

Gabrielli Perez Pedro

Orientador: Dr. Sérgio Daishi Sasaki; Co-Orientador: Fábio Thimoteo de Mendonça  
perezgabrielli@hotmail.com; sergio.sasaki@ufabc.edu.br; fabiothimoteo@hotmail.com;

## INTRODUÇÃO

A COVID-19 — do inglês “*Coronavirus Disease 2019*” — foi inicialmente identificada em dezembro de 2019, na China. Posteriormente, em março de 2020, foi declarada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A doença é causada pelo agente etiológico SARS-CoV-2, que pertence à família *Coronaviridae*. Possui em sua estrutura a proteína *Spike* (S) — dividida em duas subunidades funcionais, S1 e S2 —, que é onde o processo de infecção se inicia. O receptor de membrana enzima conversora de angiotensina II (ECA2) se liga à proteína S, mais especificamente no *receptor binding domain* (RBD), presente na subunidade S1, que apresenta complementariedade de ligação com a ECA2 [1]. Mais adiante, após a ancoragem do coronavírus com o receptor, entra em ação a enzima serinoprotease transmembranar 2 (TMPRSS2), que atua na clivagem da proteína *Spike*, induzindo a fusão de membranas da célula hospedeira com a membrana viral e formando um endossomo, que deve transportar o RNA viral até o citoplasma [2]. Posteriormente, no citoplasma, ocorre a etapa de desnudamento, em que o material genético sai de dentro do endossomo, dando continuidade à replicação viral. Drogas que bloqueiam a atividade da TMPRSS2 têm se mostrado candidatas ao tratamento terapêutico da COVID-19. Portanto, o estudo da enzima TMPRSS2 é importante para o desenvolvimento de estratégias de controle da infecção viral.

## OBJETIVOS

Expressar a proteína recombinante TMPRSS2 em bactérias *Escherichia coli* BL-21(DE3) e a elaboração de um modelo de ensaio enzimático de forma rentável para a verificação de sua atividade proteolítica com caseína.

## MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1 - Transformação bacteriana

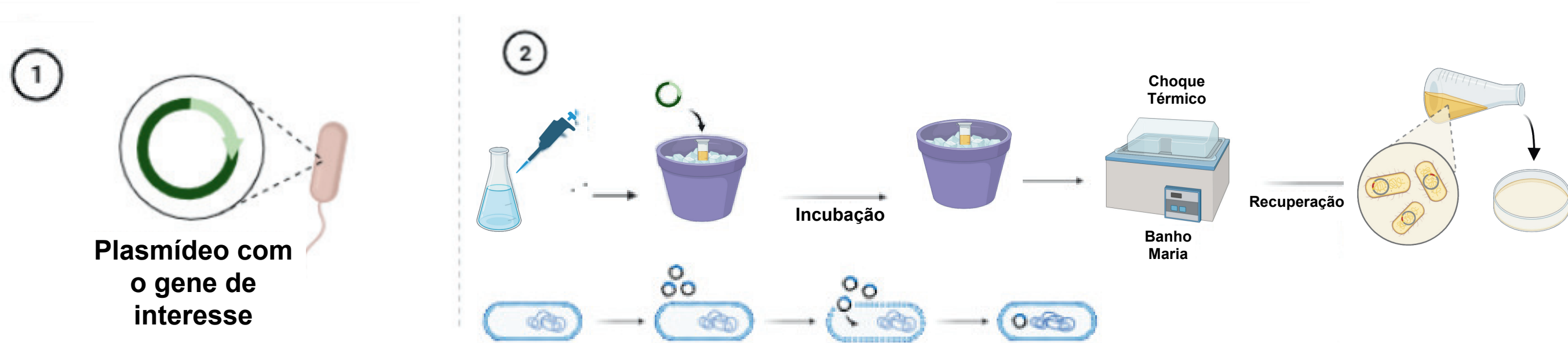


Figura 2 - Inóculo, crescimento bacteriano e indução

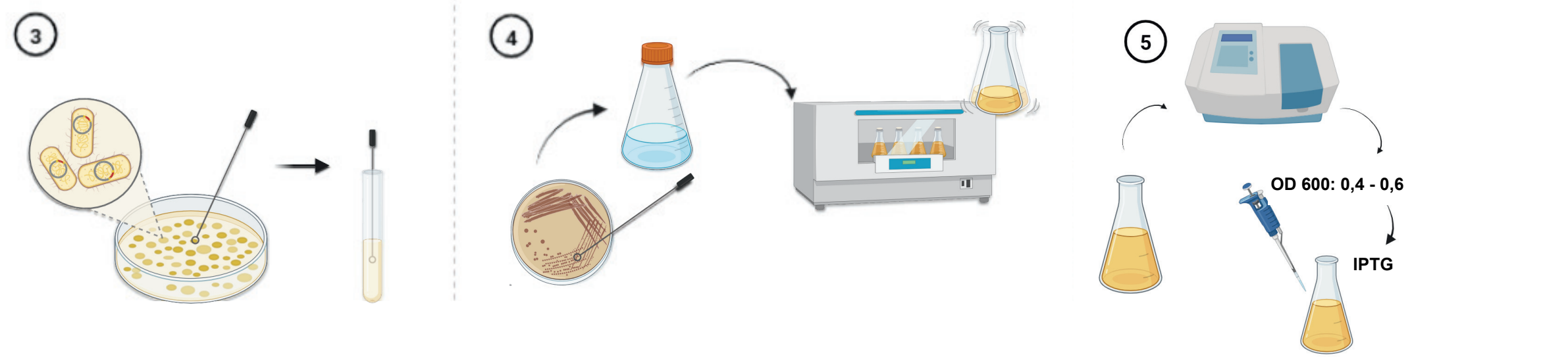


Figura 3 - Lise bacteriana por sonicação e SDS-PAGE

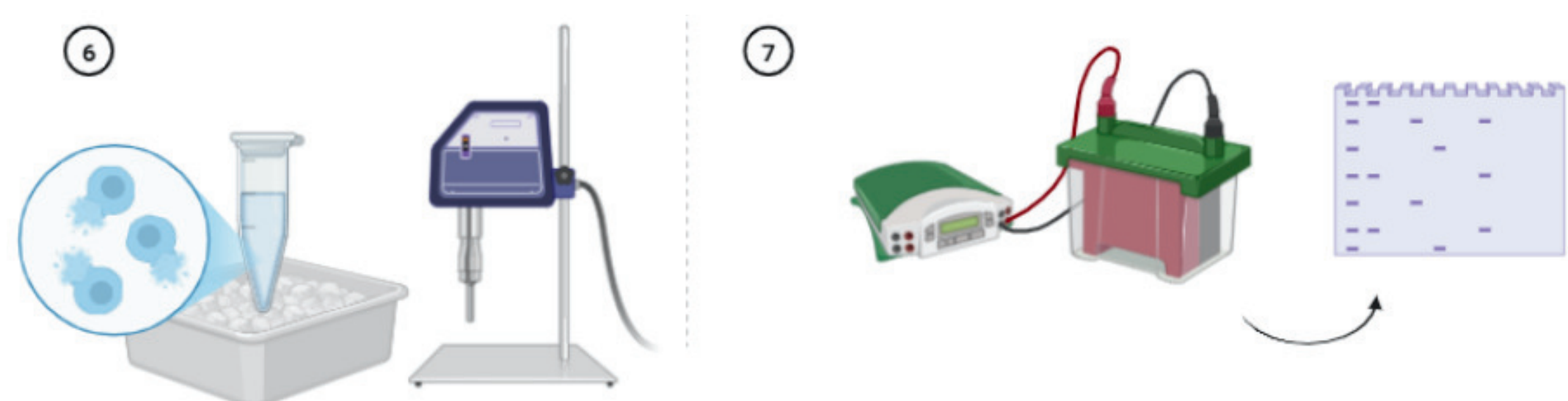
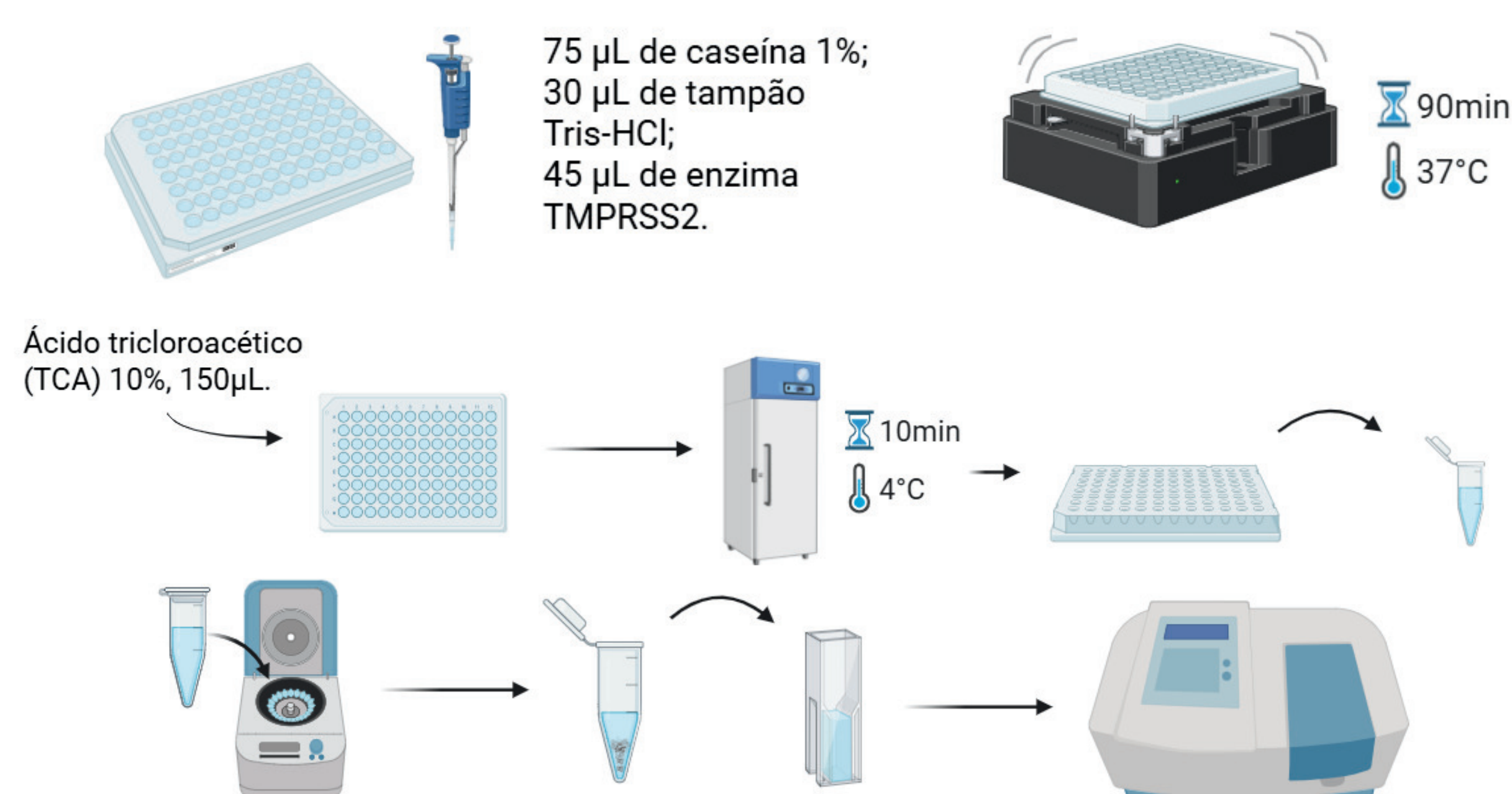


Figura 4 - Protocolo de quantificação de hidrólise de enzima utilizando Caseína



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 5 – SDS-PAGE da proteína recombinante XXA-TMPRSS2 em que as amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são, respectivamente: Lisado, sonicado, não retido e eluição 13, 14 e 15 do cromatograma.

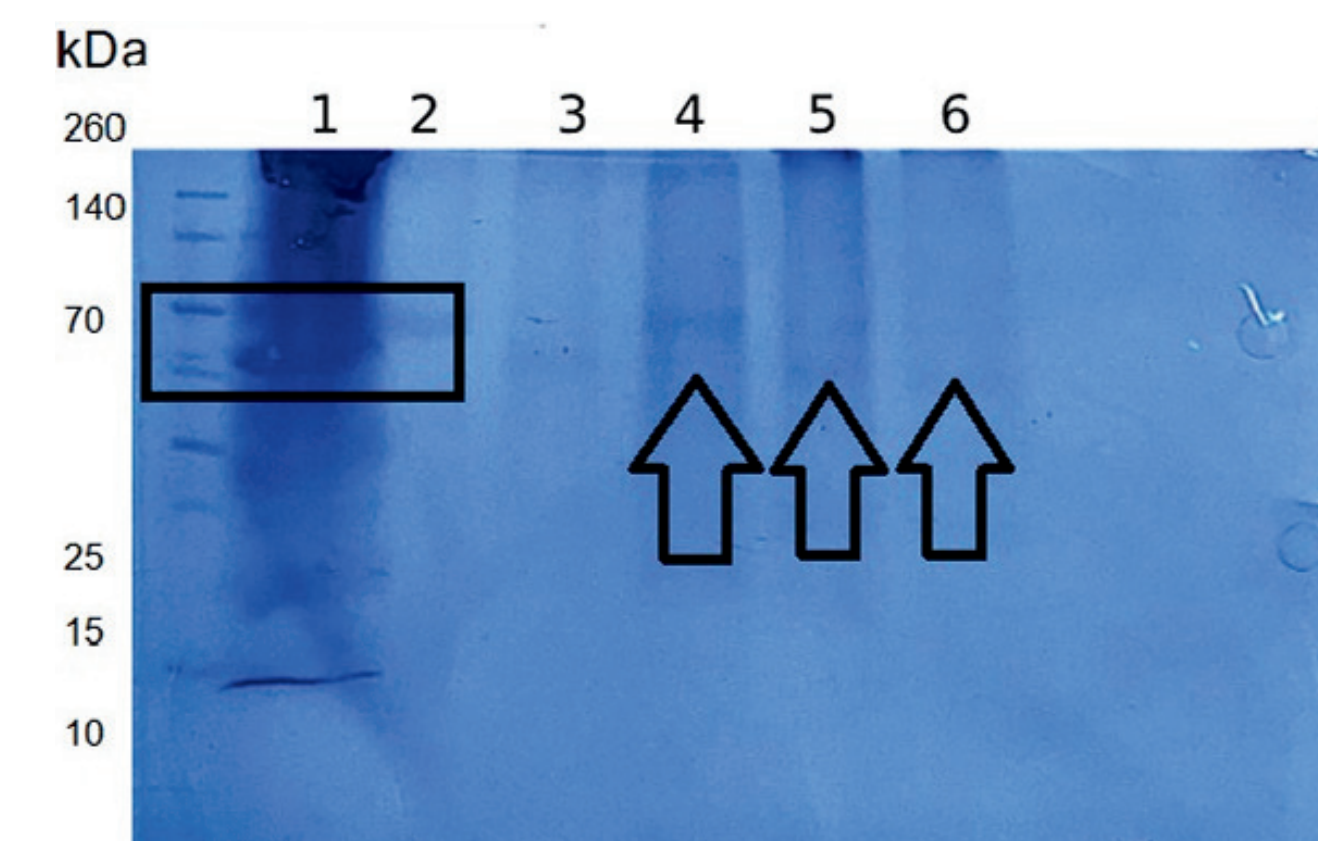


Figura 6 - Gráfico referente à hidrólise das amostras de acordo com a absorbância. No eixo X a unidade 1 se refere ao branco, as unidades 2, 3 e 4 são a triplicata e a unidade 5 é a média da triplicata.

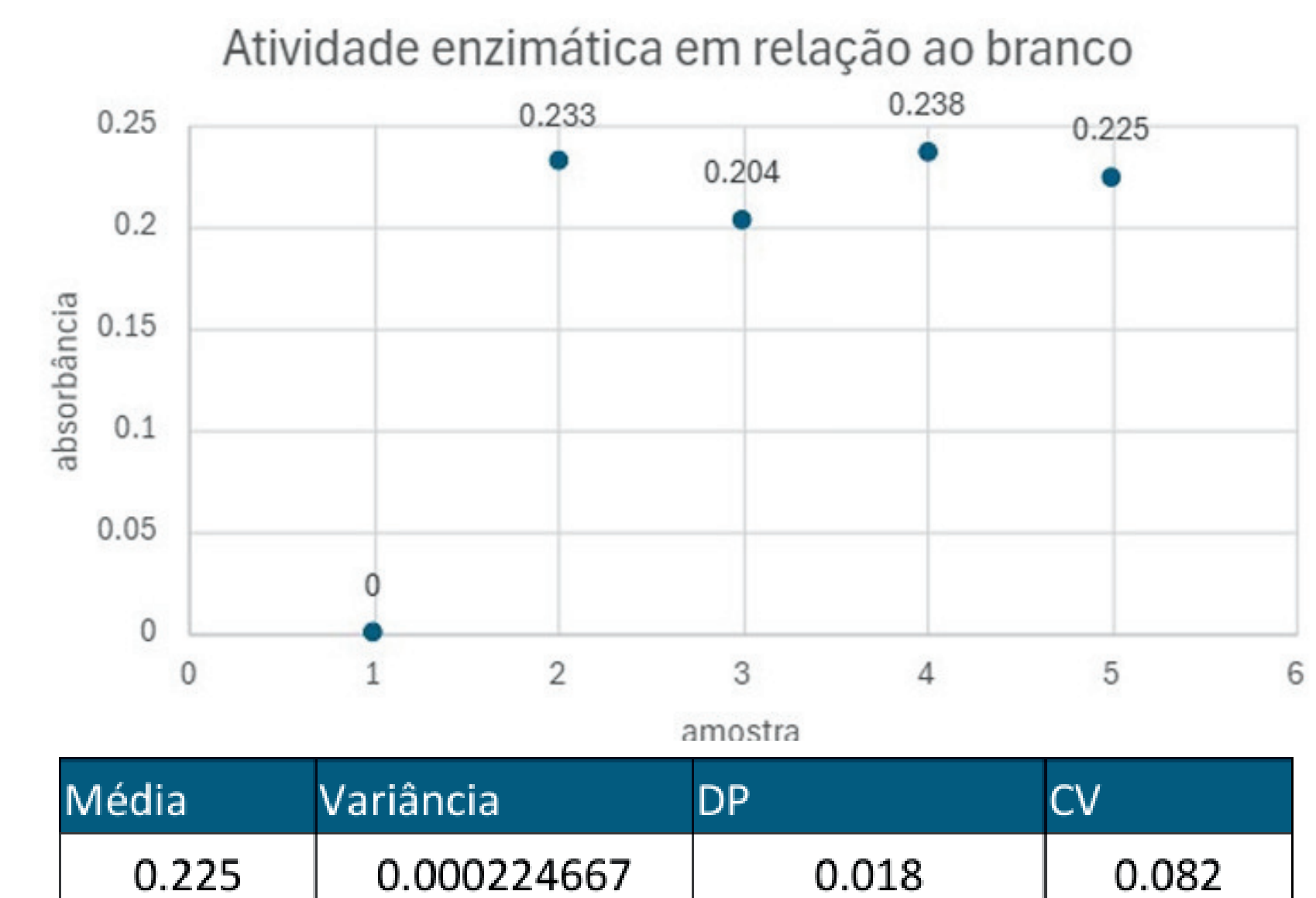
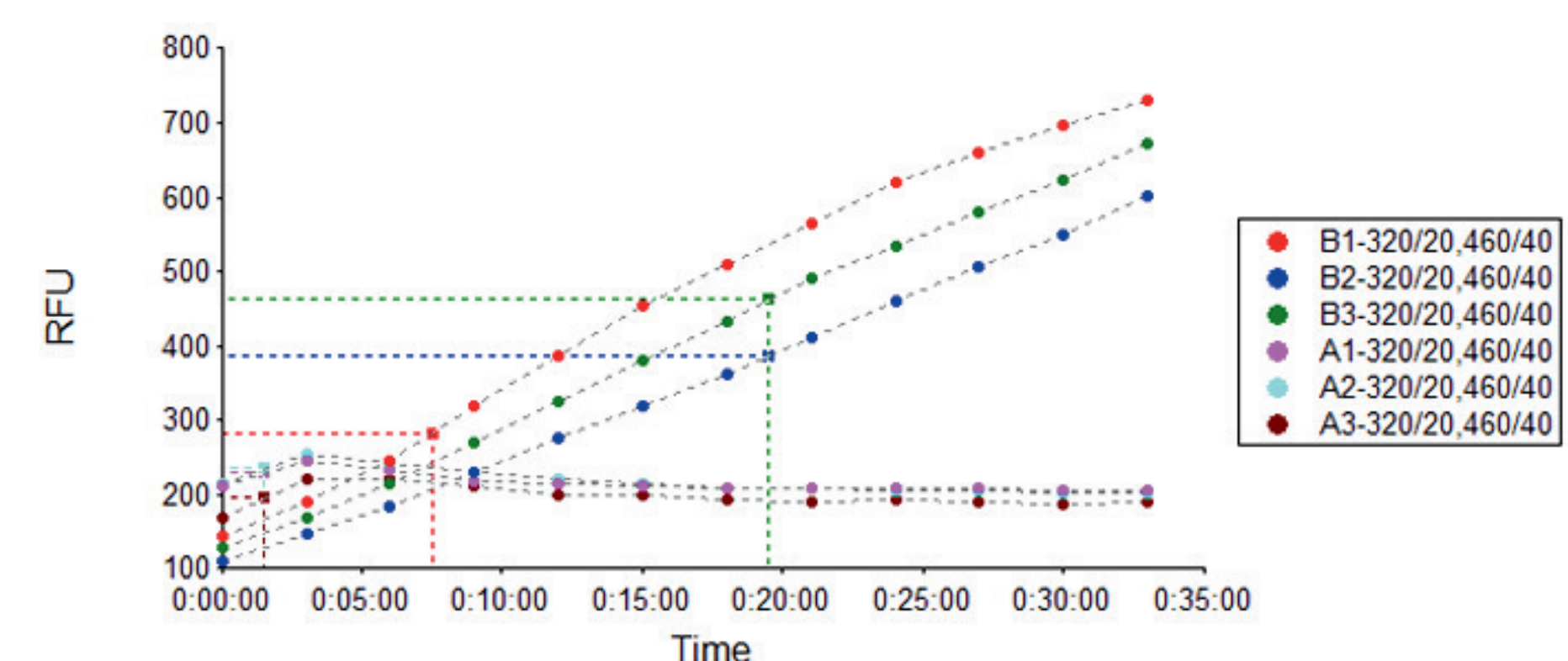


Figura 7 - Gráfico referente à quantificação de proteínas na leitura de placa contendo 6 curvas, em que 3 delas não possuem enzima (A1, A2, A3) e 3 possuem (B1, B2, B3)



## CONCLUSÃO

Portanto, a proteína XXA-TMPRSS2 foi corretamente expressa, uma vez que o gel SDS-PAGE (Figura 5) apresentou uma banda em aproximadamente 70 kDa, compatível com os valores descritos na literatura.

Além disso, a atividade proteolítica foi confirmada pois a fluorescência da amostra é numericamente superior ao branco (Figura 6), o que evidencia a ocorrência do processo de hidrólise. Ao adicionar os dados em um plano cartesiano com eixo X e Y (sendo X o eixo de fluorescência e Y o eixo do tempo), observa-se uma inclinação positiva da reta, característica de uma função de primeiro grau, o que reforça a conclusão cinética do experimento.

Por fim, a leitura de placa garantiu os achados ao quantificar a atividade enzimática (Figura 7), confirmando a eficiência do protocolo e consolidando a comprovação da atividade hidrolítica da TMPRSS2

## AGRADECIMENTOS

Trabalho financiado pela CNPq na modalidade PIBIC-EM/CNPq.

## REFERÊNCIAS

- [1] ZHOU, Peng; YANG, Xing-Lou; WANG, Xian-Guang; HU, Ben; ZHANG, Lei; ZHANG, Wei; SI, Hao-Rui; ZHU, Yan; LI, Bei; HUANG, Chao-Lin. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, London, v. 579, n. 7798, p. 270-273, 3 fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- [2] IWATA-YOSHIKAWA, Naoko; OKAMURA, Tadashi; SHIMIZU, Yukiko; HASEGAWA, Hideki; TAKEDA, Makoto; NAGATA, Noriyo. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. *Journal of Virology*, Washington, v. 93, n. 6, p. 1-15, 15 mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01815-18>.