segundo números disponibilizados pelo painel *Worldometers*, até o final do ano de 2021 o Brasil realizou 63.776.166 testes sendo o 18º país em testagem. Por outro lado, é o terceiro país em quantidade de infecções (WORLDMETERS, 2021).

O fato de o número de mortes e internações por infecções causadas pelo SARS-CoV-2 ter sido reduzida em muitos países (OMS, 2022), inclusive no Brasil, graças a vacinação massiva (BRASIL, 2022), não reduz a necessidade por cuidados sanitários contínuos e monitoramento. O risco de infecção mediada por esse vírus é parte do cotidiano e, portanto, seria especialmente importante a aplicação de testes

sorológicos para monitorar a circulação do vírus e avaliar se as medidas atuais de vigilância são eficientes no controle de infecções. Além disso, como acredita-se que os portadores assintomáticos são os principais agentes de disseminação do vírus (WILMES *et al.*, 2021), os testes precisam identificar também as infecções ativas nos assintomáticos de modo mais prático e acessível do que os testes atualmente disponibilizados. Para isso, a inclusão de testes rápidos usando anticorpos para captura de antígenos virais em secreção nasofaríngea possibilitaria aumentar as opções para se realizar testes para detecção de infecções ativas em proporções que atendam a população.

Em trabalhos publicados recentemente, diferentes fragmentos de anticorpos de cadeia pesada foram isolados a partir da imunização de camelídeos (lhamas ou alpacas) com a glicoproteína S de SARS-CoV-2 ou pela utilização de bibliotecas sintéticas de alta diversidade. A caracterização detalhada de vários destes anticorpos demonstrou seu potencial de reconhecimento da proteína S (WRAPP *et al.*, 2020 a; HANKE *et al.*, 2020; WALTER *et al.*, 2020). As vantagens na utilização da fração variável de anticorpos de cadeia pesada (denominada VHH) para aplicações biotecnológicas estão em sua maior facilidade de expressão em relação a outros fragmentos de anticorpos, estabilidade do ponto de vista bioquímico e menor tamanho se comparado a anticorpos convencionais (VATTEKATTE *et al.*, 2020). Por outro lado, a menor quantidade de sítios de interação ao antígeno, que pode significar uma desvantagem em termos de afinidade ao alvo, facilita a aplicação de técnicas de maturação sítio-dirigidas, uma vez que a área de interesse é menor.

Apesar de diversos VHHs isolados terem se mostrado capazes de reconhecer o domínio de interação ao receptor (RBD, do inglês *receptor binding domain*) da proteína S de SARS-CoV-2, nem todos os VHHs descritos apresentaram alta afinidade a esse domínio.

Uma opção para a maturação de anticorpos é a obtenção de uma biblioteca sistematicamente mutada somente nas regiões de reconhecimento do antígeno, também chamadas de regiões determinantes de complementariedade (CDR, do inglês *complementarity-determining regions*). Quando informações estruturais a respeito da interação antígeno-anticorpo estão disponíveis, as mutações podem ser direcionadas visando substituir aminoácidos com menor potencial de interação com o alvo por

aminoácidos com cadeia lateral potencialmente mais favorável à interação. Explorando o uso de oligonucleotídeos degenerados em combinação com a técnica de PCR, é possível inserir mutações apenas em regiões alvo, definindo quais os resíduos a serem inseridos com a taxa de substituições desejada. Com a geração de diversos clones é possível eleger os candidatos com maior afinidade ao alvo, levando a um processo racional e direcionado de evolução molecular.

A disponibilidade de anticorpos que possam detectar SARS-CoV-2 com alta afinidade tem grande interesse para aplicação em ensaios para detecção de infecções ativas. Além disso, a nacionalização da produção e disponibilização local de insumos para testes diagnósticos torna-se particularmente importante em situações de crise sanitária mundial como a provocada pela pandemia de Covid-19.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Otimizar o domínio variável de um anticorpo de cadeia pesada (VHH) isolado contra SARS-CoV-2, de modo a aumentar sua afinidade ao domínio de ligação ao receptor da proteína S, através de evolução molecular dirigida.

1.2.2 Objetivos específicos

1- Realizar um levantamento bibliográfico sobre os fragmentos de anticorpos tipo VHH isolados para SARS-CoV-2 e realizar análises comparativas das estruturas primárias e terciárias e regiões de interação com o antígeno.

2- Selecionar, a partir destas análises, VHHs para produção recombinante e definir os aminoácidos a serem substituídos para a geração de variantes por evolução molecular, visando ao aumento da afinidade do anticorpo pelo antígeno.

- 3- Gerar variantes de VHH através da substituição de aminoácidos na região de interação com o domínio de interação ao receptor (RBD) da proteína S de SARS-CoV-2.
- 4- Selecionar, por ensaios do tipo ELISA, variantes do VHH geradas por evolução molecular dirigida, através da quantificação de sua ligação ao domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A COVID-19 E SEU AGENTE ETIOLÓGICO

A COVID-19 tem seu nome derivado do inglês ***coronavirus disease*** (doença do coronavírus), com o número 19 indicando o ano de 2019, quando os primeiros casos foram divulgados (OMS, 2020). A COVID-19 é causada pelo SARS-CoV-2 ou coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS, do inglês ***severe acute respiratory syndrome***). O vírus SARS-CoV-2 foi inicialmente chamado "novo coronavírus", em referência a outros coronavírus anteriormente detectados, como o SARS-CoV ou SARS-CoV-1, identificado em 2002 e causador de um surto de SARS que acometeu mais de 8 mil pessoas em vários países e levou a aproximadamente 800 óbitos (KSIAZEK *et al.*, 2003; OMS, 2004).

Os coronavírus (CoVs) são o maior grupo de vírus pertencentes à ordem *Nidovirales*, que inclui as famílias *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* e *Roniviridae*. Os vírus classificados na família *Coronaviridae* são caracterizados por apresentarem um genoma de RNA não segmentado de polaridade positiva, de aproximadamente 30 kb. O genoma contém uma estrutura cap na extremidade 5' e cauda de poli-(A) na extremidade 3', permitindo que ele atue como um RNA mensageiro (mRNA) para a tradução das proteínas virais (FEHR e PERLMAN, 2015). SARS-CoV-2 bem como SARS-CoV-1 são betacoronavírus, pertencentes à família *Coronaviridae*. SARS-CoV-2 é muito similar a um vírus encontrado em morcegos do gênero *Rhinolophus*, com o qual apresenta > 96% de identidade de aminoácidos (TEMMAM *et al.* 2021; MALLAPATY, 2021). A sequência proteica do SARS-CoV-2 apresenta 75% de identidade com o SARS CoV-1 (KUMAVATH *et al.*, 2021).

A característica estrutural mais proeminente dos coronavírus são as projeções de espigões em forma de taco que emanam da superfície do vírus, formados por trímeros da glicoproteína S (*spike*) (BENIAC *et al.*, 2006). Esses picos são uma característica definidora dos virions e dão a eles a aparência de uma coroa solar, origem do nome coronavírus (FEHR e PERLMAN, 2015). Como em outros betacoronavírus, o domínio de ligação ao receptor (RBD) da glicoproteína S é

caracterizado por um domínio compacto e um subdomínio externo. Esse subdomínio externo do RBD de SARS-CoV-2 é bastante semelhante ao do SARS-CoV-1 e utiliza o mesmo receptor, a enzima conversora de angiotensina (ACE2, do inglês *angiotensin-converting enzyme 2*), para se ligar à célula hospedeira (LU *et al.*, 2020).

O genoma de SARS-CoV-2 codifica 16 proteínas não estruturais, 4 estruturais e 9 acessórias. A replicação do genoma viral gera o RNA completo (gRNA), a partir de uma fita antisenso completa, que é empacotado pelas proteínas estruturais para montar novos virions. Em paralelo são gerados subgenomas que vão da extremidade 3' até uma das sequências reguladoras de transcrição. O RNA genômico é traduzido para produzir proteínas não estruturais (nsps) a partir de dois quadros de leitura abertos (ORFs), ORF1a e ORF1b que ocupam aproximadamente 70% do genoma (BRANT *et al.*, 2021). Os RNAs sub-genômicos (sgRNAs) mais curtos codificam proteínas estruturais conservadas: *spike* (S), proteína de envelope (E), proteína de membrana (M) e proteína de nucleocapsídeo (N) e várias proteínas acessórias. As proteínas acessórias diferem das proteínas não estruturais, pois não possuem homologia com proteínas de outros grupos de vírus. Elas são geralmente pequenas e têm papéis indiretos na função de um vírus. Sabe-se que o SARS-CoV-2 possui nove genes acessórios, sendo dois localizados entre os genes S e E (ORFs 3a e 3b), e sete são encontrados entre genes M e N (ORFs 6, 7a, 7b, 8, 9a, 9b e 10) (GORKHALI *et al.*, 2021).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DO SARS-CoV-2

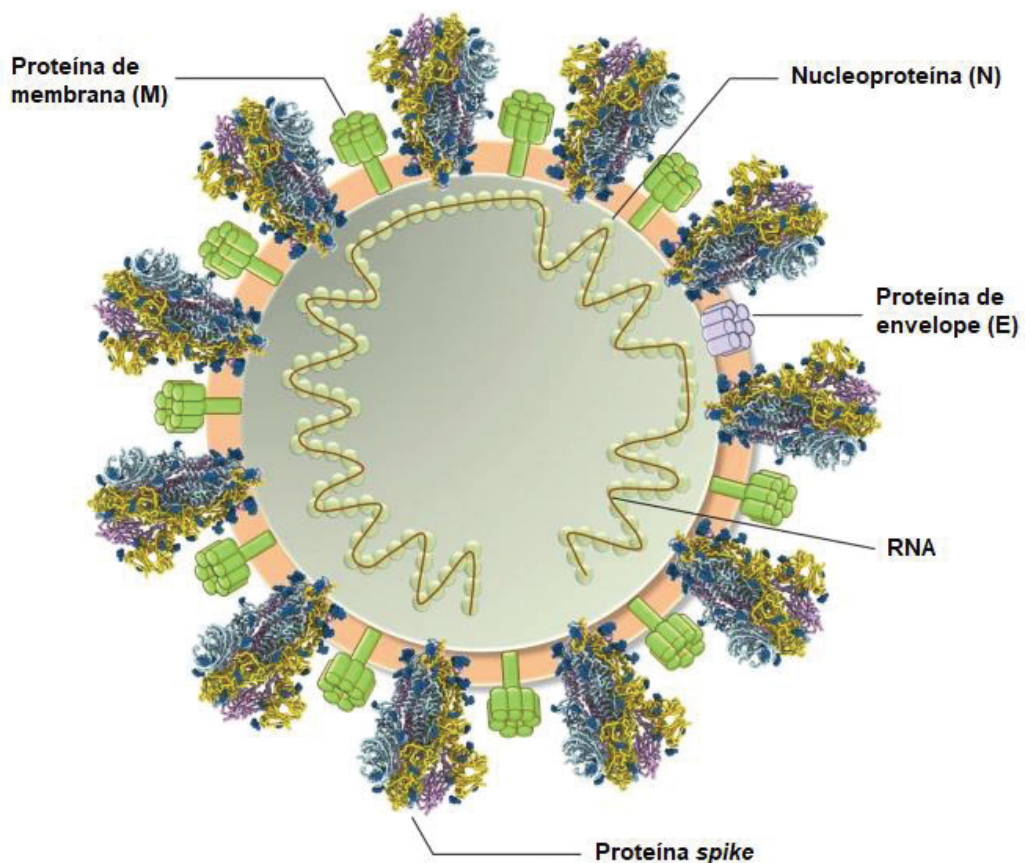


LEGENDA: A ORF1a codifica 11 proteínas não estruturais (Nsp 1-10) e a ORF1b codifica 5 Nsp (12-16). Indicação das proteínas estruturais principais: S, E, M e N e das proteínas acessórias 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9a e 9b. FONTE: Modificada de GORKHALI *et al.*, 2021.

As quatro proteínas estruturais principais, *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleoproteína (N) (Figura 2), ocorrem em todas as linhagens conhecidas de

coronavírus (NEUMAN e BUCHMEIER, 2016). A proteína M, a mais abundante no virion, é pequena (~ 25 a 30 kDa), possui três domínios transmembrana e participa da montagem viral, interagindo com as demais proteínas E, S e N do virion (FEHR, e PERLMAN, 2015). Pode ser considerada como um acessório multifuncional pois contribui para o crescimento e patogênese do vírus (NEUMAN E BUCHMEIER, 2016). A proteína E facilita a montagem e a liberação do vírus, e possui outras funções. Por exemplo, a atividade do canal iônico na proteína E de SARS-CoV-1 é necessária para a patogênese viral (FEHR, A. R., & PERLMAN, S., 2015).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VIRION SARS-CoV-2



LEGENDA: Indicação das quatro proteínas estruturais principais: *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleoproteína (N). FONTE: Adaptado de KUMAR *et al.*, 2020.

N é a única proteína presente no nucleocapsídeo. Ela é composta por dois domínios distintos, um domínio N-terminal (NTD) e um domínio C-terminal (CTD), ambos capazes de se ligar ao RNA *in vitro* (FEHR e PERLMAN, 2015). A proteína N está associada a locais de replicação do RNA viral, sugerindo que ela também pode

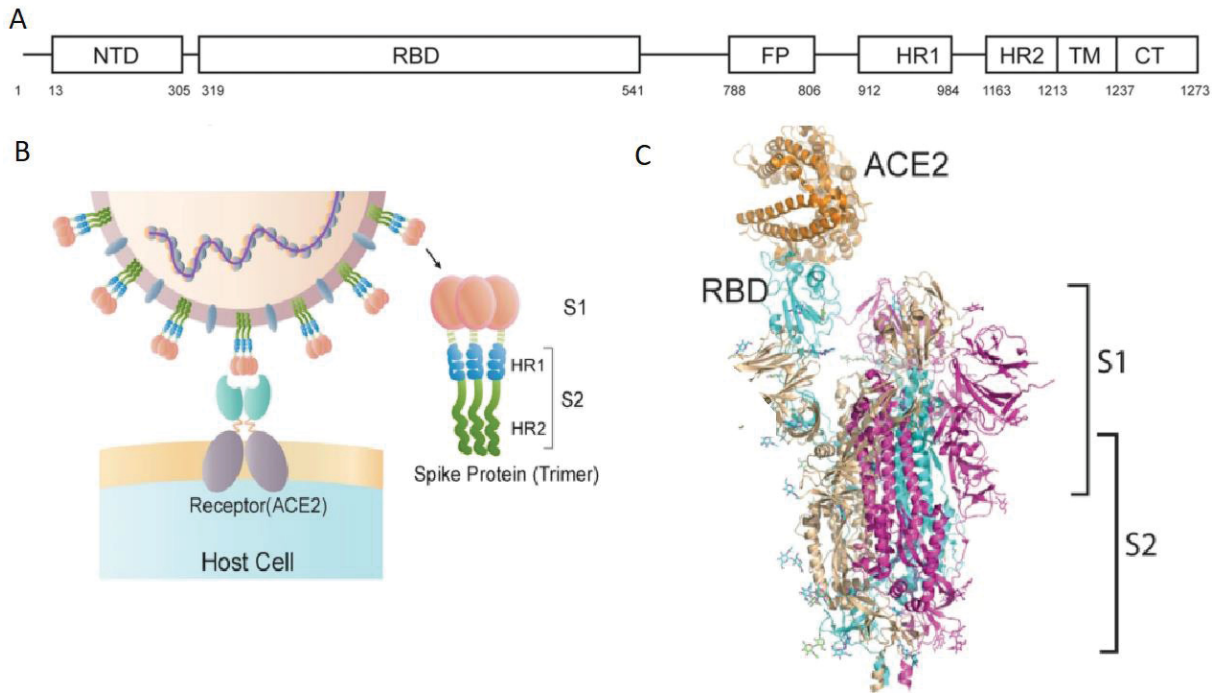
atuar na proteção do genoma ou possivelmente no transporte do genoma para o local de multiplicação do vírus (VERHEIJE *et al.*, 2010).

A glicoproteína trimérica S é uma proteína de fusão de classe I e medeia a ligação ao receptor hospedeiro (COLLINS *et al.*, 1982). Uma infecção viral bem-sucedida necessita ultrapassar a barreira da membrana celular hospedeira. Nos vírus SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2, a glicoproteína spike (S) que compõe sua superfície, é responsável pela ligação e fusão à membrana da célula e consequente infecção viral. Por estar exposta na superfície viral e mediar a entrada nas células hospedeiras, a proteína spike é o principal alvo para o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes e o foco do design terapêutico e de vacinas (WALLS *et al.*, 2020).

A proteína S (Figura 3) forma um complexo trimérico que pode ser dividido em duas subunidades de acordo com suas funções. A subunidade S1 contém o domínio N-terminal (resíduos 13-305) e domínio de ligação ao receptor (RBD, resíduos 319-541), que é o determinante crítico da interação vírus-receptor. Já na subunidade S2 estão os peptídeos de fusão celular (FP, resíduos 788-806), sequências de repetição de heptapeptídeo 1 (HR1, resíduos 912-984) e 2 (HR2, resíduos 1163-1213), domínio transmembrana (TM, resíduos 1213-1237) e domínio citoplasmático (CT, resíduos 1237-1273) (WALLS *et al.*, 2020).

A ligação ocorre devido à forte interação do vírus aos receptores funcionais das células hospedeiras, a enzima conversora de angiotensina (ACE2) e a dipeptidil peptidase 4 (DPP4) (WALLS *et al.* 2020; LI *et al.*, 2020). O domínio RBD da proteína S é suficiente para uma forte ligação à ACE2. Li e colaboradores (2003) expressaram ACE2 em linhagem HEK 293T e demonstraram que a capacidade da proteína S de SARS-CoV-1 de mediar a fusão é dependente desta enzima. A ligação de ACE2 ao RBD de SARS-CoV-2 apresenta uma constante de dissociação de 15 nM, sendo a afinidade 10 a 20 vezes superior do que a ligação entre ACE2 e o RBD de SARS-CoV-1 (WRAPP *et al.*, 2020 b).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA SPIKE (S) DE SARS-CoV-2



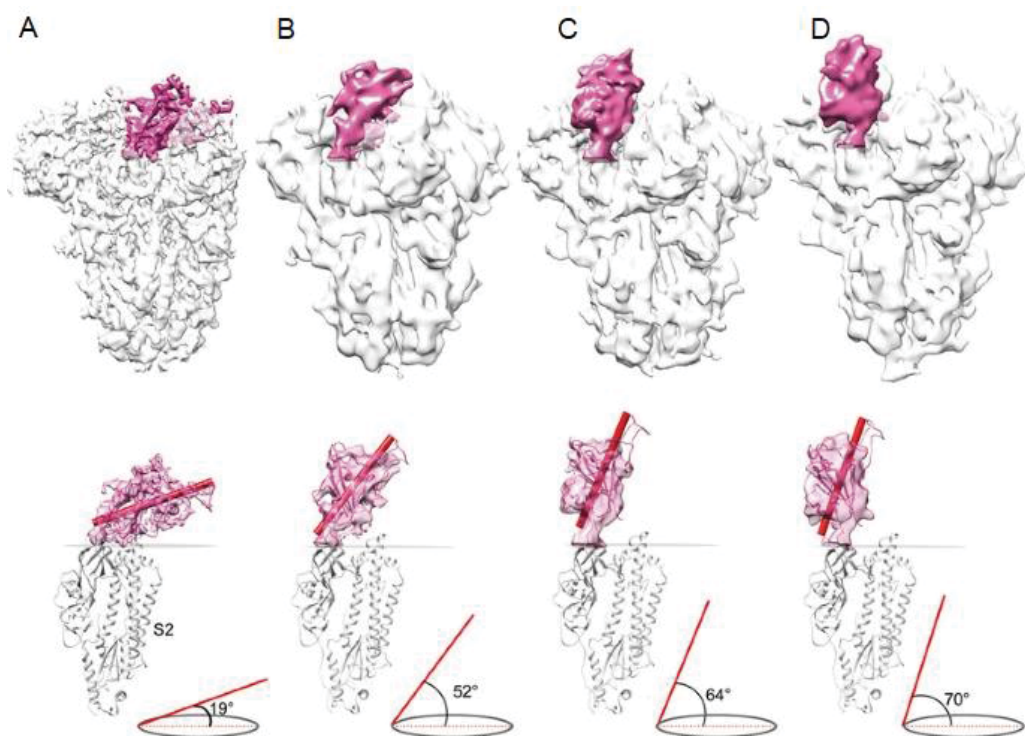
LEGENDA: A) Esquema da organização dos domínios estruturais da proteína S. B) Estrutura esquemática da proteína S e sua ligação à ACE2. C) Representação da estrutura tridimensional da proteína S em ligação ao receptor ACE2, cada uma das cores azul, roxo e bege representam um monômero que compõe o trímero. FONTE: Adaptado de HUANG *et al.*, 2020.

O RBD de SARS-CoV-2 apresenta uma folha β composta por cinco fitas antiparalelas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ e $\beta 7$) com curtas conexões de hélices e loops que formam o núcleo. Entre as fitas $\beta 4$ e $\beta 7$, há uma inserção das fitas $\beta 5$ e $\beta 6$, das hélices $\alpha 4$ e $\alpha 5$ e loops. Esta inserção é denominada de motivo de ligação do receptor (RBM), região que contém a maioria dos resíduos de contato do SARS-CoV-2 que se ligam à ACE2 (LAN *et al.*, 2020). Um total de 17 resíduos do RBD estão em contato com 20 resíduos de ACE2 e a maioria dos resíduos de contato estão localizados na hélice N-terminal de ACE2 (LAN *et al.*, 2020).

Através de estudos por crio-microscopia eletrônica da proteína S do vírus SARS-CoV-1, Gui e colaboradores (2017) observaram que o domínio RBD pode adotar duas diferentes conformações, denominados "up" e "down" no trímero da proteína S (Figura 4). Na posição "down", o domínio RBD não seria capaz de ligar o receptor celular ACE2, sugerindo que essa conformação representa um estado inativo de ligação do receptor. Por outro lado, sobreposições estruturais semelhantes mostraram que o ACE2 se liga bem ao RBD "up" sem conflitos estéricos com outras regiões do complexo trimérico da glicoproteína S, sugerindo que essa conformação

representa um estado ativo de ligação do receptor. As comparações estruturais indicaram que uma mudança de posição de "down" para "up" do RBD no trímero da glicoproteína S leva a uma transição do estado inativo para o estado ativo de ligação ao receptor, que é um pré-requisito para a ligação à ACE2 e para a neutralização por anticorpos monoclonais (GUI *et al.*, 2017).

FIGURA 4 - MUDANÇA CONFORMACIONAL DA PROTEÍNA SPIKE DE SARS-CoV-1, COM O DOMÍNIO RBD (EM ROSA) NAS CONFORMAÇÕES "DOWN" E "UP"



LEGENDA: Na posição superior estão as representações de quatro diferentes conformações do trímero da proteína *spike*. Na posição inferior estão representados os ângulos de inclinação, marcados em vermelho, da região RBD destacada em rosa. A) Proteína *spike* com RBD na conformação "down". B) Conformação intermediária. C-D) Estrutura representando o RBD na conformação "up". FONTE: Adaptado de GUI *et al.*, 2017.

Wrapp e colaboradores (2020 b), também observaram essas diferentes conformações, "up" e "down" em estudos estruturais da proteína S do vírus SARS-CoV-2. Em outro estudo, Hanke e colaboradores (2020) isolaram um anticorpo de cadeia pesada contra SARS-CoV-2, o VHH Ty1, e mostraram que é possível ocorrer

sua a ligação ao RBD, impedindo a ancoragem ao ACE2, tanto na conformação “up” como “down”.

2.1.1 Variantes de SARS-CoV-2

Usualmente, as quantidades de substituições de nucleotídeos em vírus de RNA são altas e essa rápida evolução é principalmente moldada pela seleção natural (MOYA *et al.*, 2000). Essa alta taxa de erro e a consequente rápida evolução das populações de vírus, que poderiam levar ao acúmulo de mutações de aminoácidos, afetar a transmissibilidade do vírus, seu tropismo celular e patogenicidade (GIOVANETTI *et al.*, 2021). Mutações como substituições, deleções e inserções de aminoácidos, que ocorreram no vírus SARS-CoV-2 seja na proteína *spike*, nas outras proteínas ou em regiões não codificadoras, levaram ao surgimento de diversas variantes (TIAN *et al.* 2022). Essas modificações podem conferir ao vírus novas características biológicas, incluindo o aumento da transmissibilidade.

As variantes de SARS-CoV-2 são classificadas como variantes de preocupação (VOC – *variants of concern*) ou variantes de interesse (VOI – *variants of interest*). Até a última atualização de abril de 2022, a Organização Mundial da Saúde considera como VOC atualmente circulantes as variantes Delta (B.1.617.2) e Ômicron (BA 1.1.529), além das previamente circulantes Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351) e Gamma (P.1). Mutações no domínio RBD da proteína S podem estar relacionadas ao aumento da infectividade dessas variantes (Figura 5): a mutação N501Y pode aumentar a afinidade de ligação de RBD para ACE2, aumentando a chance de o vírus infectar células hospedeiras (LIU *et al.*, 2021). A mutação T417K e N501Y pode aumentar a afinidade de ligação da região RBD à ACE2 na superfície celular (PASCARELLA *et al.*, 2021). A mutação N439K localizada na região RBM pode promover a formação de uma ponte salina com ACE2, o que poderia aumentar a afinidade de ligação da proteína *spike* ao ACE2 (THOMSON *et al.*, 2021). Singh e colaboradores descobriram que a mutação S477N pode aumentar a afinidade de ligação da proteína *spike* à ACE2 e atenuar o reconhecimento do vírus por anticorpos monoclonais e plasma de pacientes convalescentes (SINGH *et al.*, 2021). Modificações coletivas na estrutura

de interface da variante Ômicron serviram para promover simultaneamente o acesso aos receptores ACE2 humanos e reduzir o reconhecimento de anticorpos. Entre muitas modificações estão Q493R, Q498R, Y505H, que contribuem para melhor ligação geral dessa variante ao receptor (GAN *et al.* 2022).

FIGURA 5 - SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS NO DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE DIFERENTES VARIANTES DE SARS-CoV-2

Alpha (B.1.1.7)	Beta (B.1.351)	Gamma (P.1)	Delta (B.1.617.2)	Omicron (BA.1)
				S: G 339 D
				S: S 371 L
				S: S 373 P
				S: S 375 F
	S: K 417 N	S: K 417 T		S: K 417 N
				S: N 440 K
			S: L 452 R	S: G 446 S
				S: S 477 N
			S: T 478 K	S: T 478 K
	S: E 484 K	S: E 484 K		S: E 484 A
				S: Q 493 R
				S: G 496 S
				S: Q 498 R
S: N 501 Y	S: N 501 Y	S: N 501 Y		S: N 501 Y
				S: Y 505 H

LEGENDA: A letra “S” indica que estas mutações ocorreram na proteína *spike*. FONTE: HODCROFT, 2022.

2.2 ANTICORPOS CONVENCIONAIS DO TIPO IMUNOGLOBULINA

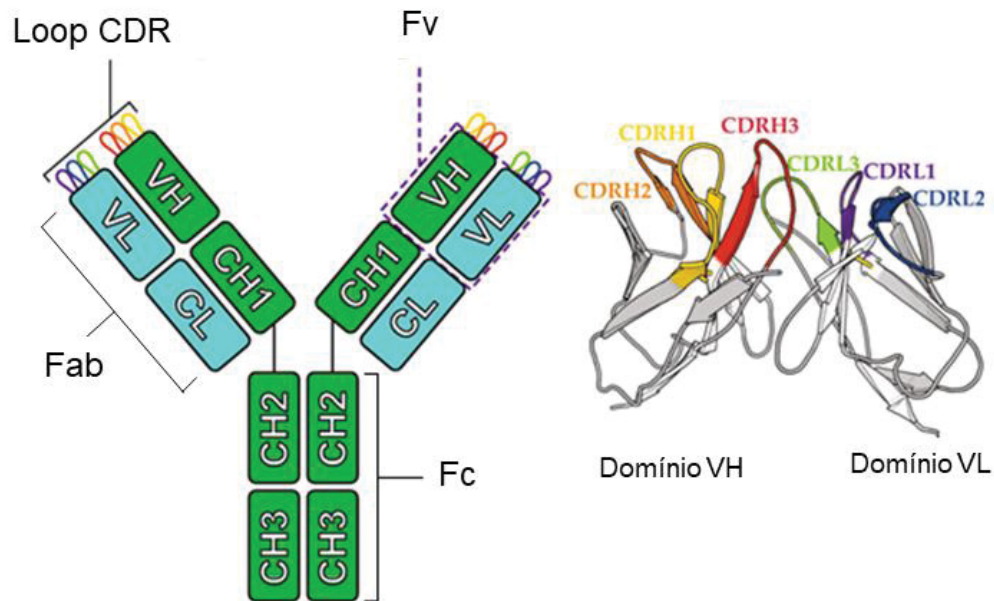
Os anticorpos são proteínas globulinas (família de proteínas com forma globular e compacta) produzidas em resposta a um antígeno, e, portanto, utiliza-se o termo

imunoglobulinas para referir-se a eles de uma forma geral. Os anticorpos do tipo imunoglobulina (Ig) são compostos por três segmentos principais: dois fragmentos idênticos de ligação ao antígeno, denominados Fabs (do inglês *fragment antigen-binding*), cada um contendo a cadeia leve e os dois primeiros domínios da cadeia pesada do anticorpo, e o chamado fragmento cristalizável (Fc), que contém os domínios constantes do C-terminal das duas cadeias pesadas (Figura 6). Os Fabs estão ligados ao Fc pela região da dobradiça, que varia em comprimento e flexibilidade nas diferentes classes de anticorpos. As regiões de ligação aos antígenos (parátomos) estão localizados nas extremidades dos Fabs (PADLAN, 1994).

Os anticorpos do tipo imunoglobulina- γ (IgG) são formados por quatro moléculas, sendo elas duas cadeias polipeptídicas idênticas que abrangem as cadeias pesadas (H, do inglês *heavy*) com 450 aminoácidos, e duas cadeias polipeptídicas idênticas de cerca de 250 aminoácidos, as cadeias leves (L). Cada cadeia pesada contém quatro domínios de duas folhas β antiparalelas, enquanto a cadeia leve consiste em dois desses domínios. Estes domínios de folha β são estruturalmente muito semelhantes, tendo sido denominados domínio imunoglobulina (BRADEN *et al.*, 1998).

As sequências dos domínios N-terminal das cadeias H e L do anticorpo formam o par dos domínios VH-VL, estes compõem o fragmento variável (Fv) que reconhece o antígeno. Os domínios VH e VL possuem três segmentos altamente variáveis tanto em sua composição de aminoácidos quanto em suas estruturas, os *loops* que unem as fitas β (BRADEN *et al.*, 1998). Esses segmentos são conhecidos como sequências hiper variáveis ou regiões determinantes de complementariedade (CDR, do inglês *complementarity-determining regions*), responsáveis pelo reconhecimento específico do respectivo antígeno (BRADEN *et al.*, 1998). As sequências restantes das cadeias H e L do Fab são conservadas (abreviadas como CH1 e CL). As duas últimas regiões da cadeia pesada, denominadas CH2 e CH3, são importantes para o recrutamento de células imunes (por exemplo, macrófagos e células *natural killer*) ou para funções de efectoras (por exemplo, ativação complementar) (MUYLDERMANS, 2013).

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ANTICORPO IgG E SUAS REGIÕES DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO



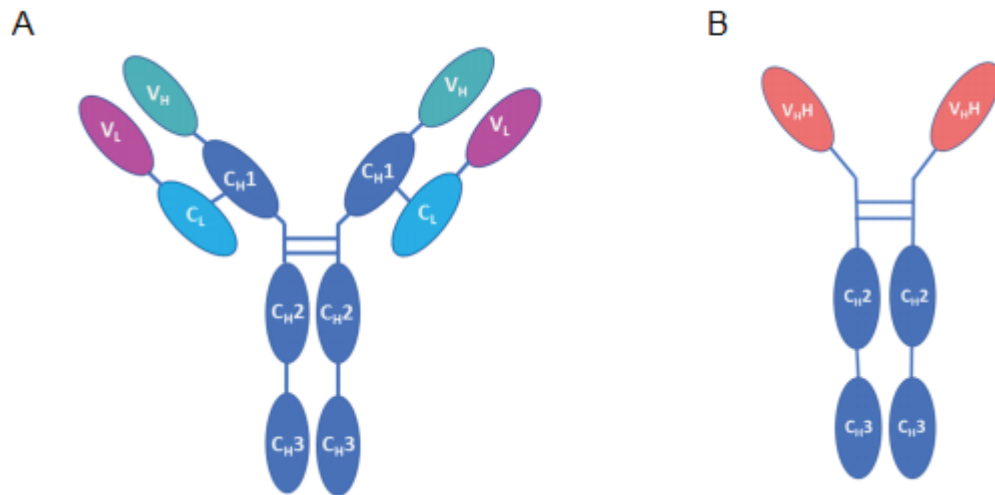
LEGENDA: Esquerda: organização global da estrutura do IgG, indicando o fragmento cristalizável (Fc), o fragmento de ligação ao antígeno (Fab) e o fragmento variável (Fv). Em verde estão representadas as cadeias pesadas (H, do inglês *heavy*) e em azul as cadeias leves (L). C refere-se aos domínios constantes e V aos domínios variáveis; Direita: representação da estrutura tridimensional dos domínios variáveis das cadeias pesada (VH) e leve (VL) destacando em cores as regiões de ligação ao antígeno ou regiões determinantes de complementariedade (CDR) da cadeia pesada (H) e leve (L). FONTE: Adaptada de LEEM e DEANE, 2018.

2.3 DOMÍNIO VARIÁVEL DE ANTICORPOS DE CADEIA PESADA (VHH)

Os camélídeos (camelos, alpacas, lhamas e vicunhas) apresentam em seu soro anticorpos com uma estrutura diferente, quando comparados à IgG convencional. Além dos anticorpos convencionais, estes organismos possuem anticorpos de cadeia pesada apenas (HCAbs – *heavy chain antibodies*) (Figura 7), que são desprovidos do polipeptídeo da cadeia L e são únicos também porque não possuem o primeiro domínio constante (CH1) (MUYLDERMANS, 2013). Seu domínio N-terminal, chamado de fração variável de anticorpo de cadeia pesada (referido como VHH), consiste num domínio equivalente ao VH das cadeias pesadas das imunoglobulinas, que tem a função de associação com o antígeno. O VHH em um HCAb é o equivalente funcional do fragmento Fab (fragmento de ligação de antígeno) de anticorpos convencionais (MUYLDERMANS, 2013).

Além dos camelídeos, alguns peixes cartilagosos como os tubarões, possuem anticorpos dos quais se pode obter fragmentos de anticorpos de domínio único (sdAb, *single domain antibody fragments*). Embora a estrutura deste tipo de anticorpo de peixes cartilagosos contenha cinco domínios CH, enquanto a estrutura proveniente de camelídeos contém só dois domínios CH, a estrutura do domínio VH (denominada vNAR, *variable domain of the shark new antigen receptor*) corresponde igualmente à do VHH de camelídeos (EYER e HRUSKA, 2012).

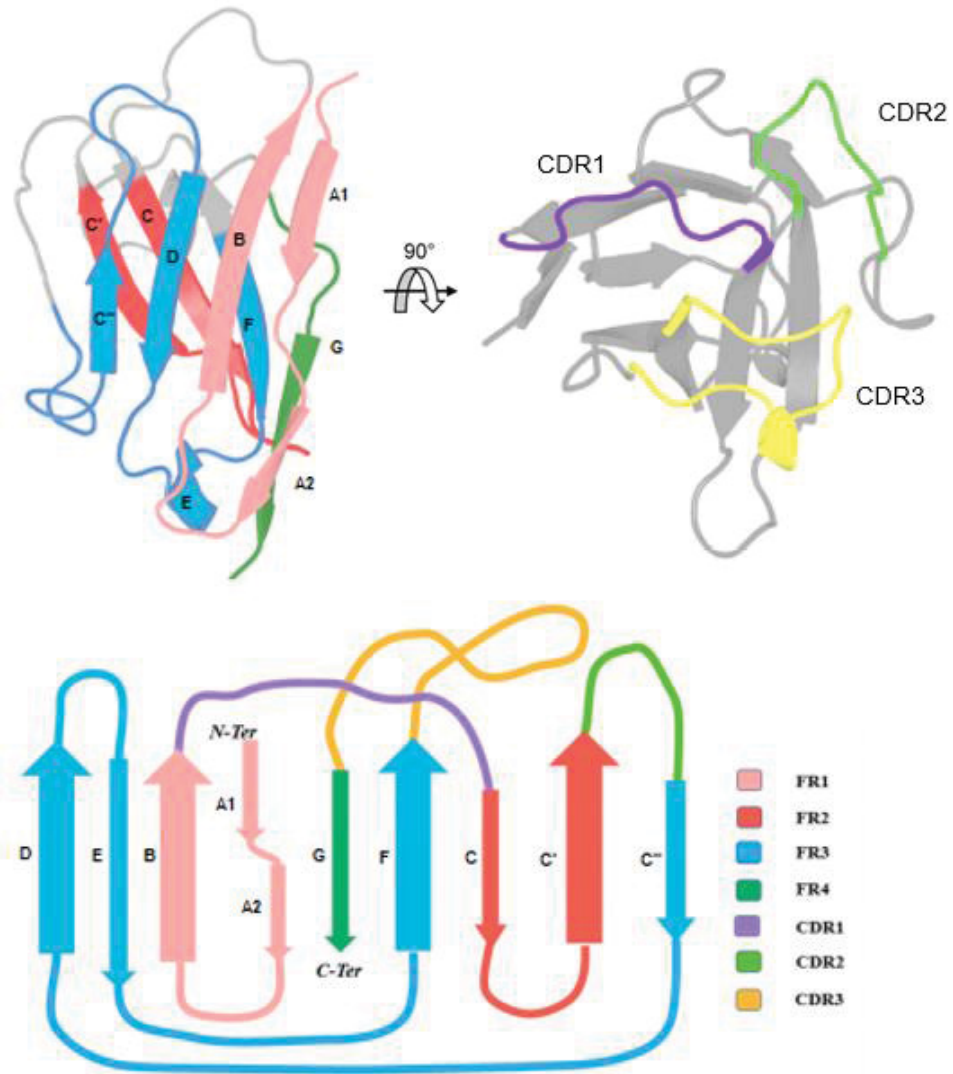
FIGURA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE A ESTRUTURA DE UMA IMUNOGLOBULINA G (IgG) E UM ANTICORPO DE CADEIA PESADA (HCAbs)



LEGENDA: A) Molécula do IgG com cadeia pesada (domínios VH, CH1, CH2 e CH3) e cadeia leve (domínios VL e CL). B) Representação dos anticorpos de cadeia pesada (HCAbs), com os domínios VHH, CH2 e CH3. FONTE: Adaptado de VATTEKATTE *et al.* 2020).

O domínio VHH possui regiões hipervariáveis (HV) equivalentes às regiões determinantes de complementariedades CDR1, CDR2 e CDR3 dos domínios VH e VL dos anticorpos de cadeia dupla, intercalados de sequências conservadas, os chamados *frameworks* (FR) (Figura 8). O VHH é formado por nove fitas β (A-B-C-C'-C''-D-E-F-G), organizados em uma folha β de quatro fitas e outra folha β de cinco fitas conectadas por loops e por uma ponte dissulfeto entre Cys23 e Cys94. As regiões HV ou CDR1, 2 e 3 ficam localizadas nas alças que conectam as fitas B-C, C'-C'' e F-G, respectivamente, e embora a sequência de aminoácidos das CDRs seja bastante variável, a variação em seus comprimentos é limitada, exceto para a CDR3 (MUYLDERMANS, 2013).

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO DOMÍNIO VARIÁVEL DE ANTICORPOS DE CADEIA PESADA VHH



LEGENDA: Nas figuras do alto a representação da estrutura tridimensional destacando as fitas β (A, B, C, C', C'', D, E, F, G) e as regiões determinantes de complementariedade (CDR). Abaixo a representação da topologia com as fitas β também identificadas. As regiões de *framework* (FR) e CDRs são identificadas em diferentes cores. FONTE: Adaptada de VATTEKATTE *et al.* 2020.

As regiões de loops das estruturas VH do IgG e VHH do HCAb apresentam diferenças entre si (MUYLDERMANS, 2013). O VHH, por não depender da presença de um domínio variável VL, tem o antígeno reconhecido por apenas três loops ao invés de seis. Por outro lado, sua superfície é geralmente maior, apresentando alças mais longas do que os VHs de anticorpos convencionais (DE GENST *et al.*, 2006).

O alinhamento das sequências de aminoácidos de VHHs indica que as regiões FR e HV são semelhantes às dos VHs, com algumas diferenças no FR2 e nas CDRs.

Dentro do FR2, aminoácidos hidrofóbicos altamente conservados nos VHs (Val47, Gly49, Leu50, Trp52), que normalmente participam da interação com o domínio VL (CHOTHIA *et al.*, 1985), são substituídos no VHH por aminoácidos menores e/ou hidrofílicos, principalmente Glu49, Arg50 e Gly52 (MUYLDERMANS, 2013).

O pequeno tamanho, a facilidade de expressão e as propriedades bioquímicas e biofísicas únicas desses domínios VHHs os tornaram alvos da biotecnologia aplicada, terapêutica de saúde e diagnóstico. Como ferramentas de pesquisa os VHHs permitem a montagem de um conjunto abrangente de reagentes bem caracterizados para alvos importantes, incluindo moléculas de sinalização intracelular e biomarcadores de câncer (VATTEKATTE *et al.*, 2020).

Os domínios variáveis podem também ser usados como ferramentas de diagnóstico, como anticorpos de captura sensíveis e seletivos. Esses domínios possuem alta afinidade e podem ser facilmente modificados para evitar grupos quimicamente reativos nas proximidades do parátipo. Também permitem sua imobilização direcional na superfície de um sensor, aumentando a capacidade máxima de captura do antígeno (SAERENS *et al.*, 2005). Outra aplicação seria na área terapêutica, pois apesar dos anticorpos policlonais geralmente resultarem em melhor neutralização e, portanto, melhor proteção, um VHH monoclonal modificado para reconhecer epítomos especiais envolvidos no reconhecimento do receptor pode atingir uma potência de neutralização extremamente alta (VANEYCKEN *et al.*, 2011).

2.4 APLICAÇÕES DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO FABS E VHHS NO RECONHECIMENTO DE SARS-COV-2

Diversos anticorpos têm sido caracterizados, apresentando propriedade de neutralização do vírus SARS-CoV-2. Walls e colaboradores demonstraram que o anticorpo S230, o qual foi isolado a partir de um indivíduo infectado com SARS-CoV-1, liga-se à proteína S de SARS-CoV-2 em região que se sobrepõe parcialmente à região de ligação ao receptor ACE2, bloqueando a interação por meio de um mecanismo competitivo.

Além disso, a ligação de S230 ou de ACE2 acarretou a mudança da proteína S de SARS-CoV-1 para a conformação pós-fusão. Esse é um exemplo de mimetismo funcional, pelo qual um anticorpo recapitula a ação do receptor ao ativar a fusão da membrana (WALLS *et al.*, 2019). Alguns dos anticorpos neutralizantes mais potentes, específicos para SARS-CoV-1, que têm como alvo o local de ligação ao receptor ACE2 não foram capazes de se ligar à proteína S de SARS-CoV-2, indicando que é necessário desenvolver novos anticorpos monoclonais que possam ligar especificamente o RBD de SARS-CoV-2 (TIAN *et al.*, 2020).

Trabalhos anteriores descreveram o isolamento de VHHs dirigidos contra MERS-CoV a partir da imunização de camelídeos, porém com poucos detalhes específicos a respeito das regiões de interação ao receptor (ZHAO *et al.*, 2018; STALIN RAJ *et al.*, 2018).

O trabalho de Wrapp e colaboradores (2020 a) está entre os primeiros que descrevem o isolamento de VHHs potencialmente neutralizantes direcionados contra o RBD da proteína S de SARS-CoV-1 e MERS-CoV. Também mostra que dois VHHs dirigidos ao RBD da proteína S de SARS-CoV-1 exibem reatividade cruzada contra o RBD da proteína S de SARS-CoV-2, sendo capaz de bloquear a interface de ligação ao receptor (WRAPP *et al.*, 2020 a).

Outros anticorpos do tipo VHH apresentando reconhecimento específico do RBD da proteína S de SARS-CoV-2 foram posteriormente descritos. Esparza e colaboradores (2020), através da imunização de lhamas, isolaram VHHs que se ligam ao domínio RBD da proteína S, bloqueando a ligação do vírus à ACE2. O VHH NIH-CoVnb-112 com maior afinidade ao RBD isolado nesse estudo apresentou constante de dissociação (K_D) de 4,94 nM em ensaio de interação *in vitro*. De forma similar, Hanke e colaboradores (2020), obtiveram um fragmento de anticorpo de domínio único derivado de alpaca, nomeado Ty1 e, Valenzuela Nieto *et al.* 2021, caracterizaram o VHH denominado W25. Tais fragmentos de anticorpos apresentaram, respectivamente, K_D de 9 nM (Ty1) e 0,295 nM (W25) em ensaios de interação com o domínio RBD de SARS-CoV-2.

Vários VHHs foram também obtidos pela utilização de bibliotecas sintéticas. Huo e colaboradores (2020), através de uma biblioteca “naive” de anticorpos de domínio único de lhama e maturação baseada em PCR, obtiveram dois VHHs, H11-

D4 e H11-H4, que se ligaram ao RBD da proteína S de SARS-CoV-2 com K_D de 10 nM e 5 nM, respectivamente. Custódio e colaboradores (2020), relataram o rápido isolamento e caracterização de VHHs de uma biblioteca sintética, os chamando de sybodies (Sb), que também tem como alvo o RBD da proteína S de SARS-CoV-2. Neste estudo foi isolado o VHH Sb23, com o K_D de 10,6 nM (CUSTÓDIO *et al.* 2020).

A partir da mesma biblioteca usada por Custódio e colaboradores (2020), Walter e colaboradores (2020) relatam a seleção e caracterização de VHHs sintéticos. Entre eles, Sb#14, Sb#15, Sb#16, Sb#42, Sb#45 e Sb#68 apresentaram os melhores resultados de afinidade ao antígeno, tendo Sb#15, apresentado uma constante de dissociação de 24,22 nM. Li e colaboradores (2020) publicaram o processo de seleção e engenharia de VHHs sintéticos altamente potentes contra SARS-CoV-2, sendo que a melhor variante isolada neste estudo, MR3, apresentou um K_D de 1 nM.

2.5 TECNOLOGIAS UTILIZANDO ANTICORPOS APLICADAS EM DIAGNÓSTICOS E EXEMPLOS DE APLICAÇÕES

2.5.1 Ensaios de imunoabsorção (ELISA) que Utilizam Anticorpos para Detecção de Antígenos

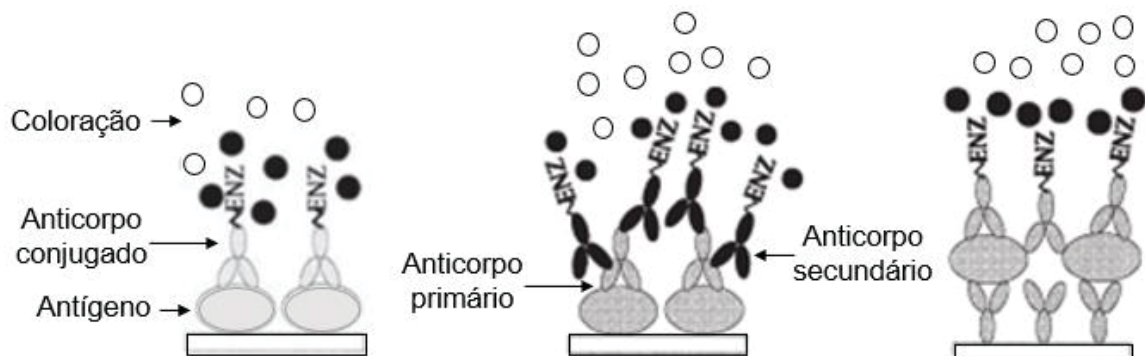
Uma das diversas aplicações para os anticorpos é sua utilização em ensaios de imunoabsorção enzimática comumente conhecidos como ELISA (do inglês – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Esta é uma técnica que utiliza um anticorpo conjugado com enzimas que é capaz de detectar proteínas imobilizadas a uma superfície sólida e revelá-la pelo desenvolvimento de cor após adição de um substrato/cromógeno adequado (CROWTHER, 2009).

Existem três métodos principais que formam a base para os ensaios ELISA: ELISA direto, indireto e sanduíche (Figura 9). No ELISA direto, o antígeno é ligado à placa por adsorção passiva. São adicionados anticorpos conjugados com enzimas e após um período de incubação e lavagem, um cromógeno é adicionado e a coloração aparece. No ELISA indireto, o antígeno de interesse é imobilizado em uma placa, seguido pela incubação com um anticorpo primário específico para o antígeno. Um

anticorpo secundário conjugado com enzima para revelação é adicionado posteriormente para se ligar ao anticorpo primário e em presença de cromógeno a coloração é desenvolvida (CROWTHER, 2009).

O ELISA sanduíche envolve a imobilização de anticorpos à placa. Esses anticorpos de captura reconhecem o antígeno e se ligam a ele. Os antígenos são diluídos em um tampão de bloqueio para evitar ligações inespecíficas à fase sólida e incubados à placa. Após a incubação e lavagem, anticorpos de ligação conjugados com enzimas de revelação se ligam ao complexo, completando assim o “sanduíche”. Por fim uma solução cromógena é adicionada e a cor desenvolvida (CROWTHER, 2009). Como essa técnica consiste em dois anticorpos reconhecendo a mesma proteína é necessário que os epítomos sejam distintos a fim de evitar uma competição (SCHMIDT *et al.*, 2012).

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRÊS TIPOS BÁSICOS DE ELISA



LEGENDA: A) ELISA direto, B) ELISA indireto e C) ELISA sanduíche. FONTE: Adaptada de CROWTHER, 2009.

2.5.2 Ensaio de captura de antígenos aplicados a diagnóstico

A técnica de ELISA sanduíche é amplamente empregada em testes de captura de antígeno. Esse é um método atual e pode ser utilizado para o diagnóstico de infecção ativas. Testes dessa natureza são amplamente utilizados no Brasil para o diagnóstico da dengue (DENV) ainda na fase inicial da doença, com a identificação do antígeno viral a proteína não estrutural 1 (NS1) (BORGES *et al.*, 2021; ALCON *et*

al., 2002). Testes similares foram descritos para o diagnóstico precoce de infecções pelo vírus do Oeste do Nilo (WNV), onde dois anticorpos monoclonais reconhecem diferentes epítomos da proteína NS1 do WNV. O teste apresentou especificidade exclusiva ao vírus sem reação cruzada com outros membros relacionados da família flavivírus (DING *et al.*, 2014).

Existe também um teste disponível para detecção da infecção ativa pelo vírus sincicial respiratório humano (HRSV). O teste utiliza anticorpos monoclonais para capturar a proteína de fusão deste vírus (MOESKER *et al.*, 2016). Também foi descrito um teste ultrasensível baseado em um biossensor eletroquímico com anticorpos produzidos em equinos contra a glicoproteína do vírus Ebola. Este teste se mostrou efetivo para a detecção do vírus Ebola inativado (JIN *et al.*, 2019). Além disso, um dos principais testes utilizados no diagnóstico da infecção pelo HIV, aprovado pela ANVISA, utiliza a detecção paralela de anticorpos e antígenos. O teste é do tipo ELISA no formato de “sanduíche” e detecta simultaneamente o antígeno p24 e anticorpos específicos contra HIV (ANVISA, 2018). A detecção do antígeno p24 é feita por anticorpos monoclonais imobilizados que irão capturar o antígeno viral, sendo este revelado por anticorpos acoplados à molécula reveladora. Já a detecção de anticorpos presentes no soro é feita por antígenos imobilizados que capturam os anticorpos do soro, sendo revelado por anticorpos acoplados à molécula reveladora. Che e colaboradores desenvolveram um teste ELISA de captura para o antígeno N presente no vírus SARS-CoV-1. Este teste utiliza três anticorpos monoclonais com alta afinidade e especificidade à proteína N (CHE *et al.*, 2004).

2.6 MATURAÇÃO DA AFINIDADE DE ANTICORPOS

Uma característica importante do sistema imunológico natural é o uso do princípio evolutivo da mutação e seleção para alcançar maior afinidade ao antígeno. No entanto, anticorpos naturais muitas vezes não possuem as propriedades de ligação necessárias para suas aplicações terapêuticas. Portanto, aumentar a afinidade de ligação é uma etapa necessária no desenvolvimento de um candidato a aplicações terapêuticas ou de diagnóstico (CHIU *et al.*, 2019).

Pela abordagem *in vitro*, esse processo natural pode ser substituído por diferentes estratégias e ferramentas que estão disponíveis para a maturação da afinidade entre proteínas (RAJPAL *et al.*, 2005). Duas técnicas primárias de mutagênese são: mutagênese sítio dirigida (SDM) e mutagênese extensiva e aleatória (REM) (DURLAND e AHMADIAN-MOGHADAM, 2021). A estratégia SDM envolve a substituição de resíduos selecionados específicos dentro dos loops da região determinante de complementaridade (CDR). Já a REM é uma técnica mais ampla, pois a mutagênese ocorre de forma aleatória em toda a sequência de fragmento variável (Fv) (PRESTA, 2005).

Um método alternativo para criar mutações direcionadas ao local dentro da sequência de nucleotídeos emprega o PCR que usa dois oligonucleotídeos sintéticos como *primers* para amplificar uma sequência de interesse. Estes *primers* se anelam em ambas as extremidades da região de interesse e são orientados em sentidos opostos. A amplificação exponencial da sequência de alvos ocorre ao longo de múltiplos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão de 3' pela DNA polimerase. O PCR pode ser usado para introduzir sequências adicionais, como sítios de restrição, incorporando-as nos *primers* (DURLAND e AHMADIAN-MOGHADAM, 2021). Posteriormente, esses produtos de PCR são digeridos e clonados para geração de bibliotecas.

Dentre as opções disponíveis para o monitoramento da infecção do SARS-CoV-2 na população, certamente a testagem em massa é uma das ferramentas mais necessárias. Tendo em vista que a afinidade de anticorpos pelo antígeno é essencial para o funcionamento de testes rápidos, é especialmente importante dispor de técnicas que melhorem o reconhecimento da molécula ao alvo. Portanto a utilização de técnica de mutagênese sítio dirigida é uma opção viável para a otimização de anticorpos para a identificação de SARS-CoV-2.

3 METODOLOGIA

3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A parte experimental foi dividida em duas etapas principais: análise *in silico* e produção de biblioteca *in vitro*. A primeira etapa consistiu em um levantamento da literatura a respeito dos VHHs disponíveis contra SARS-CoV-2. Nesta fase foram compiladas e analisadas as informações a respeito de constantes de associação ao antígeno, sequência de aminoácidos, estrutura proteica, resíduos de interação. A partir destas informações escolheu-se o candidato para geração de variantes e por conseguinte, planejou-se o desenho dos oligonucleotídeos para mutagênese sítio dirigida.

A segunda etapa consistiu nos experimentos para isolar novas variantes *in vitro*. Utilizando a técnica de PCR com oligonucleotídeos previamente desenhados para realizar as substituições planejadas, foi construída uma minibiblioteca do VHH Sb68, selecionado a partir das análises *in silico*, em fusão com a proteína fluorescente verde (GFP), a qual serviu como indicador direto de expressão do VHH em meio sólido contendo o indutor IPTG. A partir desta minibiblioteca, extratos proteicos das colônias apresentando maior intensidade de fluorescência foram preparados e testados através de ensaio do tipo ELISA, com o objetivo de identificar variantes do VHH Sb68 com maior capacidade de interação ao domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2. A identificação dos aminoácidos substituídos nas variantes selecionadas foi realizada através da extração dos plasmídeos de cada clone, seguida da determinação da sequência nucleotídica.

Após o sequenciamento, as substituições foram analisadas com base na estrutura tridimensional do complexo VHH-RBD disponível e comparadas com os resultados dos testes de interação com objetivo de investigar a relação entre a substituição dos resíduos e o ganho ou perda de afinidade do VHH Sb68 pelo domínio RBD.

3.2 LEVANTAMENTO E ANÁLISES *in silico* DOS VHHS CONTRA SARS-CoV-2

Através do levantamento da literatura, as informações disponíveis dos VHHS que interagem com o domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2 foram compiladas. Desse modo foi possível comparar as sequências, propriedades e características da região de interação com o antígeno.

Alinhamentos múltiplos de sequências foram realizados utilizando-se as ferramentas *Clustal Omega* (SIEVERS *et al.*, 2014) para gerar o alinhamento e os programas *Jalview* (Version 2.11) (CLAMP *et al.*, 2004) e *WebLogo* (<http://weblogo.threeplusone.com/>) (CROOKS *et al.*, 2004) para edição e visualização. As análises das estruturas tridimensionais disponíveis no PDB e das superfícies de interação foram feitas utilizando as ferramentas computacionais Coot (EMSLEY e COWTAN, 2004), Pymol (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0* Schrödinger, LLC.), e PDBePISA (KRISINEL e HENRICK, 2007). Estas análises dirigidas pela estrutura indicaram os aminoácidos da região de interação do VHH que poderiam ser substituídos visando aumentar a afinidade e especificidade pelo RBD de SARS-CoV-2.

3.3 DEFINIÇÃO E OBTENÇÃO DO VHH INICIAL PARA ESTE ESTUDO

Nessa etapa, foram analisadas as diferenças entre as CDRs dos diferentes VHHS com o intuito de se escolher a melhor sequência. Como critério para a escolha foram avaliadas as seguintes informações: dados disponíveis na literatura, regiões de interação entre o VHH e a proteína S de SARS-CoV-2, valor das constantes de dissociação (K_D) e se as moléculas estão ou não protegidas por patentes. Em relação à região de interação com o RBD da proteína S, buscou-se também avaliar VHHS que se ligassem em regiões distintas da região de interação com a ACE2 e de outros VHHS em estudo no nosso grupo, visando a obtenção de anticorpos com regiões distintas de reconhecimento.

A sequência de nucleotídeos codificadora do VHH selecionado (Sb68), depositada em banco de dados (AHMAD *et al.*, 2021), foi sintetizada e clonada em vetor de expressão pET28a (Novagen - Merck KGaA).

3.4 ESTRATÉGIA PARA GERAÇÃO DE VARIANTES DO VHH Sb68

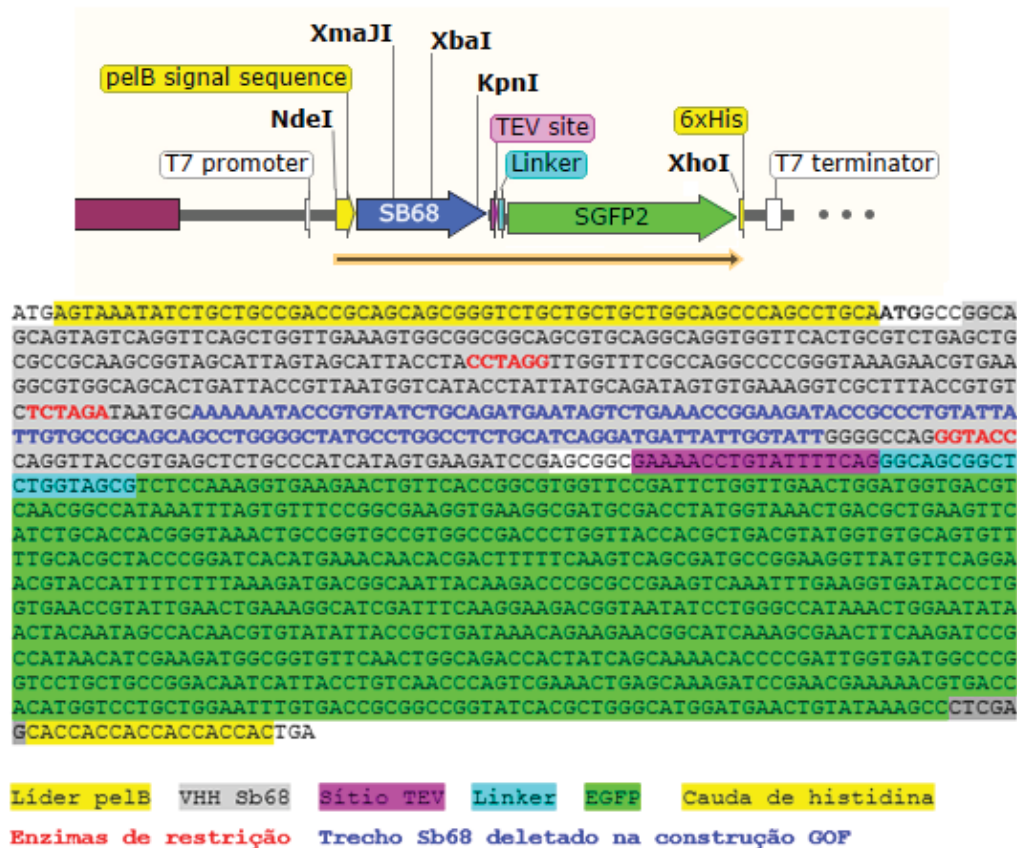
3.4.1 Desenho dos vetores de expressão para seleção de variantes do VHH Sb68

Para geração de variantes foram desenhados inicialmente dois vetores de expressão. Um deles contém a sequência original do VHH Sb68 em fusão com a proteína superfolder fluorescente verde (SGFP2) (Figura 10). A SGFP2 é uma variante da proteína fluorescente verde (GFP) e se dobra eficientemente quando fusionada a proteínas mal dobradas, também é diretamente proporcional à expressão total independentemente da solubilidade da fusão, tornando a fluorescência da SGFP um repórter robusto da expressão proteica de fusão (PÉDELACQ *et al.*, 2006).

Este vetor serve como *template* nas reações de PCR para gerar a minibiblioteca de variantes e como controle nos experimentos de expressão e nos testes de interação com RBD. Na extremidade N-terminal da região codificadora foi inserido o peptídeo sinal da proteína PelB para secreção ao periplasma. A proteína Sb68-SGFP2 é expressa em fusão com uma cauda de seis histidinas no C-terminal, o que permite sua posterior purificação por cromatografia de afinidade. Além disso, foi inserido um sítio de digestão da protease TEV que permite a separação da SGFP2 do VHH Sb68 após a purificação.

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA E SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DE INTERESSE DO VETOR pET28A-Sb68-SGFP2

Sb68-SGFP2



LEGENDA: A região codificadora está representada pela seta com contorno amarelo na parte inferior do esquema. A região da sequência de nucleotídeos marcada em azul corresponde à sequência que foi deletada na construção pET28a-Sb68-GOF que está descrita abaixo. A posição dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *Xma*JI, *Xba*I, *Kpn*I, *Nde*I e *Xho*I está indicada no esquema superior. Os sítios de *Xma*JI, *Xba*I e *Kpn*I estão marcados em vermelho na sequência de nucleotídeos. A utilização dos sítios de restrição *Xma*JI e *Kpn*I permite substituir o segmento do VHH contendo as CDRs 2 e 3 pelo mesmo segmento contendo novas variantes. Já utilizando-se os sítios de *Xba*I e *Kpn*I é possível substituir a região da CDR3 pela mesma região contendo novas variantes. Essa imagem foi gerada pelo programa SnapGene version. 6.0.2. FONTE: A autora (2022).

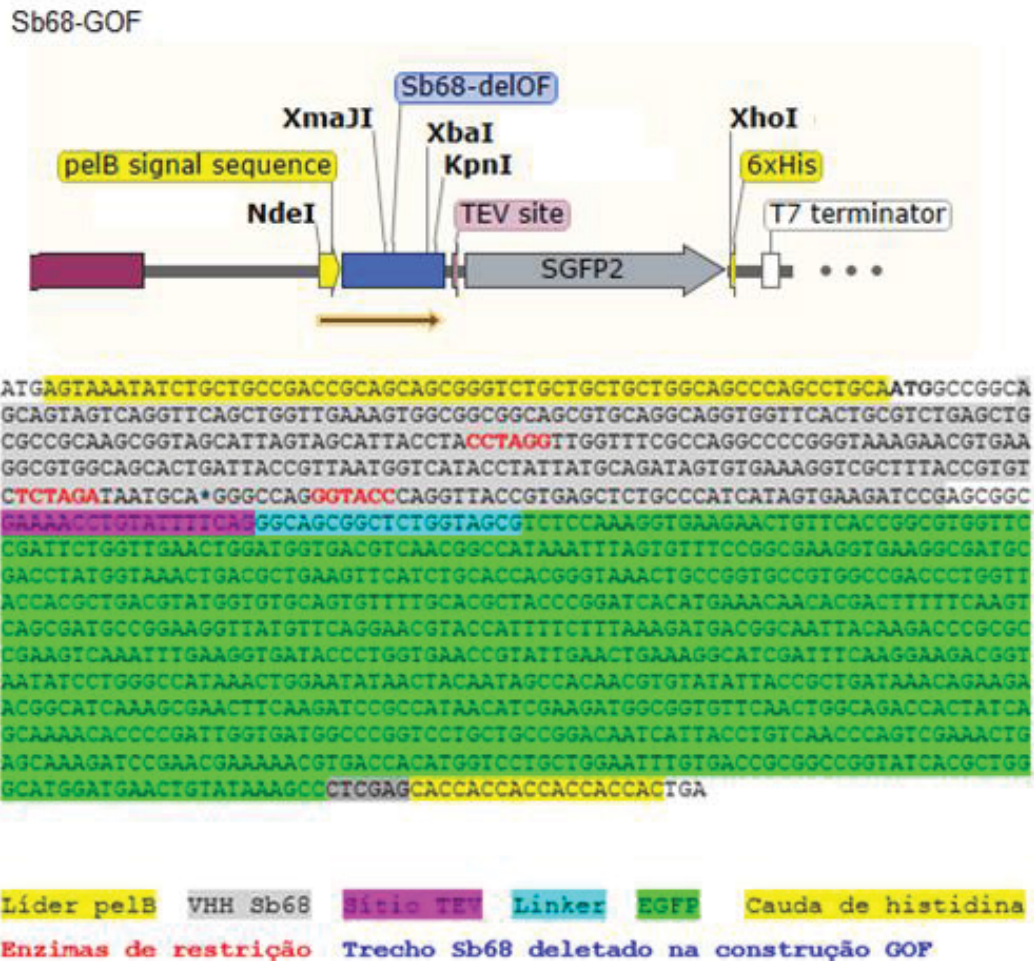
O segundo vetor, denominado pET28a-Sb68-GOF, foi construído de forma que os clones resultantes após a inserção dos produtos de PCR da minibiblioteca de variantes pudessem ser diferenciados do clone original. Para isso, ele contém o VHH Sb68 em fusão com a proteína SGFP2 (Figura 11), entretanto com a deleção de um segmento da sequência do VHH Sb68 (região deletada corresponde aos nucleotídeos em cor azul na Figura 10), ficando, com isso, o códon de iniciação da sequência codificadora que inicia em PelB, fora de fase de leitura com a sequência codificadora

da SGFP2. A fase de leitura da tradução pode ser reconstituída com a inserção de um fragmento de DNA gerado na construção da minibiblioteca de variantes.

A construção permite substituir a região contendo ambas as CDRs 2 e 3, através do uso dos sítios de restrição *Xma*I e *Kpn*I ou, apenas a região da CDR3 através do uso dos sítios das enzimas de *Xba*I e *Kpn*I. Assim, após a clonagem da minibiblioteca no vetor pET28a-Sb68-GOF e transformação em cepa de expressão de *E. coli*, as colônias não fluorescentes representam os clones originais ou não viáveis e as colônias fluorescentes representam os clones em que a sequência do Sb68 foi reconstituída ocorrendo a expressão da proteína de fusão Sb68-SGFP2.

Através da análise dos níveis de fluorescência na própria placa de Petri é possível fazer uma seleção inicial dos clones de interesse. Além disso, a proteína de interesse é expressa em fusão com uma cauda de hexahistidina no C-terminal visando sua posterior purificação por afinidade. Estes dois clones foram adquiridos da empresa Biomatik (Kitchener, Ontario Canada) como genes sintéticos clonados no plasmídeo pET28a.

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA E SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DE INTERESSE DO VETOR pET28A-Sb68-GOF



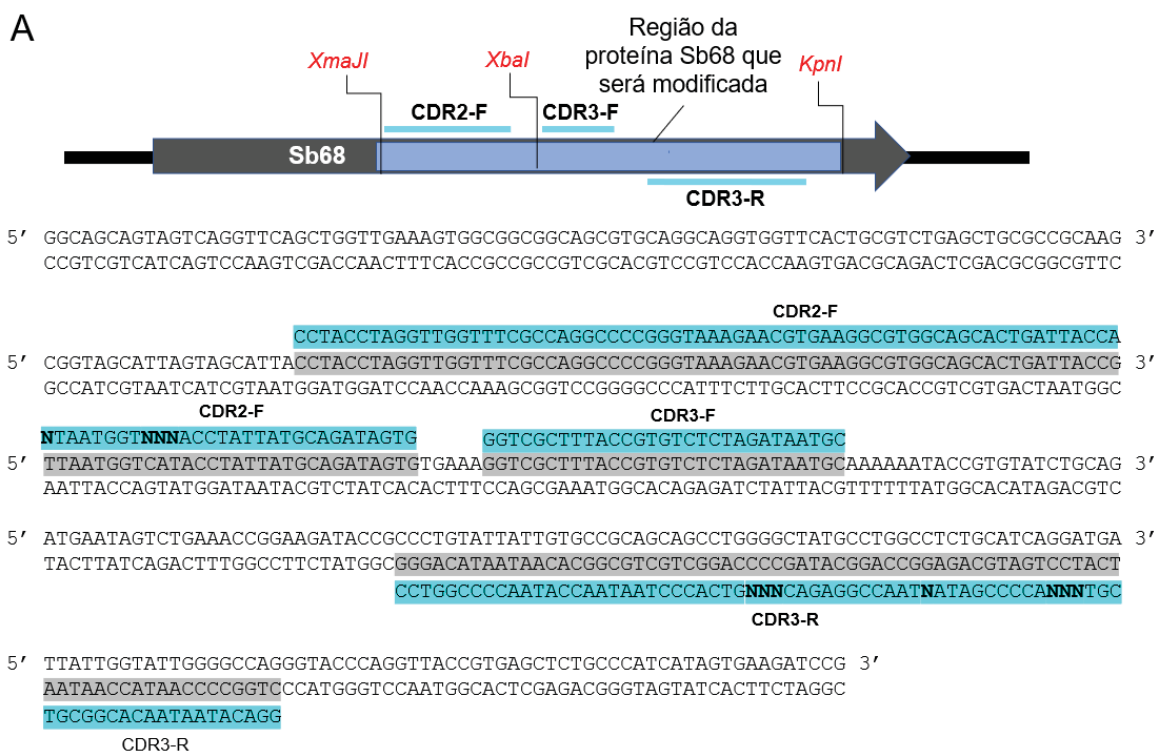
LEGENDA: A região codificadora do Sb68 fora de fase de leitura de tradução com a SGFP2 está representada pela seta com contorno amarelo na parte inferior do esquema. Na construção GOF a sequência codificadora da proteína SGFP2 está fora da fase de leitura com relação ao códon de iniciação anterior ao peptídeo sinal *pelB* devido à deleção de parte da sequência codificadora do Sb68. A posição dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *Xma*JI, *Xba*I, *Kpn*I, *Nde*I e *Xho*I está indicada no esquema superior. Os sítios de *Xma*JI, *Xba*I e *Kpn*I estão marcados em vermelho na sequência de nucleotídeos. A inserção de segmento de DNA a partir da minibiblioteca de variantes do Sb68 nos sítios de restrição *Xma*JI e *Kpn*I permite reconstituir o segmento do VHH contendo as CDRs 2 e 3, reconstituindo assim as variantes do Sb68 com sequência codificadora completa. Essa imagem foi gerada pelo programa SnapGene version 6.0.2. FONTE: A autora (2022).

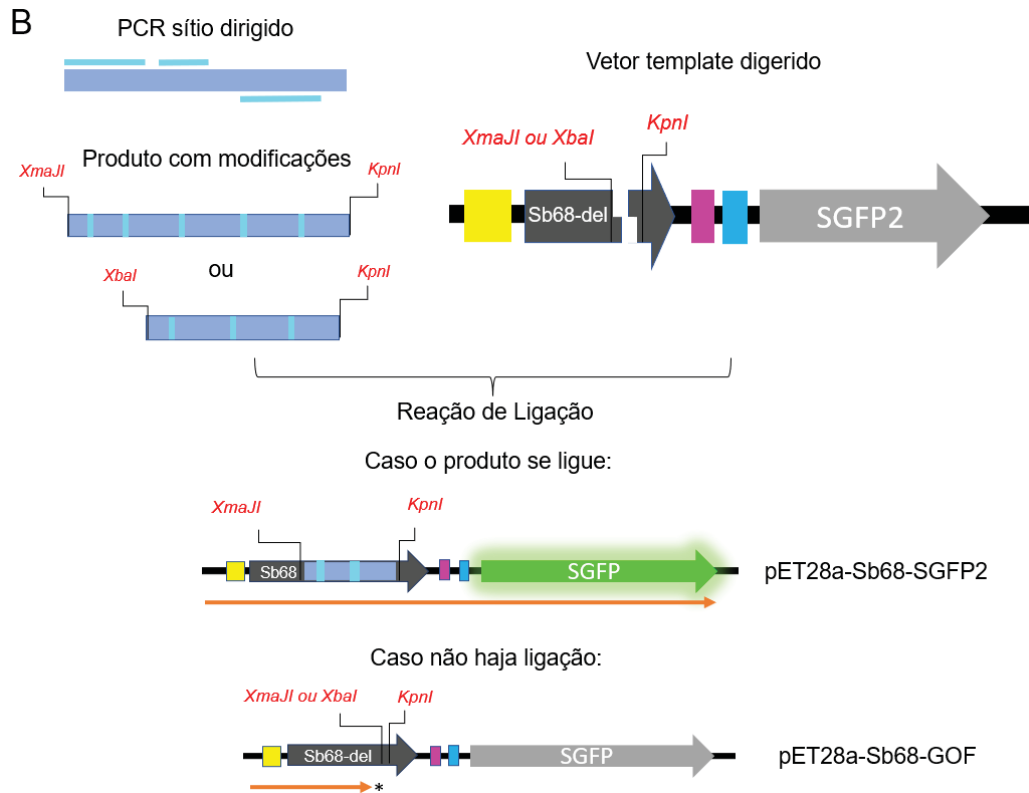
3.4.2 Geração de variantes do VHH Sb68

3.4.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos com proporções variáveis de nucleotídeos nos códons dos aminoácidos a serem substituídos foram desenhados e usados para inserção das modificações da sequência original do VHH Sb68 através de amplificação por PCR. Para a construção da biblioteca racional foram utilizados 2 oligonucleotídeos sintéticos, um no sentido *senso/forward* (CDR2-F) e um no sentido *antisenso/reverse* (CDR3-R), contendo as alterações nos códons para obtenção das mutações desejadas nas CDR2 e CDR3. Um terceiro oligonucleotídeo *forward*, CDR3-F, sem modificações, foi feito para ser usado conjuntamente com o oligonucleotídeo CDR3-R para, se necessário, gerar variantes somente da CDR3 (Figura 12). As sequências dos primers estão apresentadas na Tabela 1. Os *primers* para as reações de PCR para geração das variantes foram adquiridos liofilizados da empresa Synbio Technologies (Monmouth Junction, NJ, EUA).

FIGURA 12 - ESQUEMA REPRESENTANDO GERAÇÃO DE VARIANTES





LEGENDA: A) Regiões de anelamento dos oligonucleotídeos. Os três *primers* contendo as modificações anelam sobre o VHH Sb68 e estão destacados em azul turquesa, “N” indica as posições em que diferentes proporções dos nucleotídeos foram utilizadas para gerar as variantes. Os locais de reconhecimento das enzimas de restrição *XmaJI*, *XbaI* e *KpnI* estão destacadas em vermelho. B) Os produtos obtidos pela reação de PCR sítio dirigida são ligados ao vetor pET28a-Sb68-GOF que serve como template. As regiões da sequência da proteína Sb68 que sofrem modificações estão destacadas em azul turquesa. A seta inferior alaranjada indica a leitura da fase, caso haja correta ligação a fase de leitura será reconstituída. FONTE: A autora (2022).

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ADQUIRIDOS PARA GERAÇÃO DE VARIANTES DO VHH Sb68

Oligonucleotídeo	Sequência
CDR2-F	5'CCTA CCT AGG TTG GTT TCG CCA GGC CCC GGG TAA AGA ACG TGA AGG CGT GGC AGC ACT GAT TAC CA(00356500) AAT GGT (15850000)(35006500)(10750015) ACC TAT TAT GCA GAT AGTG 3'
CDR3-F	5' GGTCGCTTTACCGTGTCTCTAGATAATGC 3'
CDR3-R	5' CCTG GGT ACC CTG GCC CCA ATA CCA ATA ATC CCA CTG (40000060)(55004500)(00604000) CAG AGG CCA AT(00600040) ATA GCC CCA (50005000)(20800000)(35006500) TGC TGC GGC ACA ATA ATA CAGG 3'

LEGENDA: Os números entre parênteses representam um código numérico usado para indicar a proporção, em percentagem, de cada nucleotídeo na respectiva posição, sendo que o primeiro e segundo algarismos representam a percentagem de adenina, terceiro e quarto algarismos a percentagem de citosina, quinto e sexto a percentagem de guanina e, sétimo e oitavo a percentagem de timina. FONTE: A autora (2022).

3.4.2.2 Amplificação e purificação dos produtos de PCR

Os oligonucleotídeos para as reações de PCR foram reidratados com água ultrapura até a concentração de 100 µM. As reações de PCR foram realizadas com *Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fischer Scientific), conforme manual do fabricante. Uma amplificação alternativa foi realizada com *Platinum SuperFi™ II DNA Polymerase* (Thermo Fischer Scientific) seguindo o protocolo do fabricante. O programa para as amplificações foi de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/1 min, seguido de 35 ciclos (94 °C/15 s, 68 °C/20 s e 72 °C/1 min); e um ciclo de extensão final a 72 °C/5 minutos.

Os produtos de PCR foram precipitados com 0,7 volumes de isopropanol, incubados a -20 ° C por 1 hora, centrifugados (20.000 x g, por 30 minutos a 4°C) e o sobrenadante descartado. Os precipitados foram lavados com etanol 70%, novamente centrifugados (10.000 x g, por 5 minutos, 4 °C), secos à temperatura ambiente e reidratados em H₂O (18.2 MΩ-cm).

3.4.2.3 Digestão e ligação enzimática de DNA

Após quantificação, os produtos da amplificação por PCR com os *primers* CDR2-F e CDR3-R foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *XmaI* (Thermo Fischer Scientific), e os produtos amplificados com os *primers* CDR3-F e CDR3-R digeridos com as enzimas *KpnI* e *XbaI* (Anza™, Thermo Fischer Scientific).

O vetor pET28a-Sb68-GOF também foi digerido com a combinação de enzimas *KpnI-XmaI* ou *KpnI-XbaI*, sendo ambas as versões posteriormente purificadas após eletroforese em gel de agarose, cujas bandas foram cortadas e purificadas com o kit NucleoSpin Gel and PCR cleanup (Macherey-Nagel).

Os insertos e os vetores digeridos com o mesmo conjunto de enzimas foram posteriormente ligados usando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen - Thermo Fischer Scientific) em reação a 16 °C por cerca de 18 h, sendo interrompida incubando-se a 70 °C por 10 min.

3.4.2.4 Transformação em *Escherichia coli*

Os produtos da ligação foram transformados por choque térmico (42 °C por 1 minuto e 4 °C por 3 minutos) na cepa de *Escherichia coli* BL21 Star-DE3 cálcio-competentes, misturando-se 5 µL da reação de ligação em 50 µL de células. Após o choque térmico, 950 µL de meio LB foi adicionado à suspensão de transformação para recuperação das células, que foram mantidas a 37 °C por uma hora com agitação de 200 rpm. A seguir, as células foram plaqueadas em meio LB sólido com canamicina (50 µg/mL) e IPTG (30 µM). Após incubação a 37 °C por 16 horas, as placas foram analisadas no sistema iBright™ FL1500 (Invitrogen-Thermo Fischer Scientific) para identificar as colônias fluorescentes, indicando a expressão do Sb68, ou de suas variantes, fusionado à SGFP2. Para fins de comparação, os vetores pET28a-Sb68-SGFP2 e pET28a-Sb68-GOF foram também transformados e analisados como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.5 SELEÇÃO INICIAL DE VARIANTES DO VHH Sb68

3.5.1 Seleção inicial pela análise de fluorescência

Para a estratégia de seleção a partir da expressão periplasmática das variantes do VHH Sb68, a primeira seleção dos clones consistiu em observar a presença e intensidade da fluorescência das colônias transformadas com a biblioteca de variantes clonadas no vetor pET28a-Sb68-GOF, cujos clones com o inserto correto expressam, cada um deles, a fusão de uma variante do Sb68 com a SGFP2. Como controle foram plaqueadas, em paralelo, células transformadas com o vetor pET28a-Sb68-SGFP2 e que, quando cultivadas em meio suplementado com baixas doses de IPTG, expressaram o VHH Sb68 original fusionado à SGFP2. Estas células apresentaram fluorescência verde, que pôde ser rapidamente identificada no equipamento de análise de imagens iBright™ FL1500 (Invitrogen-Thermo Fischer Scientific) sob o comprimento de onda de excitação na faixa de 488 nm.

3.5.2 Avaliação dos clones das variantes por digestão de DNA plasmideal e PCR de colônias

Visando confirmar que as colônias fluorescentes continham a sequência codificadora de Sb68-SGFP2 - reconstituída após a ligação do produto de PCR contendo a minibiblioteca de variantes com o pET28a-Sb68-GOF digerido com *Xma*II e *Kpn*I - dez clones que apresentaram fluorescência foram selecionados para essa etapa. O DNA plasmideal foi extraído pelo método de lise alcalina e precipitado com isopropanol e depois digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Xho*I (Anza, Thermo Fischer Scientific). A reação de digestão foi incubada em estufa a 37 °C durante 1 hora. A seguir realizou-se uma análise qualitativa dos produtos das digestões por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

A partir desta análise e do sequenciamento do DNA de algumas amostras iniciais, verificou-se que vários DNAs isolados de colônias fluorescentes não apresentavam o inserto correspondendo ao segmento das CDRs 2 e 3 (discussão na seção 4.5.1. "Pré-triagem dos clones fluorescentes por PCR de colônia"). Por isso, foi necessário inserir uma etapa de triagem adicional dos clones por PCR de colônia, para excluir das etapas posteriores aqueles que não continham o inserto correto.

Passaram pela etapa de triagem por PCR de colônia todos os clones que foram previamente selecionados pela análise da expressão por fluorescência da SGFP2, feita diretamente nas placas de Petri utilizando o equipamento iBright FL1500 (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific).

Para as reações de PCR foram utilizadas colônias isoladas cujas células foram transferidas com palito estéril para o tubo de reação, as quais foram também inoculadas em nova placa de LB-ágar-canamicina-IPTG, com a respectiva identificação numérica, para identificação posterior de cada clone propagado. As reações foram realizadas com a mastermix do Kit NAT (IBMP) e os *primers* CDR3F e GFP-R (10 µM) que resultaram na amplificação de um fragmento de DNA contendo parte da região do Sb68 e a SGFP2 somente dos clones positivos.

As reações foram feitas em termociclador ProFlex™ (Thermo Fischer Scientific). O programa para as amplificações consistiu em um ciclo de desnaturação inicial a

94°C/3 minutos; seguido de 30 ciclos (94 °C/15 s, 61 °C/20 s, 72 °C/1 min); e um ciclo de extensão final a 72°C/7 minutos. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1%, visualizado pela adição do corante GelRed® (Sigma-Aldrich). Os clones que continham o inserto completo foram selecionados para os testes de interação com o domínio RBD da proteína S de SARS-CoV2.

3.6 ENSAIOS DE ELISA PARA AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DAS VARIANTES DE Sb68 COM O RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2

3.6.1 Preparação de extratos proteicos por choque osmótico

Primeiramente, culturas de 2 mL de meio LB contendo canamicina (50 µg/mL), de cada clone, foram incubadas a 37°C por 16 horas com agitação de 200 rpm. Em seguida, 100 µL de cada pré-cultura foram adicionados em 5 mL de meio LB fresco suplementado com canamicina (50 µg/mL) e as culturas foram incubadas a 37°C com agitação de 200 rpm até atingir densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) entre 0,6 e 0,8. Em seguida, as culturas foram aclimatadas a 18 °C por 30 min e induzidas com 100 µM de IPTG, permanecendo a 18 °C com agitação de 200 rpm por cerca de 16 horas.

Para obtenção dos extratos, 3 mL das culturas induzidas foram centrifugados (4.000 x g, 5 min, 4 °C), as células ressuspensas em 1 mL de tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 anidro, 2 mM KH_2PO_4) e novamente centrifugadas, tendo o sobrenadante sido completamente removido. Após esta lavagem das células com PBS, as proteínas do periplasma foram extraídas através de choque osmótico. Para isso as culturas foram ressuspensas em 300 µL de tampão hipertônico (20% sacarose, 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,0 mM EDTA), incubadas em gelo por 10 min sob leve agitação, centrifugadas (20.000 x g, 10 min, 4 °C) e este sobrenadante foi descartado.

As células foram então ressuspensas em 300 µL de H_2O ultrapura (18.2 MΩ-cm), incubadas em gelo por 10 min sob leve agitação, centrifugadas (20.000 x g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante coletado e armazenado em gelo para as análises e ensaios

posteriores. Os extratos foram quantificados utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific) através da medida de absorbância a 280 nm. A quantidade de proteínas totais foi normalizada, adicionando-se PBS, com relação ao extrato controle obtido do clone pET28a-Sb68-SGFP2 original, para possibilitar a comparação da afinidade relativa na interação com o RBD nos ensaios do tipo ELISA.

3.6.2 Ensaio de imun absorção enzimática - ELISA indireto

3.6.2.1 Padronização dos ensaios

Nessa etapa buscou-se identificar as melhores condições para a realização do teste. A concentração da proteína RBD2 foi determinada por curva de BSA (albumina de soro bovino – Sigma Aldrich) e gel SDS-PAGE. O domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2 utilizado neste trabalho foi expresso em células HEK293 em nosso laboratório pela aluna de mestrado Vanessa Zulkievicz Rogério e purificado por métodos cromatográficos pela pós-doutoranda Dayane Sereno Baeta Rodrigues. A proteína purificada foi gentilmente cedida para a utilização em nossos ensaios de ELISA.

Inicialmente a solução de BSA (20 mg/mL) foi preparada e quantificada pelo espectrofotômetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific) utilizando o método A280 próprio para detecção de BSA. Solução de BSA (1mg/mL) foi preparada e procedeu diluições em PBS, para a obtenção das seguintes concentrações (115 µg/mL, 47 µg/mL; 25 µg/mL). Diluições seriadas em PBS da proteína RBD2 também foram preparadas (100 µg/mL, 50 µg/mL; 25 µg/mL, e 10 µg/mL).

Alíquotas dessas proteínas de quantidades conhecidas foram adicionadas ao tampão de amostra (glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M) na proporção de 4:1. Seguidamente foram fervidas por cinco minutos a 95 °C, centrifugadas rapidamente e aplicadas em gel SDS-PAGE 10% e submetido a uma corrida de 145 V. Após a corrida, o gel foi corado com azul de Coomassie (40% metanol, 20% de ácido acético, 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250). Os padrões das bandas foram comparados.

Para a padronização dos ensaios foram realizados diversos testes com diferentes concentrações de antígenos e diferentes diluições. As concentrações do antígeno RBD2 testadas foram: 5 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL, diluídas em solução PBS. O anticorpo primário (Anti-GFP IgG1κ monoclonal – Roche) foi testado nas diluições 1:1000 e 1:2000. Foram testados tempos de incubação dos extratos proteicos e anticorpos primário e secundário, sendo avaliado os intervalos de 40 minutos e 1 hora. A quantidade de lavagens entre as etapas também foi avaliada.

Os melhores resultados foram utilizando o antígeno RBD2 na concentração 5 µg/mL, para o anticorpo primário (Anti-GFP) optou-se pela diluição 1:1000 com o tempo de incubação entre as etapas igual a 1 hora e com 5 lavagens com PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20) seguidas por 3 lavagens com PBS.

3.6.2.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA indireto

Para os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto (Figura 13) utilizou-se uma microplaca de 96 poços, preta, de fundo transparente chato (µClear®, Chimney Well). As placas foram inicialmente sensibilizadas com 100 µL/poço do domínio RBD a 5 µg/mL, totalizando 500 ng/poço. As placas tampadas foram incubadas a 4°C por aproximadamente 16 horas, os poços foram esvaziados por aspiração e lavados 3 vezes com 190 µL de PBS-T. Como solução de bloqueio utilizou-se 200 µL PBS-T + 5% de leite em pó desnatado e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Após isso, a solução de bloqueio foi removida, os poços lavados 3 vezes com 200 µL de PBS-T e 3 vezes com PBS.

A próxima etapa consistiu na incubação de 100 µL de extrato de cada clone por poço, em triplicatas, por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, os extratos foram aspirados e os poços lavados 3 vezes com PBS-T. A seguir, adicionou-se 100 µL de anticorpo primário (Anti-GFP IgG1κ monoclonal – Roche) previamente diluído 1:1000 em PBS-T, incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente e removeu-se por aspiração. Após quatro lavagens com 200 µL de PBS-T, incubou-se com 100 µL de anticorpo secundário (Anti-Mouse Goat IRDye800 - Licor) diluído 1:20.000 em PBS-T

por 1 hora à temperatura ambiente antes da remoção por aspiração. Após 5 lavagens com 200 µL de PBS-T e 3 lavagens com PBS, a coloração/revelação foi feita com 100 µL da solução cromógena de Tetrametilbenzidina (TMB) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,01% por 3-8 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, 100 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1 M foram adicionados a fim de interromper a reação. A leitura da absorbância foi realizada em 450 nm em leitora de microplacas Synergy™ H1 Multidetecção Híbrida (BioTek).

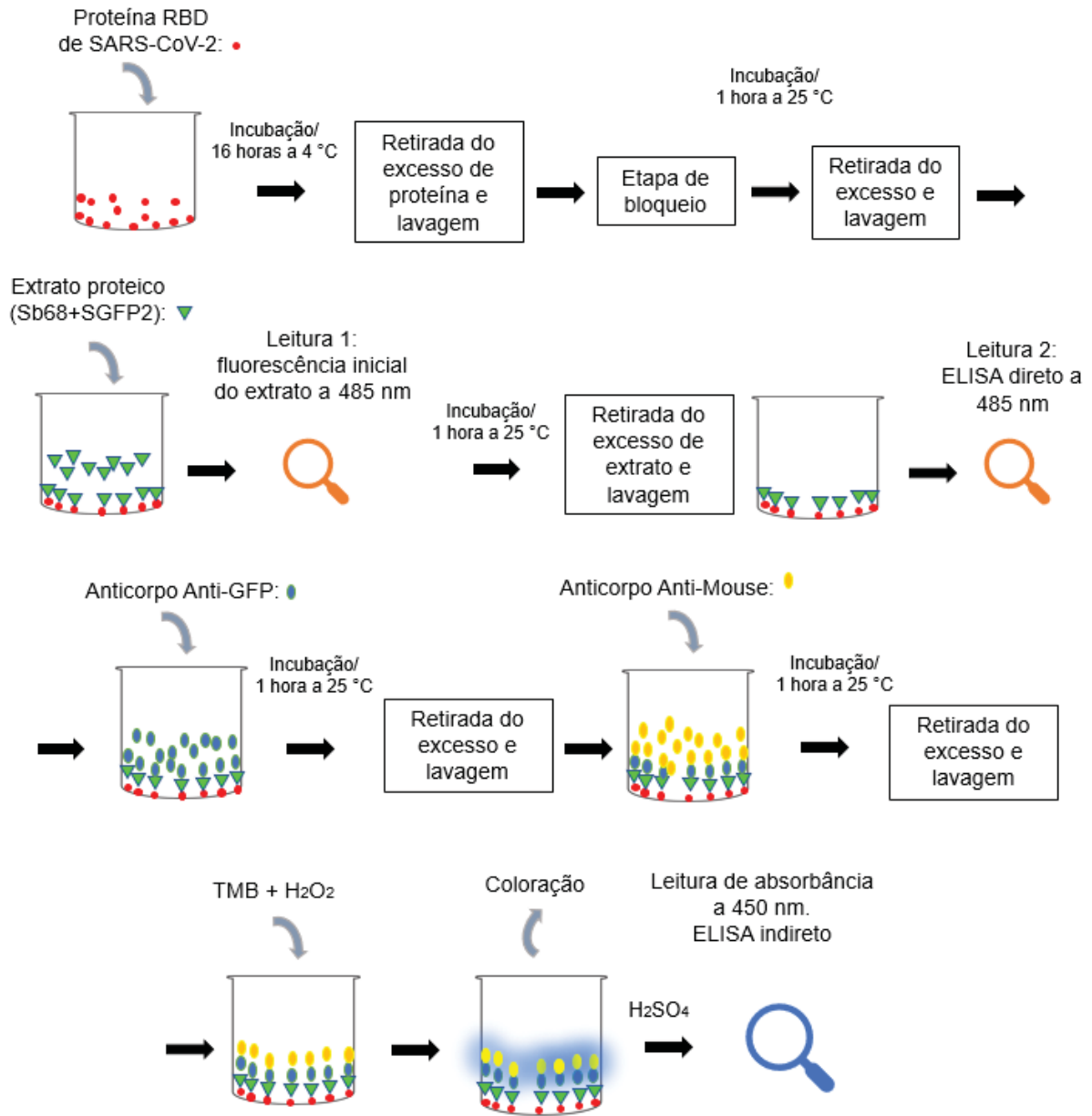
3.6.2.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA direto

O objetivo do ensaio de ELISA direto foi verificar a possibilidade de obter dados de interação utilizando apenas a fluorescência emitida pela SGFP2 fusionada às variantes do Sb68. Esse método seria mais prático pois dispensaria a necessidade de incubação com anticorpo contra a SGFP2 e a posterior incubação com anticorpo secundário contendo uma peroxidase acoplada para revelação do ensaio.

Para esse ensaio foram realizadas duas leituras com excitação na faixa de 485-520 nm e emissão na faixa 509 nm, em leitora de microplacas Synergy™ H1 Multidetecção Híbrida (BioTek) em momentos diferentes como indicado na Figura 13. A primeira ocorreu após a aplicação do extrato proteico, denominada leitura 1, a fim de determinar a intensidade de fluorescência inicial dos extratos. Já a leitura 2, que é o resultado do ELISA direto propriamente, ocorreu posteriormente à remoção do extrato e lavagens e imediatamente após a adição do anticorpo primário (anti-GFP).

A leitura foi realizada após a adição do anticorpo primário na sequência do procedimento do ELISA indireto, visto que este anticorpo não interfere na leitura de fluorescência da SGFP2. Desta forma pode-se avaliar os resultados de ELISA direto e indireto no mesmo experimento.

FIGURA 13 - ESQUEMA DE ETAPAS ENVOLVIDAS NOS ENSAIOS ELISA



LEGENDA: Os diferentes componentes do ensaio são representados por símbolos em cores e identificados. A etapa de detecção direta da fluorescência da SGFP2 está destacada como “Leitura 2”. FONTE: A autora (2022).

3.6.3 Tratamento e normalização dos dados

Para o ensaio de ELISA direto, a fluorescência emitida pelos extratos celulares dos clones foi normalizada pelo controle positivo (VHH Sb68 em fusão ao SGFP2) e os

valores de média de intensidade de fluorescência são apresentados como *fold-change* em relação ao controle.

No ELISA indireto, a afinidade foi medida pelo valor de absorvância também normalizado pelo valor do VHH Sb68. As barras de erro foram obtidas pelo cálculo do desvio padrão das razões entre cada amostra e controle.

3.7 DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS CLONES DAS VARIANTES DO VHH Sb68

3.7.1 Extração de DNA plasmidial

Nesta etapa foi extraído o DNA plasmidial dos clones para determinação da sequência nucleotídica visando identificação das substituições de aminoácidos. O DNA foi extraído pela técnica de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) a partir de inóculos de 10 mL de meio LB suplementado com canamicina (50 µg/mL), cultivados a 37 °C por 16 horas com 200 rpm de agitação. A seguir as células foram coletadas por centrifugação (4.000 rpm, 10 min, 4°C.) e ressuspensas em 300 µL de solução S1 (glicose 50 mM, Tris-HCl pH 8.0 1 M, EDTA pH 8.0 10 mM) e RNase A (400 µg/mL). Em seguida, adicionou-se 600 µL de solução S2 (NaOH 200 mM e SDS 1%), incubou-se por 5 min à temperatura ambiente e então adicionou-se 450 µL de solução S3 (acetato de potássio 5 M, ácido acético glacial), com agitação manual branda após cada adição.

O lisado foi centrifugado por 10 min a 20.000 x *g*, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo ao qual foram adicionados 300 µL de etanol absoluto. O DNA foi purificado desta suspensão através de coluna de minipreparação de plasmídeos (Qiagen). O DNA extraído foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific) e analisado em gel comparando-se com o marcador de massa molecular Precision Mass Ruler (BioRad).

3.7.2 Sequenciamento de DNA

O DNA plasmideal extraído dos clones foi sequenciado pelo método de Sanger (SANGER e NICKLEN, 1977) utilizando os serviços de sequenciamento das empresas GoGenetic (Tecnoparque PUC-PR, Curitiba – PR, Brasil), ACTGene (Campus do Vale - UFRGS, Alvorada – RS, Brasil) e Exxtend (Paulínia – SP, Brasil). Foram realizadas duas reações de sequenciamento para cada clone, uma utilizando o *primer T7 promoter* e outra o *primer GFPseq-R* (Tabela 2).

TABELA 2 - PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

Primer	Sequência
T7 promoter	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
GFPseq-R	5' AGTTTACCCGTGGTGCAGATG 3'

FONTE: A autora (2022).

3.8 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DAS VARIANTES

As sequências obtidas foram analisadas por alinhamento múltiplo utilizando-se as ferramentas *Clustal X version 2.0* (<http://www.clustal.org/clustal2/>) (LARKIN *et al.*, 2007) para gerar o alinhamento e os programas *Jalview version 2.11* (CLAMP *et al.*, 2004) e *WebLogo* (<http://weblogo.threeplusone.com/>) (CROOKS *et al.*, 2004) para edição e visualização. Nessa etapa, foram observados quais nucleotídeos e, conseqüentemente, quais aminoácidos foram substituídos quando comparados à sequência original. Também foi calculada a frequência de cada substituição observada e avaliada sua correlação com a taxa de substituições inicialmente planejada.

3.9 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS REGIÕES DA INTERAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DO VHH Sb68 COM O RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2

A partir do modelo cristalográfico previamente disponibilizado no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), acesso 7KLW (Ahmad *et al.* 2021), do VHH Sb68 em complexo com o RBD da proteína S de SARS-CoV-2, foi analisada a região de interface entre as proteínas, com auxílio dos programas Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.) e PDBePISA (KRISINEL e HENRICK, 2007). A partir desta caracterização, foram realizadas análises a fim de se observar como as substituições de aminoácidos nas variantes do Sb68 poderiam afetar, positiva ou negativamente, a ligação das variantes ao RBD. Foram levadas em consideração as características físico-químicas dos resíduos de aminoácidos originais e dos substitutos, como volume da cadeia lateral, polaridade ou hidrofobicidade e carga.

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE VHHs QUE RECONHECEM O RBD DE SARS-CoV-2 E ANÁLISES ESTRUTURAIAS

Inicialmente foi realizado um levantamento dos fragmentos de anticorpos do tipo VHH anti SARS-CoV-2 descritos na literatura no período de maio a outubro de 2020, para definição dos alvos a serem abordados na parte experimental do trabalho e encaminhamento da aquisição dos materiais.

Destes, 23 foram selecionados com base nas informações disponíveis e propriedades de interação com o antígeno (Tabela 3). Em particular, o VHH-72 foi caracterizado tanto em relação à sua interação com SARS-CoV-1 quanto com SARS-CoV-2. Os demais anticorpos foram testados apenas contra SARS-CoV-2. Os trabalhos descrevendo caracterizações estruturais e funcionais dos VHHs relacionados a este projeto, publicados após outubro de 2020, incluindo a determinação da estrutura do VHH Sb68, foram posteriormente incorporados em nossas análises.

A Tabela 3 contém informações resumidas sobre os 23 VHHs selecionados. Informamos se o método de isolamento dos anticorpos foi por meio de bibliotecas sintéticas ou por imunização de camelídeos (natural). Os valores das constantes de dissociação (K_D) determinadas para cada anticorpo VHH com o antígeno RBD são também informados, assim como os respectivos códigos das estruturas tridimensionais depositadas no Protein Data Bank.

TABELA 3 - RESUMO DOS DADOS SOBRE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS DO TIPO VHH PARA SARS-CoV-2 DESCRITOS NA LITERATURA

Identificação	Origem	K _D VHH-RBD	Estrutura tridimensional (código PDB)	Referência
VHH-72	Natural	38,6 nM	Não disponível	Wrapp <i>et al.</i> , 2020 (a)
NIH-CoVnb-103	Natural	9,43 nM	Não disponível	Esparza <i>et al.</i> , 2020
NIH-CoVnb-108	Natural	28 nM	Não disponível	
NIH-CoVnb-109	Natural	58 nM	Não disponível	
NIH-CoVnb-112	Natural	4,94 nM	Não disponível	
NIH-CoVnb-113	Natural	8,19 nM	Não disponível	
Ty1	Natural	9 nM	6ZXN	Hanke <i>et al.</i> , 2020
H11-D4	Sintético	10 nM	6YZ5	Huo <i>et al.</i> , 2020.
H11-H4	Sintético	5 nM	6ZBP	
W25UACH	Natural	0,295 nM	Não disponível	Valenzuela Nieto <i>et al.</i> , 2021.
Sb23	Sintético	10,6 nM	7A29	Custódio <i>et al.</i> , 2020.
Sb#14	Sintético	30,75 nM	Não disponível	Walter <i>et al.</i> , 2020.
Sb#15	Sintético	24,22 nM	Não disponível	
Sb#16	Sintético	61,22 nM	7KGK	
Sb#42	Sintético	178,21 nM	Não disponível	
Sb#45	Sintético	84,82 nM	7KGJ	
Sb#68	Sintético	118,12 nM	7KLW	
SR4	Sintético	14,5 nM	7C8V	Li <i>et al.</i> , 2021.
MR17	Sintético	83,7 nM	7C8W	
MR3	Sintético	1,0 nM	Não disponível	
MR4	Sintético	20,3 nM	Não disponível	
LR1	Sintético	47,5 nM	Não disponível	
LR5	Sintético	22,8 nM	Não disponível	

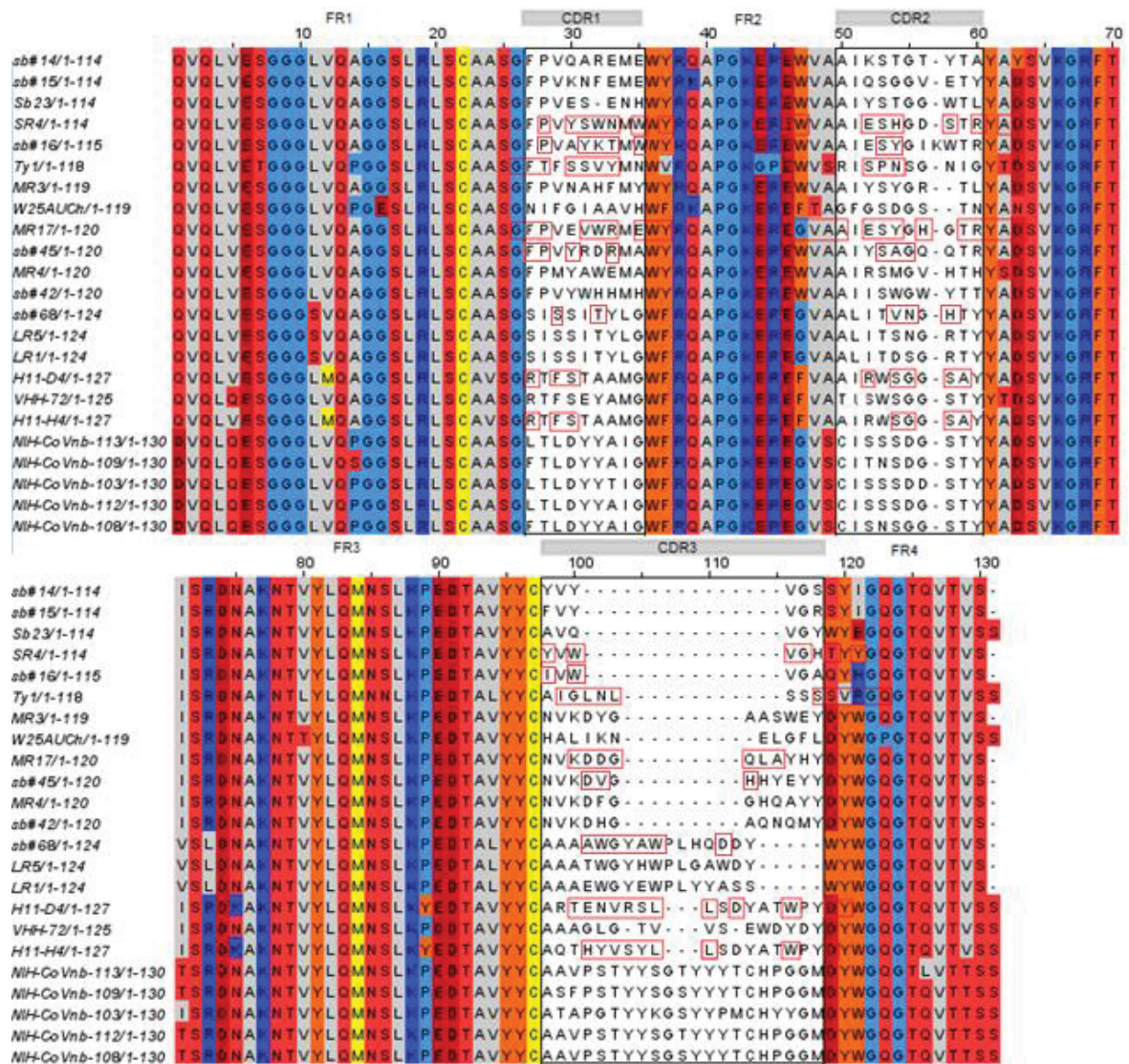
FONTE: A autora (2022).

A etapa seguinte consistiu no alinhamento múltiplo de sequências, o qual tem como objetivo revelar padrões e características que podem ser compartilhados por

muitas sequências ou identificar modificações que podem explicar a variabilidade entre elas (KEMENA e NOTREDAME, 2009). Esta análise permitiu verificar as características semelhantes e divergentes entre as sequências de aminoácidos do grupo de VHHs de interesse.

O alinhamento das sequências dos VHHs selecionados e relacionados na Tabela 3, gerado utilizando-se o programa *Clustal Omega* (SIEVERS *et al.*, 2014) e editado e analisado pelo *Jalview* (Versão 2.11) (CLAMP *et al.*, 2004), é mostrado na Figura 14. Os VHHs analisados possuem tamanho entre 114 e 130 resíduos e as regiões determinantes de complementariedade (CDRs) possuem aproximadamente 9 resíduos de aminoácidos na CDR1 e 10 resíduos na CDR2. É interessante notar a variação do tamanho da CDR3 entre os VHHs analisados, que podem ser separados em três grupos. Um primeiro grupo apresentando a CDR3 mais curta, de 6 resíduos, um segundo grupo com CDR3 de tamanho intermediário de 11 resíduos e um terceiro grupo, que apresenta uma CDR3 com comprimento de 16 a 21 resíduos.

FIGURA 14 - ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE SEQUÊNCIAS DE VHHS ANTI SARS-CoV-2



LEGENDA: As regiões correspondentes às *frameworks* (FR) e regiões determinantes de complementariedade (CDR) estão indicadas no topo do alinhamento. Os resíduos estão coloridos de acordo com suas propriedades químicas e em branco são indicados os resíduos não conservados. Os resíduos que participam da interação com o domínio RBD da proteína S, com base nas estruturas tridimensionais disponíveis dos complexos estão contornados em vermelho. As sequências estão agrupadas pelo comprimento, de modo que, aquelas com maior quantidade de gaps estão mais distantes daquelas com nenhum gap. Figura gerada pelo programa Jalview 2.11. FONTE: A autora (2022).

As regiões destacadas por caixas vermelhas indicam os resíduos que participam da interação com o domínio RBD da proteína S, identificados a partir da determinação das estruturas tridimensionais dos complexos. Observa-se, como esperado, que a maior parte das regiões de interação estão restritas às CDRs, porém

em alguns VHHs, resíduos pertencentes aos *frameworks* também participam da superfície de interação.

Uma representação do alinhamento múltiplo de sequências dos VHHs foi gerada pelo programa *WebLogo* 3.7.4 (<http://weblogo.threepusone.com/>) (CROOKS *et al.*, 2004). Tal representação evidencia a conservação ou variabilidade dos aminoácidos em cada posição ao longo da sequência. É possível observar as três regiões hiper variáveis, correspondentes as regiões de determinantes de complementariedade CDR1, CDR2 e CDR3, intercaladas pelas regiões mais conservadas frameworks FR1, FR2, FR3 e FR4 (Figura 15). Como já descrito para os anticorpos do tipo VHH, a CDR3 é a maior e menos conservada, enquanto as regiões correspondentes aos *frameworks* são mais conservadas e apresentaram maiores valores de bits. Este resultado corrobora alinhamentos anteriores de sequências de VHHs realizados por Vattekatte *et al.* (2020) e Mitchell e Colwell (2018).

FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE SEQUÊNCIAS DOS VHHs EM FORMATO LOGO

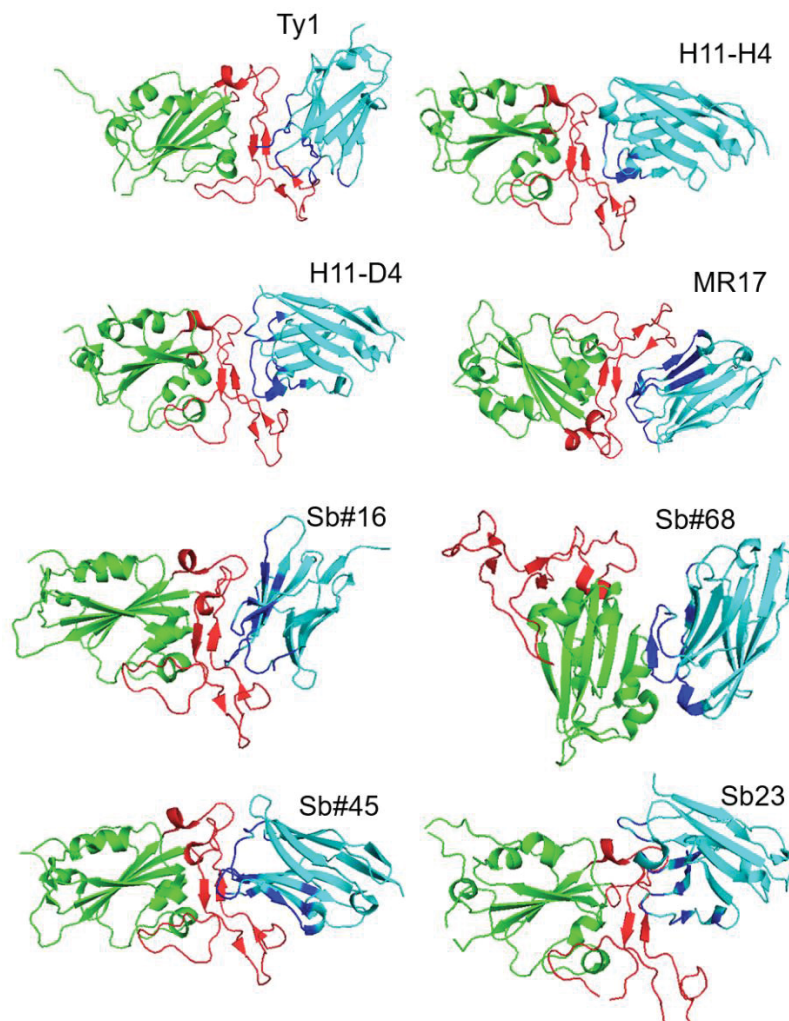


LEGENDA: A frequência de cada aminoácido é representada por sua letra e seu tamanho varia conforme sua conservação no alinhamento. Aminoácidos mais conservados possuem maiores *bits* e aqueles menos conservados possuem menores *bits*. Figura gerada pelo programa *WebLogo* 3.7.4. FONTE: A autora (2022).

Nove estruturas tridimensionais do domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2 em complexo com anticorpos do tipo VHH (SR4, Ty1, MR17, H11-D4 e H11-H4, Sb23, Sb#16, Sb#45, Sb#68) estão disponíveis no *Protein Data Bank*. As análises das estruturas utilizando o programa *PyMol* 2.4.0 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.) e o PDBePISA (KRISSINEL e HENRICK, 2007), visaram a investigação detalhada da interface de interação antígeno-anticorpo.

A figura 16 mostra uma análise global das interfaces RBD-VHH revelando que, com exceção do Sb#68, a região de interação dos demais anticorpos envolve o motivo de ligação ao receptor (RBM, mostrado em vermelho na figura 16) e, portanto, sobrepõe-se em maior ou menor grau à região de interação do RBD com a ACE2.

FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DOS COMPLEXOS DO DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2 E ANTICORPOS TIPO VHH



LEGENDA: O domínio RBD da proteína S está representada em verde, com o motivo de ligação ao receptor (RBM) destacado em vermelho. As estruturas dos VHHs são mostradas em ciano com a região de interação com o RBD destacada em azul escuro. FONTE: A autora (2022).

A tabela 4 contém resultados das análises, realizadas através da ferramenta PDBePISA, das superfícies de interação dos complexos VHH-RBD. O complexo RBD-SR31 possui a maior área de interface também é o que possui a maior quantidade de pontes de hidrogênio. Apresentar uma grande área de interface não indica necessariamente maior afinidade, por exemplo, o VHH Sb#16 possui o segundo maior valor de áreas de interface (993,3 Å²) porém apresenta um baixo valor de afinidade ao RBD ($K_D = 61,3$ nM).

Em contrapartida, o complexo RBD-H11-H4 utiliza uma menor superfície de interação e apresenta maior afinidade ($K_D = 5$ nM). Nota-se que os complexos do domínio RBD com os anticorpos H11-D4 e H14 envolvem quatro pontes salinas (interação eletrostática entre cadeias laterais carregadas) o que pode conferir maior estabilidade aos complexos.

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS DA SUPERFÍCIE DE INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS VHH-RBD

Identificação VHH	Área de Interface (Å ²)	N _{HB}	N _{SB}	K _D	Referências
Ty1	796,2	3	-	9 nM	Hanke <i>et al.</i> , 2020
H11-D4	599,0	11	4	10 nM	Huo <i>et al.</i> , 2020
H11-H4	636,8	5	4	5 nM	
Sb23	609,3	5	-	10,6 nM	Custódio <i>et al.</i> , 2020
Sb#16	993,3	10	1	61,22 nM	Walter <i>et al.</i> , 2020
Sb#45	975,7	15	4	84,82 nM	
Sb#68	639,5	9	4	118,12 nM	
SR4	727,4	6	-	14,5 nM	Li <i>et al.</i> , 2021
MR17	895,2	14	1	83,7 nM	

LEGENDA: A área de interface é um valor obtido pela diferença entre a área total da superfície acessível das moléculas individualmente e a área acessível do complexo, dividido por dois. O número de pontes de hidrogênio (N_{HB}) e pontes salinas (N_{SB}) envolvidas na interação, bem como as constantes de dissociação (K_D) são indicadas. FONTE: A autora (2022).

4.2 ESCOLHA DO VHH PARA EXPRESSÃO E EVOLUÇÃO MOLECULAR

Nesta etapa do trabalho, foram definidos os anticorpos para produção recombinante e geração de mutantes. Como critério para a escolha foram avaliados os dados disponíveis na literatura, regiões de interação entre SARS-CoV-2 e VHH, valores da constante de dissociação (K_D) e presença ou não de proteção de propriedade intelectual através de patentes. Como resultado, os candidatos escolhidos foram os Sb#15 e Sb#68 os quais não se ligam na mesma região do RBD, permitindo a utilização de um deles para captura do antígeno e do outro para revelação, em possíveis ensaios de detecção de antígeno.

Embora a detecção do vírus por um ensaio empregando o mesmo anticorpo para captura e revelação seja possível devido à presença de múltiplas cópias da proteína S na superfície viral, a utilização de anticorpos com diferente região de reconhecimento do antígeno pode apresentar vantagens em relação à sensibilidade do ensaio. A interação dos anticorpos em regiões distintas do RBD pode proporcionar um ensaio mais robusto, capaz de detectar o antígeno a partir de amostras, por exemplo, em que o trímero da proteína S não esteja íntegro.

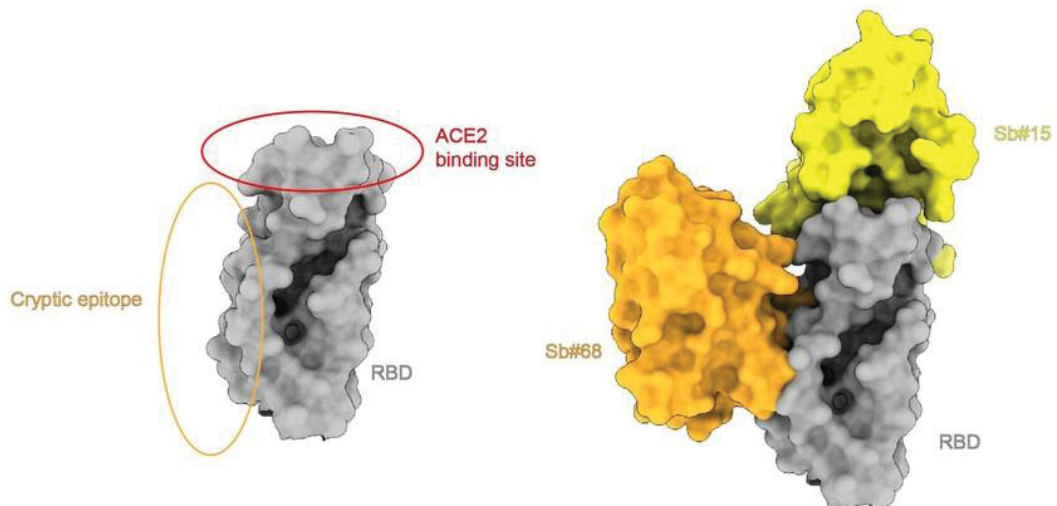
O Sb#15 reconhece o vírus pela sua ligação ao topo da região RBD, se sobrepondo fortemente ao local de ligação do ACE2, e possui uma constante de dissociação entre antígeno-anticorpo relativamente baixa ($K_D = 24,22$ nM) (WALTER *et al.*, 2022). O Sb#68, por sua vez, se liga ao vírus pela região lateral do RBD sendo essa uma região mais conservada e muito distinta da região de reconhecimento da ACE2 (Figura 17), porém esse VHH apresenta uma afinidade de ligação ao RBD bem mais baixa ($K_D = 118,2$ nM). Walter e colaboradores (2022) já demonstraram que esses dois VHHs podem se ligar simultaneamente ao RBD e apresentam uma ligação cooperativa à proteína *spike* (WALTER *et al.*, 2022).

O fato de que ambos os VHHs não estão sob proteção de propriedade intelectual também foi crucial para a escolha. Desse modo, possíveis produtos gerados em decorrência desse trabalho poderão ser disponibilizados para uso futuro sem infringir o direito de patente.

Ensaio de captura de antígeno exigem uma grande afinidade e especificidade do anticorpo no reconhecimento da proteína alvo. O fato do complexo Sb#68-RBD possuir um valor de K_D relativamente alto, indicando baixa afinidade, deixa margem para o aumento desta afinidade através da otimização da sua superfície de interação. Neste trabalho, o anticorpo sintético de domínio único inicialmente designado por Walter e colaboradores (2022) como sybody Sb#68 será referido como VHH Sb68. Utilizou-se Sb#68 quando se fez referência direta ao artigo original.

Por uma questão de limitação de tempo, a produção do Sb#15 e análise de sua aplicação em testes de detecção de antígeno é atualmente objeto de estudo de uma outra estudante do nosso grupo de pesquisa.

FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REGIÕES DE INTERAÇÃO E DAS ESTRUTURAS DOS VHHS Sb#68 E Sb#15 EM COMPLEXO COM O RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2



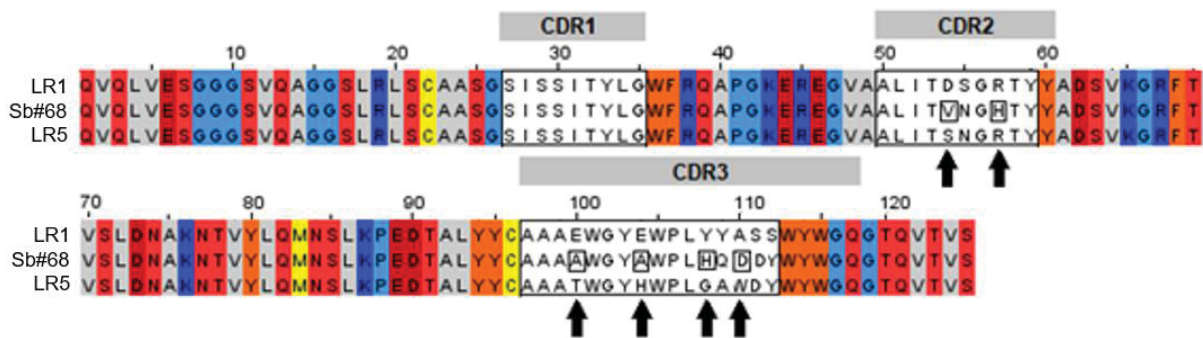
LEGENDA: A região destacada como epítipo críptico se refere a região de ligação do Sb#68, e a região ACE2 é onde ocorre a interação do RBD com o receptor celular. Sb#68 é representado pela cor laranja e o Sb#15 pela cor amarela. FONTE: Extraída de WALTER *et al.*, 2022.

4.3 PLANEJAMENTO DAS MUTAÇÕES A SEREM INTRODUZIDAS NO VHH SB68 VISANDO AUMENTO DE AFINIDADE À PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2

A estratégia para gerar variantes do Sb#68 com maior afinidade ao RBD da proteína S de SARS-CoV-2 consistiu num processo de maturação *in vitro*. Para isto, conforme descrito acima, primeiramente foi feita a análise do alinhamento múltiplo de sequências, que auxiliou nas escolhas dos aminoácidos cuja substituição pudesse

umentar a afinidade do VHH Sb#68. Os VHHs LR1 e LR5 serviram como base, pois, apesar de apresentarem sequências muito parecidas ao candidato (Figura 18), possuem maior afinidade ao RBD, sendo as constantes de dissociação: VHH LR1 $K_D=47,5$ nM e VHH LR5 $K_D=22,8$ nM. Também possuem comprimento igual, de 124 aminoácidos e mesmo tamanho da CDR3, com 16 aminoácidos.

FIGURA 18- ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE Sb#68, LR1 E LR5



LEGENDA: As setas indicam as posições para as quais foram planejadas substituições dos aminoácidos de Sb#68, destacados por caixas pretas. FONTE: A autora (2022).

Considerando que a CDR1 é igual para os VHHs LR1, LR5 e Sb68, nenhuma modificação foi planejada para esta região. Os aminoácidos a serem substituídos com as respectivas substituições estão listados na Tabela 6, na coluna denominada substituições desejadas. Na região CDR2, os aminoácidos a serem substituídos são: valina na posição 54 (V54) por serina (S) ou treonina (T); histidina na posição 57 (H57) por arginina (R) em maior proporção, manter a própria histidina (H) ou substituir pelo aminoácido serina (S).

Na região CDR3, as substituições inicialmente planejadas foram: alanina da posição 100 (A100) por treonina (T) em maior proporção, ácido glutâmico (E) ou manter a alanina (A); alanina da posição 104 (A104) por histidina (H) ou tirosina (Y); histidina da posição 108 (H108) por glicina (G), manter histidina (H) ou substituir por tirosina (Y); ácido aspártico da posição 110 (D110) por triptofano (W), tirosina (Y) ou serina (S). Destaca-se que o planejamento das substituições levou em conta não somente o resíduo correspondente nos VHHs LR1 e LR5, mas também o

aparecimento recorrente de determinado resíduo naquela posição nos demais VHHs analisados (conforme alinhamento múltiplo mostrado na Figura 14).

4.3.1 Desenho dos primers

Para substituição direcionada, são desenhados primers contendo proporção específica de nucleotídeos em cada posição dos códons. Entretanto, o desenho dos primers degenerados exige um compromisso entre as substituições de aminoácidos desejadas e a escolha de uma frequência de nucleotídeos que evite o aparecimento de códons de terminação ou de resíduos indesejados naquela posição.

As sequências degeneradas de nucleotídeos inicialmente planejadas visando as substituições nas posições desejadas nas CDRs 2 e 3 do Sb68 são mostradas na Tabela 5.

TABELA 5 - PLANEJAMENTO DA PROPORÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS PARA SUBSTITUIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

CDR2 54- VNGH -57	CDR3 100- AWGYAWPLHQD -110
Sequência original: GTT AAT GGT CAT	Sequência original: GCC TGG GGC TAT GCC TGG CCT CTG CAT CAG GAT
Sequência modificada: A(00356500)T AAT GGT (15850000)(35006500)(10750015)	Sequência modificada: (35006500)(20800000)(50005000) TGG GGC TAT (00600040)AT TGG CCT CTG (00604000)(55004500)(40000060) CAG TGG

LEGENDA: Os aminoácidos selecionados para substituição estão destacados em negrito e sombreados no alto da tabela. Nas sequências modificadas, os valores mostrados entre parênteses representam a frequência relativa, em porcentagem, dos nucleotídeos A, C, G e T, respectivamente, nas posições modificadas. Por exemplo, os valores “35006500” indicam que nesta posição é desejado que haja uma adenina (A) em 35% dos casos, citosina (C) em 0%, guanina (G) em 65% e timina (T) em 0% dos casos. FONTE: A Autora (2022).

A tabela 6 resume as substituições de aminoácidos desejadas e as possíveis, com base nas proporções de nucleotídeos dos códons modificados.

TABELA 6 - PLANEJAMENTO INICIAL DE SUBSTITUIÇÕES DE RESÍDUOS DAS CDRS 2 E 3 DO VHH Sb68

CDR2 54-VNGH-57			CDR3 100-AWGYAWPLHQD-110		
Aminoácido original	Aminoácidos desejados	Aminoácidos possíveis	Aminoácido original	Aminoácidos desejados	Aminoácidos possíveis
V54	S ou T	S, T	A100	T(+), E, A	A(+) T, E, K
H57	R(+), H, S	R(+), H, S, N, Q, K	A104	H(+), Y	H(+), Y
			H108	G, H, Y	R(+), H, G, Q, D, E
			D110	W, Y, A	W

LEGENDA: Os aminoácidos selecionados para substituição estão destacados em negrito e sombreados no alto da tabela. As colunas indicam os resíduos originais, as substituições inicialmente desejadas e as mutações possíveis com base no plano de modificação dos códons. O símbolo (+) indica o resíduo de maior frequência naquela posição. Em alguns casos além das modificações, também se optou por manter o aminoácido original. FONTE: A Autora (2022).

A partir do planejamento acima, realizou-se o desenho dos *primers* degenerados CDR2-F (*forward*) e CDR3-R (*reverse*), para amplificação do produto de PCR contendo as substituições de nucleotídeos, que é inserido entre os sítios das enzimas *Xma*II e *Kpn*I do vetor pET28a-Sb68-GOF para posterior expressão das variantes de Sb68.

No momento de fazer a sequência reversa complementar para síntese do oligonucleotídeo CDR3-R, foi cometido um erro. Foi feita apenas a sequência reversa complementar dos nucleotídeos fixos, ficando os nucleotídeos com proporções modificadas na orientação senso (Tabela 7).

TABELA 7 - SEQUÊNCIA DO OLIGONUCLEOTÍDEO CDR3-R ADQUIRIDO ERRONEAMENTE E DO OLIGONUCLEOTÍDEO DESEJADO

CDR3-R adquirido	5' CCTGGGTACCCTGGCCCCAATACCAATAATC CCA CTG (4000060)(55004500) (00604000) CAG AGG CCA AT(00600040) ATA GCC CCA (50005000)(20800000) (35006500) TGCTGCGGCACAATAATACAGG 3'
CDR3-R desejado	5' CCTGGGTACCCTGGCCCCAATACCAATAATC CCA CTG (60000040)(00450055)(00406000) CAG AGG CCA AT(40006000) ATA GCC CCA (00500050)(00008020)(00650035) TGCTGCGGCACAATAATACAGG 3'

FONTE: A autora (2022).

Consequentemente, as mutações obtidas (Tabela 8) não corresponderam ao planejamento inicial para a CDR3 (Tabela 6). Tal erro somente foi detectado nas etapas finais do trabalho, após o sequenciamento do DNA das variantes selecionadas.

TABELA 8 - SUBSTITUIÇÕES ESPERADAS DE RESÍDUOS DAS CDRS 2 E 3 DO VHH Sb68

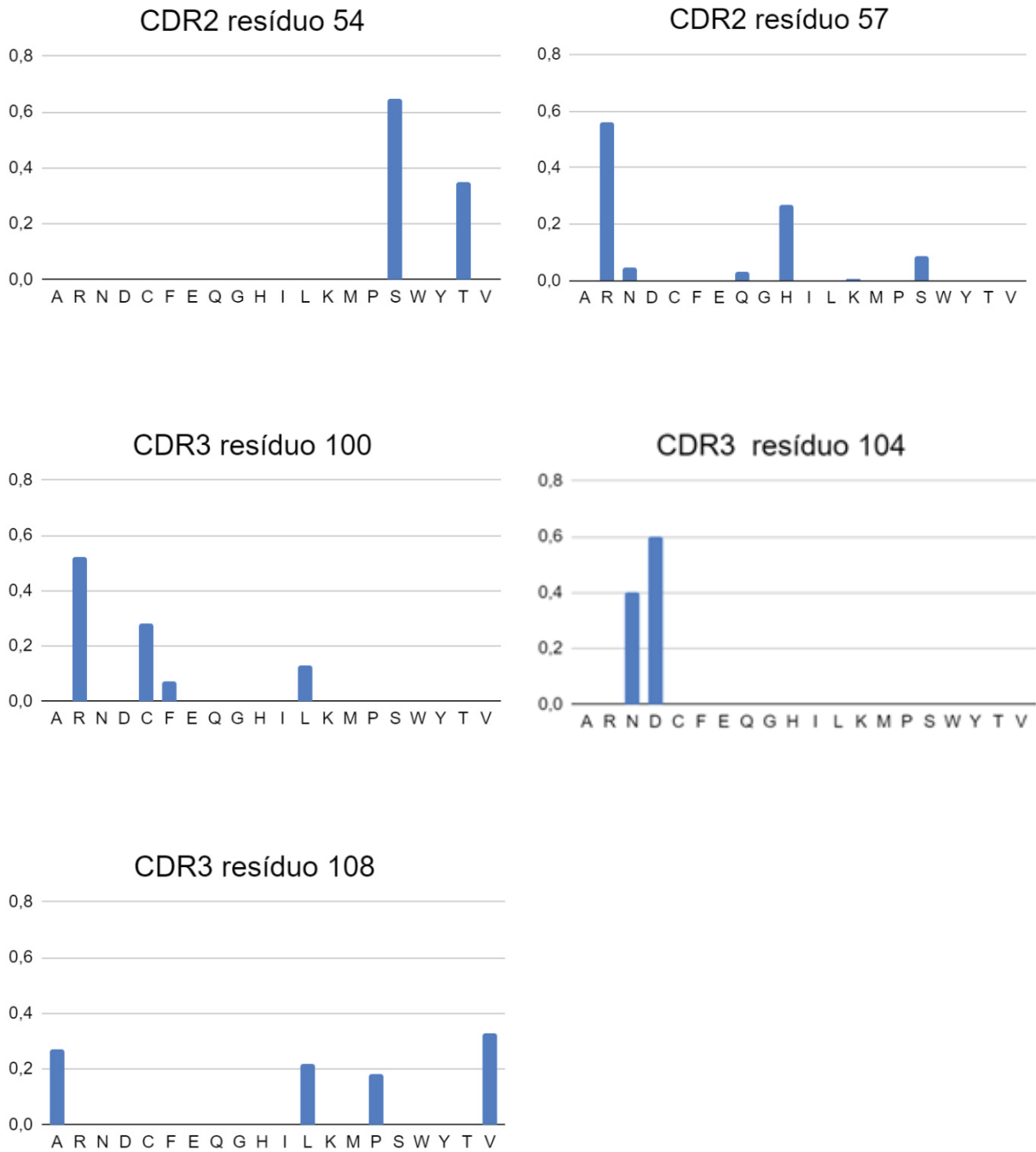
CDR2 54-VNGH-57		CDR3 100-AWGYAWPLHQD-110	
Aminoácido original	Aminoácidos possíveis	Aminoácido original	Aminoácidos possíveis
V54	S(+), T	A100	R(+), C, L, F
N55	N	W101	W
G56	G	G102	G
H57	R(+), H, S, N, Q, K	Y103	Y
		A104	D(+), N
		W105	W
		P106	P
		L107	L
		H108	V(+), A, L, P
		Q109	Q
		D110	W

LEGENDA: As colunas indicam os resíduos originais, e os possíveis com base na modificação dos códons dos *primers* adquiridos. O símbolo (+) indica o resíduo de maior frequência naquela posição. FONTE: A Autora (2022).

A figura 19 mostra as proporções esperadas para os resíduos nas posições das CDRs 2 e 3 sujeitas a mutações. Com base nas modificações inseridas, 385 combinações diferentes de aminoácidos podem ocorrer.

Apesar das variantes do VHH Sb68 geradas apresentarem mutações distintas das inicialmente planejadas devido ao erro no *primer* CDR3-R, os resultados obtidos permitiram a identificação de substituições de aminoácidos com impacto positivo e negativo para a interação com a proteína alvo, como apresentaremos a seguir.

FIGURA 19 - PROPORÇÃO ESPERADA DOS RESÍDUOS NAS POSIÇÕES DAS CDRS 2 E 3 SUJEITAS A MUTAÇÕES



FONTE: A autora (2022).

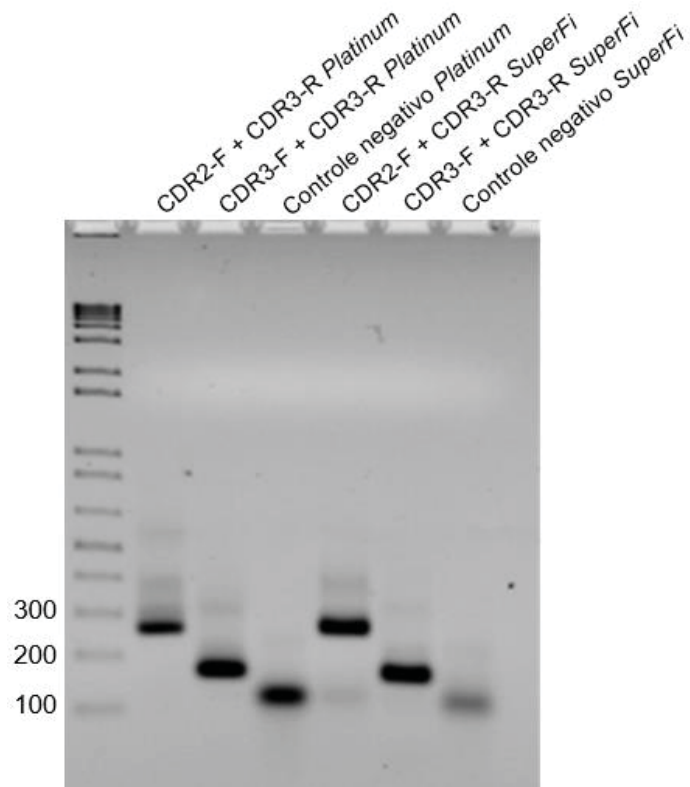
4.4 CONSTRUÇÃO DA MINIBIBLIOTECA DE VARIANTES DO VHH Sb68

4.4.1 Amplificação dos fragmentos de DNA por PCR

Os *primers* definidos acima foram utilizados em reações de PCR com amplificação dos segmentos que abrangem as CDRs 2 e 3 ou somente a CDR-3 do Sb68 usando o fragmento de DNA que codifica Sb68-SGFP2 como *template*. Este fragmento de DNA foi isolado de gel a partir de digestão do DNA do vetor pET28a-Sb68-SGFP2 com *NdeI* e *XhoI*. Os *primers* (0,4 μ M) CDR2-F *forward*, CDR3-F *forward* e CDR3-R *reverse* foram utilizados para reações de PCR com enzimas de alta fidelidade *Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fischer Scientific), e *SuperFi™ II DNA Polymerase* (Thermo Fischer Scientific) respectivamente.

A região amplificada pelos *primers* CDR2-F e CDR3-R deve gerar um fragmento de 266 pares de base e aquela amplificada com CDR3-F e CDR3-R um fragmento com 166 pares de base. Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%. Os padrões no gel coincidem com os tamanhos esperados, mostrando que as reações de PCR foram bem-sucedidas (Figura 20). O controle negativo é proveniente da reação de PCR e *primers* sem a presença do vetor pET28a-Sb68-SGFP2. A presença da banda no controle negativo pode ser explicada por possível contaminação da amostra durante o manuseio.

FIGURA 20 - ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,0% DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR



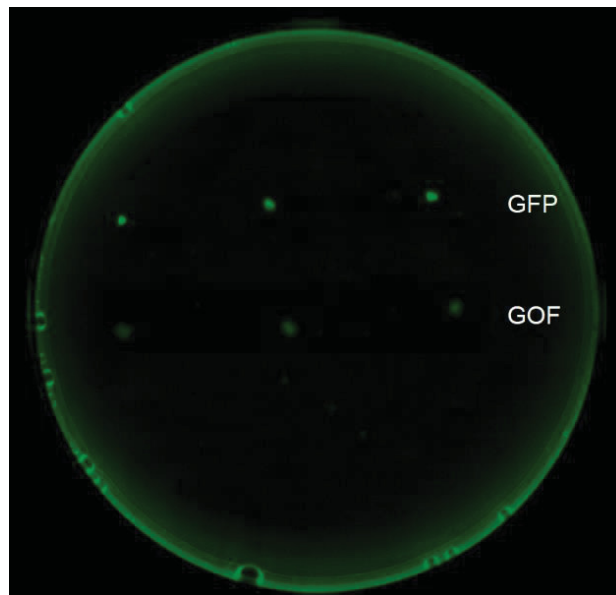
LEGENDA: Os tamanhos, em pares de bases, correspondentes às bandas, na região de interesse, do marcador de massa molecular 1Kb plus DNA *Ladder* (Invitrogen), estão indicados. As amplificações e as respectivas polimerases utilizadas estão identificadas no alto do gel. Os produtos de PCR obtidos com os *primers* CDR2-F e CDR3-R (266 bp) e, CDR3-F e CDR3-R (166 bp) migram com os tamanhos esperados. FONTE: A autora (2022).

4.4.2 Clonagem dos produtos de PCR das variantes em vetor de expressão e seleção direta dos clones recombinantes

Antes de iniciar os experimentos de transformação da biblioteca de variantes, realizou-se teste para comparar a diferença na fluorescência das colônias de *E. coli* BL21 Star-DE3 cálcio competente geradas pela transformação com os vetores de expressão pET28a-Sb68-SGFP2 e pET28-Sb68-GOF. Foram selecionadas 3 colônias isoladas de cada vetor para analisar a fluorescência com auxílio do equipamento iBright™ FL1500 (Invitrogen™) canal Green Fluorescent Protein (GFP) (Figura 21). Como esperado, é possível observar maior intensidade nas colônias que expressam Sb68-SGFP2, embora haja fluorescência basal nas colônias transformadas com o vetor pET28-Sb68-GOF.

A fluorescência basal pode ser explicada pois células contêm moléculas, que se tornam fluorescentes quando excitadas pela radiação UV/Vis. Esta autofluorescência é decorrente de cromóforos endógenos, tais como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) flavina adenina dinucleotídeo (FAD), e aminoácidos com uma fração aromática, como triptofano (MONICI, 2005; ISLAM *et al.*, 2013).

FIGURA 21 - COMPARAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA



LEGENDA: Comparação das células transformadas com o vetor pET28a-Sb68-SGFP2 (colônias superiores) e com o vetor pET28a-Sb68-GOF (colônias inferiores), que não devem expressar a SGFP2. FONTE: A autora (2022).

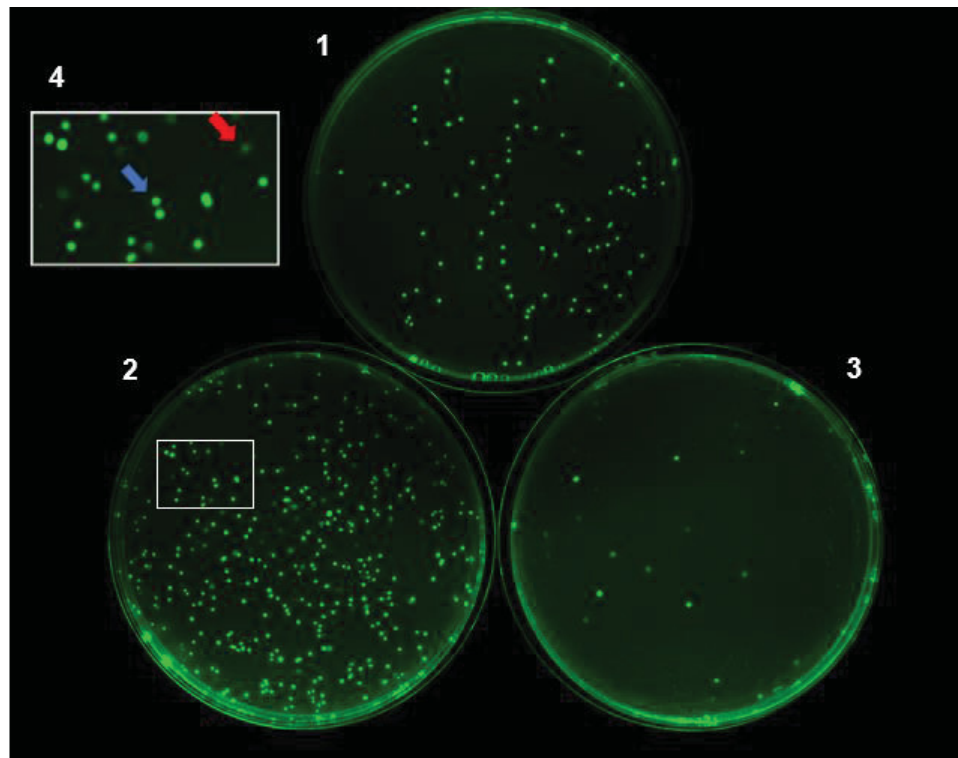
Os kits de extração de produtos de PCR de gel têm apresentado baixo rendimento na recuperação do produto. Para tentar evitar perda do DNA, os produtos de PCR foram apenas submetidos à precipitação com etanol ou isopropanol antes da digestão com as enzimas de restrição. Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas *KpnI* e *XmaI* para CDR-2-3 ou *KpnI* e *XbaI* para CDR3, e ligados com o vetor pET28a-Sb68-GOF, previamente digerido com as mesmas enzimas

A reação de ligação foi transformada em células *E. coli* BL21 Star-DE3 cálcio-competentes e as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina (50 µg/mL) e IPTG (30 µM) e incubadas a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Esta estratégia permitiu identificar os clones recombinantes de forma direta através da

fluorescência da SGFP2. Assim, as colônias expressando a proteína de interesse cuja clonagem reconstituiu a fase de leitura na fusão SGFP2 apresentaram fluorescência. (Figura 22). As análises foram realizadas a partir de imagens adquiridas com o equipamento iBright™ FL1500 (ThermoFisher Scientific).

Foram observadas 79 colônias no controle positivo (transformação com o vetor pET28a-Sb68-GFP), aproximadamente 320 colônias provenientes da ligação do pET28a-Sb68-GOF com o produto de PCR englobando as CDRs 2 e 3 e 27 colônias com o produto de PCR compreendendo apenas a CDR3. Uma vez que a obtenção de clones com modificação simultânea das CDR2 e CDR3 foi bem-sucedida tornou-se desnecessário o trabalho com a CDR3 em separado. Portanto não foram mais realizadas reações com o oligonucleotídeo CDR3-F e CDR3-R para amplificação apenas da CDR3.

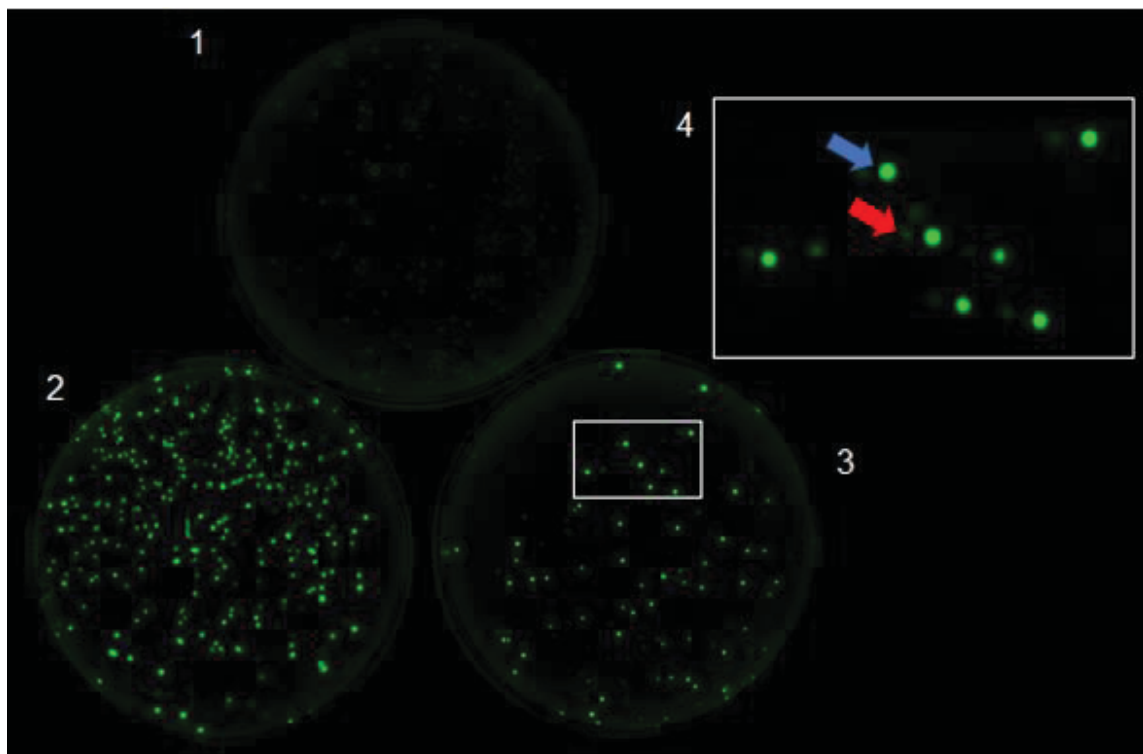
FIGURA 22 - COLÔNIAS DA LINHAGEM BL21 Star-DE3 APÓS TRANSFORMAÇÃO DA LIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR COM O VETOR pET28A-Sb68-GOF



LEGENDA: Os pontos em verde mais intenso correspondem à fluorescência da SGFP2 presente nas colônias transformadas. 1) Placa do controle positivo com células da linhagem BL21 Star-DE3 transformadas com o vetor pET28a-Sb68-GPF; 2) Transformação de pET28a-Sb68-GOF ligado com o produto de PCR CDR2-3; 3) Transformação de pET28a-Sb68-GOF ligado com o produto de PCR CDR-3. 4) Região da placa 2 em destaque mostrando a diferença entre colônia fluorescente indicada pela seta azul e não fluorescente, pela seta vermelha. FONTE: A autora (2022).

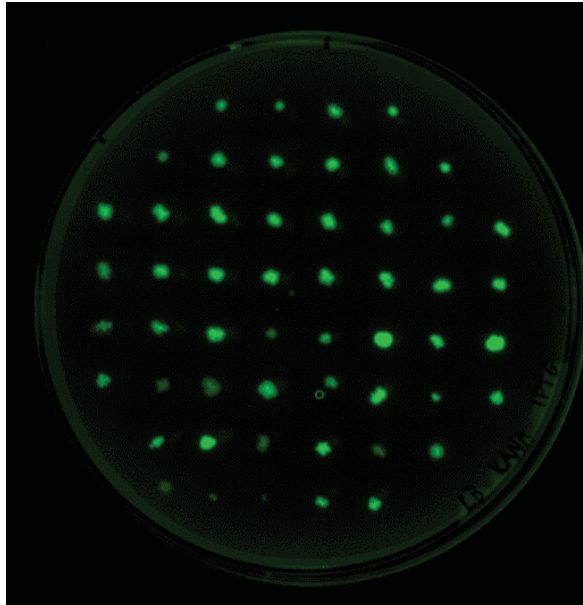
Para obtenção de um maior número de clones de variantes, foram feitas novas reações de PCR utilizando os *primers* CDR2-F e CDR3-R. Os produtos de PCR digeridos com as enzimas *KpnI* e *XmaI* foram ligados ao vetor pET28a-Sb68-GOF também previamente digerido com as mesmas enzimas. As reações de ligação foram transformadas em células *E. coli* BL21 Star-DE3 conforme descrito acima e as imagens das placas foram capturadas com o equipamento iBright™ FL1500 (Figura 23). Aproximadamente 160 colônias foram selecionadas pela intensidade de fluorescência e transferidas, uma por vez, para uma *master plate* e devidamente rotuladas e armazenadas (Figura 24).

FIGURA 23 - COLÔNIAS DA LINHAGEM BL21 Star-DE3 APÓS TRANSFORMAÇÃO COM A LIGAÇÃO DE Sb68-GOF COM O PRODUTO DE PCR CDR2-3



LEGENDA: Os pontos com verde mais intenso indicam maior fluorescência. 1) Placa do controle negativo com células BL21 Star-DE3 transformadas com o vetor pET28a-Sb68-GOF; 2) Transformação de pET28a-Sb68-GOF ligado com o produto de PCR CDR2-3 e amplificado com a Platinum SuperFi II DNA Polymerase; 3) Transformação de pET28a-Sb68-GOF proveniente de uma ligação com o produto de PCR CDR2-3 amplificado com Platinum® *Taq* DNA Polymerase; 4) Região da placa 3 em destaque mostrando a diferença entre colônia fluorescente indicada pela seta azul e não fluorescente, pela seta vermelha. FONTE: A autora (2022).

FIGURA 24 - COLÔNIAS DA LINHAGEM BL21 Star-DE3 APÓS SELEÇÃO POR FLUORESCÊNCIA



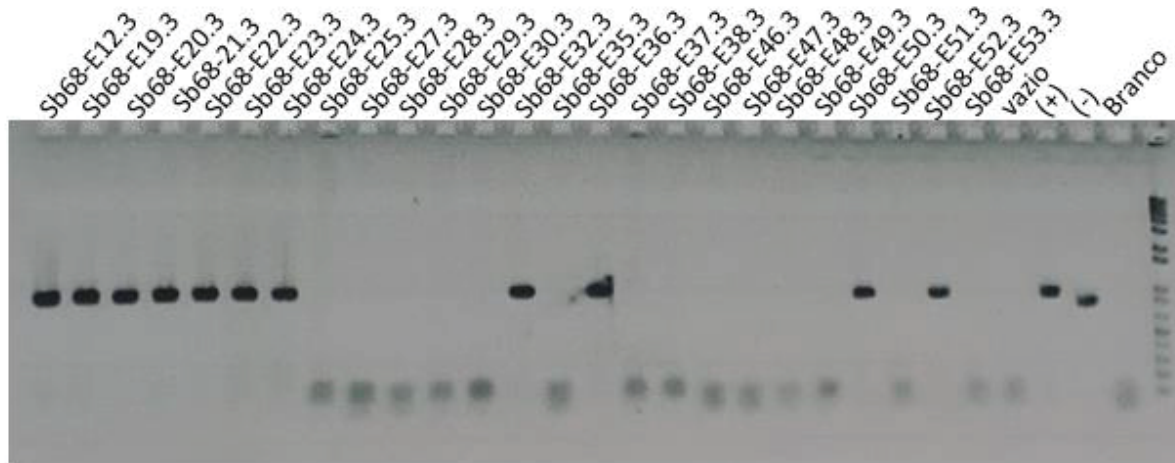
LEGENDA: Exemplo de colônias da linhagem BL21 Star-DE3 transformadas com o vetor pET28a-Sb68-GOF após ligação do produto de PCR, transferidas após seleção por fluorescência. FONTE: A autora (2022).

4.5 SELEÇÃO DOS CLONES DE VARIANTES DE Sb68 POR ENSAIO DE INTERAÇÃO COM O RBD

4.5.1 Pré-triagem dos clones fluorescentes por PCR de colônia

A fim de evitar que clones que apresentaram fluorescência, mas que não possuísem o inserto correto fossem selecionados para os ensaios de ELISA, realizou-se uma etapa de triagem por PCR de colônia dos clones fluorescentes selecionados na etapa anterior, utilizando-se os primers CDR3-F *forward* e GFPseq-R *reverse* (Figura 25). Aqueles clones que não apresentaram banda do tamanho esperado foram descartados.

FIGURA 25 - ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE PCR DE COLÔNIA



LEGENDA: O tamanho da banda dos clones com inserto completo deve ser similar ao da banda do controle positivo (+), de cerca de 1000 pares de bases. Os clones negativos apresentam uma banda na região de migração dos *primers* livres. FONTE: A autora (2022).

Esta triagem foi necessária pois os resultados de alguns sequenciamentos iniciais realizados como teste, feitos a partir da extração do DNA plasmideal de clones fluorescentes, revelaram a ausência do inserto. Tal resultado não era esperado, pois a nossa estratégia buscava garantir que a expressão da SGFP2 só ocorresse com a restauração do quadro de leitura promovida pela ligação correta do inserto.

Entretanto, analisando o resultado destes sequenciamentos iniciais observamos que, em alguns clones sem a incorporação do inserto, houve restauração do quadro de leitura através da ligação de extremidades produzidas após digestão com as enzimas de restrição *Xma*JI e *Kpn*I, apesar de tais sítios não serem complementares (Figura 26 A). Coincidentemente, a religação do plasmídeo desta forma reconstituiu o quadro de leitura do AUG do peptídeo sinal com o quadro de leitura da SGFP2, criando um problema para nossa estratégia de seleção direta dos clones recombinantes. Por outro lado, não se obteve clones fluorescentes na ligação controle, que consiste na ligação de pET-GOF digerido sem adição do inserto. Ou seja, a geração de vetores religados reconstituindo o quadro de leitura, que resultam em colônias fluorescentes, porém sem o inserto, somente ocorreu na presença do produto da reação de PCR na reação de ligação.

A explicação possível para este resultado inesperado envolve a atuação da T4 DNA ligase e da Taq DNA polimerase, esta última carregada para a reação de ligação junto com o produto de PCR (Figura 26 B). Considerando a capacidade da T4 DNA ligase de catalisar a formação de ligação fosfodiéster entre extremidades 5'-fosfato e 3'-hidroxila de DNA de fita dupla com extremidades coesivas ou extremidades “cegas” e, também ligar DNA de fita simples sem “template” ou mesmo RNA fita simples, uma primeira etapa da restauração do vetor envolveria a ligação do tipo fita simples das duas extremidades da fita anti-senso, permanecendo a lacuna na sequência senso para os oito nucleotídeos gerados pela digestão com *Xma*JI e *Kpn*l (Figura 26 B, etapa 1).

Esta lacuna teria sido preenchida pela Taq DNA polimerase, permanecendo ainda as extremidades p5'-OH3' sem ligação (Figura 26 B, etapa 2). A T4 DNA ligase catalisaria então esta última ligação na fita senso (Figura 26 B, etapa 3). Destaca-se que não foi realizado tratamento com fosfatase alcalina após a digestão do vetor, uma vez que as extremidades coesivas geradas pelas enzimas de restrição utilizadas não são complementares e não se esperava, portanto, a religação.

Além disso, o fenômeno observado aponta que a DNA polimerase manteve-se ativa após o processo de precipitação do produto de PCR com 3 volumes de etanol, fato também inesperado. Concluímos que neste caso específico de geração de minibiblioteca, onde se buscava um método direto de triagem dos clones por detecção de fluorescência, o tratamento com fosfatase alcalina é indicado para evitar o fenômeno aqui observado.

FIGURA 26 - ESQUEMA DA RELIGAÇÃO DO VETOR pET28A-Sb68-GOF SEM A INCLUSÃO DO INSERTO CORRETO.

A

Região de interesse:

5' GCAAGCGGTAGCATTAGTAGCATTACCTA**C/CTAGG** NNNNNNNNNNNNNNNN **GGTAC/C**CAGGTTACCGTG
3' CGTTCGCCATCGTAATCATCGTAATGGAT**GGATC/C** NNNNNNNNNNNNNNNN **C/CATGG**GTCCAATGGCAC5'

Sequência dos clones sem inserto:

5' ...GCAAGCGGTAGCATTAGTAGCATTACCTA**CCTAGGTACC**CAGGTTACCGTG3' ...

B

1. Ligação da fita antisense pela T4 DNA ligase:

5' GCAAGCGGTAGCATTAGTAGCATTACCTA**C3'** 5' **CCAGGTTACCGTG3'**
3' CGTTCGCCATCGTAATCATCGTAATGGAT**GGATCCATGG**GTCCAATGGCAC5'

2. Taq DNA polimerase preenche o gap – ficando p5'-OH3' entre **CC** sem ligação

5' GCAAGCGGTAGCATTAGTAGCATTACCTA**Cctaggtacc****CC**CAGGTTACCGTG3'
3' CGTTCGCCATCGTAATCATCGTAATGGAT**GGATCCATGG**GTCCAATGGCAC5'

3. T4 DNA ligase catalisa a ligação entre as extremidades p5'-OH3'

5' GCAAGCGGTAGCATTAGTAGCATTACCTA**CCTAGGTACC**CAGGTTACCGTG3'
3' CGTTCGCCATCGTAATCATCGTAATGGAT**GGATCCATGG**GTCCAATGGCAC5'

LEGENDA: A) Esquema da região de interesse, no alto, e a sequência obtida para os clones fluorescentes que não apresentaram inserto. B) Representação da ligação da fita antisense pela T4 DNA ligase, posterior preenchimento da fita sentido pela Taq DNA polimerase e ligação final pela T4 DNA ligase, reconstituindo o quadro de leitura do AUG do peptídeo sinal com o quadro de leitura da SGFP2, mesmo na ausência do inserto. Os sítios de restrição de *XmaI* e *KpnI* são destacados em vermelho e azul, respectivamente, bem como as extremidades correspondentes. NNNN indica a posição do inserto. FONTE: A autora (2022).

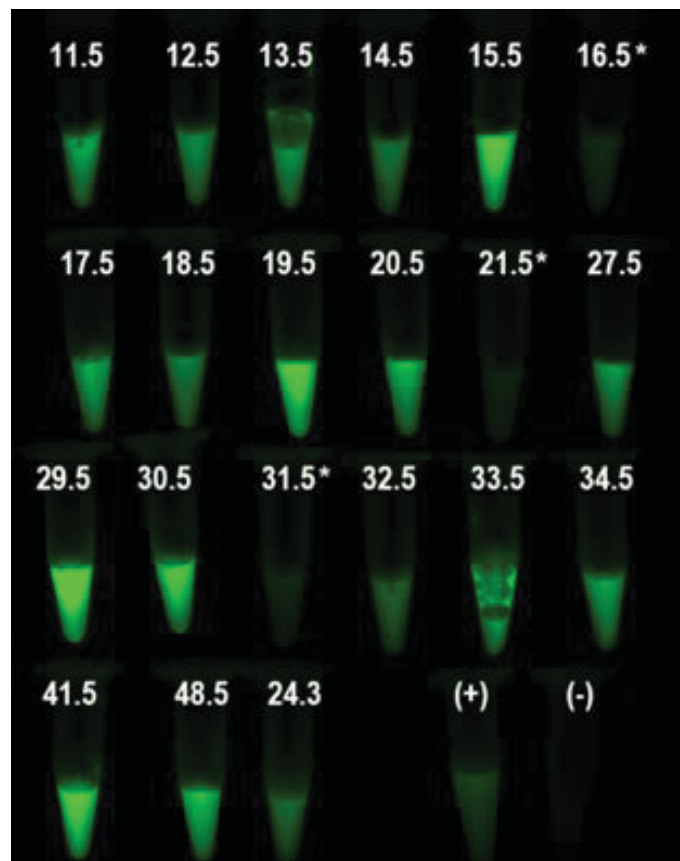
Uma segunda triagem foi necessária, anterior ao preparo das amostras para os ensaios de afinidade ao antígeno. Notou-se que algumas culturas, após a etapa de indução, apresentavam coloração rosada quando sedimentadas por centrifugação. Esses precipitados rosados apresentaram pouca ou nenhuma fluorescência e foram descartados. Essa coloração pode ser devido à contaminação com outro microrganismo.

Portanto, procurou-se estabelecer uma correlação entre o tempo decorrido desde a transferência dos clones para uma nova placa, onde clones tendo três semanas ou mais em placa já passavam a apresentar coloração diferente daquela observada nos clones mais frescos.

4.5.2 Preparação dos extratos por choque osmótico

As colônias selecionadas após as etapas de triagem pela intensidade de fluorescência e PCR de colônia foram cultivadas para obtenção de células para extração de proteínas do periplasma através de choque osmótico. Nesta etapa, já foi possível notar diferença nas intensidades de fluorescência entre os clones (Figura 27), com alguns candidatos apresentando intensidade superior ao controle positivo VHH Sb68. Após o choque osmótico, a fluorescência dos clones foi medida e mesmo após as sucessivas triagens anteriores, clones que apresentaram pouca fluorescência foram descartados (Figura 27).

FIGURA 27- ANÁLISE DOS EXTRATOS PROTEICOS OBTIDOS ATRAVÉS DE CHOQUE OSMÓTICO



LEGENDA: A fluorescência dos extratos foi detectada utilizando-se o equipamento iBright (ThermoFischer Scientific). Os clones identificados com um asterisco foram descartados. FONTE: A autora (2022).

4.5.3 Seleção de variantes de Sb68 pela interação com o domínio RBD

A interação individual das variantes do Sb68 com o domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2 foi determinada pelo método de ELISA. Foram obtidos dados tanto de ELISA indireto, através da incubação com anticorpo primário anti-GFP e secundário acoplado a peroxidase, como de ELISA direto, através de medida de fluorescência da SGFP2 fusionada ao Sb68.

Para realizar a comparação dos dados dos diferentes clones entre diferentes ensaios, os valores de absorvância (ELISA indireto) ou intensidade de fluorescência (ELISA direto) foram normalizados, para cada ensaio individualmente, pelos valores apresentados pelo clone VHH Sb68-SGFP2, que corresponde ao VHH Sb68 original. Os ensaios seguiram um desenho experimental no qual foram adicionados na placa os extratos proteicos de cada clone, bem como o controle positivo VHH Sb68-SGFP2 e dois controles negativos, VHH Sb68-GOF (fora de fase) e poços sem a adição do RBD (Figura 28). Os ensaios foram realizados em triplicata. Na apresentação dos resultados passaremos a identificar as variantes com a identificação dos clones utilizada desde as etapas de geração da minibiblioteca.

FIGURA 28 - EXEMPLO DO DESENHO EXPERIMENTAL E RESULTADO OBTIDO APÓS ENSAIO DE ELISA DIRETO E INDIRETO

ELISA indireto:

	Sb68- F03.5	Sb68- F04.5	Sb68- F05.5	Sb68- F06.5	Sb68- F07.5	Sb68- F08.5	Sb68- F09.5	(+)	(-)	sem RBD
A	1,840	1,479	1,504	1,809	1,786	1,843	1,931	1,852	0,110	0,147
B	1,794	1,335	1,775	1,777	1,762	1,696	1,890	1,880	0,113	0,139
C	1,868	1,439	1,789	1,802	1,788	1,589	1,870	1,722	0,107	0,144

ELISA direto leitura 1- fluorescência inicial:

	Sb68-F03.5	Sb68-F04.5	Sb68-F05.5	Sb68-F06.5	Sb68-F07.5	Sb68-F08.5	Sb68-F09.5	(+)	(-)	sem RBD
A	202029	67863	496708	196579	202206	197504	198238	188066	27736	188200
B	202198	68134	485337	199570	194113	196451	194845	188120	27543	190230
C	215833	68238	506862	192447	195040	197987	194292	188208	26720	190920

ELISA direto leitura 2:

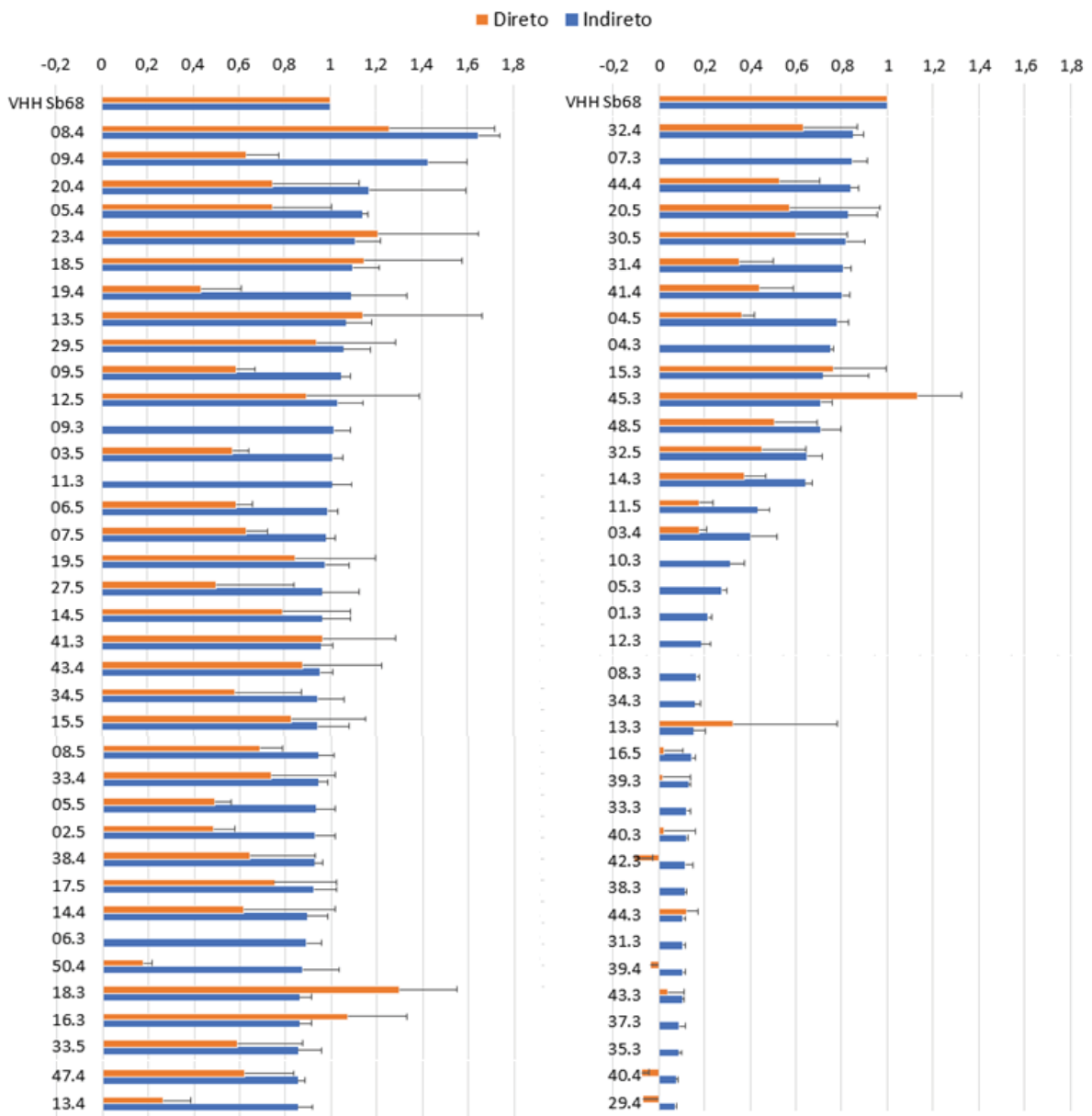
	Sb68-F03.5	Sb68-F04.5	Sb68-F05.5	Sb68-F06.5	Sb68-F07.5	Sb68-F08.5	Sb68-F09.5	(+)	(-)	sem RBD
A	1011	898	952	1034	1025	1041	1034	1163	759	728
B	1018	919	980	1018	1042	1091	997	1292	713	719
C	1029	929	997	1027	1082	1097	1046	1258	726	753

LEGENDA: Os valores de absorvância obtidos a partir do ELISA indireto estão apresentados na primeira tabela com os resultados positivos destacados em verde. Para a análise do ELISA direto realizou-se uma primeira leitura de fluorescência do extrato antes das lavagens, para efeito comparativo. Os resultados do ELISA direto propriamente dito são mostrados na tabela referente à leitura 2, com os resultados positivos destacados em vermelho. Valores mais altos são representados em coloração mais escura. A identificação das variantes bem como dos controles positivo (VHH Sb68-SGFP2) e negativo (VHH Sb68-GOF - fora de fase para expressão da SGFP) é mostrada no alto das tabelas. As colunas A, B e C referem-se a triplicatas do experimento. FONTE: A autora (2022).

Vale lembrar que foram realizadas duas leituras da fluorescência para avaliação dos resultados do ELISA direto. A primeira leitura foi realizada após a aplicação do extrato proteico e antes das lavagens e a segunda após a remoção do excesso de extrato, detectando assim apenas as proteínas que se ligaram ao antígeno RBD. A realização da primeira leitura teve a finalidade de se verificar se haveria relação entre a fluorescência emitida pelo extrato total (leitura 1) e os resultados do ELISA direto obtido com a leitura 2 (amostras com valores maiores e menores coincidindo em ambas as leituras). Caso ocorresse esta relação isso poderia indicar que um maior valor de fluorescência no ELISA direto não estaria necessariamente relacionado a uma maior afinidade relativa. Como esta relação não foi verificada, tem-se maior confiança de que os resultados do ELISA direto (leitura 2) refletem a afinidade relativa das variantes pelo antígeno.

Ao todo, 75 clones de variantes do VHH Sb68 foram testados por ELISA indireto quanto à afinidade relativa ao domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2, dos quais 57 tiveram também os valores analisados por ELISA direto. Destes 75 testados no ELISA indireto, 17 (22,9%) apresentaram valores iguais ou superiores a 0,9 com relação ao valor do VHH Sb68-SGFP2 original (considerado como 1) e 9 (12%) apresentaram valores inferiores a 0,5 em relação ao Sb68 original (Figura 29).

FIGURA 29 - RESULTADO DOS ENSAIOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DO VHH Sb68 E O RBD PELO MÉTODO DE ELISA



LEGENDA: O eixo horizontal mostra os valores de absorbância (ELISA indireto) ou fluorescência (ELISA direto) normalizados em relação ao VHH Sb68 original. No eixo vertical estão as identificações dos clones gerados através da estratégia de evolução molecular. Barras de erros também estão representadas. FONTE: A autora (2022).

O clone correspondente à variante com maior valor de afinidade relativa foi Sb68-E08.4 apresentando um aumento de 64% no valor em relação ao Sb68 original no ensaio de ELISA indireto.

Deve-se considerar que, devido ao erro na aquisição do *primer* CDR3-R, os resíduos inseridos na região CDR3 foram diferentes do originalmente planejado. Apesar disso, algumas variantes apresentaram valores semelhantes ou ganho de afinidade em relação ao Sb68. Desse modo, as modificações introduzidas na sequência do fragmento de anticorpo foram determinantes para o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo.

Os valores obtidos por ELISA direto apresentaram barras de erros superiores aos daqueles obtidos por ELISA indireto, o que pode indicar incerteza com relação aos dados, de modo que os valores obtidos são pouco confiáveis.

4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DAS VARIANTES DO VHH Sb68

A partir dos resultados do ELISA indireto, 68 clones foram selecionados para extração do DNA plasmideal e sequenciamento. Para o sequenciamento foram escolhidos clones que apresentaram bons valores de reprodutibilidade nos ensaios de ELISA indireto. Optou-se por incluir no conjunto alguns clones com valores de afinidade relativa inferiores a 0,5, uma vez que a intenção também era entender quais mutações podem levar a perda da afinidade.

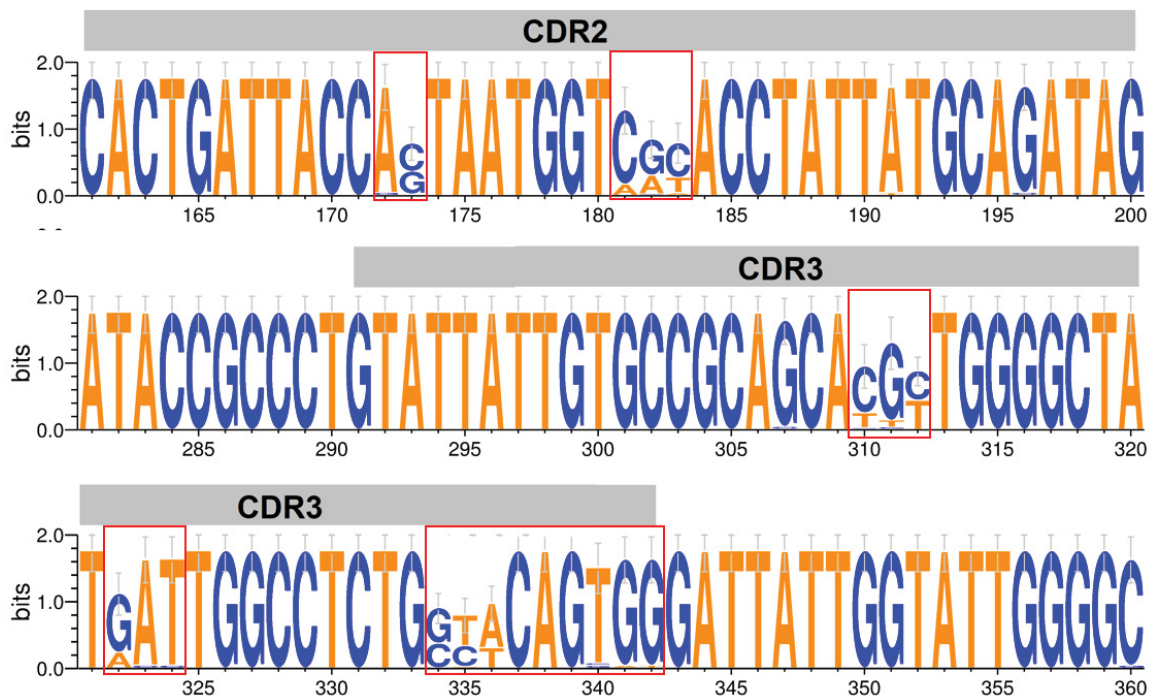
As análises que seguem foram realizadas a partir de 59 resultados de sequenciamento que apresentaram boa qualidade dos picos no cromatograma.

Inicialmente, avaliamos se as mutações introduzidas na sequência do VHH Sb68 pela mutagênese sítio dirigida seguiram as proporções baseadas nas sequências degeneradas dos oligonucleotídeos utilizados (Figura 30). É possível notar que as modificações se restringem majoritariamente as regiões de anelamento dos primers sendo estes os resíduos 173 e 174, 181 a 183, 310 a 312, 322 a 324 e 334 a 342.

As substituições na posição 310 deveriam ser adeninas ou guaninas, porém também foram obtidas guaninas e timinas. Para a posição 335, o planejado era a substituição da adenina por guanina, mas foi observado citosina e timina. O mesmo ocorre na posição 337 onde se planejou a presença de guanina ou tirosina, porém manteve-se a presença da citosina original. Para o resíduo guanina 322 o esperado era a modificação por citosina e timina, porém o observado é a presença da guanina ou adenina.

As demais modificações ocorreram conforme o planejamento. Na posição 173 guanina foi substituída por adenina, na posição 174 timina foi substituída por citosina e guanina. Na posição 181 manteve-se na grande maioria dos clones a cisteína original com a presença em menor proporção da adenina. O resíduo cisteína 323 foi modificado por adenina, citosina 324 foi modificado por timina. O resíduo guanina que originalmente compunha a posição 340 foi majoritariamente substituído pela timina. As posições 341 e 342 eram originalmente preenchidas por adenina e timina e foram substituídas por guanina.

FIGURA 30 - REPRESENTAÇÃO NO FORMATO LOGO DO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DAS VARIANTES DE VHH Sb68 NA REGIÃO DAS CDRs 2 e 3

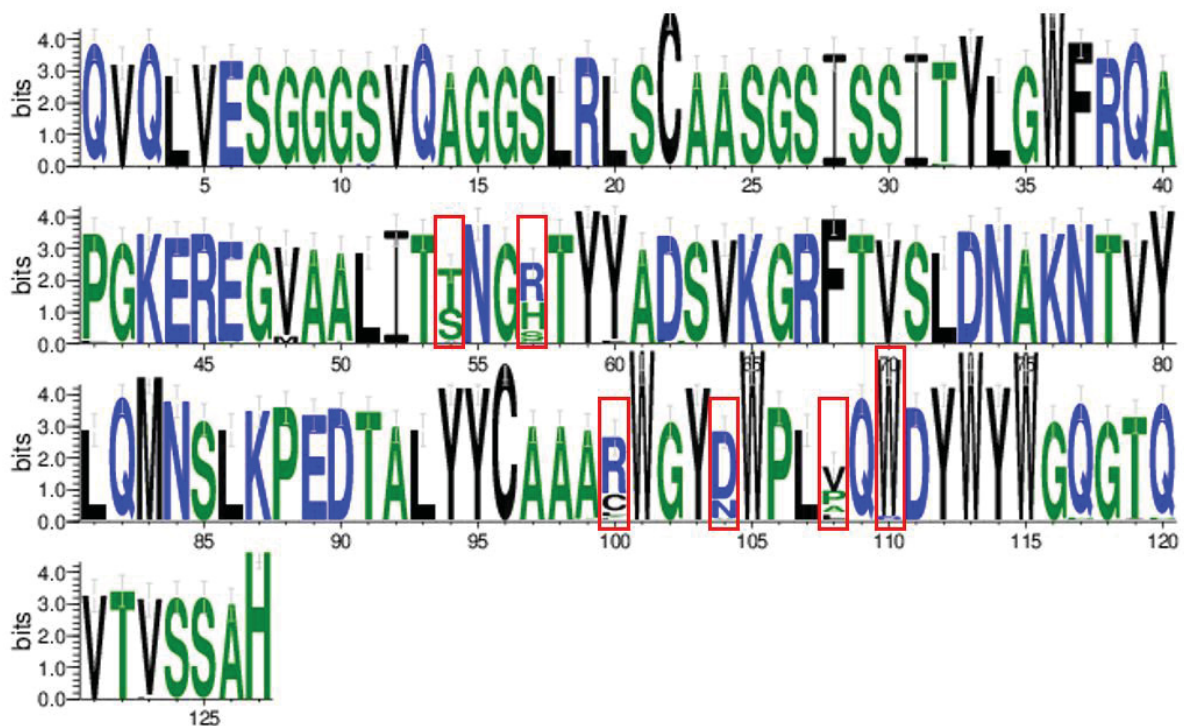


LEGENDA: O tamanho das letras reflete a proporção do nucleotídeo encontrado na posição específica, baseado no alinhamento de 59 sequências. Regiões alvos de substituições estão destacadas pelas caixas vermelhas. FONTE: A autora (2022).

A figura 31 mostra uma representação do alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos das variantes do VHH Sb68 nas regiões das CDRs 2 e 3. Na tabela 9, são mostradas as frequências esperadas dos aminoácidos nas posições sujeitas a substituições, com base no desenho dos *primers*, e as frequências obtidas experimentalmente.

Globalmente, observa-se uma concordância nas proporções, entretanto, deve-se levar em conta que o número de amostras sequenciadas (59) é pequeno do ponto de vista de uma análise estatística. Além disso, a triagem inicial através dos ensaios de ELISA pode incluir uma tendência nos conjuntos de mutações específicas observadas dentro do conjunto de mutações possíveis.

FIGURA 31 - REPRESENTAÇÃO, NO FORMATO LOGO, DO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS VARIANTES DE VHH Sb68



LEGENDA: O tamanho das letras reflete a proporção do aminoácido encontrado na posição específica, baseado no alinhamento de 59 seqüências. Regiões alvos de substituições estão destacadas pelas caixas vermelhas. FONTE: A autora (2022).

TABELA 9 - COMPARAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS PLANEJADA E OBTIDA NAS POSIÇÕES DAS CDRS 2 E 3 SUJEITAS A SUBSTITUIÇÕES

CDR2 54-VNGH-57						CDR3 100- AWGYAWPLHQD -110											
V54			H57			A100			A104			H108			D110		
aa	P	O	Aa	P	O	aa	P	O	aa	P	O	aa	P	O	Aa	P	O
S	65%	50%	R	56%	57%	R	52%	70%	D	60%	81%	V	33%	40%	W	100%	100%
T	35%	50%	H	27%	30%	C	28%	24%	N	40%	19%	A	27%	19%			
			S	9%	11%	L	13%	4%				L	22%	13%			
			N	5%	0%	F	7%	2%				P	18%	29%			
			Q	3%	2%												
			K	0,5%	0%												

LEGENDA: As proporções baseadas no desenho dos oligonucleotídeos (P - planejada) utilizados para a introdução das mutações estão destacadas em azul. As frequências obtidas são mostradas na coluna O e em alaranjado estão destacadas as frequências foram muito menores do que a ordem esperada das probabilidades. FONTE: A autora (2022).

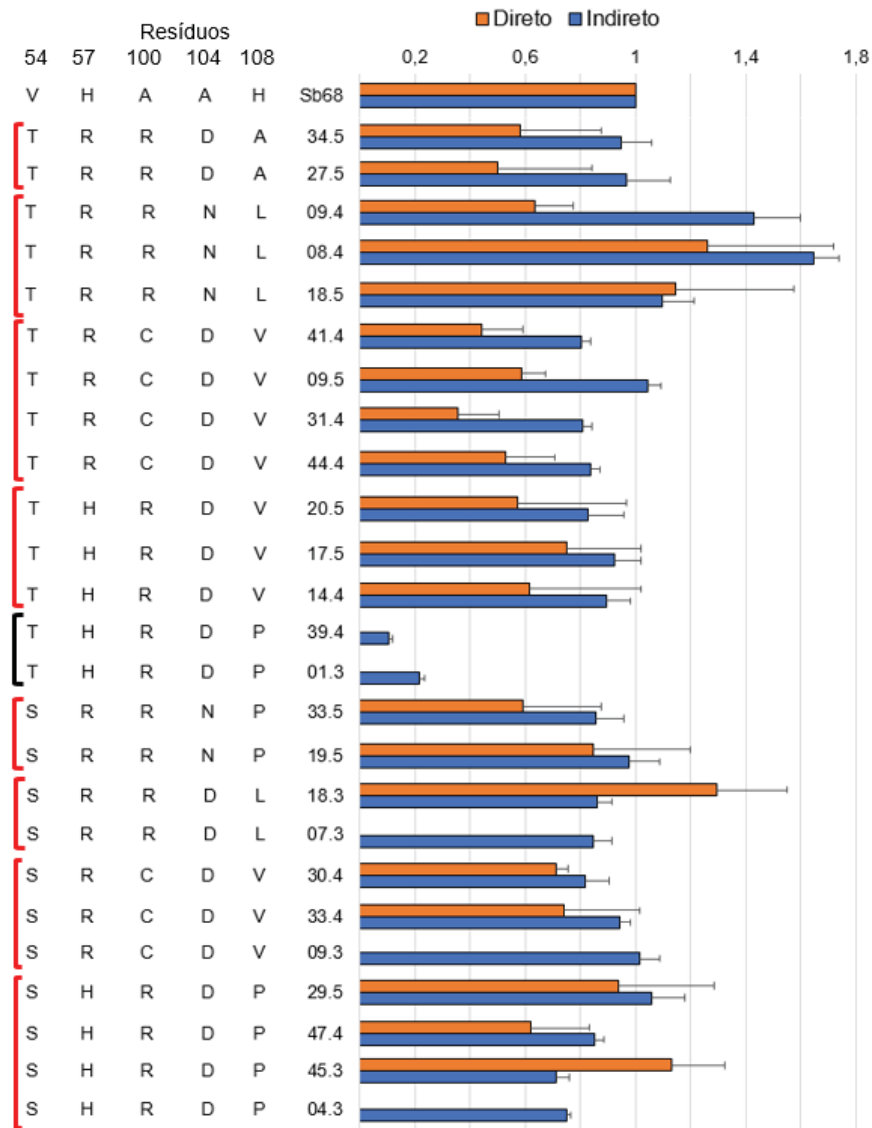
4.6.1 Correlação das mutações com os resultados dos ensaios de ELISA

Inicialmente, foi feita uma análise dos resultados de interação obtidos através dos ensaios de ELISA para os clones cujos resultados de sequenciamento mostraram a mesma combinação de mutações (Figura 32). Os valores de afinidade relativa em comparação com o VHH Sb68 original para os clones que apresentam a mesma sequência de aminoácidos são concordantes, o que reforça a confiabilidade dos resultados.

A seguir buscou-se analisar as substituições de aminoácidos que produziram ganho ou perda da afinidade da variante ao domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2. A Figura 33 mostra as variantes apresentando valores de afinidade relativa maiores de 90% ou menores de 50% em comparação com o VHH Sb68 original.

As variantes Sb68-E08.4 e E09.4 apresentaram o maior valor de afinidade relativa ao RBD da proteína S de SARS-CoV-2, com um ganho de 64% em relação ao Sb68 original. Ambas as variantes apresentam a mesma combinação de aminoácidos nas posições sujeitas a substituições.

FIGURA 32 - CORRELAÇÃO ENTRE A COMBINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E OS RESULTADOS DE INTERAÇÃO POR ENSAIOS DE ELISA

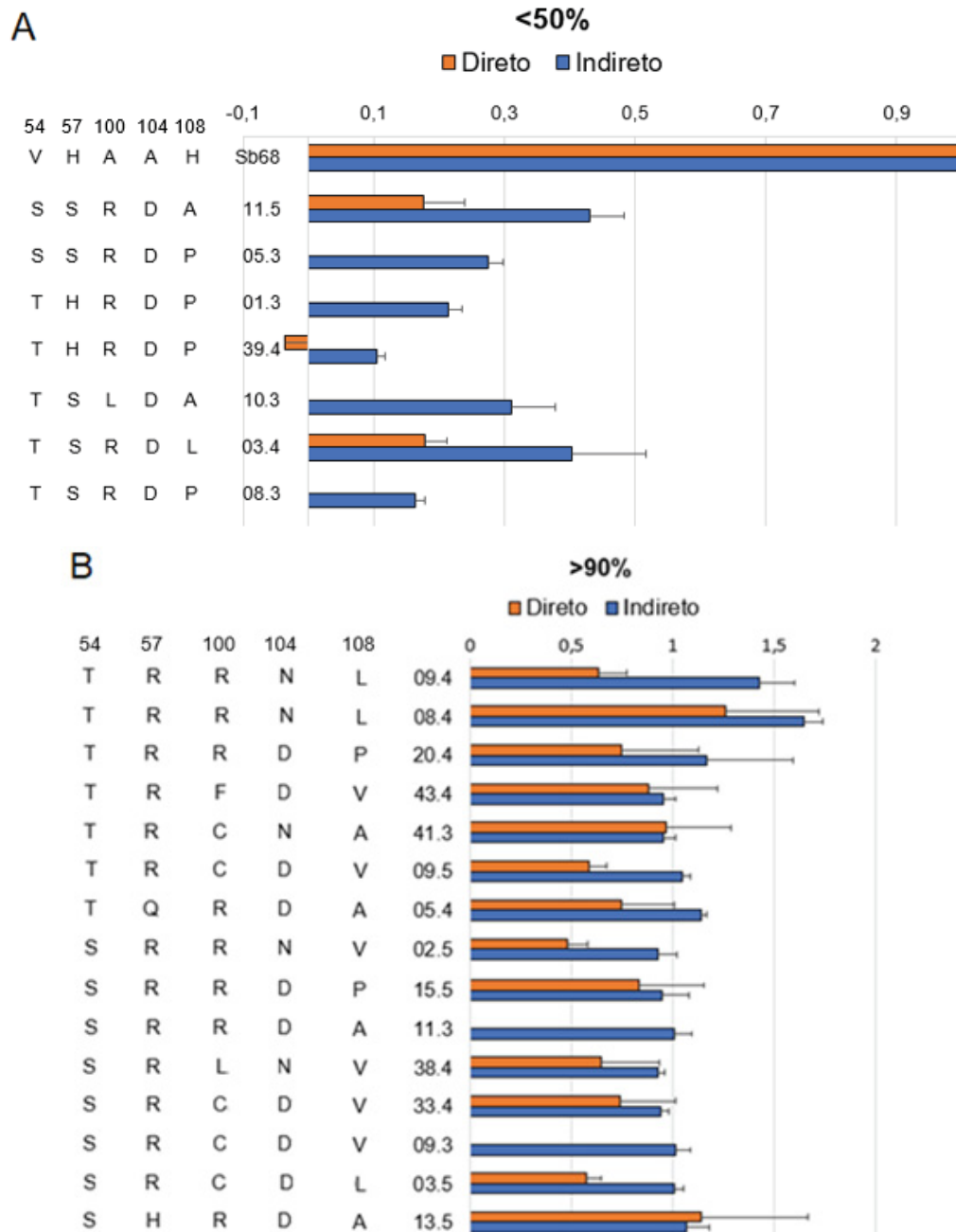


LEGENDA: Resultados dos ensaios de ELISA indireto (azul) e direto (laranja) de variantes cujo sequenciamento mostraram repetição da combinação de aminoácidos (agrupados com colchetes). O VHH Sb68 original e seus respectivos resíduos está mostrado no topo. As demais variantes estão identificadas com seus respectivos resíduos. O colchete em preto destaca o grupo em que os resultados de ELISA apresentaram discordância entre variantes com mesma sequência. FONTE: A autora (2022).

Em uma análise global é possível observar uma maior proporção de serina na posição 57 entre as variantes que apresentaram afinidade relativa inferior a 50% e que este resíduo não aparece nesta posição nenhuma vez nas variantes com afinidade relativa >90%. Ainda em relação à posição 57, o resíduo de arginina aparece com alta frequência no grupo de variantes com afinidade relativa superior a 90%. O

ácido aspártico aparece na posição 104 de todas as variantes com afinidade relativa inferior a 50%, porém não é exclusivo desse grupo pois também se mostra em grande proporção entre as variantes com afinidade relativa superior a 90%.

FIGURA 33 - CORRELAÇÃO ENTRE A COMBINAÇÃO DE SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS NAS CDRs 2 E 3 E OS RESULTADOS DE INTERAÇÃO POR ENSAIOS DE ELISA



LEGENDA: A) Variantes apresentando valores de afinidade relativa menores que 50% em comparação com o VHH Sb68 original. B) Resultados obtidos para as variantes apresentando valores superiores a 90% em relação ao Sb68 original. Os aminoácidos originais e suas posições assim como o resultado do ELISA obtido para o VHH Sb68 usado como referência são mostrados na primeira linha. FONTE: A autora (2022).

4.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DA INTERFACE DO COMPLEXO ENTRE VHH Sb68 E O DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2

4.7.1 Potencial impacto das substituições de resíduos na interface de interação

A interação entre o VHH Sb68 e RBD-SARS-CoV-2 é mediada pelos resíduos que compõem as regiões determinantes de complementariedade CDRs do anticorpo. A modificação de alguns destes resíduos conferiram diferentes afinidades ao alvo conforme visto nos ensaios de ELISA. Logo, nessa etapa foi verificada como a substituição de alguns resíduos poderiam modificar a afinidade do anticorpo ao antígeno. As informações detalhadas a respeito da interface de interação entre o VHH Sb68 e o RBD da proteína S foram obtidas a partir da estrutura cristalográfica do complexo (AHMAD *et al.*, 2021). Os resíduos envolvidos na interação são relacionados na Tabela 10.

TABELA 10 - RESÍDUOS ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO DO VHH Sb68 COM O DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2.

VHH Sb68	RBD	VHH Sb68	RBD
V54	N370	Y103	T376
N55	Y369	Y103	Y369
N55	N370	Y103	F377
H57	S371	Y103	F374
Y59	F374	A104	S375
A100	P384	A104	T376
W101	K378	W105	S 375
W101	C379	H108	R408
G102	F377	D110	R408
G102	P384	D111	R408
		D111	K378
		D111	R408

LEGENDA: Os resíduos que participam de ligações de hidrogênio estão destacados em azul, as interações por ponte salina estão identificadas em amarelo e os demais resíduos de interface estão em branco. Os resíduos relacionados mais de uma vez estão participando de múltiplas interações através de suas cadeias laterais e/ou principal. FONTE: A autora (2022).

É importante destacar que na época em que as substituições no VHH Sb68 foram planejadas para a aplicação da estratégia de evolução dirigida e subsequentemente os oligonucleotídeos desenhados, a estrutura tridimensional do complexo entre VHH Sb68 e o domínio RBD não estava disponível. Desse modo, o planejamento das substituições baseou-se no alinhamento de estrutura primária e dados de interação disponíveis na literatura.

Tendo em vista os resultados obtidos nos ensaios de ELISA, buscamos avaliar o possível efeito das substituições de aminoácidos encontradas na variante Sb68-E08.4, que apresentou um ganho de afinidade ao RBD de cerca de 60% em relação ao VHH Sb68 original. Na tabela 11, comparamos a sequência de aminoácidos nas regiões sujeitas às mutações. Em ambas as CDRs, as substituições resultam em significativa alteração das características físico-químicas dos aminoácidos na variante Sb68-E08.4.

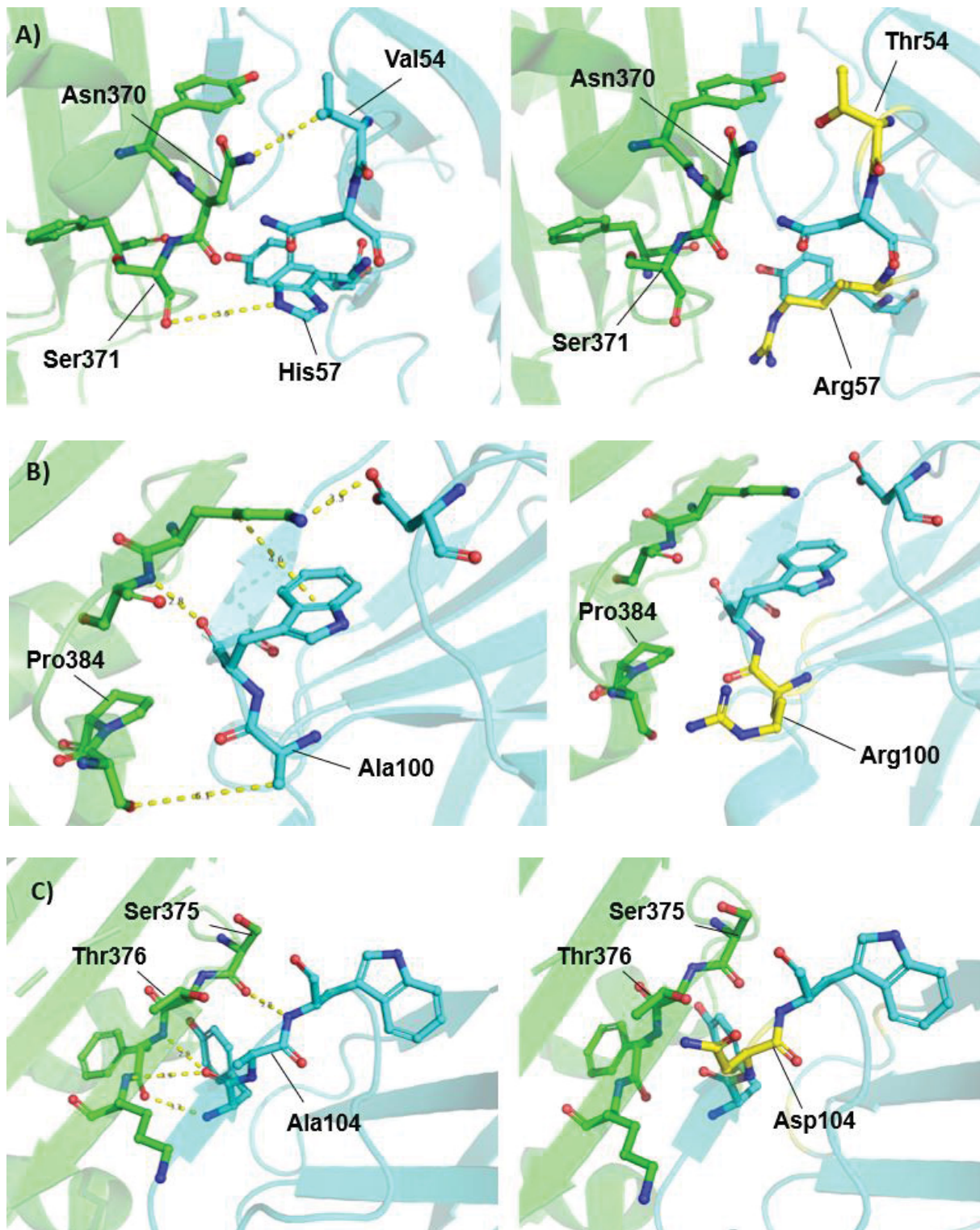
TABELA 11 - COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DAS CDRS 2 E 3 DO VHH Sb68 ORIGINAL E VARIANTE Sb68-E08.4

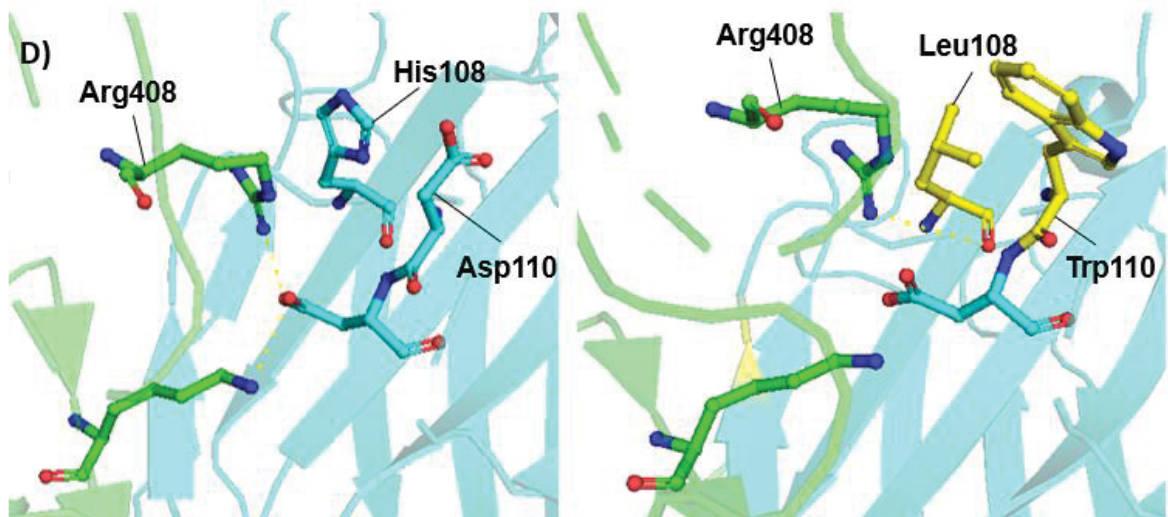
Identificação	CDR2	CDR3
VHH Sb68 original	54-VNGH-57	100-AWGYAWPLHQD-110
Variante Sb68-E08.4	54-TNGR-57	100-RWGYNWPLLQW-110

LEGENDA: Em negrito e sombreado estão destacadas as substituições de aminoácidos. FONTE: A autora (2022).

A figura 34 ilustra a região da interface entre o VHH Sb68 e o domínio RBD da proteína S (painéis da esquerda) e mostra uma análise das substituições encontradas na variante Sb68-E08.4 (painéis da direita). A substituição dos resíduos foi realizada utilizando-se o programa *Pymol 2.4.0*, tendo sido selecionados os rotâmeros mais favoráveis para as cadeias laterais correspondentes às mutações. Mesmo as substituições envolvendo significativa alteração no volume da cadeia lateral não provocaram impedimentos estéricos, indicando que a interface de interação pode ser mantida.

FIGURA 34 - COMPARAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE A INTERFACE DO DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-COV-2 COM O VHH Sb68 ORIGINAL E VARIANTE Sb68-E08.4





LEGENDA: Detalhes da interface entre o RBD (verde) e o VHH Sb68 original (painéis da esquerda) e variante Sb68-E08.4 (painéis da direita). Os resíduos de aminoácidos da sequência original do Sb68 estão destacados em ciano e as substituições observadas na variante Sb68-E08.4 estão em amarelo. Em (A) são destacadas as substituições V54T e H57R. Em (B) é mostrada a substituição A100R e em (C) a substituição A104D. Em (D) são destacadas as substituições H108L e D110W. FONTE: A autora (2022).

A valina 54, com cadeia lateral apolar é substituída por uma treonina, de volume similar, porém com um grupo hidroxila que lhe confere característica polar (Figura 34 A). Esta característica poderia promover ganho de afinidade tendo em vista a possível participação em ligações de hidrogênio, por exemplo envolvendo o resíduo asparagina 370 do RBD.

A substituição H57 por uma arginina modifica a característica da estrutura da cadeia lateral passando de um grupo aromático para uma longa cadeia alifática. Além disso, o resíduo de arginina, positivamente carregado, pode participar de interações do tipo ponte salina.

De maneira semelhante, a substituição dos resíduos de alanina A100 e A104 por arginina e asparagina (Figura 34 B e C), respectivamente, alteram cadeias laterais pequenas e apolares, para cadeias polares e carregadas, conferindo características para participação em interação do tipo ligação de hidrogênio ou eletrostática.

Finalmente, a substituição da histidina 108 por uma leucina, modifica uma cadeia lateral aromática e polar/carregada por uma cadeia lateral alifática e apolar (Figura 34 D). A cadeia lateral da leucina conferiria um caráter mais hidrofóbico à interface, podendo contribuir positivamente ou negativamente para a interação.

A substituição do resíduo D110 por triptofano havia sido planejada para todas as variantes e não é, portanto, característica específica da variante Sb68-E08.4. Tal substituição de um resíduo alifático ácido pelo resíduo aromático apolar de maior cadeia lateral poderia aumentar a superfície de interação entre as moléculas.

Deve-se considerar, entretanto, que o aumento da afinidade relativa da variante Sb68-E08.4 pelo RBD da proteína S é resultado de um efeito global das mutações, não sendo possível atribuir este aumento a uma ou outra substituição individual de aminoácido. Além disso, deve-se ressaltar que a análise das substituições apresentada na figura 34 é uma análise bastante preliminar onde buscou-se apenas avaliar as possibilidades e natureza de interações com resíduos da interface, assim como eventuais impedimentos estéricos. Não foram aplicadas metodologias de dinâmica molecular e minimização de energia previamente a estas análises.

4.7.2 Análise da região de interação entre VHH Sb68 e o domínio RBD da proteína S de variantes de SARS-CoV-2

Tendo em vista o contínuo aparecimento de variantes do vírus SARS-CoV-2, realizou-se uma análise das mutações encontradas nas chamadas variantes de preocupação e seu possível impacto na interação entre o VHH Sb68 e o domínio RBD da proteína S. As variantes de preocupação (*variants of concern* – VOC) previamente e atualmente circulantes, conforme classificação da Organização Mundial da Saúde são: Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) e Ômicron (B.1.1.529).

As mutações de aminoácidos identificadas no domínio RBD nestas variantes (HODCROFT, 2022) estão relacionadas na tabela 12, destacando-se aquelas localizadas na interface de interação com o receptor ACE2 (LAN *et al.*, 2020) e as mutações na região de ligação do VHH Sb68 (AHMAD *et al.*, 2021). Todas as variantes possuem mutação em ao menos um dos dezesseis resíduos do RBD que participam da interação com o receptor ACE2.

A variante Alpha apresenta uma substituição do resíduo de asparagina N501 por uma tirosina, na região de interação com o receptor ACE2. As variantes Beta, Gamma e Delta possuem substituições adicionais na região de reconhecimento da ACE2, mas nenhuma destas apresenta mutações de aminoácidos na região de interação com o VHH Sb68. Por outro lado, a variante Ômicron, além de substituições de aminoácidos na região de ligação à ACE2 também apresenta duas mutações, S371L e S375F, na região de interação com o VHH Sb68 (Tabela 12).

TABELA 12 - MUTAÇÕES DE AMINOÁCIDOS NO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO RECEPTOR (RBD) DA PROTEÍNA S DE SARS-COV-2 OBSERVADAS NAS CHAMADAS VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO, EM RELAÇÃO À CEPA PARENTAL (WUHAN)

Variantes	Mutação na região RBD
Alpha	Q498Y, N501Y
Beta	K417N, E484K, N501Y
Gamma	K417T, E484K, N501Y
Delta	L452R, T478K, E484Q, N501R
Ômicron	G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H

LEGENDA: Em vermelho estão destacadas as mutações de resíduos presentes na interface de interação com o receptor ACE2 e em azul as mutações de resíduos presentes na interface de interação com o VHH Sb68. FONTE: A autora (2022).

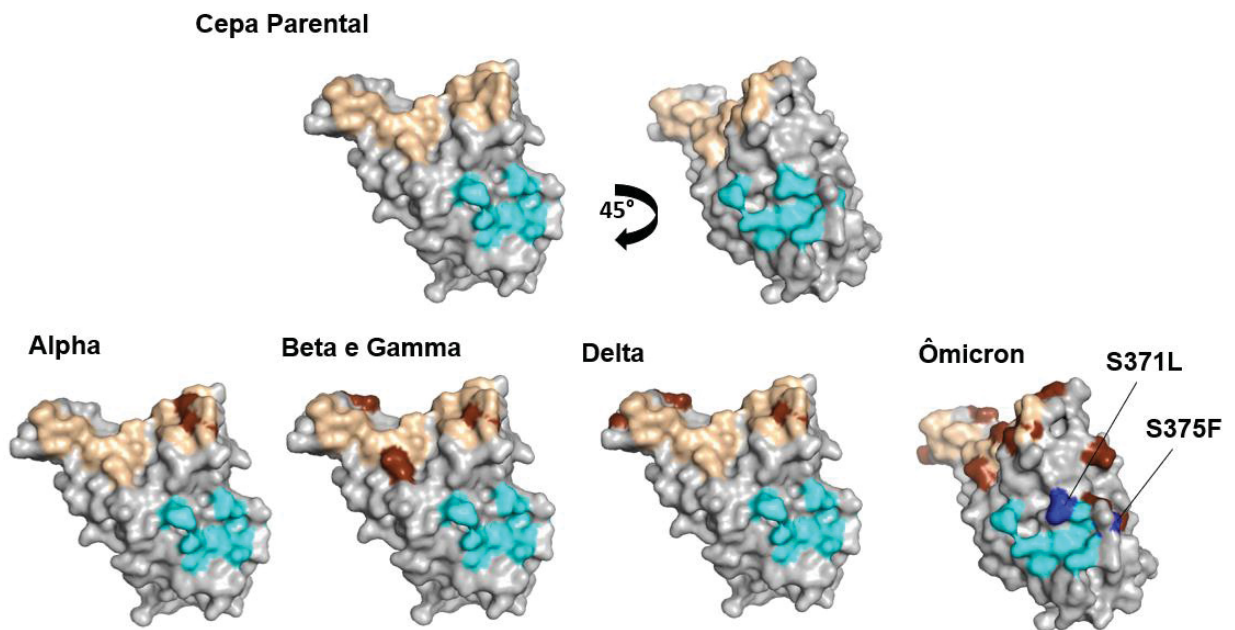
A figura 35 mostra a localização das mutações no domínio RBD da proteína S de SARS-CoV-2 encontradas nas chamadas variantes de preocupação.

As substituições no RBD da variante Ômicron, dos resíduos S371 e S375, polares e de cadeia lateral curta, por leucina e fenilalanina, hidrofóbicos e de cadeia lateral mais volumosa, poderia afetar a interface de interação com o VHH Sb68. Uma análise mais detalhada da participação destes resíduos na ligação do RBD com o VHH Sb68 é mostrada na figura 36.

Os resíduos S371 e S375 participam de ligações de hidrogênio, respectivamente, com os resíduos H57 e W105 do Sb68. As mutações S371L e S375F poderiam alterar a natureza destas interações, propiciando interações hidrofóbicas entre os novos pares presentes na interface. É interessante notar a introdução de uma cadeia lateral aromática na posição S375, que poderia favorecer uma interação do

tipo *stacking* com o W105 e/ou H57 do Sb68. Este tipo de interação é comum em interfaces de complexos e pode favorecer a estabilidade.

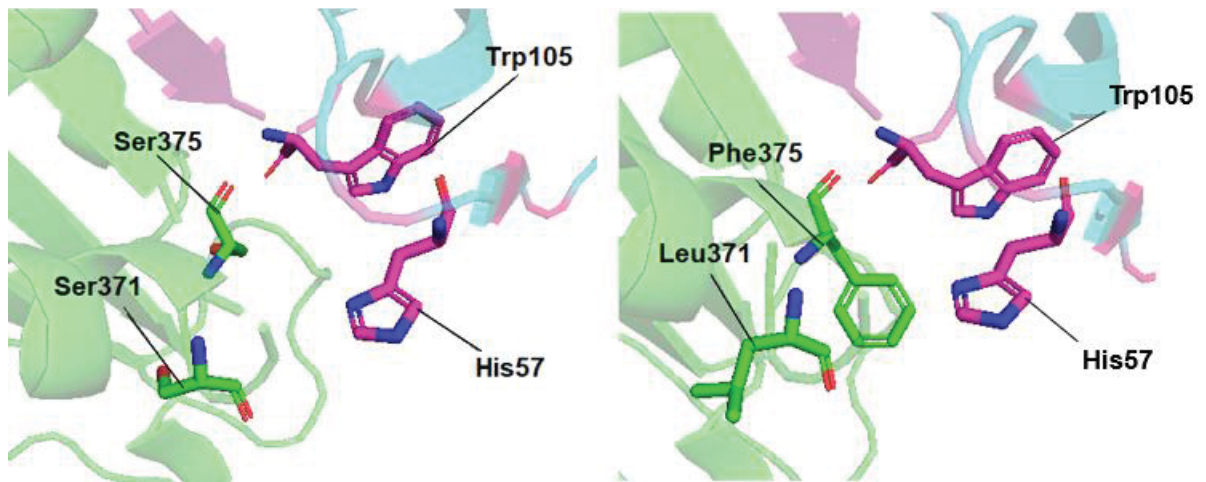
FIGURA 35 - MAPEAMENTO DAS MUTAÇÕES OBSERVADAS NO DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2 NAS CHAMADAS VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO.



LEGENDA: O domínio RBD é representado em cinza através de sua superfície molecular. Os resíduos que participam da interação com ACE2 estão destacados em bege claro, enquanto aqueles que participam da interação com o VHH Sb68 são mostrados em ciano. Os locais de mutação aparecem em marrom, exceto aqueles na região de ligação do Sb68 que estão destacados em azul escuro com as mutações identificadas. FONTE: A autora (2022).

Dados experimentais obtidos no nosso grupo em colaboração com o Laboratório de Macromoléculas e Interfaces do Departamento de Química e o Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas do Departamento de Biologia Celular da UFPR mostraram que o VHH Sb68 é capaz de reconhecer a variante Ômicron de SARS-CoV-2 em ensaio de detecção eletroquímico a partir de saliva de indivíduos infectados (dados não publicados). Desta forma conclui-se que as mutações S371L e S375F presentes no RBD da variante Ômicron não aboliram seu reconhecimento pelo Sb68. Tais resultados não fornecem, entretanto, dados quantitativos sobre a interação, ou seja, se estas mutações aumentam ou diminuem a afinidade do VHH Sb68 em relação à cepa parental de SARS-CoV-2.

FIGURA 36 - ANÁLISE ESTRUTURAL DO EFEITO DAS MUTAÇÕES PRESENTES NO DOMÍNIO RBD DA PROTEÍNA S DA VARIANTE ÔMICRON DE SARS-CoV-2 NA SUA INTERAÇÃO COM O VHH Sb68.



LEGENDA: O RBD é representado em verde e o Sb68 em ciano com os resíduos envolvidos na interação com as serinas 371 e 375 do RBD representados em magenta. À esquerda estão representados os resíduos da cepa parental e à direita as substituições identificadas na variante Ômicron. FONTE: A autora (2022).

5 DISCUSSÃO

5.1 TESTES DE CAPTURA DE ANTÍGENOS COMO FERRAMENTAS NO COMBATE DA COVID-19

Como parte dos esforços para o combate da pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, em setembro de 2021 o Ministério da Saúde lançou o PLANO NACIONAL DE EXPANSÃO DA TESTAGEM PARA COVID-19 (PNE-Teste) (BRASIL, 2021), uma estratégia nacional de vigilância epidemiológica e laboratorial para a COVID-19. O objetivo geral era a expansão do diagnóstico incluindo o uso do teste rápido de detecção de antígeno (TR-AG). Esse plano prevê o uso de testes em larga escala em três tipos de estratégias de assistência e vigilância: diagnóstico assistencial, busca ativa e triagem populacional (BRASIL, 2021). A medida de expansão do programa de testagem surgiu como resposta à circulação da Variante de Preocupação (VOC) Delta no país.

Os kits são fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), conforme detalhamento: Kit Teste rápido COVID Ag fabricado pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), e Kit TR DPP® COVID-19 AG fabricado pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e apresentam sensibilidade de 91,3% e especificidade de 98% e apesar de ser apresentado como de fabricação nacional todos os componentes são importados de países como Estados Unidos da América e China (ANVISA, 2022). A fim de atender a alta demanda por testagem, outra medida foi implementada em fevereiro de 2022, com a aprovação pela ANVISA do registro do primeiro autoteste para COVID-19 no Brasil, sendo este também um teste rápido de captura de antígeno (BRASIL, 2022). Os kits são fabricados na China, possuem sensibilidade de 89% e especificidade de 97% podendo ser adquiridos em farmácias pelo Brasil com o custo a partir de R\$ 49,00 por teste. Um trabalho publicado em 2022 analisou 94 estudos a respeito da performance de detecção de testes rápidos de antígenos (RATS). A sensibilidade e especificidade geral dos testes foram de 70% e 98%, respectivamente (KHALID *et al.*, 2022).

Ao contrário dos métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), os testes de detecção de antígenos através de anticorpos específicos detectam componentes que se localizam na superfície viral (ou seja, glicoproteína S, proteína M ou proteína N liberada) ou o vírus diretamente sem etapas de amplificação (YÜCE *et al.*, 2021). As amostras são obtidas das vias aéreas superiores e o método é designado como “imunocromatográfico” pelo fato de a interação antígeno-anticorpo ser revelada por nanopartículas que conferem uma cor para as interações positivas (WEISSLEDER *et al.*, 2020). Mesmo com a efetivação dessas ações para o monitoramento epidemiológico, o sistema público de saúde não tem capacidade para fornecimento de testes em quantidade adequada para toda a população especialmente quando há aumento de casos pelos surtos causados por novas variantes do vírus SARS-CoV-2. Um dos gargalos pode ser apontado na dependência externa de insumos e demais produtos de saúde, podendo representar até 80% do valor total do produto (FERNANDES *et al.*, 2021). No Brasil, a indústria farmacêutica é predominantemente formada por empresas multinacionais, focadas na comercialização de medicamentos produzidos em outros países (FERNANDES *et al.*, 2021).

Considerando que o vírus SARS-CoV-2 continuará em circulação por tempo indeterminado, é esperado que novas variantes do SARS-CoV-2 continuem a surgir e se espalhar substituindo cepas anteriores (CDC, 2022). Desse modo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) mantém a recomendação de contínua testagem como uma ferramenta essencial para a prevenção e controle da disseminação do vírus (OMS, 2021). Portanto, a utilização de testes para a detecção de antígenos continua sendo um pilar importante no combate ao COVID-19 e a disponibilização de produtos nacionais acessíveis é parte necessária para que isso ocorra. Pesquisas que buscam alternativas a este problema são fundamentais.

5.2 METODOLOGIA PARA A GERAÇÃO DE VARIANTES

Esse projeto buscou fornecer uma ferramenta que pode ser utilizada em eventuais testes de captura de antígeno, com produção nacional. Graças à quantidade de informações disponíveis a respeito da sequência de aminoácidos, afinidade,

estrutura, resíduos de interação foi possível selecionar um candidato que reconhece a região RBD da proteína *spike* de SARS-CoV-2 e desenhar oligonucleotídeos específicos para a modificação da sequência original. A partir disso, variantes de um anticorpo tipo VHH isolado contra o domínio RBD da proteína *spike* de SARS-CoV-2 foram geradas e otimizadas por evolução molecular, uma delas apresentando aumento de afinidade relativa em relação ao VHH original.

A produção da minibiblioteca em *E. coli* BL21-star (DE3), seguida pela seleção com base no fenótipo fluorescente, demonstram que a construção utilizando o vetor pET28a-GOF com a proteína indicadora fora de quadro é uma ferramenta útil na seleção de clones positivos em fusão com a proteína verde fluorescente SGFP2. Essa metodologia tornou a escolha de clones de interesse menos trabalhosa e mais prática. Entretanto, a quantificação da fluorescência direta das variantes do VHH em fusão com a SGFP2 não foi suficientemente reprodutível para ser utilizada em ensaios quantitativos para determinar a afinidade das variantes do VHH pelo antígeno alvo. Também deve-se levar em conta que situações inesperadas na etapa de clonagem podem ocorrer e eventualmente causar a reconstituição da fase de leitura do vetor.

O baixo número de colônias obtido pode ser atribuído à utilização direta da cepa *E. coli* BL21 (DE3) para transformação da ligação da mini-biblioteca de variantes no vetor de expressão, pois esta cepa foi otimizada para a expressão de proteína recombinantes possui eficiência de transformação menor quando comparada às cepas desenvolvidas para clonagem de DNA. Apesar disso, considerando que o trabalho foi feito todo de forma manual, a quantidade de variantes geradas foi suficiente para análise de um conjunto representativo de clones.

O método de ELISA indireto foi eficiente para avaliar a eficiência de interação, sendo que o nível de interação do VHH original ao domínio RBD da proteína *spike* de SARS-CoV-2 foi utilizado como referência em comparação com o nível de interação das demais variantes do VHH Sb68 para identificar os que eventualmente apresentavam maior afinidade. Foi possível selecionar dentre as variantes aquelas que apresentaram reconhecimento ao RBD superior ao VHH Sb68 original. Dentre elas, vale destacar o clone Sb68-E08.4, o qual apresentou maior afinidade relativa. Essa técnica tem também a vantagem de utilizar diretamente o extrato celular para realizar os testes iniciais de interação sem a necessidade de purificar o VHH.

Entretanto, as etapas de inoculação das culturas e subsequente indução por IPTG para eventual obtenção do material periplasmático por choque osmótico, demandam alguns dias de cultivo. Logo, este é um ensaio laborioso, com muitas etapas e que não permite a triagem de grande quantidade de clones ao mesmo tempo quando realizado de forma manual.

Quanto aos valores de ELISA direto, determinado a partir da fluorescência da SGFP2 fusionada ao VHH, apresentaram alta variação entre as triplicatas de modo que os valores obtidos apresentaram desvio padrão muito alto. Embora a expressão da proteína fluorescente possa ser facilmente detectada sob um detector de fluorescência, a intensidade de fluorescência pode variar de célula para célula devido à heterogeneidade da expressão da proteína fluorescente (REMUS-EMSERMANN e LEVEAU, 2010), sendo que sua normalização em extrato total não é possível. Apesar disso, essa técnica se mostrou muito mais rápida e prática do que o ELISA indireto e pode ter o potencial explorado em futuros projetos.

Através dos dados de sequenciamento verificamos que a metodologia empregada para a obtenção da minibiblioteca racional funcionou. Permitiu a geração de uma minibiblioteca com sequências racionalmente direcionadas para a presença de resíduos com características físico-químicas e estruturais que culminaram na melhora da afinidade de interação das variantes do VHH Sb68 ao RBD da proteína *spike* de SARS-CoV-2. A proporção e natureza das modificações obtidas seguiram o planejamento inicial. Além disso, pela modificação das CDRs por PCR obtivemos clones modificados diretamente no vetor de expressão, em curto tempo.

Uma etapa fundamental para a maturação e seleção de anticorpos com maior afinidade pelo antígeno, ocorre após a produção da biblioteca de sequências variadas. A maturação de anticorpos por esse método é dispendiosa pois envolve a testagem de milhares de variantes (ALMAGRO *et al.*, 2019) para que ao final, poucos candidatos com real aumento de afinidade sejam selecionados. Essa etapa consiste na seleção em grande escala das variantes que apresentam afinidade, para serem enriquecidas e isoladas. Para isso a utilização de métodos mais práticos que permitam a seleção de muitas variantes simultaneamente seria vantajosa quando comparado aos ensaios de ELISA indireto.

5.3 AFINIDADE AO ANTÍGENO

Para muitas terapias anticorpos de maior afinidade são desejáveis e/ou necessários. Anticorpos de maior afinidade também podem reduzir significativamente o custo do tratamento (ALMAGRO *et al.* 2019). É esperado que anticorpos utilizados em terapias tenham valores da constante de dissociação (K_D) na faixa de 1 nanomolar (nM) (equivalente a 10^{-7} a 10^{-9}) ou menos (TABASINEZHAD *et al.*, 2019). Anticorpos de alta afinidade estão geralmente na faixa de nanomolar (10^{-9}) e aqueles de afinidade muito alta estando na faixa picomolar (pM) (10^{-12}) (KASTRITIS *et al.*, 2011; ABCAM, 2022).

Em abril de 2021 a ANVISA liberou o uso do coquetel Regen-Cov2 para tratamento de pacientes internados pertencentes ao grupo de risco. Esse medicamento é composto pelos anticorpos monoclonais casirivimab ($K_D = 0,045$ nM) e imdevimab ($K_D = 0,046$ nM) que se ligam a distintos epítomos da proteína spike de SARS-CoV-2 (DEEKS, 2021). O anticorpo humano monoclonal recombinante sotrovimab se liga com alta afinidade a um epítomo altamente conservado da região RBD da proteína spike SARS-CoV-2 com uma constante de dissociação de $K_D = 0,21$ nM (HEO, 2022).

Devido ao tempo reduzido para a execução da parte experimental não foi possível determinar os valores da constante de dissociação (K_D), porém, deve-se levar em consideração que o anticorpo original Sb#68 possui uma $K_D = 118,12$ nM (WALTER *et al.*, 2020). Portanto, mesmo com o aumento da afinidade obtida pelo clone Sb68-E08.4 verificado pelo ensaio de ELISA, não é possível afirmar que este VHH possui afinidade a proteína *spike* superior aos demais candidatos como o VHHs Ty1 ($K_D = 9$ nM) ou H11-D4 ($K_D = 10$ nM).

5.4 PERSPECTIVAS

Uma opção para a triagem em larga escala de clones seria a utilização do *bacterial surface display*, um sistema que permite que peptídeos e proteínas sejam expressos na superfície de células microbianas, ao fusioná-los com proteínas de

ancoragem que geralmente são proteínas de superfície celular ou seus fragmentos (LEE *et al.*, 2003). A geração de variantes seria semelhante àquela através da expressão no periplasma, utilizada neste trabalho, a diferença é que no método de expressão periplasmática é necessário selecionar os clones de maior afinidade ao alvo através de técnicas convencionais do tipo ELISA, enquanto a técnica de *bacterial surface display* permitiria a seleção inicial de um maior número de clones através de citometria de fluxo, utilizando o antígeno marcado com uma sonda adequada.

A citometria de fluxo tem sido usada com sucesso para a triagem de bibliotecas de proteínas expressas na superfície de bactérias ou leveduras (GEORGIU, 2000). A triagem de bibliotecas de proteínas por citometria de fluxo oferece as seguintes vantagens: 1. É uma técnica de triagem de alto rendimento, onde até 1×10^9 células/hora podem ser processadas em equipamentos de última geração. 2. Ensaio quantitativo podem ser realizados em grandes populações, com resolução celular única. 3. O equilíbrio de ligação e a cinética de dissociação (K_D) podem ser facilmente determinados pela citometria de fluxo de células inteiras. 4. Diferentemente de outras técnicas de screening, a citometria de fluxo pode ser usada para a seleção de clones seja com base na atividade de ligação ou catalítica (GEORGIU, 2000).

Nosso grupo de pesquisa iniciou as etapas para a utilização da técnica *bacterial display*. Para isolar clones que expressam o VHH na superfície celular de *E. coli* por citometria de fluxo, necessitaremos do RBD, alvo do VHH Sb68, marcado com um cromóforo que possa ser quantificado. Isto pode ser feito através de acoplamento de um cromóforo através de ligação covalente utilizando reagentes comerciais.

Através de projetos anteriores fizemos a expressão do domínio RBD de SARS-CoV-2 em células HEK293 utilizando o plasmídeo pIRES2-EGFP, então aproveitamos este vetor para construir uma versão do RBD de SARS-CoV-2 em fusão com a proteína fluorescente vermelha monomérica (mRFP). Neste vetor, o RBD de SARS-CoV-2 contém um peptídeo sinal para expressão secretada e, no seu C-terminal, além de MRFP contém também cauda de dez histidinas para purificação. As próximas etapas incluem a expressão em *E. coli* para a geração de biblioteca.

6 REFERÊNCIAS

- ABCAM. KD value: a quantitative measurement of antibody affinity. Disponível em: <https://www.abcam.com/primary-antibodies/kd-value-a-quantitative-measurement-of-antibody-affinity>. Acesso em junho de 2022.
- AHMAD, J.; JIANG, J.; BOYD, L. F.; ZEHER, A.; HUANG, R.; XIA, D.; NATARAJAN, K.; MARGULIES, D. H. Structures of synthetic nanobody-SARS-CoV-2 receptor-binding domain complexes reveal distinct sites of interaction. **Journal of Biological Chemistry**. v. 297, n. 4. 2021.
- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR A.; DEUBEL V.; FLAMAND M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 2. 2002.
- ALMAGRO, J. C.; PEDRAZA-ESCALONA, M.; ARRIETA, H. I.; PÉREZ-TAPIA, S. M. Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development. **Antibodies**. v. 8, n. 3, p. 44. 2019.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção Pelo HIV em Adultos e Crianças**. (2018) Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/node/57787>. Acesso em 15 de novembro de 2021. 2018.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/q/?nomeTecnico=coronav%C3%ADru> . Acesso em julho de 2022. 2022.
- ARAF, Y.; AKTER, F.; TANG, Y-D.; FATEMI, R.; PARVEZ, S. A.; ZHENG, C.; HOSSAIN, G. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. **Journal of Medical Virology**. v. 94, n. 5, p. 1825-1832. 2022.
- BENIAC, D.; ANDONOV, A.; GRUDESKI, E.; BOOTH, T. F. Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. **Nature Structural and Molecular Biology**. v. 13, p.751–752. 2006.
- BORGES, H. C. B. G.; ADATI, M. C.; VIGO, D. C.; MENDONÇA, V. F.; ISSOBE, M. A.; SANTOS, F. B.; ZAMITH, H. P. S. Avaliação dos testes rápidos para diagnóstico da dengue no Brasil. **Vigilância Sanitária em Debate**. v. 9, n. 1, p. 82-90. 2021.
- BRADEN, B. C.; GOLDMAN, E. R.; MARIUZZA, R. A.; POLJAK, R. J. Anatomy of an antibody molecule: structure, kinetics, thermodynamics and mutational studies of the antilysozyme antibody D1.3. **Immunological Reviews**. v 163, n. 1, p. 45–57. 1998.
- BRANT, A.C., TIAN, W., MAJERCIK, V.; YANG, W.; ZHENG, Z-M. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. **Cell and Bioscience**. v. 11, n. 136. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Plano Nacional de Operacionalização da Vacinação contra a COVID-19**. 1ª ed. Brasília. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância da Saúde. **Nota Técnica Nº 1217/2021-CGPNI/DEIDT/SVS/MS**. Apresentação do PLANO NACIONAL DE EXPANSÃO DA TESTAGEM PARA COVID-19 e orientações acerca dos dois tipos de teste rápido de antígeno para detecção do SARS-CoV-2 distribuídos pelo Ministério da Saúde. 2021.

BRASIL. Painel Coronavírus. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em 18 maio de 2022.

BRASIL. Resolução-RE Nº 533, de 17 de fevereiro de 2022. Diário Oficial da União. Ministério da Saúde. Edição 34-A. Seção 1. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico Nº 93 - Boletim COE Coronavírus**. Brasília. 2021.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). COVID Data Tracker. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services. Disponível em: <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker>. Acesso em abril de 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-covid-spreads.html>. Acesso em 15 de agosto de 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>. Acesso em 12 de abril de 2022.

CHE, X-Y.; QIU, L-W.; PAN, Y-X.; WEN, K., HAO, W.; ZHANG, L-Y.; WANG, Y-D; LIAO, Z-Y; HUA, X.; CHENG, V. C. C.; YUEN, K-Y. Sensitive and Specific Monoclonal Antibody-Based Capture Enzyme Immunoassay for Detection of Nucleocapsid Antigen in Sera from Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 6, p. 2629–2635. 2004.

CHIU, M. L.; GOULET, D. R.; TEPLYAKOV, A.; GILLILAND, G. L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. **Antibodies (Basel)**. v. 8, p. 55. 2019.

CHOTHIA, C.; NOVOTNÝ, J.; BRUCCOLERI, R.; KARPLUS, M. Domain association in immunoglobulin molecules: the packing of variable domains. **Journal of Molecular Biology**. v. 186, p. 651–63. 1985.

CLAMP, M.; CUFF, J.; SEARLE, S. M.; BARTON, G. J. The Jalview Java alignment editor. **Bioinformatics**. v. 20, n. 3. p. 426–427. 2004.

COLLINS, A. R.; KNOBLER, R. L.; POWELL, H.; BUCHMEIER, M. J. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell–cell fusion. **Virology**. 1982.

CROOKS, G. E. WebLogo: A Sequence Logo Generator. **Genome Research**. v. 14, n. 6, p. 1188–1190. 2004.

CROWTHER, J. R. **Methods in Molecular Biology. The ELISA guidebook**. 2 ed. v. 516. Hertfordshire, UK. Humana Press. 2009.

CUSTÓDIO, T. F.; DAS, H.; SHEWARD, D. J.; HANKE, L.; PAZICKY, S.; PIEPRZYCK, J.; SORGENFREI, M.; SCHROER, M.; GRUZINOV, A.; JEFFRIES, C.; GRAEWERT, M.; SVERGUN, D.; DOBREV, N.; REMANS, K.; SEEGER, M. A.; MCINERNEY, G. M.; MURREL, B.; HÄLLBERG, B. M.; LÖW, C. Selection, biophysical and structural analysis of synthetic nanobodies that effectively neutralize SARS-CoV-2. **Nature Communications**. v. 11. n. 5588. 2020.

DEEKS, E. D. Casirivimab/Imdevimab: First Approval. *Drugs*. v. 81, p. 2047–2055. 2021.

DE GENST, E.; SILENCE, K.; DECANNIERE, K.; CONRATH, K.; LORIS, R.; KINNE, J.; WYNS, L. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 103, n. 12, p. 4586–4591. 2006.

DING, X-X.; LI, X-F.; DENG, Y-Q.; GUO, Y-H.; HAO, W.; CHE, X-Y.; QIN, C-F.; FU, N. Development of a Double Antibody Sandwich ELISA for West Nile Virus Detection Using Monoclonal Antibodies against Non-Structural Protein 1. **PLoS ONE**. v. 9, n. 10. 2014.

DURLAND, J.; AHMADIAN-MOGHADAM, H. Genetics, Mutagenesis. *StatPearls*. Treasure Island (FL). **StatPearls Publishing**. 2021.

EYER, L.; HRUSKA, K. Single-domain antibody fragments derived from heavy-chain antibodies: a review. **Veterinární Medicína**. V. 57, n. 9, p. 439–513. 2012.

EMSLEY P, COWTAN K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**. v. 60 (Pt 12 Pt 1), p. 2126-2132. 2004.

ESPARZA, T. J.; MARTIN, N. P.; ANDERSON, G. P.; GOLDMAN, ELLEN, R.; BRODY, D. L. High affinity nanobodies block SARS-CoV-2 spike receptor binding domain interaction with human angiotensin converting enzyme. **Scientific Reports**. v. 10, n. 22370. 2020.

FALAVIGNA, M.; STEIN C.; AMARAL, J. L G.; AZEVEDO, L. C. P.; BELLI, K. C.; COLPANI, V.; CUNHA, C. A.; DAL-PIZZOL, F.; DIAS, M. B. S.; FERREIRA, J. C.; FREITAS, A. P. R.; GRÄF, D. D.; GUIMARÃES, H. P.; LOBO, S. M. A.; MONTEIRO, J. T.; NUNES, M. S.; OLIVEIRA, M. S.; PRADO, C. C. L.; SANTOS, V. C. C.; SILVA, R. M.; SOBREIRA, M. L.; VEIGA, V. C.; VIDAL, A. T.; XAVIER, R. M.; ZAVASCK, A. P.; MACHADO F. R.; CARVALHO, C. R. R. Diretrizes Brasileiras para o tratamento farmacológico de pacientes hospitalizados com COVID-19. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v 34, n. 1, p.1-12. 2021

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. **PubMed® Methods in Molecular Biology**. v. 1282, p. 1–23. 2015.

FERNANDES, D. R. A.; GADELHA, C. A. G.; MALDONADO, J. M. S. V. Vulnerabilidades das indústrias nacionais de medicamentos e produtos biotecnológicos no contexto da pandemia de COVID-19. **Cadernos de Saúde Pública [online]**. v. 37, n. 4. 2021.

GAN, H. H.; ZINNO, J.; PIANO, F.; GUNSALUS, K. C. Omicron Spike Protein Has a Positive Electrostatic Surface That Promotes ACE2 Recognition and Antibody Escape. **Frontiers in Virology**. v. 2, n. 894531. 2022.

GEORGIU, G. Analysis of large libraries of protein mutants using flow cytometry. **Adv Protein Chem**. v. 55, p. 293-315. 2001.

GIOVANETTI, M.; BENEDETTI, F.; CAMPISI, G.; CICOZZI, A.; FABRIS, S.; CECCARELLI, G.; TAMBONE, V.; CARUSO, A.; ANGELETTI, S.; ZELLA, D.; CICOZZI, M. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 538, p. 88-91. 2021.

GORKHALI, R.; KOIRALA, P.; RIJAL, S.; MAINALI, A; BARAL A; BHATTARAI H. K. Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. **Bioinformatics and Biology Insights**. v. 15. 2021.

GUI, M.; SONG, W.; ZHOU, H.; XU, J.; CHEN, S.; XIANG, Y.; WANG, X. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. **Cell Research**. v. 27, n. 1, p. 119-129. 2017.

HANKE, L., VIDA KOVICS PEREZ, L., SHEWARD, D.J.; DAS, H.; SCHULTE, T.; MOLINER-MORRO, A.; CORCORAN, M.; ACHOUR, A.; HEDESTAM, G. B. K.; HÄLLBERG, B. M.; MURRELL, B.; MCINERNEY, G. M. An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction. **Nature Communications**. v. 11, n. 4420. 2020.

HEO, YA. Sotrovimab: First Approval. **Drugs**. v. 82, p. 477–484. 2022.

HODCROFT, E. B. "CoVariants: SARS-CoV-2 Mutations and Variants of Interest." Disponível em: <https://covariants.org/>. Acesso em 10 de abril de 2022.

HUANG, Y.; YANG, C.; XU, X. F.; XU, W.; LIU, S. W. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 41, n. 9, p.1141-1149. 2020.

HUO, J.; LE BAS, A; RUZA, R. R.; DUYVESTYEN, H. M. E.; MIKOLAJEK, H.; MALINAUSKAS, T.; TAN, T. K.; RIJAL, P.; DUMOUX, M.; WARD, P. N.; REN, J.; ZHOU, D.; HARRISON, P. J.; WECKENER, M.; CLARE, D. K.; VOGIRALA, V. K.; RADECKE, J.; MOYNIÉ, L.; ZHAO, Y.; GILBERT-JARAMILLO, J.; KNIGHT, M. L.; TREE, J. A.; BUTTIGIEG, K. R.; COOMBES, N.; ELMORE, M. J.; CARROLL, M. W.; CARRIQUE, L.; SHAH, P. N. M.; JAMES, W.; TOWNSEND, A. R.; STUART, D. I.; OWENS, RAYMOND J.; NAISMITH, J. H. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2

spike RBD and block interaction with ACE2. **Nature Structural and Molecular Biology**. v. 27, p. 846–854 2020.

ISLAM, M.S.; HONMA, M.; NAKABAYASHI, T.; KINJO, M.; OHTA, N. pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells. **Internacional Journal Molecular Sciences**. v. 14, p. 1952-1963. 2013.

JEWELL, B., T. Monitoring differences between the SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant and other lineages. **The Lancet Public Health**. v. 6, p. 267-268. 2021.

JIN, X.; ZHANG, H.; LI, Y-T.; XIAO, M-M.; ZHANG, Z-L.; PANG, D-W.; WONG, G.; ZHANG, Z-Y.; ZHANG, G-J. A field effect transistor modified with reduced graphene oxide for immunodetection of Ebola virus. *Microchimica Acta*. v. 186, n. 223. 2019.

KASTRITIS, P. L.; MOAL, I. H.; HWANG, H.; WENG, Z.; BATES, P. A.; BONVIN, A. M.; JANIN, J. A structure-based benchmark for protein-protein binding affinity. **Protein science: a publication of the Protein Society**. v. 20, n. 3, p. 482–491. 2011.

KEMENA, C.; NOTREDAME, C. Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the high-throughput era. **Bioinformatics**. v. 25, n. 19, p. 2455–2465. 2009.

KHALID, M. F.; SELVAM, K.; JEFFRY, A. J. N.; SALMI, M. F.; NAJIB, M. A.; NORHAYATI, M. N.; AZIAH, I. Performance of Rapid Antigen Tests for COVID-19 Diagnosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Diagnostics**. v. 12, p. 110. 2022.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of Molecular Biology**. v. 372, p. 774--797. 2007.

KSIAZEK, T. G.; ERDMAN, D.; GOLDSMITH, C. S.; ZAKI, S. R.; PERET, T.; EMERY, S.; TONG, S.; URBANI, C.; COMER, J. A.; LIM, W.; ROLLIN, P. E.; DOWELL, S. F.; LING, A. E.; HUMPHREY, C. D.; SHIEH, W. J.; GUARNER, J.; PADDOCK, C. D.; ROTA, P.; FIELDS, B.; DERISI, J.; YANG, J. Y.; COX, N.; HUGHES, J. M.; LEDUC, J. W.; BELLINI, W. J.; ANDERSON, L. J. . A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. **New England Journal of Medicine**. v. 348, n. 20, p. 1953–1966. 2003.

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). In: Saxena, S. (eds) *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control*. **Springer**. p. 23-31. 2020.

KUMAVATH, R.; BARH, D.; ANDRADE, B. S.; IMCHEN, M.; ABURJAILE, F. F.; CH, A.; RODRIGUES, D. L. N.; TIWARI, S.; ALZAHIRANI, K. J.; GÓES-NETO. A.; WEENER, M. E.; GHOSH, P.; AZEVEDO V. The Spike of SARS-CoV-2: Uniqueness and Applications. *Frontiers in Immunology*. v. 12. 2021.

LAN, J.; GE, J.; YU, J.; SHAN, S.; ZHOU, H.; FAN, S.; ZHANG, Q.; SHI, X.; WANG, Q.; ZHANG, L.; WANG, X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**. v. 581, p. 215–220. 2020.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**. v. 23, p. 2947-2948. 2007.

LEE, S. Y.; CHOI, J. H.; & XU, Z. Microbial cell-surface display. **Trends in Biotechnology**. v. 21, n. 1, p. 45–52. 2003.

LEEM, J.; DEANE, C. M. High-Throughput Antibody Structure Modeling and Design Using ABodyBuilder. *Methods in Molecular Biology*. **Computational Methods in Protein Evolution**. v. 1851, p. 367-380. 2018.

LI, T.; CAI, H.; YAO, H.; ZHOU, B.; ZHANG, N.; VAN VLISSINGEN, M. F.; KUIKEN, T.; HAN, W.; GEURTSVANKESSEL, C. H.; GONG, Y.; ZHAO, Y.; SHEN, Q.; QIN, W.; TIAN, X-X.; PENG, C.; LAI, Y.; WANG, Y.; HUTTER, C. A. J.; KUO, S-M.; BAO, J.; LIU, C.; WANG, Y.; RICHARD, A. S.; RAOUL, H.; LAN, J.; SEEGER, M. A.; CONG, Y.; ROCKX, B.; WONG, G.; BI, Y.; LAVILLETTE, D.; LI, DI. A synthetic nanobody targeting RBD protects hamsters from SARS-CoV-2 infection. **Nature Communications**. v. 12, n. 4635. 2021.

LI, Y.; ZHANG, Z.; YANG, L.; LIAN, X.; XIE, Y.; LI, S.; XIN, S.; CAO, P.; LU, J. The MERS-CoV Receptor DPP4 as a Candidate Binding Target of the SARS-CoV-2 Spike. **IScience**. v. 23, n. 6. 2020.

LI, W.; MOORE, M.; VASILIEVA, N.; SUI, J.; WONG, S. K.; BERNE, M. A.; SOMASUNDARAN, M.; SULLIVAN, J. L.; LUZURIAGA, K.; GREENOUGH, T. C.; CHOE, H.; FARZAN, M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**. v. 426, p. 450–454. 2003.

LIU, H., ZHANG, Q., WEI, P. CHEN, Z.; AVISZUS, K; YANG, J.; DOWNING, W.; JIANG, C.; LIANG, B.; REYNOSO, L.; DOWNEY, G. P.; FRANKEL, S. K. KAPPLER, J. MARRACK, P.; ZHANG, G. The basis of a more contagious 501Y.V1 variant of SARS-CoV-2. **Cell Research**. v. 31, p. 720–722. 2021.

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P.; YANG, B.; WU, H.; WANG, W.; SONG, H.; HUANG, B.; ZHU, N.; BI, Y.; MA, M.; ZHAN, F.; WANG, L.; HU, T.; ZHOU, H.; HU, Z.; ZHOU, W.; ZHAO, L.; CHEN, J.; MENG, Y.; WANG, J.; LIN, Y.; YUAN, J.; XIE Z.; MA, J.; LIU, W-J.; WANG, D.; XU, W.; HOLMES, E. C.; GAO, G. F.; WU, G.; CHEN, W.; SHI, W.; TAN, W. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**. v. 395. n. 10224. p. 565-574. 2020.

MALLAPATY, S. Closest known relatives of virus behind COVID-19 found in Laos. **Nature**. v. 597, n. 603. 2021.

MENNI, C.; VALDES, A. M.; POLIDORI, L.; ANTONELLI, M.; PENAMARUKI, S.; NOGAL, A.; LOUCA, P.; MAY, A.; FIGUEIREDO, J. C.; HU, C.; MOLTENI, E.; CANAS, L.; ÖSTERDAHL, M. C.; MODAT, M.; SUDRE, C. H.; FOX, B.; HAMMERS, A.; WOLF, J.; CAPDEVILA, J.; CHAN, A. T.; DAVID, S. P.; STEVES, C. J.; OURSELIN, S.; SPECTOR, T. D. Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: a prospective observational study from the ZOE COVID Study. **The Lancet**. v. 399, n. 10335, p. 1618-1624. 2022.

MITCHELL, L. S.; COLWELL, L. J. Comparative analysis of nanobody sequence and structure data. **Proteins**. v. 86, n. 7, p. 697–706. 2018.

MOESKER, F. M.; VAN KAMPEN, J. J. A.; ARON, G.; SCHUTTEN, M.; J.J.A. VAN DE VIJVER, J.J.A.; KOOPMANS, M.P.G.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; FRAAIJ, P. L. A. Diagnostic performance of influenza viruses and RSV rapid antigen detection tests in children in tertiary care. **Journal of Clinical Virology**. v. 79, p. 12-17. 2016.

MOHAMMED, I.; NAUMAN, A.; PAUL, P.; GANESAN, S.; CHEN, K-H.; JALIL, S. M. S.; JAOUNI, S. H.; HAWAS, H.; KHAN, W. A.; VATTOTH, A. L.; AL-HASHIMI, Y. A.; FARES, A.; ZEGHLACHE, R.; ZAKARIA, D. The efficacy and effectiveness of the COVID-19 vaccines in reducing infection, severity, hospitalization, and mortality: a systematic review. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. v. 18, n. 1. 2022.

MONICI, M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. **Biotechnology Annual Review**. v. 11, p. 227–256. 2005.

MOYA, A.; ELENA, S. F.; BRACHO, A.; MIRALLES, R.; BARRIO, E. The evolution of RNA viruses: a population genetics view. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.** v. 97, n. 2, p. 6967-6973. 2000.

MUYLDERMANS, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. **Annual Review of Biochemistry**. v. 82, n. 1, p. 775–797. 2013.

NEUMAN, B. W; BUCHMEIER, M. J. Supramolecular Architecture of the Coronavirus Particle. **Advances in Virus Research**. v. 96, p. 1-27. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). WHO Director-General's statement on IHR Emergency Committee on Novel Coronavirus (2019-nCoV). Disponível em: [https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ih-er-emergency-committee-on-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ih-er-emergency-committee-on-novel-coronavirus-(2019-ncov)). Acesso em novembro de 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Disponível em: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it). Acesso em julho de 2020. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). WHO COVID-19 Dashboard. Geneva: World Health Organization, 2020. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 04 de maio de 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Summary of probably SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. WHO. Disponível em: http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/. Acesso em: 07 de maio de 2022. 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-lab-testing-2021.1-eng>. Acesso em junho de 2022. 2021.

PADLAN, E. A. Anatomy of the antibody molecule. **Molecular Immunology**. v. 31, p. 169–217. 1994.

PASCARELLA, S.; CICOZZI, M.; ZELLA, D.; BIANCHI, M.; BENEDETTI, F.; BENVENUTO, D.; BROCCOLO, F.; CAUDA, R.; CARUSO, A.; ANGELETTI, S.; GIOVANETTI, M.; CASSONE, A. SARS-CoV-2 B.1.617 Indian variants: are electrostatic potential changes responsible for a higher transmission rate?. **Journal of Medical Virology**. 2021.

PÉDELACQ, J.-D.; CABANTOUS, S.; TRAN, T.; TERWILLIGER, T. C.; WALDO, G. S. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**. v. 24, n. 1, p. 79–88. 2006.

PRESTA, L. G. Selection, design, and engineering of therapeutic antibodies. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 116, n. 4, p. 731-736. 2005.

RAJPAL, A.; BEYAZ, N.; HABER, L.; CAPPUCILLI, G.; YEE, H.; BHATT, RR; TAKEUCHI, T.; LERNER, R. A.; CREA, R. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A**. v. 102, n. 24, p. 8466-8471. 2005.

REMUS-EMSERMANN, M., LEVEAU, J. Linking environmental heterogeneity and reproductive success at single-cell resolution. **The ISME Journal**. v. 4, p. 215–222. 2010.

RITCHIE, H.; MATHIEU, E.; RODÉS-GUIRAO, L.; APPEL, C.; GIATTINO, C.; ORTIZ-OSPINA, E.; HASSELL, J.; MACDONALD, B.; BELTEKIAN, D.; ROSER, M. Coronavirus Pandemic (COVID-19)". Publicado online em: OurWorldInData.org. Disponível em: <https://ourworldindata.org/coronavirus>. 2022.

SAERENS, D.; FREDERIX, F.; REEKMANS, G.; CONRATH, K.; JANS, K.; BRYNS, L.; HUANG, L.; BOSMANS, E.; MAES, G.; BORGHES, G.; MUYLDERMANS, S. Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing. **Analytical Chemistry**. v. 77, n. 23, p. 7547–7555. 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SCHMIDT, S. D.; MAZZELLA M. J.; NIXON, R. A.; MATHEWS, P. M. A β Measurement by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Methods in Molecular Biology** (Methods and Protocols), v. 849, p. 507-527. 2012.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**. v. 7, p. 539–539. 2014.

SINGH, J.; RAHMAN, S. A.; EHTESHAM, N. Z.; HIRA, S.; HASNAIN, S. E. SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. **Nature Medicine**. v. 27, n. 7, p.1131-1133. 2021.

STALIN RAJ, V.; OKBA, N. M. A.; GUTIERREZ-ALVAREZ, J.; DRABEK, D.; VAN DIEREN, B.; WIDAGDO, W.; LAMERS, M. M.; WIDJAJA, I.; FERNANDEZ-DELGADO, R.; SOLA, I.; BENSALD, A.; KOOPMANS, M. P.; SEGALÉS, J.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; BOSCH, B. J.; ENJUANES, L.; HAAGMANS, B. L. Chimeric camel/human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection. **Science Advances**. v. 4, n. 8. 2018.

TABASINEZHAD, M.; TALEBKHAN, Y.; WENZEL, W.; RAHIMI, H.; OMIDINIA, E.; MAHBOUDI, F. Trends in therapeutic antibody affinity maturation: From in-vitro towards next-generation sequencing approaches. **Immunology Letters**. v. 212, p. 106-113. 2019.

TEMMAM, S.; VONGPHAYLOTH, K.; SALAZAR, E. B.; MUNIER, S.; BONOMI, M.; RÉGNAULT, B.; DOUANGBOUBPHA, B.; KARAMI, Y.; CHRETIEN, D.; SANAMXAY, D.; XAYAPHET, V.; PAPHAPHANH, P.; LACOSTE, V.; SOMLOR, S.; LAKEOMANY, K.; PHOMMAVANH, N.; PÉROT, P.; DONATI, F.; BIGOT, T.; NILGES, M.; REY, F.; VAN DER WERF, S.; BREY, P.; ELOIT, M. Coronaviruses with a SARS-CoV-2-like receptor-binding domain allowing ACE2-mediated entry into human cells isolated from bats of Indochinese peninsula. PREPRINT. Research Square. v. 1. 2021.

THOMSON, E. C.; ROSEN, L. E.; SHEPHERD, J. G. *et al.* Circulating SARS-CoV-2 Spike N439K variants maintain fitness while evading antibody-mediated immunity. **Cell**. v. 184, n. 5, p. 1171-1187. 2021.

TIAN, X.; LI, C.; HUANG, A.; XIA, S.; LU, S.; SHI, Z.; LU, L.; JIANG, S.; YANG, Z.; WU, Y.; YING, T. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. **Emerging Microbes & Infections**. v. 9, n. 1, p. 382–385. 2020.

TIAN, D.; SUN, Y.; ZHOU, J.; YE, Q. The global epidemic of SARS-CoV-2 variants and their mutational immune escape. **Journal of Medical Virology**. v. 94, p. 847-857. 2022.

VALENZUELA NIETO, G.; JARA, R.; WATTERSON, D.; MODHIRAN, NAPHA; AMARILLA, ALBERTO A.; HIMELREICHS, J.; KHROMYKH, A. A.; SALINAS-REBOLLEDO, C.; PINTO, T.; CHEUQUEMILLA, Y.; MARGOLLES, Y.; LÓPEZ GONZÁLEZ DEL REY, N.; MIRANDA-CHACON, Z.; CUEVAS, A.; BERKING, A.; DERIDE, C.; GONZÁLEZ-MORAGA, S.; MANCILLA, H.; MATURANA, D.; LANGER, A.; TOLEDO, J. P.; MÜLLER, A.; UBERTI, B.; KRALL, P.; EHRENFELD, P.; BLES, J.; CHANA-CUEVAS, P.; REHREN, G.; SCHWEFEL, D.; FERNANDEZ, L. A.; ROJAS-FERNANDEZ, A. Potent neutralization of clinical isolates of SARS-CoV-2 D614 and G614 variants by a monomeric, sub-nanomolar affinity nanobody. **Scientific Reports** v. 11, n. 3318. 2021.

VANEYCKEN, I.; D'HUYVETTER, M.; HERNOT, S.; DE VOS, J.; XAVIER, C.; DEVOOGDT, N.; LAHOUTTE, T. Immuno-imaging using nanobodies. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 22, n. 6, p. 877–881. 2011.

VATTEKATTE, M. A.; SHINADA N. K.; NARWANI T. J.; NOËL F, BERTRAND, O.; MEYNIEL, J. P.; MALPERTUY A.; GELLY J. C.; CADET F.; DE BREVERN A. G. Discrete analysis of camelid variable domains: sequences, structures, and in-silico structure prediction. **PeerJ**. v. 8, n. 8408. 2020.

VERHEIJE, M. H.; HAGEMEIJER, M. C.; ULASLI, M.; REGGIORI, F.; ROTTIER, P. J.; MASTERS, P. S.; DE HAAN, C. A. The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. **Journal of Virology**. v. 84, n. 21, p. 11575-11579. 2010.

WALLS, A. C.; XIONG, X.; PARK, Y. J.; TORTORICI, M. A.; SNIJDER, J.; QUISPE, J.; CAMERONI, E.; GOPAL, R.; DAI, M.; LANZAVECCHIA, A.; ZAMBON, M.; REY, F. A.; CORTI, D.; VEESLER, D. Unexpected Receptor Functional Mimicry Elucidates Activation of Coronavirus Fusion. **Cell**. v. 176, p. 1026-1039.15. 2019.

WALLS, A. C.; PARK, Y.-J.; TORTORICI, M. A.; WALL, A.; MCGUIRE, A. T.; & VEESLER, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**. v. 181, n 2, p. 281-292. 2020.

WALTER, J. D.; HUTTER, C. A. J.; ZIMMERMANN, I.; WYSS, M.; EGLOFF, P.; SORGENFREI, M.; HÜRLIMANN, L. M.; GONDA, I.; MEIER, G.; REMM, S.; THAVARASAH, S.; PLATTET, P.; SEEGER, M. A. Sybodies targeting the SARS-CoV-2 receptor-binding domain. **BioRxiv**. 2020.

WALTER, J. D.; HUTTER, C. A. J.; GARAEVA, A. A.; SCHERER, M.; ZIMMERMANN, I.; WYSS, M.; RHEINBERGER, J.; RUEDIN, Y.; EARP, J. C.; EGLOFF, P.; SORGENFREI, M.; HÜRLIMANN, L. M.; GONDA, I.; MEIER, G.; REMM, S.; THAVARASAH, S.; VAN GEEST, G.; BRUGGMAN, RÉMY.; ZIMMER, G.; SLOTBOOM, D. J.; PAULINO, C.; PLATTET, P.; SEEGER, M. A. Biparatopic sybody constructs neutralize SARS-CoV-2 variants of concern and mitigate emergence of drug resistance. **EMBO Reports**. v. 23, n. 4. 2022.

WEISSLEDER, R.; LEE, H.; KO, J.; PITTET, M. J. COVID-19 diagnostics in context. **Science Translational Medicine**. v. 12, n. 546. 2020.

WILMES, P.; ZIMMER, J.; SCHULZ, J.; GLOD, F.; VEIBER, L.; MOMBAERTS, L.; RODRIGUES, B.; AALTO, A.; PASTORE, J.; SNOECK, C. J.; OLLERT, M.; FAGHERAZZI, G.; MOSSONG, J.; GONCALVES, J.; SKUPIN, A.; NEHRBASS, U. SARS-CoV-2 transmission risk from asymptomatic carriers: Results from a mass screening programme in Luxembourg. **The Lancet Regional Health - Europe**. v. 4, n. 100056. 2021.

WORLDOMETER. Coronavirus Cases. Disponível em: <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/brazil/>. Acesso em 04 de maio de 2022.

WRAPP, D.; VLIENER, D. DE.; CORBETT, K.; M. TORRES, G.; BREEDAM, W.; ROOSE, K.; SCHIE, L. V.; VIB-CMB COVID-19; HOFFMANN, M.; PÖHLMANN, P.; GRAHAM, B. S.; CALLEWAERT, N.; SCHEPENS, B.; SAELENS, X.; MCLELLAN, J. S. Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-domain Camelid Antibodies. **Cell**. v. 181, n. 5, p. 1004-1015.e15. 2020 (a).

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

YONG, S., J. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. **Infectious Diseases**, v. 53:10. p. 737-754. 2021.

YÜCE, M.; FILIZTEKIN, E.; ÖZKAYA, K. G. COVID-19 diagnosis — A review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 172, n. 112752. 2021.

ZHAO, G.; HE, L.; SUN, S.; QIU, H.; TAI, W.; CHEN, J.; LI, J.; CHEN, Y.; GUO, Y.; WANG, Y.; SHANG, J.; JI, K.; FAN, R.; DU, E.; JIANG, S.; LI, F.; DU, L.; ZHOU, Y. A Novel Nanobody Targeting Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Receptor-Binding Domain Has Potent Cross-Neutralizing Activity and Protective Efficacy against MERS-CoV. **Journal of Virology**. v. 92, n. 18, p. 2018.

ZHENG, C.; SHAO, W.; CHEN, X.; ZHANG, B.; WANG, G.; ZHANG, W. Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis, **International Journal of Infectious Diseases**. v. 114, p. 252-260. 2022.