



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Efeito das proteínas NSP4 e ORF9b de SARS-CoV-2 sobre a viabilidade celular e
identificação de ligantes contra NSP4**

Deborah Kimie Yonamine

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como
parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2023

Resumo

Yonamine, D. K. **Efeito das proteínas NSP4 e ORF9b de SARS-CoV-2 sobre a viabilidade celular e identificação de ligantes contra NSP4**. 2023. 138f. Tese (doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A pandemia da doença coronavírus 2019 (COVID-19) causado pelo novo coronavírus humano, denominado de coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), originou-se em Wuhan, China, tem representado uma ameaça global à saúde humana, à segurança pública e à economia global. Para a produção de vírions maduros de SARS-CoV-2 durante o ciclo infeccioso, os metabólitos das células hospedeiras são requeridos, assim como o escape da resposta antiviral é necessário. Nesse contexto, a replicação do SARS-CoV-2 depende da formação de vesículas de membrana dupla (DMVs) que tem a sua biogênese facilitada pelas proteínas não estruturais NSP3, 4 e 6 e formadas a partir do retículo endoplasmático. Além disso de modo a se evadir da resposta imune do hospedeiro esse vírus possui estratégias para antagonizar as respostas dos interferons, que é suprimido em grande parte pela proteína ORF9b. Considerando a importância da formação dos DMVs, buscou-se identificar compostos contra NSP4 e potencialmente impedir a formação das vesículas de membrana dupla. Nesse sentido, a proteína NSP4 foi expressa em Rosetta™(DE3)pLysS, purificada por cromatografia de afinidade e imobilizada em partículas magnéticas as quais foram submetidas à técnica de *Ligand fishing* com 10 potenciais alcalóides extraídos de espécies de Amaryllidacea, bem como o seu extrato bruto, dos quais cinco foram identificados como potenciais compostos contra SARS-CoV-2. São eles: 2- α -7-dimetoxihomolicorina, hemantidina, albomaculina, tazetina e aulicina, os quais apresentaram razão de afinidade de 1,89; 3,15; 2,9, 2,42 e 1,45 respectivamente. Além disso, a fim de se entender o papel das proteínas NSP4 e ORF9b diretamente nas células, avaliou-se os seus efeitos quando expressas em células da linhagem de fibroblastos pulmonares neonatais de camundongos MLG2908. Os resultados relevaram que ambas as proteínas aumentaram os níveis de espécies reativas de oxigênio mitocondrial na ordem de 39% e 23%, respectivamente. Além disso, após 24 e 48 h pós-transfecção com Nsp4, houve uma redução significativa nos níveis de MAVS, atingindo 0,11% e 0,29%, respectivamente. De maneira semelhante, ORF9b também reduziu a expressão MAVS em 0,31 \pm 0,02 após 24 h de transfecção. Adicionalmente, a NSP4 resultou em uma diminuição de 9% e 11%, nos níveis de viabilidade celular e de ATP, assim como uma redução em 8% e 11% do potencial de membrana após 24 e 48 horas de transfecção, respectivamente. Observou-se também a ativação da via intrínseca da apoptose pela NSP4, com aumento da ativação da caspase 9 em 0,22% após 24 h de transfecção e a ativação da caspase 3 em de 0,42 e 0,40% após 48 e 72 h de transfecção, respectivamente. A NSP4 também ativou a via de apoptose independente de caspase, indicada pelo aumento de AIF em 0,49% após 72 h de transfecção. Adicionalmente, a NSP4 causou a fragmentação e condensação nuclear após 24, 48 e 72 h de transfecção, com aumento de 6,64%; 4,54% e 7,89 %, respectivamente, indicando morte celular programada. Esses resultados destacam a influência das proteínas NSP4 e ORF9b do SARS-CoV-2 na função celular, com implicações importantes para a compreensão da patogênese viral e o desenvolvimento de possíveis estratégias terapêuticas.

Palavras chave: SARS-CoV-2; COVID-19; NSP4; ORF9b; mitocôndria, *ligand fishing*.

Abstract

Yonamine, D. K. **Effect of SARS-CoV-2 NSP4 and ORF9b proteins on cell viability and identification of ligands against NSP4**. 2023. 138f. Tese (doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by the new human coronavirus, called severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which originated in Wuhan, China, has represented a global threat to human health, public safety and the global economy. For the production of mature SARS-CoV-2 virions during the infectious cycle, metabolites from host cells are required, as well as escape from the antiviral response is necessary. In this context, the replication of SARS-CoV-2 depends on the formation of double-membrane vesicles (DMVs) whose biogenesis is facilitated by the non-structural proteins NSP3, 4 and 6 and formed from the endoplasmic reticulum. Furthermore, in order to evade the host's immune response, this virus has strategies to antagonize interferon responses, which are largely suppressed by the ORF9b protein. Considering the importance of the formation of DMVs, we sought to identify compounds against NSP4 and potentially prevent the formation of double-membrane vesicles. In this sense, the NSP4 protein was expressed in Rosetta™(DE3)pLysS, purified by affinity chromatography and immobilized on magnetic particles which were subjected to the Ligand fishing technique with 10 potential alkaloids extracted from one of the species of Amaryllidacea a *Hippeastrum aulicum*, of which four were identified as potential compounds against SARS-CoV-2. They are: 2- α -7-dimethoxyhomolycorine, hemanthidine, albomaculin, tazetine and aulicine which presented an affinity ratio of 1.89; 3.15; 2.9, 2.42 and 1,45 respectively. Furthermore, in order to understand the role of NSP4 and ORF9b proteins on mitochondrial function and cell viability, their effects were evaluated in cells from the MLG2908 mouse neonatal lung fibroblast line. The results revealed that both proteins increased the levels of mitochondrial reactive oxygen species by 39% and 23%, respectively. Furthermore, after 24 and 48 h post-transfection with Nsp4, there was a significant reduction in MAVS levels, reaching 0.11% and 0.29%, respectively. Similarly, ORF9b also reduced MAVS expression by 0.31 ± 0.02 after 24 h of transfection. Additionally, NSP4 resulted in a 9% and 11% decrease in cell viability and ATP levels, as well as an 8% and 11% reduction in membrane potential after 24 and 48 hours of transfection, respectively. The activation of the intrinsic apoptosis pathway by NSP4 was also observed, with an increase in the activation of caspase 9 by 0.22% after 24 h of transfection and the activation of caspase 3 by 0.42 and 0.40% after 48 and 72 h of transfection, respectively. NSP4 also activated the caspase-independent apoptosis pathway, indicated by the increase in AIF by 0.49% after 72 h of transfection. Additionally, NSP4 caused nuclear fragmentation and condensation after 24, 48 and 72 h of transfection, with an increase of 6.64%; 4.54% and 7.89%, respectively, indicating programmed cell death. These results show that the SARS-CoV-2 proteins NSP4 and ORF9b affect cellular function, which is important for understanding viral pathogenesis and the development of possible therapeutic strategies.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; NSP4; ORF9b; mitochondria, *ligand fishing*.

1. Introdução

As doenças infecciosas virais vêm ameaçando a saúde da humanidade ao longo de muitos anos (YOUNES *et al.*, 2020). O surgimento e a propagação de vírus animais que ameaçam os humanos são facilitados por diversos fatores, dentre eles as mudanças nos ecossistemas, precarização da saúde pública, urbanização de alta densidade e elevada circulação de pessoas entre cidades e países (EXCLER *et al.*, 2021). Desde a descoberta dos primeiros coronavírus (CoV), em 1965, por (TYRRELL & BYNOE, 1965), novas cepas vêm surgindo em virtude da sua capacidade de infectar, mutar e recombinar entre as diferentes espécies de hospedeiro e tipos celulares (MIRANDA *et al.*, 2021).

Nesse cenário, o século XXI vivenciou o surgimento e a epidemia de três coronavírus com graves consequências ao redor do mundo: coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) em 2003; coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) em 2012 e em 2019, na cidade de Wuhan, na China, surgiu o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave- 2 (SARS-CoV-2) (TU *et al.*, 2020).

A pandemia COVID -19 (do inglês *coronavirus disease 19*) foi causada pelo SARS-CoV-2, que teve seu primeiro caso relatado no dia 8 de dezembro de 2019. Em 31 de dezembro, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi notificada pela Comissão Municipal de Saúde de Wuhan sobre um surto de pneumonia de causa não identificada. Em 30 de janeiro, a OMS declarou o surto do novo coronavírus e em 11 de março de 2020 a OMS declarou a COVID-19 como uma pandemia (FLINT, 2020). Em 11 de fevereiro, o novo coronavírus foi denominado de “SARS-CoV-2” pelo Comitê Internacional de Taxinomia, e a OMS nomeou a doença de “COVID-19” (HU *et al.*, 2020). Finalmente, em 05 de maio de 2023, a OMS declarou o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional referente à COVID-19 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2023).

Os pacientes infectados com COVID-19 apresentam vários sintomas, dentre eles febre, tosse seca, dificuldades respiratórias, tremores, dor de cabeça, corrimento nasal, dores musculares e perda do paladar e olfato (RAJNIK *et al.*, 2021). Ademais, o COVID-19 promove múltiplas lesões nos lóbulos pulmonares e nos lóbulos hepáticos (GE *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020a).

De acordo a OMS, no dia 19 de setembro de 2023, foram relatados mais de 770 milhões de casos de COVID-19 e mais de 6,9 milhões de mortes no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Segundo o Painel Coronavírus do Ministério da Saúde, o Brasil

possui nessa mesma data, quase 37 milhões de casos confirmados da doença e mais de 704 mil óbitos (SAÚDE, 2021). Devido à gravidade da doença, inúmeros esforços estão sendo direcionados em todas as regiões do mundo, visando sua erradicação, prevenção e tratamento.

Devido a todos os protocolos sanitários recomendados, como distanciamento social, uso de máscaras, higienização de ambientes e mãos e do desenvolvimento de vacinas, a pandemia foi controlada e a OMS declarou o fim da Emergência de Saúde Pública (WISE, 2023). Todavia, a necessidade de estudos envolvendo o vírus SARS-CoV-2 ainda é de interesse mundial.

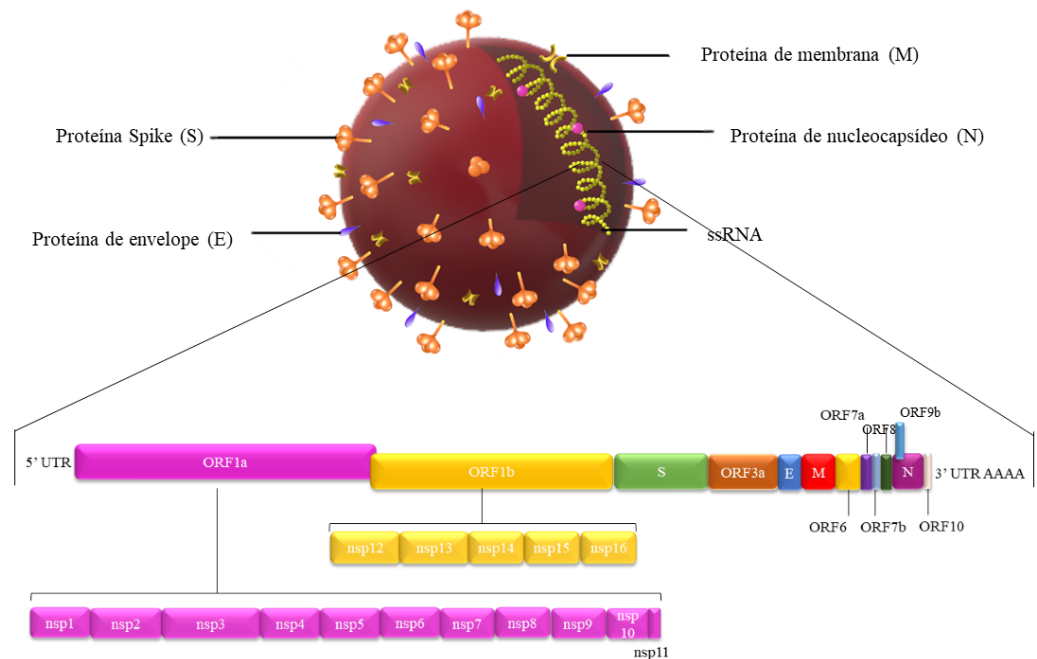
1.1. SARS-CoV-2

Os Coronavírus (CoVs) são pertencentes à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e subfamília *Coronavirinae*, que possui quatro gêneros (Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus) (CUI *et al.*, 2019). Os coronavírus mais mortais conhecidos em humanos são o SARS-CoV-2, pertencente ao gênero betacoronavírus, juntamente com o MERS-CoV e SARS-CoV (com 50% e 79% de homologia com SARS-CoV-2, respectivamente) (MALIK, 2020).

Dentre todas as famílias de vírus de RNA, os CoVs possuem os maiores genomas, com tamanho médio entre 22-32 Kb (KIM *et al.*, 2020). Assim como outros coronavírus, o SARS-CoV-2 é um vírus envelopado que possui um genoma viral (+)ssRNA (do inglês, *positive-sense single stranded RNA viroses*) de 30 Kb que codifica 14 fases de leitura aberta (ORFs). Semelhante aos demais betacoronavírus, possui em suas extremidades um cap-5' no início e uma cauda poli (A) no final do transcrito de RNA (SANTERRE *et al.*, 2021).

São descritas seis ORFs principais no SARS-CoV-2. As ORF1a e ORF1b são ORFs sobrepostas e presentes na extremidade 5' do genoma (YUNG-FANG TU *et al.*, 2020). Quando processadas, geram as 16 proteínas não estruturais (NSP1-16) e ocupam dois terços do comprimento de todo o genoma e do subgenoma de RNA. Essas proteínas desempenham papéis relacionados à patogênese viral, incluindo sua função na replicação, bem como na sinalização celular e modificação da expressão gênica. As quatro principais proteínas estruturais de SARS-CoV-2 são: glicoproteína de superfície de pico (S), proteína de envelope (E), proteína de membrana (M) e proteína do nucleocapsídeo (N) (FINKEL *et al.*, 2021; PHAN, 2020) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura do genoma do SARS-CoV-2. O vírus é revestido por um envelope lipídico recoberto por proteínas de pico (S). O RNA viral corresponde a 29.903 nucleotídeos. Possui um complexo replicase composto por duas fases de leitura sobrepostos denominados ORF1a e ORF1b na 5'UTR, que traduzem duas poliproteínas devido ao deslocamento de quadro ribossômico. A ORF1a codifica as NSP1-11, enquanto a ORF1b codifica as NSP12-16. Essas poliproteínas são processadas em Nsps maduras pelas M^{pro} , que é a Nsp5 e PL^{pro} , que faz parte da Nsp3, representadas pelos triângulos brancos e pretos, respectivamente. Em seguida estão os genes que codificam para proteínas estruturais intercalados por proteínas acessórias: gene spike (S), gene envelope (E), gene membrana (M), gene nucleocapsídeo (N) e uma cauda poli(A) na extremidade 3' UTR.



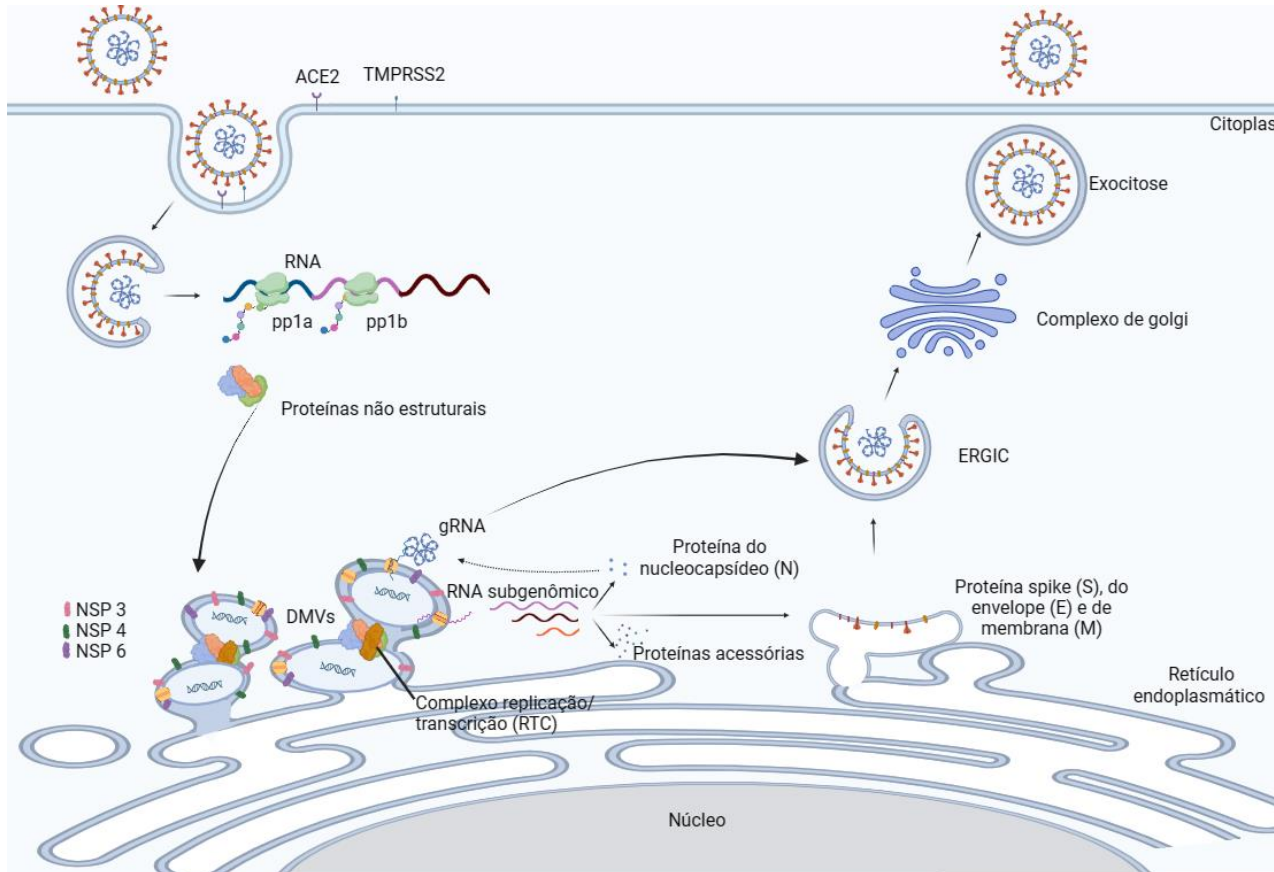
Fonte. Foto autoral criada com Biorender (Biorender, 2023).

Para o vírus entrar em uma célula hospedeira, a proteína Spike do SARS-CoV-2 interage com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) na superfície celular, enquanto é clivada por proteases celulares como a serina protease 2 (TMPRSS2) de modo a ativar a sua capacidade de fusão de membrana. O RNA genômico é então liberado da partícula viral e traduzido em duas poliproteínas replicantes, pp1a e pp1b, após recrutar ribossomos da célula hospedeira. As primeiras proteínas não estruturais codificadas são a proteinase semelhante à papaína (PL^{pro} , NSP3) e a protease M^{pro} , uma proteinase semelhante à 3-quimiotripsina (NARWAL *et al.*, 2023).

Essas proteínas clivam a poliproteína ORF1ab em 16 proteínas não estruturais (NSP1-16). Juntas, formam um complexo adequado para a replicação e transcrição viral, denominado complexo de replicação/ transcrição (RTC), essencial para o ciclo de vida do SARS-CoV-2 (FINKEL *et al.*, 2021; SANTERRE *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020b). Posteriormente, os RTC produzem novos gRNAs e um conjunto de RNAs subgenômicos (sgRNAs) e servem como modelo para a produção de mRNAs subgenômicos que serão traduzidas em proteínas estruturais e acessórias (CHEN *et al.*, 2020). As proteínas estruturais translocam-se para a membrana do

retículo endoplasmático e transitam pelo compartimento intermediário ER-para-Golgi (ERGIC) no qual ocorre a montagem do SARS-CoV-2. Finalmente, os vírions são secretados da célula infectada por exocitose (V'KOVSKI *et al.*, 2020) (Figura 2).

Figura 2. Ciclo de replicação do SARS-CoV-2.



Fonte: Foto autoral criada com Biorender (Biorender, 2023).

Mudanças no genoma do SARS-CoV-2, como mutações e deleções, podem alterar o seu potencial patogênico, permitindo o surgimento de diferentes linhagens de SARS-CoV-2 e dificultando o desenvolvimento de drogas e vacinas (GIOVANETTI *et al.*, 2021). Atualmente são relatadas ao menos onze variantes conhecidas (Alfa, Beta, Gama, Delta, Delta Plus, Epsilon, Eta, Theta, Iota, Kappa, Lambda e Omicron) (TAMURA *et al.*, 2022; KANNAN *et al.*, 2021), sendo que algumas dessas tornaram-se dominantes em seus países, despertando preocupações. As variantes, Alfa (B.1.1.7); Beta (B.1.351); Gama (P.1) e mais recentemente a variante Delta (B.1.617.2), foram inicialmente relatadas no Reino Unido, África do Sul, Brasil e Índia respectivamente (KARIM & OLIVEIRA, 2021). A variante Delta foi considerada como uma

variante de preocupação (VOC) pela OMS, uma vez que possui um aumento na transmissão de 66% e é mais propensa à evasão imunológica (ALIZON *et al.*, 2021).

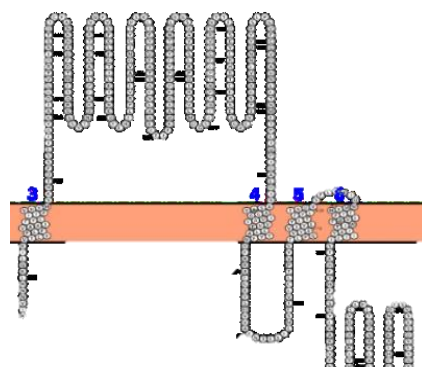
A variante Omicron (BA.1) foi a principal variante por alguns meses, porém foi substituída por uma série de outras subvariantes, tais como BA.2, BA. 4 e BA.5. Além disso, uma subvariante emergiu no final de 2022 com a recombinação de duas linhagens BA.2 gerando a subvariante denominada de XBB (TAMURA *et al.*, 2022). Recentemente, a linhagem XBB.1.16 (Arcturus) foi descrita pela primeira vez em janeiro de 2023 e rapidamente se tornou a linhagem dominante (NEHLMEIER *et al.*, 2023) sendo detectada pela primeira vez no Brasil em abril de 2023, uma segunda variante recém-emergida derivada da CBB.1.9.2, a EG.5 conhecida como Éris, foi detectada no Brasil em setembro de 2023 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

Faizan *et al* 2022 investigou o impacto mitocondrial e a morte celular ocasionada pelas proteínas do SARS-CoV-2, revelando que duas proteínas desse vírus induziram significativamente o dano mitocondrial, caracterizado por alterações mitocondriais, permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de DNA mitocondrial.

1.1.1. NSP4

A NSP4 é a subunidade da poliproteína ORF1ab e uma das proteínas não-estruturais (NSPs) de coronavírus (MANOLARIDIS *et al.*, 2009). Trata-se de uma proteína de membrana, não específica de SARS-CoV-2, composta por 500 aminoácidos, que conferem uma massa molecular de 56 kDa, com quatro domínios transmembrana e um domínio citoplasmático C-terminal (ALSAADI J & JONES, 2019) (Figura 3).As proteínas de membrana são alvo de mais de 50% dos medicamentos atuais (URNER *et al.*, 2020), entretanto o número de proteínas de membrana com estrutura conhecida é pouco relatado em comparação às proteínas solúveis, devido às dificuldades de sua expressão, solubilização, purificação e cristalização (KIELKOPF *et al.*,2021).

Figura 3. Topologia da NSP4

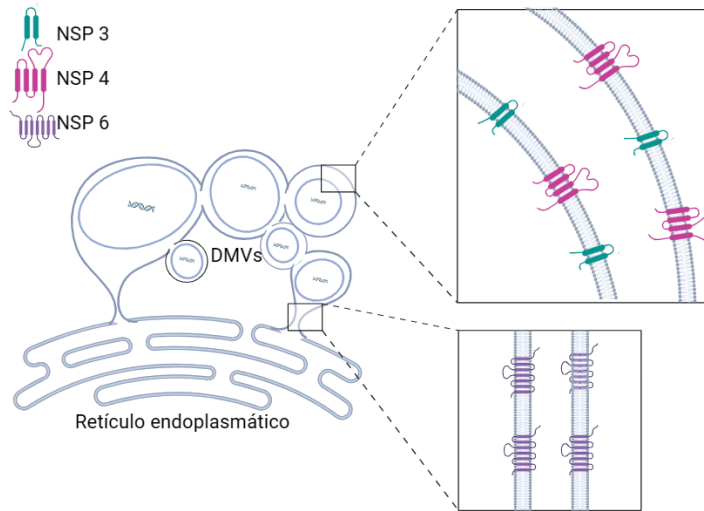


Fonte. Determinada através da ferramenta Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/>).

Embora os vírus (+)ssRNA tenham seu próprio material genético, eles são dependentes da maquinaria celular do hospedeiro para se desenvolverem. Dessa forma, para produzir vírions maduros, os vírus dependem dos metabólitos da célula hospedeira (nucleotídeos, aminoácidos, ácidos graxos) durante o ciclo infeccioso (GATTI *et al.*, 2020), além de sequestrarem os mecanismos de defesa da célula e criarem uma barreira entre o compartimento de replicação e os sensores imunológicos inatos, replicando-se e propagando-se com sucesso (SINGH *et al.*, 2020).

No caso dos coronavírus, sua replicação se baseia na formação de vesículas de membrana dupla (DMVs) (Figura 4) derivadas do retículo endoplasmático (RE), que servem para ocultar o RNA viral, permitindo o escape da resposta antiviral do hospedeiro (SINGH *et al.*, 2020). Nesse sentido, as proteínas não estruturais, NSP3, 4 e 6, se destacam por possuírem domínios transmembranas (TM). As proteínas NSP3 e NSP4 são responsáveis pela formação dos DMVs, enquanto a proteína NSP6 é responsável pela formação de finos canais, similares a um zíper, que realizam a conexão entre o retículo endoplasmático e a vesícula replicativa. Tais proteínas não estruturais demonstraram serem essenciais na biogênese dos DMVs (ALSAADI J & JONES, 2019; FUNG & LIU, 2018).

Figura 4. Arquitetura de DMVs induzidas por coronavírus. Interação heterotípica entre NSP3 e NSP4 para a curvatura e emparelhamento de membrana necessário para a formação de vesículas de membrana dupla (DMVs) derivadas do retículo endoplasmático.



Fonte: Foto autoral criada com Biorender (Biorender, 2023).

A morfologia de DMVs possuem semelhanças notáveis com autofagossomos (MOHAN, J. & WOLLERT, T., 2021), com uma ligação direta proposta entre a formação de DMVs e a autofagia para alguns vírus, como o SARS-CoV (REGGIORI *et al.*, 2010). Além disso, mutações específicas nos resíduos 258 resultou em um fenótipo sensível à temperatura caracterizado pela diminuição do número de DMVs (CLEMENTZ *et al.*, 2008). Ainda, mutações em outros dois resíduos de aminoácidos dessa proteína, nas posições 120 e 121 inibiu a replicação viral ao prejudicar os rearranjos da membrana na formação dos DMV (SAKAI *et al.*, 2017). Esses resultados demonstram que essa proteína e a sua conservação é essencial na replicação do genoma viral (CHAKRABORTY *et al.*, 2023).

Wu e colaboradores realizaram um trabalho *in silico* (WU *et al.*, 2020) e sugeriram que o RNA de SARS-CoV-2 localiza-se preferencialmente nas mitocôndrias das células hospedeiras, podendo prejudicar a função mitocondrial, alterar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BURTSCHER *et al.*, 2020); induzir a disfunção mitocondrial, gerando o aumento do número de vesículas de membrana dupla (DMVs) (SINGH *et al.*, 2020); além de interagir potencialmente com componentes da maquinaria de importação de proteínas da membrana mitocondrial interna (complexo TIM), necessárias para manter a integridade estrutural das mitocôndrias (GORDON *et al.*, 2020).

Além disso, uma vez que a replicação viral consiste na formação de DMVs derivadas do retículo endoplasmático, é plausível que o SARS-CoV-2 possa manipular a mitocôndria a

seu favor, resultando na indução de membranas duplas derivadas de mitocôndrias, ocultando o vírus das respostas imunológicas do hospedeiro e permitindo a replicação viral (SINGH *et al.*, 2020).

1.1.2. ORF9b

A ORF9b é uma proteína acessória do quadro de leitura alternativo do gene do nucleocapsídeo (N) de SARS-CoV-2 que codifica uma proteína de 97 aminoácidos e 10,8 kDa, possuindo similaridade de 72,4% com a ORF9b de SAR-CoV (AYINDE *et al.*, 2022).

De modo a se evadirem da resposta imune do hospedeiro, os vírus desenvolveram estratégias para antagonizar a resposta do interferon (IFN). Nesse sentido, a ORF9b de SARS-CoV-2 possui como função principal a supressão de grande parte do interferon tipo I e III (IFN-I e IFN-III) devido ao seu direcionamento mitocondrial e associação ao TOM70 (JIANG *et al.*, 2020) e inibição de MAVS nas mitocôndrias que medeiam a síntese de IFN (KIM & SHIN, 2021). A resposta (IFN) tipos I e III é a reação do sistema imune a uma infecção viral do hospedeiro (TOTURA & BARIC, 2012).

ORF9b também possui como alvo a proteína mitocondrial MAVS, que é um adaptador essencial para a via de sinalização antiviral RIG-I/MDA5 e a produção de IFN- β (SHI *et al.*, 2014).

1.2. Mitocôndria

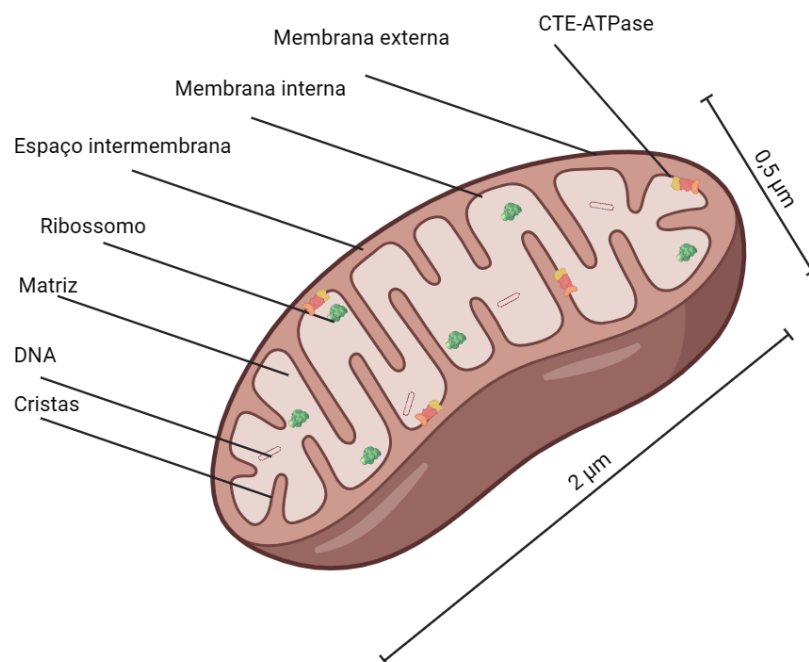
1.2.1. Estrutura e função

Segundo a teoria endossimbionte aceita, as mitocôndrias originaram-se de uma relação simbiótica entre α -proteobactéria e uma arqueobactéria (CUI *et al.*, 2019). Apesar da mitocôndria possuir variabilidade morfológica, pode-se definir uma morfologia básica. Nesse sentido, a mitocôndria é uma organela de forma oval com aproximadamente 2 μm de comprimento e 0,5 μm de diâmetro formada duas membranas e dois compartimentos aquosos, o espaço intermembrana e a matrix.

A membrana mitocondrial externa é permeável a maior parte dos íons e moléculas pequenas e medeia a troca entre o citosol e o espaço intermembranar. Além disso, essa membrana abriga a maquinaria necessária para a comunicação e interação física com outras estruturas celulares (GIACOMELLO *et al.*, 2020).

Ao contrário da membrana mitocondrial externa, a membrana mitocondrial interna é uma das bicamadas lipídicas altamente rica em proteínas, com uma proporção de massa de proteína/lipídio de aproximadamente 75:25 (ARDAIL *et al.*, 1990). Essa membrana envolve o espaço da matriz e possui uma área superficial maior em relação à membrana externa. Nela, podem ser encontradas junções em forma de cristas, túbulos estreitos ou fendas que atuam como barreira seletiva para proteínas, lipídios, metabólitos e pequenos solutos como os íons que não podem atravessar essa membrana sem a assistência de proteínas transportadoras (VOGEL *et al.*, 2006). Nesse sentido, o espaço intermembranar é quimicamente equivalente ao citosol, enquanto a matriz contém um conjunto altamente selecionado dessas moléculas (ALBERTS *et al.*, 2002). Além disso, diferentes complexos hospedam-se na membrana interna, com destaque para os envolvidos na fosforilação oxidativa (cadeia transportadora de elétrons (CTE) e ATPase), fazendo com que a sua função primária seja a bioenergética (GIACOMELLO *et al.*, 2020) (Figura 5).

Figura 5. Estrutura mitocondrial.



Fonte: Foto autoral criada com Biorender (Biorender, 2023).

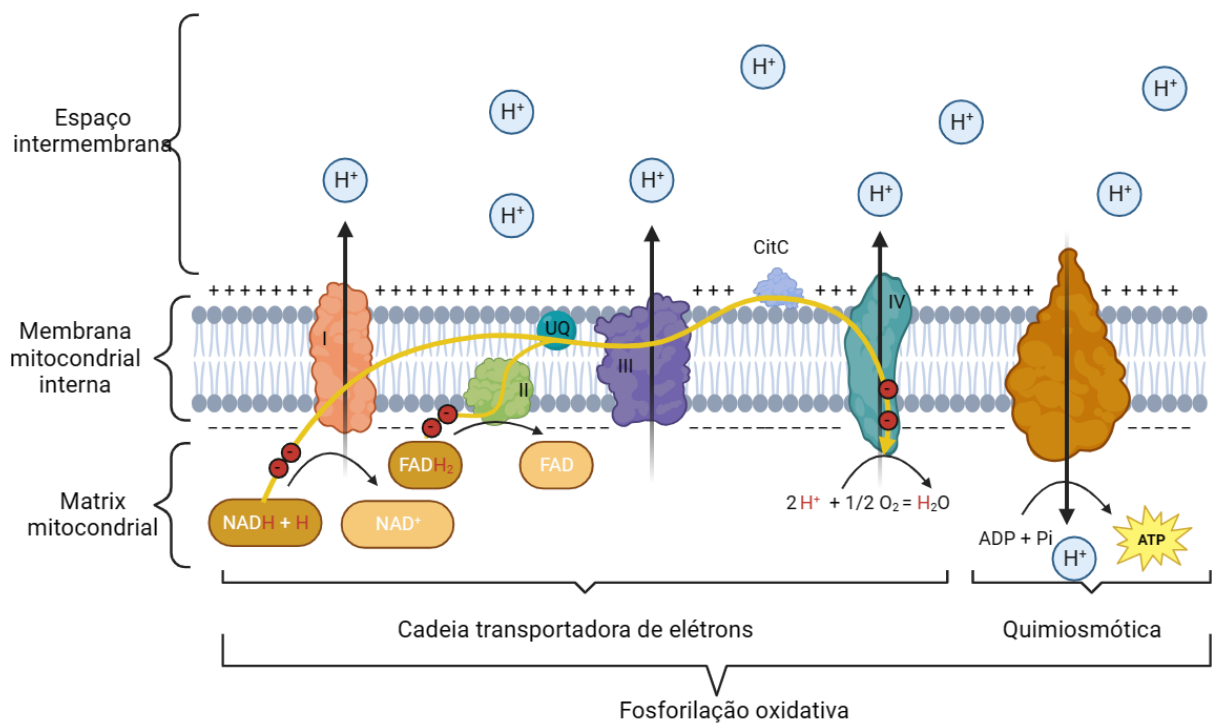
1.2.2. Função energética

A mitocôndria é a organela celular responsável, através da fosforilação oxidativa, pela síntese de aproximadamente 95% do ATP necessário à manutenção da estrutura e função das

células (HATEFI, 1985). Na mitocôndria ocorre a interconversão da energia redox livre proveniente da oxidação dos substratos respiratórios em energia química, na forma de ATP (MITCHELL, 1961).

A energização das mitocôndrias, com substratos respiratórios gera um gradiente eletroquímico de prótons (Dp), cujo potencial elétrico de membrana (DY) é de 0,1 a 0,2 V (negativo na matriz) e cuja diferença de pH (DpH) é de uma unidade (alcalino na matriz). O sistema responsável pela fosforilação oxidativa, na membrana interna da mitocôndria, é formado por cinco complexos enzimáticos que incluem a cadeia respiratória (complexos I-IV) e a FoF1-ATP sintase (complexo V). Durante a fosforilação oxidativa os elétrons são removidos dos substratos oxidáveis pela ação de desidrogenases específicas, ligadas a NAD^+ (substratos do complexo I), e transferidos à cadeia respiratória com subsequente redução do oxigênio molecular. Os equivalentes redutores são transferidos inicialmente a NADH desidrogenase mitocondrial (complexo I). Em uma segunda via, o succinato (substrato do complexo II) é oxidado pela succinato desidrogenase ligada a FAD (complexo II). Os complexos I e II transferem os seus elétrons a ubiquinona (UQ), sendo os mesmos transferidos sequencialmente aos complexos III, citocromo *c*, complexo IV e finalmente ao oxigênio, com formação de água (A L LEHNINGER, 1993; BOYER, 1977) (Figura 6).

Figura 6. Esquema da cadeia transportadora de elétrons acoplada à síntese de ATP.



Fonte: Foto autoral criada com Biorender (Biorender, 2023).

De acordo com a hipótese quimiosmótica de Mitchell em associação com a do acoplamento conformacional de Boyer, o fluxo de elétrons através dos complexos I, III e IV são acompanhados de bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico de H^+ . A energia livre liberada no retorno do H^+ à matriz mitocondrial induz alteração conformacional do componente F1 da FoF1-ATP sintase (complexo V), liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos (BOYER *et al.*, 1973; MITCHELL, 1961).

Além disso, a fosforilação oxidativa mitocondrial produz as espécies reativas de oxigênio (ROS) que são fortes reguladores da proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) que regula a sinalização imune inata e apoptótica após a infecção, uma estratégia bem sucedida para impedir a replicação viral (JACOBS & COYNE, 2013; LEI *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 2021).

1.2.3. Mitocôndria como fonte de espécies reativas de oxigênio

O termo “espécies reativas de oxigênio (ROS)” é frequentemente utilizado para se referir a radicais livres, que são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência (COSTA *et al.*, 2021; MAGDER, 2006). No entanto, é importante notar que os radicais livres também possuem espécies reativas de nitrogênio, ferro, cobre e enxofre. Além disso, existem ROS que não são radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (COSTA *et al.*, 2021).

As ROS são subprodutos altamente reativos originados da redução de um ou vários elétrons de oxigênio. Essas espécies reativas de oxigênio são moléculas produzidas pela redução de oxigênio molecular (O_2). A redução de um elétron de oxigênio produz o ânion superóxido (O_2^-), que, por sua vez pode ser reduzido produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A redução subsequente do peróxido de hidrogênio gera um radical hidroxila ($\cdot OH$) (BRAND, 2016).

Nesse sentido, as mitocôndrias são uma importante fonte de ROS na maioria das células de mamíferos, responsável por cerca de 90% do total de ROS celular, denominado de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mtROS) (ANDREYEV *et al.*, 2005). Essa produção de ROS está intimamente relacionado à sua função primária do metabolismo oxidativo e síntese de ATP,

sendo a cadeia de transporte de elétrons a principal contribuinte para esse fenômeno (BRAND, 2016).

Durante a fosforilação oxidativa na cadeia transportadora de elétrons, a maioria do oxigênio é continuamente reduzida a água. No entanto, uma pequena porcentagem, em torno de 0,2-2,0% de oxigênio molecular consumido pelas mitocôndrias sofrem redução incompleta podendo interagir com alguns elétrons que vazam durante o transporte e é reduzido a ânions superóxido (O_2^-) que são convertidos em outros ROS, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou íons hidroxila ($\cdot OH$) (ADAM-VIZI & CHINOPOULOS, 2006; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009; TIRICHEN *et al.*, 2021).

Em condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a formação e a degradação de ROS, e embora a produção dessas espécies reativas possua funções importantes na sinalização redox da organela para o restante da célula, o seu acúmulo excessivo pode levar ao estresse oxidativo, contribuindo para o dano mitocondrial e uma séria de patologias (BALABAN *et al.*, 2005).

1.2.4. Mitocôndria e resposta imune

Uma vez que as mitocôndrias possuem papéis multifacetados no controle do metabolismo celular e das respostas imunes, vários vírus (+) ssRNA a possuem como alvo preferencial (GATTI *et al.*, 2020). Nesse sentido, as mitocôndrias podem ativar o sistema imunológico inato após o dano celular por meio de moléculas endógenas liberadas, conhecidas como DAMPs (do inglês, *Danger Associated Molecular Patterns*) mitocondriais, todavia já foi demonstrado que as proteínas de SARS-CoV-2 possuem a capacidade de manipular os mecanismos mitocondriais evitando a resposta imune do hospedeiro e alterando as funções mitocondriais (BURTSCHER *et al.*, 2020).

No contexto da manipulação da resposta imune mediada pelas mitocôndrias, uma estratégia relevante envolve a degradação das proteínas de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS), que está localizada na membrana mitocondrial (GATTI *et al.*, 2020). A ativação dessa proteína ocorre quando o RNA viral é detectado por receptores semelhantes a RIG-I (*Retinoic Acid-Inducible Gene 1*) e MDA5 (*Differentiation-Associated Protein 5*), presentes no citosol e acionam a sinalização do interferon tipo I (IFN-I) (BANOTH & CASSEL, 2018; BURTSCHER *et al.*, 2020; SOROURI *et al.*, 2022).

Nesse sentido, órgãos ricos em mitocôndrias e com uma demanda energética mais elevada, tais como o cérebro, músculos, pulmão, coração, rim, fígado e o sistema gastrointestinais tendem a ser mais vulneráveis (SHENOY, 2020).

Dessa forma, esse projeto alvitra a caracterização e avaliação do papel das proteínas NSP4 e ORF9b em cultura de células, baseando na hipótese de que essas proteínas possam interagir com mitocôndrias da célula hospedeira e alterar de alguma forma a função dessa organela bem como a identificação de potenciais ligantes contra NSP4.

1.2.5. Morte celular por apoptose

Há diversas maneiras pelas quais as células poder perder a viabilidade e, eventualmente, morrer. A morte celular pode ocorrer de maneira controlada e programada ou descontrolada (KERR *et al.*, 1972). Dois tipos de morte celular são reconhecidos na classificação mais amplamente utilizada: apoptose e necrose (KROEMER *et al.*, 2008; GALLUZZI *et al.*, 2007). Além desses, um terceiro tipo de morte celular foi proposto, conhecido como autofagia. A distinção entre esses três tipos de morte celular implica em diferenças no modo de morte e atributos morfológicos, bioquímicos e moleculares.

A morte celular é considerada programada quando é controlada geneticamente (HOTCHKISS *et al.*, 2009). Nesse sentido, a apoptose e a autofagia são os dois tipos fundamentais de morte celular programada os quais são essenciais para o crescimento celular, sobrevivência e homeostase (KLIONSKY, 2007). A apoptose é a morte celular programada do tipo 1, caracterizada pela degradação precoce do citoesqueleto, porém as organelas são preservadas até a fase tardia. Enquanto isso, a autofagia corresponde à morte celular do tipo 2, que apresenta um colapso precoce das organelas e a preservação do citoesqueleto até o último estágio (LEVINE & YUAN, 2005).

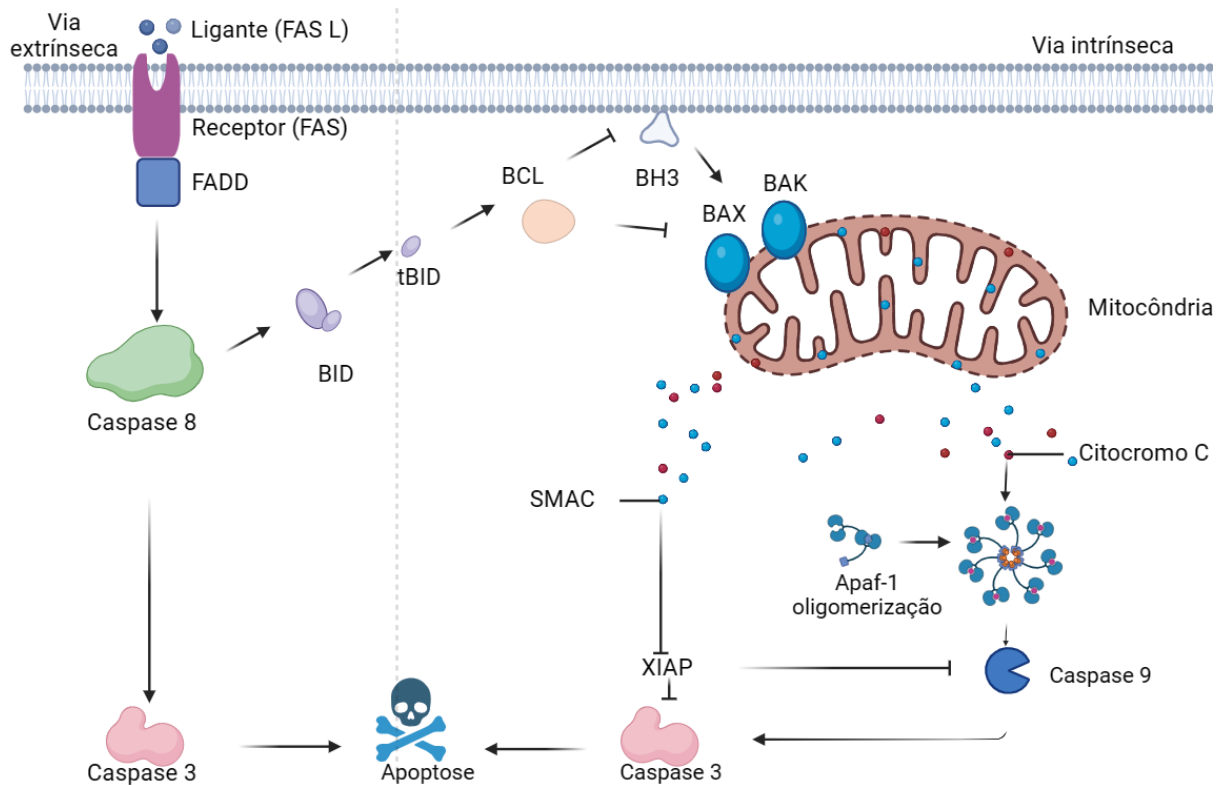
Entre essas abordagens, destaca-se a apoptose, a forma mais bem caracterizada e prevalente de morte celular onde são observadas alterações morfológicas envolvendo o encolhimento celular, citoplasma mais denso, organelas mais compactas e a picnose, que é o resultado da condensação da cromatina (ROBERTSON *et al.*, 2000).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias principais: a via extrínseca, iniciada por receptores de morte e a via intrínseca, associada à mitocôndria. A via de sinalização extrínseca envolve a interação mediadas por receptores de morte transmembrana e ligantes. Em linhas gerais, quando um receptor de morte se associa com seu ligante, o resultado é a oligomerização, seguida do recrutamento de molécula adaptadora (MANDAL *et al.*, 2020). Proteínas adaptadoras citoplasmáticas que exibem domínios de morte atuam como sítios de ancoragem para outras proteínas pró-apoptóticas, as quais são recrutadas e se ligam aos

receptores. Um dos modelos mais amplamente caracterizados é o modelo FasL/FasR (HONGMEI & HONGMEI, 2012).

A ligação do ligante Fas ao receptor Fas ocasiona a ligação da proteína adaptadora FADD (*Faz Associated Protein with Death Domain*). O FADD então se associa à pró-caspase-8 iniciadora, formando um complexo DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). Nesse complexo, ocorre a ativação autocatalítica gerando as suas formas ativas (caspase-8) que será liberada do complexo para iniciar a cascata da apoptose (CURTIN & COTTER, 2003). Foi descrito que a caspase-10 também é capaz de se associar ao FADD no complexo DISC (BARNHART *et al.*, 2003). Após esse evento, a forma ativa da caspase-8 cliva as caspases efetoras 3, 6 e 7 gerando formas ativas que conduzem os eventos que caracterizam o processo apoptótico (NAKAYAMA *et al.*, 2006).

Diferentemente da via extrínseca, a via intrínseca da apoptose pode ser desencadeada por diferentes fatores que incluem a ausência de fatores de crescimento, danos ao DNA, estresse do retículo endoplasmático e aumento de ROS são apenas alguns dos eventos desencadeadores da apoptose (LOSSI, 2022). Nessa via, a ativação das caspases está relacionada à permeabilização da membrana mitocondrial por membros pró-apoptóticos da família Bcl (GREEN & KROEMER, 2004). Com a permeabilização da membrana mitocondrial externa, proteínas geralmente encontradas no espaço entre as membranas mitocondriais são liberadas para o citosol, incluindo o citocromo C, Smac/DIABLO e AIF (*Apoptosis-induction factor*) (SAELENS *et al.*, 2004). A liberação do citocromo c para o citosol desencadeia a ativação da caspase-3 através da formação do complexo apoptossomo. Nesse processo, o citocromo c se associa a Apaf-1, facilitando a sua associação ao ATP/dATP, ocasionando a ligação desses nucleotídeos ao complexo citocromo c/Apaf-1. Isso promove a sua oligomerização e formação de um apoptossoma que recrutará moléculas de pró-caspase-9, promovendo sua auto-clivagem em caspase-9. A caspase-9 ligada ao apoptossoma, por sua vez, recruta e ativa a caspase-3 por meio de sua clivagem, tornando-a apta para clivar moléculas celulares desencadeando a apoptose, conforme demonstrado na Figura 7 (BRATTON *et al.*, 2001; ADRAIN *et al.*, 1999).

Figura 7. Cascata de eventos apoptóticos

Fonte: Foto autoral criada com Biorender (Biorender, 2023).

Apesar de seguir um caminho diferente, a Smac/DIABLO também desempenha um papel na ativação da caspase-3 por meio da neutralização de proteínas inibidoras da apoptose (FULDA & DEBATIN, 2006). Por outro lado, o AIF aparenta não estar ligado à ativação das caspases efetoras, porém controla o equilíbrio dinâmico da morfologia mitocondrial entre fissão e fusão da organela (LI *et al.*, 2020b; CHUNG *et al.*, 2011). Após ser liberado no citosol, o AIF migra para o núcleo, onde induz a fragmentação parcial do DNA e a compactação da cromatina (CANDÉ *et al.*, 2004; SAELENS *et al.*, 2004).

1.3. Produtos Naturais para tratamento de infecções virais

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo (VALLI & BOLZANI, 2019). Ao longo da história, produtos naturais e seus derivados têm sido amplamente utilizados na medicina popular para tratar diferentes doenças, incluindo infecções virais (GANJHU *et al.*, 2015). Os produtos naturais apresentam vantagens e desafios em relação às moléculas sintéticas no processo de descoberta de novos fármacos (ATANASOV *et al.*, 2021). Em geral, os produtos naturais possuem algumas características específicas, geralmente apresentando massa

molecular mais elevada, maior quantidade de centros quirais, maior número de átomos de carbono e oxigênio, porém menos átomos de nitrogênio e halogênio. Além disso, eles tendem a apresentar maior número de aceitadores e doadores de ligação de hidrogênio, maior hidrofobicidade e maior rigidez molecular (ATANASOV *et al.*, 2015, 2021; BARNES *et al.*, 2016; FEHER & SCHMIDT, 2003). Essas diferenças estruturais resultam em uma atividade e especificidade biológica mais alta em relação aos compostos sintéticos (ATANASOV *et al.*, 2015).

Nesse contexto, fármacos antivirais derivados de produtos naturais podem complementar a ação de fármacos atualmente disponíveis. De fato, ao longo do período entre janeiro de 1981 e setembro de 2019, 77% de todos os novos medicamentos antivirais foram derivados de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2020). A triagem antiviral de extratos de plantas e seus compostos tem apresentado resultados promissores (NAITHANI *et al.*, 2008; AHMAD *et al.*, 2006; KHAN *et al.*, 2005), o que justifica a busca por novas substâncias com potencial atividade antiviral provenientes dessas fontes. Esses estudos têm demonstrado que determinadas plantas possuem compostos bioativos capazes de inibir a replicação de vírus (DA SILVEIRA OLIVEIRA *et al.*, 2017; MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015) ou diminuir sua carga viral (LI & PENG, 2013; SKEHAN *et al.*, 1990), o que representa uma perspectiva encorajadora no combate a infecções virais.

1.3.1. Amaryllidacea

A família de plantas Amaryllidacea engloba aproximadamente 75 gêneros, compreendendo cerca de 1600 espécies que são naturalmente encontradas em uma ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Além de ser uma planta ornamental, as Amaryllidacea destacam-se pelas suas propriedades terapêuticas, principalmente devido ao efeito antiviral que possuem (NAIR & STADEN, 2023). (“La Paz and Beni - Hippeastrum (Amaryllidaceae) da Região de Madidi | Guias de Campo”,)

A evidência mais antiga de sua aplicação terapêutica remonta ao século IV a.C., com a recomendação do uso de óleo do narciso, *Narcissus poeticus L.* para o tratamento de tumores uterinos por Hipócrates de Kos (KORNIENKO & EVIDENTE, 2008). Há milhares de anos, essas plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional e, até o momento, permanecem entre as 20 famílias de plantas medicinais mais reconhecidas (JIN & YAO, 2019).

O valor medicinal dessas plantas é intrinsecamente relacionado à presença de compostos estruturalmente únicos, denominados alcalóides Amaryllidacea, que são sintetizados exclusivamente por essa família (CAHLÍKOVÁ *et al.*, 2021). Até o momento, mais de 500 alcalóides Amaryllidacea com diversas estruturas foram isolados, identificados e descritos (KA *et al.*, 2020; SINGH & DESGAGNÉ-PENIX, 2014). Esta família é caracterizada em grupos, de acordo com suas semelhanças estruturais: norbeladina, licorina, homolicorina, crinina hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina e galantamina.

As potentes atividades farmacológicas desses compostos abrangem uma diversidade de propriedades, incluindo atividade antimalárica, antimicrobiana, anti-inflamatória, inibidores de acetilcolinesterase (AChE), antifúngico e antiviral (CAHLÍKOVÁ *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2021; BERKOV *et al.*, 2020), incluindo a família coronavírus (JIN *et al.*, 2021; SAÚDE, 2021; HUANG *et al.*, 2020). Além disso, pesquisas têm relacionado esses alcalóides como uma promissora fonte para o tratamento de doenças como a doença de Chagas (ORTIZ *et al.*, 2023) e diabetes (ATTIA *et al.*, 2021).

1.4. Imobilização

A imobilização de proteínas consiste na fixação dessas moléculas em suportes sólidos envolvendo interações proteína-proteína ou proteína-ligante, desempenhando um papel fundamental nos avanços das ciências da vida e da medicina, destacando-se pela capacidade de aumentar a estabilidade e a atividade das proteínas (BORNSCHEUER, 2003). Além disso, as proteínas imobilizadas possuem uma série de vantagens em relação às proteínas solúveis, tais como a sua fácil recuperação, reciclagem, estabilidade e armazenamento (COWAN & FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; ZHANG *et al.*, 2010). Essas características fazem com que as proteínas imobilizadas tenham uma ampla gama de aplicações, incluindo biossensores, matrizes de proteínas para triagem de drogas, implantes biomédicos e outras aplicações biotecnológicas (CHAUDHARY *et al.*, 2021; MELDAL & SCHOFFELEN, 2016).

Diferentes interações são utilizadas nos métodos de imobilização que incluem as interações físicas (interações hidrofóbicas e de van de Waals) e químicas (ligação covalente e iônica, imobilização por aprisionamento e ligação cruzada) entre a enzima alvo e o suporte selecionado.

A imobilização de proteínas baseada na formação de ligações covalentes é o método mais utilizado (HASSAN *et al.*, 2019; PORATH & AXÉN, 1976) e consiste na formação de ligações fortes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos

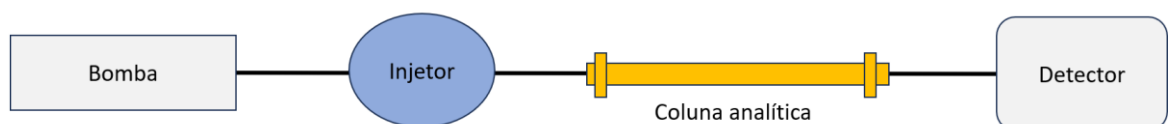
funcionais dos resíduos de aminoácidos da proteína (lisina, arginina, ácidos aspártico, ácidos glutâmico, serina, tionina e cisteína) (CARDOSO *et al.*, 2009a). A presença da forte ligação covalente entre o suporte e a proteína imobilizada oferece diversas vantagens. Em primeiro lugar, esse método impede dessorção da proteína da superfície do suporte, garantindo maior estabilidade ao sistema. Além disso, a formação de ligações multipontos aumenta a rigidez da conformação da proteína, resultando em uma melhora da atividade, da seletividade e no seu tempo de vida. Todavia, esse método pode modificar a estrutura terciária da proteína, prejudicando a sua função (ZAHIRINEJAD *et al.*, 2021; CARDOSO *et al.*, 2009b).

Dentre as opções de suportes disponíveis para imobilização, as partículas magnéticas se sobressaem devido às suas propriedades únicas, nas quais destacam-se o superparamagnetismo, elevada área superficial e grande relação superfície-volume, baixa porosidade, estabilidade mecânica além da capacidade de serem facilmente separadas sob a influência de campos magnéticos (XU *et al.*, 2014; LAURENT *et al.*, 2008).

Essas partículas magnéticas podem possuir diferentes tamanhos, variando desde o micro ao nanômetro, e têm seus núcleos compostos por elementos com capacidade magnética, como o ferro, níquel ou nióbio. Suas superfícies são funcionalizadas com derivados tosil, amino, carboxila ou grupos epóxidos, o que permite a imobilização de peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, entre outras moléculas (CARDOSO *et al.*, 2009b).

Após a imobilização da proteína em um suporte sólido forma-se um biorreator denominado de IMER (*Immobilized enzyme reactor*) (CARDOSO *et al.*, 2009a) que pode ser conectado diretamente a uma coluna e a um detector, permitindo uma triagem dos analitos e seleção dos ligantes (Figura 8).

Figura 8. Configurações para a análise cromatográfica.



Fonte: Foto autoral.

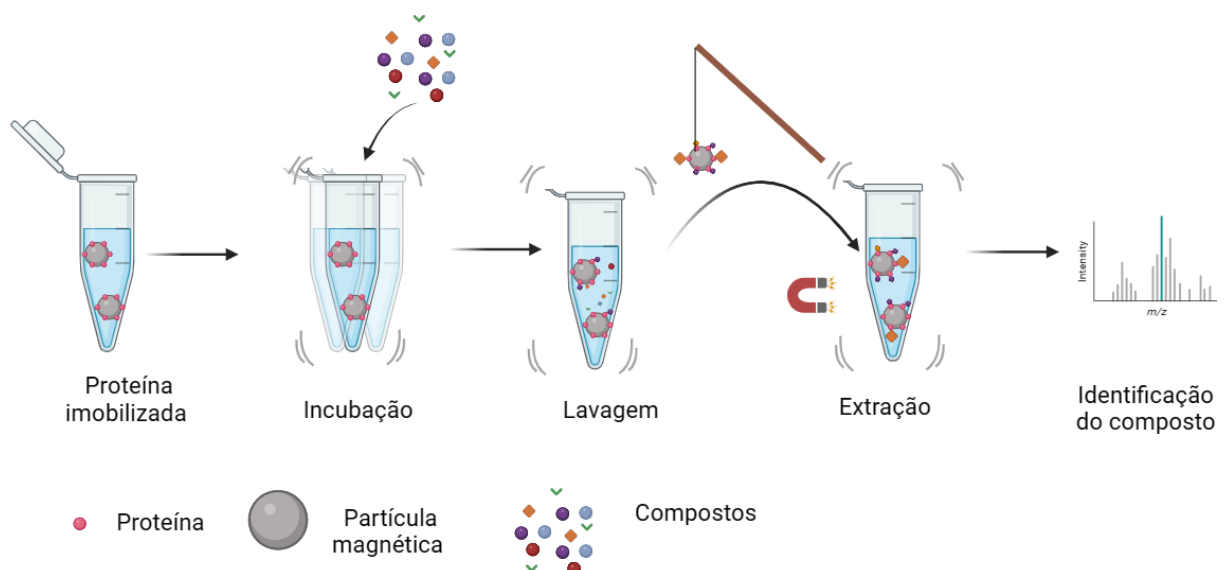
1.5. Pesca de ligantes (*Ligand fishing*)

A pesca de ligantes utiliza a imobilização de alvos específicos, como proteínas, e abordagens analíticas para a triagem de compostos ativos em misturas complexas para pescas de potenciais ligantes de misturas de produtos naturais (ZHUO *et al.*, 2016). Essa abordagem se baseia no princípio de que qualquer composto que tenha afinidade com o alvo imobilizado é capturado em sua superfície e, posteriormente, pode ser eluído para análise (TRINDADE XIMENES *et al.*, 2021).

Até o momento, o suporte mais amplamente utilizado nos ensaios de *Ligand fishing* são as partículas magnéticas através da imobilização de proteínas ou enzimas por meio de ligações covalentes ou adsorção principalmente devido às suas características de fácil isolamento e imobilização estável (DE LIMA *et al.*, 2020).

Uma das abordagens dessa técnica envolve a incubação da proteína imobilizada diretamente na matriz que contém a amostra, possibilitando com que os compostos que possuam afinidade pela proteína sejam retidos, enquanto os que não possuem ficarão no sobrenadante da solução. Em seguida, etapas de lavagem são realizadas para que os compostos que não possuem afinidade ou baixa afinidade sejam removidos. Finalmente, a última etapa é conhecida como extração, no qual o IMER é mantido em contato com uma solução extratora composta por solvente orgânico e um pH diferente da solução de incubação, provocando mudanças em sua conformação e consequentemente desligando os compostos que possuam afinidade moderada a forte pela proteína. Os compostos dissociados são identificados por técnicas espectrométricas e espectroscópicas (Figura 9) (TRINDADE XIMENES *et al.*, 2021).

Figura 9. Etapas do ensaio de *ligand fishing*



Fonte: Foto autoral criada com Biorender (Biorender, 2023).

Em um estudo pioneiro, a albumina de soro humano foi imobilizada em partículas magnéticas e utilizadas para isolar compostos ativos conhecidos de uma mistura contendo ligantes e não ligantes para essa proteína (MOADDEL *et al.*, 2007). Em seguida, essa abordagem foi rapidamente ampliada para a triagem de extratos de plantas como inibidores de diferentes enzimas, dentre elas a acetilcolinesterase, uma enzima crucial na propagação de impulsos nervosos (LOURENÇO VANZOLINI *et al.*, 2013); a neuraminidase, um potencial alvo terapêutico para influenza; a enzima SIRT6, um alvo terapêutico contra distúrbios metabólicos e doenças associadas à idade (SINGH *et al.*, 2014); e mais recentemente esse ensaio foi utilizado inclusive para a busca de ligantes com afinidade pela proteína Spike de SARS-CoV-2 para o combate à COVID 19 (MUCHIRI *et al.*, 2022). Esses exemplos ilustram a potencial aplicação de ensaios de *Ligand fishing* com base em partículas magnéticas, que possibilitam a identificação de novos e promissores compostos para o tratamento de diversas doenças.

1.6. Sistema de expressão de proteína heterólogas

Sistemas de expressão biológicos procarióticos e eucarióticos desempenham um papel fundamental na produção de proteínas heterólogas, as quais possuem importância crucial para o estudo a nível molecular e estrutural dos vírus (SCHNEEMANN & YOUNG, 2003).

A escolha do sistema de expressão ótimo pode variar dependendo da proteína de interesse. Isso envolve decidir a escolha do organismo ou tipo celular que será utilizado, bem como o vetor de expressão apropriado. A seleção cuidadosa desses componentes é fundamental para garantir uma produção eficiente e funcional da proteína desejada.

Apesar dos avanços significativos alcançados pelos sistemas de expressão procarióticos e eucarióticos, a *Escherichia coli* (BANEYX, 1999) mantém-se como o sistema mais popular e amplamente utilizado para expressão de proteínas recombinantes (NAG *et al.*, 2022) e em menor escala a expressão em linhagens celulares de mamíferos (KOST & CONDREAY, 1999). Além disso, outros sistemas de expressão, como células de insetos (ALTMANN *et al.*, 1999), leveduras (CREGG *et al.*, 2000) e algas, também são empregados (SCHILLBERG *et al.*, 2019).

Essa diversidade de sistemas permite uma abordagem flexível para a produção de proteínas heterólogas, cada um com suas vantagens e limitações específicas, de acordo com as necessidades do estudo.

1.6.1. *Escherichia coli*

Organismos procariotos estão entre as primeiras células utilizadas na engenharia genética. Desde o início da década de 80, a bactéria *Escherichia coli* tem sido amplamente utilizada para a clonagem do DNA recombinante, além de ser um típico sistema de expressão e um dos mais atrativos sistemas de produção de proteínas heterólogas (BANEYX, 1999).

A *E. coli* destaca-se como a plataforma de expressão bacteriana mais amplamente adotada devido as suas diversas vantagens, que incluem seu rápido crescimento, genética bem conhecida, requisitos nutricionais simples e baratos, elevado nível de expressão e fácil manipulação. Todavia, existem algumas limitações, como agregação intracelular e incorreto dobramento das proteínas, falta de modificações pós-traducionais e degradação de proteínas decorrentes da ação de proteases (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

A pesquisa dedicada à expressão heteróloga nesse hospedeiro resultou no desenvolvimento de diversas linhagens geneticamente modificadas, otimizadas para atender às demandas específicas de diferentes proteínas e condições de expressão. Essa diversidade de linhagens é acompanhada por uma ampla gama de vetores de expressão comercialmente disponíveis, que oferecem flexibilidade e versatilidade aos pesquisadores (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

Graças a essa combinação de recursos, a *E. coli* continua sendo a plataforma de expressão bacteriana preferencial pela comunidade científica, impulsionando avanços significativos em diversas áreas da biotecnologia e ciências da vida (KAUR *et al.*, 2018).

1.6.2. Cultura de células de mamíferos

Ao longo das últimas décadas, o cultivo celular, especialmente de células de mamíferos, tem desempenhado um papel fundamental nas pesquisas biológicas e farmacêuticas. A cultura de células que envolve a retirada de células a partir de um tecido animal ou plantas e subsequente cultivo em ambientes artificiais controlados. Nesses ambientes, as células continuam a crescer quando fornecidos nutrientes e fatores de crescimento adequados. Esse processo ocorre em condições assépticas e estéreis, garantindo a minimização do risco de

contaminação. Para isso, são controlados parâmetros como temperatura, umidade relativa, pH e níveis de dióxido de carbono, criando um ambiente ideal para a sobrevivência e a proliferação das células em cultura (WIKANDARI *et al.*, 2021).

Sistemas de expressão eucarióticos embora possua um custo relativamente alto, fácil contaminação e baixos níveis de expressão, é frequentemente empregado para a expressão de diversas proteínas heterólogas, abrangendo desde proteínas estruturais virais até peptídeos bioativos (KUMONDAI *et al.*, 2020; YIN *et al.*, 2007), isso porque possuem a capacidade de realizarem modificações pós-traducionais e pontes dissulfeto que podem influenciar na função e/ou estabilidade da proteína, possibilitando a obtenção de proteínas recombinantes com características mais próximas às versões nativas (KAUR *et al.*, 2018).

Conclusões

A estrutura da proteína SARS-CoV-2 NSP4 expressa em *E. coli* foi determinada experimentalmente e corroborou com o estudo *in silico* previsto publicado por (LI & HIRST, 2020). Nossos ensaios de *ligand fishing* utilizando Nsp4 do SARS-CoV-2 imobilizada em partículas magnéticas identificou com sucesso quatro alcalóides, a saber, 2- α -7-dimetoxi-homolicorina, albomaculina, tazetina e hemantamina, com afinidade significativa pela Nsp4. Esses alcalóides podem potenciais alvos para a interrupção ou diminuição da replicação viral uma vez que a NSP4 é uma das enzimas chave na montagem das DMV no qual ocorrem a replicação viral. Investigações adicionais, incluindo ensaios baseados em células utilizando o SARS-CoV-2 em sua forma ativa, são necessárias para avaliar a eficácia e atividade desses alcalóides, o que pode levar ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra o SARS-CoV-2.

Além disso, os resultados obtidos das proteínas NSP4 e ORF9b do SARS-CoV-2 em cultura de células da linhagem Mlg2908 indicaram que a proteína ORF9b não interferiu nos níveis de ATP, condensação e fragmentação celular, por outro lado a proteína NSP4 diminui os níveis de ATP, elevou os níveis de ROS e mtROS, assim como ativou as vias de apoptose intrínseca e a via independente de caspase com níveis elevados de AIF. Ambas a proteínas demonstraram influenciar os níveis de mtROS, porém apenas as células expressando NSP4 obteve a diminuição do potencial de membrana.

Essas descobertas contribuem para a nossa compreensão dos mecanismos subjacentes às infecções virais causadas pelos coronavírus. Importante destacar que esse conhecimento pode ser utilizado para o desenvolvimento de terapias eficazes no combate à infecção pelo coronavírus em seres humanos. Ao direcionar as vias específicas afetadas pela NSP4 e ORF9b, podemos potencialmente desenvolver intervenções que reduzam os efeitos prejudiciais do vírus sobre as funções mitocondriais e melhorem a viabilidade celular.

À vista disso, este estudo fornece novos conhecimentos sobre duas proteínas de SARS-CoV-2, que podem ajudar na luta contra o COVID-19 e outras doenças causadas pelos vírus da família *Coronaviridae*.

Referências bibliográficas

- A L LEHNINGER, D. L. N. & M. M. C. Principles of biochemistry second edition. **Biochemical Education**, v. 21, n. 2, p. 114–114, 1 abr. 1993.
- ADAM-VIZI, V. & CHINOPOULOS, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 12, p. 639–645, 1 dez. 2006.
- ADRAIN, C. *et al.* Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 30, p. 20855–20860, 23 jul. 1999.
- AHMAD, I. *et al.* Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs. **Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs**, p. 1–384, 11 dez. 2006.
- ALBERTS, B. *et al.* The Mitochondrion. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26894/>>. Acesso em: 17 set. 2023.
- ALIZON, S. *et al.* Rapid spread of the SARS-CoV-2 Delta variant in some French regions, June 2021. **Eurosurveillance**, v. 26, n. 28, p. 2100573, 15 jul. 2021.
- ALSAADI J, E. A. & JONES, I. M. Membrane binding proteins of coronaviruses. **Future Virology**, v. 14, n. 4, p. 275–286, 2019.
- ALTMANN, F. *et al.* Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. **Glycoconjugate Journal**, v. 16, n. 2, p. 109–123, 1999.
- ANDREYEV, A. Y. *et al.* Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry (Moscow)** 2005 70:2, v. 70, n. 2, p. 200–214, 2005.
- ARCHER, S. L. *et al.* SARS-CoV-2 mitochondriopathy in COVID-19 pneumonia exacerbates hypoxemia. **Redox Biology**, v. 58, p. 102508, 1 dez. 2022.
- ARDAIL, D. *et al.* Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 31, p. 18797–18802, 5 nov. 1990.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 1 dez. 2015.

ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery** 2021 20:3, v. 20, n. 3, p. 200–216, 28 jan. 2021.

ATTIA, E. Z. *et al.* Anti-diabetic potential of mucilage from *Hippeastrum vittatum* bulbs in streptozotocin-induced diabetic rats. **South African Journal of Botany**, v. 136, p. 100–104, 1 jan. 2021.

AYINDE, K. S. *et al.* Binding of SARS-CoV-2 protein ORF9b to mitochondrial translocase TOM70 prevents its interaction with chaperone HSP90. **Biochimie**, v. 200, p. 99–106, 2022.

BAIROCH, A. The cellosaurus, a cell-line knowledge resource. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 29, n. 2, p. 25–38, 1 jul. 2018.

BALABAN, R. S. & NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483–495, 25 fev. 2005.

BANERJEE, R. & SHEET, T. Ratio of ellipticities between 192 and 208 nm (R1): An effective electronic circular dichroism parameter for characterization of the helical components of proteins and peptides. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 85, n. 11, p. 1975–1982, 1 nov. 2017.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411–421, 1 out. 1999.

BANOTH, B. & CASSEL, S. L. Mitochondria in innate immune signaling. **Translational Research**, v. 202, p. 52–68, 1 dez. 2018. . Acesso em: 17 set. 2023.

BARNES, E. C. *et al.* The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 372–381, 2 mar. 2016.

BARNHART, B. C. *et al.* The death effector domain protein family. **Oncogene** 2003 22:53, v. 22, n. 53, p. 8634–8644, 24 nov. 2003.

BEACHBOARD, D. C. *et al.* Mutations across Murine Hepatitis Virus nsp4 Alter Virus Fitness and Membrane Modifications. **Journal of Virology**, v. 89, n. 4, p. 2080–2089, 15 fev. 2015.

BERGMANS, H. E. N. *et al.* Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process. **Journal of Bacteriology**, v. 146, n. 2, p. 564–570, 1981.

BERKOV, S. *et al.* Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. **Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 83, p. 113–185, 1 jan. 2020.

BESSA, C. D. P. B. *et al.* Identification of Alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) Using CGC-MS and Ambient Ionization Mass Spectrometry (PS-MS and LS-MS). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 5, p. 819–830, 1 maio 2017. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jbchs/a/nFthcJm6SWbJmKTLbDwGcxt/?lang=en>>. Acesso em: 30 out. 2023.

BHATWA, A. *et al.* Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 65, 10 fev. 2021.

BHOWAL, C. *et al.* Pathophysiological involvement of host mitochondria in SARS-CoV-2 infection that causes COVID-19: a comprehensive evidential insight. **Molecular and Cellular Biochemistry** 2022 **478:6**, v. 478, n. 6, p. 1325–1343, 29 out. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-022-04593-z>>. Acesso em: 14 maio. 2023.

Biblioteca Digital do Cerrado: Rebrotando pós fogo. Disponível em: <<https://jbb.ibict.br/handle/1/247?mode=full>>. Acesso em: 17 set. 2023.

BOLZANI, V. S. *et al.* Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837–1846, 26 jul. 2012.

BORNSCHEUER, U. T. Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 29, p. 3336–3337, 28 jul. 2003.

BOYER, P. D. **Coupling mechanisms in capture, transmission, and use of energy.** **Annual Review of Biochemistry** 1977. Disponível em: <www.annualreviews.org>. Acesso em: 1 set. 2021.

BOYER, P. D. *et al.* A New Concept for Energy Coupling in Oxidative Phosphorylation Based on a Molecular Explanation of the Oxygen Exchange Reactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 10, p. 2837–2839, 1 out. 1973.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRAND, M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 100, p. 14–31, 1 nov. 2016. . Acesso em: 17 set. 2023.

BRATTON, S. B. *et al.* Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 5, p. 998–1009, 1 mar. 2001.

BURTSCHER, J. *et al.* Mitochondria: In the Cross Fire of SARS-CoV-2 and Immunity. **iScience**, v. 23, n. 10, p. 1–15, 2020.

CABEZAS, F. *et al.* Alcaloides y actividad biológica en *Eucharis amazonica*, *E. grandiflora*, *Caliphurria subedentata* y *Crinum kunthianum*, especies colombianas de Amaryllidaceae. **Scientia et Technica**, v. 13, n. 33, p. 237–241, 2007.

CAHLÍKOVÁ, L. *et al.* The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, n. 1, p. 303–323, 1 fev. 2021.

CANDÉ, C. *et al.* AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. **Oncogene 2004 23:8**, v. 23, n. 8, p. 1514–1521, 12 jan. 2004.

CARDOSO, C. L. *et al.* Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175–187, 2009a.

CARDOSO, C. L. *et al.* **Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas** *Química Nova* 2009b.

RAJNIK, M. *et al.* Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). **Uniformed Services University Of The Health Sciences**, 2021.

CASTAÑEDA, C. *et al.* Amaryllidaceae alkaloids in skin cancer management: Photoprotective effect on human keratinocytes and anti-proliferative activity in melanoma cells. 2023. Disponível em: <<http://jab.zsf.jcu.cz><http://doi.org/10.32725/jab.2023.004>>. Acesso em: 30 out. 2023.

CHAKRABORTY, J. *et al.* A systematic drug repurposing approach to identify promising inhibitors from FDA-approved drugs against Nsp4 protein of SARS-CoV-2. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 2, p. 550–559, 2023.

- CHANG, C. T. *et al.* Circular dichroic analysis of protein conformation: Inclusion of the β -turns. **Analytical Biochemistry**, v. 91, n. 1, p. 13–31, 1 nov. 1978.
- CHANG, R. *et al.* SARS-CoV-2 Mediated Endothelial Dysfunction: The Potential Role of Chronic Oxidative Stress. v. 11, n. January, p. 1–27, 2021.
- CHAUDHARY, K. *et al.* Protein immobilization on graphene oxide or reduced graphene oxide surface and their applications: Influence over activity, structural and thermal stability of protein. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 289, p. 102367, 1 mar. 2021.
- CHEN, Y. *et al.* Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, 2020.
- CHUNG, S. H. *et al.* Apoptosis inducing factor deficiency causes reduced mitofusion 1 expression and patterned Purkinje cell degeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 41, n. 2, p. 445–457, 1 fev. 2011.
- CLEMENTZ, M. A. *et al.* Mutation in murine coronavirus replication protein nsp4 alters assembly of double membrane vesicles. **Virology**, v. 375, n. 1, p. 118–129, 25 maio 2008.
- COLE, E. R. *et al.* Cytotoxic and Genotoxic Activities of Alkaloids from the Bulbs of *Griffinia gardneriana* and *Habranthus itaobinus* (Amaryllidaceae). **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 707–717, 18 jan. 2019.
- COLLINS, J. A. *et al.* Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 923–934, 1997.
- COSTA, T. J. *et al.* The homeostatic role of hydrogen peroxide, superoxide anion and nitric oxide in the vasculature. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 162, p. 615–635, 1 jan. 2021.
- COWAN, D. A. & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 326–346, 10 set. 2011.
- CREGG, J. M. *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology** 2000 **16:1**, v. 16, n. 1, p. 23–52, 2000.
- CUI, J. *et al.* **Origin and evolution of pathogenic coronaviruses** *Nature Reviews Microbiology* 2019.

CURTIN, J. F. & COTTER, T. G. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. **Cellular Signalling**, v. 15, n. 11, p. 983–992, 1 nov. 2003.

DA SILVEIRA OLIVEIRA, A. F. C. *et al.* Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses. **Molecules** **2017**, Vol. **22**, Page **505**, v. 22, n. 3, p. 505, 22 mar. 2017.

DAVIES, J. P. *et al.* Comparative Multiplexed Interactomics of SARS-CoV-2 and Homologous Coronavirus Nonstructural Proteins Identifies Unique and Shared Host-Cell Dependencies. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 12, p. 3174–3189, 11 dez. 2020. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsinfecdis.0c00500>>. Acesso em: 14 maio. 2023.

DE LIMA, J. M. *et al.* Micro- and nano-sized amine-terminated magnetic beads in a ligand fishing assay. **Analytical Methods**, v. 12, n. 33, p. 4116–4122, 27 ago. 2020.

EXCLER, J.-L. *et al.* Vaccine development for emerging infectious diseases. **Nature Medicine** **2021** **27:4**, v. 27, n. 4, p. 591–600, 12 abr. 2021.

FAIZAN, M. I. *et al.* NSP4 and ORF9b of SARS-CoV-2 Induce Pro-Inflammatory Mitochondrial DNA Release in Inner Membrane-Derived Vesicles. v. 2, p. 1–36, 2022a.

FEHER, M. & SCHMIDT, J. M. Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 1, p. 218–227, jan. 2003.

FERMANDJIAN, S. Conformational analysis of pGlu-His-Amph and pGlu-His-Pro-Amph related to their central nervous system activity . n. 3, p. 495–505, 1981.

FINKEL, Y. *et al.* The coding capacity of SARS-CoV-2. **Nature**, v. 589, n. 7840, p. 125–130, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2739-1>>.

FLINT, S. W. Stigmatizing Media Portrayal of Obesity During the Coronavirus (COVID-19) Pandemic. **Frontiers in Psychology**, v. 0, p. 2124, 3 set. 2020.

FULDA, S. & DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene** **2006** **25:34**, v. 25, n. 34, p. 4798–4811, 7 ago. 2006.

FUNG, T. S. & LIU, D. X. Post-translational modifications of coronavirus proteins: Roles and function. **Future Virology**, v. 13, n. 6, p. 405–430, 2018.

- GALLUZZI, L. *et al.* Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1237–1243, jul. 2007.
- GANJHU, R. K. *et al.* Herbal plants and plant preparations as remedial approach for viral diseases. **VirusDisease**, v. 26, n. 4, p. 225–236, 1 dez. 2015.
- GARRIDO, C. *et al.* Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. **Cell Death & Differentiation** 2006 **13:9**, v. 13, n. 9, p. 1423–1433, 5 maio 2006.
- GATTI, P. *et al.* Mitochondria Targeted Viral Replication and Survival Strategies—Prospective on SARS-CoV-2. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. August, 2020a.
- GE, Huipeng *et al.* The epidemiology and clinical information about COVID-19. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 39, p. 1011-1019, 2020.
- GIACOMELLO, M. *et al.* The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2020 **21:4**, v. 21, n. 4, p. 204–224, 18 fev. 2020.
- GIOVANETTI, M. *et al.* Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 538, p. 88–91, 29 jan. 2021.
- GONRING-SALARINI, K. L. *et al.* *In vitro* Antiplasmodial Activities of Alkaloids Isolated from Roots of *Worsleya procera* (Lem.) Traub (Amaryllidaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 8, p. 1624–1633, 12 ago. 2019.
- GORDON, D. E. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, 2020.
- GREEN, D. R. & KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 626–629, 30 jul. 2004.
- GÜSSOW, D. & CLACKSON, T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 10, p. 4000, 1989.
- HASSAN, M. E. *et al.* Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications. **3 Biotech**, v. 9, n. 12, p. 1–16, 1 dez. 2019.
- HATEFI, Y. **The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annual review of biochemistry.** [s.l: s.n.]1015–1069 p.
- HOLY, J. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. **Mutation research**, v. 518, n. 1, p. 71–84, 27 jun. 2002.

HONGMEI, Z. & HONGMEI, Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. **Apoptosis and Medicine**, 16 ago. 2012. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/38236>>. Acesso em: 17 set. 2023.

HOTCHKISS, R. S. *et al.* Cell Death. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0901217>, v. 361, n. 16, p. 1570–83, 15 out. 2009.

HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, n. December, 2020.

HUANG, C. T. *et al.* Enhancement of the IFN- β -induced host signature informs repurposed drugs for COVID-19. **Heliyon**, v. 6, n. 12, p. e05646, 1 dez. 2020.

HUSSON, G. P. *et al.* Investigations on antiviral action of Haemanthus albiflos natural extract. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 5, p. 348–351, 1 set. 1993. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.2650070505>>. Acesso em: 22 maio. 2023.

IMBERTI, R. *et al.* Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 265, n. 1, 1993.

JACOBS, J. L. & COYNE, C. B. Mechanisms of MAVS Regulation at the Mitochondrial Membrane. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 24, p. 5009–5019, 13 dez. 2013. . Acesso em: 9 maio. 2023.

JIANG, H. W. *et al.* SARS-CoV-2 Orf9b suppresses type I interferon responses by targeting TOM70. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 17, n. 9, p. 998–1000, 2020.

JIN, Y. H. *et al.* Lycorine, a non-nucleoside RNA dependent RNA polymerase inhibitor, as potential treatment for emerging coronavirus infections. **Phytomedicine**, v. 86, p. 153440, 1 jun. 2021.

JIN, Z. & YAO, G. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 10, p. 1462–1488, 16 out. 2019.

KA, S. *et al.* Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids. **Molecules 2020, Vol. 25, Page 4901**, v. 25, n. 21, p. 4901, 23 out. 2020.

- KALYANARAMAN, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2012.
- KANJANAHALUETHAI, A. & BAKER, S. C. Processing of the replicase of murine coronavirus: Papain-like proteinase 2 (PLP2) acts to generate p150 and p44. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 494, p. 267–273, 2001.
- KANNAN, S. R. *et al.* Evolutionary analysis of the Delta and Delta Plus variants of the SARS-CoV-2 viruses. **Journal of Autoimmunity**, v. 124, p. 102715, 1 nov. 2021.
- KARIM, S. S. A. & OLIVEIRA, T. New SARS-CoV-2 Variants — Clinical , Public Health , and Vaccine Implications. **N Engl J Med**, p. NEJMc2100362., 2021.
- KAUFFMAN, M. E. *et al.* MitoSOX-based flow cytometry for detecting mitochondrial ROS. **Reactive oxygen species (Apex, NC)**, v. 2, n. 5, p. 361, 2016.
- KAUR, J. *et al.* Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, 1 jan. 2018.
- KEHINDE, I. *et al.* Modulatory influences of antiviral bioactive compounds on cell viability, mRNA and protein expression of cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein in HepG2 and HEK293 cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 107, p. 104573, 1 fev. 2021.
- KERR, J. F. R. *et al.* Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer** **1972 26:4**, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972.
- KHAN, M. T. H. *et al.* Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, n. 2, p. 107–119, 1 ago. 2005.
- KIELKOPF, C. L. *et al.* **Considerations for membrane protein purification** Cold Spring Harbor Protocols 2021.
- KIM, D. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 914–921.e10, 2020.
- KIM, J. Y. & PARK, J. H. ROS-dependent caspase-9 activation in hypoxic cell death. **FEBS Letters**, v. 549, n. 1–3, p. 94–98, 14 ago. 2003.

- KIM, Y. M. & SHIN, E. C. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 53, n. 5, p. 750–760, 2021.
- KINGSTON, R. E. *et al.* Calcium phosphate transfection. **Current Protocols in Neuroscience**, p. 1–8, 1997.
- KLIONSKY, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2007 8:11, v. 8, n. 11, p. 931–937, nov. 2007.
- KORNIENKO, A. & EVIDENTE, A. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 1982–2014, jun. 2008.
- KOST, T. A. & CONDREAY, J. P. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 428–433, 1 out. 1999.
- KOWALTOWSKI, A. J. *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333–343, 15 ago. 2009.
- KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation** 2009 16:1, v. 16, n. 1, p. 3–11, 10 out. 2008.
- KUMONDAI, M. *et al.* Heterologous expression of high-activity cytochrome P450 in mammalian cells. **Scientific Reports** 2020 10:1, v. 10, n. 1, p. 1–13, 25 ago. 2020.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LAURENT, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064–2110, jun. 2008.
- LEI, Y. *et al.* MAVS-Mediated Apoptosis and Its Inhibition by Viral Proteins. **PLOS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5466, 11 abr. 2009. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005466>>. Acesso em: 1 set. 2021.
- LEVINE, B. & YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10, p. 2679–2688, 3 out. 2005.

- LI, S. *et al.* SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. **Signal Transduction and Targeted Therapy** **2020 5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 9 out. 2020a.
- LI, T. *et al.* Overexpression of apoptosis inducing factor aggravates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice. **Cell Death & Disease** **2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 30 jan. 2020b.
- LI, T. & PENG, T. Traditional Chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity. **Antiviral Research**, v. 97, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 2013.
- LI, Y. H. *et al.* Molecular Characteristics, Functions, and Related Pathogenicity of MERS-CoV Proteins. **Engineering**, v. 5, n. 5, p. 940–947, 2019.
- LI, Z. & HIRST, J. D. Computed optical spectra of SARS-CoV-2 proteins. **Chemical Physics Letters**, v. 758, p. 137935, 1 nov. 2020.
- LIANZA, M. *et al.* Isolation, Absolute Configuration and Cytotoxic Activities of Alkaloids from *Hippeastrum goianum* (Ravenna) Meerow (Amaryllidaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 10, p. 2135–2145, 9 out. 2020.
- LIMA, J. M. *et al.* LC-HRMS and acetylcholinesterase affinity assay as a workflow for profiling alkaloids in *Annona salzmannii* extract. **Journal of Chromatography B**, v. 1164, p. 122493, 1 fev. 2021.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001.
- LOSSI, L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 479, n. 3, p. 357–384, 11 fev. 2022.
- LOURENÇO VANZOLINI, K. *et al.* Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: A new tool for plant extract ligand screening. **Talanta**, v. 116, p. 647–652, 15 nov. 2013.
- LU, X.; LU, Y. & DENISON, M. R. Intracellular and In Vitro-Translated 27-kDa Proteins Contain the 3C-like Proteinase Activity of the Coronavirus MHV-A59. **Virology**, v. 222, n. 2, p. 375–382, 15 ago. 1996.

- LY, J. D. *et al.* The mitochondrial membrane potential ($\Delta \psi_m$) in apoptosis ; an update. v. 8, n. 2, p. 115–128, 2003.
- MADIKIZELA, B. & MCGAW, L. J. Underexplored Medicinal Plants from Sub-Saharan Africa: Plants with Therapeutic Potential for Human Health, **Academic Press**. p. 151–159, 1, 2020.
- MAGDER, S. Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? **Critical Care**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 3 fev. 2006.
- MALIK, Y. A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. **The Malaysian journal of pathology**, v. 42, n. 1, p. 3–11, 2020.
- MANDAL, R. *et al.* Caspase-8: The double-edged sword. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1873, n. 2, p. 188357, 1 abr. 2020.
- MANOLARIDIS, I. *et al.* Structure of the C-terminal domain of nsp4 from feline coronavirus. **urn:issn:0907-4449**, v. 65, n. 8, p. 839–846, 17 jul. 2009.
- MASI, M. *et al.* Cytotoxicity and Antiviral Properties of Alkaloids Isolated from *Pancreaticum maritimum*. **Toxins 2022, Vol. 14, Page 262**, v. 14, n. 4, p. 262, 7 abr. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/14/4/262/htm>>. Acesso em: 29 maio. 2023.
- MELDAL, M. & SCHOFFELEN, S. Recent advances in covalent, site-specific protein immobilization. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- MILLER, B. *et al.* Host mitochondrial transcriptome response to SARS-CoV-2 in multiple cell models and clinical samples. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 8 jan. 2021.
- Ministério da Saúde confirma caso da variante EG.5 no Brasil e reforça vacinação como principal medida de proteção — Ministério da Saúde.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/agosto/ministerio-da-saude-confirma-caso-da-variante-eg-5-no-brasil-e-reforca-vacinacao-como-principal-medida-de-protecao>>. Acesso em: 30 out. 2023.
- MIRANDA, C. *et al.* Genomic evolution of the human and animal coronavirus diseases. **Molecular Biology Reports 2021**, v. 1, p. 1–9, 12 ago. 2021.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p. 144–148, 1961a.

MOADDEL, R. *et al.* Automated ligand fishing using human serum albumin-coated magnetic beads. **Analytical chemistry**, v. 79, n. 14, p. 5414-5417, 2007.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. *et al.* Potential Antiviral Agents from Marine Fungi: An Overview. **Marine drugs**, v. 13, n. 7, p. 4520–4538, 1 jul. 2015.

MUCHIRI, R. N. *et al.* Advances in Magnetic Microbead Affinity Selection Screening: Discovery of Natural Ligands to the SARS-CoV-2 Spike Protein. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 5 jan. 2022.

MOHAN, J. & WOLLERT, T. Membrane remodeling by SARS-CoV-2–double-enveloped viral replication. **Faculty Reviews**, v. 10, 2021.

NAG, N. *et al.* Strategies to improve the expression and solubility of recombinant proteins in *E. coli*. **Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods**, p. 1–12, 1 jan. 2022.

NAIR, J. J. & STADEN, J. van. Antiviral Effects of the Plant Family Amaryllidaceae. <https://doi.org/10.1177/1934578X231162781>, v. 18, n. 3, p. 1934578X2311627, 14 mar. 2023.

NAITHANI, R. *et al.* Antiviral Activity of Phytochemicals: A Comprehensive Review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 11, p. 1106–1133, 30 set. 2008.

NAKAYAMA, J. *et al.* A humanized anti-human Fas antibody, R-125224, induces apoptosis in type I activated lymphocytes but not in type II cells. **International Immunology**, v. 18, n. 1, p. 113–124, 1 jan. 2006.

NARWAL, M. *et al.* SARS-CoV-2 polyprotein substrate regulates the stepwise Mpro cleavage reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 299, n. 5, p. 104697, 1 maio 2023. Disponível em: <<http://www.jbc.org/article/S0021925823003393/fulltext>>. Acesso em: 16 set. 2023.

NEHLMEIER, I. *et al.* Host cell entry and neutralisation sensitivity of the SARS-CoV-2 XBB.1.16 lineage. **Cellular & Molecular Immunology** **2023 20:8**, v. 20, n. 8, p. 969–971, 8 maio 2023. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41423-023-01030-z>>. Acesso em: 30 out. 2023.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

OOSTRA, M. *et al.* Localization and Membrane Topology of Coronavirus Nonstructural Protein 4: Involvement of the Early Secretory Pathway in Replication. **Journal of Virology**, v. 81, n. 22, p. 12323–12336, 15 nov. 2007.

OMS declara fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional referente à COVID-19 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/5-5-2023-oms-declara-fim-da-emergencia-saude-publica-importancia-internacional-referente>>. Acesso em: 31 out. 2023.

ORTIZ, J. E. *et al.* Candimine from *Hippeastrum escoipense* (Amaryllidaceae): Anti-Trypanosoma cruzi activity and synergistic effect with benznidazole. **Phytomedicine**, v. 114, p. 154788, 1 jun. 2023.

PAPAZISIS, K. T. *et al.* Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. n. August, 1997.

PHAN, T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, n. February, p. 104260, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104260>>.

PIETROBON, A. J. *et al.* Dysfunctional purinergic signaling correlates with disease severity in COVID-19 patients. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 5814, 30 set. 2022.

PORATH, J. & AXÉN, R. Immobilization of enzymes to agar, agarose, and sephadex support. **Methods in Enzymology**, v. 44, n. C, p. 19–45, 1 jan. 1976.

QUAN, J. & TIAN, J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nature Protocols** 2011 6:2, v. 6, n. 2, p. 242–251, 3 fev. 2011.

REGGIORI, F. *et al.* Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 6, p. 500-508, 2010.

ROBERTSON, J. D. *et al.* Review: Nuclear Events in Apoptosis. **Journal of Structural Biology**, v. 129, n. 2–3, p. 346–358, 1 abr. 2000. . Acesso em: 17 set. 2023.

- ROSANO, G. L. & CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 79503, 17 abr. 2014.
- SAELENS, X. *et al.* Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene** **2004** **23:16**, v. 23, n. 16, p. 2861–2874, 12 abr. 2004.
- SAKAI, Y. *et al.* Two-amino acids change in the nsp4 of SARS coronavirus abolishes viral replication. **Virology**, v. 510, p. 165–174, 1 out. 2017.
- Sambrook, J. *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Lab.**, Plainview. 1989.
- SANGER, F. *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SANTERRE, M. *et al.* Why do SARS-CoV-2 NSPs rush to the ER? **Journal of Neurology**, n. 0123456789, 2021.
- SAÚDE, M. da. **Painel Coronavírus**. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>.
- SCHILLBERG, S. *et al.* Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 453222, 31 maio 2019.
- SCHNEEMANN, A. & YOUNG, M. J. Viral assembly using heterologous expression systems and cell extracts. **Advances in protein chemistry**, v. 64, p. 1–36, 2003.
- SHANG, C. *et al.* SARS-CoV-2 Causes Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy Impairment. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 4159, 6 jan. 2022.
- SHAWKY, E. In-silico profiling of the biological activities of Amaryllidaceae alkaloids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 11, p. 1592–1605, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jphp.12794>>. Acesso em: 22 maio. 2023.
- SHENOY, S. **Coronavirus (Covid-19) sepsis: revisiting mitochondrial dysfunction in pathogenesis, aging, inflammation, and mortality** **Inflammation Research** 2020.
- SHI, C. S. *et al.* SARS-Coronavirus Open Reading Frame-9b Suppresses Innate Immunity by Targeting Mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 Signalingosome. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 6, p. 3080–3089, 15 set. 2014.

SINGH, A. & DESGAGNÉ-PENIX, I. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. **Plant Science Today**, v. 1, n. 3, p. 114–120, 10 jul. 2014.

SINGH, K. K. *et al.* Decoding sars-cov-2 hijacking of host mitochondria in covid-19 pathogenesis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 319, n. 2, p. C258–C267, 2020.

SINGH, N. *et al.* The identification of a novel SIRT6 modulator from *Trigonella foenum-graecum* using ligand fishing with protein coated magnetic beads. **Journal of Chromatography B**, v. 968, p. 105–111, 1 out. 2014.

SKEHAN; R, S. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 4 jul. 1990.

SOROURI, M. *et al.* Mitochondria and Viral Infection: Advances and Emerging Battlefronts. **mBio**, v. 13, n. 1, 1 fev. 2022.

SOUZA, A. S. *et al.* Untargeted GC/MS-based approach for identification of anti-inflammatory alkaloids from *Hippeastrum elegans* (Amaryllidaceae) using a human neutrophil model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 199, p. 114061, 30 maio 2021.

SPYROPOULOS, I. C. *et al.* TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models. **Bioinformatics**, v. 20, n. 17, p. 3258–3260, 22 nov. 2004.

SZLÁVIK, L. *et al.* Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of amaryllidaceae alkaloids. **Planta Medica**, v. 70, n. 9, p. 871–873, set. 2004. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-2004-827239>>. Acesso em: 29 maio. 2023.

TAMURA, T. *et al.* Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XBB variant derived from recombination of two Omicron subvariants. **bioRxiv**, p. 2022.12.27.521986, 27 dez. 2022. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.12.27.521986v1>>. Acesso em: 30 out. 2023.

TIRICHEN, H. *et al.* Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Their Contribution in Chronic Kidney Disease Progression Through Oxidative Stress. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 627837, 23 abr. 2021.

TOTURA, A. L. & BARIC, R. S. SARS coronavirus pathogenesis: Host innate immune responses and viral antagonism of interferon. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 3, p. 264–275, 2012.

TOWBIN, H. *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

TRINDADE XIMENES, I. A. *et al.* Magnetic particles for enzyme immobilization: A versatile support for ligand screening. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 204, p. 114286, 10 set. 2021.

TU, Y.-F. *et al.* A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. **International Journal of Molecular Sciences** 2020, Vol. 21, Page 2657, v. 21, n. 7, p. 2657, 10 abr. 2020.

TYRRELL, D. A. J. & BYNOE, M. L. Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ Cultures. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5448, p. 1467–1470, 1965.

URNER, L. H. *et al.* Modular detergents tailor the purification and structural analysis of membrane proteins including G-protein coupled receptors. **Nature Communications**, 2020.

VALLI, M. & BOLZANI, V. S. Natural Products: Perspectives and Challenges for use of Brazilian Plant Species in the Bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20190208, 8 ago. 2019.

VAZQUEZ, C. & HORNER, S. M. MAVS Coordination of Antiviral Innate Immunity. **Journal of Virology**, v. 89, n. 14, p. 6974–6977, 15 jul. 2015.

VICHAI, V. & KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

V'KOVSKI, P. *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology** 2020 19:3, v. 19, n. 3, p. 155–170, 28 out. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-020-00468-6>>. Acesso em: 16 set. 2023.

VOGEL, F. *et al.* Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. **Journal of Cell Biology**, v. 175, n. 2, p. 237–247, 23 out. 2006.

WIKANDARI, R. *et al.* Application of cell culture technology and genetic engineering for production of future foods and crop improvement to strengthen food security. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2003665>, v. 12, n. 2, p. 11305–11330, 2021.

WISE, J. Covid-19: WHO declares end of global health emergency. **BMJ**, v. 381, p. p1041, 9 maio 2023. Disponível em: <<https://www.bmj.com/content/381/bmj.p1041>>. Acesso em: 16 set. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Coronavirus Disease (COVID-19)**. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>>. Acesso em: 2 set. 2021.

WU, J. *et al.* SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-linked ubiquitination of NEMO. **Cell Reports**, v. 34, n. 7, p. 108761, 16 fev. 2021.

WU, K. E. *et al.* RNA-GPS Predicts SARS-CoV-2 RNA Residency to Host Mitochondria and Nucleolus. **Cell Systems**, v. 11, n. 1, p. 102- 108.e3, 2020.

XU, J. *et al.* Application of Iron Magnetic Nanoparticles in Protein Immobilization. **Molecules** **2014**, Vol. **19**, Pages **11465-11486**, v. 19, n. 8, p. 11465–11486, 4 ago. 2014.

YIN, J. *et al.* Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 335–347, 10 jan. 2007.

YOUNES, Nadin *et al.* Challenges in laboratory diagnosis of the novel coronavirus SARS-CoV-2. **Viruses**, v. 12, n. 6, p. 582, 2020.

YUNG-FANG TU, *et al.* Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. **Reference & User Services Quarterly**, v. 21, n. 7, p. 2657, 2020.

ZAHIRINEJAD, S. *et al.* Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, p. 111774, 1 ago. 2021.

ZAPPI, D. C. *et al.* Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 1 out. 2015. . Acesso em: 16 set. 2023.

ZHANG, C. *et al.* **Liver injury in COVID-19: management and challenges** **The Lancet Gastroenterology and Hepatology** 2020a.

ZHANG, J. *et al.* Biochimie Membrane heist : Coronavirus host membrane remodeling during replication. **Biochimie**, v. 179, p. 229–236, 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.10.010>>.

ZHANG, F. *et al.* Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: Physical properties and applications in phenolic compound removal. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 18, p. 8469–8473, 13 maio 2010.

ZHOU, T. *et al.* High-Content Screening in hPSC-Neural Progenitors Identifies Drug Candidates that Inhibit Zika Virus Infection in Fetal-like Organoids and Adult Brain. **Cell Stem Cell**, v. 21, n. 2, p. 274- 283.e5, 3 ago. 2017. . Acesso em: 22 maio. 2023.

ZHUO, R. *et al.* Ligand Fishing: A Remarkable Strategy for Discovering Bioactive Compounds from Complex Mixture of Natural Products. **Molecules** **2016**, Vol. **21**, Page **1516**, v. 21, n. 11, p. 1516, 11 nov. 2016.

ZUO, Y. *et al.* Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1. **Cell Research** **2009** **19:4**, v. 19, n. 4, p. 449–457, 24 fev. 2009.

