

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

“Interações da proteína Spike do SARS-CoV-2 com células do sistema respiratório.”

MARIA LUIZA PELLICER TEIXEIRA

Monografia apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, ênfase em Ciências Básicas da Saúde.

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2021**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

“Interações da proteína Spike do SARS-CoV-2 com células do sistema respiratório.”

MARIA LUIZA PELLICER TEIXEIRA

Monografia apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, ênfase em Ciências Básicas da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Vitor Marcel Faça
Co-orientadora: Virgínia Campos Silvestrini

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2021**

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 57^a Sessão Ordinária, realizada em 04/10/2021

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rose e Ricardo, que foram - e são - meu alicerce na vida, vocês nunca pararam de acreditar nos meus sonhos mesmo quando eu duvidava deles. Obrigada pelo apoio incondicional, por sempre respeitarem minhas escolhas, por me apoiarem em todos os meus planos e me orientarem com todo o amor do mundo. Nunca vou conseguir expressar toda a minha gratidão, amo vocês além da vida.

Aos meus avós, Emília e Ulisses, que não puderam mais estar me prestigiando em vida. Sinto o amor de vocês em todos os meus passos e sei o quanto estão felizes por mim.

Aos meus avós, Filomena e Jácomo, que ainda tenho o privilégio de ter por perto, obrigada pelo amor e orgulho que demonstram todos os dias.

Aos meus amigos de vida, Camille, Fernanda e Guilherme, pudemos acompanhar uns aos outros pelo começo da vida adulta e tudo teria sido mais difícil sem vocês.

A todos os amigos que fiz graças a faculdade, mas em especial à Beatriz, Giulia e Jéssica, vocês foram parte de todos os momentos importantes para mim. À Lara, por todo o amor e companheirismo, muito obrigada.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer no Laboratório de Proteômica do Câncer, Alessandra, Guilherme Lanfredi, Guilherme Sastre, Izadora e John.

A Virgínia, pela dedicação e carinho para me ensinar quase tudo que hoje sei sobre o método científico e a importância da pesquisa. Muito obrigada por todos os conselhos, todas as risadas e todas as vezes que você se provou não só uma co-orientadora, mas também uma amiga.

A Ana Masson, pelo empenho em me auxiliar nos desafios técnicos e pessoais da pesquisa no Brasil, sem nunca perder a sensibilidade e a paciência.

Ao meu orientador Vitor, por nunca deixar de acreditar na importância desse projeto e me mostrar o verdadeiro impacto da ciência no mundo.

A Universidade de São Paulo, bem como a todos os seus funcionários que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

RESUMO

Em janeiro de 2020, a OMS declarou a pandemia de COVID-19, após a disseminação do vírus SARS-CoV-2 por 37 países, iniciando na província de Wuhan, China. A taxa de mortalidade em infectados é de 2%, o que representa mais de 4,6 milhões de vítimas fatais até setembro de 2021. A transmissão da COVID-19 ocorre de forma extremamente rápida, e em grande parte por indivíduos assintomáticos, procedendo através do contato direto com pacientes infectados, gotículas de saliva, e também por contaminação cruzada, em que a transmissão acontece por meio de objetos infectados. O SARS-CoV-2 foi originado a partir de uma mutação do vírus SARS-CoV, responsável por causar uma epidemia no leste asiático em 2003. Em seu material genético, o vírus possui um RNA sentido positivo que induz a célula hospedeira a sintetizar proteínas envolvidas na sua replicação: replicase ORF1ab, **Spike (S)**, envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). A proteína Spike atua na conformação do envelope viral, agindo na ligação ao receptor e fusão à célula hospedeira, e apresenta em sua estrutura um domínio RBM (*Receptor Binding Motif*), localizado na estrutura RBD (*Receptor Binding Domain*), que possui a função de se ligar à Enzima Conversora de Angiotensina II (ACE2), o principal receptor conhecido em células humanas. Partindo deste princípio, o estudo das interações da proteína Spike com células de linhagens do sistema respiratório humano, bem como o desenvolvimento de métodos que bloqueiem ou minimizem essa interação, consiste no principal foco deste trabalho.

A partir da estrutura tridimensional do complexo Spike-ACE2, desenvolvemos um peptídeo sintético derivado do RBM de Spike que mimetiza esta interface de interação e que representa uma ferramenta para estudos de interações ou inibição destas interações entre o vírus e células hospedeiras. O peptídeo sintetizado final possui sequência 487NSYFPLQSYGFQPTNG502-CYS e foi denominado Spike487-502Cys. Para identificar possíveis novas interações do peptídeo, foi realizado o cultivo celular das linhagens A549 *Wild Type (WT)* e A549 com superexpressão de ACE2 (+A), derivadas de adenocarcinoma de pulmão, que foram submetidas à enriquecimento de frações celulares. As amostras deste enriquecimento foram avaliadas quanto aos marcadores de compartimentos celulares por meio de *Western Blotting*. Posteriormente, foram realizados experimentos com o peptídeo Spike487-502Cys imobilizado para identificação de interações com as frações celulares obtidas. A partir de análises preliminares das proteínas ligantes do peptídeo, observamos padrões diferenciais para as linhagens A549 *WT* e A549 +A e uma lista preliminar de possíveis proteínas candidatas para avaliação mais detalhada. Com a análise das interações obtidas, pretendemos confirmar possíveis novos receptores para o vírus bem como utilizar peptídeos derivados de Spike que possam agir como agentes bloqueadores da infecção celular.

Palavras-chave: COVID-19, SARS-CoV-2, Spike, ACE2.

ABSTRACT

In January 2020, WHO declared the COVID-19 pandemic, following the spread of the SARS-CoV-2 virus across 37 countries, starting in Wuhan province, China. The mortality rate in infected people is 2%, which represents more than 4.6 million fatal victims by September 2021. The transmission of COVID-19 occurs extremely quickly, and in large part by asymptomatic individuals, proceeding through direct contact with infected patients, droplets of saliva, and also cross-contamination, in which transmission occurs through infected objects. SARS-CoV-2 originated from a mutation of the SARS-CoV virus, responsible for causing an epidemic in East Asia in 2003. In its genetic material, the virus has a positive-sense RNA that induces the host cell to synthesize proteins involved in its replication: replicase ORF1ab, Spike (S), envelope (E), membrane (M) and nucleocapsid (N). The Spike protein acts on the conformation of the viral envelope, acting in binding to the receptor and fusion to the host cell, and presents in its structure an RBM (Receptor Binding Motif) domain, located in the RBD (Receptor Binding Domain) structure, which has the function of binds to Angiotensin-Converting Enzyme II (ACE2), the major known receptor on human cells. Based on this principle, the study of Spike protein interactions with cell lines from the human respiratory system, as well as the development of methods that block or minimize this interaction, is the main focus of this work.

From the three-dimensional structure of the Spike-ACE2 complex, we developed a synthetic peptide derived from Spike's RBM that mimics this interaction interface and represents a tool for studies of interactions or inhibition of these interactions between the virus and host cells. The final synthesized peptide has sequence 487NSYFPLQSYGFQPTNG502-CYS and was named Spike487-502Cys. In order to identify possible new interactions of the peptide, cell culture of the A549 Wild Type and A549 strains with overexpression of ACE2, derived from lung adenocarcinoma, which were subjected to enrichment of cell fractions, was performed. Samples from this enrichment were evaluated for cell compartment markers by Western Blotting. Subsequently, experiments were carried out with the immobilized peptide Spike487-502Cys to identify interactions with the cell fractions obtained. From preliminary analysis of the peptide binding proteins, we observed differential patterns for the A549 WT and A549 +A strains and a preliminary list of possible candidate proteins for more detailed evaluation. With the analysis of the interactions obtained, we intend to confirm possible new receptors for the virus as well as using peptides derived from Spike that can act as blocking agents for cellular infection.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, Spike, ACE2.

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| ACE2 | <i>Angiotensin Converting Enzyme 2</i> |
| ACN | Acetonitrila |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| AT1R | <i>Angiotensin II Type 1 Receptor</i> |
| AT2R | <i>Angiotensin II Type 2 Receptor</i> |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumine</i> |
| COVID-19 | <i>Coronavirus Disease 2019</i> |
| DIC | Di-isopropilcarbodiimida |
| DIPEA | Di-isopropiletilamina |
| DMF | Dimetilformamida |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| Fmoc | Grupo protetor de fluorenilmeloxicarbonil |
| HBTU | Hexafluorofosfato Benzotriazol Tetrametil Urônio |
| Hobt | Hidroxibenzotriazol |
| IAA | Iodoacetamida |
| OMS | Organizaçao Mundial da Saude |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PVDF | Fluoreto de Polivinilideno |
| RAAS | <i>Renin-Angiotensin-Aldosterone System</i> |
| RBD | <i>Receptor Binding Domain</i> |
| RBM | <i>Receptor Binding Motif</i> |
| SARS-CoV-2 | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> |
| Spike487-502Cys | peptídeo 487NSYFPLQSYGFQPTNG502-CYS |
| SPPS | <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> |
| TNBS | Ácido Trinitrobenzenosulfônico |

SÍMBOLOS

| | |
|---------------|--|
| g | Gramas |
| μg | Micrograma |
| L | Litro |
| mL | Mililitro |
| μL | Microlitro |
| cm | Centímetro |
| μm | Micrômetro |
| nm | Nanômetro |
| mm | Milímetro |
| M | Molar |
| V | Volts |
| pH | Log negativo da concentração de H ⁺ |
| rpm | Rotações por minuto |
| % | Porcentagem |
| °C | Graus Celsius |
| xg | X gravidade |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Contabilização de novos casos semanais de COVID-19 de diferentes regiões do mundo em 2020-2021: Américas, Europa, Sudeste Asiático, Leste Mediterrâneo, Oeste Pacífico e África..... | 14 |
| Figura 2. Representação esquemática dos vírus da família Coronaviridae..... | 16 |
| Figura 3. Topologia geral de um monômero da proteína Spike..... | 17 |
| Figura 4. Estrutura esquemática do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, representando as funções desempenhadas pelas enzimas ACE e ACE 2..... | 19 |
| Figura 5. Expressão de ACE2 em tecidos humanos..... | 20 |
| Figura 6. Interação entre o SARS-CoV-2 e seu receptor ACE2, com posterior fusão viral..... | 21 |
| Figura 7. Imagem por cristalografia de raios X da estrutura molecular da interação entre a porção RBD do vírus SARS-CoV-2 e o receptor ACE2..... | 22 |
| Figura 8. Substituição do resíduo de lisina na posição 417 do SARS-CoV-2 por um resíduo de valina na posição 404 do SARS-CoV..... | 23 |
| Figura 9. Localização das mutações da proteína Spike..... | 24 |
| Figura 10. Fluxograma da metodologia utilizada..... | 29 |
| Figura 11. Região de contato da porção RBM da proteína Spike com o receptor ACE2..... | 40 |
| Figura 12. Espectro de massa do peptídeo Spike487-502Cys..... | 41 |
| Figura 13. Microscopia confocal de tecido pulmonar de autópsia de indivíduos positivos (+) e negativos (-) para COVID-19..... | 43 |
| Figura 14. <i>Western blotting</i> das proteínas e quantificação por Image J das bandas de ACE2, LYN, GAPDH e Histona H3..... | 45 |
| Figura 15. Representação esquemática da metodologia utilizada para captura do peptídeo Spike 487-502 Cys..... | 46 |
| Figura 16. Gel SDS-Page de alíquotas da interação entre amostras celulares e o peptídeo Spike487-502Cys..... | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Legenda da sequência HPPHCPC em repetições de heptal..... | 18 |
| Tabela 2. Variantes de destaque do vírus SARS-CoV-2 detectadas durante a pandemia da COVID-19..... | 23 |
| Tabela 3. Lista de anticorpos utilizados para técnica de <i>Western Blotting</i> : proteína, peso molecular, espécie, diluição, fabricante e código..... | 35 |
| Tabela 4. Quantificação pelo método Bradford das frações enriquecidas de ambas linhagens celulares, obtidas pelo protocolo 3.5..... | 44 |
| Tabela 5. Resultado da identificação por espectrometria de massas das proteínas de interação com a fração de membrana de células A549 <i>Wild Type</i> | 47 |
| Tabela 6. Resultado da identificação por espectrometria de massas das proteínas de interação com a fração de membrana de células A549 com superexpressão de ACE2 | 48 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução | 14 |
| 1.1 A COVID-19 | 14 |
| 1.2 O SARS-CoV-2 | 15 |
| 1.3 A glicoproteína Spike | 17 |
| 1.4 A Enzima Conversora de Angiotensina II | 18 |
| 1.5 Interação entre proteína Spike e Enzima Conversora de Angiotensina II | 20 |
| 1.5.1 Ligação do vírus com a célula hospedeira | 20 |
| 1.5.2 Diferenças entre SARS-CoV e SARS-CoV-2 | 21 |
| 1.6 Variantes de destaque do SARS-CoV-2 | 23 |
| 2. Objetivos | 27 |
| 2.1 Objetivos gerais | 27 |
| 2.2 Objetivos específicos | 27 |
| 3. Metodologia | 29 |
| 3.1 Fluxograma da metodologia utilizada | 29 |
| 3.2 Síntese de peptídeos | 29 |
| 3.2.1 Acoplamento de novo aminoácido | 30 |
| 3.2.2 Desbloqueio | 30 |
| 3.2.3 Clivagem | 31 |
| 3.2.4 Purificação em cromatografia de fase reversa | 31 |
| 3.3 Cultivo da linhagem celular A549 | 32 |
| 3.4 Extração total de proteínas das células A549 | 33 |
| 3.5 Produção de frações enriquecidas | 33 |
| 3.6 Quantificação método Bradford | 34 |
| 3.7 SDS-PAGE e Western Blotting | 34 |
| 3.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida | 34 |
| 3.7.2 Western Blotting Submarino | 34 |
| 3.7.3 Western Blotting Semi-seco | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7.4 Bloqueio de Sítios Inespecíficos e Incubação de Anticorpos | 35 |
| 3.8 Quantificação de Imagens de Western Blotting por Image J | 36 |
| 3.9 Quantificação de peptídeos por reagente OPA | 36 |
| 3.10 Quantificação de peptídeos pelo sistema Qubit. | 36 |
| 3.11 Desenvolvimento de agentes de captura com o peptídeo Spike487-502Cys | 36 |
| 3.11.1 Captura de peptídeo em placa de sulfidrila | 36 |
| 3.11.2 Captura de peptídeo em resina | 37 |
| 3.12 Preparo de amostras para análise por espectrometria de massas | 37 |
| 4. Resultados e discussão | 40 |
| 4.1 Desenho e síntese de peptídeo da Spike para captura de novos alvos de superfície celular | 40 |
| 4.2 Escolha da linhagem A549 | 42 |
| 4.3 Fracionamento para enriquecimento de fração de membrana | 43 |
| 4.4 Desenvolvimento de estratégias para captura de novas proteínas que interagem com o peptídeo Spike487-502Cys | 45 |
| 4.5 Potenciais novos alvos de interação com a proteína Spike descritos na literatura | 51 |
| 5. Conclusões | 54 |
| 6. Referências bibliográficas | 56 |

Introdução

1. Introdução

1.1 A COVID-19

Em dezembro de 2019, um surto de pneumonia de causa desconhecida acometeu a cidade de Wuhan, província de Hubei, na China. A doença se espalhou rapidamente e logo foi descoberto que era causada pelo vírus SARS-CoV-2 (abreviação de *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), e a doença foi nomeada COVID-19 (abreviação de *Coronavírus Disease 2019*). Em janeiro de 2020, o vírus já havia chegado a mais de 20 países dos continentes europeu, americano e asiático, e em março a pandemia foi oficialmente declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Yuen & Ye, 2020). Atualmente, o mundo conta com mais de 200 milhões de infectados e 5 milhões de óbitos (OMS, novembro de 2021).

Uma característica preocupante da pandemia de COVID-19 é a presença de “ondas de contágio”, em que o aparecimento de uma nova variante do SARS-CoV-2, geralmente mais infecciosa, causa um aumento nos casos à nível mundial, como exemplificado na **Figura 1**. Por exemplo, é possível observar que o maior pico de contágio ocorreu entre abril e junho, que coincide com a prevalência mundial da variante Delta, que possui a característica de ser mais infecciosa.

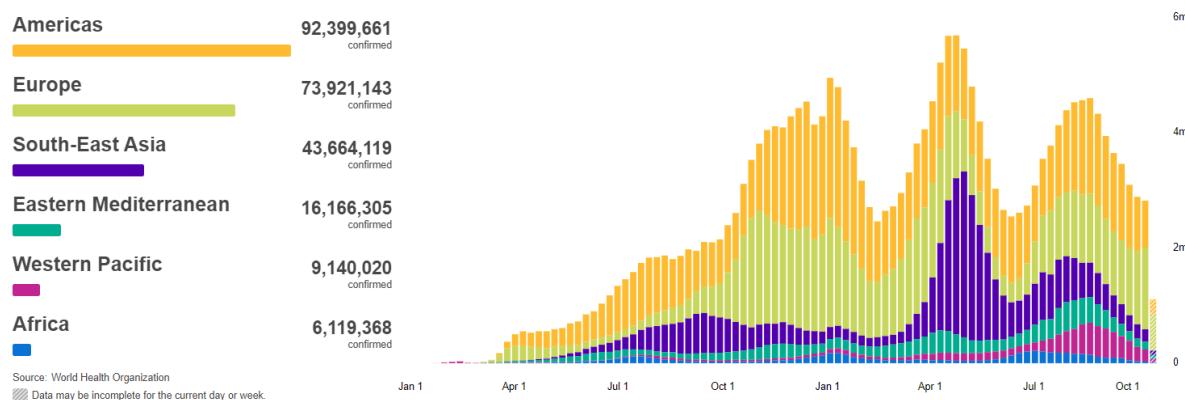


Figura 1. Contabilização de novos casos semanais de COVID-19 de diferentes regiões do mundo em 2020-2021: Américas, Europa, Sudeste Asiático, Leste Mediterrâneo, Oeste Pacífico e África (World Health Organization, acesso em 21.10.21).

No Brasil, o primeiro caso de COVID-19 foi reportado no final de fevereiro de 2020, e a doença atingiu toda a extensão do país rapidamente, chegando à marca de 4 mil mortos

por dia, em abril de 2021. Atualmente, conta-se com mais de 21 milhões de infectados e 600 mil mortos, somando uma taxa de mortalidade de quase 3% (Ministério da Saúde, 2021).

A transmissão do SARS-CoV-2 se dá por meio de secreção do sistema respiratório de infectados, como gotas de saliva, que podem ficar presente no ar em forma aerossol por até três horas e assim contaminar indivíduos tanto de forma direta, pela inalação de aerossóis, quanto por forma indireta, em que pessoas saudáveis têm contato com superfícies contaminadas e levam a mão aos olhos, nariz ou boca (Doremalen *et al*, 2020).

As manifestações clínicas da COVID-19 se apresentam de forma muito difusa e vão desde indivíduos assintomáticos, que são descritos como os maiores agentes transmissores do vírus, até quadros de falência múltipla de órgãos e morte. Contudo, os sintomas mais comuns geralmente são febre, tosse seca e falta de ar (Hui *et al*, 2020). Uma das principais manifestações clínicas da infecção por SARS-CoV-2 é o aspecto opaco dos pulmões em imagens de tomografia computadorizada, já que a Enzima Conversora de Angiotensina II (ACE2), descrita como o principal receptor humano do vírus, possui alta expressão na porção apical de pneumócitos presentes no espaço alveolar (Yoshikawa *et al*, 2020). A infecção desses pneumócitos induz a ativação do sistema imune, que age por meio da fagocitose de células dendríticas e macrófagos de células infectadas, levando ao dano do tecido pulmonar (Fujimoto & Pan, 2020). Adicionalmente, a maioria dos pacientes graves da COVID-19 apresenta linfopenia, que é caracterizada pelo baixo número de linfócitos circulantes, o que dificulta a resposta imune mediada por células T (Zhou *et al*, 2020).

Atualmente, não há tratamentos específicos disponíveis para a COVID-19, apesar de resultados promissores na literatura com o uso de plasma de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, devido à presença de anticorpos neutralizantes (Aberg *et al*, 2020). Sendo assim, a vacinação é a única forma de conter o contágio da doença, e o Brasil conta com mais de 50% da população completamente vacinada contra a COVID-19, o que representa mais de 120 milhões de brasileiros, em número absolutos (Ministério da Saúde). Esse número coloca o Brasil em terceiro lugar no *ranking* de número de habitantes vacinados, atrás apenas da Índia e dos Estados Unidos (OMS).

1.2 O SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavírus 2*, sigla em inglês para Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2) é um β-coronavírus pertencente à família *Coronaviridae*, também chamados de coronavírus, e exemplificados na **Figura 2**. Esses vírus possuem uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira, que

abriga as proteínas de superfície virais. As proteínas se projetam para fora do vírus e o confere uma aparência de coroa, responsável pelo nome coronavírus (Drosten *et al*, 2003). Também, os coronavírus possuem uma única fita de RNA sentido positivo em seu material genético, contendo cerca de 30 mil bases, o que os confere o maior genoma entre todos os vírus de RNA (Woo *et al*, 2009).

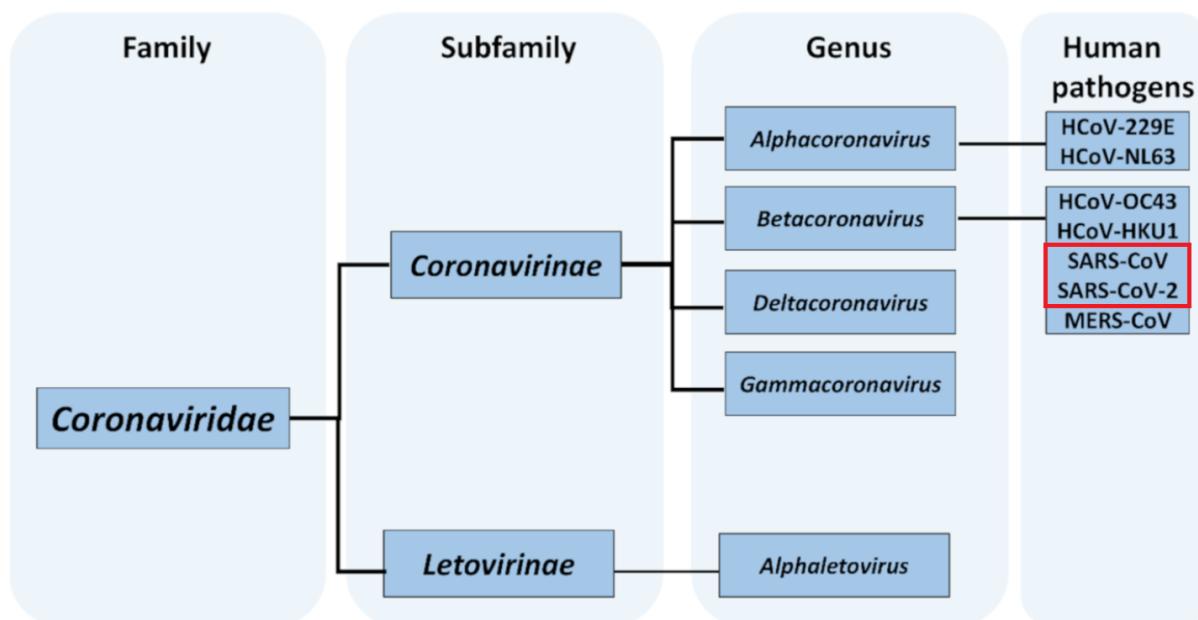


Figura 2. Representação esquemática dos vírus da família *Coronaviridae* (Wartecki & Rzymski, 2020)

O RNA dos coronavírus codifica quatro proteínas estruturais, sendo elas a proteína N, responsável por envelopar o material genético viral, a glicoproteína Spike, que age como o receptor do vírus, a proteína de matriz celular M, e a proteína de envelope E (Fehr & Perlman, 2015). Além disso, uma das proteínas não estruturais codificadas é a RNA polimerase RNA dependente (RdRp, sigla em inglês para *RNA-dependent RNA polymerase*), responsável por replicar a fita simples de RNA viral. A replicação do RNA possui uma taxa de erros muito alta, fato que confere alta mutabilidade aos vírus da família *Coronaviridae* (Duffy *et al*, 2008).

Um ponto importante a ser destacado, é que, em geral, os coronavírus humanos causam quadros de gripe leve, com sintomas comuns como febre, tosse e coriza. Entretanto, em 2002, com o surgimento do vírus SARS-CoV, houve uma epidemia no leste Asiático em que os infectados apresentavam comprometimento respiratório mais severo, com taxa de mortalidade de 9,5% (Corman *et al*, 2018). O SARS-CoV-2 surgiu a partir de mutações do SARS-CoV, e foi capaz de se espalhar com maior rapidez devido ao fato que, mesmo com

taxa de mortalidade representando apenas $\frac{1}{3}$ da taxa do SARS-CoV, apresenta maior transmissibilidade (Mackay & Arden, 2015).

Muitas hipóteses foram formuladas quanto às circunstâncias que propiciaram o surgimento do SARS-CoV-2, mas a mais aceita é que o vírus surgiu do contato entre humanos e morcegos, pois o material genético do vírus RaTG13 (que infecta morcegos) possui 96.2% de similaridade com o RNA de SARS-CoV-2. Contudo, ainda não está claro se essa evolução pode ter ocorrido de forma direta, ou por meio de um mamífero intermediário (Zhu *et al*, 2020).

1.3 A glicoproteína Spike

A glicoproteína Spike é um trímero que pode ser subdividido em três estruturas básicas, sendo uma porção N-terminal extracelular, um domínio transmembrana (TM) ancorado à membrana viral e uma porção C-terminal (Jun Lan *et al*, 2020). Em seu estado normal, pré-fusão, a Spike é metaestável e quando um receptor é reconhecido, sua estrutura passa por alterações estruturais complexas para permitir o *binding* correto com a célula hospedeira. Além disso, a Spike é uma glicoproteína por possuir uma camada de polissacarídeos em torno de si, que possui a função de evasão do sistema imune do hospedeiro durante a replicação viral (Watanabe *et al*, 2020)

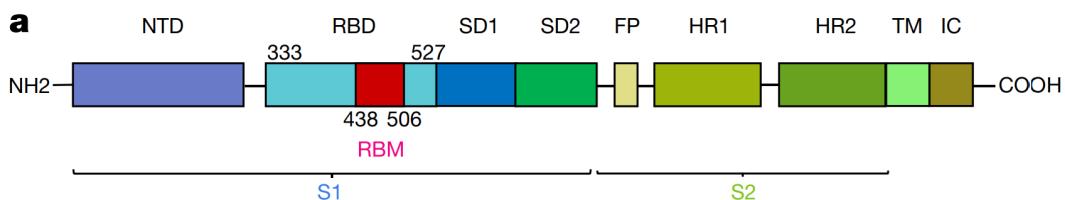


Figura 3. Topologia geral de um monômero da proteína Spike (modificado de Jun Lan *et al*, 2020).

O monômero da proteína Spike está demonstrado na Figura X. Os domínios S1 e S2 são responsáveis pela ligação ao receptor e pela fusão de membrana, respectivamente. A clivagem do monômero entre S1 e S2 é o que representa a quebra da metaestabilidade quando a Spike não está em contato com a célula hospedeira. No domínio S1, têm-se o domínio N-terminal (NTD), o *receptor binding domain* (RBD), responsável pela interação com a célula hospedeira, bem como o *receptor binding motif* (RBM) que representa a porção que fica em contato físico com o receptor. O domínio S2 apresenta o peptídeo de fusão (FP) responsável por romper uma parte da membrana da célula hospedeira e conectá-la à membrana do vírus. Ainda no domínio S2, são encontrados os domínios de repetição de

heptal 1 e 2 (HR1 e HR2, respectivamente), que consistem em peptídeos que podem ser formados por diferentes resíduos de aminoácidos, mas possuem sempre as mesma características bioquímicas. Essas características são representadas na sequência consenso HPPHCPC, que deve ser interpretada conforme a **Tabela 1** (Huang *et al*, 2020).

Tabela 1. Legenda da sequência HPPHCPC em repetições de heptal (Huang *et al*, 2020)

| Letra | Representação de | Exemplos |
|-------|----------------------|---------------|
| H | Aminoácido apolar | Gli, Val, Leu |
| P | Aminoácido polar | Asn, Gln, Ser |
| C | Aminoácido carregado | Asp, Arg, Lis |

Essas repetições de heptal são responsáveis pela mudança conformacional que Spike passa quando entra em contato com seu receptor ACE2 (Huang *et al*, 2020).

1.4 A Enzima Conversora de Angiotensina II

A ACE2 é um componente regulatório do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS, sigla em inglês para *renin-angiotensin-aldosterone system*), que consiste em duas vias, e pode ser entendida como o principal ponto de reconhecimento celular para o vírus SARS-CoV-2 (Kuba *et al*, 2005).

Conforme demonstrado na **Figura 4**, a primeira reação do sistema RAAS consiste na ação da enzima conversora de angiotensina (ACE) convertendo angiotensina I (Ang I) em angiotensina II (Ang II), que age nos receptores de angiotensina tipo I (AT1R), induzindo ao aumento da pressão arterial por estimular vasoconstrição e reabsorção de sódio nos rins, além de estimular quimiocinas pró-inflamatórias pela promoção de disfunção endotelial (Garrido & Griendling, 2009).

O segundo componente, considerado contra-regulatório, é a ACE2, que possui cerca de 60% de homologia com a ACE (El Bekay *et al*, 2003) e age metabolizando Ang II em Ang (1-7), induzindo a redução da pressão arterial e a inflamação por meio da vasodilatação e atividade antiproliferativa. Além disso, a ACE2 também pode metabolizar Ang I em Ang (1-9), que é a forma inativa do peptídeo da angiotensina e pode ser convertida em Ang (1-7) novamente pela ACE (Garrido & Griendling, 2009).

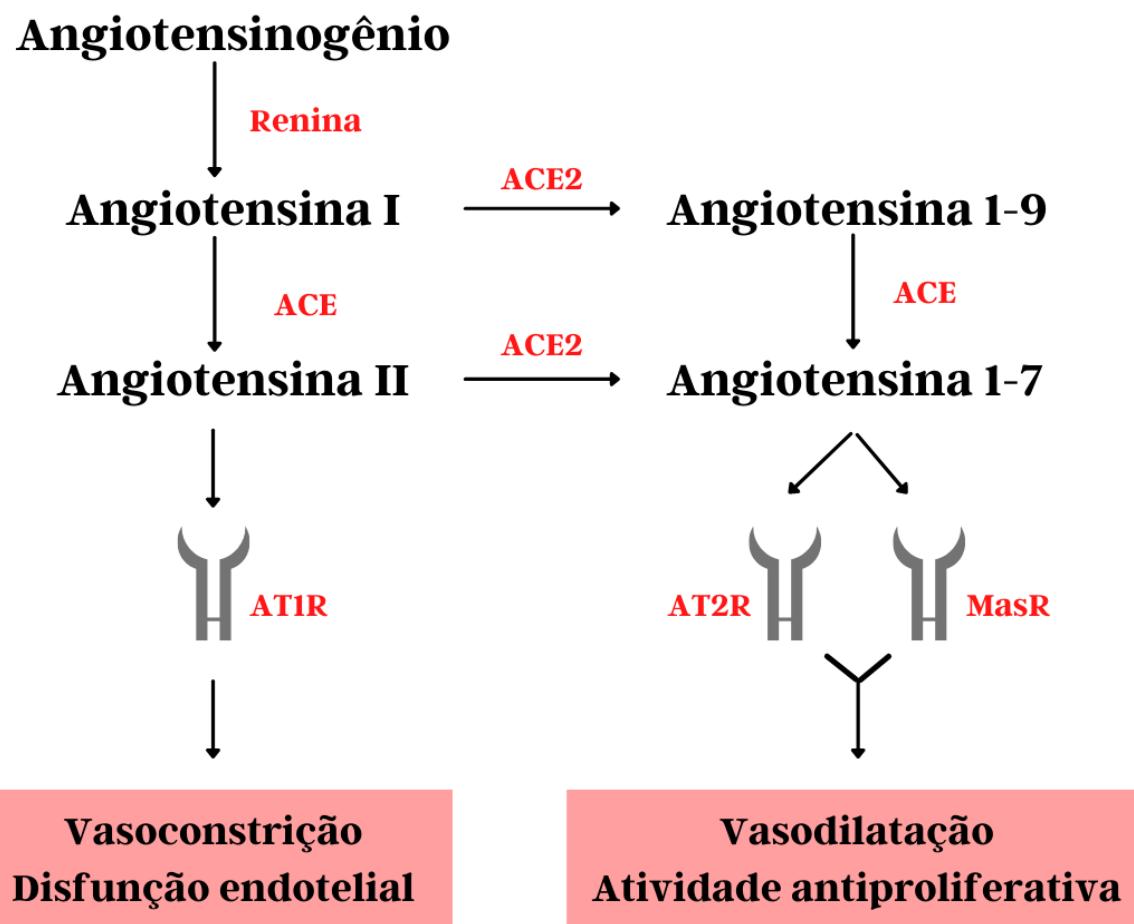


Figura 4. Estrutura esquemática do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, representando as funções desempenhadas pelas enzimas ACE e ACE2. Criado em Canva: <<https://www.canva.com/>>. Acesso em 22.10.2021 (Mirabito Colafella *et al*, 2019)

A ACE2 é expressa em diversos tecidos, principalmente no sistema gastrointestinal e renal (**Figura 5**), o que se explica pela sua função, visto que o controle volêmico é crucial para a manutenção da homeostase arterial (Kuba *et al*, 2005).

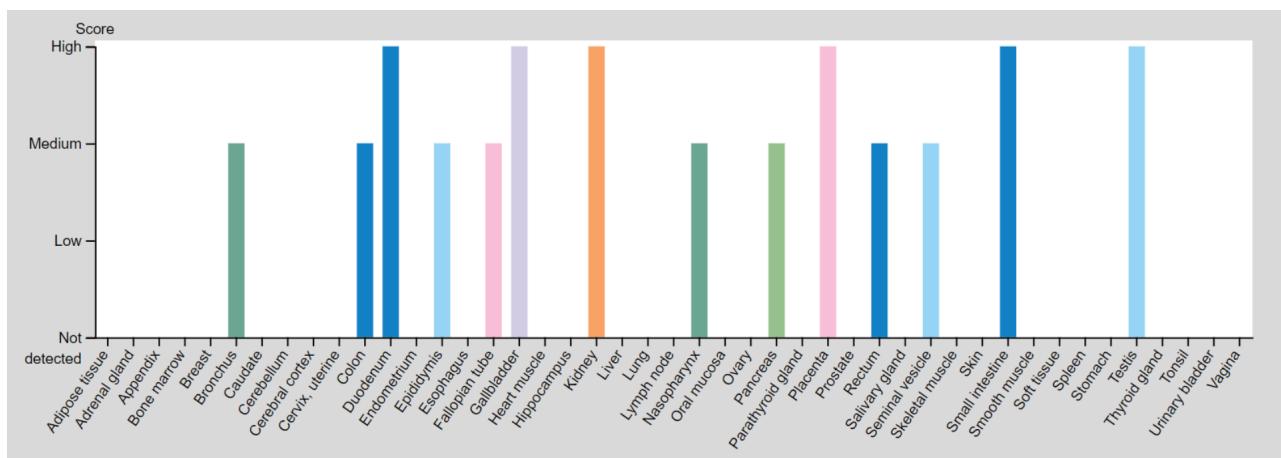


Figura 5. Expressão de ACE2 em tecidos humanos. Imagem obtida em Protein Atlas. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/>>. Acesso em 22.10.2021.

Também é possível observar uma expressão de nível médio nos brônquios e na nasofaringe, condizente com o ciclo de infecção do SARS-CoV-2, que utiliza a ACE2 como seu receptor. A infecção na nasofaringe garante que o vírus consiga ser expelido pelo hospedeiro por meio de tosse, espirro ou fala. Enquanto isso, a infecção nos brônquios induz o dano ao tecido pulmonar, levando o paciente infectado ao quadro de crise respiratória grave (Esakandari *et al*, 2020).

1.5 Interação entre proteína Spike e Enzima Conversora de Angiotensina II

1.5.1 Ligação do vírus com a célula hospedeira

A ligação do vírus SARS-CoV-2 através da proteína Spike à ACE2 ocorre especificamente pela porção RBD da proteína, e a partir desse contato, ocorre a clivagem da nos subdomínios S1 e S2. Então, o subdomínio S2 muda de conformação ao inserir o peptídeo de fusão (FP) na membrana da célula alvo, expondo a superhélice do domínio HR1 e permitindo que o mesmo interaja com H2R. Essa interação forma a estrutura 6-HB, que possui a forma de grampo e permite que o envelope viral se aproxime da membrana celular, sendo possível a fusão e entrada viral, como ilustrado na **Figura 6** (Xia *et al*, 2018).

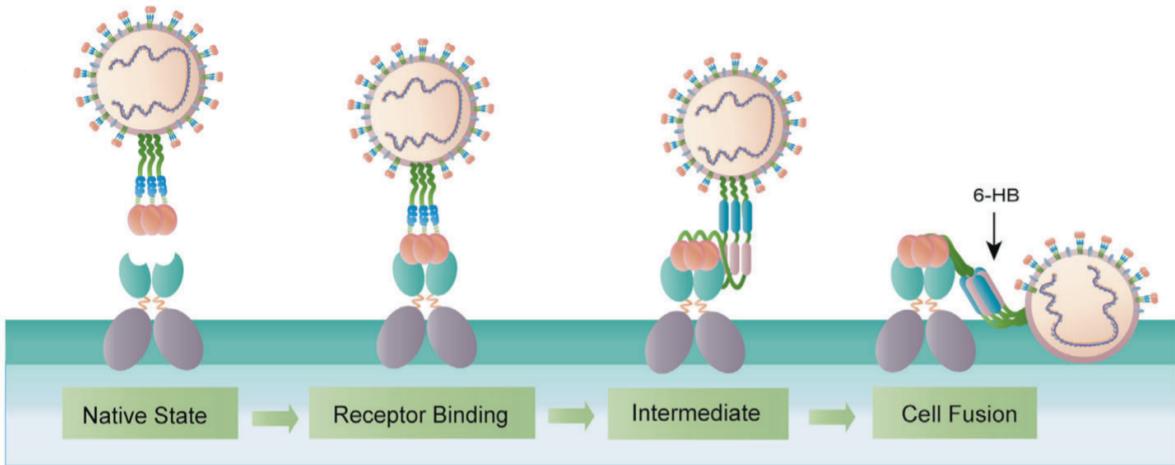


Figura 6. Interação entre o SARS-CoV-2 e seu receptor ACE2, com posterior fusão viral. (Modificada de Huang *et al.*, 2020).

_____ A fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula hospedeira culmina no enovelamento da porção RBM com o receptor ACE2, evento denominado *cradling* (Jun Lan *et al.*, 2020).

1.5.2 Diferenças entre SARS-CoV e SARS-CoV-2

A forma como a porção RBD interage com a ACE2 é a chave para elucidar o mecanismo pelo qual o vírus SARS-CoV-2 é mais eficiente em se replicar e ser transmitido do que o vírus SARS-CoV. A Figura 7 ilustra a interação entre ACE2 e as porções RBD da Spike de SARS-CoV e SARS-CoV2 observada por cristalografia de raios X.

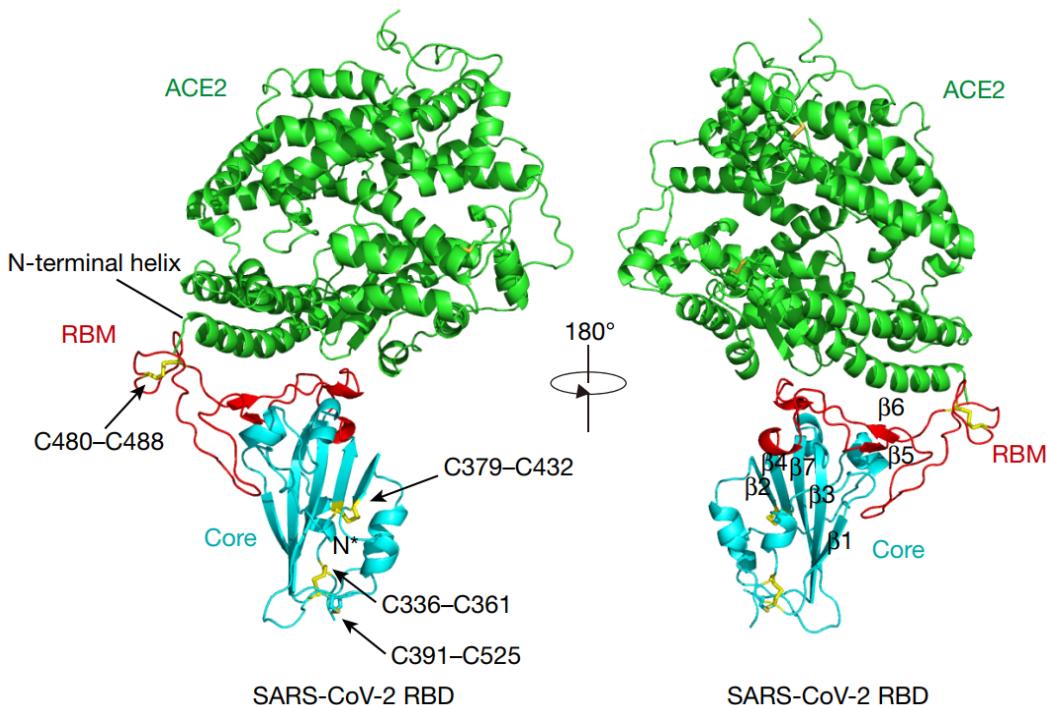


Figura 7. Imagem por cristalografia de raios X da estrutura molecular da interação entre a porção RBD do vírus SARS-CoV-2 e o receptor ACE2. (Jun Lan *et al*, 2020)

A porção RBD do SARS-CoV-2 possui cinco folhas beta anti-paralelas (β_1 , β_2 , β_3 , β_4 e β_7), conectadas por hélices e laços. Entre as folhas β_4 e β_7 , há uma extensão que compreende as folhas β_5 e β_6 , bem como as hélices α_4 e α_5 , que representa a porção RBM, responsável pelo contato físico e direto com a aminopeptidase N do receptor ACE2 (Jun Lan *et al*, 2020).

Estruturalmente, a interação com ACE2 dos vírus SARS-CoV e SARS-CoV-2 é praticamente idêntica, havendo algumas particularidades bioquímicas que explicam o mecanismo pelo qual SARS-CoV-2 é mais infectivo. A porção RBM de SARS-CoV possui 17 resíduos de aminoácidos em contato com a ACE2, enquanto o RBM de SARS-CoV-2, possui 16 resíduos. Ambos interagem com 17 aminoácidos da porção N-terminal do receptor ACE2. (Jun Lan *et al*, 2020).

Externo à sequência RBM de SARS-CoV-2, há um resíduo único de interação com o receptor ACE2 (Lys 417) que forma interações iônicas com Asp 30 de ACE2. No SARS-CoV-2, esta posição é substituída por um resíduo de valina que não participa na ligação ACE2, como demonstrado na **Figura 8** (Jun Lan *et al*, 2020).

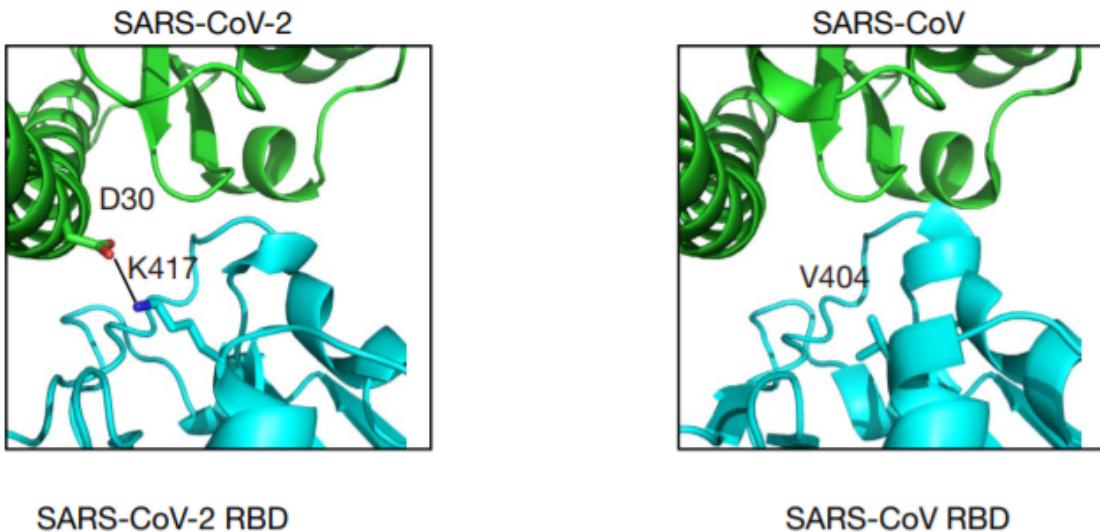


Figura 8. Substituição do resíduo de lisina na posição 417 do SARS-CoV-2 por um resíduo de valina na posição 404 do SARS-CoV. (Modificado de Jun Lan *et al*, 2020)

1.6 Variantes de destaque do SARS-CoV-2

Durante a progressão da pandemia de COVID-19, a alta taxa de mutação do gene S, codificador da proteína Spike, conferiu o surgimento de inúmeras variantes do vírus SARS-CoV-2. Quatro ganharam destaque mundial e instigaram maior preocupação da OMS, e estão listadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Variantes de destaque do vírus SARS-CoV-2 detectadas durante a pandemia da COVID-19 (OMS).

| Variante (OMS) | Linhagem | País de origem | Primeira detecção |
|----------------|-----------|----------------|-------------------|
| Alfa | B1.1.7 | Reino Unido | 07/02/2020 |
| Beta | B1.351 | África do Sul | 15/02/2020 |
| Delta | B.1.617.2 | Índia | 21/08/2020 |
| Gama | P.1 | Brasil | 11/09/2020 |

Para que seja considerada como uma variante, a nova cepa do vírus necessita apresentar uma das três características: maior transmissibilidade, escape da imunidade adquirida ou quadros clínicos mais graves da COVID-19 (OMS). A **Figura 9**, apresenta o local das mutações específicas à proteína Spike, presentes em muitas variantes. Destacadas em vermelho estão as mutações de maior notoriedade, que são as substituições D614G, N501Y e E484K.

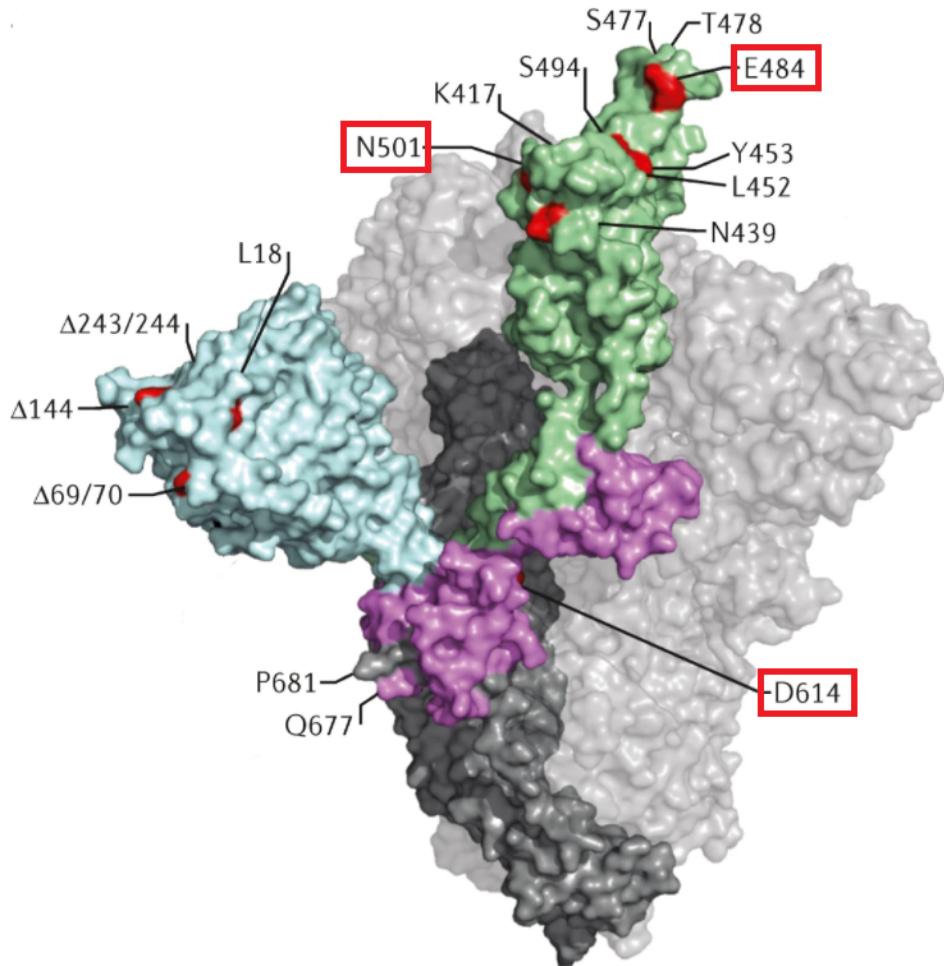


Figura 9. Localização das mutações da proteína Spike, indicando a porção RBD em verde, o domínio amino terminal em azul, o domínio carboxi terminal em roxo e a subunidade S2 em cinza escuro (Tao & Tzou, 2021).

A mutação D614G foi a mais prevalente no final de fevereiro de 2020 e, dentro de alguns meses, superou todos os vírus ancestrais e atingiu uma prevalência global de quase 100%. Essa mutação confere ao SARS-CoV-2 uma replicabilidade maior em células do trato respiratório superior, além de também possuir um papel disruptivo em alguns contatos interprotoméricos, o que favorece a posição aberta da porção RBD e, consequentemente, a ligação ao receptor ACE2 (Korber *et al*, 2020; Hou *et al*, 2020).

A mutação N501Y apresenta uma alta afinidade à ACE2 além de, assim como a D614G, maior taxa de replicação no trato respiratório superior. Já a mutação E484K possui uma característica específica, que é conferir ao vírus menor susceptibilidade aos anticorpos monoclonais, aumentando seu escape à resposta imune (Tada *et al*, 2021; Liu *et al*, 2021).

Todos estes detalhes moleculares e possibilidades de mutação do vírus mostram a importância do entendimento da relação estrutura-função das proteínas que participam da interface vírus-célula hospedeira. Com o avanço da compreensão das interações

SARS-CoV-2 com células humanas, pode-se criar, por exemplo, novas estratégias de inibição da infecção. Com a intenção de contribuir para o refinamento da compreensão das interações vírus-hospedeiro, apresentamos nas seções a seguir nosso estudo de descobrimento de novas potenciais interações do vírus com modelos de células epiteliais do sistema respiratório.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Identificar possíveis novas interações da proteína Spike de SARS-CoV-2 com outras proteínas da superfície de linhagens celulares derivadas de células do sistema respiratório, contribuindo para o entendimento de mecanismos que adicionais da infecção por SARS-CoV-2

2.2 Objetivos específicos

1. Desenhar e sintetizar peptídeo representativo do domínio RBD da proteína Spike responsável pela ligação com a célula hospedeira através da proteína ACE2;
2. Produzir extratos proteicos de culturas celulares enriquecidos em proteínas de membrana;
3. Desenvolver agentes para captura de proteínas ligantes ao peptídeo da proteína Spike;
4. Identificar as proteínas ligantes do peptídeo sintético de Spike através de espectrometria de massas.

Metodologia

3. Metodologia

3.1 Fluxograma da metodologia utilizada

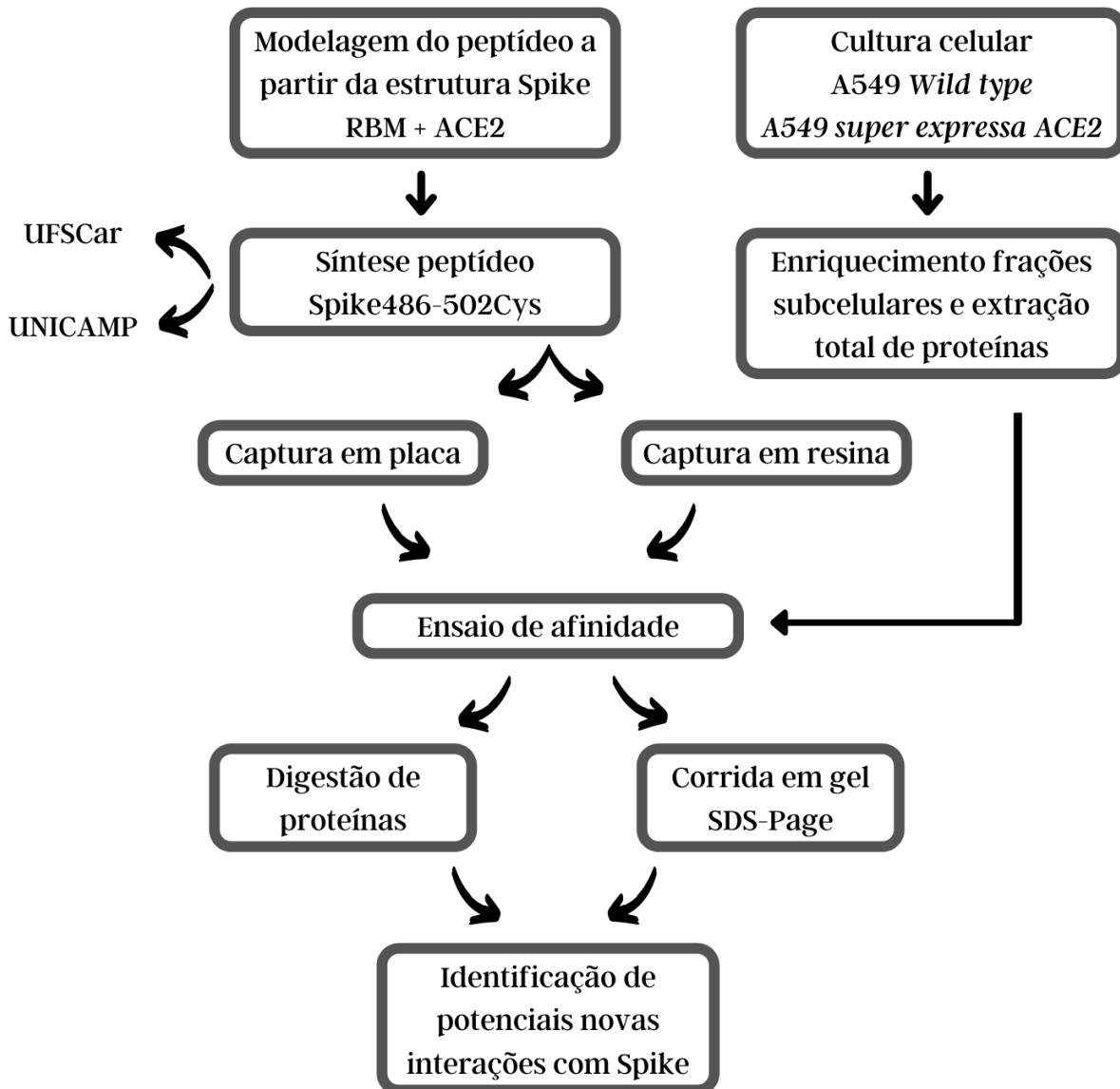


Figura 10. Fluxograma da metodologia utilizada.

3.2 Síntese de peptídeos

A síntese de peptídeos foi realizada utilizando a metodologia SPPS (síntese de peptídeos em fase sólida) utilizando-se o grupo Fmoc como protetor. A síntese se inicia com o acoplamento do primeiro aminoácido da cadeia nascente em um suporte polimérico insolúvel (Resina Wang ou Rink, *Sigma Aldrich*). Posteriormente, o primeiro aminoácido C-terminal ancorado é estendido no sentido N-terminal por uma série de ciclos de adição,

caracterizados por repetições de desbloqueio e acoplamento de novos Fmoc-aminoácidos. O peptídeo desenhado com base na estrutura tridimensional da proteína Spike, possui sequência NSYFPLQSYGFQPTNG, adicionando-se um resíduo do aminoácido cisteína na posição C-terminal para facilitar reações de acoplamento do peptídeo com outras biomoléculas ou suportes químicos. Este peptídeo foi denominado Spike487-502Cys. Este peptídeo foi sintetizado pela doutoranda Virgina Silvestrini e Prof. Eduardo Brandt de Oliveira. As etapas detalhadas que envolvem a síntese são descritas. Partindo-se de 100 µmol da resina de síntese Rink (*Rink Amide resin*, código 8.55001, Sigma-Aldrich), inicia-se a síntese pelo acoplamento do primeiro Fmoc-aminoácido.

3.2.1 Acoplamento de novo aminoácido

Todos os FMOC-aminoácidos foram utilizados em excesso molar de 2.5 vezes em relação à capacidade de ligação da resina para minimizar perdas ao longo das etapas. A reação adição de um novo aminoácido ao grupo amina desbloqueado foi realizada por meio das soluções de acoplamento Hbt/HBTU ou Hbt/DIC. A solução Hbt/HBTU (Hidroxibenzotriazol, cód.: 2592-95-2, *Advanced ChemTech*/Hexafluorofosfato Benzotriazol Tetrametil Urônio, cód.: 94790-37-1, *Advanced ChemTech*) é uma solução acopladora mais fraca e não induz racemização no peptídeo, sendo mais apropriado para ensaios biológicos. Para cada ensaio, foram adicionados 520µL de HObt/HBTU. Já Hbt/DIC (Hidroxibenzotriazol/ Diisopropilcarbodiimida, cód.: D125407, *Sigma Aldrich*) consiste em uma solução mais forte e, apesar da eficiência, pode induzir racemização do peptídeo, utilizada apenas quando o Hbt/HBTU não foi eficiente. Para tal, foram adicionados 168µL de Hbt diluído em NMP (Metilpirrolidona, cód: 328634, Merck), seguido de 38µL de DIC. As reações foram prosseguidas com 6 pulsos de micro-ondas, de 2 minutos cada, em potência mínima. Após as reações de acoplamento, foram realizados novamente testes com DIPEA e TNBS na proporção 1:1, conforme mencionado anteriormente. Se a resina apresentasse coloração inteiramente transparente, seguia-se com a etapa de desbloqueio.

3.2.2 Desbloqueio

Os aminoácidos utilizados possuem um grupo Fmoc (Fluorenilmetyl Carbonila) ligado à porção amina, que age como um protetor para que nenhuma reação química adicional aconteça. Foi realizado o desbloqueio da remoção do grupo Fmoc pela adição de 2mL de Piperidina 20% (Lote 13830/07, Cromoline Ltda.) em 3 ciclos seguidos, de 1, 3 e 7 minutos, com 1 pulso de micro-ondas de 1 minuto entre eles. Após o desbloqueio, a resina

presente no reator foi lavada com DMF (Dimetilformamida, cód.: D1009.01.BJ, *Synth*) e Metanol (cód.: 1.06009.1000, *Merck*).

Para checar se o desbloqueio foi bem sucedido, uma pequena quantidade de resina foi retirada do reator e adicionada a uma solução de DIPEA (Diisopropiletilamina, cód.: 7087-68-5, *Sigma Aldrich*) e TNBS (Ácido Trinitrobenzenosulfônico, cód.: 28997, *ThermoFisher*) em proporção 1:1. Se a resina apresentasse coloração inteiramente laranja, prosseguia-se a síntese adicionando o próximo aminoácido, já que o grupo Fmoc foi completamente removido.

3.2.3 Clivagem

Após a adição de todos os FMOC-aminoácidos constituintes do peptídeo, foi realizado o processo de clivagem, em que o peptídeo bruto foi removido da resina. A resina contendo a cadeia polipeptídica foi lavada com metanol e transferida para um tubo de ensaio. A solução de clivagem contendo ácido trifluoroacético (cód.: AT09865RA, Exodo Científica), 2,5% triisopropilsilano (cód.: 233781, *Merck*) e 2,5% ditiotreitol (cód.: D0632, *Sigma Aldrich*) foi adicionada ao peptídeo e deixado sob agitação por 1h30min. Após este processo, foram adicionados 10mL de dietil éter (cód.: #STBH4204, *Sigma Aldrich*) durante 30 minutos, para a precipitação. O peptídeo foi centrifugado durante 5 minutos, 300 rpm a 25°C, descartando todo o sobrenadante ao final. O ciclo de lavagem com 10mL de éter, precipitação e centrifugação foi repetido três vezes para evitar perda. Após esses três ciclos, o peptídeo foi liofilizado e iniciou-se o processo de purificação.

3.2.4 Purificação em cromatografia de fase reversa

A purificação foi realizada em coluna (Supelclean LC-18 SPE 3 mL, cód.: 57012, *Merck*), que foi equilibrada com metanol por capilaridade e posteriormente com soluções de diferentes concentrações de ACN (Acetonitrila, cód.: 100017, *Merck Millipore*). Então, o peptídeo liofilizado foi ressuspenso em 300µL de **solução B** (60% ACN) e 7mL de **solução A** (1% ACN). Com o peptídeo retido à coluna, foi adicionado 1,2 mL de solução A, que foi completamente eluída na coluna. Para eluição do peptídeo, foram adicionados 300µL de solução B, separada em 6 tubos *eppendorfs*. Por fim, foram realizados novamente testes com solução de DIPEA e TNBS para avaliar a presença do peptídeo.

3.3 Cultivo da linhagem celular A549

O cultivo celular foi realizado utilizando linhagem A549 (ATCC cód. CCL- 185), proveniente de adenocarcinoma de pulmão. Considerando o objetivo inicial de estudar interação de ACE2 com as proteínas virais, utilizamos células A549 transduzidas com vetor para superexpressão ACE2 (A549 +A) e também células selvagens (A549 WT). As células transduzidas foram cedidas pelo Prof. Thiago Mattar Cunha do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ambas linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning, cód.: 353136) contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco) com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico Estreptomicina/Penicilina, e mantidas à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) e as células foram expandidas a cada quatro dias, quando atingiam aproximadamente 90% de confluência. Para a expansão ou tripsinização, o meio de cultura foi removido e a camada celular aderente lavada cuidadosamente com 5mL de PBS. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C com 5mL de solução de tripsina-EDTA 1% (*Trypsin-EDTA Solution 10X*, cód.: T4174, Sigma Aldrich), até que perdessem total aderência à garrafa. Então, 10 mL de meio DMEM 10% SFB foi adicionado para inativação da tripsina devido ao SFB presente no meio de cultura. A solução celular foi transferida para um tubo *falcon* e centrifugada (*Centrifuge Sorvall ST 16R, Thermo Fisher*) a 1200 rpm, 4°C, por 5 minutos, com aceleração e desaceleração de 5m/s². O sedimento celular foi homogeneizado manualmente e ressuspenso em meio DMEM 10% SFB. Uma alíquota foi adicionada à garrafa de 75cm², originando uma nova passagem da linhagem celular.

Para ensaios posteriores, 1 milhão de células foram cultivadas em placas de petri de 58,1 cm² (Corning, cód.: 353003). Todos os experimentos de manutenção e cultivo das linhagens foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos recomendados pela ATCC para manter a esterilidade dos materiais, reagentes e meio de cultura utilizados. Após 4 dias as células foram retiradas da cultura para extração de proteínas. Para isso, as placas foram lavadas duas vezes com PBS gelado e também raspadas com 1mL de PBS gelado. Foi realizada a centrifugação a 500xg e 4°C, por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado, armazenando o pellet em *freezer* -20°C.

3.4 Extração total de proteínas das células A549

Para extração total de proteínas, os *pellets* celulares foram ressuspensos em tampão Ureia 8M e foram realizados três ciclos de sonicação em sonicador de banho a 45W por 5 minutos cada (*Unique Ultracleaner 1600*), intercalando-se com agitação em vortex (*BR-2000 Vortexer Bio-Rad*) por 2 minutos, e resfriamento da amostra em banho de gelo. Ao final dos ciclos, as amostras foram centrifugadas a 20.000 xg, por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e quantificado através do método de Bradford (Quick Start Bradford Kit, Biorad), de acordo com as instruções do fabricante.

3.5 Produção de frações enriquecidas

O enriquecimento foi realizado após o *pellet* celular ser ressuspensido em Tampão hipotônico (50mM HEPES 10mM NaCl 5mM MgCl₂, 0,1mM EDTA, pH 7,4) suplementado com 1% inibidor de protease e 2% de inibidor de fosfatase. Posteriormente, as células foram passadas 20 vezes por seringas (*Plastipak Luer Slip 1mL*, BD Sciences) equipadas com agulha (*PrecisionGlide*, BD Sciences) para romper a membrana plasmática e homogeneizadas (*Dispensor IKA ULTRA TURRAX T10*, BioVera) por 30 segundos. A solução foi centrifugada a 500xg, 4°C, por 30 minutos, com aceleração em 1m/s² e desaceleração em 0m/s². O protocolo realizado com o pellet está no item **a**, e o protocolo realizado com o sobrenadante está no item **b**:

- a) O pellet foi ressuspensido em Tampão 8M Ureia 4% CHAPS e submetido à três ciclos de agitação em vortex por 20 segundos, intercalando-se com sonicação em sonicador de banho a 45W por 5 minutos cada e resfriamento em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 20,000xg, 4°C, por 30 minutos, com aceleração e desaceleração em 9m/s². O pellet foi descartado e o sobrenadante, contendo a **Fração Nuclear**, foi armazenado a -4°C.
- b) A amostra foi novamente centrifugada a 16,000xg, 4°C, por 20 minutos, com aceleração em 9m/s² e desaceleração em 5m/s², obtendo-se a **Fração Citoplasmática no sobrenadante**. O pellet foi ressuspensido em Tampão 25mM MES 150mM NaCl 2% Triton (pH 6,5), congelado em nitrogênio líquido e mantido em banho de gelo até descongelar por completo. Após o descongelamento, a amostra foi mantida mais 30 minutos em banho de gelo, com agitação em vortex a cada 5 minutos. Por fim, a amostra foi centrifugada a 16,000xg, 4°C, por 20 minutos, com aceleração em 9m/s² e desaceleração em 5m/s², e o sobrenadante, contendo a **Fração de Membrana**, foi armazenado a -4°C.

3.6 Quantificação método Bradford

Para realização de quantificação de proteínas, foi utilizado o método Bradford, por meio do kit *Bio-Rad Protein Assay I* (cód.: #5000001, *Bio-Rad*). Como forma de checar a confiabilidade dos resultados, todos os experimentos foram realizados a partir de uma curva padrão com diferentes concentrações de Albumina de Soro Bovino (BSA): 0; 0,025; 0,05; 0,075 e 1 µg/µL. As amostras foram diluídas de 20 a 200 vezes, a depender da concentração celular inicial.

Para a análise, foram utilizados 200µL de reagente Bradford, em todas as amostras dispostas em placas de 96 poços (*Costar 96-Well Flat-Bottom EIA Plate*, cód.: #2240096, *Bio-Rad*). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (*Microplate Spectrophotometer xMark, Bio Rad*), com comprimento de onda de 595 nm.

3.7 SDS-PAGE e *Western Blotting*

Aliquotas das amostras celulares contendo 50 µg de proteínas totais foram misturadas com tampão da amostra em proporção 1:5 (Tris-HCL 0.5M pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 1,25% (v/v), B-mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0.1% (p/v). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C, por 5 minutos, a 300 rpm, em banho seco (*ThermoMixer C, Eppendorf*).

3.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi realizado segundo *Laemmli* (1970). A eletroforese foi desenvolvida sob corrente de 90V nos primeiros 20 minutos com posterior alteração para 110V durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos, em sistema de eletroforese vertical (*PowerPac Basic Power Supply* e *MiniPROTEAN TetraVertical cell*, ambos *Bio-Rad*). Em todas as análises, foram utilizados um padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards #1610373, Bio-Rad*) e um padrão biotinilado (*Biotinylated Protein Ladder Detection #7727, Cell Signaling*) para controle.

3.7.2 *Western Blotting* Submarino

Para o ensaio de *western blotting* submarino, foi utilizado membrana de PVDF (cód.: 10600023, *Hybond-P, GE Healthcare*) previamente ativada com metanol durante 5 minutos. Posteriormente, as proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para a membrana,

e foi realizada a transferência em tampão 10% TRIS-glicina 20% metanol, por 1 hora, 100 V, 300 mA a 4°C.

3.7.3 Western Blotting Semi-seco

Para o ensaio de *western blotting* semi-seco, as proteínas separadas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (cód.: RPN 3032D, *Hybond-P*, *GE Healthcare*). A transferência prosseguiu-se em Tampão Tris Glicina, 10% SDS 20% Metanol, no aparelho *Trans-Blot Turbo Transfer System* (cód.: 1704150, *Bio Rad*), durante 40 min a 25V.

3.7.4 Bloqueio de Sítios Inespecíficos e Incubação de Anticorpos

Para bloquear sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%, 30 pH 7,6 (TBS-T) contendo 3% (m/v) de BSA durante 1 hora. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários de interesse, *overnight* a 4°C, sob agitação, seguindo as instruções do fabricante (**Tabela 1**). Após o tempo estabelecido, a membrana foi cuidadosamente lavada 3 vezes por 10 minutos com TBS-T. Prosseguiu-se com a marcação de anticorpos secundários durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. A detecção foi realizada o kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagents* (GE HealthCare), de acordo com as instruções do fabricante e reveladas em fotodocumentador imagens luminescentes (*ChemiDoc XRS+*, *Bio Rad*).

Tabela 3. Lista de anticorpos utilizados para técnica de *Western Blotting*: proteína, peso molecular, espécie, diluição, fabricante e código.

| Proteína | Peso Molecular | Espécie | Diluição | Fabricante e código |
|------------|----------------|---------|----------|--------------------------------|
| ACE2 | 120 kDa | Coelho | 1:2000 | <i>abcam</i> #ab15348 |
| GAPDH | 38 kDa | Coelho | 1:1000 | <i>Cell Signaling</i> #2118 |
| Histona H3 | 17 kDa | Coelho | 1:2000 | <i>Cell Signaling</i> #4499 |
| Lyn | 58 kDa | Coelho | 1:1000 | <i>Cell Signaling</i> #2796 |

3.8 Quantificação de Imagens de *Western Blotting* por Image J

O programa Image J, desenvolvido pelo *National Institute of Health (NIH)*, versão Java 1.8.0_172 para Windows 64 bit, seguindo as instruções do desenvolvedor, foi utilizado para análise quantitativa das marcações dos anticorpos.

3.9 Quantificação de peptídeos por reagente OPA

Para quantificação de peptídeos e/ou aminoácidos, foi utilizado o reagente OPA (*OPA amine detection reagent*, código 02727A, Interchim) para detecção de aminas livres que possui um espectro de detecção entre 1-50 μ g/mL quando utilizada por fluorescência.

Curvas de calibração foram obtidas com concentrações de glicina na faixa de 0 - 0,5mM. A solução de trabalho com o reagente OPA foi preparada conforme orientações do fabricante, então foi adicionada às amostras a serem quantificadas na proporção 1:100, e posteriormente medidas por fluorescência com excitação a 340nm e leitura a 455nm.

3.10 Quantificação de peptídeos pelo sistema Qubit.

Para a quantificação de peptídeos com o sistema de fluorimetria Qubit (*Qubit 4 Fluorometer*, código Q33238, Thermo Scientific), foram adicionados 10 μ L de amostra a ser quantificado a 190 μ L da solução de trabalho (*Qubit Protein Assay Kit*, código Q33211, Invitrogen) do kit, que foram incubados por 15 minutos e, após, tiveram a fluorescência lida no sistema.

3.11 Desenvolvimento de agentes de captura com o peptídeo Spike487-502Cys

3.11.1 Captura de peptídeo em placa de sulfidrila

Para a imobilização e estudo da ligação de peptídeos com proteínas das frações celulares foram utilizadas placas de 96 poços contendo grupos reativos com sulfidrilas (*Corning 96 Well Sulfhydryl-BIND™*, código: CLS2509, Merck). Em cada poço, foram adicionados 20 μ g do peptídeo Spike487-502Cys diluído em PBS e deixado sob agitação overnight, a 4°C. No dia seguinte, o resíduo da interação foi removido e cada poço foi lavado 3 vezes com 200 μ L de PBS. Posteriormente, foram adicionadas 50ug de frações de citoplasma e membrana, diluídas em PBS com volume final de 200 μ L. A placa foi deixada sob agitação overnight a 4°C. Após essa etapa, o resíduo da interação foi removido e foi realizada a digestão de proteínas, seguida da purificação. Em cada poço contendo o peptídeo ligado à amostra, foram adicionados 50 μ L de Tampão Tris 0.1M/ Ureia 8M e as amostras

foram mantidas sob agitação por 1 hora, a 25°C. Esta solução proteica foi submetida a eletroforese em gel de SDS-PAGE ou preparada para análise por espectrometria de massas.

3.11.2 Captura de peptídeo em resina

Para esse experimento, foi utilizada uma resina com grupos iodoacetil para captura do peptídeo com grupo sulfidrila (*SulfoLink Coupling Resin*, cód.: 20401, ThermoFisher), na proporção de 1:1. Para permitir que o peptídeo Spike487-502Cys fosse imobilizado, foi feita a redução dos grupos -SH com TCEP (código VB1000, Promega) em concentração 25mM, por 30 minutos, a 25°C.

A coluna formada pela compactação da resina foi equilibrada com 4mL de tampão 50mM Tris, 5mM EDTA-Na, pH 8.5. Após, foi feito o bloqueio de interações inespecíficas por meio de incubação com 2mL de solução de cisteína por 15 minutos, a 25°C e 600 rpm. Ao fim dos 15 minutos, foram contabilizados mais 30 minutos da solução em repouso, também a 25°C. Em seguida, a resina foi lavada com 12 mL de tampão NaCl 1M.

Para o ensaio de afinidade, as resinas foram condicionadas com 3mL de tampão PBS 0,1% Tween, e em seguida, 200µg das amostras celulares A549 WT e A549 +A (Extrato total de proteínas e frações de citoplasma, núcleo e membrana) foram adicionadas. O ensaio de afinidade foi feito *overnight*, com agitação a 600 rpm e a 25°C.

As alíquotas de interação entre as amostras e o peptídeo Spike487-502Cys foram obtidas de duas formas distintas ao longo deste estudo, descritas abaixo.

- a) Eluição em glicina: As alíquotas foram eluídas em uma solução de glicina 0.2 M, em 4 etapas de 1 mL cada, em que foram posteriormente secas em concentradores de vácuo. O pellet foi ressuspêndido em tampão de amostra, aquecido a 100°C, por 5 minutos, a 300 rpm, em banho seco e adicionado ao gel SDS-PAGE.
- b) Tampão de Amostra: As alíquotas foram removidas da resina mediante adição direta do tampão de amostra e aquecimento a 100°C por 5 minutos sob agitação de 300 rpm. As amostras foram rapidamente centrifugadas para que a resina se depositasse no fundo, e o sobrenadante contendo as alíquotas de interação foi removido e adicionado ao gel SDS-PAGE.

3.12 Preparo de amostras para análise por espectrometria de massas

As amostras de proteína obtidas dos experimentos de interação com o peptídeo imobilizado em placa foram recuperadas pela adição de Tampão Ureia 8M e transferidas para

tubos *eppendorf*. Foram adicionados 150 µg de Ditiotreitol (DTT) diluídos em Tampão Tris 0.1M/ Ureia 8M e as amostras mantidas a 37°C, 450 rpm, por 1 hora. Foi adicionado 450 µg de Iodocetamida (IAA, *cód.*: #H1149, Sigma Aldrich) diluído em Tampão Tris 0.2M durante 1 hora. Em seguida, a solução foi diluída em Tris 0.1M para diluição da ureia a 0,5 M. Foi adicionado 6 µg de Tripsina (*Sequencing Grade Trypsin*, *cód.*: #V5113, Promega) e a solução foi mantida em agitação de 450 rpm, a 37°C, por 18 horas. Ao fim, foram adicionados 45 µL de ácido acético 20% em cada amostra.

A purificação de peptídeos foi realizada por meio do método *Stage Tip*, em que foram utilizados discos (3MEmpore C18 Extraction Disks, *cód.*: 14-386-2, ThermoFisher) e suspensão de resina Oasis em ACN. A coluna foi condicionada com 50 µL de ACN e equilibrada com 100 µL de solução 2% ACN e 1% Ácido Fórmico. Posteriormente, a coluna foi lavada duas vezes com 100 µL de solução de 2% ACN e 0.1% ácido fórmico. A amostra foi eluída em 50 µL de solução 50% ACN e 0.1% ácido fórmico e seca em *speedvac* para posterior análise por espectrometria de massas em laboratório externo.

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

4.1 Desenho e síntese de peptídeo da Spike para captura de novos alvos de superfície celular

Em março de 2020, a estrutura da proteína Spike ligada à ACE2 - porção RBM - foi elucidada no trabalho de Shang *et al* (2020). A interface de interação entre as proteínas é representada na **Figura 11** abaixo.

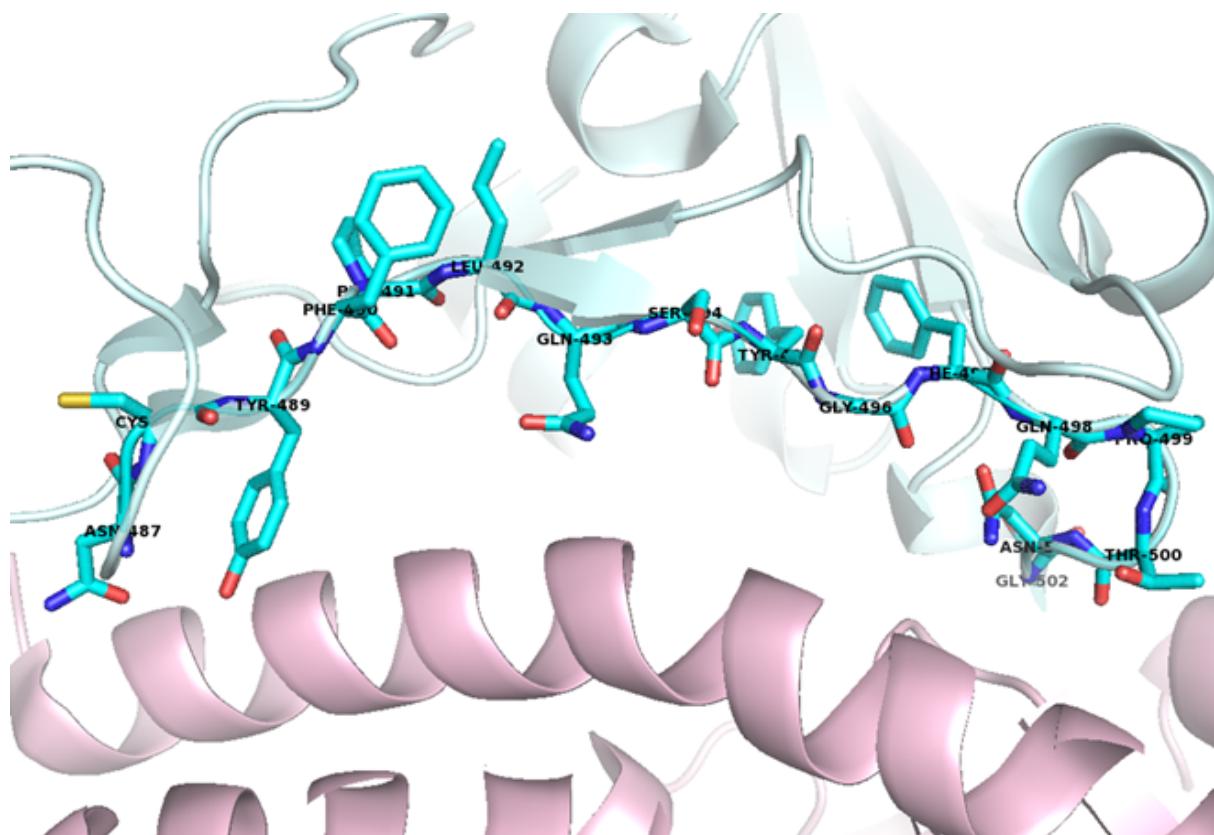


Figura 11. Região de contato da porção RBM da proteína Spike com o receptor ACE2. (Adaptado de Shang *et al*, 2020).

É possível observar que o segmento da proteína Spike é linear e não estruturado, o que nos abriu a possibilidade de sintetizar esse peptídeo em laboratório, conforme descrito no item 3.3, sugerindo um maior grau de fidelidade bioquímica nas interações com amostras celulares. A sequência final do peptídeo desenhado foi NSYFPLQSYGFQPTNG, nomeado peptídeo Spike487-502Cys, com um resíduo de cisteína adicional na porção C-terminal para que fosse possível a realização de experimentos de imobilização. Também foi feita a substituição do resíduo original de cisteína na posição 488 por uma serina, a fim de minimizar possíveis pontes dissulfeto, mas mantendo a característica hidrofílica da região.

Após a síntese, clivagem para remoção da resina e purificação, o peptídeo foi analisado por espectrometria de massas acoplado a cromatografia líquida (LC-MS/MS), e na **Figura 12** é ilustrado o espectro obtido por essa análise.

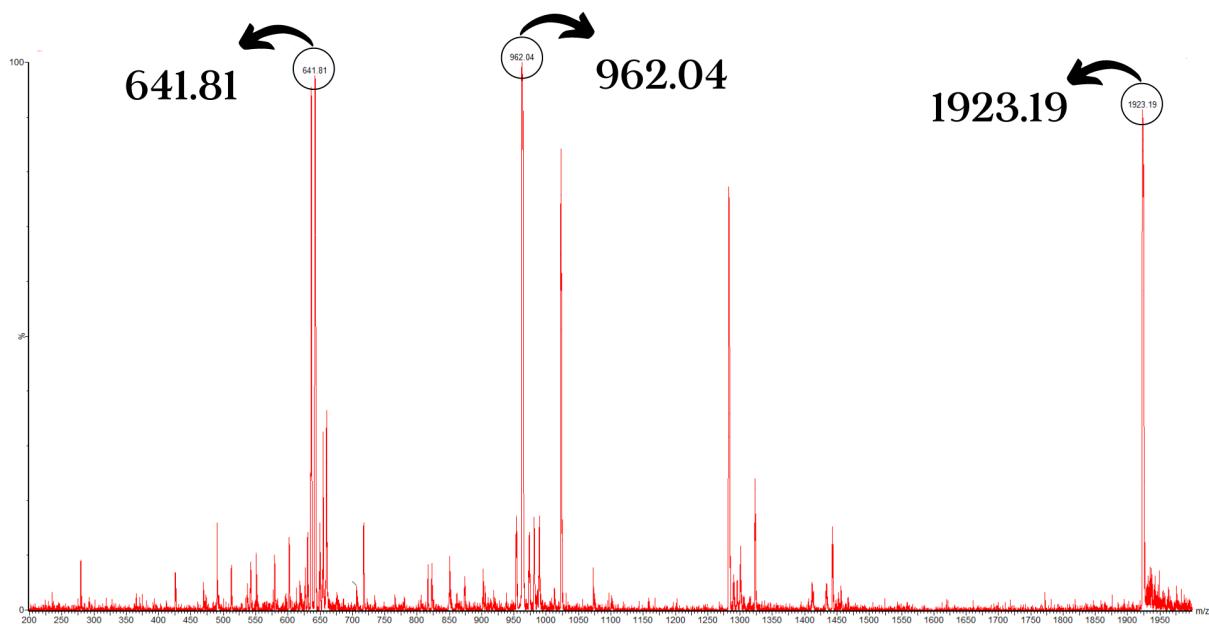


Figura 12. Espectro de massa do peptídeo Spike487-502Cys. O espectro foi obtido em instrumento com ionização eletrospray que induz a formação de íons com múltiplas cargas, acoplado a cromatografia líquida de fase reversa em coluna C18. Foram injetados no sistema aproximadamente 500ng do peptídeo sintético. As condições de análises utilizadas estão descritas em Lanfredi e Cols, 2021.

O peso molecular final do peptídeo foi calculado em 1922 g/mol, e os picos da imagem acima representam a eluição do peptídeo, que ocorreu após aproximadamente 7 minutos de retenção no cromatograma. Observando no espectro, o peptídeo foi detectado com cargas 1, 2 e 3 por se tratar de uma técnica por eletrospray, que confere múltiplas cargas aos peptídeos.

Após todas as etapas pós-síntese e a confirmação da qualidade do peptídeo, estimamos um rendimento geral da síntese de 40%, tendo obtido uma massa final de 36mg do peptídeo. Alíquotas da mesma preparação foram utilizadas para todos os experimentos aqui descritos. Amostras do mesmo também foram enviadas para diversos grupos de pesquisa, auxiliando em estudos de detecção, inativação e imunização contra o SARS-CoV-2. Um desses estudos é o que foi realizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar),

que desenvolveu um sensor patenteado capaz de detectar a presença da proteína Spike na saliva de pacientes (FAPESP, 2021).

Também, o peptídeo Spike487-502Cys foi utilizado no trabalho realizado no departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia da Universidade de Campinas (UNICAMP), sob comando do Prof. Dr. Alessandro S. Farias, em que foi estudada a interação entre a proteína Spike e CD4 na infecção de linfócitos *T helper* na COVID-19 (Davanzo *et al.*, 2020).

4.2 Escolha da linhagem A549

Como citado no item 3.4, a linhagem celular utilizada no desenvolvimento desse projeto foi A549, proveniente de adenocarcinoma de pulmão. A escolha teve como base a possibilidade de novas descobertas que os resultados poderiam fornecer, por se tratar de células presentes na porção apical dos alvéolos pulmonares, que geralmente são as estruturas afetadas de forma mais grave na COVID-19 (Giard *et al.*, 1973). Também, trata-se de uma linhagem tumoral, o que nos garantiu alto crescimento, reproduzibilidade e possibilidade de obtenção de grandes quantidades de extratos proteicos para os estudos de interação.

Outro importante fator considerado foi que o trabalho de Veras *et al.* (2020) demonstrou a diferença na resposta imunológica no pulmão de pacientes que vieram a óbito, comparando aqueles que não foram infectados pelo SARS-CoV-2 com os que portavam o vírus (Veras *et al.*, 2020). Na **Figura 13**, têm-se a microscopia confocal desses tecidos com a marcação de moléculas de interesse para o estudo.

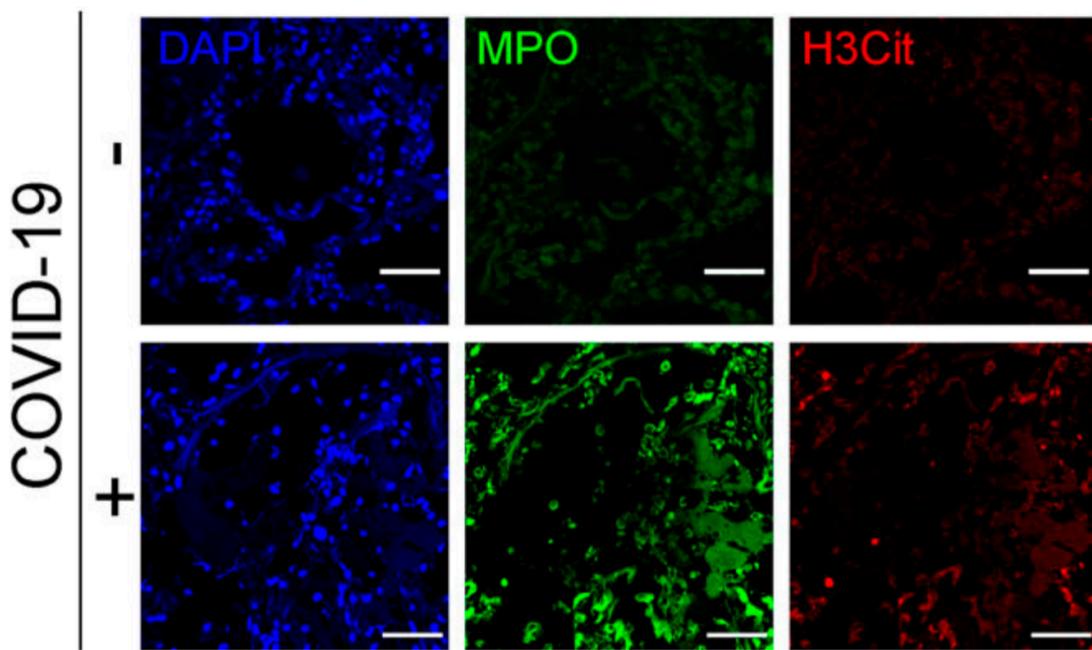


Figura 13. Microscopia confocal de tecido pulmonar de autópsia de indivíduos positivos (+) e negativos (-) para COVID-19. Na cor azul, têm-se a marcação de DAPI, na cor verde a marcação de mieloperoxidase (MPO) e na cor vermelha a marcação de histona H3 citrulinada (H3Cit) (Reproduzido de Veras *et al*, 2020).

É possível notar que a marcação de DNA por DAPI difere pouco entre as amostras pois evidencia as células pulmonares (Weber *et al*, 2006). Já MPO e H3Cit são marcadores importantes da atividade do sistema imunológico na região, observando-se uma grande diferença entre as amostras, visto que a amostra positiva possui grande volume de marcação, e esse resultado leva à conclusão de que há infecção por SARS-CoV-2 nos pulmões (Veras *et al*, 2020).

Adicionalmente, foram fornecidas pelo professor Thiago Mattar Cunha, membro do CRID (*Center for Research in Inflammatory Diseases*), algumas alíquotas da linhagem A549 com super expressão de ACE2, e essas células foram utilizadas como potencial controle positivo para identificação de interações com o peptídeo Spike487-502Cys em todos os experimentos.

4.3 Fracionamento para enriquecimento de fração de membrana

Para obtenção da fração enriquecida em proteínas de membrana das linhagens A549 *Wild Type* (WT) e A549 com superexpressão ACE2 (+A), primeiramente foi realizada uma técnica simples, baseada em protocolo de centrifugação diferencial. Contudo, esse protocolo não se mostrou adequado para nossos objetivos, visto que o enriquecimento de proteínas de

diferentes compartimentos celulares não foi específico entre as frações quando avaliado pela técnica *Western Blotting*.

Então, utilizamos uma técnica baseada em solubilização diferencial em detergente. A técnica é descrita no trabalho de Thomé *et al* (2012), que foi formulada para a obtenção de balsas lipídicas em células derivadas de leucemia promielocítica aguda. O protocolo descrito em 3.5 detalha essa técnica com as adaptações que foram necessárias para nossos objetivos.

Com esse novo protocolo, foi possível obter uma melhor distribuição de proteínas entre as frações conforme quantificação pelo método Bradford, demonstrada na **Tabela 4**.

Tabela 4. Quantificação pelo método Bradford das frações enriquecidas de ambas linhagens celulares, obtidas pelo protocolo 3.5. Partiu-se de um extrato total de proteínas contendo 1.10^8 células, que rendeu um total de 2,5 mg de proteínas, por linhagem.

| Linhagem A549 | Fração | Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) |
|-------------------------------|------------|--|
| <i>Wild Type</i> (WT) | Núcleo | 3,1 |
| | Citoplasma | 1,3 |
| | Membrana | 1,8 |
| Superexpressando ACE2 (+A) | Núcleo | 4,2 |
| | Citoplasma | 1,8 |
| | Membrana | 2,2 |

Para confirmação final de que a técnica estava realmente adequada aos nossos objetivos, foi realizada a marcação das proteínas histona H3, GAPDH, Lyn e ACE2 por *Western Blotting*. A proteína histona H3 foi utilizada para marcar frações de núcleo, visto que representa uma das principais estruturas formadoras da cromatina de células eucarióticas (Bhasin *et al*, 2006). Já a proteína GAPDH foi utilizada como controle da qualidade do método, por se tratar de uma proteína constitutiva e presente principalmente no citoplasma celular (Tristan *et al*, 2011). Por fim, a proteína Lyn nos serviu como marcadora de fração de membrana, pois é uma proteína associada à membrana, responsável por desencadear eventos de cascata celular como a ativação de fosfatas SHIP-1 e SHP-1 (Yamanashi *et al*, 1987). A marcação de ACE2 foi realizada para confirmar a superexpressão do receptor na linhagem A549 +A.

Na **Figura 14**, têm-se as marcações das proteínas citadas acima, realizadas em membrana de PVDF, com os anticorpos citados na **Tabela 3**.

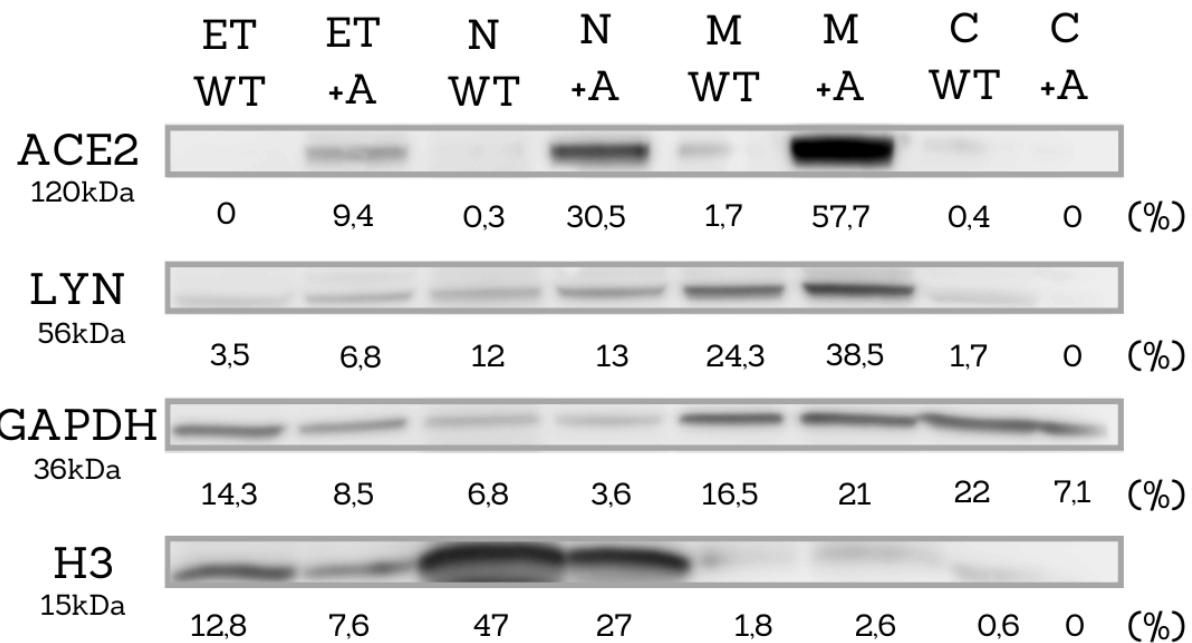


Figura 14. *Western blotting* das proteínas e quantificação por Image J das bandas de ACE2, LYN, GAPDH e Histona H3. Fração citoplasmática (C), núcleo (N), membrana (M), extrato total (ET), linhagem A549 Wild Type (WT) e linhagem A549 superexpressando com ACE2 (+A). Os valores indicados sobre cada banda representam a quantificação da intensidade relativa utilizando-se o software Image J.

Após observar a clara diferença de marcação de todas as proteínas entre as frações analisadas, realizamos a quantificação das bandas pelo *software* Image J, seguindo as orientações do desenvolvedor.

Na **Figura 14**, também foi possível quantificar aproximadamente como as proteínas de interesse estão distribuídas em porcentagem entre as amostras analisadas, e assim avaliar a eficiência do enriquecimento subcelular. No caso da proteína Lyn, as maiores porcentagens localizam-se na fração de membrana, enquanto a marcação de Histona H3 é mais presente em frações nucleares, confirmando que o método de enriquecimento nos forneceu os resultados esperados. Com isso, foi dado prosseguimento na elaboração de estratégias de estudo da interação do peptídeo Spike487-502Cys com frações enriquecidas das células.

4.4 Desenvolvimento de estratégias para captura de novas proteínas que interagem com o peptídeo Spike487-502Cys

a) Captura em placa

A primeira estratégia de captura do peptídeo Spike487-502Cys foi baseada em placas de 96 poços pré-tratados com maleimida no fundo de cada poço, como descrito no item **3.11.1**, permitindo a reação com o grupo sulfidrila no aminoácido C-terminal (cisteína) do

peptídeo. Como demonstrado na **Figura 15**, o peptídeo foi imobilizado e em seguida foram adicionadas alíquotas de fração enriquecida de membrana das linhagens A549 *WT* e A549 +A.

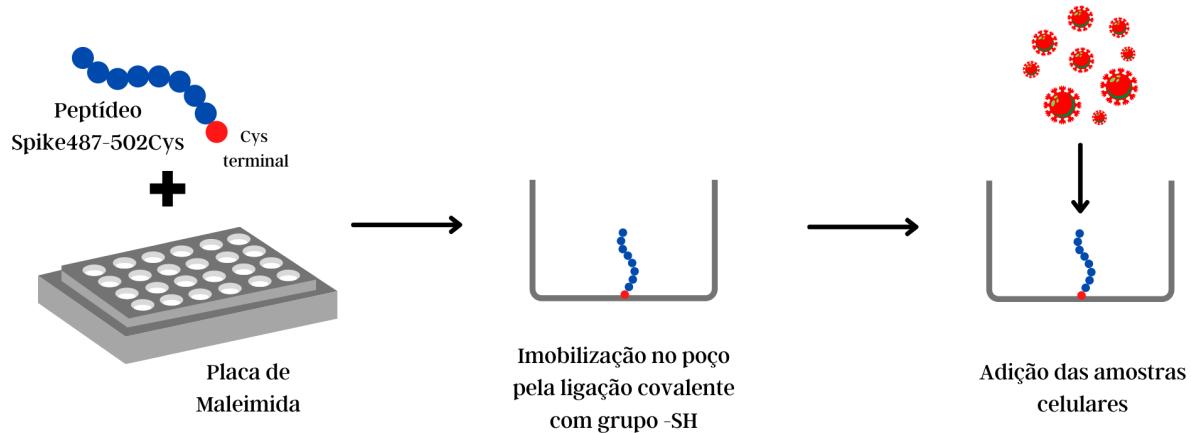


Figura 15. Representação esquemática da metodologia utilizada para captura do peptídeo Spike487-502Cys.
Criada em Canva: <<https://canva.com/>>. Acesso em 11/11/2021.

Inicialmente, esse método foi escolhido para capturar o peptídeo Spike487-502Cys porque representaria uma estratégia simples e de larga escala no estudo de quais moléculas interagiam com o mesmo, por exemplo para avaliar múltiplas amostras em paralelo. Contudo, um dos desafios técnicos foi certificar a imobilização do peptídeo na placa, o que foi primeiramente sanado com a implementação da quantificação com o reagente OPA, conforme protocolo descrito em 3.9, por se tratar de um método sensível de detecção de aminas. Desta forma foi estimado que aproximadamente 4 µg do peptídeo foi imobilizado em cada poço da placa.

A partir da placa pronta, 50 µg de cada extrato enriquecido em proteínas de membrana (A549 *Wild Type* e A549 superexpressando ACE2) foram incubados em cada poço. Dada a pequena quantidade de proteínas capturada (abaixo do limite de detecção do método de Bradford), partiu-se para o processo de identificação das proteínas ligadas na placa por espectrometria de massas, precedido de digestão enzimática, descrita no tópico 3.12. A coleta dos dados foi realizada em laboratório no exterior e os dados foram processados localmente.

As proteínas identificadas nas frações enriquecidas de membrana das linhagens A549 *WT* e A549 +A são apresentadas a seguir, nas **Tabelas 5 e 6**. Primeiramente nota-se que para a grande maioria das proteínas identificadas, foram obtidos um baixo número de peptídeos, o que indica a baixa abundância na amostra, mas também, uma confiabilidade limitada nos

resultados. Interessante destacar que várias proteínas de membrana (ex. receptores) foram identificadas para ambas as amostras. Também chama atenção o fato de que a proteína ACE2 não encontra-se na lista para a amostra proveniente da linhagem A549 +A. Isto provavelmente se deve à baixa quantidade de proteínas recuperada do experimento. Considerando a qualidade limitada desses resultados, partimos para outra estratégia de captura de interações por cromatografia de afinidade, conforme descrito na seção seguinte.

Tabela 5. Resultado da identificação por espectrometria de massas das 10 principais proteínas capturadas da fração de membrana de células A549 *Wild type* pelo peptídeo Spike487-502Cys.

| Fração de membrana A549 WT | | | | | | | |
|-----------------------------------|---|----------------|--|----------------|----------------------|-------------------------|--|
| nº | Proteína | Probab. | Descrição | # de AA | Cobertura (%) | # Espectro Total | Peptídeos |
| 1 | sp P81605 DCD_HUMAN | 1,000 | Dermcidin (DCD) | 110 | 12,7 | 2 | DAVEDLESVGK |
| | | | | | | | LGKDAVEDLESVGK |
| 2 | sp A6NGY1 FRG2_C_HUMAN | 0,997 | Protein FRG2-like-2 (FRG2C) | 282 | 9 | 1 | GPLCAQVQTLYSMATQAAYV FPAES |
| | sp Q64ET8 FRG2_HUMAN | | Protein FRG2 (FRG2) | | | | |
| 3 | sp O00206 TLR4_HUMAN | 0,997 | Toll-like receptor 4 (TLR4) | 839 | 2,9 | 1 | KQELQHFPSSLAFLNLTQNDF ACT |
| 4 | sp O14718 OPSX_HUMAN | 0,997 | Visual pigment-like receptor peropsin (RRH) | 337 | 15,6 | 1 | AMLMAMFKCQTHQTMPVTSIL PMDVSQNPRL |
| 5 | sp O14730 RIOK3_HUMAN | 0,997 | Serine/threonine-protein kinase RIO3 (RIOK3) | 519 | 8,1 | 1 | PEVAVAEGPFITGENIDTSSDL MLAQMLQMELYDREYDAQLRR |
| 6 | sp O43520 AT8B1_HUMAN tr A0A2R8Y5C5 A0A2R8Y5C5_HUMAN tr A0A3B3IRQ1 A0A3B3IRQ1_HUMAN_N | 0,997 | Phospholipid-transporting ATPase IC (ATP8B1) | 1251 | 4,6 | 1 | FKMSLEITDQYLQREDTLATFDG |
| 7 | sp O76054 S14L2_HUMAN tr B3KRD8 B3KRD8_HUMAN | 0,997 | SEC14-like protein 2 (SEC14L2) | 403 | 12,8 | 1 | AGEMTEVLPNQRYNSHLVPE DGTLTCSDPGIYVLRFDNTYSF |
| 8 | sp O95013 O4F21_HUMAN sp Q6IEY1 OR4F3_HUMAN | 0,997 | Olfactory receptor 4F21 (OR4F21) | 312 | 7,4 | 1 | MDGENHSVVSEFLFLGLTHSWEI |
| 9 | sp P04275 VWF_HUMAN | 0,997 | von Willebrand factor (VWF) | 2813 | 0,8 | 1 | MDVGQDSIHVTVLQYSYMWTVY |
| 10 | sp P29400 CO4A5_HUMAN | 0,997 | Collagen alpha-5(IV) chain (COL4A5) | 1685 | 1,7 | 1 | LWGQPAEAAACYGCSPGSKDCSGIKGEK |

Tabela 6. Resultado da identificação por espectrometria de massas das 10 principais proteínas capturadas da fração de membrana de células A549 com superexpressão de ACE2 pelo peptídeo Spike487-502Cys

| Fração de membrana A549 +A | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|----------------|--|----------------|----------------------|-------------------------|--|
| nº | Proteína | Probab. | Descrição | # de AA | Cobertura (%) | # Espectro Total | Peptídeos |
| 1 | sp Q8WZ42 TITIN_HUMAN | 1,000 | Titin | 34350 | 0,3 | 7 | APLLDGGARIHHYVVEKR |
| | tr A0A0A0MTS7 A0A0A0MTS7_HUMAN | | | | | | AVHKEKR AVKPRVIQAPS CHYMTIHNVTPDDEGVYSVIA EKVHRVIEVFEEEVFEKPK VSNVAGGVECSANLFVKE |
| 2 | tr A0A0A0MRJ3 A0A0A0MRJ3_HUMAN | 0,998 | Neuron navigator 1 | 1830 | 2,8 | 6 | GQLTNIVHGSVLSASSAS LAELPPPLRAT SNIQYRSLPRPAKSSSMSVTG |
| 3 | sp Q8TAM1 BBS10_HUMAN | 0,999 | Bardet-Biedl syndrome 10 protein (BBS10) | 723 | 2,6 | 6 | TPTDTFQTVEVTLTCLSLE |
| 4 | sp Q9HC10 OTOF_HUMAN | 1,000 | Otoferlin (OTOF) | 1997 | 5,7 | 5 | EHVETRPLLNPDKPGIEQGR LLLLLLL RDPMKPSQILTRLCK SHSTGEVVVTMEEPEVPIKKLETMVK |
| | tr A0A2U3TZT7 A0A2U3TZT7_HUMAN | | | | | | DGRIHTRLK EDAGLYTCHVGSEETR EIFDIYVVTADYLPLGAEQDAITLRE GQYVEVLDAAHPLR PEWGAAEAPFPGEAVSEDEYK TKPTKSSPSRQGWVSPAYLD |
| 6 | sp Q5RHP9 ERIC3_HUMAN | 1,000 | Glutamate-rich protein 3 (ERICH3) | 1530 | 6,5 | 4 | APPNEMGSDAENEAPVEASELSDNP GLLGE DKKDNLDPK GHSVLVDEGHSSPLALTAPRPTVAPG TAAAGKVVEELARSGEEVPAAEE MTVTTTEAG |
| 7 | sp Q9H4B8 DPEP3_HUMAN | 0,996 | Dipeptidase 3 (DPEP3) | 488 | 4,1 | 4 | LLLLLLL |
| | tr A0A5F9ZHB4 A0A5F9ZHB4_HUMAN | | | | | | LLLLLLLLLRQPVTRAET LLLLLLLLLRQPVTRAETT |
| 8 | sp Q6ZNL6 FGD5_HUMAN | 0,999 | FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 5 (FGD5) | 1462 | 1,7 | 4 | LEVDRRSLSNSPQLK |
| | tr B7ZM68 B7ZM68_HUMAN | | FGD5 protein (FGD5) | | | | |
| 9 | sp P21817 RYR1_HUMAN | 1,000 | Ryanodine receptor 1 (RYR1) | 5038 | 1,6 | 4 | ILNEFAKMPKLTTNHYER MCAPTDQDLITLAKTRYALK MIARQMVDMLVESSSNVEMILK SMFDHLSYLLENSGIGLGMQQ |
| 10 | sp Q86UQ4 ABCAD_HUMAN | 1,000 | ATP-binding cassette sub-family A member 13 (ABCA13) | 5058 | 1 | 4 | DPSATDAQKLEFGNEVIWKMQLTG S |
| | tr A0A0A0MT16 A0A0A0MT16_HUMAN | | | | | | IGSFLKMKVICLTLEALWK |

b) Cromatografia de afinidade

Após o resultado insatisfatório obtido com a captura do peptídeo Spike487-502Cys em placa, seguimos com a metodologia de cromatografia de afinidade, descrito no item **3.11.2**. A principal vantagem desse método é que há a possibilidade de imobilização de grande quantidade de peptídeo e, portanto, capturar maior quantidade de interações. Além disso, a fase estacionária acoplada ao peptídeo pode ser reaproveitada algumas vezes. Para avaliação do processo de acoplamento do peptídeo Spike487-502Cys à resina Sulfolink-Agarose, utilizamos um novo método de quantificação de proteínas e peptídeos comercial. Este método apresentou uma sensibilidade maior que o método por reagente OPA e demonstrou cerca de 60% de eficácia no acoplamento do peptídeo Spike487-502Cys.

Assim, com a fase estacionária devidamente preparada, procedemos com a incubação com as alíquotas das frações celulares obtidas para as linhagens A549 *WT* e A549 +A. Para eluição das proteínas ligadas ao peptídeo, utilizamos inicialmente solução de glicina (1M). Entretanto, a alta concentração de glicina interferia nas etapas seguintes de análise. Na tentativa de solucionar esta limitação, passamos a concentrar as amostras eluídas em colunas de ultrafiltração (*Vivaspin 6*, código Z614475, Merck) para eliminação de sais. Contudo, não foi o suficiente para que as interações pudessem ser avaliadas com qualidade pela eletroforese em gel SDS-Page, além de nos fornecer um rendimento muito baixo. Por fim, passamos a eluir as proteínas ligadas a fase estacionária com o próprio tampão de amostras para eletroforese SDS-PAGE, como descrito no item **3.11.2b**. Com essa estratégia, a corrida de eletroforese foi bem sucedida como ilustrado na **Figura 16**, abaixo.

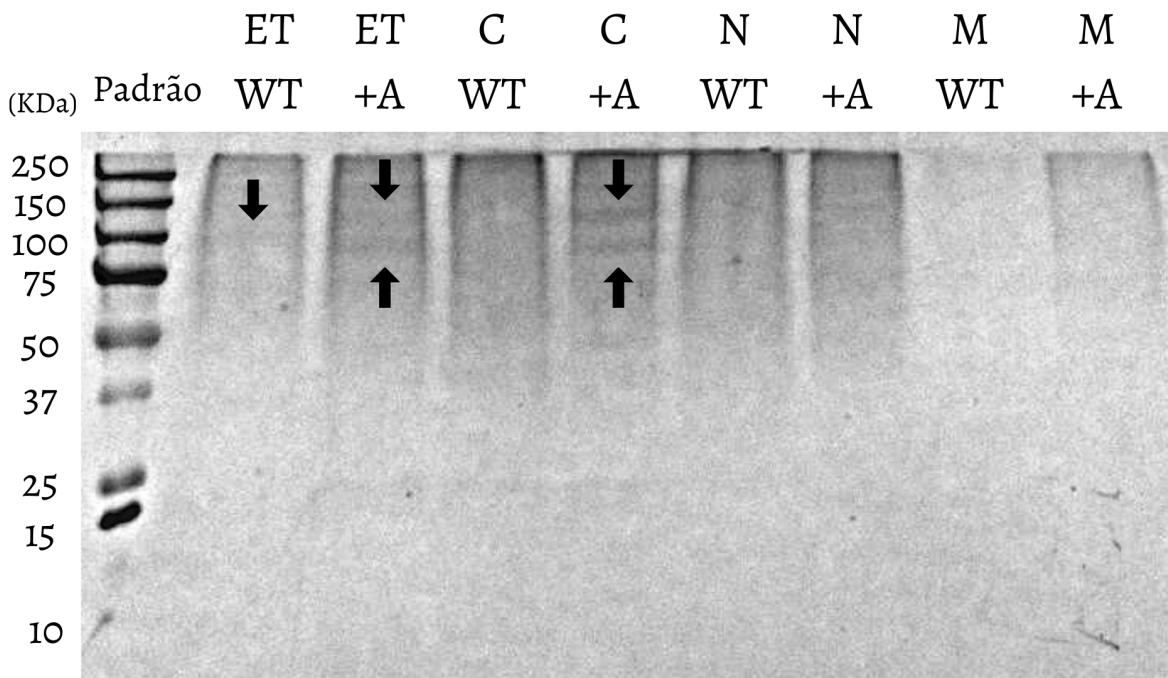


Figura 16. Gel SDS-Page de alíquotas da interação entre amostras celulares e o peptídeo Spike487-502Cys. Fração citoplasmática (C), núcleo (N), membrana (M), extrato total (ET), linhagem A549 Wild Type (WT) e linhagem A549 superexpressando com ACE2 (+A).

No gel SDS-Page que representa as alíquotas de interação entre amostras celulares e o peptídeo Spike487-502Cys, pode-se observar a presença de duas bandas na fração citoplasmática e no extrato total de proteínas da linhagem A549 superexpressando ACE2, em posição próxima ao peso molecular da proteína ACE2 (~120 KDa), sugerindo que dever ter havido interação entre as duas moléculas.

Também, pode-se inferir que houve um padrão de interação, em que as amostras de linhagem A549 +A apresentam bandas correspondentes a ACE2 em maior intensidade e quando comparadas com as amostras de linhagem *Wild Type*. Além disso, também é possível observar a presença de pouca proteína no gel, ainda que o ensaio de afinidade tenha sido feito com pouco mais de 600 μ g de proteína total, o que sugere a especificidade do método.

A estratégia aqui demonstrada, sugere a viabilidade de capturar proteínas que interagem com o peptídeo Spike487-502Cys. Estes experimentos deverão ser realizados em maior escala para permitir o processo de identificação das principais interações. A partir destes experimentos, certamente obteremos listas de proteínas de alta qualidade e, dentre os candidatos, poderemos avaliar os novos ligantes da proteína Spike de SARS-CoV-2.

Por fim, a variante P1 (atualmente chamada de variante Gama, pela OMS) foi originada no Brasil, e possui uma das mutações mais importantes - N501Y - da proteína

Spike localizada na penúltima posição da sequência utilizada para a síntese do peptídeo Spike487-502Cys. Esse peptídeo modificado, de sequência 487NSYFPLQSYGFQPTYG502-Cys, já foi sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa e será utilizado em experimentos de captura e interação, como complemento e avanço dos estudos deste trabalho.

4.5 Potenciais novos alvos de interação com a proteína Spike descritos na literatura

Desde que o mecanismo de infecção por SARS-CoV-2 pelo receptor ACE2 foi elucidado, a investigação de novos alvos de interação com a proteína Spike se tornou extremamente importante. Muitos alvos foram estudados pela criação de paralelos com outros vírus da família *Coronaviridae*, como o receptor DPP4, que age como receptor do vírus MERS-CoV (Wang *et al*, 2013). Essa hipótese também foi fundamentada no fato de que os pulmões possuem baixa expressão de ACE2, porém o receptor DPP4 é um dos principais genes relacionados à expressão de ACE2 (Song *et al*, 2014). Contudo, após estudos de *docking* molecular não foi demonstrado nenhuma interação significativa entre a proteína Spike do SARS-CoV-2 e o receptor DPP4 (Cameron *et al*, 2021).

Também, foi estudada a interação entre a proteína Spike de SARS-CoV-2 e receptores colinérgicos do tipo nicotínicos (Oliveira *et al*, 2021), que foi hipotetizada devido à baixa prevalência de pacientes fumantes hospitalizados após o diagnóstico de COVID-19, o que sugeriu um papel protetivo da nicotina (Changeux *et al*, 2020). Aliado a isso, foi observada uma considerável similaridade entre a porção RBM da proteína Spike do SARS-CoV-2 e antagonistas de receptores colinérgicos do tipo nicotínicos (nAchRs) (Farsalinos *et al*, 2020). No estudo da interação foram utilizados a sequência Y674-R685 do RBM da proteína Spike e a bungarotoxina, uma neurotoxina que age como antagonista de nAchRs, e por meio de microscopia eletrônica foi possível observar *binding* significativo entre as moléculas (Oliveira *et al*, 2021). Isso corrobora com o fato de que a COVID-19 pode causar muitos sintomas nos sistemas neurológico e motor, além do respiratório (Ellul *et al*, 2020; Yuki *et al*, 2020).

Adicionalmente, também foi proposto que a proteína transmembrana CD147, presente principalmente em linfócitos T ativados, poderia ser um receptor da proteína Spike do SARS-CoV-2 (Helal *et al*, 2020). Essa proposição se deu devido à considerável prevalência de linfopenia em pacientes com COVID-19, um distúrbio caracterizado pela baixa contagem de linfócitos totais no plasma sanguíneo (Tan *et al*, 2020). Foi hipotetizado

que a infecção por SARS-CoV-2 induz a cascata de ativação de linfócitos T para o combate ao invasor, consequentemente aumentando a expressão de CD147 na superfície desses linfócitos, e propiciando a entrada do vírus, inutilizando aquele linfócito infectado (Zheng *et al*, 2020). Nos estudos de *docking* molecular e cristalografia de raios X foi possível observar uma forte interação polar entre alguns resíduos de aminoácidos hidrofilicos da porção RBM da proteína Spike e o receptor CD147, sugerindo que essa é uma possível via de infecção de linfócitos por SARS-CoV-2 (Helal *et al*, 2020).

Conclusões

5. Conclusões

Nesse trabalho, conseguimos projetar e sintetizar um peptídeo que representa a região de interação da porção RBM da proteína Spike de SARS-CoV-2 com o receptor ACE2. Este peptídeo foi imobilizado em diferentes suportes para viabilizar estudos de captura de potenciais novas interações. Também, foi possível desenvolver estratégias para o enriquecimento de frações subcelulares das linhagens A549 *Wild Type* e A549 com superexpressão de ACE2. A combinação destes componentes tornou possível identificar de forma preliminar possíveis novas interações da porção RBM da proteína Spike. O escalonamento desta estratégia viabilizará a identificação por espectrometria de massas dessas potenciais novas interações, além de permitir comparações com novas variantes da proteína Spike que apresentam mutações nesta importante região.

Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

1. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol.* 2020 Jun;215:108427. doi: 10.1016/j.clim.2020.108427. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32325252; PMCID: PMC7169933.
2. Organização Mundial da Saúde
3. Esakandari H, Nabi-Afjadi M, Fakkari-Afjadi J, Farahmandian N, Miresmaeli SM, Bahreini E. A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biol Proced Online.* 2020 Aug 4;22:19. doi: 10.1186/s12575-020-00128-2. PMID: 32774178; PMCID: PMC7402395.
4. Yuen KS, Ye ZW, Fung SY, Chan CP, Jin DY. SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions. *Cell Biosci.* 2020 Mar 16;10:40. doi: 10.1186/s13578-020-00404-4. PMID: 32190290; PMCID: PMC7074995.
5. Ministério da Saúde
6. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, Ippolito G, Mchugh TD, Memish ZA, Drosten C, Zumla A, Petersen E. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis.* 2020 Feb;91:264-266. doi: 10.1016/j.ijid.2020.01.009. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31953166; PMCID: PMC7128332.
7. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, Tamin A, Harcourt JL, Thornburg NJ, Gerber SI, Lloyd-Smith JO, de Wit E, Munster VJ. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 2020 Apr 16;382(16):1564-1567. doi: 10.1056/NEJMc2004973. Epub 2020 Mar 17. PMID: 32182409; PMCID: PMC7121658.
8. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, Ippolito G, Mchugh TD, Memish ZA, Drosten C, Zumla A, Petersen E. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis.* 2020 Feb;91:264-266. doi: 10.1016/j.ijid.2020.01.009. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31953166; PMCID: PMC7128332.
9. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first

- step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol.* 2004 Jun;203(2):631-7. doi: 10.1002/path.1570. PMID: 15141377; PMCID: PMC7167720.
10. Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, Farzan M, Wohlford-Lenane C, Perlman S, McCray PB Jr. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol.* 2005 Dec;79(23):14614-21. doi: 10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005. PMID: 16282461; PMCID: PMC1287568.
 11. Yoshikawa T, Hill T, Li K, Peters CJ, Tseng CT. Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus-induced lung epithelial cytokines exacerbate SARS pathogenesis by modulating intrinsic functions of monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Virol.* 2009 Apr;83(7):3039-48. doi: 10.1128/JVI.01792-08. Epub 2008 Nov 12. PMID: 19004938; PMCID: PMC2655569.
 12. Fujimoto I, Pan J, Takizawa T, Nakanishi Y. Virus clearance through apoptosis-dependent phagocytosis of influenza A virus-infected cells by macrophages. *J Virol.* 2000 Apr;74(7):3399-403. doi: 10.1128/jvi.74.7.3399-3403.2000. PMID: 10708457; PMCID: PMC111841.
 13. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, Sun R, Tian Z, Xu X, Wei H. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev.* 2020 Jun;7(6):998-1002. doi: 10.1093/nsr/nwaa041. Epub 2020 Mar 13. PMID: 34676125; PMCID: PMC7108005.
 14. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, Xie C, Ma K, Shang K, Wang W, Tian DS. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020 Jul 28;71(15):762-768. doi: 10.1093/cid/ciaa248. PMID: 32161940; PMCID: PMC7108125.
 15. Pau AK, Aberg J, Baker J, Belperio PS, Coopersmith C, Crew P, Grund B, Gulick RM, Harrison C, Kim A, Lane HC, Masur H, Sheikh V, Singh K, Yazdany J, Tebas P; National Institutes of Health COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Convalescent Plasma for the Treatment of COVID-19: Perspectives of the National Institutes of Health COVID-19 Treatment Guidelines Panel. *Ann Intern Med.* 2021 Jan;174(1):93-95. doi: 10.7326/M20-6448. Epub 2020 Sep 25. PMID: 32976026; PMCID: PMC7556653.
 16. Drosten C, Preiser W, Günther S, Schmitz H, Doerr HW. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med.* 2003

- Aug;9(8):325-7. doi: 10.1016/s1471-4914(03)00133-3. PMID: 12928032; PMCID: PMC7128529.
17. Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009 Oct;234(10):1117-27. doi: 10.3181/0903-MR-94. Epub 2009 Jun 22. PMID: 19546349.
18. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol*. 2015;1282:1-23. doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1. PMID: 25720466; PMCID: PMC4369385.
19. Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet*. 2008 Apr;9(4):267-76. doi: 10.1038/nrg2323. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18319742.
20. Lai MM. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev*. 1992 Mar;56(1):61-79. doi: 10.1128/mr.56.1.61-79.1992. PMID: 1579113; PMCID: PMC372854.
21. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017. Epub 2020 Jan 24. PMID: 31978945; PMCID: PMC7092803.
22. Corman VM, Muth D, Niemeyer D, Drosten C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Adv Virus Res*. 2018;100:163-188. doi: 10.1016/bs.aivir.2018.01.001. Epub 2018 Feb 16. PMID: 29551135; PMCID: PMC7112090.
23. Mackay IM, Arden KE. MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virol J*. 2015 Dec 22;12:222. doi: 10.1186/s12985-015-0439-5. PMID: 26695637; PMCID: PMC4687373.
24. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020 Jul 17;369(6501):330-333. doi: 10.1126/science.abb9983. Epub 2020 May 4. PMID: 32366695; PMCID: PMC7199903.
25. Xu Y, Zhu J, Liu Y, Lou Z, Yuan F, Liu Y, Cole DK, Ni L, Su N, Qin L, Li X, Bai Z, Bell JI, Pang H, Tien P, Gao GF, Rao Z. Characterization of the heptad repeat regions, HR1 and HR2, and design of a fusion core structure model of the spike protein from

- severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Biochemistry*. 2004 Nov 9;43(44):14064-71. doi: 10.1021/bi049101q. PMID: 15518555.
26. Huang Y, Yang C, Xu XF, Xu W, Liu SW. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin*. 2020 Sep;41(9):1141-1149. doi: 10.1038/s41401-020-0485-4. Epub 2020 Aug 3. PMID: 32747721; PMCID: PMC7396720.
27. Xu Y, Zhu J, Liu Y, Lou Z, Yuan F, Liu Y, Cole DK, Ni L, Su N, Qin L, Li X, Bai Z, Bell JI, Pang H, Tien P, Gao GF, Rao Z. Characterization of the heptad repeat regions, HR1 and HR2, and design of a fusion core structure model of the spike protein from severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Biochemistry*. 2004 Nov 9;43(44):14064-71. doi: 10.1021/bi049101q. PMID: 15518555.
28. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Z, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C, Penninger JM. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005 Aug;11(8):875-9. doi: 10.1038/nm1267. Epub 2005 Jul 10. PMID: 16007097; PMCID: PMC7095783.
29. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32075877; PMCID: PMC7164637.
30. El Bekay R, Alvarez M, Monteseirín J, Alba G, Chacón P, Vega A, Martin-Nieto J, Jiménez J, Pintado E, Bedoya FJ, Sobrino F. Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF- κ B. *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):662-71. doi: 10.1182/blood-2002-09-2785. Epub 2003 Mar 27. PMID: 12663441.
31. Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Apr 29;302(2):148-58. doi: 10.1016/j.mce.2008.11.003. Epub 2008 Nov 18. PMID: 19059306; PMCID: PMC2835147.
32. Silva-Filho JL, Souza MC, Henriques Md, Morrot A, Savino W, Nunes MP, Caruso-Neves C, Pinheiro AA. AT1 receptor-mediated angiotensin II activation and

- chemotaxis of T lymphocytes. *Mol Immunol.* 2011 Sep;48(15-16):1835-43. doi: 10.1016/j.molimm.2011.05.008. Epub 2011 Jun 8. PMID: 21641648.
33. Mirabito Colafella KM, Bovée DM, Danser AHJ. The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. *Exp Eye Res.* 2019 Sep;186:107680. doi: 10.1016/j.exer.2019.05.020. Epub 2019 May 23. PMID: 31129252.
34. Huang Y, Yang C, Xu XF, Xu W, Liu SW. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin.* 2020 Sep;41(9):1141-1149. doi: 10.1038/s41401-020-0485-4. Epub 2020 Aug 3. PMID: 32747721; PMCID: PMC7396720.
35. Xia S, Xu W, Wang Q, Wang C, Hua C, Li W, Lu L, Jiang S. Peptide-Based Membrane Fusion Inhibitors Targeting HCoV-229E Spike Protein HR1 and HR2 Domains. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 6;19(2):487. doi: 10.3390/ijms19020487. PMID: 29415501; PMCID: PMC5855709.
36. Tao K, Tzou PL, Nouhin J, Gupta RK, de Oliveira T, Kosakovsky Pond SL, Fera D, Shafer RW. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nat Rev Genet.* 2021 Sep 17:1–17. doi: 10.1038/s41576-021-00408-x. Epub ahead of print. PMID: 34535792; PMCID: PMC8447121.
37. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, Hengartner N, Giorgi EE, Bhattacharya T, Foley B, Hastie KM, Parker MD, Partridge DG, Evans CM, Freeman TM, de Silva TI; Sheffield COVID-19 Genomics Group, McDanal C, Perez LG, Tang H, Moon-Walker A, Whelan SP, LaBranche CC, Saphire EO, Montefiori DC. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell.* 2020 Aug 20;182(4):812-827.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043. Epub 2020 Jul 3. PMID: 32697968; PMCID: PMC7332439.
38. Hou YJ, Chiba S, Halfmann P, Ehre C, Kuroda M, Dinnon KH 3rd, Leist SR, Schäfer A, Nakajima N, Takahashi K, Lee RE, Mascenik TM, Graham R, Edwards CE, Tse LV, Okuda K, Markmann AJ, Bartelt L, de Silva A, Margolis DM, Boucher RC, Randell SH, Suzuki T, Gralinski LE, Kawaoka Y, Baric RS. SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo. *Science.* 2020 Dec 18;370(6523):1464-1468. doi: 10.1126/science.abe8499. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33184236; PMCID: PMC7775736.
39. Tada T, Dcosta BM, Samanovic MI, Herati RS, Cornelius A, Zhou H, Vaill A, Kazmierski W, Mulligan MJ, Landau NR. Convalescent-Phase Sera and

- Vaccine-Elicited Antibodies Largely Maintain Neutralizing Titer against Global SARS-CoV-2 Variant Spikes. *mBio*. 2021 Jun 29;12(3):e0069621. doi: 10.1128/mBio.00696-21. Epub 2021 Jun 1. PMID: 34060334; PMCID: PMC8262901.
40. Liu Y, Liu J, Plante KS, Plante JA, Xie X, Zhang X, Ku Z, An Z, Scharton D, Schindewolf C, Menachery VD, Shi PY, Weaver SC. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 transmission. *bioRxiv* [Preprint]. 2021 Mar 9:2021.03.08.434499. doi: 10.1101/2021.03.08.434499. PMID: 33758836; PMCID: PMC7986995.
41. Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, Toller-Kawahisa JE, de Lima M, Nascimento DC, Schneider AH, Caetité D, Tavares LA, Paiva IM, Rosales R, Colón D, Martins R, Castro IA, Almeida GM, Lopes MIF, Benatti MN, Bonjorno LP, Giannini MC, Luppino-Assad R, Almeida SL, Vilar F, Santana R, Bollela VR, Auxiliadora-Martins M, Borges M, Miranda CH, Pazin-Filho A, da Silva LLP, Cunha LD, Zamboni DS, Dal-Pizzol F, Leiria LO, Siyuan L, Batah S, Fabro A, Mauad T, Dolhnikoff M, Duarte-Neto A, Saldiva P, Cunha TM, Alves-Filho JC, Arruda E, Louzada-Junior P, Oliveira RD, Cunha FQ. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J Exp Med*. 2020 Dec 7;217(12):e20201129. doi: 10.1084/jem.20201129. PMID: 32926098; PMCID: PMC7488868.
42. Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol*. 2006 May;80(10):5059-64. doi: 10.1128/JVI.80.10.5059-5064.2006. PMID: 16641297; PMCID: PMC1472073.
43. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973 Nov;51(5):1417-23. doi: 10.1093/jnci/51.5.1417. PMID: 4357758.
44. Thomé CH, dos Santos GA, Ferreira GA, Scheucher PS, Izumi C, Leopoldino AM, Simão AM, Ciancaglini P, de Oliveira KT, Chin A, Hanash SM, Falcão RP, Rego EM, Greene LJ, Faça VM. Linker for activation of T-cell family member2 (LAT2) a lipid raft adaptor protein for AKT signaling, is an early mediator of alkylphospholipid anti-leukemic activity. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Dec;11(12):1898-912. doi: 10.1074/mcp.M112.019661. Epub 2012 Sep 22. PMID: 23001822; PMCID: PMC3518132.

45. Bhasin M, Reinherz EL, Reche PA. Recognition and classification of histones using support vector machine. *J Comput Biol.* 2006 Jan-Feb;13(1):102-12. doi: 10.1089/cmb.2006.13.102. PMID: 16472024.
46. Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal.* 2011 Feb;23(2):317-23. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.08.003. Epub 2010 Aug 19. PMID: 20727968; PMCID: PMC3084531.
47. Yamanashi Y, Fukushige S, Semba K, Sukegawa J, Miyajima N, Matsubara K, Yamamoto T, Toyoshima K. The yes-related cellular gene lyn encodes a possible tyrosine kinase similar to p56lck. *Mol Cell Biol.* 1987 Jan;7(1):237-43. doi: 10.1128/mcb.7.1.237-243.1987. PMID: 3561390; PMCID: PMC365062.
48. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature.* 2020 May;581(7807):221-224. doi: 10.1038/s41586-020-2179-y. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32225175; PMCID: PMC7328981.
49. Cameron K, Rozano L, Falasca M, Mancera RL. Does the SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor Binding Domain Interact Effectively with the DPP4 (CD26) Receptor? A Molecular Docking Study. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 29;22(13):7001. doi: 10.3390/ijms22137001. PMID: 34209788; PMCID: PMC8269389.
50. Wang N, Shi X, Jiang L, Zhang S, Wang D, Tong P, Guo D, Fu L, Cui Y, Liu X, Arledge KC, Chen YH, Zhang L, Wang X. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res.* 2013 Aug;23(8):986-93. doi: 10.1038/cr.2013.92. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23835475; PMCID: PMC3731569.
51. Song W, Wang Y, Wang N, Wang D, Guo J, Fu L, Shi X. Identification of residues on human receptor DPP4 critical for MERS-CoV binding and entry. *Virology.* 2014 Dec;471-473:49-53. doi: 10.1016/j.virol.2014.10.006. Epub 2014 Oct 21. PMID: 25461530; PMCID: PMC7112127.
52. Farsalinos K, Barbouni A, Niaura R. Systematic review of the prevalence of current smoking among hospitalized COVID-19 patients in China: could nicotine be a therapeutic option? *Intern Emerg Med.* 2020 Aug;15(5):845-852. doi: 10.1007/s11739-020-02355-7. Epub 2020 May 9. PMID: 32385628; PMCID: PMC7210099.

53. Changeux JP, Amoura Z, Rey FA, Miyara M. A nicotinic hypothesis for Covid-19 with preventive and therapeutic implications. *C R Biol.* 2020 Jun 5;343(1):33-39. doi: 10.5802/crbiol.8. PMID: 32720486.
54. Oliveira ASF, Ibarra AA, Bermudez I, Casalino L, Gaieb Z, Shoemark DK, Gallagher T, Sessions RB, Amaro RE, Mulholland AJ. A potential interaction between the SARS-CoV-2 spike protein and nicotinic acetylcholine receptors. *Biophys J.* 2021 Mar 16;120(6):983-993. doi: 10.1016/j.bpj.2021.01.037. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33609494; PMCID: PMC7889469.
55. Ellul MA, Benjamin L, Singh B, Lant S, Michael BD, Easton A, Kneen R, Defres S, Sejvar J, Solomon T. Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol.* 2020 Sep;19(9):767-783. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30221-0. Epub 2020 Jul 2. PMID: 32622375; PMCID: PMC7332267.
56. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol.* 2020 Jun;215:108427. doi: 10.1016/j.clim.2020.108427. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32325252; PMCID: PMC7169933.
57. Helal MA, Shouman S, Abdelwaly A, Elmehrath AO, Essawy M, Sayed SM, Saleh AH, El-Badri N. Molecular basis of the potential interaction of SARS-CoV-2 spike protein to CD147 in COVID-19 associated-lymphopenia. *J Biomol Struct Dyn.* 2020 Sep 16:1-11. doi: 10.1080/07391102.2020.1822208. Epub ahead of print. PMID: 32936048; PMCID: PMC7544927.
58. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, Xu Y, Tian Z. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020 May;17(5):533-535. doi: 10.1038/s41423-020-0402-2. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32203188; PMCID: PMC7091858.
59. Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang YQ, Wang Q, Miao H. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Mar 27;5(1):33. doi: 10.1038/s41392-020-0148-4. Erratum in: *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Apr 29;5(1):61. PMID: 32296069; PMCID: PMC7100419.
60. Lanfredi GP, Thomé CH, Ferreira GA, Silvestrini VC, Masson AP, Vargas AP, Grassi ML, Poersch A, Candido Dos Reis FJ, Faça VM. Analysis of ovarian cancer cell secretome during epithelial to mesenchymal transition reveals a protein signature associated with advanced stages of ovarian tumors. *Biochim Biophys Acta Proteins*

Proteom. 2021 Jun;1869(6):140623. doi: 10.1016/j.bbapap.2021.140623. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33607274.