



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Método para detecção do RNA viral de SARS-CoV-2 empregando Ribozimas e DNA-*hairpins* associados em reação de hibridação em cadeia com transferência de energia fluorescente por ressonância**

Leonardo Ferreira da Silva

Orientadora: Professora Ildinete Silva Pereira  
Coorientadora: Professora Cíntia Marques Coelho

Brasília-DF, Novembro de 2023

**LEONARDO FERREIRA DA SILVA**

**Método para detecção do RNA viral de SARS-CoV-2 empregando Ribozimas e DNA-*hairpins* associados em reação de hibridação em cadeia com transferência de energia fluorescente por ressonância.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira

Co Orientadora: Prof. Dra. Cíntia M. Coelho

**Brasília-DF, Novembro de 2023**

**LEONARDO FERREIRA DA SILVA**

**Método para detecção do RNA viral de SARS-CoV-2 empregando Ribozimas e DNA-*hairpins* associados em reação de hibridação em cadeia com transferência de energia fluorescente por ressonância.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

**Aprovado em: 18/12/2023**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr(a). **Ildinete Silva Pereira**

Instituição: **Universidade de Brasília**

Julgamento: **APROVADO**

Prof. Dr(a). **Marcelo de Macedo Brígido**

Instituição: **Universidade de Brasília**

Julgamento: **APROVADO**

Prof. Dr(a). **Marcelo Henrique Soller Ramada**

Instituição: **Universidade Católica de Brasília**

Julgamento: **APROVADO**

Prof. Dr(a). **Márcio Jose Poças Fonseca**

Instituição: **Universidade de Brasília**

Julgamento: **APROVADO**

**Brasília-DF, Novembro de 2023**

## AGRADECIMENTOS

Não poderia começar de outra forma a não ser agradecendo a minha querida professora e amiga Cintia Marques Coelho, por ter idealizado o projeto todo, me ensinado muito mais do que eu esperava aprender, tanto na esfera acadêmica quanto na vida pessoal, ter me dado suporte emocional em um dos momentos mais difíceis da minha vida e desempenhou um papel fundamental nesta jornada acadêmica. Sua orientação sábia, conselhos valiosos e paciência incansável foram essenciais para o sucesso desta pesquisa. Agradeço a minha amiga e professora Ildinete Silva pelas orientações valiosas e atenciosas. Agradecer aos meus pais e ao meu irmão, por sempre me apoiarem, independentemente de qualquer coisa que acontecesse e mesmo sem entender nada do que eu trabalho continuam me dando suporte, agradeço pelo apoio incondicional ao longo desses três anos. Seu amor e compreensão foram a âncora que me sustentou nos momentos mais desafiadores. Agradeço aos meus queridos amigos e colegas de laboratório, por criar um ambiente colaborativo e inspirador. As discussões, trocas de ideias e apoio mútuo foram cruciais para enfrentar os desafios que surgiram ao longo do caminho, principalmente ao Pedro Queiroz, Sophia Garcia, Letícia Cabral e Henrique Fetzner pois eu não conseguiria finalizar o projeto sem a ajuda incansável dessas pessoas, tanto na hora de realização dos experimentos e debates de resultados quanto nas conversas e momentos de apoio emocional, por isso tudo e muito mais sou eternamente grato a vocês. Gostaria de agradecer também a todos os amigos e amigas antigos e novos que fiz durante esse período, tanto na esfera acadêmica quanto na vida pessoal, agradecer aos professores e alunos, dos diferentes grupos de pesquisa, que contribuíram e colaboraram com o andamento e conclusão do projeto. Escrevendo esse agradecimento percebi que nunca conseguirei retribuir todo amor, carinho, atenção e zelo que tive de tantas pessoas maravilhosas ao meu redor, então vou eternizar todos vocês aqui nesse agradecimento, pois todos estão eternizados na minha cabeça e no meu coração, MUITO obrigado a todos!

*“É preciso ainda ter o caos dentro de si para poder dar à luz uma estrela dançante”*

*Friedrich Nietzsche*

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1. PANDEMIA DA COVID-19.....	13
1.2. VÍRUS DA FAMÍLIA CORONAVIRIDAE.....	16
1.3. UTILIZAÇÃO DAS RIBOZIMAS COMO FERRAMENTA PARA APLICAÇÃO NA SAÚDE.....	20
1.4. FRET-HCR E SUA APLICAÇÃO.....	23
1.5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	25
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>27</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
3.1. IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS GENÔMICOS.....	28
3.2. DESENHO RACIONAL DE RIBOZIMAS E MOLÉCULAS REPÓRTERES DE DNA... 28	
3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA RIBOZIMA.....	31
3.4. TESTE DE AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE SINAL BASEADO EM FRET-HCR... 32	
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA SARS-CoV-2.....	33
4.2 DETECÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE SINAL BASEADO EM FRET-HCR.....	35
4.3 AVALIAÇÃO DO USO CONJUNTO DA ATIVIDADE DA RIBOZIMA E ENSAIOS FRET-HCR.....	42
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>56</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Representação visual da linha do tempo dos acontecimentos mais relevantes do primeiro ano da pandemia.....Pág 15.

**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura funcional de Ribozimas do tipo *Hammerhead*.....Pág 23.

<b>Figura 3:</b> Representação esquemática das principais etapas de reação do método diagnóstico para SARS-CoV-2.....	Pág 36.
<b>Figura 4:</b> Alinhamento de sequências nucleotídicas.....	Pág 36.
<b>Figura 5:</b> Ensaio de FRET-HCR empregando diferentes concentrações da molécula sintética de DNA iniciadora.....	Pág 38.
<b>Figura 6:</b> Ensaio de FRET-HCR em tampão SSC.....	Pág 40.
<b>Figura 7:</b> Ensaio de FRET-HCR empregando duas concentrações diferentes e dois espectrofotômetros diferentes.....	Pág 41.
<b>Figura 8:</b> Ensaio de FRET-HCR empregando DNA e RNA como molécula sintética iniciadora.....	Pág 43.
<b>Figura 9:</b> Transcrição <i>in vitro</i> do RNA alvo e ribozimas, observadas em eletroforese de gel de agarose 2%.....	Pág 44.
<b>Figura 10:</b> Ensaio de atividade de clivagem de ribozimas visualizadas em eletroforese em gel de agarose 2%.....	Pág 45.
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática e emissão média do espectro de intensidade de fluorescência.....	Pág 46.
<b>Figura 12:</b> Ensaio de FRET-HCR empregando RNA como molécula sintética iniciadora.....	Pág 50.
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática e emissão média do espectro de intensidade de fluorescência.....	Pág 51.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Identificação das sequências das moléculas de DNA ou RNA utilizadas nos ensaios.....Pág 27.

**Tabela 2:** Identificação das sequências das moléculas de DNA ou RNA utilizadas nos ensaios.....Pág 31.

**Tabela 3:** - Parâmetros obtidos pelo software RiboSoft para cada uma das ribozimas utilizadas neste estudo.....Pág 33.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

±: Mais ou menos.

**ACE2:** Angiotensin-converting enzyme 2 (inglês).

**bp:** Base pair (inglês).

**CARMEN:** Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids (inglês).

**CCDC:** Chinese Centers for Diseases Control and Prevention (inglês).

**CDC-CI:** Centers for Diseases Control and Prevention of Côte d'Ivoire (francês).

**CDC:** Centers for Diseases Control and Prevention (inglês).

**COVID-19:** Coronavírus Diseases 2019 (inglês).

**CRISPR-Cas:** Clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein (inglês).

**Ct:** Cycle threshold (inglês).

**Cy3:** Cianina 3.

**Cy5:** Cianina 5.

**DDC:** Thai Department of Diseases Control (inglês).

**DETECTR:** DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter (inglês).

**DHA:** Danish Health Authority (inglês).

**DNA:** Deoxyribonucleic acid (inglês).

**dsRNA:** Double strand RNA (inglês).

**ECDC:** European Centers for Diseases Control and Prevention (inglês).

**EIOS:** Epidemic Intelligence from Open Sources (inglês).

**ERASE:** Easy-Readout and Sensitive Enhanced (inglês).

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations (inglês).

**FDA:** Food and Drug Administration (inglês).

**FRET:** Fluorescence resonance energy transfer (inglês).

**H1:** *Hairpin 1* (inglês).

**H2:** *Hairpin 2* (inglês).

**HCR:** Hybridization chain reaction (inglês).

**HCV:** Hepatitis C virus (inglês).

**HDV:** Hepatitis Delta virus (inglês).

**HIV:** Human immunodeficiency virus (inglês).

**IgG:** Imunoglobulina G.

**IgM:** Imunoglobulina M.

**ILACO:** Isothermal LAMP based method for COVID-19 (inglês).

**kb:** Quilobases.

**LAMP:** Loop-mediated isothermal amplification (inglês).

**LED:** Light Emitting diode (inglês).

**LFT:** Lateral flow test (inglês).

**M:** Molar.

**MAFFT:** Multiple Alignment using fast Fourier transform (inglês).

**MERS-CoV:** Middle East respiratory syndrome coronavirus (inglês).

**MHV:** Murine hepatitis virus (inglês).

**miRNA:** Micro RNA (inglês).

**MOHG:** Ministry of Health Ghana (inglês).

**mRNA:** Messenger RNA (inglês).

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information (inglês).

**nm:** Nanômetro.

**nM:** Nanomolar.

**nt:** Nucleotídeo.

**NUPACK:** Nucleic Acid Package (inglês).

**OFDs:** Organic Fluorescent dyes (inglês).

**OMS:** Organização Mundial da Saúde.

**OPAS:** Organização Pan-Americana de Saúde.

**ORF1ab:** Open reading Frame 1ab (inglês).

**ProMED:** Program for Monitoring Emerging Diseases (inglês).

**RdRP:** RNA-dependent RNA polymerase (inglês).

**RGB:** Red, Green and Blue (inglês).

**RiboSoft:** Ribozymes Software (inglês).

**RNA:** Ribonucleic acid (inglês).

**RNAi:** RNA interference (inglês).

**RNase P:** Ribonuclease P.

**RT-qPCR:** Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (inglês).

**SARS-CoV-1:** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1 (inglês).

**SARS-CoV-2:** Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (inglês).

**SHERLOCK:** Specific high-sensitivity enzyme reporter unlocking (inglês).

**shRNA:** Short *hairpin* RNA (inglês).

**siRNA:** Small interfering RNA (inglês).

**SNP:** Single nucleotide polymorphism (inglês).

**SPRP:** Strategic Preparedness and Response Plan (inglês).

**SS:** Single strand (inglês).

**SSC:** Saline Sodium Citrate (inglês).

**SSCT:** Saline Sodium Citrate with Tween (inglês).

**STOP-COVID:** SHERLOCK Testing in One Pot (inglês).

**SUS:** Sistema Único de Saúde.

**UKHSA:** United Kingdom Health Security Agency (inglês).

**VOIs:** Variants of Interest (inglês).

**WHO:** World Organisation for Animal Health (inglês).

**µl:** Microlitros.

## RESUMO

A pandemia de COVID-19 teve seu início na província de Wuhan, situada na China, e foi causada pelo coronavírus SARS-CoV-2. Em poucos meses o vírus já tinha se espalhado pelo mundo todo, levando à uma grande preocupação de saúde pública global. Até o presente momento mais de 770 milhões de casos de infecção e mais de 6,9 milhões de óbitos em todo o mundo foram registrados. Esses elevados números de infecção demonstram a importância de métodos diagnósticos capazes de identificar a presença do vírus nos primeiros dias de infecção para direcionar políticas públicas de medidas de contenção evitando sua maior disseminação. Para essa fase inicial o método recomendado é o RT-qPCR, considerado padrão ouro atualmente. Entretanto, essa metodologia apresenta algumas limitações como elevado custo de produção, longo tempo de execução da técnica além da necessidade de mão de obra e equipamentos especializados. Além da necessidade de refrigeração no transporte e armazenamento que limitam sua ampla distribuição e utilização em vários ambientes, principalmente naqueles longe de centros urbanos que não possuem estrutura de saúde pública adequada. Portanto, este estudo tem como objetivo o desenvolvimento de um método diagnóstico sensível e de fácil manuseio, isento de atividade enzimática, de equipamentos e mão de obra especializados e refrigeração. Baseando-se em ribozimas para o reconhecimento e clivagem do RNA viral e moléculas meta-estáveis de grampos de DNA com fluoróforos em suas extremidades, capazes de realizar reação de hibridação em cadeia seguida por transferência ressonante de fluorescência (FRET-HCR) para a identificação do vírus. Os resultados indicaram que duas ribozimas projetadas conseguiram identificar e clivar o alvo transcrito *in vitro* de RNA viral e as moléculas de DNA *hairpin* foram eficientes nas reações de HCR e os fluoróforos nas reações de FRET, com os melhores resultados apresentando intensidade de fluorescência  $1,34 \pm 0,11$  vezes superior ao controle negativo, evidenciando assim o potencial do método proposto. Portanto, este estudo serviu como prova de conceito para o uso conjunto de ribozimas e grampos de DNA com fluoróforos em reações FRET-HCR para detectar SARS-CoV-2.

**Palavras-chave:** Método diagnóstico, Ribozima, DNA-*hairpin*, SARS-CoV-2, FRET, HCR.

## ABSTRACT

The COVID-19 pandemic began in Wuhan province, located in China, and was caused by the SARS-CoV-2 coronavirus. Within a few months, the virus had already spread throughout the world, leading to a major global public health concern. To date, more than 770 million cases of infection and more than 6.9 million deaths have been recorded worldwide. These high infection numbers demonstrate the importance of diagnostic methods capable of identifying the presence of the virus in the first days of infection to guide public policies on containment measures to prevent its further spread. For this initial phase, the recommended method is RT-qPCR, currently considered the gold standard. However, this methodology presents some limitations such as high production cost, need for refrigeration, long execution time of the technique in addition to the need for specialized labor and equipment. Consequently, the need for refrigeration during transport and storage limits its wide distribution and use in various environments, especially those far from urban centers that do not have an adequate public health structure. Therefore, this study aims to develop a sensitive and easy-to-use diagnostic method, free from enzymatic activity, specialized equipment, labor and refrigeration. Relying on ribozymes for the recognition and cleavage of viral RNA and metastable DNA *hairpin* molecules with fluorophores at their ends, capable of performing hybridization chain reaction followed by fluorescence resonant energy transfer (FRET-HCR) for identification of the virus. The results indicated that two engineered ribozymes were able to identify and cleave the *in vitro* transcribed target of viral RNA and the DNA *hairpin* molecules were efficient in HCR reactions and the fluorophores in FRET reactions, with the best results showing fluorescence intensity  $1.34 \pm 0,11$  times higher than the negative control, thus highlighting the potential of the proposed method. Therefore, this study served as a proof of concept for the joint use of ribozymes and DNA *hairpin* with fluorophores in FRET-HCR reactions to detect SARS-CoV-2.

**Keywords:** Diagnostic method, Ribozyme, DNA-*hairpin*, SARS-CoV-2, FRET, HCR.

## 1. INTRODUÇÃO

A grande pandemia do século afetou o mundo, tendo seu epicentro na província de Wuhan, na China, e disseminando-se rapidamente por todos os continentes. Essa pandemia é resultado da infecção pelo vírus SARS-CoV-2, que, ao se replicar em seres humanos, pode ocasionar o desenvolvimento da doença COVID-19. Até o presente momento, registram-se mais de 770 milhões de casos de infecção e mais de 6,9 milhões de óbitos em todo o mundo decorrentes da COVID-19 ([OMS](#), 2023a). A colaboração entre a Organização Mundial da Saúde, instituições governamentais, indústrias farmacêuticas e pesquisadores tornou possível a elaboração e rápida aplicação de vacinas em diversas regiões do globo. Contudo, as restrições de logística e produção de insumos, em conjunto com alta densidade populacional e consecutivas aparições de novas variantes, realçam a relevância das medidas de controle não farmacológico, uma vez que há potencial para o desenvolvimento de cepas resistentes à vacina. Nesse contexto, a rastreabilidade e a detecção de indivíduos infectados, assim como a testagem em larga escala, são indicados para guiar as políticas públicas na tomada de decisões. Os indivíduos infectados por SARS-CoV-2 podem ser classificados em assintomáticos, pré-sintomáticos e sintomáticos. É importante ressaltar que mesmo com cuidados médicos constantes, os indivíduos sintomáticos correm o risco de desenvolver sintomas graves que podem resultar em óbito (WU e MCGOOGAN, 2020). Visando aprimorar o controle de pandemias atuais e futuras, bem como promover a saúde pública, é crucial a implementação em larga escala de testes diagnósticos à beira do leito, capazes de identificar o vírus em estágios iniciais da doença. Nesta fase, o padrão ouro recomendado como método diagnóstico é a análise quantitativa de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) que usa como molde o produto da reação de transcrição reversa (RT) mais conhecido pela sigla em inglês RT-qPCR. Outros testes que são baseados na metodologia CRISPR-Cas, cujo princípio fundamenta-se na detecção de RNA viral por pareamento Watson-Crick com o complexo de RNA guia e Cas13 (CRISPR-Cas), antígenos, e testes embasados em amplificação isotérmica mediada por LOOP (LAMP) também têm sido usados. É relevante evidenciar que, apesar de os métodos sorológicos baseados na detecção de antígenos, IgM e/ou IgG, gerados graças à infecção viral, serem os testes mais disseminados, estes não são recomendados para o diagnóstico nos primeiros estágios da doença (pelo menos 5 dias após o início dos sintomas). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América ([CDC](#), 2022; [CDC](#), 2023a) é

possível obter resultados negativos, mesmo em pacientes que tiveram contato prévio com o vírus.

Desta forma, é observado que as metodologias vigentes para detecção do SARS-CoV-2 no estágio inicial de infecção são fundamentadas na atividade de diversas enzimas que são fortemente sensíveis às condições de transporte e tempo prolongado de uso. Isto pode prejudicar a disseminação e implementação desses métodos diagnósticos em países com dimensões continentais, especialmente em áreas rurais com estruturas de saúde precárias. Deste modo, o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos que excedam as adversidades referentes aos métodos atuais é de suma importância.

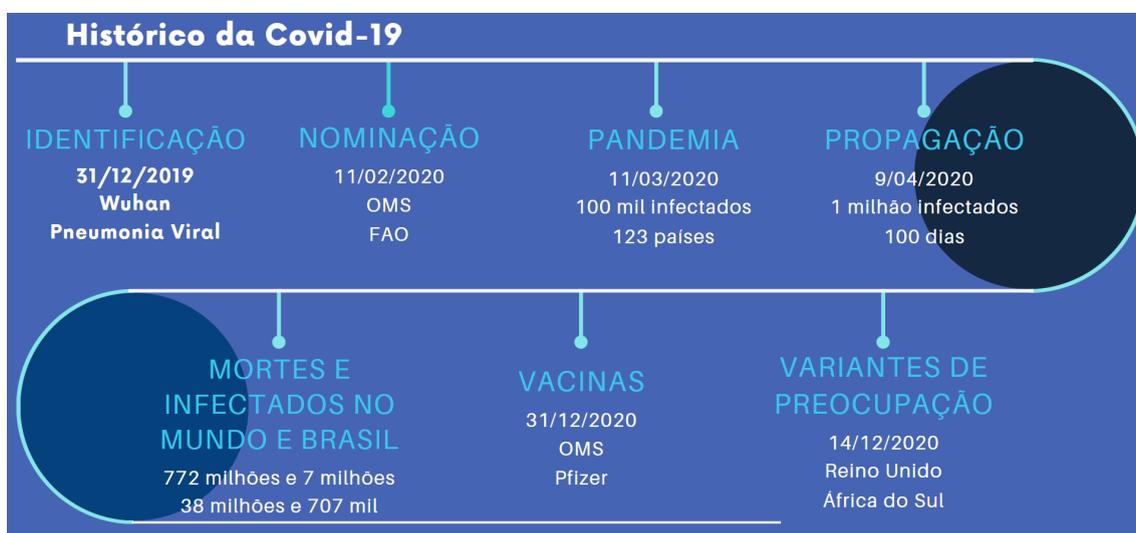
### **1.1. PANDEMIA DA COVID-19**

Em 31 de dezembro de 2019 o escritório da Organização Mundial de Saúde (OMS) na República Popular da China teve acesso a uma declaração de mídia emitida pela Comissão Municipal de Saúde de Wuhan, comunicando sobre o surgimento de casos de ‘pneumonia viral’ na província ([OMS, 2023b](#); [CDC Chines](#)). No mesmo dia, a plataforma Epidemic Intelligence from Open Sources (EIOS) da OMS também teve acesso a uma reportagem emitida no ProMED, um programa da Sociedade Internacional de Doenças Infecciosas, em relação ao mesmo grupo de casos de ‘pneumonia de causa desconhecida’ em Wuhan, sendo este o início da grande pandemia do século ([ProMED](#); [OMS, 2023b](#)). O primeiro relatório da OMS sobre a pneumonia de causa desconhecida foi divulgado no dia 5 de Janeiro de 2020 e já apresentava 44 casos relatados, sendo 11 deles em estado grave, com o agente causador ainda não identificado, já demonstrando o perigo iminente que o mundo iria enfrentar ([OMS, 2023b](#)). Poucos dias após esse relatório, as autoridades chinesas informaram que o surto é causado por um novo coronavírus e já no dia 11 de Janeiro, a OMS comunica que recebeu as sequências genéticas do vírus e no mesmo dia, é relatada a primeira morte na China causada pela doença ([OMS, 2023b](#); [CDC Chines](#)). Dois dias após, o DDC Tailandes (do inglês, Thai Department of Diseases Control) relata um caso confirmado de infecção pelo novo coronavírus, começando assim, a dispersão do vírus para outros países. Neste período, a OMS já começa a entender que a transmissão homem a homem seria possível, pois se tratava de um patógeno respiratório. No mesmo dia a OMS divulgou o RT-qPCR em tempo real como o primeiro método para diagnosticar o novo coronavírus, disponibilizando todas as sequências necessárias para a realização do teste ([DDC Tailandes](#); [OMS, 2023b](#)). No dia 30 de Janeiro de 2020 o diretor geral da OMS declarou que o surto do novo coronavírus

preenchia todos os requisitos para ser classificado como uma emergência de saúde pública de interesse internacional, sendo este, o mais alto nível de alarme da OMS. Já naquele momento haviam 98 casos confirmados sem nenhuma morte, espalhados por 18 outros países ([OMS, 2023b](#)), com exceção da China onde teve início o surto. Quatro dias depois, a OMS sinaliza a finalização do Plano Estratégico de Preparação e resposta (do inglês, Strategic Preparedness and Response Plan, SPRP), focado em melhorar a capacidade de detecção, preparação e resposta ao surto, embasando-se nas informações sobre o vírus disponíveis naquele período, utilizando-se de estratégias para orientar o desenvolvimento de planos operacionais regionais e nacionais para a contenção do vírus ([OMS, 2023b](#))

Com relação a nomeação da doença, isso foi resolvido no dia 11 de Fevereiro de 2020 onde a OMS, e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês, Food and Agriculture of the United Nations, FAO) utilizaram-se do documento de boas práticas redigido por eles mesmo em 2015 para nomear a doença como COVID-19 ([FAO](#); [WOAH](#); [OMS, 2023b](#)). Esse documento utilizado leva em consideração vários aspectos com o intuito de evitar ofender qualquer grupo étnico, cultural e social, minimizando o impacto negativo desnecessário que possa surgir. No dia 11 de Março de 2020, o número de casos confirmados de COVID-19 já ultrapassavam 100 mil indivíduos infectados, gerando uma preocupação alarmante na OMS devido a rápida disseminação do vírus, e no mesmo dia, a OMS declara que a COVID-19 naquele momento já era uma pandemia em curso ([ECDC](#); [OMS, 2023b](#)). Dois dias depois, é declarado que a Europa tinha se tornado o epicentro da pandemia contendo mais casos e mortes relatadas do que o resto do mundo junto, com exceção da China. Naquele período 123 países e territórios já haviam sido infectados com mais de 5 mil pessoas levadas a óbito ([OMS, 2023b](#)). Já no dia 9 de abril de 2020 completou 100 dias desde os primeiros casos de “pneumonia de causa desconhecida” relatados, e já nesse período o número de casos confirmados ultrapassavam 1 milhão em todo o mundo, sendo este um aumento de mais de 10 vezes em menos de 1 mês, demonstrando a rápida capacidade de adaptação e propagação do vírus ([OMS, 2023b](#)). Entre os dias 16 de Abril e 5 de Junho de 2020 a OMS publicou novas orientações sobre medidas sociais e de saúde pública como por exemplo restrições de movimento em larga escala e o uso de máscaras para o controle da COVID-19, dando direcionamentos sobre quem deve usar máscaras, especificações de qual material devem ser feitas e quando devem ser usadas ([OMS, 2023b](#)). Meses depois, com a pandemia ainda seguindo seu curso, no dia 14 de Dezembro de 2020, as autoridades do Reino Unido relatam o surgimento da primeira variante de preocupação do SARS-CoV-2 e poucos dias depois, no dia 31 de Dezembro de 2020, a OMS

emite um relatório sobre as novas variantes que estão surgindo no Reino Unido e na África do Sul, levando em consideração os relatórios dos departamentos de segurança nacional dos dois países e da Dinamarca também. Neste documento é detalhado a resposta de saúde pública e a avaliação de risco, pois nesse período já haviam sido confirmados 79 milhões de casos de COVID-19 somando mais de 1.7 milhões de mortes espalhadas pelo mundo (UKHSA; CDC da África; DHA; OMS, 2023b). No mesmo dia a OMS divulga sua primeira validação de uso emergencial de uma vacina para a COVID-19, enfatizando a importância do acesso global e equitativo das vacinas que viriam a ser validadas, aprovadas e comercializadas (OMS, 2023b). Nos meses seguintes, mais precisamente entre o final de Fevereiro e começo de Março de 2021, começou a distribuição global das vacinas aprovadas, duas versões da vacina da AstraZeneca/ Oxford. Gana se torna o primeiro país, com exceção da Índia, a receber doses de vacina para distribuir para a população (MOHG; OMS, 2023b). No dia 1 de março de 2021 as primeiras doses da vacina foram administradas na África a partir de campanhas de vacinação destinadas a proteger os profissionais de saúde, feitas pelos governos da Costa do Marfim e de Gana (CDC-CI; MOHG; CDC da África; OMS, 2023b). A **Figura 1** apresenta uma representação esquemática-visual dos principais acontecimentos ocorridos nesse período de pandemia da COVID-19.



**Figura 1:** Representação visual, como linha do tempo, dos acontecimentos mais relevantes do primeiro ano da pandemia.

No Brasil, de acordo com a OMS, o primeiro caso registrado de contaminação pelo SARS-CoV-2 foi no dia 27 de Fevereiro de 2020 e menos de um mês depois, no dia 19 de março já possuía 100 casos e uma morte confirmada (OMS, 2023b). O vírus no país se

espalhou de uma forma muito rápida, sendo que no final do ano de 2020 o Brasil já registrava mais de mil mortes diárias, com pico de mortes diárias registradas em abril de 2021, superando mais de 4 mil óbitos, sendo a primeira aplicação da vacina em 17 de Janeiro de 2021, de acordo com a OMS (OMS, 2023b). Atualmente o Brasil registra de forma acumulada mais de 37 milhões de casos confirmados de COVID-19 e mais de 704 mil óbitos, sendo as regiões Sul e Sudeste as mais afetadas tanto em casos confirmados quanto em mortes (Ministério da Saúde, SUS). A região Sudeste possui mais de 15 milhões de casos confirmados até o presente momento, com mais de 338 mil mortes, já a região Sul registrou mais de 8 milhões de contaminações pelo vírus, o que gerou mais de 111 mil mortes (Ministério da Saúde, SUS). De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) a OMS declarou o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional referente à COVID-19 no dia 5 de Maio de 2023 (OPAS; OMS, 2023b), com mais de 13 bilhões de doses de vacinas administradas pelo mundo todo, um feito impressionante e nunca visto antes (OMS, 2023b). Entretanto, o Brasil ainda vem registrando vários novos casos de infecção por coronavírus (Ministério da Saúde), o que evidencia que ainda é necessário medidas de controle não farmacológicas, uma vez que ainda existe a possibilidade de surgimento de cepas resistentes à vacina.

## 1.2. VÍRUS DA FAMÍLIA CORONAVIRIDAE

Coronaviridae é uma família de vírus que possuem características morfológicas bem distintas por possuir virion circular e em sua estrutura mais externa, brotam projeções que podem ser comparadas a coroa solar, propriedades que levaram ao nome deste grupo de vírus (NAZ et al., 2022). Esta família de vírus foi primeiramente descrita por Tyrrell e Bynoe em 1966 em pacientes que sofriam de gripe comum (TYRRELL e BYNOE, 1966). Nos dias atuais, tem-se o conhecimento de que os coronavírus são vírus de RNA fita simples de senso positivo, envelopados e possuem genomas que podem variar de 26 kb até 32 kb, tendo a capacidade de infectar tanto seres humanos como também outros animais como civetas (SHI e HU, 2008; NAZ et al., 2022). Este grupo viral foi dividido em quatro grandes subfamílias denominadas alfa-, beta-, gamma- e delta- sendo que, desses quatro, alfa- e beta- advêm de mamíferos, principalmente de morcegos. Alfa-coronavírus podem levar a infecções assintomáticas ou causar leve sintomas de inflamação em humanos, já os Beta-coronavírus, onde se encontra o SARS-CoV-2, são conhecidos por causar doenças sérias. Os grupos

gamma- e delta- também são capazes de infectar animais, sendo originários de pássaros e porcos (NAZ et al., 2022).

Existem sete tipos de coronavírus que já foram identificados em humanos e destes sete, quatro são mais comuns, por apresentarem baixo risco a humanos saudáveis e em casos de sintomas, levarem a problemas respiratórios leves, mas podendo causar doenças crônicas em indivíduos com deficiência no sistema imunológico. Em contrapartida, os outros três tipos (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 e MERS) geram maior impacto no sistema respiratório, levando desde problemas respiratórios, até óbitos (WU et al., 2020a).

A pneumonia ascendeu como a primeira doença relacionada à Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) associada ao coronavírus do gênero Beta-coronavírus, conhecido como SARS-CoV em inglês. Este distúrbio pulmonar desempenhou um papel crucial na sua identificação, servindo como um marcador precoce, uma vez que infecções assintomáticas e sintomas de natureza gastrointestinal em crianças começaram a ser relatados recentemente (CHAN et al., 2015).

Até o presente momento, só foi identificada apenas uma cepa do vírus SARS, que emergiu em 2002 na China e causou um surto global (NAZ et al., 2022). A OMS, para distinguir esta cepa de outros coronavírus relacionados, refere-se a ela como SARS-CoV-1, a mesma possui um período de incubação de aproximadamente 5 dias (ANDERSEN et al., 2020). O surto global causado pelo SARS-CoV-1 ocasionou mais de 8 mil casos reportados de infecção com quase 800 pessoas mortas no mundo todo e desde esse período não houve casos de transmissão do SARS-CoV-1 para humanos. É importante ressaltar que, apesar de pertencerem à mesma família, o SARS-CoV-1 e o SARS-CoV-2 são vírus diferentes, por possuírem distinções genéticas bem evidentes (NAZ et al., 2022). Estudos sugerem que a fonte zoonótica desse vírus pode ser rastreada até civetas e guaxinins, sendo que as civetas podem ainda atuar como hospedeiros secundários (KAN et al., 2005). No entanto, investigações mais recentes reforçam a hipótese de que morcegos desempenham um papel central na disseminação do vírus, uma vez que morcegos do gênero *Rhinolophus* demonstraram a presença de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-1 (SHI e HU, 2008).

Coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (do inglês, Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) foi identificado pela primeira vez em um paciente, que estava hospitalizado com pneumonia e lesão renal aguda, na Arabia Saudita em Junho de 2012 (BAUERFEIND et al., 2016; MCINTOSH et al., 2023). Pouco tempo depois, em Setembro de 2012, ocorreu um segundo relato de paciente infectado por um vírus similar, que possuía 99,5% de identidade genética com o vírus identificado no primeiro paciente. Este

segundo paciente tinha viajado previamente para a Arabia Saudita, mas a progressão da infecção só ocorreu posteriormente (WISE, 2012). Estudos nas áreas da virologia e soropidemiologia realizados de 2013 à 2014 relataram a infecção do MERS-CoV em camelos dromedários (*Camelus dromedarius*), sendo estes vírus isolados dos dromedários capazes de infectar o trato respiratório de humanos (Al-TAWFIQ, 2013; AZHAR et al., 2014). Até o presente momento, todos os casos confirmados de infecção por MERS-CoV ocorreram principalmente na região do Oriente Médio, Europa, Leste Asiático, Norte da África e Estados Unidos, sendo que desde a primeira infecção, já foram reportados mais de 2.600 casos em 27 países, levando mais de 940 pessoas a óbito ([OMS](#), 2022; [ECDC](#)).

A subfamília 2C beta-coronavírus é identificada tanto em camelos quanto em seres humanos, sendo que o MERS-CoV é uma linhagem descendente dessa subfamília. Embora esteja relacionado aos vírus SARS-like, o MERS-CoV apresenta similaridades apenas com alguns poucos coronavírus encontrados em morcegos. Apesar da semelhança genômica, o MERS-CoV se diferencia dos outros beta-coronavírus humanos, como o SARS-CoV-1 e o SARS-CoV-2 (SHARIF-YAKAN e KANJ, 2014; BAUERFEIND et al., 2016; MCINTOSH et al., 2023; CHAN et al., 2015). O MERS-CoV tem a habilidade de infectar várias linhagens celulares de humanos como por exemplo, as células epiteliais respiratórias, macrófagos, células dendríticas, células renais, intestinais, hepáticas e histiócitos, além disso, estudos realizados *in vitro* sugerem que o MERS-CoV consegue infectar também linhagens celulares de primatas não humanos, morcegos, civetas, suínos, coelhos e cavalos (KINDLER et al., 2013; CHAN et al., 2014; MULLER et al., 2012). Esta capacidade de recombinar, mutar e ser transmitido entre os animais confere ao MERS-CoV o potencial de causar surtos de doenças tanto em humanos quanto em animais (MACKAY e ARDEN, 2015).

SARS-CoV-2 faz parte da espécie de coronavírus relacionados à Síndrome Respiratória Aguda Grave, sendo o mesmo, o único membro de um subgênero de vírus chamado Sarbecovírus, que é principalmente encontrado em morcegos-ferradura (*Rhinolophus mehelyi*) (GORBALENYA et al., 2020). Assim como vírus da mesma família, o SARS-CoV-2 exibe um genoma de RNA relativamente grande, possuindo aproximadamente 30.000 nucleotídeos e tendo sua replicação baseada em RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) com uma enzima de correção associada a uma exoribonuclease (ExoN) (CARABELLI et al., 2023).

Apesar do SARS-CoV-2 ter se provado um patógeno humano bem sucedido, este vírus também é considerado generalista em termos de tropismo do hospedeiro, por ser capaz de infectar uma variedade de espécies de mamíferos, incluindo visons de cativeiro e

reservatórios virais estáveis em cervos de cauda branca além de infecções acidentais de inúmeras outras espécies animais (LU et al., 2021; MARQUES et al., 2022; HALE et al., 2022; BASHOR et al., 2021). Depois que o SARS-CoV-2 infectou humanos, seus primeiros meses de evolução foram determinados pelas alterações fenotípicas e pela adaptação limitada em relação à sua evolução posterior, sendo a primeira mudança notável a única substituição de um resíduo de aminoácido da proteína spike (D614G), que aconteceu no início da pandemia e proporcionou uma vantagem de replicação de aproximadamente 20%, quando comparado às variantes anteriores (MACLEAN et al., 2020; VOLZ et al., 2020). A primeira indicação do potencial do vírus de aumentar sua transmissibilidade em humanos foi demonstrada com a linhagem estabelecida como D614G (linhagem PANGO B.1) que rapidamente se tornou dominante na Europa (O'TOOLE et al., 2022).

A proteína spike do SARS-CoV-2 possui características importantes que lhe permitem uma transmissão eficiente de humano para humano. Uma dessas propriedades é sua ligação com a enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2) humana, o seu receptor na célula hospedeira, e o local de clivagem da furina polibásica (FCS) na junção S1-S2. Sendo importante mencionar que atualmente o S1-S2 FCS é único entre os sarbecovírus, apesar de sequências análogas já terem sido observadas em outros beta-coronavírus (PEACOCK et al., 2021; HOFFMANN et al., 2020).

A evolução de vírus de RNA ocorre em escalas de tempo comparáveis com a dinâmica ecológica (mobilidade humana, mudanças no número de indivíduos infectados ao longo do tempo e perfis de imunidade) e eventos de transmissão do vírus. Como consequência, os processos epidemiológicos e as mudanças ecológicas e evolutivas impactam umas às outras, sendo esta, uma característica dos vírus de RNA genômico (PYBUS e RAMBAUT, 2009). A maioria das mutações geradas pela evolução é perdida durante os estreitos gargalos impostos pelo ambiente, embora algumas dessas mutações sejam transmitidas ao acaso, sem vantagem seletiva (CLARKE et al., 1993). Estudos estimam que a taxa de mutação do SARS-CoV-2 seja em torno de  $1 \times 10^{-6}$  ou  $2 \times 10^{-6}$  mutações por nucleotídeo por ciclo de replicação, sendo essas estimativas consistentes com estimativas anteriores de outros beta-coronavírus (SANJUAN et al., 2010; FEHR e PERLMAN, 2015; AMICONE et al., 2022). Essas taxas de mutação são inferiores às taxas típicas para outros vírus de RNA, como por exemplo o vírus da imunodeficiência humana (HIV, aproximadamente  $10^{-4} \times 10^{-6}$  mutações por nucleotídeo por ciclo de replicação) e o vírus da hepatite C (HCV, aproximadamente  $10^{-5} \times 10^{-6}$  mutações por nucleotídeo por ciclo de replicação), sendo que o HIV, ao contrário dos coronavírus, não possuem um mecanismo de

revisão de 3' exonuclease na sua maquinaria de replicação (FEHR e PERLMAN, 2015; MINSKAIA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2012; RAWSON et al., 2015).

Até o presente momento cinco variantes do SARS-CoV-2 foram consideradas variantes de preocupação pela OMS, sendo elas a Alfa (linhagem PANGO B.1.1.7, Beta (B.1.351), Gama (P.1), Delta (sublinhagem B.1.617.2/AY) e as várias sub linhagens da Omicron (sublinhagens B.1.1.529/BA, como BA.1, BA.2 e BA.5). Alfa, Beta e Gama foram dominantes regionalmente na Europa, África do Sul e América do Sul, e Delta e Omicron se tornaram dominantes globalmente (O'TOOLE et al., 2022; CARABELLI et al., 2023). Subsequentemente ficou evidente que o SARS-CoV-2 é um vírus generalista com a habilidade de utilizar a proteína receptora de membrana ACE2 de diferentes mamíferos para entrada na célula, permitindo seu tropismo em uma ampla gama de animais (MACLEAN et al., 2020; CONCEIÇÃO et al., 2020; DELAUNE et al., 2021).

O SARS-CoV-2 tem circulado na população humana por um período de três anos, infectando centenas de milhões de indivíduos. Apesar disso, continua sendo um vírus humano relativamente novo, em constante evolução e adquirindo adaptações para o novo hospedeiro. Nesse contexto, torna-se essencial uma vigilância abrangente para detecção ágil de novas Variantes de Interesse (VOIs) entre indivíduos e comunidades, antes que se propaguem de maneira mais ampla, sendo a principal preocupação de escape às vacinas utilizadas mundialmente.

### **1.3. UTILIZAÇÃO DAS RIBOZIMAS COMO FERRAMENTA PARA APLICAÇÃO NA SAÚDE**

Os primeiros exemplares da atividade de clivagem de RNAs se deu no início dos anos 1980, precisamente em 1982 Thomas R. Cech e seu grupo perceberam, em análises *in vitro*, que o precursor do RNA ribossômico de *Tetrahymena thermophila* possui um intron com capacidade de auto clivagem sem a necessidade de energia externa ou enzima. Ainda em 1982 o termo ribozima foi cunhado por Kelly e colaboradores (KRUGER et al., 1982). Posteriormente, Altman e colaboradores demonstraram que o componente de RNA da RNase P de *Escherichia coli*, sem necessidade de fatores protéicos, foi capaz de processar o precursor de tRNA. Os dois pesquisadores compartilharam o prêmio Nobel de Química em 1989 pela descoberta do mecanismo de auto-splicing de introns (KRUGER et al., 1982; GUERRIER-TAKADA et al., 1983).

As ribozimas são moléculas de RNA fita simples e não codificadoras. Atuando em trans a partir do pareamento de bases do tipo Watson-Crick, elas podem se ligar à sequência de RNA alvo, o qual será clivado pela hidrólise das ligações fosfodiéster. Além disso, ribozimas apresentam outras funções intracelulares como na síntese proteica pela formação da ligação peptídica catalisada pelo RNA ribossomal da subunidade maior do ribossomo (PUERTA-FERNÁNDEZ et al., 2003).

De forma sucinta, as ribozimas se concatenam com o RNA alvo, adquirindo uma estrutura secundária, a qual ativa sua atividade de clivagem intrínseca de hidrólise da ligação fosfodiéster. Após a etapa de clivagem a ribozima dissocia-se do transcrito alvo e este ciclo pode recomeçar novamente. Ribozimas podem agir não somente em trans, mas também em cis (auto-clivagem) no contexto dos processos de supressão da transcrição gênica (FUKUSHIMA et al., 2009). Tais propriedades singulares das ribozimas na identificação e clivagem, de modo sequência-específica, no processo de inativação de RNAs alvo, fizeram com que já no início dos anos 2000, as ribozimas fossem vistas como promissoras ferramentas de silenciamento gênico, identificação molecular, entre outras funcionalidades (DOUDNA e CECH, 2002).

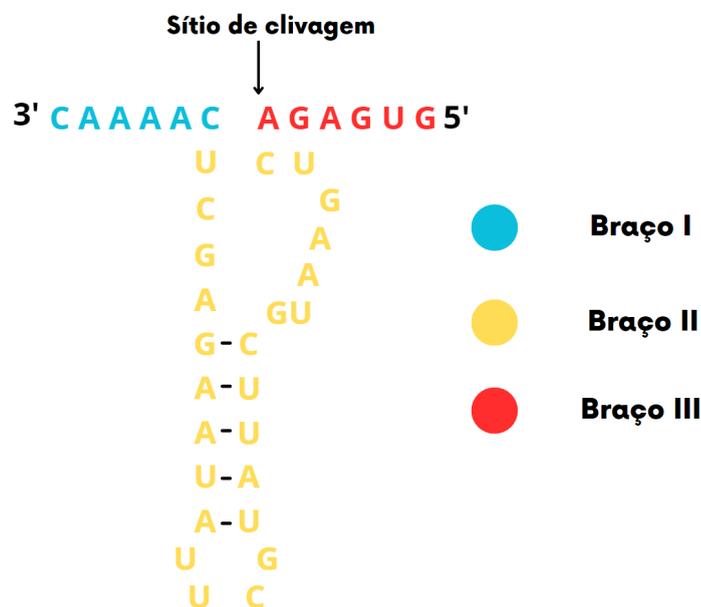
De forma natural, já foram encontrados sete tipos de RNAs catalíticos sendo que, as ribozimas podem ser divididas em três grupos quando comparado sua estrutura e função, sendo estes grupos chamados de Ribonuclease P (RNase P), íntrons de auto-splicing e pequenos RNAs catalíticos (FUKUSHIMA et al., 2009). Pequenos RNAs de tamanho entre 50 e 150 nucleotídeos realizam a reação de auto-clivagem específica como ribozimas do tipo *hammerhead*, satélite *Neurospora Varkud*, *hairpin* e ribozimas do vírus da hepatite delta (HDV) e podem ser encontradas de forma natural em genomas virais de RNA, agentes subvirais e virusóides (DOUDNA e CECH, 2002; TANNER e CECH, 1995). Apesar das ribozimas presentes neste grupo apresentarem funções similares a enzimas como por exemplo proteinases, ribozimas afetam somente as ligações fosfodiéster a partir do mapeamento de bases e outras interações e desta forma, conseguem determinar o local de corte dentro da região alvo (FEDOR e WILLIAMSON, 2005). Os grandes RNAs catalíticos como a RNase P e os grupos I e II de íntrons possuem uma faixa de tamanho que varia de poucas centenas até 3000 nucleotídeos (CECH, 1993; TANNER, 1999). Entretanto, ainda não foi completamente elucidado a relação de tamanho e o mecanismo de ação dos RNAs catalíticos. N.K Tanner menciona em seu artigo que é possível que o tamanho e mecanismos de ação de grandes RNAs catalíticos sejam necessários para aproximar, elementos distantes do substrato, do sítio de atividade. Já os pequenos RNAs catalíticos não “sofreriam” desta questão e puderam

evoluir sítios de atividades menores. Porém Tanner também menciona que é possível que esta relação de tamanho e sítio de atividade possa ter surgido ao acaso (TANNER, 1999).

Dentro do grupo de pequenos RNAs catalíticos, as ribozimas do tipo *hammerhead* são pequenas moléculas de RNA fita simples com capacidade de auto clivagem e atividade de endonuclease de sequência específica. Essas são as mais estudadas, podendo ser facilmente manipuladas para manter a especificidade e ter sua atividade de clivagem regulada (HUANG et al., 2019; ZHANG e BURKE, 2005). Sua estrutura consiste em três braços chamados de I, II e III, como demonstrado na **Figura 2**. Em sua estrutura o importante é a existência de um núcleo de clivagem de aproximadamente 11 nucleotídeos de tamanho, sendo que este tem uma região de reconhecimento do substrato possuindo duas sequências em ambos os lados da região a ser clivada, as sequências dos braços I e III (LUCIER et al., 2006). As ribozimas do tipo *hammerhead* são consideradas por alguns pesquisadores os “clivadores” mais notáveis de RNA para atividades de edição gênica além de serem frequentemente utilizadas em variados estudos de processos de inibição viral (STOBART et al., 2009; NAZARI et al., 2008; FENG et al., 2000; MITSUYASU et al., 2009; TANG et al., 1994). Até o presente momento, doze tipos distintos de ribozimas *hammerhead* foram encontradas em uma variedade de animais, sendo alguns destes, dois tipos de camundongos e musaranhos, três tipos de ratos, cavalos, elefantes, cães, vacas, ornitorrincos e ouriços, mas também podem ser encontradas de forma natural em vários viróides e vírus de planta (MARTICK et al., 2008; DE LA PEÑA et al., 2017).

Em um estudo realizado em 2012 encontrou-se que a auto-divisão realizada por esses RNAs necessita de uma sequência de no mínimo 50 nucleotídeos, que podem ser constituídas em uma estrutura secundária que lembra um martelo, sendo que a maior parte das sequências conservadas estão presentes no sítio de clivagem da ribozima com o único requerimento para a quebra do substrato sendo a presença de uma sequência GUC (HAMMANN et al., 2012). Para a obtenção de uma ribozima alvo-específica, é necessário projetar as sequências dos braços I e III usando o RNA alvo como molde para o desenho e levando em consideração as regras de pareamento de bases do tipo Watson-Crick e, nas circunstâncias favoráveis, as ribozimas só se ligam aos RNAs que tenham sequências perfeitamente complementares aos braços I e III, que flanqueiam o trinucleotídeo GUC (AMARZGUIOUI et al., 1998). Essa ajustabilidade tanto dos braços I e III quanto da região da tripla base (GUC) possibilita que as ribozimas sejam projetadas para identificar e clivar qualquer alvo de RNA, o que se tornou ainda mais fácil com o surgimento de programas especializados no desenho de ribozimas.

Desta forma, ao longo dos anos, as ribozimas foram usadas em diversas áreas e com diferentes propostas, com algumas dessas aplicações sendo: fármacos usados no tratamento contra ondas epidêmicas de SARS-CoV e outros vírus como o vírus da hepatite murina (MHV) (FUKUSHIMA et al., 2009); interruptores para controle da expressão gênica em mamíferos (AUSLÄNDER e FUSSENEGGER, 2017); engenharia metabólica para detecção de metabólitos em células vivas (YOU et al., 2019); melhoramento de plantas a partir de engenharia genética avançada (ČERMÁK et al., 2017) e, mais recentemente, foi utilizada para identificação rápida e sensível de pequenas biomoléculas (WENXING et al., 2023) e também como possível futura ferramenta diagnóstica para aplicações biomédicas (CARDADOR et al., 2023).



**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura funcional de Ribozimas do tipo *Hammerhead*. As cores azul, amarelo e vermelho indicam os braços I, II e III, respectivamente e a seta preta indica o sítio de clivagem.

#### 1.4. FRET-HCR E SUA APLICAÇÃO

O método de Transferência de Energia Fluorescente por Ressonância (FRET, sigla em inglês), foi descrito primeiramente por Theodor Förster em 1946 (FÖRSTER, 1948). FRET é um fenômeno físico no qual um fluoróforo doador em seu estado excitado transfere sua energia de excitação de forma não radiativa, ou seja, ocorre via acoplamento dipolo-dipolo de longo alcance, para um fluoróforo aceptor em estado eletrônico fundamental, fazendo com que o cromóforo aceptor emita sua fluorescência característica (FÖRSTER, 1948;

JARES-ERIJMAN e JOVIN, 2003). Para que o FRET ocorra entre dois fluoróforos é preciso que os mesmos estejam próximos um do outro e tenham sobreposição substancial (>30%) entre os espectros de emissão do doador e de absorção do acceptor e sua eficiência está estritamente relacionada com a distância e orientação relativa entre os fluoróforos, o número de aceptores próximos de cada doador e grau de sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do acceptor (ZACCOLO, 2004).

FRET é altamente sensível à distância entre o doador e o acceptor e sua faixa típica de distância é de alguns nanômetros, variando de 2 até aproximadamente 10 nm com alguns pares de fluoróforos podendo chegar até 20 nm em casos especiais e devido a essas características, biossensores baseados em FRET foram extensamente adotados como réguas espectroscópicas, permitindo assim, que pesquisadores monitorem uma variedade de atividades bioquímicas, como por exemplo, mudanças conformacionais de moléculas, atividades enzimáticas, concentrações iônicas intra e intercelulares e interações proteína-proteína (ZACCOLO, 2004; JARES-ERIJMAN e JOVIN, 2003; MIYAWAKI, 2011; LAM et al., 2012; PREVO e PETERMAN, 2014; ALGAR et al., 2019; WU et al., 2020b). As sondas de doadores e aceptores que tem a capacidade de realizar o FRET são divididas em quatro categorias principais, sendo exemplos, proteínas fluorescentes (POPE et al., 2020), pontos quânticos (LIU et al., 2020), lantanídeos (PILCH-WROBEL et al., 2022) e corantes fluorescentes orgânicos (do inglês, organic fluorescent dyes, OFDs) (GRAZON et al., 2022), que é a categoria de fluoróforo utilizada neste estudo.

Os OFDs são indicadores fluorescentes mais comumente utilizados por possuírem vantagens como boa repetibilidade, nenhuma radiação e rápida detecção. São conjuntos de fluoróforos, onde a maioria possuem grupos reativos que possibilitam a ligação de algumas biomoléculas por meio de ligações covalentes. Os principais e mais comumente OFDs utilizados são a rodamina, fluoresceína e acridina e têm sido empregados em diversas aplicações como melhoramento de contraste em imagens de amostras biológicas em microscopia de fluorescência (FANG et al., 2023). Uma ampla gama de OFDs estão disponíveis para variadas aplicações e podem ser combinados com outras categorias de sondas para atender diferentes necessidades (FANG et al., 2023). Corantes de cianina também é um grupo que é bastante utilizado em reações FRET, entre as quais Cy3, Cy5, Cy5.5 e Cy7 são pares de fluoróforos frequentemente utilizados como doadores e aceptores.

A utilização de FRET traz vantagens únicas quando comparado a técnicas de fluorescência normais convencionais em aplicações práticas. A primeira vantagem é a alta sensibilidade devido a extrema suscetibilidade relacionada a mudanças na distância entre os

fluoróforos. A segunda vantagem é a visualização dinâmica pois o FRET só ocorre nas condições específicas entre doador e acceptor além de que mudanças na intensidade de fluorescência tanto do doador como do acceptor podem ser observadas em tempo real. A terceira vantagem é uma forte aptidão anti-interferência, uma vez que o FRET é um sistema duplo de fluoróforos, a eficiência de seu sinal é maximizada somente quando é irradiado luz com o comprimento de onda de excitação específico, sendo mais forte que a aptidão anti-interferência de fluorescências tradicionais. Por último, a quarta vantagem se dá no efeito de escalonamento de sinal único, pois aplicando esta técnica a sistemas de hibridação de ácidos nucleicos é possível alcançar um aumento notável da fluorescência do acceptor, o que não ocorre em sistemas comuns de fluorescência por utilizarem apenas uma única fonte de fluorescência (FANG et al., 2023).

Assim, a técnica de reação de hibridação em cadeia (do inglês, hybridization chain reaction, HCR) foi proposta como uma inovação metodológica visando amplificar o sinal a partir da utilização de sondas. Neste contexto, duas sondas de DNA, com estrutura secundária em formato de grampo, que exibem regiões complementares e encontram-se marcadas com fluoróforos diferentes são utilizadas. Na presença de um alvo iniciador, tais sondas se unem de maneira concatenada, formando uma estrutura de dupla fita de DNA mais extensa. Desta forma, com um sinal de fluorescência aumentado devido a amplificação, é possível detectar a presença do alvo (DIRKS e PIERCE, 2004; CHOI e PIERCE, 2014). Esta metodologia necessita de etapas de lavagem para retirar sondas não ligantes e é especialmente utilizada em hibridações *in situ*. Visando otimizar esse processo e ampliar as funcionalidades da metodologia, diferentes estudos acrescentaram a reação FRET à técnica levando a metodologia FRET-HCR (HUANG et al., 2016; CHOI et al., 2018; GUO et al., 2019).

## 1.5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Nos primeiros dias da pandemia, quando ainda não existia a disponibilidade de fontes físicas de ácidos nucleicos genéticos virais, Corman et al., 2020 propôs o uso de RT-qPCR como forma de identificação do SARS-CoV-2. Apesar de o RT-qPCR ser apontado como padrão ouro, esta técnica possui algumas exigências que podem limitá-la, como a demanda por equipamentos e profissionais especializados, tempo considerável para executar os procedimentos, elevado custo e a demanda por logística de distribuição e armazenamento refrigerada em consequência da instabilidade térmica das enzimas.

Desta forma, os testes rápidos de antígenos, baseados na imunocromatografia de fluxo lateral, revelaram-se como testes altamente específicos, sensíveis e de baixo custo. O órgão governamental americano que regulamenta as questões envolvendo Alimentos e Medicamentos (FDA do inglês, Food and Drug Administration) viabilizou o uso emergencial desses testes no país (CDC, 2022 CDC, 2023b) como os testes de auto-administração e testes capazes de detectar o SARS-CoV-2, tais como o teste de antígenos que foram projetados para uso à beira do leito (CDC, 2022 CDC, 2023b). Contudo, testes fundamentados em antígenos, quando comparados com o RT-qPCR, possuem baixa sensibilidade (CDC, 2023b).

No Brasil, devido a infecção pela variante Omicron, testes rápidos de antígenos foram avaliados em indivíduos assintomáticos e sintomáticos (BEZERRA et al., 2022). Os resultados deste estudo indicaram que, na situação de baixa carga viral, mesmo com alta especificidade e um amplo uso de variados testes de antígenos à beira do leito, esses geram resultados incertos e não confiáveis (BEZERRA et al., 2022).

Como alternativa para superar as dificuldades inerentes aos testes de antígeno, métodos fundamentados em LAMP, foram propostos (KITAGAWA et al., 2020; LAMB et al., 2020; YU et al., 2020). Nessa metodologia LAMP, é utilizada uma enzima isotérmica com atividade de transcrição reversa (RT-LAMP), necessitando de instrumentos de aquecimento básico para a execução da reação isotérmica, cuja leitura do resultado dá-se por um teste visual de turbidez da solução dependente da presença do RNA viral (KITAGAWA et al., 2020). Subsequentemente, visando aperfeiçoar o RT-LAMP, uma metodologia que possibilita o monitoramento da reação de amplificação pela alteração de cor da solução foi desenvolvida e designada ILACO (YU et al., 2020). Além disso, o método de diagnóstico embasado em CRISPR-Cas descrito previamente para identificação de outros vírus (ZHANG et al., 2020; KELLNER et al., 2019) foi atualmente ajustado para identificar o RNA do SARS-CoV-2 e foi denominado SHERLOCK (do inglês, Specific high-sensitivity enzyme reporter unlocking) (KELLNER et al., 2019). Nesse método o RNA viral é detectado pelo complexo Cas13 e RNA guia, por complementaridade deste último ao genoma viral, assim a Cas13 assume atividade promíscua que permite a clivagem de RNA repórter com fluoróforo e *quencher* separando esses e permitindo a emissão de fluorescência. A utilização da enzima Cas13 também aparece em outros métodos diagnósticos, como uma metodologia denominada CARMEN (do inglês, Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids) e é baseada em relações combinatórias em arranjo para avaliação multiplexada de ácidos nucleicos (ACKERMAN et al., 2020). Também foi desenvolvido o STOP-Covid (detecção SHERLOCK em um tubo) visando simplificar esses testes por meio da fácil

extração de RNA viral em conjunto com amplificação isotérmica por LAMP e identificação por CRISPR-Cas12b (JOUNG et al., 2020). Além disso, foi proposto a metodologia ERASE (do inglês, Easy-Readout and Sensitive Enhanced) que é uma tira de fluxo lateral de fácil leitura que se baseia em CRISPR (LI et al., 2021). Na **tabela 1** é demonstrado um resumo dos diferentes métodos abordados e suas características.

**Tabela 1:** Descrição dos diferentes métodos diagnósticos abordados, com referência para cada método.

<b>Nome</b>	<b>Método de detecção</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
RT-qPCR	PCR	PCR de transcrição reversa em tempo real	Corman et al., 2020
RT-LAMP	Transcriptase reversa e amplificação isotérmica mediada por LOOP	cDNA é sintetizado a partir do RNA viral utilizando transcriptase reversa, seguido de amplificação de DNA sob condições isotérmicas em uma etapa.	KITAGAWA et al., 2020
ILACO	Método isotérmico baseado em LAMP	Sistema LAMP acoplado a um indicador de pH presente na reação permitindo a leitura de amplificação por mudança de cor	YU et al., 2020
SHERLOCK	CRISPR-Cas13a e amplificação da polimerase recombinase	Combinando a especificidade programável da Cas13 com uma molécula repórter que é ativada no reconhecimento do alvo, resultando em uma indicação da presença ou quantidade de um ácido nucleico	KELLNER et al., 2019

CARMEN	CRISPR-Cas13	Baseada em relações combinatórias em arranjo para avaliação multiplexada de ácidos nucleicos	ACKERMAN et al., 2020
STOP-COVID	CRISPR-Cas12b	Extração de RNA viral em conjunto com amplificação isotérmica por LAMP e identificação por CRISPR-Cas12b	JOUNG et al., 2020
ERASE	CRISPR-Cas13a	Tira de fluxo lateral de fácil leitura que se baseia em CRISPR	LI et al., 2021
DETECTOR	CRISPR-Cas12	Realiza transcrição reversa simultânea e amplificação isotérmica usando RT-LAMP seguido por detecção de Cas12 de sequências predefinidas de coronavírus com a clivagem de uma molécula repórter confirmando a detecção	BROUGHTON et al., 2020

Observa-se que as abordagens atuais para a detecção precoce do SARS-CoV-2 necessitam de atividade de enzimas sensíveis às condições de transporte, armazenamento e um tempo prolongado de execução das técnicas. Tal situação pode comprometer a propagação e a adoção desses métodos diagnósticos à beira do leito, especialmente em países de dimensões continentais, particularmente em regiões rurais dotadas de estruturas de saúde precárias. Portanto, a imperatividade do desenvolvimento de novos métodos diagnósticos capazes de superar os desafios associados aos métodos atuais é de suma importância.

Tendo em consideração as vantagens distintas de FRET-HCR devido a realização eficiente de uma única etapa juntamente com identificação precisa e específica da molécula alvo a partir de uma sonda molecular marcada com fluoróforo, neste estudo, é proposto o uso de ribozimas para identificar e clivar o RNA viral do SARS-CoV-2, bem como a utilização de

*hairpins* de DNA devidamente marcados com fluoróforos de cianina 3/ cianina 5 (Cy3/Cy5) para gerar uma reação de hibridação em cadeia (HCR) baseada na transferência de energia fluorescente por ressonância (FRET-HCR) para amplificação inicial do sinal (CHOI e PIERCE, 2014; HUANG et al., 2016; KHARMA et al., 2015; WU et al., 2020b).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

A presente proposta visa desenvolver um método diagnóstico sensível e de fácil manuseio, isento de atividade enzimática dependente de efetores termo-sensíveis e de equipamentos e mão de obra especializados. Nossa metodologia propõe o uso de ribozimas tendo como alvo o RNA do SARS-CoV-2 e empregando as propriedades de moléculas metaestáveis de DNA *hairpins* marcadas com fluoróforos Cy3/Cy5. Esse sistema promove uma reação de hibridação em cadeia que resulta em um polímero de moléculas fluorogênicas as quais desencadeiam a transferência de energia fluorescente por ressonância (FRET-HCR), gerando um sinal detectável mesmo que partindo de uma baixa carga viral. Tal teste seria para uso na fase inicial da infecção por SARS-CoV-2, a qual pode requerer um ensaio sensível.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificação da região genômica viral de interesse para ser usada como alvo;
- Desenho e síntese de sequências de DNA a serem submetidas à transcrição *in vitro* para obtenção de ribozimas e também da sequência de DNA alvo transcrita em RNA viral alvo;
- Clonagem das sequências de DNA sintetizadas em vetores apropriados;
- Transcrição *in vitro* das ribozimas e do RNA alvo;
- Desenho e síntese de pares de moléculas repórter de grampos DNA metaestáveis com fluoróforos capazes de realizar transferência de fluorescência por ressonância;
- Avaliação da atividade das ribozima quanto a identificação e clivagem do RNA de SARS-CoV-2;
- Análise *in vitro* da funcionalidade do método diagnóstico para COVID-19 através de detecção de fluorescência (Avaliação da atividade de FRET-HCR).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS GENÔMICOS

A seleção inicial da sequência genômica do SARS-CoV-2 que será utilizada para avaliação da atividade de clivagem das ribozimas foi embasada em um alvo previamente utilizado com sucesso (HOU et al., 2020). Além disso o banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/sars-cov-2-seqs/>) em conjunto com o uso do software de livre acesso MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), permitiu o alinhamento de aproximadamente 16.000 sequências genômicas do SARS-CoV-2, possibilitando a análise desta região de interesse. Para o alinhamento, foram selecionados os parâmetros padrão, com exceção do parâmetro ‘formato de saída’ que foi escolhido ‘formato clustal classificado’ e o parâmetro ‘estratégia’ que foi definida como FFT-NS-2. Visando retirar sequências que também são consensuais para outros vírus, foi realizado o alinhamento desta região de interesse com sequências de outros vírus de RNA como os das famílias MERS e SARS, que são parentes próximos do SARS-CoV-2. Portanto, identificou-se uma sequência consensual e específica para o SARS-CoV-2 de 400 nt localizada na ORF1ab, diferente das sequências encontradas em outros vírus de RNA, tornando-a a escolha apropriada como sequência alvo para as ribozimas. Todos os alinhamentos foram visualizados utilizando o software de livre acesso Jalview (<https://www.jalview.org/>).

#### 3.2. DESENHO RACIONAL DE RIBOZIMAS E MOLÉCULAS REPÓRTERES DE DNA

O programa Ribosoft foi utilizado para o desenho das ribozimas do tipo *hammerhead* de acordo com os parâmetros padrão, com exceção do parâmetro “ambiente de destino” que foi marcado: *in vivo*, *Homo sapiens* (taxonomia 9606, espécie 9606) utilizando o conjunto GRCh38,p12 e selecionando o método de especificidade “clivagem” (KHARMA et al., 2015; <https://ribosoft2.fungalgenomics.ca/>). Utilizando as pontuações de especificidade, acessibilidade, estrutura e ponto de clivagem e a sequência de RNA de 400 nt como alvo, três ribozimas do tipo *hammerhead* foram escolhidas e nomeadas 1, 2 e 3.

Uma análise de fita única (do inglês, Single Strand -SS-) foi conduzida visando definir, dentro do alvo de RNA de 400 nt, a região complementar à primeira molécula de DNA repórter *hairpin* (H1). A análise indicou uma sequência com maior pontuação SS, sendo esta de 18 nt, e a partir desta sequência selecionada, foi elaborado o primeiro conjunto

de moléculas de DNA repórter *hairpin* (H1 e H2) visando a complementaridade à sequência de 18 nt. Foi projetado um segundo conjunto do par de H1 e H2 de forma complementar ao fragmento de RNA gerado pela atividade de clivagem das ribozimas 1 e 3. Para avaliar a interação dos pares de H1 e H2 entre eles e com o alvo de RNA, análises *in silico* foram realizadas utilizando o programa NUPACK (ANG e YUNG, 2016; ZADEH et al., 2011; <http://www.nupack.org/>), conforme os parâmetros a seguir: DNA, Compute Melt: ligado, Temp min: 25°C, Incremento: 6°C, Temp máx: 37°C, Na+: 0.75 M, 3 filamentos e tamanho máximo do complexo 3 e concentração das moléculas em 100 nM cada uma das três (alvo, H1 e H2). As moléculas foram sintetizadas pela IDT (Coralville, Iowa, EUA), H1 contendo fluoróforo Cy3 na extremidade 5' e H2 com o fluoróforo Cy5 posicionado na extremidade 3'. Na **Tabela 2** é apresentado as sequências dos DNA *hairpins*, das ribozimas e do RNA alvo de 400 nt. Na **Tabela 3** é mostrado as pontuações das ribozimas geradas pelo Ribosoft.

**Tabela 2:** Identificação das sequências das moléculas de DNA ou RNA utilizadas nos ensaios.

Nome	Sequência (5' → 3')	Nº de NT
ORF1ab	UUAGAUUAUGAAUUC ACAGGGACUACUCCCA CCCAAGAAUAGCAUAG AUGCCUCAAACUCAA CAUUAUUUGUUGGGU GUUGGUGGCAAACCUU GUAUCAAGUAGCCAC UGUACAGUC UAAAUG UCAGAUGUAAAGUGCA CAUCAGUAGUC UUACU CUCAGUUUUGCAACAA CUCAGAGUAGAAUCAU CAUCUAAAUUGUGGGC UCAUGUGUC CAGUUA CACAAUGACAUUCUCU UAGCUAAAGAUACUAC UGAAGCCUUGAAAAA AUGGUUUCACUACUUU CUGUUUUGCUUCCAU GCAGGGUGCUGUAGAC AUAACAAGCUUUGUG AAGAAAUGCUGGACAA CAGGGCAACCUUACAA GCUAUAGCCUCAGAGU	400

	UUAGUCCCCUCCAUC	
Ribozima 1 *	CAAACUGAGAAUAGU AACUGAUGAGUCGCUG AAAUGCGACGAAACUA CU	50
Ribozima 2 *	GUCAUUGUGUAAUAAC UGCUGAUGAGUCGCUG AAAUGCGACGAAACAC AUUGAGCCCA	58
Ribozima 3 *	ACAUCUGACAAAUUUU UACUGAUGAGUCGCUG AAAUGCGACGAAACUG UAC	51
Sequência alvo 18.C.1	AGTTTAGTTCCTTCCAT	18
H1.18.C.1 *	ATGGAAGGGAACTAAA CTTGTGATAGTTTAGTT CCC	36
H2.18.C.1 *	AGTTTAGTTCCTTCCAT GGGAACTAAACTATCAC A	36
Sequência alvo R46-1.E *	GATGTAAAGTGCACATC A	18
H1.R46-1.E *	TGATGTGCACTTTACAT CTGTGATGATGTAAAGT GC	36
H2.R46-1.E	GATGTAAAGTGCACATC AGCACTTTACATCATCA CA	36

\* As cores vermelho, verde e azul, representam o local de anelamento das ribozimas 1,2 e 3, respectivamente. A | representa o sítio de clivagem na molécula de RNA alvo e a cor laranja identifica a sequência loop.

**Tabela 3:** - Parâmetros obtidos pelo software RiboSoft para cada uma das ribozimas utilizadas neste estudo.

<b>Ribozima</b>	<b>Pontuação de Especificidade</b>	<b>Pontuação de acessibilidade</b>	<b>Pontuação de estrutura</b>
<b>1</b>	<b>5081.81</b>	<b>7.1</b>	<b>13.38</b>
<b>2</b>	<b>1534.499</b>	<b>9.6</b>	<b>33.009</b>
<b>3</b>	<b>2352.182</b>	<b>5.9</b>	<b>15.86</b>

### **3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA RIBOZIMA**

A partir das sequências das três ribozimas do tipo *hammerhead* e o alvo viral de RNA de 400 nt, sequências de DNA com o promotor T7 foram sintetizadas, para cada uma das moléculas, pela empresa GenScript (Piscataway, New Jersey, USA). Utilizando o kit InFusion HD EcoDry Cloning (Takara Bio, San Jose, California, USA), estas sequências de DNA, foram então, introduzidas no vetor de clonagem pBluescript SK (+) seguido de transformação em bactéria termo-competente (XL-10 Gold). Foram adquiridos quatro vetores distintos, sendo eles pBluescript SK (+)\_Rz1, pBluescript SK (+)\_Rz2, pBluescript SK (+)\_Rz3, e pBluescript SK (+)\_target. Desta forma, utilizando o MEGAshortscript T7 Transcription kit (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) e seguindo as instruções do fabricante, os transcritos das ribozimas e do alvo de RNA foram obtidos separadamente a partir de transcrição *in vitro*. Os transcritos foram quantificados, analisados por eletroforese em gel de agarose e incubados em -80°C até o uso.

Reações de atividade das ribozimas foram realizadas de acordo com as descrições de Tang et al., 1994. Brevemente, em uma proporção de 1:10, cada uma das três ribozimas foram misturadas separadamente à molécula de RNA de 400 nt em tampão de reação de ribozima contendo 50 mM Tris pH 8.0 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) e 20 mM MgCl<sub>2</sub> (Dinâmica, Indaiatuba, São Paulo, Brazil). As soluções foram incubadas a 50°C por 2,5 horas. Todas as análises foram conduzidas de forma independente em replicatas biológicas e duplicatas técnicas, tendo como controle negativo a reação na ausência de ribozimas. Os produtos dessa reação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando brometo de etídio para a visualização. O marcador molecular utilizado foi 50 bp DNA Ladder (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA).

### 3.4. TESTE DE AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE SINAL BASEADO EM FRET-HCR

Visando aferir o sinal de FRET-HCR, foi utilizado o tampão de hibridação de DNA composto por citrato de sódio salino 5X (do inglês, SSC 5X) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) para diluir separadamente as moléculas de DNA *hairpin* (H1 e H2). Deste modo, as moléculas *hairpin* foram aquecidas até 95°C por 5 minutos e posteriormente, para retomarem suas estruturas originais, foram resfriadas à temperatura ambiente por 40 minutos. A ausência da molécula alvo/iniciadora constitui o controle negativo do experimento.

No intuito de caracterizar os parâmetros ideais para os ensaios de FRET-HCR, no primeiro momento os ensaios foram executados utilizando a molécula de DNA iniciadora de 18 nt, sintetizada pela empresa GenScript (Piscataway, New Jersey, USA). Foram empregadas diferentes concentrações finais das moléculas de DNA iniciador de 18 nt, em tampão SSC 5X e SSCT 5X. As concentrações utilizadas foram 6000 nM, 600 nM, 400 nM e 200 nM. As moléculas de DNA iniciador de 18 nt, foram então, misturadas com as moléculas *hairpin* H1 e H2, ambas em concentração final de 600 nM e posteriormente, foram transferidas para uma placa preta de 96 poços da Greiner. As amostras foram examinadas em três diferentes espectrofluorímetros à 27°C: fluorímetro de fase multifrequencial K2 (ISS, Champaign, Illinois, USA) acoplado ao leitor de placas de micropoços K428; Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) e leitora de microplacas multimodo SpectraMax M3 (Molecular Devices, San Jose, California, USA). Utilizando o Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) e a leitora de microplacas multimodo SpectraMax M3 (Molecular Devices, San Jose, California, USA) em ensaios FRET-HCR, também foram analisadas as moléculas de RNA iniciador de 18 nt diluídas em tampão SSC 5X, sintetizadas pela empresa GenScript (Piscataway, New Jersey, USA).

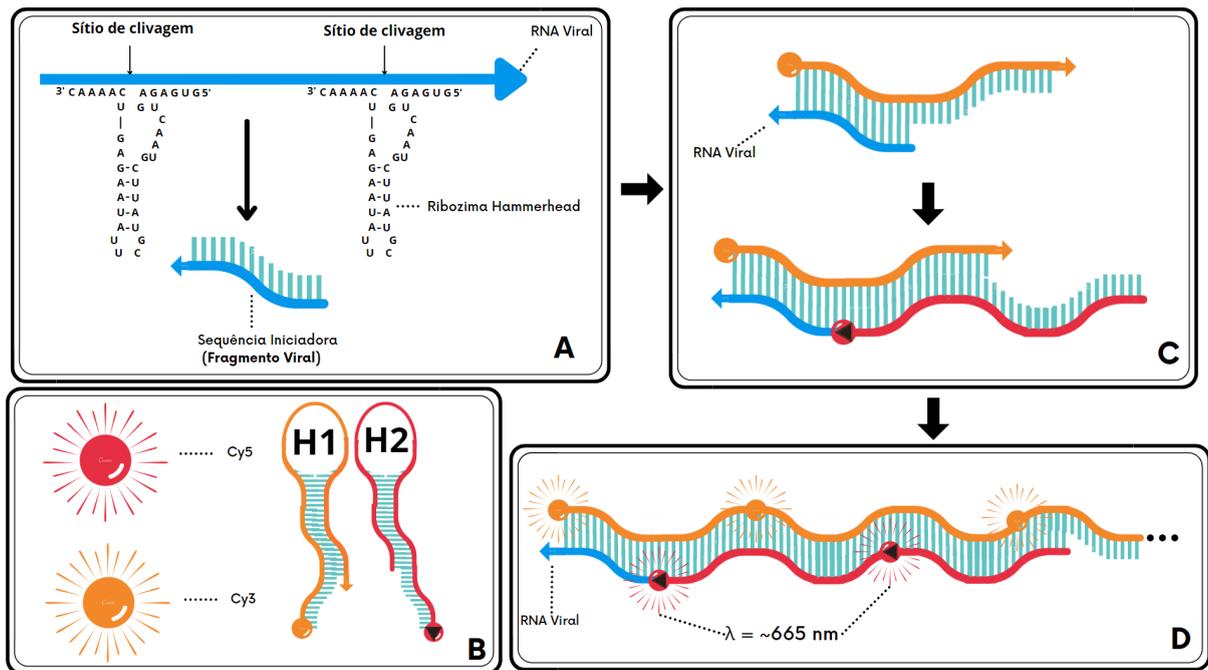
Visando avaliar o método diagnóstico, foram utilizados os produtos resultantes da clivagem das ribozimas, correspondentes a molécula de RNA de 400 nt, mais um ou dois conjuntos de H1 e H2 em concentração final de 600 nM, misturados em proporção 2:1:1 em volume total de 100 µl de tampão SSC 5X, como descrito previamente (HUANG et al., 2016). A molécula de RNA iniciadora de 18 nt diluída em tampão de clivagem de ribozima foi usada como controle positivo. Logo após o ensaio de clivagem pela ribozima, as reações FRET-HCR foram montadas e o espectro fluorescente foi lido e gravado a 27°C pela leitora de microplacas multimodo SpectraMax M3 (Molecular Devices, San Jose, California, USA).

Com excitação em 547 nm e emissão de 557 até 750 nm, que correspondem ao comprimento de onda de excitação e emissão dos fluoróforos doadores e aceptores, respectivamente, os sinais do espectro de fluorescência do FRET-HCR foram monitorados e registrados. Todos os ensaios foram executados independentemente, em duplicata e em diferentes dias experimentais.

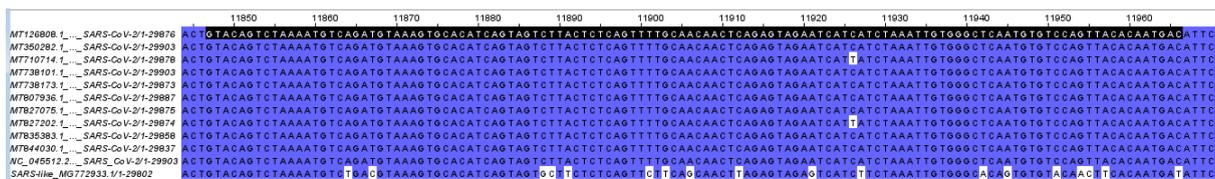
## 4. RESULTADOS

### 4.1 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA SARS-CoV-2

A **Figura 3** apresenta um esquema que descreve o método diagnóstico proposto para detectar o RNA viral do SARS-CoV-2. A primeira etapa fundamenta-se na identificação e clivagem do RNA genômico viral pelas ribozimas do tipo *hammerhead*. Para cada uma das ribozimas selecionadas, seus respectivos sítios-alvo de atividade precisam ser regiões específicas e conservadas apenas para a sequência genômica do SARS-CoV-2. Por este motivo, a sequência alvo do SARS-CoV-2 foi escolhida baseada em estudos prévios (HOU et al., 2020). Em seguida, foi realizado o alinhamento genômico das diferentes cepas com o intuito de verificar a concordância da sequência alvo com as variantes do SARS-CoV-2. Visando remover as sequências que também são consensuais para outros vírus, como vírus das famílias MERS e SARS e outros vírus de humanos, a sequência escolhida foi alinhada e comparada a essas outras sequências (**Fig. 4**). Assim, foi selecionado como sequência alvo uma região de 400 nt da ORF1ab, consenso para variantes do SARS-CoV-2 e diferente das sequências virais de outras famílias/grupos como os da MERS e SARS. Para o método diagnóstico proposto essa sequência será reconhecida e clivada pelas ribozimas do tipo *hammerhead*, resultando na liberação do fragmento de RNA denominado da sequência iniciadora. Todas as sequências da molécula de RNA alvo de 400 nt e das ribozimas são apresentadas na **Tabela 2**.



**Figura 3:** Representação esquemática das principais etapas de reação do método diagnóstico para SARS-CoV-2. (A) Reação de detecção e clivagem do alvo de RNA viral pelas ribozimas do tipo *hammerhead*, resultando na liberação do fragmento de RNA iniciador. (B) Representação esquemática de duas moléculas de DNA repórter contendo diferentes fluoróforos, H1-Cy3 (Cianina 3) e H2-Cy5 (Cianina 5). (C) Hibridação da sequência iniciadora à molécula de DNA repórter H1 e sua respectiva desnaturação em fita simples, levando à associação com a molécula complementar de DNA repórter H2, que também é desnaturada em fita simples. (D) Formação de um polímero a partir da concatenação das moléculas H1 e H2, resultando no FRET-HCR que amplifica o sinal de detecção do RNA viral.



**Figura 4:** Alinhamento de seqüências nucleotídicas de genomas de 10 variantes do SARS-CoV-2 e de outros vírus semelhantes aos da SARS, usando o programa de livre acesso MAFFT. A primeira linha (de preto) indica a seqüência usada como modelo para síntese das ribozimas. Os nucleotídeos mostrados em cor e pontos brancos indicam polimorfismo de nucleotídeo único (SNP).

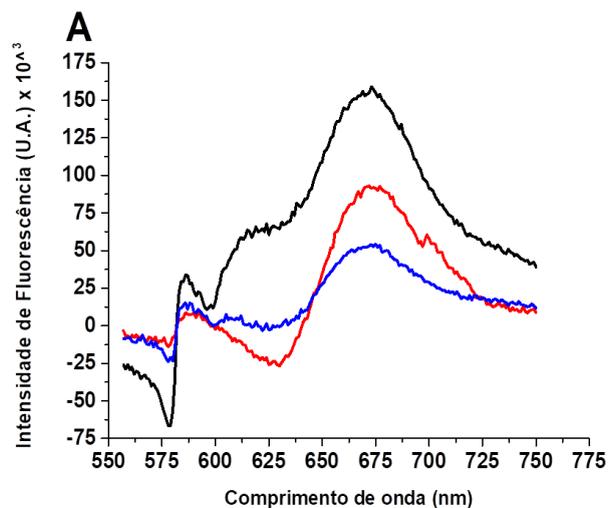
O segundo estágio do processo consiste na concatenação deste fragmento de RNA viral iniciador, liberado pela atividade das ribozimas, com dois *hairpins* de DNA metaestáveis (H1 e H2), sendo cada um deles ligados a fluoróforos doadores (Cianina 3, Cy3) e fluoróforos aceptores (Cianina 5, Cy5), respectivamente (**Fig. 3**). O comprimento de onda de 547 nm excita o fluoróforo doador, e este, com a energia de sua banda de emissão,

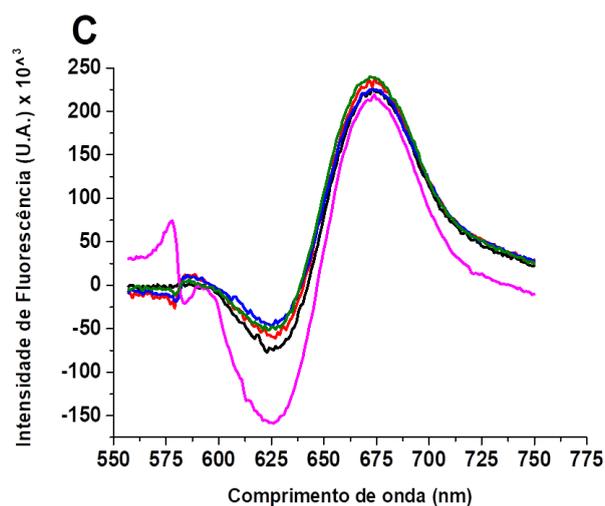
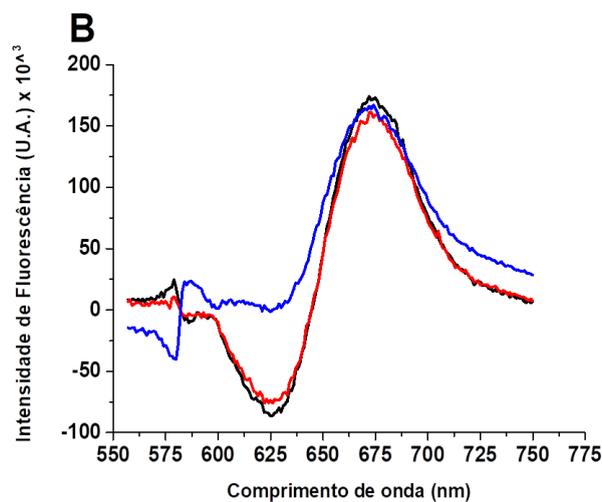
transfere a energia ao fluoróforo acceptor, resultando assim, no aumento da intensidade de sua respectiva banda de emissão à ~675 nm. A interação, por complementaridade com a sequência estendida (toehold + stem) de H1, entre o fragmento de RNA viral iniciador e o primeiro DNA *hairpin* (H1), ocasiona a abertura de H1. Esta mudança estrutural em H1, por consequência, ocasiona a abertura do segundo DNA *hairpin* (H2), levando a hibridação de H1 e H2 por complementaridade entre as sequências estendidas. Atendendo as condições necessárias para o correto funcionamento da reação FRET, as sondas H1 e H2 foram desenhadas para conter os seus respectivos fluoróforos posicionados, após a reação de hibridação, perto um do outro (**Fig. 3**). A terceira etapa consiste no aumento do sinal fluorescente no comprimento de onda do acceptor (~675 nm) devido a formação de um polímero bidimensional ocasionado pela hibridação em cadeia das moléculas H1 e H2. A sensibilidade do método é aumentada graças a esta reação de polimerização em cadeia, que permite a detecção de pequenas quantidades do RNA viral (**Fig. 3**). No método diagnóstico proposto, o sinal de fluorescência de emissão será calculado como uma proporção em relação ao controle negativo, que corresponde aos ensaios FRET-HCR sem a presença do fragmento da molécula iniciadora relativa ao RNA viral alvo.

## 4.2 DETECÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE SINAL BASEADO EM FRET-HCR

A partir do alvo de RNA de 400 nt do vírus SARS-CoV-2, uma sequência de 18 nt, identificada com a pontuação mais alta de probabilidade de estar em fita simples (ss) pelo programa NUPACK, foi usada como molécula iniciadora para reação de hibridação em cadeia do primeiro par de moléculas de DNA *hairpin* (H1 e H2). Então, o primeiro conjunto de H1 e H2 foi desenhado em concordância com critérios descritos em estudos prévios (ANG e YUNG, 2016). Em seguida, o programa NUPACK foi utilizado para avaliar os desenhos desse par de moléculas. A seleção do par ideal de H1 e H2 foi feita baseando-se nos resultados gerados pelo NUPACK e levando em consideração o potencial de ligação com o fragmento iniciador. Desta forma, o primeiro par de moléculas repórteres de DNA *hairpin* foi projetado para conter os fluoróforos Cy3 e Cy5 nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Diferentes experimentos independentes foram realizados para verificar a ocorrência de FRET-HCR. Nesses ensaios, diferentes variáveis foram avaliadas, como, diferentes fluorímetros, concentração das moléculas e tampões. O tampão SSC 5X, que é o tampão utilizado na reação FRET-HCR, foi usado nos testes iniciais para diluir as moléculas de DNA iniciadoras. Três concentrações finais diferentes, 200 nM, 400 nM e 600 nM da molécula de

DNA iniciadora de 18 nt foram avaliadas para o ensaio de FRET-HCR (**Fig. 5**). O sinal de fluorescência negativo é decorrente da subtração do espectro da amostra de controle negativo (sem a molécula de DNA iniciadora) de todos os espectros analisados. Os valores médios dos espectros mostram bandas de emissão, do fluoróforo doador, decrescentes e intensidade máxima de fluorescência do fluoróforo acceptor em ~670 nm nos três a cinco experimentos independentes com H1 e H2 em todas as concentrações avaliadas, em tampão SSC 5X com Tween (SSCT 5X) (**Fig. 5**). Contudo, para as concentrações 200 nM e 400 nM a variação entre os experimentos realizados em dias independentes foi mais alta do que quando a concentração final das moléculas foi igual a 600 nM. O sinal FRET-HCR mais alto foi obtido a partir do espectro fluorescente de H1, H2 e o DNA alvo de 18 nt na concentração de 600 nM (**Fig. 5**), com um nítido decréscimo e aumento da intensidade das bandas de emissão do doador e do acceptor, respectivamente. A concentração final de 600 nM foi escolhida para os ensaios seguintes já que foi obtido sinal mais alto e mais similar para as análises realizadas em dias diferentes.

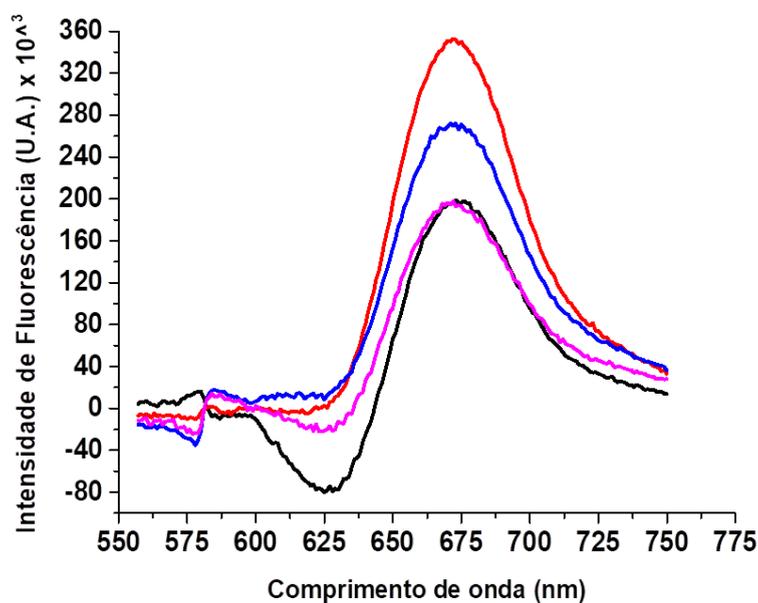




**Figura 5:** Ensaio de FRET-HCR empregando diferentes concentrações da molécula sintética de DNA iniciadora (18 nt). Emissão da intensidade de fluorescência da transferência de energia fluorescente por ressonância (FRET-HCR) de H1 (600 nM) para H2 (600 nM) mediado pela reação de hibridação em cadeia. Ensaio de FRET-HCR empregando as concentrações de 200 nM (A), 300 nm (B) e 600 nM (C) da molécula de DNA iniciadora de 18 nt em tampão SSCT 5X. Cada linha colorida representa o espectro fluorescente de experimentos independentes e duplicatas técnicas. Todos os espectros analisados foram obtidos após a subtração do espectro da amostra controle (sem molécula iniciadora), o que resultou em sinal fluorescente negativo.

A molécula de DNA iniciadora de 18 nucleotídeos na concentração final de 600 nM, foi então, utilizada na etapa subsequente dos ensaios de otimização, visando analisar a eficiência da reação FRET-HCR em tampão SSC 5X, na ausência do reagente Tween.

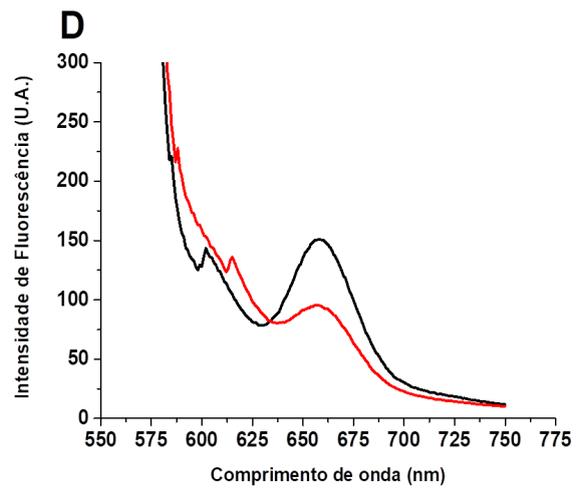
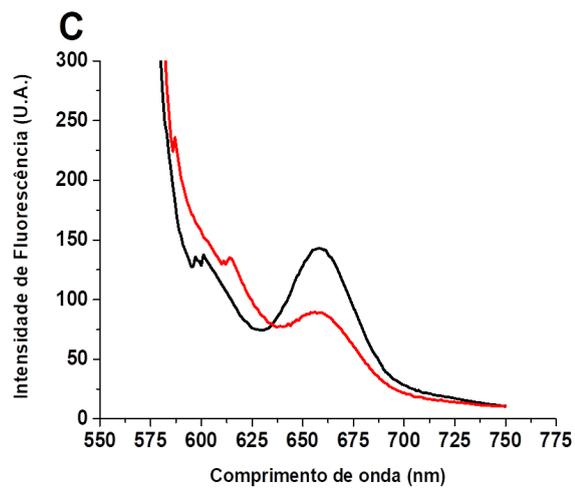
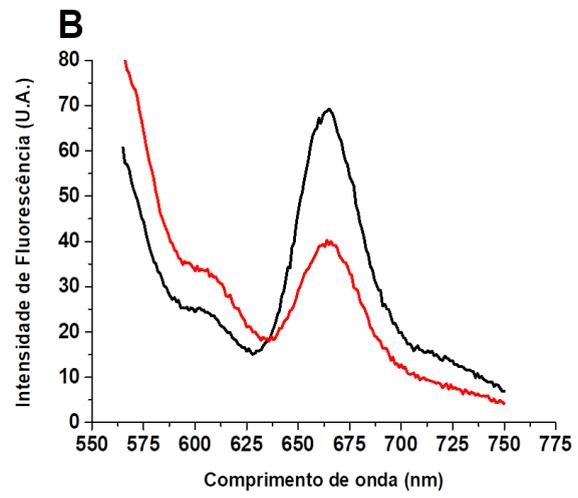
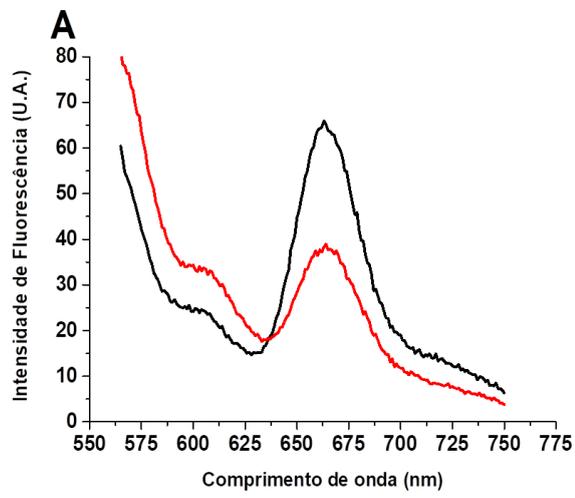
Os resultados indicaram que no tampão SSC 5X, sem a presença do reagente Tween, o sinal de FRET-HCR, foi maior em comparação às análises feitas usando o tampão SSCT 5X na presença do reagente (**Fig. 6**).

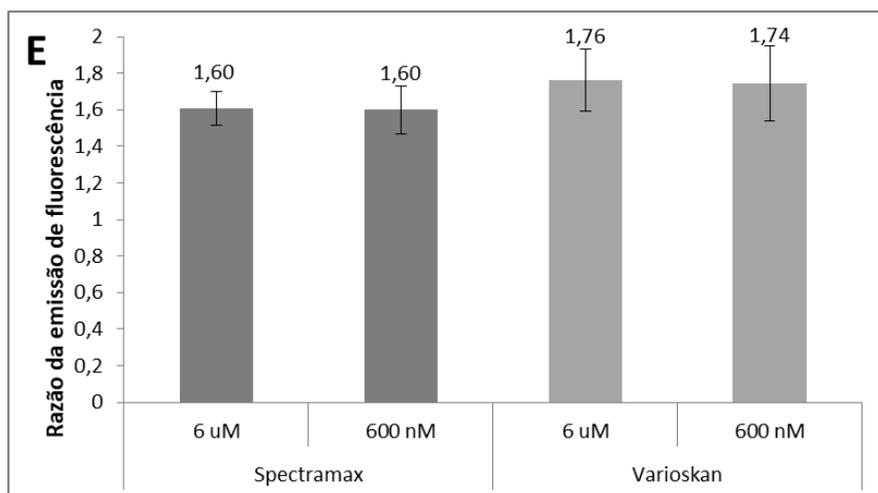


**Figura 6:** Ensaio de FRET-HCR em tampão SSC. Emissão da intensidade de fluorescência da transferência de energia fluorescente por ressonância (FRET-HCR) de H1 para H2 mediado pela reação de hibridação em cadeia a 600 nM de H1, H2 e a molécula sintética de DNA iniciadora de 18 nt em tampão SSC 5X. Cada linha colorida representa o espectro de fluorescência de experimentos independentes e duplicatas técnicas. Todos os espectros analisados foram obtidos após a subtração do espectro da amostra controle (sem molécula iniciadora), o que resultou na aparição de sinal fluorescente negativo.

O equipamento K2, um fluorímetro com sensibilidade alta e que necessita de mão de obra especializada, foi utilizado inicialmente para verificar a eficiência dos ensaios FRET-HCR, como ilustrados nas **Figuras 5 e 6**. Entretanto, as mesmas análises foram realizadas nos equipamentos Varioskan LUX e no SpectraMax M3 visando cumprir um dos objetivos deste estudo, que é o desenvolvimento de um método diagnóstico independente de equipamentos e mão de obra especializadas. Em consequência da baixa sensibilidade destes dois fluorímetros, em comparação com o K2, foram avaliadas duas concentrações distintas das moléculas de DNA iniciadoras de 18 nt, 600 nM, a concentração previamente escolhida e 6000 nM, concentração 10 vezes maior. Os espectros de todos os ensaios avaliados são exibidos juntos com os espectros dos respectivos controle negativo, que não contêm a molécula iniciadora. O sinal de emissão de fluorescência em aproximadamente 670 nm (**Fig.**

7) indicou que o ensaio de FRET-HCR, nos equipamentos menos sensíveis, aconteceu de forma similar aos obtidos no K2, o espectrofluorímetro mais sensível e especializado.

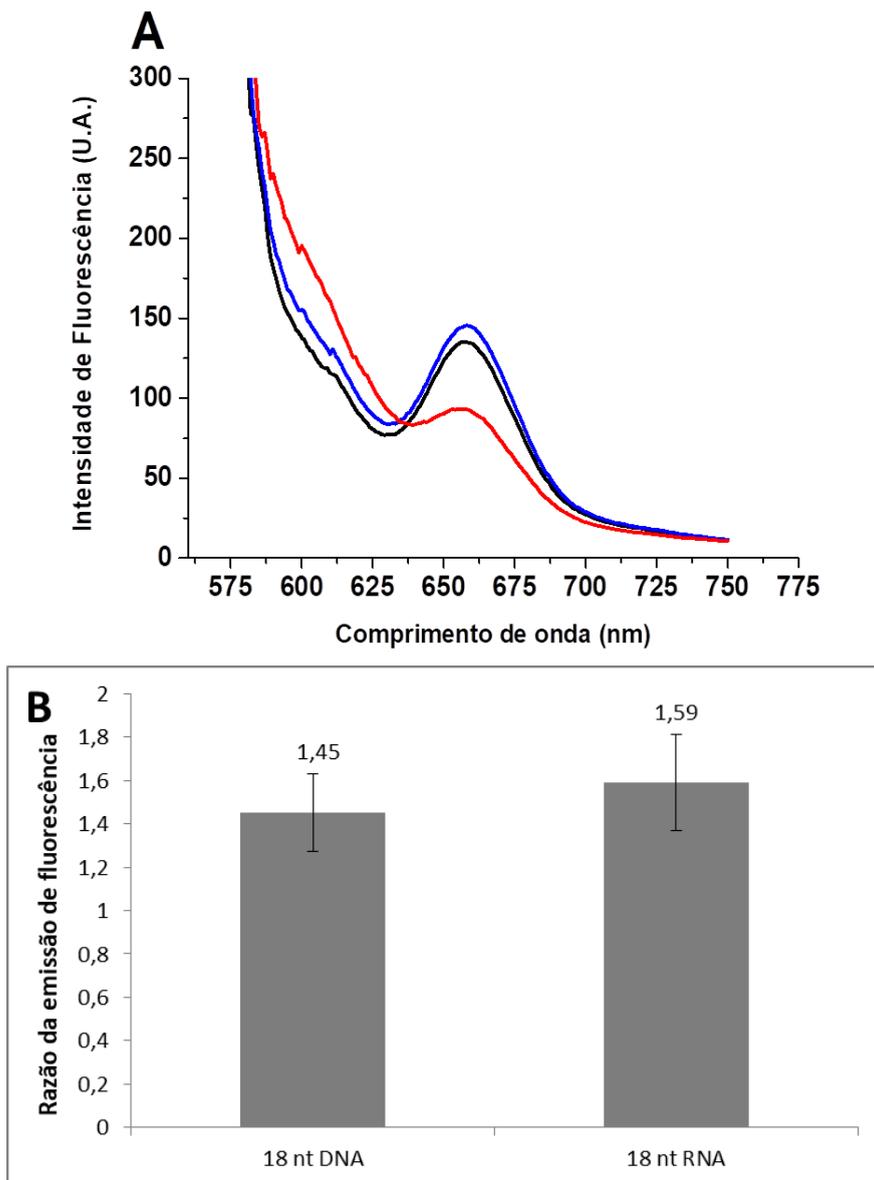




**Figura 7:** Ensaio de FRET-HCR empregando duas concentrações diferentes e dois espectrofotômetros diferentes. Emissão média da intensidade de fluorescência da transferência de energia entre H1 (600 nM) e H2 (600 nM) mediado pela reação de hibridação em cadeia à 6000 nM (A e C) e 600 nM (B e D) da molécula sintética de DNA iniciadora de 18 nt em tampão SSC 5X (linha preta). (A) e (B) são espectros de fluorescência obtidos no fluorímetro Varioskan e (C) e (D) são espectros de fluorescência obtidos no fluorímetro SpectraMax. Como controle negativo não há molécula iniciadora (linha vermelha). Gráfico de barras mostrando a razão entre a média e o desvio padrão da emissão de maior intensidade de fluorescência após ensaios FRET-HCR com 6  $\mu$ M e 600 nM de H1, H2 e a molécula de DNA iniciadora de 18 nt (E). Ensaios foram realizados em duplicatas técnicas em três dias independentes.

Mais importante ainda, de acordo com os gráficos de barras, os ensaios FRET-HCR demonstraram que a razão do sinal de intensidade de fluorescência com o controle negativo foi de  $1,6 \pm 0,09$  e  $1,7 \pm 0,16$  nas duas concentrações finais analisadas, 600 nM e 6000 nM, no SpectraMax e no Varioskan, respectivamente. Desta forma, os resultados sugerem que mesmo considerando a variação na sensibilidade dos equipamentos, o sinal FRET-HCR é detectável em baixas concentrações (600 nM) em equipamentos menos sensíveis.

Tendo em mente que o genoma do SARS-CoV-2 é de RNA e não de DNA, as etapas subsequentes do ensaio FRET-HCR foram executadas usando o RNA do SARS-CoV-2 de 18 nt na concentração final de 600 nM como molécula iniciadora, tendo H1 e H2 em tampão SSC 5X em SpectraMax M3 (Fig. 8). Como demonstrado pelo gráfico de barras, os resultados indicam que o sinal FRET-HCR ocorreu de forma similar, quando comparado com a molécula de DNA de 18 nt, tendo emissão de fluorescência do aceptor em  $\sim 670$  nm, sendo esta emissão,  $1,6 \pm 0,22$  vezes maior que o controle negativo (Fig. 8). Por ter tido resultados muito semelhantes, o SpectraMax M3 foi o equipamento selecionado para as análises futuras por ser um equipamento de manuseio simples, sem a exigência de mão de obra especializada em comparação com os espectrofluorímetros K2 e o Varioskan LUX.

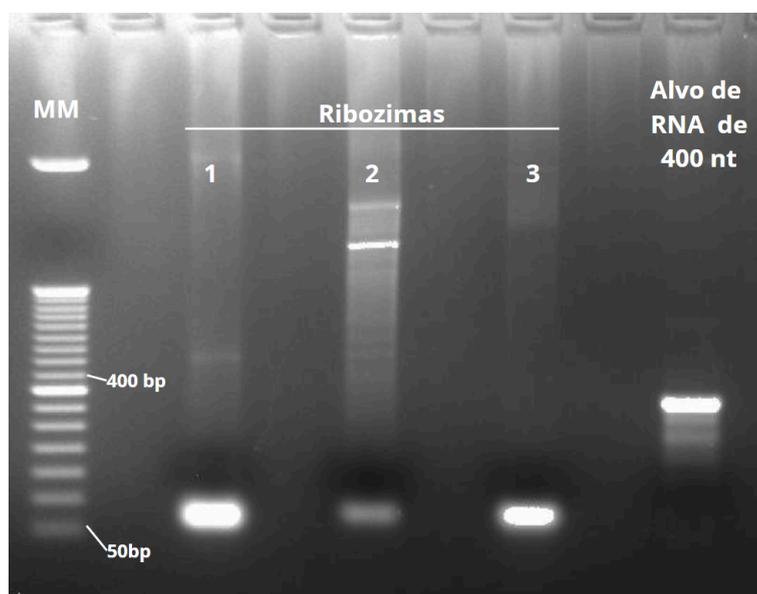


**Figura 8:** Ensaio de FRET-HCR empregando DNA e RNA como molécula sintética iniciadora. Emissão média da intensidade de fluorescência da transferência de energia entre H1 e H2 mediado pela reação de hibridação em cadeia à 600 nM de H1, H2 e a molécula de RNA iniciadora de 18 nt em tampão SSC 5X (linha preta) (A). Controle positivo consiste de DNA iniciador de 18 nt na mesma concentração da molécula de RNA iniciador de 18 nt (600 nM) é indicado como linha azul. Controle negativo na ausência da molécula iniciadora é indicado como linha vermelha. Gráfico de barras mostra a média e o desvio padrão da emissão de maior intensidade de fluorescência após ensaios FRET-HCR com as moléculas de DNA e RNA iniciadoras de 18 nt, e sem nenhuma molécula como controle negativo (B). Os ensaios foram realizados no SpectraMax M3 em duplicatas técnicas e em três dias independentes.

### 4.3 AVALIAÇÃO DO USO CONJUNTO DA ATIVIDADE DA RIBOZIMA E ENSAIOS FRET-HCR

Após a seleção dos parâmetros avaliados, procedeu-se à análise do método diagnóstico por completo, que combinou os ensaios de FRET-HCR seguido da reação de clivagem do RNA do SARS-CoV-2 pelas ribozimas. Inicialmente, três ribozimas foram projetadas para reconhecer e clivar o RNA do vírus SARS-CoV-2, na região consenso cuja sequência foi identificada pelo uso do programa de alinhamento MAFFT (Fig. 4). Na Tabela 3 é mostrado as pontuações relacionadas ao local de clivagem, especificidade, estrutura e acessibilidade, parâmetros que foram usados para selecionar as ribozimas do tipo *hammerhead*, desenhadas pelo uso do aplicativo RiboSoft. A ribozima 2 obteve as maiores pontuações de acessibilidade e estrutura. Entretanto, de acordo com o conjunto dos parâmetros estabelecidos, a pontuação de especificidade, que é o parâmetro mais importante, pois refere-se à discriminação entre sequências inespecíficas, como as de RNAs humanos possíveis de estarem presentes nas amostras de pacientes, mostrou a maior pontuação para as ribozimas 1 e 3.

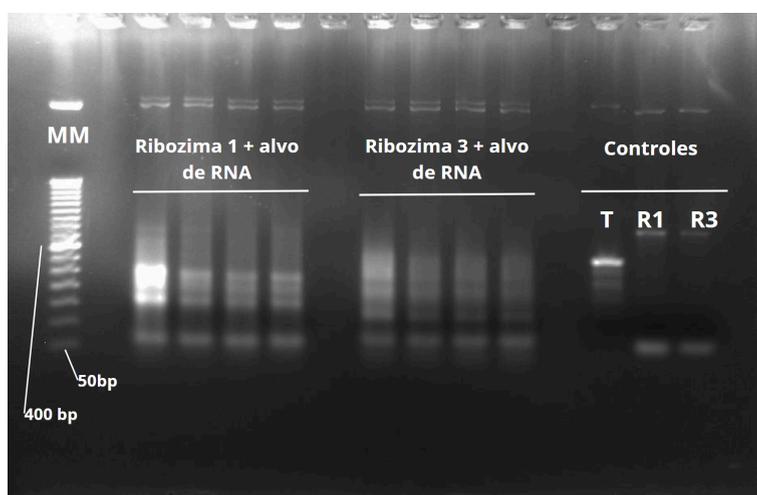
O alvo de RNA de 400 nt e as ribozimas foram clonadas no vetor pBluescript, transcritos *in vitro* e analisados por eletroforese em gel de agarose 2% (Fig. 9).



**Figura 9:** Transcrição *in vitro* do RNA alvo e ribozimas, observadas em eletroforese de gel de agarose 2%. O RNA alvo tem aproximadamente 400 nt e as ribozimas têm aproximadamente 60 nt. Marcador molecular Invitrogen 50 bp DNA Ladder.

As ribozimas foram obtidas no tamanho esperado e em grandes concentrações demonstrando uma transcrição *in vitro* bem sucedida. É relevante destacar que a ribozima 2 foi obtida em menor concentração quando comparada às ribozimas 1 e 3.

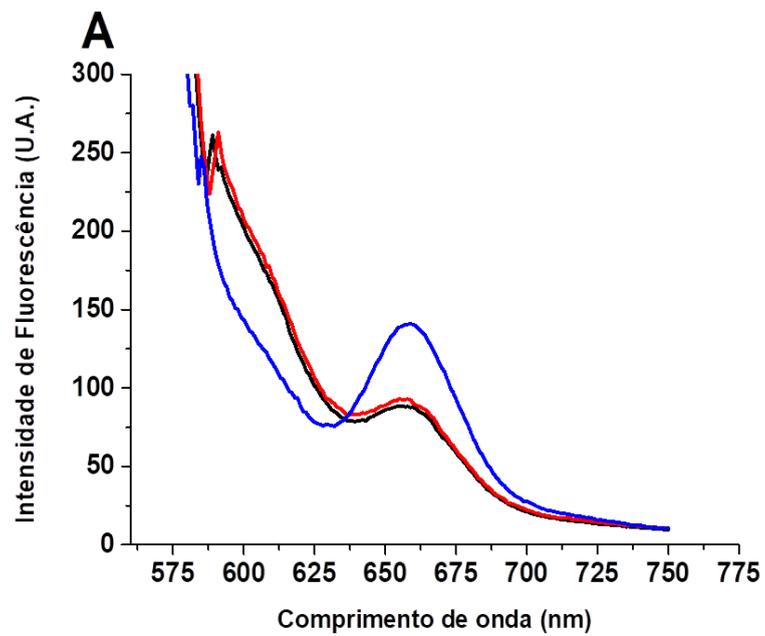
Em seguida, foi realizada a análise de atividade de clivagem das ribozimas utilizando o RNA alvo de 400 nt na proporção de 1:10 (**Fig. 10**). As ribozimas demonstraram atividade de clivagem gerando os fragmentos de RNA de tamanho esperado. Os produtos de RNA clivados esperados para a ribozima 1 são de 155 e 245 nt e para os da ribozima 3 são de 121 e 279 nt. A ribozima 2 não seguiu para os próximos testes devido a baixa taxa de transcrição e os ensaios de clivagem resultarem em diversos fragmentos de RNA inesperados (dados não mostrados).

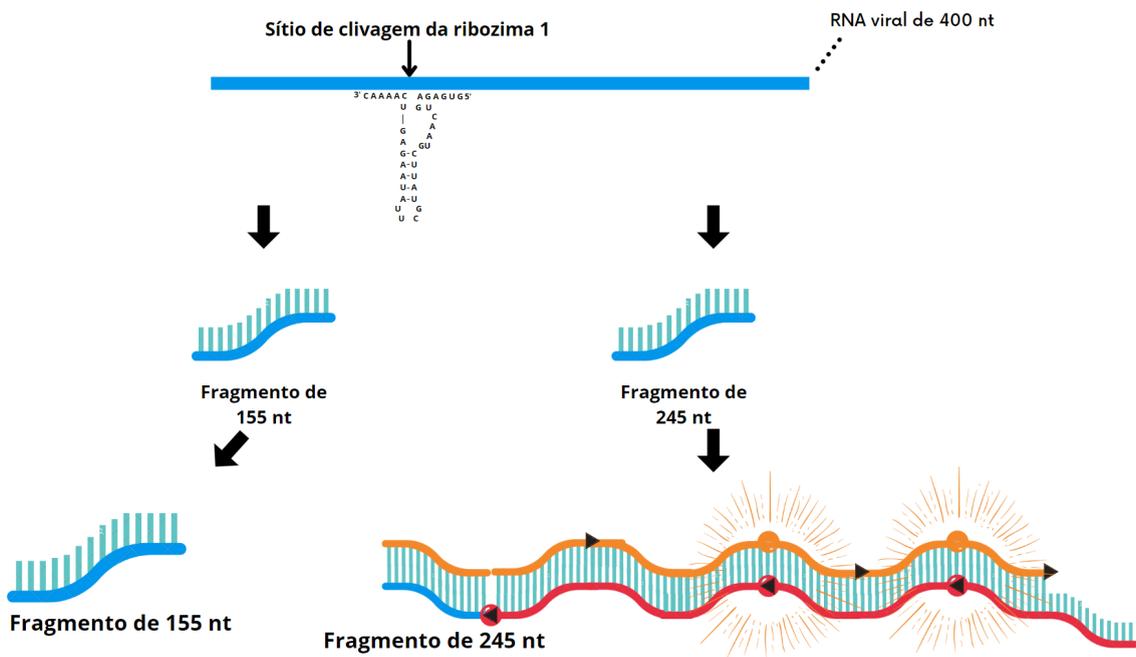
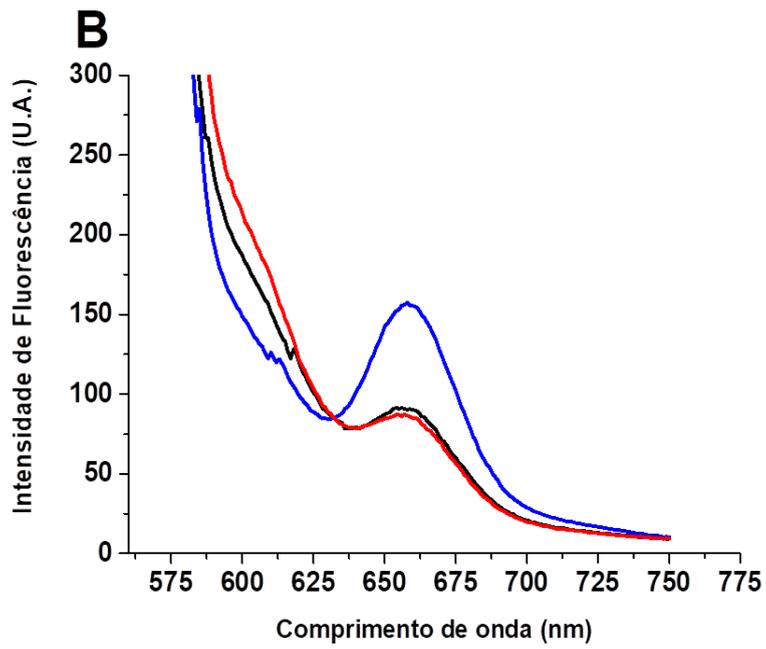


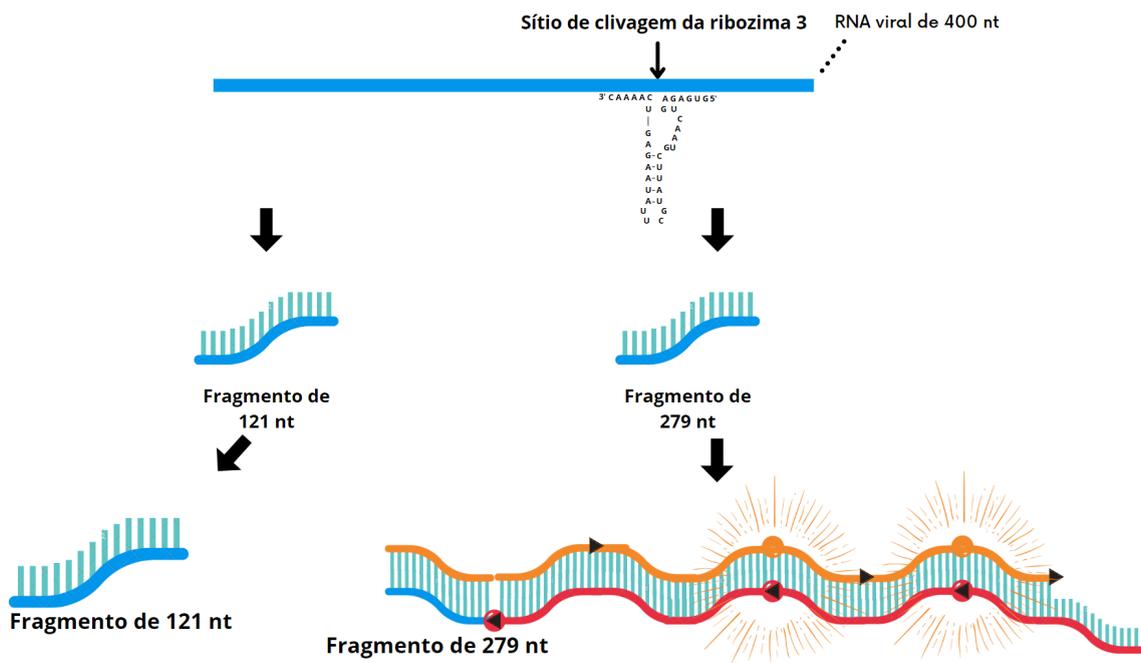
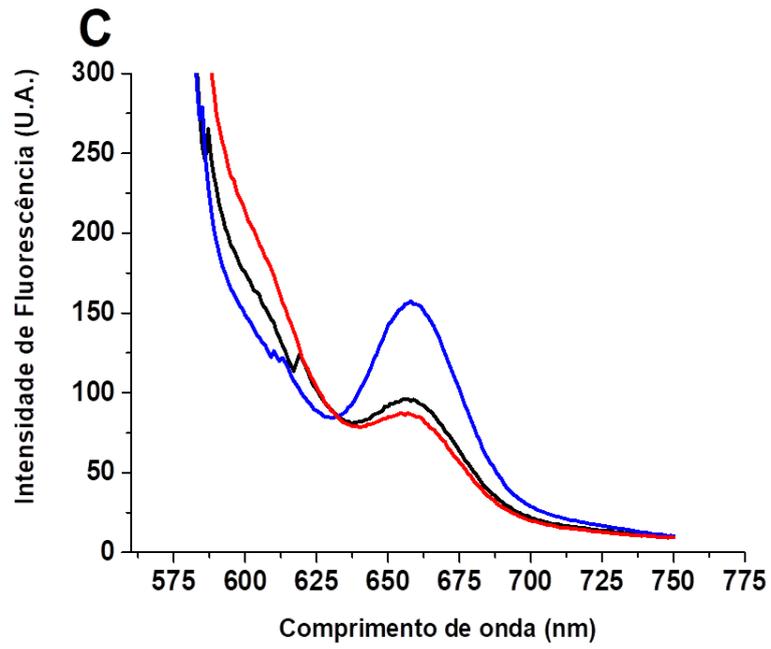
**Figura 10:** Ensaio de atividade de clivagem de ribozimas visualizadas em eletroforese em gel de agarose 2%. Fragmentos de RNA obtidos após clivagem das ribozimas 1 e 3 da molécula de RNA alvo de 400 nt. O alvo de RNA é de aproximadamente 400 nt e as ribozimas são aproximadamente 60 nt. Produtos de RNA clivados para ribozima 1 são de 155 e 245 nt e para ribozima 3 são de 121 e 279 nt. Marcador molecular (MM) usado foi o DNA Ladder de 50 bp (Invitrogen).

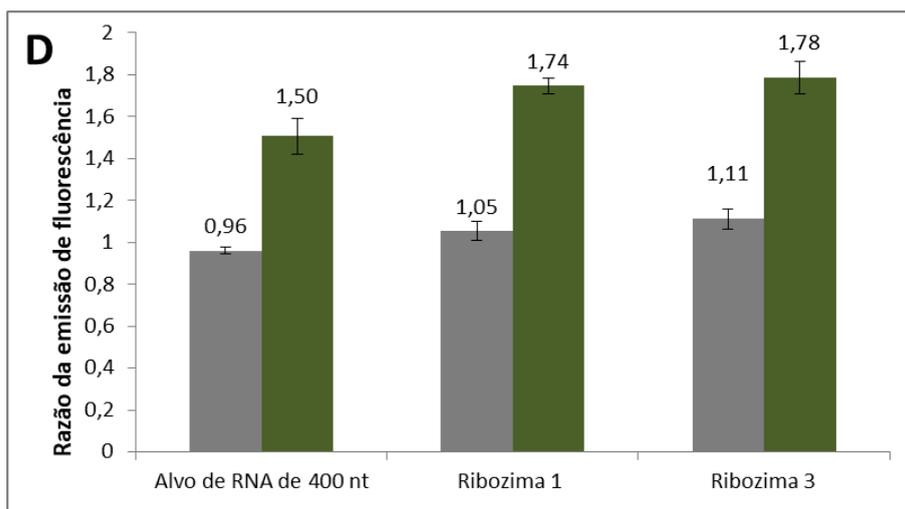
A **Figura 11** apresenta o sinal FRET-HCR obtido a partir da molécula alvo de RNA de 400 nt bem como dos produtos gerados pela clivagem das ribozimas 1 ou 3, separadamente, combinados com 600 nM de H1 e H2 na proporção de 2:1:1 em duplicatas técnicas e biológicas. O controle positivo foi a molécula de RNA iniciadora de 18 nt diluída no mesmo tampão deste ensaio (SSC 5X). Os resultados obtidos indicam que as diferentes etapas do método, a transcrição *in vitro*, a atividade de clivagem das ribozimas e detecção do sinal FRET-HCR, foram bem sucedidos. As análises com RNA alvo de 400 nt intacto, sem a etapa de clivagem pelas ribozimas, geraram sinal FRET-HCR idêntico ao obtido com o controle negativo (sem o RNA alvo). Além disso, foi observado que os ensaios de

FRET-HCR após a clivagem do RNA de 400 nt com a ribozima 1 foi de  $1,05 \pm 0,04$  em comparação com o controle negativo, enquanto  $1,11 \pm 0,05$  foi observado após a clivagem da ribozima 3.



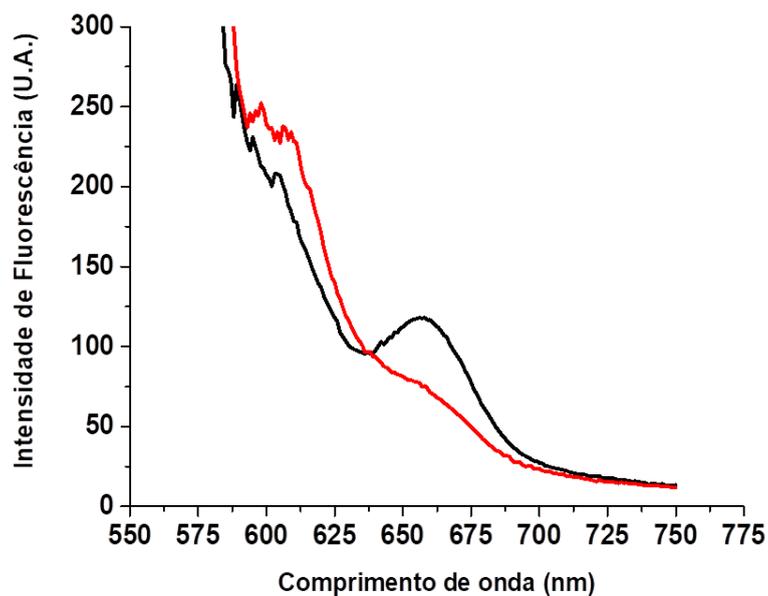






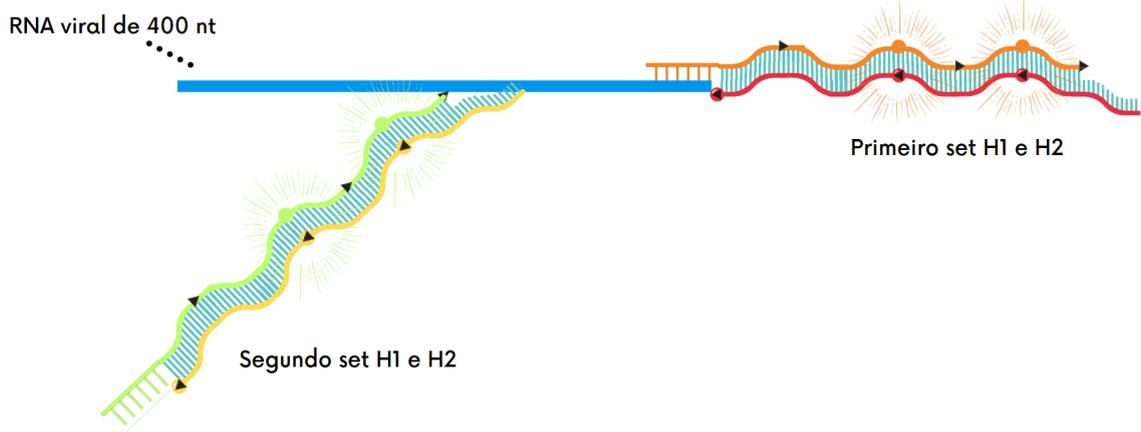
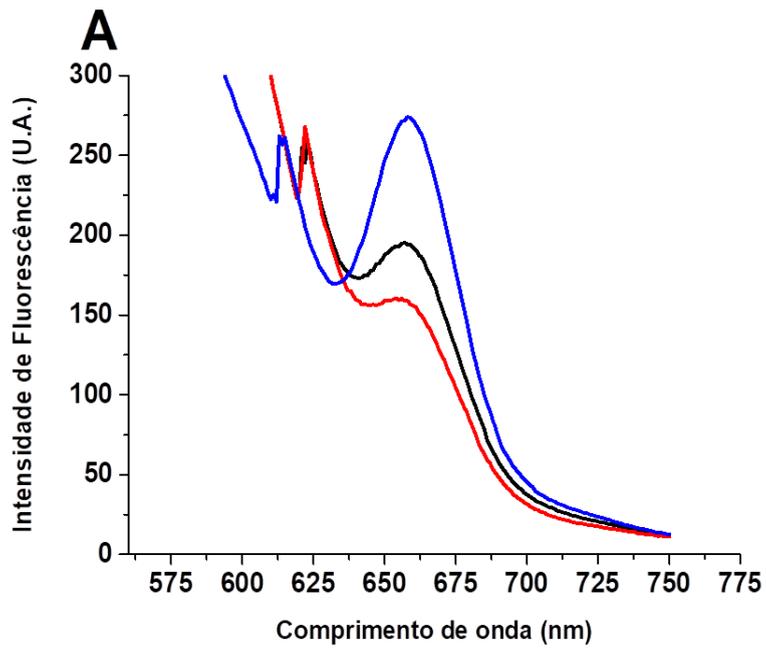
**Figura 11:** Representação esquemática e emissão média do espectro de intensidade de fluorescência. Transferência de energia fluorescente entre H1 e H2 devido à reação de hibridação em cadeia a 600 nM de H1, H2 e alvo de RNA na proporção 2:1:1 em tampão SSC 5X. Ensaio de FRET-HCR em conjunto com o alvo de RNA de 400 nt (A), produtos da clivagem da ribozima 1 (B), e produtos da clivagem da ribozima 3 (C). Esses ensaios foram realizados em duplicatas técnicas e em três dias independentes. Linha azul representa o controle positivo, molécula de RNA de 18 nt iniciadora, a linha vermelha representa o controle negativo, sem a molécula alvo, e a linha preta, o ensaio FRET-HCR seguido pela atividade de clivagem de ribozima ou realizado com a molécula iniciadora de RNA de 400 nt. Gráfico de barras mostra a razão entre a média e o desvio padrão da maior intensidade de fluorescência do ensaio de FRET-HCR comparado com o controle negativo realizado com os produtos de RNA da atividade de clivagem das ribozimas em proporção 2:1:1 ou a molécula de RNA alvo de 400 nt intacto em dias independentes (D).

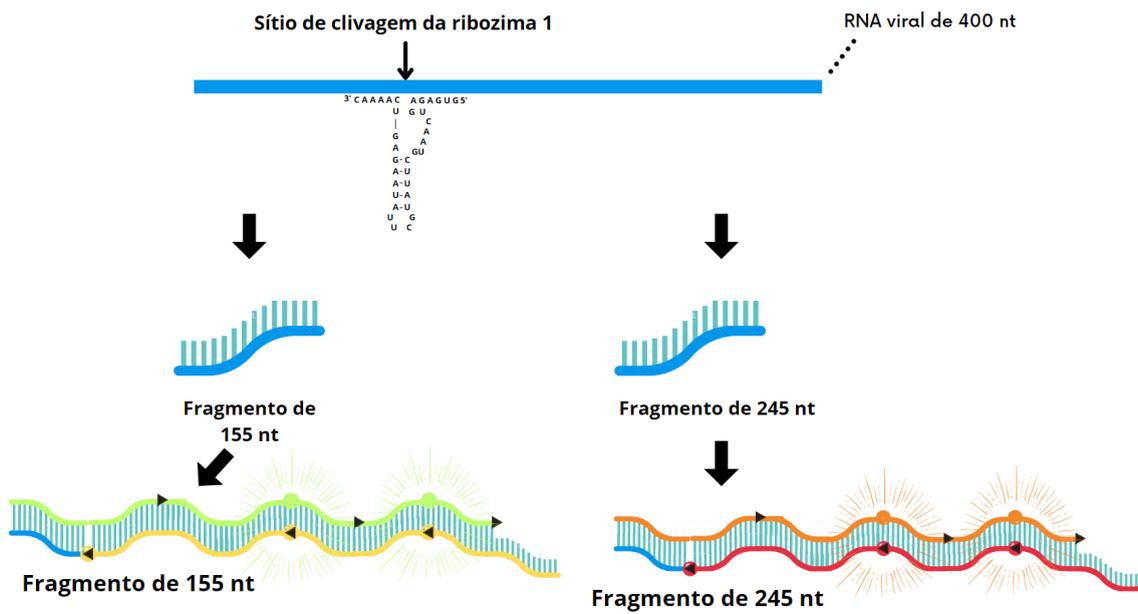
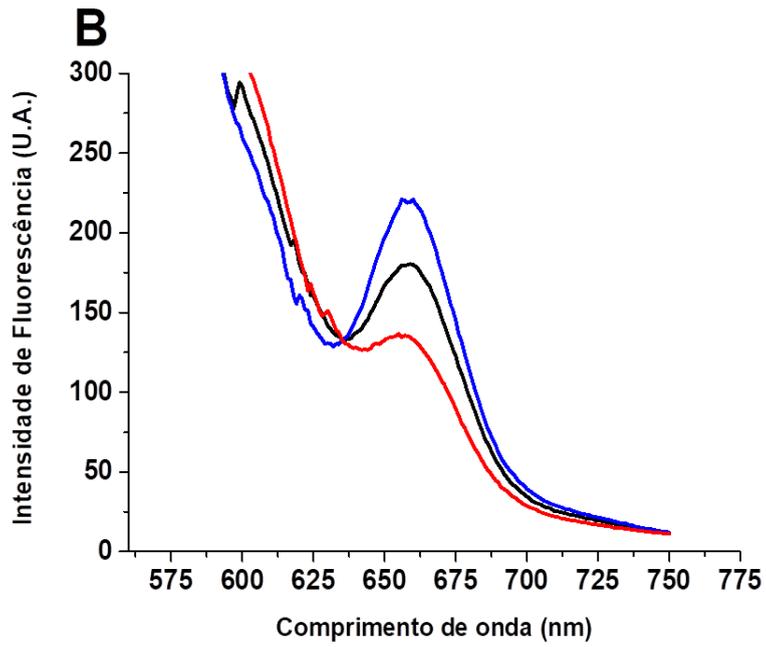
Assim, foi hipotetizado que a utilização de dois conjuntos de moléculas H1 e H2 poderiam intensificar a emissão do sinal de fluorescência do fluoróforo acceptor. Nesse sentido, foi desenvolvido um novo conjunto de moléculas H1 e H2 e subsequentemente foram submetidas a análises no programa NUPACK. O novo par de moléculas H1 e H2 teve seu desenho feito visando complementaridade ao fragmento de RNA obtido após a atividade de clivagem de ambas ribozimas de forma simultânea. Essas moléculas foram eficientes nos ensaios de FRET-HCR em associação com a molécula de RNA complementar iniciadora de 18 nt na concentração final de 600 nM (Fig. 12).

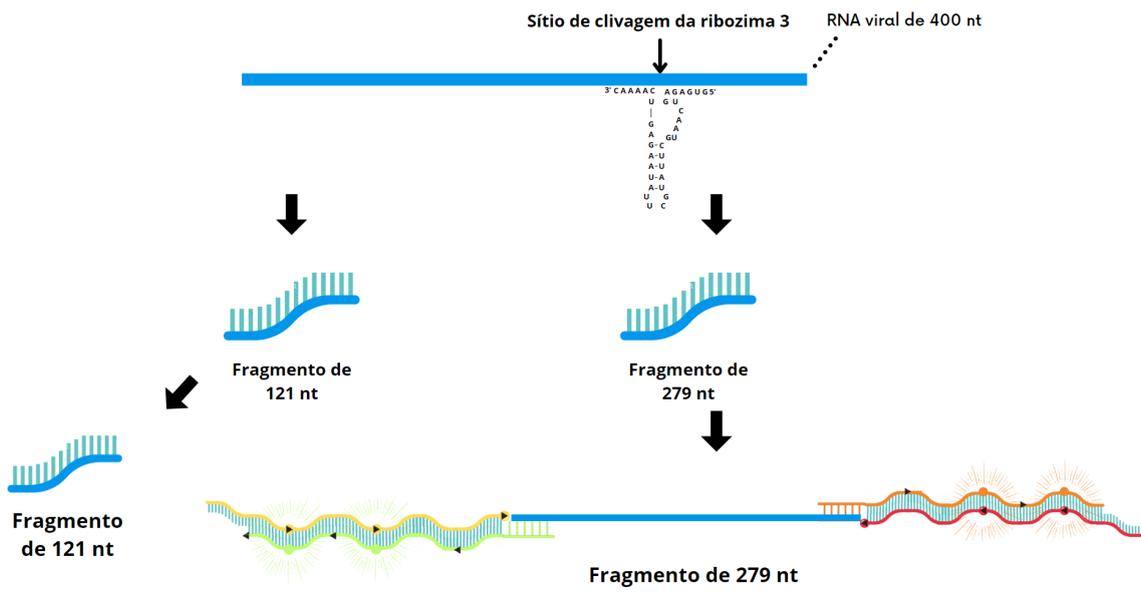
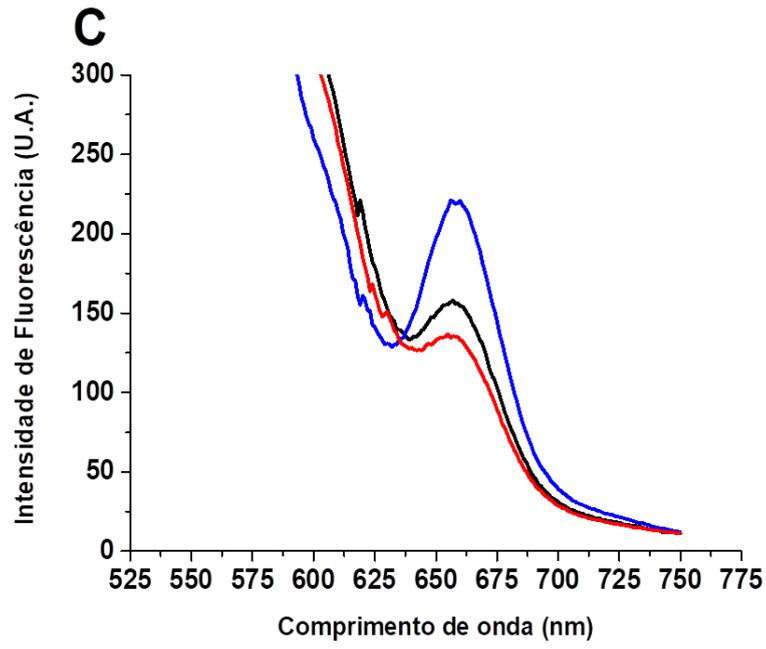


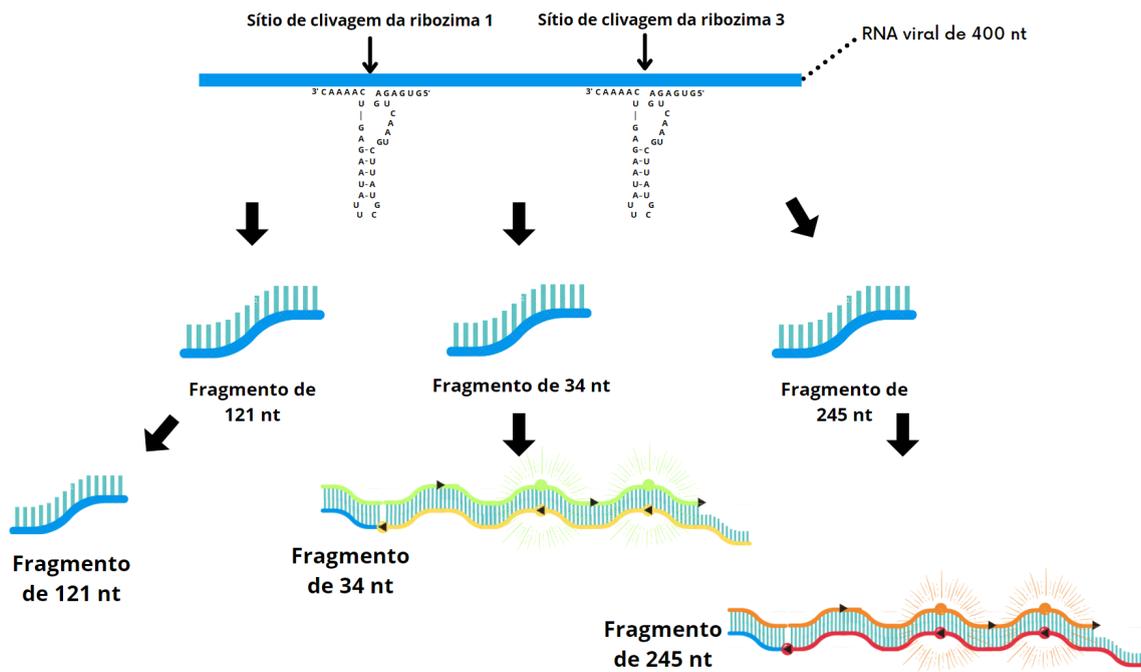
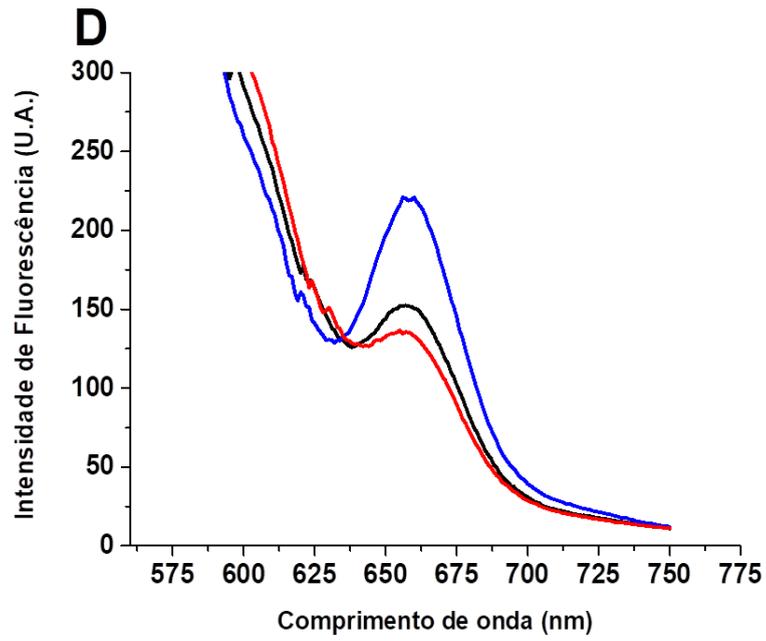
**Figura 12:** Ensaio de FRET-HCR empregando RNA como molécula sintética iniciadora. Emissão média da intensidade de fluorescência da transferência de energia entre o segundo set de H1 e H2 mediado pela reação de hibridação em cadeia à 600 nM de H1, H2 e a molécula de RNA iniciadora de 18 nt em tampão SSC 5X (linha preta). Como controle negativo não há molécula iniciadora (linha vermelha).

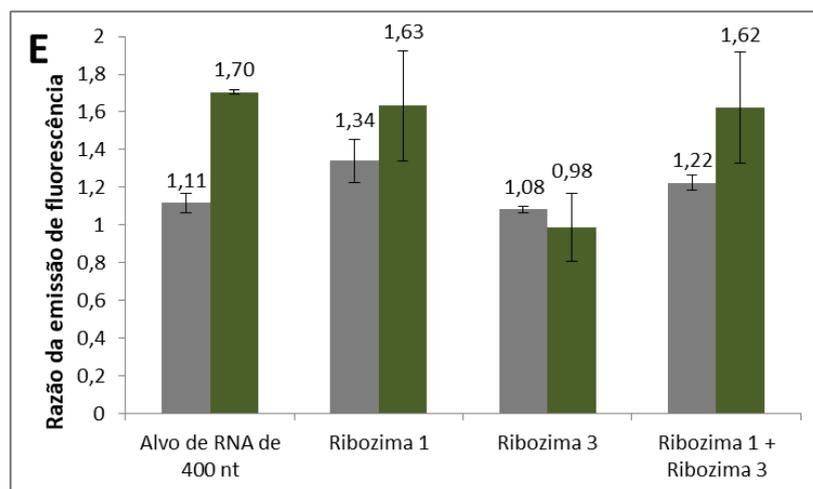
Ensaio de atividade de ribozima foram feitos utilizando tanto as duas ribozimas juntas quanto cada uma delas separadamente. Subsequentemente, os produtos adquiridos a partir dos ensaios de clivagem de ribozima, descritos acima, juntamente com o alvo de RNA intacto de 400 nt, foram utilizados em ensaios FRET-HCR. O controle positivo é composto pelas duas moléculas de RNA iniciadoras de 18 nt mais os dois conjuntos de moléculas H1 e H2 e o ensaio na ausência da molécula iniciadora é controle negativo. Os resultados indicam que o ensaio FRET-HCR multiplexado realizado com os produtos das clivagens das ribozimas 1 e 3 e o alvo de RNA de 400 nt intacto geraram a emissão do sinal fluorescente como mostrado na **Figura 13**. Surpreendentemente, os ensaios FRET-HCR realizados com produtos da clivagem da ribozima 1 mostraram a maior emissão fluorescente observada, sendo  $1,34 \pm 0,11$  vezes maior que o controle negativo, conforme é mostrado no gráfico de barras da **Figura 13**.











**Figura 13:** Representação esquemática e emissão média do espectro de intensidade de fluorescência. Transferência de energia fluorescente entre H1 e H2 devido à reação de hibridação em cadeia a 600 nM de H1, H2 e alvo de RNA na proporção 2:1:1 em tampão SSC 5X. Todos os ensaios foram realizados com, no mínimo, duplicatas técnicas e biológicas. Linha azul representa o controle positivo, dois conjuntos da molécula iniciadora de RNA de 18 nt, a linha vermelha representa o controle negativo, sem a molécula alvo, e a linha preta, o ensaio FRET-HCR seguido pela atividade de clivagem de ribozima ou realizado com a molécula iniciadora de RNA de 400 nt. Esses ensaios de FRET-HCR foram realizados com 2 conjuntos de H1 e H2 e a molécula alvo de RNA intacto de 400 nt (A); dois conjuntos de H1 e H2 e produtos da clivagem da ribozima 1 (B); dois conjuntos de H1 e H2 e produtos de clivagem da ribozima 3 (C); dois conjuntos de H1 e H2 e produtos da clivagem das ribozimas 1 e 3 (D). Gráfico de barras mostra a razão entre a média e o desvio padrão da maior intensidade de fluorescência do ensaio de FRET-HCR comparado com o controle negativo realizado com os produtos de RNA da atividade de clivagem das ribozimas (cinza) ou a molécula de RNA alvo de 18 nt (verde) em proporção 2:1:1 em dias independentes (E).

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi apresentada uma proposta de desenvolvimento de um método diagnóstico sensível, sem o requerimento de mão de obra e equipamentos especializados, livre de atividade enzimática, sem processos de amplificação da amostra e com potencial para aplicação futura. A falta da necessidade de refrigeração, devido ao uso de moléculas estáveis sem o uso de atividade enzimática, é uma vantagem que esta metodologia tem em relação aos testes diagnósticos descritos anteriormente. Ainda, uma característica adicional atrativa do método proposto é a amplificação do sinal de detecção do RNA viral, baseada em FRET-HCR, e isso ocorre devido a polimerização de H1 e H2, duas moléculas de DNA com capacidade de aumentar a emissão fluorescente, sem a necessidade de uma etapa de amplificação baseada em atividade enzimática. Adicionalmente, com o ensaio FRET-HCR, é possível evitar a ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único, que podem surgir da etapa de amplificação enzimática, o que pode comprometer a detecção do RNA alvo. Por fim,

é esperado que o teste proposto seja economicamente viável, pois baseia-se no uso de moléculas metaestáveis simples.

Até o presente momento, o RT-qPCR é considerado como o teste padrão ouro para detecção de SARS-CoV-2 e foi o primeiro método proposto para o diagnóstico em massa de pessoas infectadas nos primeiros estágios da doença, como observado no começo do surto de COVID-19 (CORMAN et al., 2020). A primeira etapa do método possui uma das principais limitações, que é a extração de RNA, sendo a mesma laboriosa, limitante e cara de se executar. Smyrlaki et al., 2020, visando superar essas desvantagens, simplificaram o teste por meio da identificação do SARS-CoV-2 por RT-qPCR em amostras que foram diretamente inativadas pelo calor (SMYRLAKI et al., 2020). No entanto, alguns outros entraves como a exigência de mão de obra e equipamentos especializados, necessidade de refrigeração e tempo de execução demorado ainda são limitações para uma mais ampla aplicação desta metodologia. Assim, essas limitações representam obstáculos significativos para sua adoção como testes à beira do leito, principalmente em países em desenvolvimento ou não desenvolvidos e que possuem dimensões continentais. Por tanto, para a identificação do SARS-CoV-2 de forma rápida e acessível, foi proposto como solução, uma estratégia global de teste à beira do leito baseada na detecção de antígeno, por meio de testes de fluxo lateral, já usado para outros patógenos, como vírus sincicial respiratório e o vírus influenza.

A precisão do diagnóstico obtido por testes de fluxo lateral (do inglês, lateral flow test, LFT) de antígeno em comparação com RT-qPCR para pacientes de cuidados primários na Áustria foi avaliado por Leber et al., 2021. Os resultados indicaram que há uma correlação significativa e negativa entre LFT reativo e o valor Ct, e a análise de regressão logística univariada sugere uma forte associação entre LFT reativo e o valor de Ct quando este é menor do que 30 (LEBER et al., 2021). Entretanto, esse processo exige treinamento padronizado para técnicos de saúde e requer garantia de qualidade, que são dificuldades semelhantes aos testes embasados em RT-qPCR. Recentemente, um estudo foi conduzido durante o surto de infecção pela variante Omicron do SARS-CoV-2 no Brasil visando avaliar a eficiência prática do teste rápido de antígeno em indivíduos sintomáticos (BEZERRA et al., 2022). Da mesma forma como Leber et al., 2021, os resultados obtidos neste estudo demonstram que os testes de detecção antigênica apresentam alta precisão em casos de cargas virais elevadas, entretanto, geram resultados não confiáveis e incertos quando a carga viral é baixa (BEZERRA et al., 2022; LEBER et al., 2021).

Os métodos RT-LAMP e ILACO foram desenvolvidos visando a utilização de equipamentos de baixo custo, assim como proporcionar uma interpretação visual simplificada

dos testes, respectivamente, bem como reduzir seu tempo de execução (KITAGAWA et al., 2020; YU et al., 2020). Entretanto, métodos baseados em RT-LAMP, assim como RT-qPCR, são dependentes de atividade enzimática, que podem perder sua atividade catalítica devido às condições de transporte e tempo prolongado de uso. Apesar da eficácia na detecção do SARS-CoV-2 e do aumento do uso em todo o mundo, métodos baseados em CRISPR, como SHERLOCK, DETECTR e CARMEN ainda necessitam da atividade catalítica de enzimas (ZHANG et al., 2020; ACKERMAN et al., 2020; BROUGHTON et al., 2020).

Em contraste, este estudo propõe um método baseado na diferenciação e identificação do RNA do SARS-CoV-2 por ribozimas específicas, a partir da utilização de moléculas simples e com um único ciclo de aquecimento, eliminando desta forma, a necessidade de enzimas. Além do mais, a metodologia proposta visa a independência de técnicos e equipamentos altamente especializados. Os resultados observados neste estudo evidenciaram a viabilidade do uso de mão de obra e equipamentos menos especializados com o método aqui proposto, uma vez que o sinal fluorescente da molécula aceptora foi detectado nos ensaios de FRET-HCR com menor concentração das moléculas de DNA e RNA iniciadoras de 18 nt, utilizando os espectrofluorímetros Varioskan LUX e SpectraMax M3 (**Figs. 7 e 8**). Adicionalmente, os resultados deste estudo evidenciaram que das três ribozimas projetadas para identificar e clivar o alvo de RNA de 400 nt, ribozima 1 e 3 apresentaram alta eficiência de transcrição *in vitro* e demonstraram atividade funcional (**Figs. 9 e 10**), indicando a viabilidade da utilização dessas moléculas simples no diagnóstico de SARS-CoV-2. Estudos prévios relataram que as ribozimas podem ser utilizadas para identificação de RNAs virais, como descrito por Cardador et al., 2023. Entretanto, o método para diagnóstico de SARS-CoV-2 aqui descrito é o primeiro relatado na literatura a usar ribozimas associadas a FRET de DNA-*hairpin* na reação de hibridação em cadeia (FRET-HCR) (**Figs. 11 e 13**). Anteriormente, somente ensaios de HCR haviam sido sugeridos para detecção do RNA do SARS-CoV-2 sendo a visualização feita por meio de eletroforese em gel de agarose como proposto por Wu et al., 2020c, o que torna este teste diagnóstico um problema para a efetiva detecção de HCR à beira do leito. Assim, no estudo aqui proposto o resultado final do ensaio é a detecção da emissão de fluorescência, que ao contrário da necessidade de realização de eletroforese em gel de agarose, apresenta uma maior versatilidade para aplicação nos locais de atendimento médico.

Neste estudo foi demonstrado que as moléculas de RNA de 18 nt iniciadoras foram capazes de emitir uma intensidade de fluorescência  $1,6 \pm 0,22$  vezes maior que o controle negativo (**Fig. 8**). Adicionalmente, comprovou-se que a combinação da atividade de clivagem

da ribozima e as moléculas H1 e H2 multiplexadas nos ensaios FRET-HCR permitiram a detecção, identificação, clivagem e emissão do sinal fluorescente desejado do acceptor em ~660 nm (**Fig. 13**), com os melhores resultados apresentando intensidade de fluorescência  $1,34 \pm 0,11$  vezes superior ao controle negativo, evidenciando assim o potencial do método proposto.

Por fim, dois outros entraves adicionais dos métodos diagnósticos mais amplamente usados, que são baseados nos sistemas CRISPR-Cas, são a necessidade de uma pré-amplificação do RNA viral e a baixa sensibilidade quando empregados em conjunto com LFT. Visando superar essas desvantagens, um método que utiliza uma tira de fluxo lateral mais sensível e de fácil interpretação, capaz de detectar diretamente o SARS-CoV-2, foi desenvolvido e denominado ERASE (LI et al., 2021; FOZOUNI et al., 2020). Entretanto, pelo fato da sensibilidade de detecção pelo método ERASE ser ligeiramente menor do que a detecção de fluorescência avançada, resultados falso-negativos podem ocorrer em amostras com baixas cargas virais (LI et al., 2021).

Desta forma, uma das vantagens adicionais e futuras do método diagnóstico proposto aqui é a interpretação da emissão do sinal de fluorescência, que pode ser facilitada pela captação desse sinal por câmeras de celular, sendo esta, uma relevante perspectiva para o método diagnóstico desenvolvido com este trabalho. No ensaio de FRET-HCR, observou-se que ao utilizar as moléculas de DNA e RNA de 18 nt, obteve-se um sinal de intensidade de fluorescência emitido de  $1,45 \pm 0,17$  e  $1,59 \pm 0,22$ , respectivamente, vezes maior que o sinal de controle negativo (**Fig. 8**). Além do mais quando os produtos de RNA clivado da ribozima 1 foram utilizados nos ensaios de FRET-HCR, obteve-se um sinal fluorescente  $1,34 \pm 0,11$  vezes maior do que o sinal do controle negativo, demonstrando uma proximidade significativa com o controle positivo que utilizou a molécula de RNA de 18 nt iniciadora (**Fig. 13**). Esses resultados sugerem o potencial do método proposto para diagnóstico rápido e acessível, utilizando-se de um telefone celular, sem a necessidade de amplificação, como já foi demonstrado previamente na detecção do SARS-CoV-2 (FOZOUNI et al., 2020). Contudo, o limite de detecção atual que está em quantidades submicromolares ainda necessita aprimoramento para o alcance desse objetivo.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

É relevante destacar que tecnologias de diagnóstico apresentam limitações e a escolha do método a ser empregado deve ser feita baseando-se na disponibilidade de recurso,

características da população e o propósito do diagnóstico. Para o diagnóstico de COVID-19, os métodos baseados em CRISPR-Cas e RT-qPCR ainda são amplamente utilizados, entretanto, a tecnologia aqui proposta tem um potencial promissor como alternativa de diagnóstico, principalmente em locais onde a capacidade de refrigeração, disponibilidade de recursos e mão de obra especializados sejam limitados.

Em conclusão, o estudo proposto aqui teve como objetivo o desenvolvimento de um método diagnóstico para SARS-CoV-2 como prova de conceito, utilizando ribozimas e FRET-HCR, que até o presente momento trata-se de uma estratégia inédita.

Como perspectivas futuras, já está em desenvolvimento um protótipo de dispositivo diagnóstico de SARS-CoV-2 mediante imagens digitais de telefones inteligentes ou smartphones. Diferentes desenhos e aprimoramentos serão realizados para identificar o melhor desenho do protótipo, sendo as tarefas a serem realizadas englobam: desenhar e fabricar LED RGB; Desenhar e fabricar módulo e circuito de alimentação, componentes eletrônicos e controle; Programar software controle para o circuito de controle do módulo LED RGB; Desenho e Fabricação de componentes estruturais por impressão 3D; Calibrar os espectros do modelo LED RGB para os diferentes canais Red, Green and Blue; Obter imagens de reações FRET controles e de amostras positivas e negativas; Análises de componentes RGB das imagens com software específico e padronizar, avaliar e validar o potencial uso de imagens digitais adquiridas com smartphones como via de detecção da fluorescência-FRET.

Assim sendo, é notável o potencial deste método proposto em melhorar a portabilidade e acessibilidade dos testes diagnósticos atuais, bem como a facilidade de uso em qualquer lugar, sem a exigência de equipamentos especializados, reduzindo assim, a complexidade e o custo do processo de diagnóstico. Adicionalmente, a capacidade de compartilhar facilmente as imagens capturadas com pesquisadores ou profissionais de saúde, permitindo interpretação e análises remotas, apresenta potenciais benefícios, especialmente em contextos com recursos limitados.

Finalmente, é fundamental estudos adicionais para melhorar parâmetros cruciais para um potencial teste à beira do leito. Dentre elas, a redução do tempo de ensaio de clivagem de ribozimas, a investigação da especificidade do método e, principalmente, a investigação aprofundada do nível mínimo de detecção da metodologia apresentada. Essas abordagens são de extrema importância para a validação do método proposto.

## 7. REFERÊNCIAS

Ackerman CM, Myhrvold C, Thakku SG, Freije CA, Metsky HC, Yang DK, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection with Cas13. *Nature* 2020;582:277–82. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2279-8>.

África Center of Diseases Control. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://africacdc.org/>.

Al-Tawfiq, J. A. (2013). Middle East Respiratory Syndrome-coronavirus infection: An overview. *Journal of Infection and Public Health*, 6(5), 319–322. doi:10.1016/j.jiph.2013.06.001.

Algar W, Hildebrandt N, Vogel S, Medintz I. FRET as a biomolecular research tool - understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nat Methods*. 2019;16:815–829.

Amarzguioui, M., Prydz, H. Hammerhead ribozyme design and application. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1175–1202 (1998). <https://doi.org/10.1007/s000180050247>.

Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*. doi:10.1038/s41591-020-0820-9.

Ang YS, Yung L-YL. Rational design of hybridization chain reaction monomers for robust signal amplification. *Chem Commun* 2016;52:4219–22. <https://doi.org/10.1039/C5CC08907G>.

Ausländer, S., & Fussenegger, M. (2017). Synthetic RNA-based switches for mammalian gene expression control. *Current Opinion in Biotechnology*, 48, 54–60. doi:10.1016/j.copbio.2017.03.011.

Azhar, E. I., El-Kafrawy, S. A., Farraj, S. A., Hassan, A. M., Al-Saeed, M. S., Hashem, A. M., & Madani, T. A. (2014). Evidence for Camel-to-Human Transmission of MERS Coronavirus. *New England Journal of Medicine*, 370(26), 2499–2505. doi:10.1056/nejmoa1401505.

Bashor, L. et al. SARS-CoV-2 evolution in animals suggests mechanisms for rapid variant selection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 118, e2105253118 (2021). <https://doi.org/10.1073/pnas.2105253118>.

Bauerfeind R, von Graevenitz A, Kimmig P, et al. *Zoonoses: Infectious diseases transmissible from animals to humans*. Fourth Edition. Washington, DC, USA: ASM Press. 2016.

Bezerra MF, Silva LCA, Pessoa-e-Silva R, Soares GL, Dezordi FZ, Lima GB, et al. Real-life evaluation of a rapid antigen test (DPP SARS-CoV-2 Antigen) for COVID-19 diagnosis of primary healthcare patients, in the context of the Omicron-dominant wave in Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.11.003>.

Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* 2020;38:870–4. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>.

Caisse des Dépôts et Consignations de Côte d'Ivoire (CDC-CI). 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://cdc.ci/notre-identite/>.

Carabelli, A.M., Peacock, T.P., Thorne, L.G. et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol* 21, 162–177 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00841-7>.

Cardador CM, Muehlmann LA, Coelho CM, Silva LP, Garay AV, Carvalho AMdS, Bastos IMD, Longo JPF. Nucleotides Entrapped in Liposome Nanovesicles as Tools for Therapeutic and Diagnostic Use in Biomedical Applications. *Pharmaceutics*. 2023; 15(3):873. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030873>.

Cech, T. R. (1993). Structure and mechanism of the large catalytic RNAs: group I and group II introns and ribonuclease P. *COLD SPRING HARBOR MONOGRAPH SERIES*, 24, 239-239.

Centers for Disease Control and Prevention. Antigen Testing Guidelines 2023. Acesso em: 22 de Novembro de 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>.

Centers for Disease Control and Prevention. Testing Overview 2023. Acesso em: 22 de Novembro de 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html#print>.

Chan, J. F. W., Lau, S. K. P., To, K. K. W., Cheng, V. C. C., Woo, P. C. Y., & Yuen, K.-Y. (2015). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: Another Zoonotic Betacoronavirus Causing SARS-Like Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 465–522. doi:10.1128/cmr.00102-14.

Chan, R. W. Y., Hemida, M. G., Kayali, G., Chu, D. K. W., Poon, L. L. M., Alnaeem, A., ... Peiris, J. S. M. (2014). Tropism and replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus from dromedary camels in the human respiratory tract: an in-vitro and ex-vivo study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2(10), 813–822. doi:10.1016/s2213-2600(14)70158-4.

Chinese Center For Disease Control and Prevention. 2023. Acesso em: 22 de Novembro de 2023. Disponível em: <https://en.chinacdc.cn/>.

Choi HMT, Beck VA, Pierce NA. Next-generation in situ hybridization chain reaction: Higher gain, lower cost, greater durability. *ACS Nano* 2014;8:4284–94. <https://doi.org/10.1021/nn405717p>.

Clarke, D. K. et al. Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *J. Virol.* 67, 222–228 (1993). <https://doi.org/10.1128/jvi.67.1.222-228.1993>.

Conceicao, C. et al. The SARS-CoV-2 spike protein has a broad tropism for mammalian ACE2 proteins. *PLoS Biol.* 18, e3001016 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001016>.

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., ... & Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3), 2000045.

Danish Health Authority. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://www.sst.dk/en/english/About-us>.

De la Peña, M., García-Robles, I., & Cervera, A. (2017). The Hammerhead Ribozyme: A Long History for a Short RNA. *Molecules*, 22(1), 78. doi:10.3390/molecules22010078.

Delaune, D., Hul, V., Karlsson, E.A. et al. A novel SARS-CoV-2 related coronavirus in bats from Cambodia. *Nat Commun* 12, 6563 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26809-4>.

Dirks, Robert M., and Niles A. Pierce. "Triggered amplification by hybridization chain reaction." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.43 (2004): 15275-15278.

Doudna, J., Cech, T. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* 418, 222–228 (2002). <https://doi.org/10.1038/418222a>.

European Centre for Disease Prevention and Control. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: MERS-CoV situation update. 2022. Acesso em: 22 de Novembro de 2023. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers-cov-situation-update>.

Fang C, Huang Y, Zhao Y. Review of FRET biosensing and its application in biomolecular detection. *Am J Transl Res*. 2023 Feb 15;15(2):694-709. PMID: 36915763; PMCID: PMC10006758.

Fedor, M., Williamson, J. The catalytic diversity of RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 399–412 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrm1647>.

Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 1–23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7\_1.

Feng, Y., Leavitt, M., Tritz, R., Duarte, E., Kang, D., Mamounas, M., ... Barber, J. R. (2000). Inhibition of CCR5-Dependent HIV-1 Infection by Hairpin Ribozyme Gene Therapy against CC-Chemokine Receptor 5. *Virology*, 276(2), 271–278. doi:10.1006/viro.2000.0536.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811 (1998). <https://doi.org/10.1038/35888>.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/home/en/>.

Förster T. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann Physiol*. 1948;2:55–75.

Fozouni P, Son S, Díaz de León Derby M, Knott GJ, Gray CN, D'Ambrosio M V., et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell* 2021;184:323-333.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.001>.

Fukushima, A., Fukuda, N., Lai, Y., Ueno, T., Moriyama, M., Taguchi, F., ... Kuroda, K. (2009). Development of a Chimeric DNA-RNA Hammerhead Ribozyme Targeting SARS Virus. *Intervirology*, 52(2), 92–99. doi:10.1159/000215946.

Ghana Ministry of Health. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://www.moh.gov.gh/>.

Gorbalenya, A. E. et al. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*. doi:10.1038/s41564-020-0695-z 10.1038/s41564-020-0695-z.

Grazon C, Chern M, Lally P, Baer RC, Fan A, Lecommandoux S, Klapperich C, Dennis AM, Galagan JE, Grinstaff MW. The quantum dot vs. organic dye conundrum for ratiometric FRET-based biosensors: which one would you chose? *Chem Sci*. 2022;13:6715–6731.

Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., & Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35(3), 849–857. doi:10.1016/0092-8674(83)90117-4.

Guo, J., Mingoos, C., Qiu, X., & Hildebrandt, N. (2019). Simple, Amplified, and Multiplexed Detection of MicroRNAs Using Time-Gated FRET and Hybridization Chain Reaction. *Analytical Chemistry*. doi:10.1021/acs.analchem.8b05600.

Hale, V.L., Dennis, P.M., McBride, D.S. et al. SARS-CoV-2 infection in free-ranging white-tailed deer. *Nature* 602, 481–486 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04353-x>.

Hammann, C., Luptak, A., Perreault, J., & de la Pena, M. (2012). The ubiquitous hammerhead ribozyme. *RNA*, 18(5), 871–885. doi:10.1261/rna.031401.111.

Harry M. T. Choi, Maayan Schwarzkopf, Mark E. Fornace, Aneesh Acharya, Georgios Artavanis, Johannes Stegmaier, Alexandre Cunha, Niles A. Pierce; Third-generation in situ hybridization chain reaction: multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust. *Development* 15 June 2018; 145 (12): dev165753. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.165753>.

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

Hou T, Zeng W, Yang M, Chen W, Ren L, Ai J, et al. Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for COVID-19. *PLOS Pathog* 2020;16:e1008705. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008705>.

Huang J, Wang H, Yang X, Quan K, Yang Y, Ying L, et al. Fluorescence resonance energy transfer-based hybridization chain reaction for: In situ visualization of tumor-related mRNA. *Chem Sci* 2016;7:3829–35. <https://doi.org/10.1039/c6sc00377j>.

Huang, X., Zhao, Y., Pu, Q., Liu, G., Peng, Y., Wang, F., ... Mo, X. (2019). Intracellular selection of trans-cleaving hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkz018.

Jares-Erijman, E., Jovin, T. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 21, 1387–1395 (2003). <https://doi.org/10.1038/nbt896>.

Joung J, Ladha A, Saito M, Segel M, Bruneau R, Huang M-LW, et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *MedRxiv Prepr Serv Heal Sci* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.20091231>.

Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., ... Xu, J. (2005). Molecular Evolution Analysis and Geographic Investigation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Like Virus in Palm Civets at an Animal Market and on Farms. *Journal of Virology*, 79(18), 11892–11900. doi:10.1128/jvi.79.18.11892-11900.2005.

Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc* 2019;14:2986–3012. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0210-2>.

Kennelly, J. C., Lane, M. P., Barker, J. A., Barber, G., Tinwell, H., Gallagher, J. E., ... Ashby, J. (1993). Genotoxic activity of 1-chloromethylpyrene in stomach epithelium in vivo: insensitivity of the stomach scintillation UDS assay. *Carcinogenesis*, 14(4), 637–643. doi:10.1093/carcin/14.4.637.

Kharma N, Varin L, Abu-Baker A, Ouellet J, Najeh S, Ehdaevand MR, et al. Automated design of hammerhead ribozymes and validation by targeting the PABPN1 gene transcript. *Nucleic Acids Res* 2015;44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1111>.

Kindler, E., Jonsdottir, H. R., Muth, D., Hamming, O. J., Hartmann, R., Rodriguez, R., ... Thiel, V. (2013). Efficient Replication of the Novel Human Betacoronavirus EMC on Primary Human Epithelium Highlights Its Zoonotic Potential. *mBio*, 4(1). doi:10.1128/mbio.00611-12.

Kitagawa Y, Orihara Y, Kawamura R, Imai K, Sakai J, Tarumoto N, et al. Evaluation of rapid diagnosis of novel coronavirus disease (COVID-19) using loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Virol* 2020;129. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104446>.

Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., & Cech, T. R. (1982). Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell*, 31(1), 147–157. doi:10.1016/0092-8674(82)90414-7.

Lam, A., St-Pierre, F., Gong, Y. et al. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 9, 1005–1012 (2012). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2171>.

LAMB, L. E. et al. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLOS ONE*, [S. l.], v. 15, n. 6, p. e0234682, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234682>.

Leber W, Lammel O, Siebenhofer A, Redlberger-Fritz M, Panovska-Griffiths J, Czypionka T. Comparing the diagnostic accuracy of point-of-care lateral flow antigen testing for SARS-CoV-2 with RT-PCR in primary care (REAP-2). *EClinicalMedicine* 2021;38. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101011>.

Li H, Dong X, Wang Y, Yang L, Cai K, Zhang X, et al. Sensitive and Easy-Read CRISPR Strip for COVID-19 Rapid Point-of-Care Testing. *Cris J* 2021;4:392–9. <https://doi.org/10.1089/crispr.2020.0138>.

Liu S, Yan A, Guo W, Fang Y, Dong Q, Li R, Ni S, Sun Y, Yang W, Yang G. Human neutrophil elastase activated fluorescent probe for pulmonary diseases based on fluorescence resonance energy transfer using CdSe/ZnS quantum dots. *ACS Nano*. 2020;14:4244–4254.

Lu, L., Sikkema, R.S., Velkers, F.C. et al. Adaptation, spread and transmission of SARS-CoV-2 in farmed minks and associated humans in the Netherlands. *Nat Commun* 12, 6802 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27096-9>.

Lucier, JF., Bergeron, L.J., Brière, F.P. et al. RiboSubstrates: a web application addressing the cleavage specificities of ribozymes in designated genomes. *BMC Bioinformatics* 7, 480 (2006). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-480>.

Mackay, I. M., & Arden, K. E. (2015). MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology Journal*, 12(1). doi:10.1186/s12985-015-0439-5.

MacLean, O. A., Orton, R. J., Singer, J. B., & Robertson, D. L. (2020). No evidence for distinct types in the evolution of SARS-CoV-2. *Virus Evolution*. doi:10.1093/ve/veaa034.

Marques, A. D. et al. Multiple introductions of SARS-CoV-2 Alpha and Delta variants into white-tailed deer in Pennsylvania. *mBio* 13, e02101-22 (2022). <https://doi.org/10.1128/mbio.02101-22>.

Martick, M., Horan, L., Noller, H. et al. A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature* 454, 899–902 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07117>.

Massimo Amicone, Vítor Borges, Maria João Alves, Joana Isidro, Líbia Zé-Zé, Sílvia Duarte, Luís Vieira, Raquel Guiomar, João Paulo Gomes, Isabel Gordo, Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution, *Evolution, Medicine, and Public Health*, Volume 10, Issue 1, 2022, Pages 142–155, <https://doi.org/10.1093/emph/eoac010>.

McIntosh K, Hirsch M, Thorner A. Middle East respiratory syndrome coronavirus: Virology, pathogenesis, and epidemiology. In: Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA, USA: UpToDate Inc. 2023.

Ministério da Saúde Brasileiro. Painel Coronavírus. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>.

Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., & Ziebuhr, J. (2006). Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(13), 5108–5113. doi:10.1073/pnas.0508200103.

Mitsuyasu, R. T., Merigan, T. C., Carr, A., Zack, J. A., Winters, M. A., Workman, C., ... Cooper, D. A. (2009). Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells. *Nature Medicine*, 15(3), 285–292. doi:10.1038/nm.1932.

Miyawaki, A. (2011). Development of Probes for Cellular Functions Using Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 357–373. doi:10.1146/annurev-biochem-072909-094736.

Muller, M. A., Raj, V. S., Muth, D., Meyer, B., Kallies, S., Smits, S. L., ... Drosten, C. (2012). Human Coronavirus EMC Does Not Require the SARS-Coronavirus Receptor and Maintains Broad Replicative Capability in Mammalian Cell Lines. *mBio*, 3(6). doi:10.1128/mbio.00515-12.

Naz S, Chatha AMM, DANABAS D, Arshad A. Molecular basis of the structure and transmission of SARS-CoV, SARS-CoV-2, and MERS: a review report. *BioSci Rev*. 2023;5(1):119–150. <https://doi.org/10.32350/bsr.51.09>.

Nazari, R., Ma, X. Z., & Joshi, S. (2008). Inhibition of human immunodeficiency virus-1 entry using vectors expressing a multimeric hammerhead ribozyme targeting the CCR5 mRNA. *Journal of General Virology*, 89(9), 2252–2261. doi:10.1099/vir.0.2008/001222-0.

O’Toole, Á., Pybus, O.G., Abram, M.E. et al. Pango lineage designation and assignment using SARS-CoV-2 spike gene nucleotide sequences. *BMC Genomics* 23, 121 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08358-2>.

Open Data Sistema Único de Saúde. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://opendatasus.saude.gov.br/>.

Organização Pan Americana de Saúde. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt>.

Peacock, T. P., Goldhill, D. H., Zhou, J., Baillon, L., Frise, R., Swann, O. C., ... Barclay, W. S. (2021). The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nature Microbiology*. doi:10.1038/s41564-021-00908-w.

Pilch-Wrobel A, Kotulska A, Lahtinen S, Soukka T and Bednarkiewicz A. Engineering the compositional architecture of core-shell upconverting lanthanide-doped nanoparticles for optimal luminescent donor in resonance energy transfer: the effects of energy migration and storage. *Small* 2022; 18: e2200464.

Pope J, Johnson R, Jamieson W, Worthy H, Kailasam S, Ahmed R, Taban I, Auhim H, Watkins D, Rizkallah P, Castell O, Jones D. Association of fluorescent protein pairs and its significant impact on fluorescence and energy transfer. *Adv Sci*. 2020;8:2003167.

Prevention C for DC and. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing 2022. Acesso em: 22 de Novembro de 2023. Disponível em: [https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing/antibody-tests-guidelines.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2F1ab%2Fresources%2Fantibody-tests-guidelines.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing/antibody-tests-guidelines.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2F1ab%2Fresources%2Fantibody-tests-guidelines.html).

Prevo B, Peterman E. Förster resonance energy transfer and kinesin motor proteins. *Chem Soc Rev*. 2014;43:1144–1155.

ProMED International Society For Infectious Disease. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://promedmail.org/>.

Puerta-Fernández, E., Romero-López, C., Barroso-delJesus, A., & Berzal-Herranz, A. (2003). Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(1), 75–97. doi:10.1016/s0168-6445(03)00020-2.

Pybus, O. G., & Rambaut, A. (2009). Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nature Reviews Genetics*, 10(8), 540–550. doi:10.1038/nrg2583.

Rawson, J. M. O., Landman, S. R., Reilly, C. S., & Mansky, L. M. (2015). HIV-1 and HIV-2 exhibit similar mutation frequencies and spectra in the absence of G-to-A hypermutation. *Retrovirology*, 12(1). doi:10.1186/s12977-015-0180-6.

Ribeiro, R. M., Li, H., Wang, S., Stoddard, M. B., Learn, G. H., Korber, B. T., ... Perelson, A. S. (2012). Quantifying the Diversification of Hepatitis C Virus (HCV) during Primary Infection: Estimates of the In Vivo Mutation Rate. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002881. doi:10.1371/journal.ppat.1002881.

Sanjuan, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 84(19), 9733–9748. doi:10.1128/jvi.00694-10.

Sharif-Yakan, A., & Kanj, S. S. (2014). Emergence of MERS-CoV in the Middle East: Origins, Transmission, Treatment, and Perspectives. *PLoS Pathogens*, 10(12), e1004457. doi:10.1371/journal.ppat.1004457.

Shi, Z., & Hu, Z. (2008). A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Research*, 133(1), 74–87. doi:10.1016/j.virusres.2007.03.01.

Smyrlaki I, Ekman M, Lentini A, Rufino de Sousa N, Papanicolaou N, Vondracek M, et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat Commun* 2020;11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5>.

Stobart, M. J., Simon, S. L. R., Plews, M., Lamoureux, L., & Knox, J. D. (2009). Efficient Knockdown of Human prnp mRNA Expression Levels Using Hybrid Hammerhead Ribozymes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(17-18), 1034–1039. doi:10.1080/15287390903084314.

Tang, X.-B., Hobom, G., & Luo, D. (1994). Ribozyme mediated destruction of influenza A virus in vitro and in vivo. *Journal of Medical Virology*, 42(4), 385–395. doi:10.1002/jmv.1890420411.

Tanner MA, Cech TR. An important RNA tertiary interaction of group I and group II introns is implicated in gram-positive RNase P RNAs. *RNA*. 1995 Jun;1(4):349-50. PMID: 7493313; PMCID: PMC1482410.

Tanner, N. (1999). Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(3), 257–275. doi:10.1016/s0168-6445(99)00007-8

Thai Department of Disease Control. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://ddc.moph.go.th/en/index.php>.

Tomáš Čermák and others, A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants, *The Plant Cell*, Volume 29, Issue 6, June 2017, Pages 1196–1217, <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>.

Tyrrell D, Bynoe M. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *1966;287(7428):76-77*. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)92364-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)92364-6).

UK Health Security Agency. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://research.ukhsa.gov.uk/>.

Volz, E., Hill, V., McCrone, J. T., Price, A., Jorgensen, D., O'Toole, Á., ... Connor, T. R. (2020). Evaluating the effects of SARS-CoV-2 Spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2020.11.020.

Wenxing Li, Yiming Xu, Yue Zhang, Pengfei Li, Xiaoli Zhu, and Chang Feng *ACS Synthetic Biology* 2023 12 (6), 1657-1666 DOI: 10.1021/acssynbio.3c00003.

Wise, J. (2012). Patient with new strain of coronavirus is treated in intensive care at London hospital. *BMJ*, 345(sep24 2), e6455–e6455. doi:10.1136/bmj.e6455.

World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2022. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov)).

World Health Organization. Timeline of WHO's response to COVID-19. 2023. Acesso em: 22 de Novembro de 2023. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline#!>.

World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard n.d. 2023. Acesso em: 22 de Novembro de 2023. Disponível em: <https://covid19.who.int/>.

World Organization for Animal Health. 2023. Acesso em: 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://www.woah.org/en/home/>.

Wu L, Huang C, Emery B, Sedgwick A, Bull S, He X, Tian H, Yoon J, Sessler J, James T. Förster resonance energy transfer (FRET)-based small-molecule sensors and imaging agents. *Chem Soc Rev*. 2020;49:5110–5139.

Wu T-H, Chang C-C, Yang C-H, Lin W-Y, Ee TJ, Lin C-W. Hybridization Chain Reactions Targeting the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Int J Mol Sci* 2020;21:3216. doi.org/10.3390/ijms21093216.

Wu Z, McGoogan JM. Asymptomatic and Pre-Symptomatic COVID-19 in China. *Infect Dis Poverty* 2020;9:72. doi.org/10.1186/s40249-020-00679-2.

Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., ... Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. doi:10.1038/s41586-020-2008-3.

You, M., Litke, J. L., Wu, R., & Jaffrey, S. R. (2019). Detection of Low-Abundance Metabolites in Live Cells Using an RNA Integrator. *Cell Chemical Biology*. doi:10.1016/j.chembiol.2019.01.00.

Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, et al. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. 2020.

Zaccolo, M. (2004). Use of Chimeric Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer to Monitor Cellular Responses. *Circulation Research*, 94(7), 866–873. doi:10.1161/01.res.0000123825.83803.cd.

Zadeh JN, Steenberg CD, Bois JS, Wolfe BR, Pierce MB, Khan AR, et al. NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems. *J Comput Chem* 2011;32:170–3. https://doi.org/10.1002/jcc.21596.

Zhang Q, Liu Z, Moncada-Velez M, Chen J, Ogishi M, Bigio B, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* (80- ) 2020;370. https://doi.org/10.1126/science.abd4570.

Zhang, Z., & Burke, J. M. (2005). Inhibition of Viral Replication by Ribozyme: Mutational Analysis of the Site and Mechanism of Antiviral Activity. *Journal of Virology*, 79(6), 3728–3736. doi:10.1128/jvi.79.6.3728-3736.2005.