



## AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DE PALÁDIO COMO INIBIDORES DAS PROTEASES TMPRSS2 HUMANA E SARS-COV2-Mpro, ENVOLVIDAS NA INFECTIVIDADE E VIRULÊNCIA DO COVID-19

Fábio da Silva Siqueira<sup>1</sup>; Wagner Alves de Souza Judice<sup>2</sup>

1. Estudante - curso de Farmácia; e-mail: fabioatdr37@gmail.com;
2. Professor - UMC; e-mail: wagneras@umc.br.

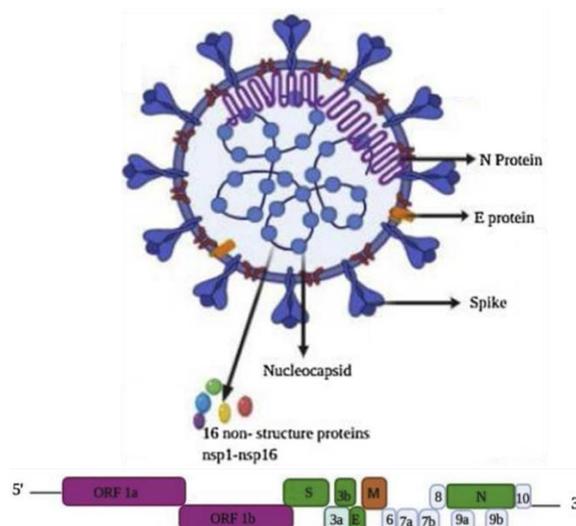
**Área de conhecimento:** Enzimologia.

**Palavras-chave:** SARSCOV-2-Mpro; TMPRSS2; síndrome respiratória.

### INTRODUÇÃO

O Novo coronavírus (CoV2) é o agente etiológico responsável pela epidemia de pneumonia viral que teve início na cidade de Wuhan no ano de 2019 (LI *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020). O vírus (FIGURA 1) se instala no sistema respiratório causando a doença conhecida como Síndrome respiratória aguda grave 2 (Sars-CoV-2) levando a um prejuízo da função ventilatória e respiratória do indivíduo (WU *et al.*, 2020; BHATTACHARYA; DEV e SOURIRAJAN, 2021).

**Figura 1** – Desenho esquemático da estrutura do CoV2 e de seu gene.



**Fonte:** Adaptado de BHATTACHARYA; DEV e SOURIRAJAN, 2021.

Trata-se de um vírus de RNA e que codificam mais de 20 proteases diferentes dentre elas uma cisteíno protease quimotripsina-like denominada M<sup>pro</sup> (CHEN *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020). Devido a sua importância estrutural para a sobrevivência viral, unida a ausência de homólogos estruturais em humanos fazem da M<sup>pro</sup> um promissor alvo farmacoterapêutico para o desenho de novos antivirais para



combater a SARS-CoV-2. A infectividade do vírus depende de uma proteína de superfície chamadas proteína spike que se liga na célula do hospedeiro por meio de receptores das enzimas conversoras de angiotensina 2 (ECA2), sendo que a proteína spike é processada pela serino protease TMPRSS2 (HOFFMANN *et al.*, 2020). Alguns testes foram realizados com inibidores de TMPRSS2 e mostraram se promissores devido ao fato de não apresentarem efeitos negativos a hemodinâmica do hospedeiro e reduzirem a internalização do vírus via receptor de ECA2 (ZHANG *et al.*, 2020).

## OBJETIVO

Amplificação plasmidial e reclonagem em pET28 dos genes de expressão das proteases TMPRSS2, SARS-CoV2 M<sup>PRO</sup> e TEV em bactérias competentes DH5 $\alpha$ .

## METODOLOGIA

A estratégia de clonagem para a produção das proteínas está sendo baseada no reportado por XUE, 2007, com pequenas variações de acordo com a construção dos insertos. Bactérias *E. Coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas isoladamente como os plasmídeos contendo os insertos das proteases TMPRSS2 ou SARS-CoV2 M<sup>PRO</sup> ou TEV os quais foram inseridos por meio de choque térmico. Posteriormente plaqueadas e deixadas overnight a 37oC em placa de meio sólido LB contendo canamicina. Efetuou-se seleção de colônias, ampliação em meio LB líquido e realizada purificação plasmidial e eletroforese em agarose para confirmação de banda indicando presença de plasmídeo. Alíquotas foram submetidas à digestão por enzimas de restrição SmaI e XbaI bem como o plasmídeo pET28 gerando extremidades coesivas. Inseto e pET28 foram submetidos a ligação por meio de t4 ligase e o produto gerado utilizado para transformação bacteriana. Esses procedimentos foram realizados para os três plasmídeos comerciais, gerando os vetores de expressão: pET28- TMPRSS2, pET28-TEV e pET28-M<sup>PRO</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização do tratamento por choque térmico e incubação das bactérias competentes, foi visualizada pequena turvação no meio de cultura, o que sugere que houve crescimento de microrganismos, logo foi suposto que haveriam microrganismos viáveis para a semeadura em meio sólido. Este fato foi confirmado no dia seguinte com o crescimento das colônias em placas de petri com meio de cultura e antibióticos, sendo este também um fato positivo se levado em conta que o gene que confere resistência bacteriana estava presente no plasmídeo que foi transformado nas bactérias em questão. A presença deste plasmídeo foi confirmada após a extração pelo método de Sambrook (SAMBROK *et al.*, 1989) e realização de eletroforese que deixou evidente 3 bandas bem próximas com massas moleculares de 3271, 3463 e 3040 pares de bases, representando os plasmídeos das proteases M<sup>PRO</sup>, TMPRSS2 e TEV, respectivamente. As alíquotas sabidamente positivas que foram semeadas em meio sólido apresentaram crescimento de colônias isoladas e foram armazenadas para possíveis novas extrações, já a alíquota que foi inoculada em meio líquido foi encaminhada para lise alcalina com kit de extração de DNA e apresentou resultado idêntico ao anterior em eletroforese, já na dosagem em nanodrop foi obtida a concentração de 200ng/uL para M<sup>PRO</sup>, 208ng/uL para TMPRSS2 e 145ng/uL para a TEV. Após a digestão por endonucleases e



purificação do produto de digestão foi observada a concentração de 35ng/uL para M<sup>PRO</sup>, 32ng/uL para a TMPRSS2, 37ng/uL para TEV e por fim 28 e 33 ng/uL para as duas aliquotas de pET28. A ligação entre vetor e inserto foi realizada e seu produto foi transformado em cepas *Escherichia coli* DH5α seguido de incubação, porém não foi observado crescimento bacteriano o que nos força a retornar ao passo de ligação, uma vez que todo o conteúdo deste processo foi utilizado no protocolo.

## CONCLUSÃO

Foi possível estabelecer metodologia de transferência do inserto das três proteases de seus respectivos plasmídeos comerciais, para o pET28 gerando os vetores de clonagem e expressão pET28- TMPRSS2, pET28-TEV e pET28-M<sup>PRO</sup>. Não houve sucesso na transformação de bactérias para obtenção dos clones de expressão, pois, as bactérias transformadas com os novos vetores de expressão não cresceram em meio seletivo, o que nos obrigará a repetir o processo de transformação. Uma hipótese é que as bactérias utilizadas tenham perdido a competência.

## REFERÊNCIAS

BHATTACHARYA R, DEV K, SOURIRAJAN A. Antiviral activity of bioactive phytocompounds against coronavirus: An update. **J Virol Methods**. 2021 Jan 23; 290:114070.

CHEN, Y. W.; YIU, C. B.; WONG, K. Y. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CL pro) structure: virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates. **F1000Res**. 2020 Feb 21;9:129.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; KRÜGER, N.; HERRLER, T.; ERICHSEN, S.; SCHIERGENS, T. S.; HERRLER, G.; WU, N. H.; NITSCHKE, A.; MÜLLER, M. A.; DROSTEN, C.; PÖHLMANN, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8.

LI, Q.; GUAN, X.; WU, P.; WANG, X.; ZHOU, L.; TONG, Y.; REN, R.; LEUNG, K. S. M.; LAU, E. H. Y.; WONG, J. Y.; XING, X.; XIANG, N.; WU, Y.; LI, C.; CHEN, Q.; LI, D.; LIU, T.; ZHAO, J.; LIU, M.; TU, W.; CHEN, C.; JIN, L.; YANG, R.; WANG, Q.; ZHOU, S.; WANG, R.; LIU, H.; LUO, Y.; LIU, Y.; SHAO, G.; LI, H.; TAO, Z.; YANG, Y.; DENG, Z.; LIU, B.; MA, Z.; ZHANG, Y.; SHI, G.; LAM, T. T. Y.; WU, J. T.; GAO, G. F.; COWLING, B. J.; YANG, B.; LEUNG, G. M.; FENG, Z. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. **N Engl J Med**. 2020 Mar 26;382(13):1199-1207.

SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2. ed. New York : **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1989. 3v. 3104p.

XUE, X.; YANG, H.; SHEN, W.; ZHAO, Q.; LI, J.; YANG, K.; CHEN, C.; JIN, Y.; BARTLAM, M.; RAO, Z. Production of authentic SARS-CoV M(pro) with enhanced activity: application as a novel tag-cleavage endopeptidase for protein overproduction. **J Mol Biol**. 2007 Feb 23;366(3):965-75.



## REVISTA CIENTÍFICA DA UMC



ZHANG, H.; PENNINGER, J. M.; LI, Y.; ZHONG, N.; SLUTSKY, A. S. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. **Intensive Care Med.** 2020 Apr;46(4):586-590.

ZHOU, P.; YANG, X. L.; WANG, X. G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H. R.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C. L.; CHEN, H. D.; CHEN, J.; LUO, Y.; GUO, H.; JIANG, R. D.; LIU, M. Q.; CHEN, Y.; SHEN, X. R.; WANG, X.; ZHENG, X. S.; ZHAO, K.; CHEN, Q. J.; DENG, F.; LIU, L. L.; YAN, B.; ZHAN, F. X.; WANG, Y. Y.; XIAO, G. F.; SHI, Z. L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature.** 2020 Mar;579(7798):270-273.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X.; YANG, B.; SONG, J.; ZHAO, X.; HUANG, B.; SHI, W.; LU, R.; NIU, P.; ZHAN, F.; MA, X.; WANG, D.; XU, W.; WU, G.; GAO, G. F.; TAN, W. China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med.** 2020 Feb 20;382(8):727-733.

WU, F.; ZHAO, S.; YU, B.; CHEN, Y. M.; WANG, W.; SONG, Z.G.; HU, Y.; TAO, Z. W.; TIAN, J. H.; PEI, Y. Y.; YUAN, M. L.; ZHANG, Y. L.; DAI, F. H.; LIU, Y.; WANG, Q. M.; ZHENG, J. J.; XU, L.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y. Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature.** 2020 Mar;579(7798):265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3. Epub 2020 Feb 3. Erratum in: **Nature.** 2020 Apr;580(7803):E7.