



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE BERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE  
SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA  
CONTENDO AGENTE PARA REGENERAÇÃO  
ÓSSEA GUIADA**

**E**

**KIT, Método DE PCR MULTIPLEX *ONE-TUBE* E  
OLIGONUCLEOTÍDEOS COM E SEM MARCAÇÃO  
FLUORESCENTE: USO INDIVIDUAL E/OU  
COMBINADO PARA DIAGNÓSTICO  
DIFERENCIAL DE 22 SÍNDROMES  
RESPIRATÓRIAS HUMANAS**

**Aluna:** Isabela Lemos de Lima

**Orientadora:** Dra. Vivian Alonso Goulart

**Coorientadora:** Dra. Adriana Freitas Neves

**UBERLÂNDIA - MG**

**NOVEMBRO / 2021**

**COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE  
SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA  
CONTENDO AGENTE PARA REGENERAÇÃO  
ÓSSEA GUIADA**

**E**

**KIT, Método DE PCR MULTIPLEX *ONE-TUBE* E  
OLIGONUCLEOTÍDEOS COM E SEM MARCAÇÃO  
FLUORESCENTE: USO INDIVIDUAL E/OU  
COMBINADO PARA DIAGNÓSTICO  
DIFERENCIAL DE 22 SÍNDROMES  
RESPIRATÓRIAS HUMANAS**

**Aluna:** Isabela Lemos de Lima

**Orientadora:** Dra Vivian Alonso Goulart

**Co-orientadora:** Dra. Adriana Freitas Neves

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como parte  
dos requisitos para obtenção do  
Título de Doutor em Genética e  
Bioquímica**

**UBERLÂNDIA - MG  
NOVEMBRO / 2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- L732c  
2021
- Lima, Isabela Lemos de, 1990-  
Composição e processo de produção de sistemas de liberação controlada contendo agente para regeneração óssea guiada [recurso eletrônico] / Isabela Lemos de Lima. - 2021.
- Orientadora: Vivian Alonso Goulart.  
Coorientadora: Adriana Freitas Neves.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.7031>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.
- Acompanha: Kit, método de PCR multiplex *one-tube* e oligonucleotídeos com e sem marcação fluorescente: uso individual e/ou combinado para o diagnóstico diferencial de 22 síndromes respiratórias humanas.
1. Genética. I. Goulart, Vivian Alonso, 1969-, (Orient.). II. Neves, Adriana Freitas, 1977-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

---

CDU: 575

Glória Aparecida  
Bibliotecária Documentalista - CRB-6/2047

**COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO  
CONTROLADA CONTENDO AGENTE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA  
GUIADA**

**E**

**KIT, Método DE PCR MULTIPLEX *ONE-TUBE* E OLIGONUCLEOTÍDEOS COM  
E SEM MARCAÇÃO FLUORESCENTE: USO INDIVIDUAL E/OU COMBINADO  
PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE 22 SÍNDROMES RESPIRATÓRIAS  
HUMANAS**

**ALUNA:** Isabela Lemos de Lima

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Dra. Vivian Alonso Goulart

**Examinadores:**

**Dra. Yara Cristina de Paiva Maia**

**Dra. Thaise Gonçalves de Araújo**

**Dr. Fernando Rosado Spilki**

**Dra. Helisângela de Almeida Silva**

**Data da Defesa:** 03 /11 /2021

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da  
Dissertação/Tese foram contempladas

Vivian Alonso Goulart



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - 04/2021 - PPGGB				
Data:	Três de novembro de dois mil e vinte e um	Hora de início:	08:00h	Hora de encerramento:	11:50h
Matrícula do Discente:	11723GBI002				
Nome do Discente:	Isabela Lemos de Lima				
Título do Trabalho:	Plataforma de PCR Multiplex Para Diagnóstico Diferencial de 21 Síndromes Gripais.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular e Celular.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	INCT em Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT-TeraNano).				

Aos três dias do mês de novembro de dois mil e vinte e um, às 08:00 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Cisco Webex Meetings*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki, Profª. Drª. Helisângela de Almeida Silva, Profª. Drª. Thaise Gonçalves de Araújo, Profª. Drª. Yara Cristina de Paiva Maia e Profª. Drª. Vivian Alonso Goulart, orientador (a) do (a) candidato (a) em sessão secreta. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, Profª. Drª. Vivian Alonso Goulart, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença dos membros da Banca e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADO (A).

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram

encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Presidente**, em 03/11/2021, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Membro de Comissão**, em 03/11/2021, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Yara Cristina de Paiva Maia, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/11/2021, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Rosado Spilki, Usuário Externo**, em 03/11/2021, às 12:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helisângela de Almeida Silva, Usuário Externo**, em 03/11/2021, às 12:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3142571** e o código CRC **7C02063A**.

## AGRADECIMENTOS

- ♥ Agradeço primeiramente a Deus, pois “Até aqui me nos Ajudou o Senhor” (1Samuel). Além de sempre ser alento, apoio e força todos que me conhecem sabem tudo que passei nessa trajetória. E ELE me sustentou todo esse tempo. Além disso, a cada grãozinho de conhecimento e entendimento científico que eu adquiro eu tenho mais certeza que existe uma inteligência maior por trás de tudo!! Obrigada Deus por toda essa trajetória, todo o aprendizado e todos os obstáculos vencidos!!
- ♥ Agradeço muito aos meus pais Joel e Jomara, e meu irmão Joel Filho, que sempre tem me apoiado em tudo, me ajudado e me amado. Sendo sempre meu porto seguro para alçar meus voos e alcançar meus objetivos. Me dando sempre o suporte para realizar meus sonhos!! Vocês são minha força!! Amo vocês!! Enfrentamos tudo juntos, e continuaremos se Deus quiser. Obrigada por tudo sempre!! Essa vitória é nossa!!
- ♥ Agradeço a minha avó Dalci por todo amor, apoio e incentivo e a toda minha família que sempre me apoiou e torceu por mim!!
- ♥ Agradeço também ao meu noivo Higo Eduardo pelo apoio, incentivo, força e alento sempre. Nunca medindo esforços para me ajudar e me impulsionar!! Te amo muito!!
- ♥ Obrigada a todos meus amigos, que sempre permaneceram ao meu lado me apoiando, torcendo e sempre encorajando!!
- ♥ Neste grupo dos amigos agradeço em especial as amigas Patrícia Lopes, Sara Teixeira, Kellen Costa, Esther Fernandez e Cristiane Angélico; por dividirem comigo as dores e as delícias da pós-graduação. Sempre juntas, nos apoiando, incentivando, aplaudindo, rindo e chorando .
- ♥ Preciso dedicar um tópico a Sara Teixeira, que além de sempre me apoiar e me ajudar foi muitas vezes meu socorro na mudança de projeto sempre generosa dividindo comigo sua experiência. Obrigada por tudo Saretta!!
- ♥ Ainda falando de amigos, não posso deixar de agradecer meus amigos da família Nanos. Imensurável minha gratidão a todos pelos aprendizados, ajuda, risadas e choros. Vou citar os nomes da Luciana Bastos, Natássia Rezende, Emília Rezende, Tafarel Andrade, Ana Flávia Notário, Fabiana Santos, Mário Machado, Mylla Spirandelli e Loyna Nobile para deixar o meu enorme muito obrigada por toda ajuda, ensinamentos e apoio. Mas que os outros integrantes não se sintam preteridos pois todos tem seu lugar no meu coração. Somos realmente uma família!!
- ♥ Falando em Nanos, não posso deixar de agradecer o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart por acolher nosso GEP-CT no laboratório, sempre nos apoiando. E agradecer especialmente pelas oportunidades que me deu, pela ajuda, ideias e

**esse projeto que me possibilitou um enorme aprendizado. Tenho enorme admiração pelo senhor. Muito Obrigada por tudo!!**

- ♥ **Agradecer também minha outra família na UFU, o GEP-CT, que eu tenho muito orgulho e amo fazer parte!!**
- ♥ **E falando em oportunidades, essas palavras serão poucas para poder agradecer tudo que a melhor orientadora do Universo fez por mim. Profa. Dra. Vivian, muito obrigada por ter me acolhido desde a iniciação científica. Chegamos ao fim juntas de um outro ciclo e espero que venham outros!! Obrigada pela atenção, paciência, carinho, apoio, por todos os ensinamentos e por ser exemplo de honestidade sempre. Quando comecei na pesquisa, ainda na graduação, pessoalmente me ensinou os primeiros passos. Muito obrigada por quando eu disse: “Vivian, acho que não vai dar tempo de prestar o doutorado”, você ter segurado minha mão e dito: “Vai sim Bel, vamos juntas!”. Lembrando de toda a história fico até emocionada em constatar a sorte que eu tive de ter te encontrado, pois sempre foi uma mãe científica e na vida também. Como disse, posso escrever páginas aqui que não seria suficiente!! Muito Obrigada por tudo!!**
- ♥ **Neste caminho também encontrei a Profa. Dra. Letícia Filice, que até metade do caminho foi minha co-orientadora. E novamente as palavras não serão suficientes para agradecer todo apoio, companheirismo e ensinamentos!! E sempre que precisei nunca hesitou em sentar-se do meu lado e por a mão na massa. No final, acabei seguindo uma linha diferente, mas com certeza seu apoio e seus ensinamentos fizeram diferença também na segunda parte! Obrigada por tudo!!**
- ♥ **Já nessa segunda parte da jornada encontrei outra co-orientadora maravilhosa, Profa. Dra. Adriana Freitas Neves. Obrigada por ter me apresentado esse novo mundo, me ajudando a sair da minha zona de conforto, obrigada por todos os ensinamentos, toda ajuda e todo apoio!! Fez total diferença para a conclusão dessa etapa!!**
- ♥ **Preciso também agradecer a equipe do Biogenetics Diagnósticos, e vou fazê-lo nas pessoas da Daniella Tambasco e da Juliana São Julião, por todo apoio, ajuda, paciência (muita paciência) e acolhimento. Obrigada aos velhos e novos amigos por me deixarem invadira rotina de vocês, em especial: Cíntia Bastos, Tatiana Almeida, Sara Martins, Lorraine Moura, Bianca Uliana e todas as meninas do Covid.**
- ♥ **Quero agradecer também a Dimension Sciences pela oportunidade e incentivo!! Fiquei muito honrada por ter sido escolhida para participar da primeira turma do programa de bolsas de vocês!! Foi uma oportunidade de troca e crescimento ímpar!! Que vocês possam continuar sempre incentivando e auxiliando os jovens cientistas.**

## **DEDICATÓRIA**

- ♥ **Dedico este trabalho primeiramente a Deus!! Tudo para honra e glória DELE!!**
- ♥ **Dedico aos meus pais Joel e Jomara, pois este trabalho também fruto de muito esforço deles.**
- ♥ **Dedico a minha avó Dalci, que é a minha maior incentivadora e entusiasta.**
- ♥ **Dedico também a Profa. Vivian, a Profa. Leticia e a Profa. Adriana por todos os motivos que citei nos agradecimentos.**

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”  
*Albert Einstein*

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nanobiotecnologia (Instituto de Biotecnologia) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU-Uberlândia – MG) sob orientação da Professora Dra. Vivian Alonso Goulart e coorientação da Professora Dra. Adriana de Freitas Neves e no Laboratório Biogenetics Diagnósticos em Uberlândia -MG sob supervisão da Dra. Daniella Tambasco Debenedetti e da MsC. Juliana São Julião.

# Sumário

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Dedicatória</b> .....	<b>vi</b>
<b>Apresentação</b> .....	<b>1</b>
<b>Parte I</b> .....	<b>3</b>
Capítulo 1 – Fundamentação Teórica.....	4
1.1 - Introdução .....	4
1.2 – Tecido Ósseo .....	5
1.3 – Engenharia de Tecido ósseo .....	8
1.4 – Biomateriais .....	12
1.5 – <i>Scaffolds</i> .....	14
1.6 – Sinvastatina.....	18
1.7 – Referências .....	21
Capítulo 2 – Patente: COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA CONTENDO AGENTE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA .....	27
<b>Parte II</b> .....	<b>51</b>
Capítulo 3 – Fundamentação Teórica.....	52
3.1 - Introdução .....	52
3.2 – Vírus e Bactérias que acometem o sistema respiratório .....	53
3.3 – Doenças Respiratórias .....	58
3.4 – Diagnóstico Diferencial.....	63
3.5 – Referências .....	68
Capítulo 4 – Patente: KIT, Método DE PCR MULTIPLEX <i>ONE-TUBE</i> E OLIGONUCLEOTÍDEOS COM E SEM MARCAÇÃO FLUORESCENTE: USO INDIVIDUAL E/OU COMBINADO PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE 22 SÍNDROMES RESPIRATÓRIAS HUMANAS .....	73

## Lista de Figuras

### Parte I

#### Capítulo 1

**Figura 1:** Etapas da remodelação óssea.

**Figura 2:** Propriedades que um *scaffold* ideal deve ter para ser aplicado com êxito na Engenharia de Tecido Ósseo.

#### Capítulo 2

**Figura 1:** Micrografia eletrônica da estrutura micro e nanofibrilar do material médico.

**Figura 2:** Micrografia eletrônica e o difratograma de raios-X da invenção em questão.

**Figura 3:** Gráficos da Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), permitindo identificar as frequências de absorções dos grupos funcionais característicos dos materiais constituintes e dos dispositivos.

**Figura 4:** Curvas térmicas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC).

**Figura 5:** Análises de termogravimetria (TGA) através dos gráficos de perda de massa e derivadas das perdas de massas dos materiais constituintes e dos dispositivos promotores e indutivos da regeneração óssea, evidenciando seus comportamentos térmicos até a degradação.

**Figura 6:** Gráficos referentes às propriedades cristalográficas dos materiais constituintes, através dos difratogramas de raios-X (DRX).

**Figura 7:** Relação entre o ângulo de contato e o acréscimo da concentração do polímero hidrofílico, com as imagens das gotas depositadas durante a análise.

**Figura 8:** Perfis de liberação da sinvastatina em função do tempo.

**Figuras 9 e 10:** Micrografias eletrônicas de varreduras das mantas poliméricas com regiões mineralizadas após o tratamento com células osteoblásticas, 7 e 14 dias respectivamente.

## **Parte II**

### Capítulo 3

**Figura 1:** Ciclo de vida viral.

**Figura 2:** Incidência dos vírus respiratórios no Brasil até semana 49 do boletim epidemiológico.

**Figura 3:** Esquematização da PCR.

### Capítulo 4

**Figura 1:** Diagrama de fluxo do processamento da amostra.

**Figura 2:** Tipagem de amostras de COVID-19.

## Lista de Tabelas

### Parte I

#### Capítulo 1

**Tabela 1:** Linha do tempo referente aos marcos na Engenharia de Tecidos.

**Tabela 2:** Visão geral dos esforços de engenharia de tecidos apresentando os diferentes tecidos, as abordagens utilizadas e os desafios.

**Tabela 3:** Propriedades dos *scaffolds*.

### Parte II

#### Capítulo 4

**Tabela 1:** Patógenos, seus respectivos oligonucleotídeos, marcação e número de entrada na sequência no GenBank.

**Tabela 2:** Resultados apresentados pelas amostras testadas.

**Tabela 3:** Reivindicação das sequências dos oligonucleotídeos.

## Lista de Abreviaturas

ALP: Fosfatase Alcalina

BMP-2: Proteína morfogenética óssea 2

BMPs: Proteínas morfogênicas ósseas

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

COVID-19: Coronavírus Disease 2019

CoVs: Coronavírus

CTs: Células-Tronco

DEPC: Dietil Pirocarbonato

dNTPs: Desoxinucleotídeos trifosfato

DRX: Difractogramas de raios-X

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

ELISA: Ensaio imunoenzimático

ET: Engenharia de Tecidos

ETO: Engenharia de Tecidos Ósseos

EV: Enterovírus

FDA: *Food and Drug Administration*

FGF23: Fator de crescimento de fibroblastos 23

FLU: Influenza Vírus

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

HAdV: Adenovírus Humano

HBoV: Bocavírus Humanos

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

HMPV: Metapneumovírus Humano

HPeV: Parechovírus Humano

HPIV: Parainfluenza Vírus Humano

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

INPI: Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

IRAs: Infecções respiratórias agudas

LDL: *Low Density Lipoproteins*

MC3T3: Linhagem de pré-osteoblastos

MERS-CoV: Síndrome Respiratória do Oriente Médio

Mpneu: *Mycoplasma pneumoniae*

MSCs: Células-Tronco Mesenquimais

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORFs: *Open reading frame*

PBS: Solução de Tampão fosfato-salino

PCL: Policaprolactona

PCR Multiplex: Reação em Cadeia da Polimerase com múltiplos marcadores

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PEG: Polietilenoglicol

PLA/PEG: Poli (ácido lático)/ poli(etileno glicol)

PLA: Ácido Poli-lático

PLGA: Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RV: Rinovírus

SARS-CoV: Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS-CoV-2: Do inglês, coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave

SBF: Fluido corporal simulado

SBS: *Solution Blow Spinning*

SRAG: Síndrome respiratória aguda grave

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VSR: Vírus sincicial respiratório

## Apresentação

A presente Tese é composta por duas partes (Parte I e Parte II). A primeira parte é composta pelo projeto original de doutorado e está relacionada aos temas: engenharia de tecidos, regeneração óssea e células-tronco; e a segunda parte está relacionada aos temas: Covid-19, síndromes gripais e diagnóstico molecular. Originalmente o projeto de doutorado era referente a primeira parte (Capítulos 1 e 2), que deram origem a patente (Capítulo 2) referente a minha qualificação. Passado o período da qualificação, no ano de 2020 nos deparamos com a Pandemia de COVID-19 (Corona Vírus Disease 2019) que paralisou a maioria das atividades presenciais e por isso não consegui dar sequência ao projeto previsto. Neste contexto uma ONG americana, *Dimensions Sciences*, lançou um edital que contemplou 7 pesquisadores brasileiros para trabalharem nas pesquisas para enfrentamento da pandemia no Brasil. Dentre este pequeno grupo, eu fui uma das selecionadas e tive a oportunidade de me inserir nas pesquisas que estavam em andamento no Laboratório de Nanobiotecnologia e logo fui designada a ser responsável por um projeto que decidimos então utilizar para a minha defesa de Tese. Este projeto é referente a segunda parte desta Tese (Capítulos 3 e 4).

**Parte I:** Atualmente a Engenharia de tecidos vem sofrendo grande evolução com a utilização da nanobiotecnologia. Cada vez mais busca-se alternativas para reparo e substituição de tecidos do corpo que preservem a função e características, além de uma maior biocompatibilidade. Neste âmbito, *scaffolds* nanoestruturados tem se mostrado boa alternativa para reparo do tecido ósseo por sua capacidade de sustentação das células, dos poros que desenvolvem um ambiente propício para a comunicação e proliferação delas, capacidade de ser bioabsorvido, além de poder ser associado a fármacos, que podem levar ao aumento da diferenciação decélulas-tronco na região. O capítulo 1 traz uma contextualização do tema justificando a importância dos objetivos desta primeira parte, que é a validação de *scaffolds* nanoestruturados compostos por PLA/PEG (poli(ácido láctico)/ poli(etilenoglicol)) associados a Sinvastatina. O capítulo 2 traz a patente já depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), referente ao processo de

produção dos *scaffolds* de PLA/PEG associados ou não a sinvastatina, que apresentaram bons resultados preliminares com perspectivas de aplicação em regeneração óssea.

**Parte II:** Em janeiro de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou estado de pandemia devido ao grande número de casos de COVID-19 pelo mundo e a rápida disseminação do vírus SARS-CoV-2 (sigla do inglês que significa coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave) causando a morte de milhares de pessoas. Diante dessa estatística é fundamental diagnosticar o maior número de casos de forma rápida e eficaz para direcionar o tratamento e controle da doença. Entretanto, diferenciar outras infecções respiratórias agudas (IRAs) na atual pandemia por SARS-CoV-2 é essencial para conduzir a escolha da terapia individual mais adequada, medidas coletivas para prevenir a disseminação, prevenir também a disseminação de infecções hospitalares secundárias, evitar resistência bacteriana e diminuir a sobrecarga das unidades de saúde. O capítulo 3 contextualiza a situação da pandemia em que vivemos e outras síndromes gripais que podem ser confundidas com a COVID-19, bem como seus dados epidemiológicos de forma a justificar o objetivo desta parte, que consiste no desenvolvimento de uma nova plataforma diagnóstica diferencial baseada em PCR multiplex. O Capítulo 4 apresenta a patente que ainda será depositada, reivindicando o uso dos oligonucleotídeos desenhados para essa plataforma e o método de amplificação de todos os alvos em um único tubo com detecção simultânea destes alvos.

# **Parte I:**

**“COMPOSIÇÃO E PROCESSO  
DE PRODUÇÃO DE SISTEMAS  
DE LIBERAÇÃO CONTROLADA  
CONTENDO AGENTE PARA  
REGENERAÇÃO ÓSSEA  
GUIADA”**

## Capítulo 1 – Fundamentação Teórica

### 1.1 - Introdução

O osso é um tecido mineralizado, que tem como função dar estrutura de suporte e proteção para o corpo, armazena minerais para o metabolismo e produz células sanguíneas (1). Atualmente existe uma grande parcela da população mundial que é acometida por problemas ósseos e nas articulações. Defeitos ósseos podem se desenvolver de diferentes maneiras, como: infecção, tumor, trauma, cirurgia, etiologia congênita, entre outros (2, 3). Essas condições estão presentes em torno de 50% das doenças crônicas de indivíduos com mais de 50 anos, e trazem dor, incapacidade física e na maioria das vezes necessitam de cirurgia, onde são feitos enxertos ósseos e implantes (4).

Por muitos séculos foi discutida a ideia de substituir tecido ósseo e existem registros de civilizações antigas e relatos, como do século 17, onde foi realizado enxerto de um pedaço de osso de cachorro em um defeito da calota craniana de um soldado. Mais tarde no século 19 surgiram relatos de enxerto autogênico. Existem também registros de substituição por materiais não ósseos (3). Após todo esse tempo de discussão destas ideias e experimentos rudimentares, a chamada primeira geração de enxertos ósseos sintéticos foi feita a partir de metais e ligas, os implantes bioinertes de alumina e aço inoxidável. Apesar de serem muito utilizados devido a sua boa reprodutibilidade e alta disponibilidade possuem certas desvantagens, como: má integração, rigidez incompatível com o osso, encapsulamento em tecido fibroso, liberação de detritos e não possuem atividade bioativa (5, 6).

Com o tempo e o surgimento da engenharia de tecidos vem aparecendo novas opções para regeneração do tecido ósseo, onde se possa preservar as funções do osso (5, 7). Outros materiais, como polímeros e cerâmicas bioativas, começaram a ser utilizados para fabricação de *scaffolds*, estruturas que trazem flexibilidade e reabsorção associadas as propriedades mecânicas, osteoindutoras e osteocondutoras. Na sequência surgiram estudos associando essas estruturas a fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas ósseas e células, aumentando assim a eficiência biológica (6, 8, 9). Neste âmbito já há uma ampla gama de estudo

da biologia das células-tronco (CTs), especialmente em relação às suas funções

tróficas, regenerativas e imunomoduladoras que têm gerado grande entusiasmo no desenvolvimento de soluções terapêuticas inovadoras (10).

Além das células, fatores de crescimento e proteínas ósseas podemos associar outras substâncias aos *scaffolds* para tentar aumentar a influência sobre a diferenciação óssea. Dentre estas substâncias temos as estatinas, que já foram amplamente estudadas quanto ao efeito pleiotrópico direto na modulação da diferenciação e função das células ósseas e osteossíntese (11). Essas descobertas foram feitas no ano de 1999, sendo demonstrado pelos autores que este grupo de substâncias foram muito eficazes na cultura de tecido de calvária murina através da expressão do gene da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), promovendo a diferenciação das células em osteoblastos (12). Mais tarde outros estudos confirmaram esses resultados, como no caso da Sinvastatina, que mostrou influenciar o aumento da fosfatase alcalina (ALP, do inglês alkaline phosphatase) e aumentou a expressão de mRNA de osteocalcina em uma cultura *ex vivo* (13).

A capacidade da indução osteogênica do *scaffold* está também diretamente relacionada com o tamanho e as interconexões entre os poros que facilitam a distribuição celular, integração com o tecido do hospedeiro e crescimento capilar. Portanto, estes são parâmetros extremamente importante na fabricação do biomaterial e é uma questão significativa na engenharia de tecido ósseo. O objetivo do presente trabalho consistiu no uso de *scaffold* nanoestruturados de PLA/PEG (nas respectivas proporções 70/30 e 90/10) acrescidos de Sinvastatina (2,5% a 7,5%) em linhagens de pré-osteoblastos (MC3T3) para regeneração óssea *in vitro*.

A seguir serão discutidos em mais detalhes todas essas vertentes importantes na regeneração óssea e na engenharia de tecidos

## 1.2– Tecido Ósseo

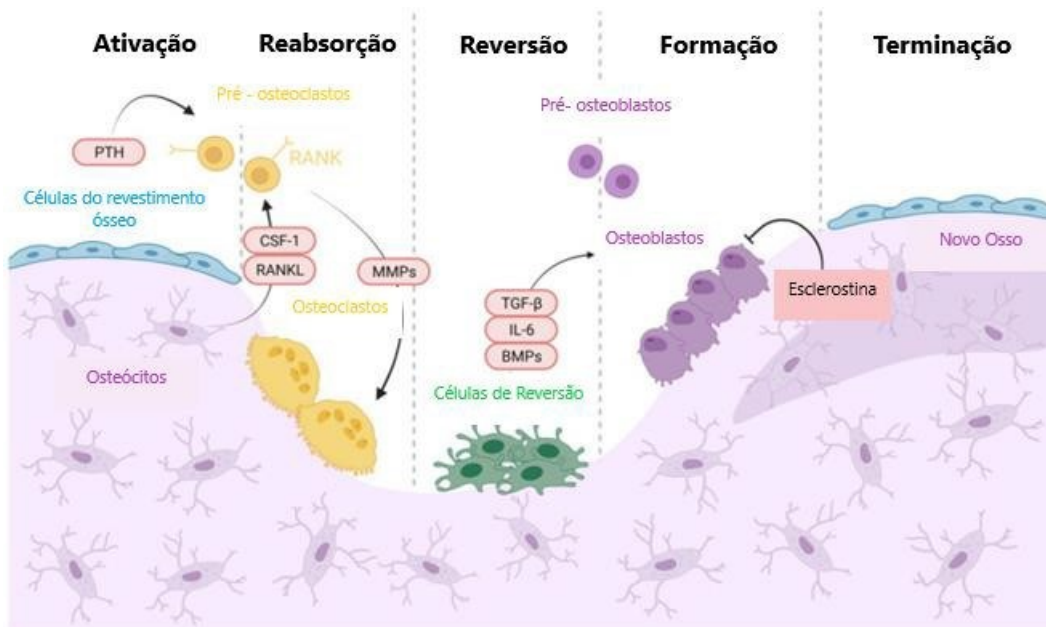
O osso é a estrutura básica que forma o esqueleto e tem várias funções, como: suporte mecânico, proteção dos órgãos internos (cérebro, pulmão, coração etc.), armazenamento de minerais, produção de células sanguíneas e ainda é fonte de células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês *Mesenchymal stem cells*). Sua estrutura rígida serve como pontos de fixação para os músculos esqueléticos, que são responsáveis pelo movimento. Os ossos tem capacidade de regeneração de

sua matriz extracelular orgânica e inorgânica através de suas células que são osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (14). A osteogênese pode ocorrer por meio de ossificação dentro de uma membrana de tecido conjuntivo (ossificação intramembranosa) ou por ossificação de precursores de cartilagem (ossificação endocondral) (15).

De acordo com a sua forma os ossos do corpo humano podem ser classificados em: longos, curtos, achatados e irregulares. Como o próprio nome diz, os ossos longos tem formato alongado e são encontrados nos membros inferiores e superiores (clavícula, úmero, rádio, ulna e fêmur, tibia e fíbula). Os ossos curtos são aqueles que todas as suas dimensões são praticamente iguais dando uma forma cúbica e compacta (carpo e tarso). Ossos achatados são os planos, finos e largos, oferecem área para fixação de músculo e protegem os órgãos (frontal, occipital, parietal). Por fim, os irregulares apresentam uma morfologia mais complexa com diferentes funções (vértebra, sacro, cóccix e esfenóide) (15).

Alguns estudiosos já mostraram também que além das funções já citadas, o osso influencia a atividade de outros órgãos e é influenciado por outros órgãos e sistemas do corpo, atuando também como órgão endócrino. O esqueleto produz pelo menos dois hormônios, fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23) e osteocalcina. O primeiro é produzido pelos osteócitos e atua no rim para inibir a 1-alfa-hidroxiilação da vitamina D e promover a excreção de fósforo. A osteocalcina, atua nas células beta pancreáticas para aumentar a produção de insulina e nos tecidos periféricos para aumentar a sensibilidade a insulina e por consequência aumentar a utilização de glicose (16).

O tecido ósseo é constituído de 70% de material inorgânico, a hidroxiapatita deixa o esqueleto duro e forte e 30% de material orgânico que são as fibras colágenas e as proteínas não colágenas que deixam o osso flexível (15). Este tecido sofre constante remodelamento, reabsorção (liberação de cálcio e fosfato do osso mineralizado) e deposição (uso de cálcio e fosfato para formação de novo osso), por meio das ações das suas células componentes (Osteoblasto, Osteoclasto, Osteócito e revestimento ósseo) (15, 17). A figura 1 esquematiza o processo de remodelação óssea.



**Figura 1 – Remodelação óssea. Ativação:** O osso quiescente detecta um sinal de iniciação que é desencadeado por forças mecânicas, danos ou hormônios como o paratormônio (PTH). Acontece então a apoptose dos osteócitos que liberam fatores de osteoclastogênese, como o fator estimulador de colônias 1(CAF-1) e o ativador do receptor do ligante NF-kB (RANKL) recrutam e ativam o precursor de osteoclastos. **Reabsorção:** Os osteoblastos secretam citocinas e metaloprotéinas de matriz (MMPs) para expor os locais de adesão para facilitar a fixação dos osteoclastos, que dissolvem a matriz mineralizada e a matriz óssea. **Reversão:** As células de “reversão” removem a matriz de colágeno não mineralizada e matriz mineralizada não colágena para aumentar a adesão osteoblástica. Os osteoclastos são então substituídos por células de linhagem dos osteoblastos, promovendo o início da formação óssea. **Formação:** Os progenitores de osteoblastos se diferenciam e iniciam a nova formação óssea até que eles voltem a formar células de revestimento ósseo, que cobrem a superfície óssea. **Terminação:** Os osteócitos produzem esclerostina, suprimindo a diferenciação dos osteoblastos e a formação óssea. Adaptado de Pedrero, Llamas-Sillero (2021) (18).

As células osteogênicas vêm de células-tronco mesenquimais na medula óssea. Essas células se diferenciam em pré-osteoblastos, que posteriormente dão origem a osteoblastos maduros (15). Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, os osteoblastos pela formação óssea, enquanto os osteócitos atuam como sensores e regentes do processo de remodelação óssea. Todo esse processo é controlado por fatores locais (fatores de crescimento e citocinas) e sistêmicos

(calcitonina e estrogênios), que promovem a homeostase óssea. Um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação pode resultar em doenças ósseas como osteoporose e osteopetrose (17).

Além das doenças que podem ser ocasionadas por esse desbalanço, milhões de pessoas apresentam anualmente fraturas ou até mesmo câncer, que levam a perda óssea. Estes quadros podem levar a dor intensa e perda de função (18). Como dito anteriormente, o osso é capaz de se remodelar, mas em casos mais graves é necessária intervenção cirúrgica, sendo cada vez mais interessante a pesquisa de novos materiais e a evolução da engenharia de tecidos.

### 1.3 - Engenharia de tecidos

A medicina vem enfrentando grande desafio no reparo e regeneração de órgão e tecidos até hoje, buscando alternativas menos invasivas e mais modernas. Quem tenta trazer essas novas opções é a Engenharia de Tecidos (ET) que precisa lidar com vários parâmetros que estão inseridos na natureza e sua complexidade, além de ter que lidar com mecanismos que ainda não foram elucidados (19).

Por volta dos anos 90 foi cunhado o termo “Engenharia de Tecidos” com o significado de “campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido” (20, 21). Há um pouco mais de 30 anos alguns pesquisadores, como Langer e Vago já publicavam trabalhos, que já eram o início dessa nova vertente no reparo de tecidos. Estes autores por exemplo descreveram preparações de células cultivadas sobre polímeros artificiais bioerodíveis em cultura de células do fígado, pâncreas e intestino e implantaram os arcabouços em camundongos tendo sucesso nos enxertos (20, 22). A tabela 1 mostra o desenvolvimento dessa área de pesquisa através dos anos.

**Tabela 1** – Linha do tempo referente aos marcos na Engenharia de Tecidos. Adaptada de Sidhu, Kumar (23).

Ano	Marco
1907	Dr. Harrison Ross observou pela primeira vez fibra nervosa viva em desenvolvimento
1948	Primeiro rim artificial foi desenvolvido

1988	Posição tridimensional das células
1993	Termo “Engenharia de Tecidos” foi definido
1994	Bio-fabricação
1997	Comercialização de pele útil
2002	Comercialização de osso útil
2003	Patente da impressora 3D
2008	Descelularização de órgão
2015	Desenvolvimento de tecido leve
2019	Desenvolvimento de um novo processo estereolitográfico para redes multi-vasculares

Como mencionado anteriormente, esta é uma área multidisciplinar, então biologia celular, biomateriais e bioengenharia, têm contribuído para os avanços da ET (24). As estratégias que podem ser utilizadas se dividem em duas categorias principais: as que usam *scaffolds* e as que não usam e em todas pode-se usar células autólogas ou alogênicas (24, 25). Dentre estas estratégias podemos citar: 1- *scaffolds* sintéticos ou biologicamente ativos, que induzem a resposta regenerativa; 2- abordagens sem *scaffold* usando células capazes de auto montar, entrega de fatores de crescimento de tecido e outras moléculas (24).

O uso de células trouxe questões que os pesquisadores devem se preocupar, entre elas o valor econômico e a disponibilidade de células. Surgiu também as estratégias de utilização de substâncias produzidas por células para recrutar no próprio organismo maior número para o local a ser reparado e também de células geneticamente modificadas (25). As células expandidas mais comumente utilizadas são células-tronco adultas (originadas de medula óssea, tecido adiposo, dente e sangue periférico), células-tronco embrionárias, células-tronco pluripotentes induzidas e células geneticamente modificadas (26).

Atualmente temos pesquisas para recriar quase todos os órgãos do corpo humano estando em estágios variados de avanço, alguns já sendo usados na clínica e outros no estágio pré-clínico ou ainda em fase de pesquisa (24). Na tabela 2 temos um apanhado de avanços e os desafios enfrentados.

**Tabela 2** - Visão geral dos esforços de engenharia de tecidos apresentando os diferentes tecidos, as abordagens utilizadas e os desafios. Adaptado de **Berthiaume, Maguire (27)**.

<b>Tecido</b>	<b>Abordagem</b>	<b>Desafio</b>
<b>Pele</b>	Matriz implantada para guiar regeneração; implantes com células autólogas ou alogênicas.	Falta de apêndices para fixação, lento processo de crescimento de células, lenta vascularização
<b>Córnea</b>	Implantes de matriz extracelular; matriz gerada por células cultivadas <i>ex vivo</i>	Manter a transparência e propriedades de barreira da matriz
<b>Fígado</b>	Hepatócitos de xenogênicos, alogênico ou derivado de células-tronco ou hepatoma imortalizado semeado em matrizes implantáveis extracorpóreas e sistemas biorreatores	Fonte de célula, manutenção de função hepática, célula com alta densidade, vascularização de implantes
<b>Pâncreas</b>	Ilhota livre ou transplantação encapsulada	Escolha do local de transplante, vascularização, fonte de células, rejeição imunológica
<b>Cartilagem</b>	Matriz implantada para guiar regeneração; implantes com	Processo lento para o crescimento das células, controle da diferenciação celular,

	células autólogas ou alogênicas	integração com o ambiente receptor, longo prazo e durabilidade
<b>Coração</b>	Materiais, inclusive órgãos descelularizados, semeados com células progenitoras e células-tronco diferenciadas em cardiomiócitos	Tumorigenicidade, controle da célula, diferenciação elétrica e integração
<b>Rim</b>	Néfrons derivados de células-tronco cultivado <i>ex vivo</i>	Alta permeabilidade hidráulica
<b>Neurônio e medula espinhal</b>	Materiais em forma de tubos para orientação axonal e regeneração, às vezes usada em combinação com estratégias antiinflamatórias; células-tronco neurais	Falta de conexão com axônios adequados, controle do ambiente pró-inflamatório, difícil prevenção da formação de cicatriz no tecido

O tecido ósseo, como dito anteriormente, dependendo da gravidade da lesão necessitam de suporte adicional. Estruturas ósseas criadas a partir de osso autólogo ou aloenxerto podem ser usadas, embora produzam problemas como taxas de degradação rápidas, bioatividade reduzida, morbidade do local doador ou o risco de transmissão de patógenos (28). E por isso, o desenvolvimento da ET é tão importante.

Para que a TE funcione para regeneração óssea se faz necessário entender os processos de ossificação endocondral e intramembranoso. As duas vias começam da mesma forma, com o recrutamento de células-tronco mesenquimais e sua

diferenciação. No primeiro, as MSCs se diferenciam em condrócitos que depositam cartilagem, que a seguir é mineralizada pelos osteoblastos, esta via forma os ossos que contém medula. A segunda via, se dá pela diferenciação osteogênica direta das MSCs, são eficazes na reparação e restauração após lesões e quando estas lesões são de grande porte esse processo pode requerer um suporte externo, como o uso de biomateriais (29).

#### **1.4– Biomateriais**

Uma das primeiras definições dadas para o termo “Biomaterial” foi cunhada por Dr. Jonathan Cohen em 1967 e dizia que estes eram quaisquer materiais utilizados como implante, excluindo suturas e drogas, mas ele estava focado em um grupo muito restrito de aplicações, considerado somente os que já haviam sido testados e o mais importante. Além disso, ele ainda não considerava como era a interação do material com o sistema biológico (30, 31).

Atualmente os Biomateriais são definidos como materiais que interagem com o sistema biológico, e eles podem ser naturais, sintéticos, vivos ou sem vida (32, 33). A estrutura totalmente interativa, biocompatível, biodegradável e não citotóxica com o sistema biológico, ainda é uma prioridade na medicina regenerativa para auxiliar no tratamento de feridas e doenças, possibilitando também a criação de substitutos para dispositivos médicos (33).

Existem várias formas de classificá-los, por exemplo com base em sua biocompatibilidade são classificados como bioativos, biotolerantes, biodegradáveis e bioinertes. Podem também ser classificados de acordo com sua estrutura química em metal, cerâmica, polímero e compósito. Estas classificações são funcionais, mas se tornam algumas vezes inadequadas ou até confusas se observarmos todas as descobertas ao longo do tempo até agora. Desta foram surgindo outras formas para classificar, entre elas pela origem e pela quantidade de energia gasta para processar ou moldar o material ou até mesmo dividindo os materiais em três categorias: Primitivo (materiais de ocorrência natural, que são remodelados usando ferramentas manuais (osso)), Artesanais (são refinados usando uma tecnologia específica) e Transformado (materiais que requerem uma transformação física ou química adicional) (30).

Existem registros nas civilizações antigas, há alguns milênios, de substituição de dentes fixados por fios de ouro, reparos de defeitos no crânio e enxertos de pele. Estes registros mostram a utilização de materiais de cadáveres e até animais (30). De lá para cá muitos outros materiais foram testados e analisados. Podemos citar o marfim e a queratina de animais, o primeiro é duro, mas tem certa flexibilidade. O marfim assim como o osso tem hidroxiapatita na sua composição e matriz que contém colágeno (34). Já a queratina é encontrada nas unhas, chifres, cascos, cabelos e garras (30, 35). Ela apresenta diversos usos na indústria de cosméticos, aditivo de cerâmicas, fertilizante, nos materiais de combate a incêndio e para tratamento do couro (36). As proteínas da queratina podem se automontar e polimerizar, atuam como um suporte de fixação celular ativo e participam das funções regulatórias celulares (37). Outros materiais que podem ser citados são: vidro, porcelana, ouro, prata, ferro, cobre, bronze, cálcio, minerais sódicos e vários tipos de polímeros (30).

Um recente trabalho de meta-análise realizado por nosso grupo de pesquisa, revisou trabalhos que utilizavam biomateriais associados a células-tronco para regeneração tecidual, e concluiu que a maioria dos trabalhos utilizavam polímeros. Os sintéticos foram 21% dos trabalhos analisados (Policaprolactona (PCL), hidrogel, Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA), Ácido Poli-láctico (PLA), Polietilenoglicol (PEG), entre outros), os naturais 15% (alginato, matriz extracelular, quitosana, colágeno, heparina, seda e outros) e aqueles que usaram uma combinação de sintéticos e naturais foram 23% (33). A utilização de polímeros como biomateriais teve um grande impacto no avanço da medicina moderna, em especial na regeneração óssea e dentre eles vários estudos utilizam PLA e PEG (38-40). Os biomateriais poliméricos que são biodegradáveis apresentam a vantagem significativa de poderem ser quebrados e removidos após terem cumprido seu papel no implante. A seleção do biomaterial desejado deve atender à demanda funcional, de acordo com propriedades físicas, químicas, biológicas, biomecânicas e de degradação (41).

O PLA é um dos polímeros mais usados na ET por sua alta biocompatibilidade, processabilidade e suas propriedades mecânicas. É um poliéster alifático termoplástico biodegradável que tem sido muito utilizado em *scaffolds* destinados

não só à regeneração óssea, bem como regeneração cartilaginosa, tendínea, neural ou vascular. Este material é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para ter contato direto com fluídos biológicos, seu custo é baixo e pode ser extraído de recursos renováveis (42). Uma propriedade importante do PLA é a razão de cristalinidade, que influencia as características finais de muitos polímeros, incluindo propriedades mecânicas, taxa de degradação, temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão que são importantes para o sucesso do uso em enxertos (42, 43).

O PEG é um polímero cristalino hidrofílico, que é bem conhecido por sua biocompatibilidade e por não ser tóxico e é muito conhecido por modificar o PLA, sendo muitas vezes associado a ele para produção de *scaffolds* (44). Ele pode facilitar o carregamento de drogas de transportadores hidrofóbicos (como o PLA), pois pode ser dissolvido em ambiente aquoso, a sua incorporação pode criar canais para promover a difusão da droga (40).

### **1.5– Scaffolds**

A tradução literal de *scaffold* é “andaime”, o que realmente remete a descrição real de que é uma estrutura artificial usada para apoiar a formação de tecido tridimensional (3D). Eles podem ser utilizados como sistemas acelulares ou como suporte para células e carreador de drogas. Os materiais acelulares devem permitir a colonização adequada das células hospedeiras para fins de regeneração no local da lesão, já os *scaffolds* combinados com diferentes tipos de células devem ser capazes de promover a formação óssea *in vivo*, seja por diferenciação ou pela liberação de moléculas solúveis específicas. Quando preparados com substâncias ou drogas solúveis como antibióticos, agentes quimioterápicos ou fatores de crescimento agem como veículos, entregando essas substâncias no local a ser reparado para que elas exerçam seus efeitos terapêuticos e regenerativos (26).

Um *scaffold* ideal deve permitir ou melhorar a viabilidade celular, fixação, proliferação, diferenciação, vascularização, integração do hospedeiro e suporte de carga. Deve também ser de fácil manuseio, sem procedimentos preparatórios extensos na sala de operação e permitir implantação minimamente invasiva. Deve ser esterilizável por técnicas industriais e sua reprodutibilidade deve ser possível

de se conseguir em larga escala além de ter valor econômico acessível (26, 45). Atualmente a preocupação maior é mimetizar processos naturais do desenvolvimento dos tecidos e promover a remodelação ao invés de simplesmente apoiar a forma e função do tecido final (45). Essas características com toda certeza se aplicam a Engenharia de Tecidos Ósseos (ETO) (figura 2).



**Figura 2 – Propriedades que um scaffold ideal deve ter para ser aplicado com êxito na Engenharia de Tecido Ósseo.** Estão esquematizadas os requisitos biológicos, características estruturais, tecnologias de fabricação e composição de biomateriais. **Requisitos Biológico:** atóxico, biocompatível, bio absorvível, biodegradável, não-imunogênico, Bioativo e “inteligente”. **Características estruturais:** Biomimético, inspirado nos sistemas biológicos, feitos sob medida, adaptados, porosidade elevada e interconectada, propriedades mecânicas e topografia propícias a adaptação e favorecendo os processos biológicos. **Tecnologias de fabricação:** Espuma de gás, fundição por solvente, Secagem por congelamento, *Eletrospinning* e Prototipagem rápida. **Composição:** Cerâmicas, polímeros e compósitos. Na parte inferior do esquema temos os

principais objetivos das aplicações de regeneração óssea por meios de *scaffolds*: Aderência celular, viabilidade celular, *homing* celular, proliferação celular, integração no local do enxerto, suporte de carga, diferenciação osteogênica e crescimento vascular interno. **Figura modificada de Moreno, Amaral (4)**

A tabela 3 mostra algumas das propriedades relacionadas com a remodelação óssea.

**Tabela 3** - Propriedades dos *scaffolds*. Adaptada de Pedrero, Llamas-Sillero (18)

<b>Superfície</b>	Crucial para as interações célula-estrutura, facilitando a vascularização e infiltração de tecido
	A macroporosidade pode promover a osteogênese, facilitando o transporte de células e íons
	A microporosidade melhora a área de superfície para adsorção de proteínas, aumentando a solubilidade iônica e os pontos de fixação para osteoblastos
<b>Tamanho de poro</b>	Poros > 300 $\mu\text{m}$ facilitam a formação de osso novo e vascularização
	Acredita-se que o tamanho do poro de 75-100 $\mu\text{m}$ promova a angiogênese
	A faixa de tamanho de poro de 200 a 500 $\mu\text{m}$ resulta em vascularização de penetração no tecido ideal <i>in vivo</i>
	Maior taxa de deposição óssea e profundidade de infiltração

<b>Interconectividade Pore</b>	O diâmetro ideal de conexões entre os poros varia de 700-1200 $\mu\text{m}$
<b>Topologia de superfície</b>	Superfícies rugosas promovem a osteointegração e favorecem a fixação epitelial
<b>Propriedades mecânicas</b>	O módulo de Young deve ser próximo a 7–30 GPa e uma resistência à tração de 50–151 MPa
	A força compressiva deve ser comparável ao osso cortical (100-230 MPa)
	A taxa de degradação deve corresponder ao crescimento do ECM nativo para garantir o suporte mecânico do andaime

Os polímeros apresentam características físico-químicas reprodutíveis e ajustáveis, como tamanho dos poros, porosidade, solubilidade, biocompatibilidade e resposta imune, e como dito acima são parâmetros importantes. Podem ser usados os naturais ou sintéticos. Os naturais incluem proteínas (tais como colágeno, gelatina, fibrinogênio, elastina, queratina e seda), polissacarídeos (quitosana, alginato, ácido hialurônico e celulose) e polinucleotídeos (DNA, RNA). Já os sintéticos são poliésteres alifáticos como poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (caprolactona) (PCL), fumarato de polipropileno (PPF) e outros (18).

Dentre os sintéticos as nanofibras de PLA tem sido amplamente utilizadas como *scaffolds*, mas apresentam fraca resistência mecânica, o que restringe sua aplicação na regeneração óssea. Essa limitação também pode influenciar as

células que serão utilizadas como suporte para diferenciação. Desta forma, essas nanofibras devem ser reforçadas para permitir sua aplicação em tecidos rígidos (40). O PEG é muito utilizado para associação com PLA para driblar essa característica indesejável, além de ser muito utilizados por sua não toxicidade e natureza hidrofílica. Outro parâmetro que a associação melhora é a hidrofobicidade trazida pelo PLA, com a incorporação do PEG pode-se construir um sistema polimérico anfifílico que é adequado para aplicações de ETO. A hidrofobicidade conferem estabilidade e biodegradação ao polímero, enquanto a hidrofílicidade aumentam a resistência mecânica e ajudam a ajustar a taxa de degradação e viabilizam a associação de drogas a serem dissolvidas em ambiente aquoso difundindo-as na nanofibra (40, 46).

## 1.6 - Sinvastatina

As statinas foram descobertas no ano de 1970, produzidas pelo fungo *Penicillium citrinum*. As primeiras foram a citrinina e a compactina (mesvastatinas). São inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que reduz a biossíntese do colesterol, sendo até hoje base para este tipo de tratamento (47, 48). As primeiras statinas não foram comercializadas, pois apresentaram muitos efeitos colaterais em testes com animais. Depois de um tempo, em 1979, pesquisadores da *Merck* identificaram a lovastatina, também de origem natural (*Aspergillus terreusem*) com menos efeitos colaterais. Logo depois surgiram outros seis tipos que foram inseridas no mercado, a sinvastatina e a pravastatina, que são semi-sintéticas e a fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pivastatina, que são sintéticas (48, 49).

O interesse inicial na prospecção e estudos das statinas são o potencial para tratamento de hipercolesterolemia por acarretar riscos de doença cardíaca. Mas com a sua influência da via bioquímica do mevalonato, que é responsável pela produção de uma variedade de produtos, desconfiou-se dos efeitos pleiotrópicos destes compostos (48). Entre esses efeitos, um que chamou atenção foi a capacidade pró-osteogênica, pois observou-se que a lovastatina pode estimular a produção de importantes fatores de crescimento osteogênico e melhoras em pacientes com osteoporose. Além destes efeitos foram observadas

atividades antiinflamatórias, imunomodulatórias, anti-fungico, anti-viral, antibacteriano e no tratamento de pacientes com sepse (42).

Na ETO existem muitos estudos que focam na entrega de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Entretanto, estas proteínas tem valor elevado, apresentam meia-vida curtae são de difícil associação em veículos biomateriais devido à conformação necessária para a bioatividade (30). Já foi registrado que a sinvastatina, atorvastatina e cerivastatina, aumentam a expressão do mRNA de VEGF em pré- osteoblastos *in vitro* (50). Estudos com camundongos também mostraram o mesmoefeito, mas também descobriu-se que o efeito depende não só do tipo de statina, mas também do tipo celular (48). Outros estudos também descobriram que nem todas as estatinas estimulam a produção de BMP-2, apenas compactina e sinvastatina foram capazes de estimular seu promotor (51).

Mais recentemente, Zhang e colaboradores (2020) mostraram que a sinvastatina pode promover a diferenciação de células-tronco mesenquimais de ratos em osteoblastos, influenciando a via Wnt /  $\beta$ -catenina. Eles isolaram CTM de ratos e cultivaram em meio osteogênico acrescido de sinvastatina. Avaliaram a atividade de ALP, a coloração com vermelho de alizarina, coloração com fosfatase alcalina e expressão gênica específica para osteoblastos. Depois adicionaram antagonistas da via Wnt/  $\beta$ -catenina e repetiram os testes (52). Outro estudo mostrou a influência da sinvastatina na via BMP2/Smad, utilizando modelo de rato ovariectomizados, como modelo para osteoporose. Foram analisados genes relacionados a diferenciação óssea (RUNX2 e Osterix), a atividade de fosfatase alcalina e *Western Blot* para detecção de proteínas relacionadas a via, e concluiu-se o impacto positivo na diferenciação de MSCs (53).

Existem também estudos associando a sinvastatina a biomateriais, como por exemplo a pesquisa feita para desenvolvimento de uma nanofibra de celulose oxidada, que foi acoplada a uma cerâmica de fosfato de cálcio bifásico onde a sinvastatina foi aprisionada, dando origem a um *scaffold* com propriedades osteocondutoras e osteoindutoras. Células MC3T3 foram cultivadas sobre o *scaffold* para avaliação da viabilidade, morfologia e diferenciação óssea. O ensaio mostrou boa proliferação e integração das células, a expressão de proteínas

responsáveis pela diferenciação osteogênica, bem como a fosfatase alcalina e a osteopontina tiveram nível de expressão elevados (54).

Então após todas essas observações, e muitos outros estudos cada vez mais tem-se investigado a influência da sinvastatina associada a biomateriais para diferenciação osteogênica, prospectando assim várias alternativas para uso clínico no reparo de lesões ósseas.

## 1.7 - Referências

1. Zhu L, Luo D, Liu Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *International Journal of Oral Science*. 2020 2020/02/06;12(1):6.
2. Poirier J. *Histologie : les tissus* / J. Poirier, J.-L. Ribadeau Dumas, M. Catala... [et al.]. 2e éd. ed. Paris: Masson; 2002.
3. Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset A-M, Benkirane-Jessel N, et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal of Tissue Engineering*. 2018;9:2041731418776819. PubMed PMID: 29899969.
4. Moreno M, Amaral MH, Lobo JMS, Silva AC. Scaffolds for Bone Regeneration: State of the Art. *Current Pharmaceutical Design*. 2016;22(18):2726-36.
5. Filippi M, Born G, Chaaban M, Scherberich A. Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 2020-May-21;8(474). English.
6. Fikai A, Andronescu E, Voicu G, Fikai D. *Advances in Collagen/Hydroxyapatite Composite Materials*. 2011.
7. Reddy R, Reddy N. Biomimetic approaches for tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2018 2018/09/22;29(14):1667-85.
8. Sahoo NG, Pan YZ, Li L, He CB. Nanocomposites for bone tissue regeneration. *Nanomedicine*. 2013;8(4):639-53. PubMed PMID: 23560413.
9. Guarino V, Gloria A, Raucci M, Santis RD, Ambrosio L. Bio-inspired composite and cell instructive platforms for bone regeneration. *International Materials Reviews*. 2012;57:256 - 75.
10. Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen N-T. Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2020 2020/03/01;5(1):1-9.
11. Chamani S, Liberale L, Mobasheri L, Montecucco F, Al-Rasadi K, Jamialahmadi T, et al. The role of statins in the differentiation and function of bone cells. *European Journal of Clinical Investigation*. 2021;51(7):e13534.

12. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1946-9. PubMed PMID: 10583956. Epub 1999/12/03. eng.
13. Baek KH, Lee WY, Oh KW, Tae HJ, Lee JM, Lee EJ, et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *Journal of Korean medical science*. 2005 Jun;20(3):438-44. PubMed PMID: 15953866. Pubmed Central PMCID: PMC2782200. Epub 2005/06/15. eng.
14. Bilgiç E, Boyacıoğlu Ö, Gizer M, Korkusuz P, Korkusuz F. Chapter 6 - Architecture of bone tissue and its adaptation to pathological conditions. In: Angin S, Şimşek IE, editors. *Comparative Kinesiology of the Human Body*: Academic Press; 2020. p. 71-90.
15. Nikita E. Chapter 1 - The Human Skeleton. In: Nikita E, editor. *Osteoarchaeology*: Academic Press; 2017. p. 1-75.
16. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2009 Jul;20(5):230-6. PubMed PMID: 19546009. Epub 2009/06/24. eng.
17. Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746-. PubMed PMID: 26247020. Epub 07/13. eng.
18. Pedrero SG, Llamas-Sillero P, Serrano-López J. A Multidisciplinary Journey towards Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 2021;14(17):4896. PubMed PMID: 34500986. eng.
19. Peneda Pacheco D, Suárez Vargas N, Visentin S, Petrini P. From tissue engineering to engineering tissues: the role and application of in vitro models. *Biomaterials science*. 2021 Jan 5;9(1):70-83. PubMed PMID: 33191420. Epub 2020/11/17. eng.
20. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg*. 2016;51(1):8-12. PubMed PMID: 26711689. Epub 11/10. eng.
21. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6. PubMed PMID: 8493529. Epub 1993/05/14. eng.
22. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J*

Pediatr Surg. 1988 Jan;23(1 Pt 2):3-9. PubMed PMID: 2895175. Epub 1988/01/01. eng.

23. Sidhu P, Kumar S, Kumar K, Vyas V, Vyas R, Dhillon S, et al. Recent Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. 2020 03/02;26.

24. Sahakyants T, Vacanti JP. Tissue engineering: from the bedside to the bench and back to the bedside. Pediatric Surgery International. 2020 2020/10/01;36(10):1123-33.

25. Vapniarsky N, Arzi B, Hu JC, Nolta JA, Athanasiou KA. Concise Review: Human Dermis as an Autologous Source of Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Stem cells translational medicine. 2015;4(10):1187-98. PubMed PMID: 26253713. Epub 08/07. eng.

26. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. Materials Science and Engineering: C. 2017 2017/09/01;78:1246-62.

27. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. Annual review of chemical and biomolecular engineering. 2011;2:403-30. PubMed PMID: 22432625. Epub 2011/01/01. eng.

28. Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S, Retnasingh S, Pejakić M, Schnettler R, et al. An introduction to bone tissue engineering. The International Journal of Artificial Organs. 2020;43(2):69-86. PubMed PMID: 31544576.

29. Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S, Retnasingh S, Pejakić M, Schnettler R, et al. An introduction to bone tissue engineering. Int J Artif Organs. 2020 Feb;43(2):69-86. PubMed PMID: 31544576. Epub 2019/09/24. eng.

30. Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2020;108(8):1617-33.

31. Cohen J. Biomaterials in orthopedic surgery. American journal of surgery. 1967 Jul;114(1):31-41. PubMed PMID: 5338210. Epub 1967/07/01. eng.

32. Matichescu A, Ardelean LC, Rusu L-C, Craciun D, Bratu EA, Babucea M, et al. Advanced Biomaterials and Techniques for Oral Tissue Engineering and

Regeneration—A Review. *Materials*. 2020;13(22):5303. PubMed PMID: doi:10.3390/ma13225303.

33. Alonso-Goulart V, Carvalho LN, Marinho ALG, de Oliveira Souza BL, de Aquino Pinto Palis G, Lage HGD, et al. Biomaterials and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine: A Systematic Review. *Materials*. 2021;14(16):4641. PubMed PMID: doi:10.3390/ma14164641.

34. Jakubinek MB, Samarasekera CJ, White MA. Elephant ivory: A low thermal conductivity, high strength nanocomposite. *Journal of Materials Research*. 2006 2006/01/01;21(1):287-2.

35. Choyke A. Bronze Age Bone and Antler Working at the Jászdózsza-Kápolnahalom Tell. 2005. p. 129-56.

36. Karthikeyan R, Srinivasan B, Sehgal P. Industrial applications of keratins—A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2007 10/01;66:710-5.

37. Vasconcelos A, Cavaco-Paulo A. The use of keratin in biomedical applications. *Current drug targets*. 2013 May 1;14(5):612-9. PubMed PMID: 23410124. Epub 2013/02/16. eng.

38. Li X, Wang Y, Wang Z, Qi Y, Li L, Zhang P, et al. Composite PLA/PEG/nHA/Dexamethasone Scaffold Prepared by 3D Printing for Bone Regeneration. *Macromolecular bioscience*. 2018 Jun;18(6):e1800068. PubMed PMID: 29687630. Epub 2018/04/25. eng.

39. Kaito T, Myoui A, Takaoka K, Saito N, Nishikawa M, Tamai N, et al. Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA–PEG/hydroxyapatite composite. *Biomaterials*. 2005 2005/01/01;26(1):73-9.

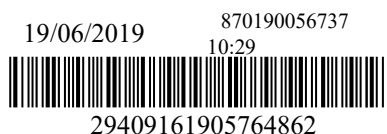
40. Wang S-F, Wu Y-C, Cheng Y-C, Hu W-W. The Development of Polylactic Acid/Multi-Wall Carbon Nanotubes/Polyethylene Glycol Scaffolds for Bone Tissue Regeneration Application. *Polymers*. 2021;13(11):1740. PubMed PMID: doi:10.3390/polym13111740.

41. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys*. 2011;49(12):832-64. PubMed PMID: 21769165. eng.

42. Donate R, Monzón M, Alemán-Domínguez ME. Additive manufacturing of PLA-based scaffolds intended for bone regeneration and strategies to improve their biological properties. *e-Polymers*. 2020;20(1):571-99.
43. Farah S, Anderson DG, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016 2016/12/15/;107:367-92.
44. Chen B-Y, Jing X, Mi H-Y, Zhao H, Zhang W-H, Peng X-F, et al. Fabrication of polylactic acid/polyethylene glycol (PLA/PEG) porous scaffold by supercritical CO<sub>2</sub> foaming and particle leaching. *Polymer Engineering & Science*. 2015;55(6):1339-48.
45. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363-408. PubMed PMID: 23339648. eng.
46. Wang J-Z, You M-L, Ding Z-Q, Ye W-B. A review of emerging bone tissue engineering via PEG conjugated biodegradable amphiphilic copolymers. *Materials Science and Engineering: C*. 2019 2019/04/01/;97:1021-35.
47. Qiao LJ, Kang KL, Heo JS. Simvastatin promotes osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells via canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Mol Cells*. 2011;32(5):437-44. PubMed PMID: 22058016. Epub 11/01. eng.
48. Shah SR, Werlang CA, Kasper FK, Mikos AG. Novel applications of statins for bone regeneration. *Natl Sci Rev*. 2015;2(1):85-99. PubMed PMID: 26543666. Epub 08/16. eng.
49. Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2010;86(5):484-93. PubMed PMID: 20467214. eng.
50. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology*. 2003 Feb;144(2):681-92. PubMed PMID: 12538631. Epub 2003/01/23. eng.
51. Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000 May 19;271(3):688-92. PubMed PMID: 10814523. Epub 2000/05/18. eng.

52. Zhang M, Bian YQ, Tao HM, Yang XF, Mu WD. Simvastatin induces osteogenic differentiation of MSCs via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway to promote fracture healing. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2018 May;22(9):2896-905. PubMed PMID: 29771446. Epub 2018/05/18. eng.
53. Feng C, Xiao L, Yu JC, Li DY, Tang TY, Liao W, et al. Simvastatin promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in rat model of osteoporosis through BMP-2/Smads signaling pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2020 Jan;24(1):434-43. PubMed PMID: 31957858. Epub 2020/01/21. eng.
54. Faruq O, Sayed S, Kim B, Im SB, Lee BT. A biphasic calcium phosphate ceramic scaffold loaded with oxidized cellulose nanofiber-gelatin hydrogel with immobilized simvastatin drug for osteogenic differentiation. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2020 May;108(4):1229-38. PubMed PMID: 31410989. Epub 2019/08/15. eng.

# Capítulo 2 – Patente: “COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA CONTENDO AGENTE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA”



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

**Número do Processo:** BR 10 2019 012701 5

## **Dados do Depositante (71)**

---

**Depositante 1 de 2**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DA

PARAIBA **Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 24098477000110

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino

Pesquisa **Endereço:** Cidade

Universitária

**Cidade:** João

Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58059-900

**País:** Brasil

**Telefone:** (83)

32167558

**Fax:**

**Email:** [inova@reitoria.ufpb.br](mailto:inova@reitoria.ufpb.br)

## Depositante 2 de 2

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 25648387000118

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila, Nº 2121, Bloco 3P, Bairro Santa Mônica.

**Cidade:** Uberlândia

**Estado:** MG

**CEP:** 38400-902

**País:** BRASIL

**Telefone:** (34) 323 94977 **Fax:**

**Email:** rita.lima@ufu.br

## Dados do Pedido

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA CONTENDO AGENTE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

**Resumo:** A presente invenção trata de uma composição e processo de um dispositivo polimérico contendo agente(s) osteoindutivo(s) e osteocondutor(es) para o tratamento de fraturas ósseas para a engenharia de tecidos. Tal dispositivo é constituído por blendas poliméricas ao qual se atribuem características mecânicas, estruturais e hidrofóbicas/hidrofílicas apropriadas para a interação fluídica biológica. A invenção tem o objetivo de promover a cicatrização de fraturas através da formação óssea, potencializando a atividade osteoblástica, por conter sinalizadores celulares para estimulação, formação e regeneração tecidual óssea.

**Figura a publicar:** 2

## Dados do Inventor (72)

---

### Inventor 1 de 8

**Nome:** KALINE DO NASCIMENTO FERREIRA

**CPF:** 09252232478

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Mathias Sifrônio de Oliveira, n° 72.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58075-690

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 998 677592 **Fax:**

**Email:** kaline\_kaline2@hotmail.com

### Inventor 2 de 8

**Nome:** ELITON SOUTO DE MEDEIROS

**CPF:** 02381705430

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior **Endereço:** Rua

Aderbal Maia Paiva, N° 600.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58051-900

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 998 677592 **Fax:**

**Email:** elitonsdemedeiros@gmail.com

### Inventor 3 de 8

**Nome:** LÚCIO ROBERTO CANÇADO CASTELLANO

**CPF:** 01333940696

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Débora da Silva Braga, Nº 75, Apto. 302, Edf. Tívoli.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58036-843

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 999 937692 **Fax:**

**Email:** luciocastellano@gmail.com

**Inventor 4 de 8**

**Nome:** LUIZ RICARDO GOULART FILHO

**CPF:** 44214570600

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior **Endereço:** Rua

Santa Catarina, Nº 850, Apto. 303.

**Cidade:** Uberlândia

**Estado:** MG

**CEP:** 38400-652

**País:** BRASIL

**Telefone:** (34) 919 26961 **Fax:**

**Email:** lrgoulart@ufu.br

**Inventor 5 de 8**

**Nome:** LETÍCIA DE SOUZA CASTRO FILICE

**CPF:** 55644570134

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Abrão Calil, Nº 111.

**Cidade:** Uberlândia

**Estado:** MG

**CEP:** 38408-444

**País:** BRASIL

**Telefone:** (34) 919 84006 **Fax:**

**Email:** leticiafilice@gmail.com

**Inventor 6 de 8**

**Nome:** LORRAINE BRAGA FERREIRA

**CPF:** 07016317676

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** Rua Krausenstrasse, Nº 28, Mitte, 10117.

**Cidade:** Berlim

**Estado:**

**CEP:**

**País:** ALEMANHA

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:** lorraine.braga@gmail.com

**Inventor 7 de 8**

**Nome:** VIVIAN ALONSO GOULART

**CPF:** 60750413115

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Cirineu Menezes, Nº 156, Vigilato Pereira.

**Cidade:** Uberlândia

**Estado:** MG

**CEP:** 38408-614

**País:** BRASIL

**Telefone:** (34) 996 406010 **Fax:**

**Email:** vivialonso@hotmail.com

#### Inventor 8 de 8

**Nome:** ISABELA LEMOS DE LIMA

**CPF:** 03793204103

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Armando Tucci, Nº 700.

**Cidade:** Uberlândia

**Estado:** MG

**CEP:** 38408-256

**País:** BRASIL

**Telefone:** (34) 988 185861 **Fax:**

**Email:** isabela.lemosl@hotmail.com

#### Documentos anexados

---

<b>Tipo Anexo</b>	<b>Nome</b>
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante_da_patente.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio_descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacoes.pdf
Desenho	03_Desenhos.pdf
Resumo	04_Resumo.pdf

## **Acesso ao Patrimônio Genético**

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

## **Declaração de veracidade**

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

## “COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA CONTENDO AGENTE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA”

[01] A presente invenção trata de um implante artificial regenerativo manométrico por meio de uma composição e processo de produção de sistemas de liberação controlada contendo sinvastatina com aplicação na área de engenharia de biomateriais ou biotécidos medicinais, contendo ingredientes ativos orgânicos e polímeros sintéticos biocompatíveis e biorreabsorvíveis, caracterizados por formas físicas especiais visando comportar agentes osteoindutores e/ou osteocondutores utilizados como sinalizadores celulares para a formação, crescimento e regeneração tecidual em fraturas ósseas.

[02] Biomateriais são materiais que podem ser implantados para substituir ou reparar tecidos em falta. Durante anos, os biomateriais foram criados de modo que permanecessem inertes no organismo, com a finalidade de evitar e prevenir as respostas teciduais indesejáveis. Entretanto, na atualidade estão sendo desenvolvidos de forma que possuam interação efetiva, estimulando respostas fisiológicas como crescimento e/ou diferenciação celular no sítio de implantação.

[03] Problemas degenerativos, inflamatórios e defeitos ósseos afetam milhares de pessoas em todo o mundo. Relacionados muitas vezes com a incidência de sucessivas perdas ósseas, como por exemplo, a osteoporose. Estes problemas ocorrem devido às alterações no processo de remodelação óssea, nas quais há um aumento da reabsorção e diminuição da formação do tecido ósseo. Tais disfunções levam a redução da qualidade de vida do indivíduo, tornando assim, a criação de dispositivos para a regeneração de regiões danificadas um objetivo.

[04] O uso de agentes osteoindutores e/ou osteocondutores correlacionados a um biomaterial polimérico nanométrico/micrométrico propicia a restituição do tecido ósseo,

podendo aumentar efetivamente os processos básicos que regulam a sua reparação, garantindo uma estrutura física, características mecânicas e hidrofílicas apropriadas para a interação fluídica biológica.

[05] As estatinas são agentes hipolipemiantes, atuantes como inibidores competitivos da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) redutase. A partir do bloqueio da transformação de HMG-CoA em ácido mevalônico ocorre o aumento da síntese dos receptores da lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoproteins*) LDL, ocasionando a redução da concentração do colesterol em níveis plasmáticos. Estudos mostram que as estatinas não só promovem a diminuição de LDL-colesterol, como possuem efeito pleiotrópico na estimulação de formação tecidual e consequente aumento da densidade óssea, através da indução da expressão da proteína morfogenética óssea (BMP)-2.

[06] Os efeitos pleiotrópicos benéficos no metabolismo ósseo, incluindo, consolidação de fraturas ao lado da sua capacidade de reduzir doenças cardiovasculares vem sendo estudado desde 1999, comprovando a eficácia das estatinas para a promoção óssea. Mundy e colaboradores iniciaram os estudos através da comprovação da estimulação do aumento da densidade óssea a partir do uso das estatinas, *in vitro* e em roedores, reforçando a diferenciação osteoblástica.

[07] O desenvolvimento de biomateriais como as mantas não tecidas vem ganhando atenção e grande interesse em aspectos relacionados à liberação de fármacos e como suporte para a regeneração tecidual, por formarem arcabouços celulares com porosidades. Com essas particularidades, as células encontram um ambiente tridimensional repleto de conjuntos de informações análogas ao tecido original. Em especial, as mantas produzidas pela técnica de *Solution Blow Spinning*

(SBS) ou fiação por sopro em solução, são constituídas por fibras de diâmetros pequenos, vantajosas por possuírem uma grande área superficial por unidade de volume, flexíveis, porosas e capazes de misturar e dispersar outros materiais em sua estrutura.

[08] Moduladores e direcionadores poliméricos de fármacos em sítios específicos no organismo tendem a ser influenciados pelo caráter hidrofílico/hidrofóbico do sistema. A interação polímero-célula é aperfeiçoada através da proporção adequada entre a hidrofiliicidade/hidrofobicidade, facilitando inicialmente a resposta fisiológica tecidual por liberar rapidamente o princípio ativo, dando início assim, ao processo regenerativo.

[09] Atualmente, técnicas foram patenteadas ou referenciadas na literatura utilizando os seguintes sistemas, métodos de preparo e compostos, como descritos a seguir:

[10] A patente CN104587470 (A) reivindica uma composição farmacêutica que compreende o uso de estatinas e cetorolaco de trometamina para promover apenas a promoção da cicatrização óssea após a cirurgia de fratura osteoporótica. A reivindicação se limita a preparação oral, incluindo comprimidos, cápsulas, grânulos, suspensão seca e solução oral.

[11] A patente CN105726532 (A) reivindica em particular uma composição de sinvastatina e 5-bromo-4-trifluorometilindazol e a sua utilização na preparação de um medicamento para promover a formação e transformação óssea, de modo a atingir o objetivo no tratamento de fraturas osteoporóticas. A composição farmacêutica restringe ao uso oral através da produção de comprimidos, cápsula ou grânulo.

[12] A patente CN103768653 (A) reivindica um implante artificial regenerativo e um método de preparação a base de titânio ou liga de titânio, com superfície revestida através do método de tratamento biomimético, modificado com sinvastatina e nanogrãos cobertos com

cálcio e hidroxiapatita. A patente limita o uso da estatina apenas como revestimento para promover a formação óssea com efeitos terapêuticos para a osteoporose, porém, não menciona a cinética de liberação do fármaco.

[13] A patente US2005112349 reivindica nanofibras formadas por polímeros não degradáveis ou degradáveis com polímeros orgânicos, inorgânicos/organometálicos, bem como nanofibras compostas com hidroxiapatitas, uteis para aplicações médicas, andaimes para engenharia de tecidos, sistemas de administração de fármacos controlados, entre outros. A patente detém desvantagens, pois o SBS produz fibras em forma 3d mais facilmente, facilitando assim a formação de arcabouços tridimensionais, enquanto que a que a técnica *electrospinning* usada na patente, possui a capacidade de produzir poucas fibras, a utilização de altas voltagens que limita o uso de vários solventes, dificultando assim, a produção em escala industrial.

[14] A patente US2012310366 (A1) reivindica métodos e composições para estimular o crescimento ósseo com o uso de estatinas. Diante as reivindicações do pedido, se limita por não mencionar a produção de nanofibras através do método SBS, que é excelente para a produção em escala industrial comparada com os demais métodos.

[15] Sabe-se que o funcionamento destas formulações e métodos para liberação de fármacos exige uma concentração farmacológica considerada alta, quando se trata de dosagens sistêmicas, assim como métodos demorados de produção quando se trata da produção das nanofibras por técnica de *electrospinning*, inconvenientes sanados pelo método aqui proposto.

[16] Com o intuito de solucionar tais problemas, a composição e método de produção de sistemas de liberação controlada micro e nanofibrosos com estatinas para regeneração óssea guiada foi desenvolvida a presente invenção, com o benefício de trazer melhorias e

vantagens na biodisponibilidade da droga, na sua absorção, na manutenção da concentração do fármaco dentro da janela terapêutica e na redução dos efeitos colaterais do tratamento em comparação com os métodos administrativos comerciais, como também na ausência da necessidade de remoção do dispositivo no organismo, pois os materiais constituintes são biorreabsorvíveis.

[17] O produto do presente invento foi obtido por *Solution Blow Spinning* (SBS), empregando sinvastatina e a associação de polímeros hidrofóbicos e polímeros hidrofílicos, poli(ácido lático), PLA, e poli(etileno glicol), PEG, em concentrações capazes de influenciar na taxa de degradação da fibra, na cinética de liberação de drogas e em seus efeitos associados. Na invenção, o implante com atividade regenerativa contendo sinvastatina é utilizado para promover a formação do tecido ósseo, indicadas assim para o tratamento de fraturas.

[18] Corroborando com as particularidades dessa invenção, um dos objetivos da composição e método do sistema de administração desenvolvido é melhorar a biodisponibilidade do fármaco no local da fratura óssea (por exemplo, fratura, vazios por perda óssea, etc.), sustentando sua concentração e a neoformação do tecido no local do implante, reduzindo o tempo da reconstituição, possuindo baixa sensibilidade a interferências, assim como, resolver os problemas atrelados às dosagens sistêmicas.

[19] A obtenção dos dispositivos micro e nanofibrosos basearam-se em uma solução contendo blendas poliméricas de um polímero hidrofóbico, o PLA, e um polímero hidrofílico, o PEG, com a sinvastatina nas concentrações de 2,5% a 7,5%. Produzidos através do SBS com bicos concêntricos, mas não limitados a essa configuração, ao qual as soluções foram injetadas através do bico interno a uma taxa fixa entre 50 e 200 uL/mim. Ao mesmo tempo, um sistema de gás comprimido (armazenado em cilindro ou produzido num compressor) injeta por esta

mesma matriz o gás (com pressão de 20 a 80 psi) por meio do bico externo, que se encarrega de arrastar as soluções das blendas poliméricas (100/0 – 0/100% m/v ou v/v) e a solução de sinvastatina e/ou associações (2,5-7,5% m/m) e transformá-las em fibras que são ejetadas em direção ao coletor.

[20] A formação das estruturas fibrosas pelo SBS ocorre quando a tensão superficial gerada pela solução polimérica é superada pelas forças aerodinâmicas provenientes do gás pressurizado, em seguida a solução polimérica é lançada ao coletor com velocidade de rotação controlável. Durante o processo o solvente evapora e mantas não tecidas são formadas em escalas micro ou nanométrica, dependendo das condições experimentais estabelecidas.

[21] Os dispositivos desta solicitação asseguram o controle temporal e espacial da concentração do agente osteoindutivo, osteocondutor, de forma a aperfeiçoar a administração e a ação terapêutica enquanto estimula a expressão da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), melhorando a densidade óssea.

[22] À medida que a proporção dos polímeros hidrofílicos é modificada, pois, dependendo da massa molar, podendo ser encontrado no estado líquido ou sólido em temperatura ambiente, ocorre alteração das dimensões nanoestruturais, melhorando a adesão das células ósseas, assim como as condições do processo do SBS, resultando com as alterações dimensionais a redução do ângulo de contato dispositivo- fluido corporal, promovendo o controle da cinética de liberação, dessa forma, otimizando a promoção da regeneração óssea guiada.

[23] O processo de preparação dos implantes manométricos regenerativos e indutivos ósseos compreende os seguintes passos: a) proporções de 90/10, 80/20 e 70/30 de PLA e PEG foram solubilizadas em cloroformio:acetona (3:1) até a completa solubilização polimérica; b) em seguida, 2,5% a 7,5% de sinvastatina foi adicionado na solução

polimérica até a sua completa solubilização; c) as soluções foram colocadas em seringas e ejetadas através de bicos concêntricos do SBS e estiradas por intermédio de forças aerodinâmicas do gás pressurizado.

[24] A invenção poderá ser melhor compreendida através da seguinte descrição detalhada, em consonância com as figuras em anexo, onde:

[25] A **FIGURA 1** exibe a micrografia eletrônica da estrutura micro e nanofibrilar do material médico para implantes locais indutivos e regenerativos com sinvastatina, constatando as dimensões do dispositivo.

[26] A **FIGURA 2** apresenta a micrografia eletrônica e o difratograma de raios-X da invenção em questão, após 7 dias com mantas imersas em fluido corporal simulado (SBF), indicando o surgimento de elementos referentes à deposição de hidroxiapatita à estrutura micro e nanofibrilar.

[27] A **FIGURA 3** evidencia os gráficos da Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), permitindo identificar as frequências de absorções dos grupos funcionais característicos dos materiais constituintes e dos dispositivos.

[28] A **FIGURA 4** apresenta as curvas térmicas obtidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC), com o objetivo de avaliar o processamento dos materiais produzidos para a reivindicação em questão.

[29] A **FIGURA 5** sumarizam as análises de termogravimetria (TGA) através dos gráficos de perda de massa e derivadas das perdas de massas dos materiais constituintes e dos dispositivos promotores e indutivos da regeneração óssea, evidenciando seus comportamentos térmicos até a degradação.

[30] A **FIGURA 6** exibe os gráficos referentes às propriedades cristalográficas dos materiais constituintes, através dos difratogramas de raios-X (DRX).

[31] A **FIGURA 7** apresenta a relação entre o ângulo de contato e o acréscimo da concentração do polímero hidrofílico, com as imagens das gotas depositadas durante a análise.

[32] A **FIGURA 8** evidencia os perfis de liberação da sinvastatina em função do tempo, proporcionado pelas blendas poliméricas com diferentes concentrações para fins comparativos das cinéticas de liberação. Os materiais sinvastatina foram colocados em 15 mL de uma solução de Tampão fosfato-salino (PBS), a 37°C e as absorvâncias foram lidas em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 238 nm. A concentração do fármaco foi calculada nas diversas proporções de materiais, como demonstrado, a sinvastatina foi liberada até 21 dias de forma gradual, estável e eficaz.

[33] As **FIGURAS 9 e 10** apresentam as micrografias eletrônicas de varreduras das mantas poliméricas com regiões mineralizadas após o tratamento com células osteoblásticas, 7 e 14 dias respectivamente. Demonstrando assim, que os implantes carregados com sinvastatina caracterizam como um novo dispositivo médico apto para a formação óssea com atividade regenerativa em fraturas.

[34] Estruturas micro e nanofibrilares exibem alta flexibilidade e elasticidade, garantindo uma grande facilidade de manipulação, podendo ser usadas em diversas finalidades sem se limitar a formas de uso convencionais e restritivas.

[35] Embora a versão preferida tenha sido descrita, não há intenção de limitar a presente invenção às formas de realização e exemplares particulares. A área de aplicação da invenção engloba todas as modificações, equivalentes ou alterações feitas dentro do âmbito de utilidade da regeneração do tecido ósseo.

## REIVINDICAÇÕES

**1. “Composição e processo de produção de sistemas de liberação controlada contendo agente para regeneração óssea guiada” caracterizado pelas** seguintes etapas: a) as proporções de 90/10, 80/20 e 70/30 de PLA e PEG serem solubilizadas em clorofórmio:acetona (3:1) até a completa solubilização polimérica; b) em seguida, uma proporção do(s) agente(s) osteoindutivo(s) e osteocontudor(es) ser adicionada na solução polimérica até a sua completa solubilização; e c) as soluções serem colocadas em seringas e ejetadas através de bicos do *Solution Blow Spinning* (SBS) e estiradas por intermédio de forças aerodinâmicas do gás pressurizado.

**2. “Composição e processo de produção de sistemas de liberação controlada contendo agente para regeneração óssea guiada”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** obtenção dos dispositivos micro e nanofibrosos basearem-se em uma solução contendo blendas poliméricas de um polímero hidrofóbico, o PLA, e um polímero hidrofílico, o PEG, com o(s) agente(s) osteoindutivo(s) e osteocontudor(es) nas concentrações de 2,5% a 7,5% a ser(em) adicionado(s), conforme a etapa b.

**3. “Composição e processo de produção de sistemas de liberação controlada contendo agente para regeneração óssea guiada”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** produção, tratada na etapa c, adotar o método de SBS, preferencialmente com bicos concêntricos, a qual as soluções são injetadas através do bico interno a uma taxa entre 50 e 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  e, simultaneamente, por meio de bico externo, ocorrer o arrasto, por sistema de gás comprimido, com pressão entre 20 a 80 psi, das blendas poliméricas, entre 100/0 e 0/100% m/v ou v/v, e da solução de agente(s) osteoindutivo(s) e osteocontudor(es) e/ou das associações, entre 2,5 e 7,5% m/m, para transformá-las em fibras.

**4. “Composição e processo de produção de sistemas de liberação controlada contendo agente para regeneração óssea guiada” caracterizado pela** composição ser constituída por manta micro e nanofibrilar contendo material biorreabsorvível, biocompatível, hidrofílico, hidrofóbico e contendo agente(s) osteoindutivo(s) e osteocondutor(es).

**5. “Composição e processo de produção de sistemas de liberação controlada contendo agente para regeneração óssea guiada”,** de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pela** composição ser preferivelmente de origem sintética e ser capaz de sofrer degradação por meio de processos hidrolíticos e/ou enzimáticos.

**6. “Composição e processo de produção de sistemas de liberação controlada contendo agente para regeneração óssea guiada”,** de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo(s)** agente(s) osteoindutivo(s) e osteocondutor(es) ser escolhido do grupo que consiste em hipolipemiante e anti-inflamatórios da classe das estatinas e ser, preferivelmente, a sinvastatina.

**7. “Composição e processo de produção de sistemas de liberação controlada contendo agente para regeneração óssea guiada”,** de acordo com as reivindicações 4 e 6, **caracterizado pelo(s)** agente(s) osteoindutivo(s) e osteocondutor(es) permitirem o tratamento local do tecido ósseo lesionado com a liberação ser modelada de acordo com a massa molecular polimérica utilizada e pela necessidade por meio do controle da concentração e composição das fibras constituintes do implante.

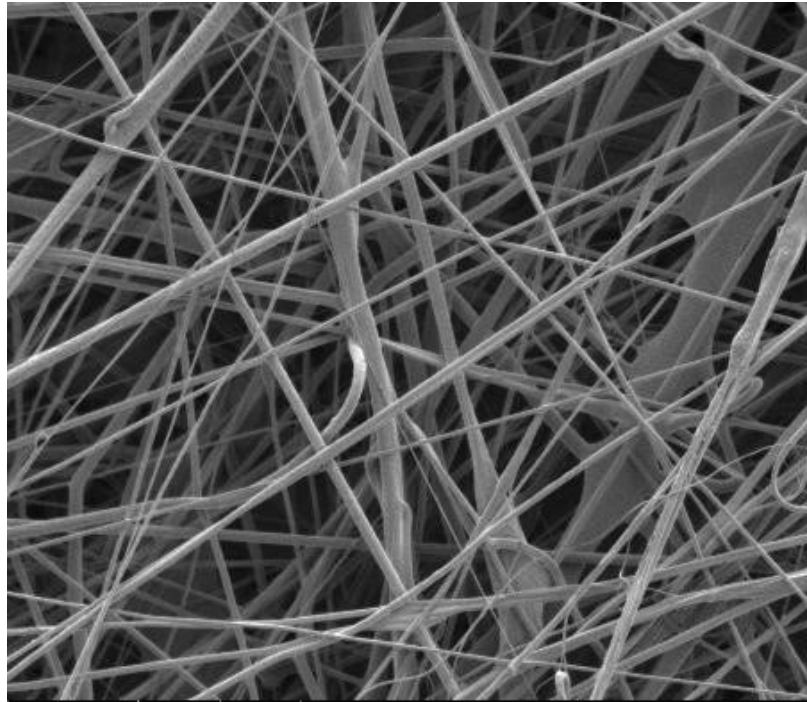


Figura 1

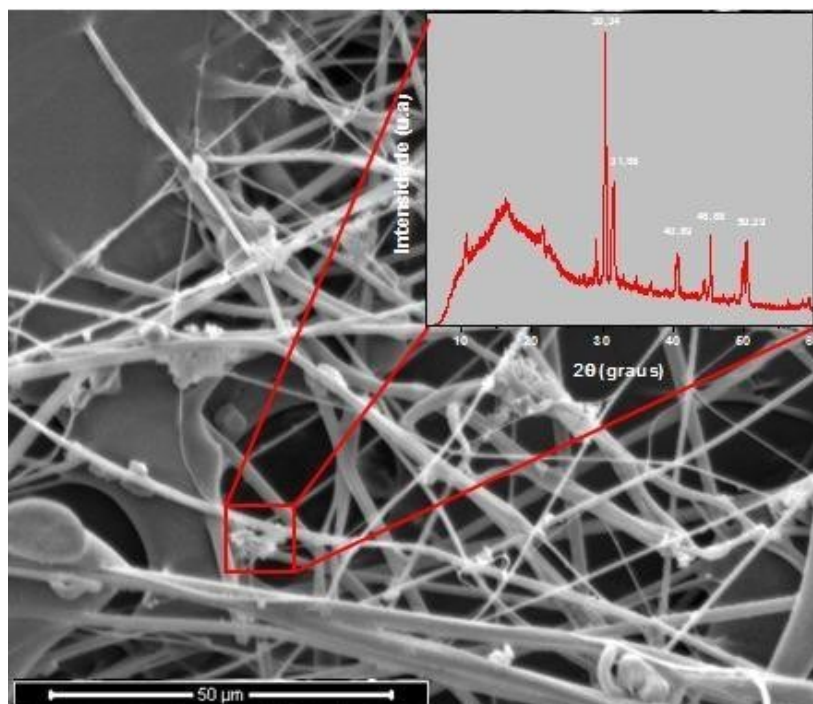


Figura 2

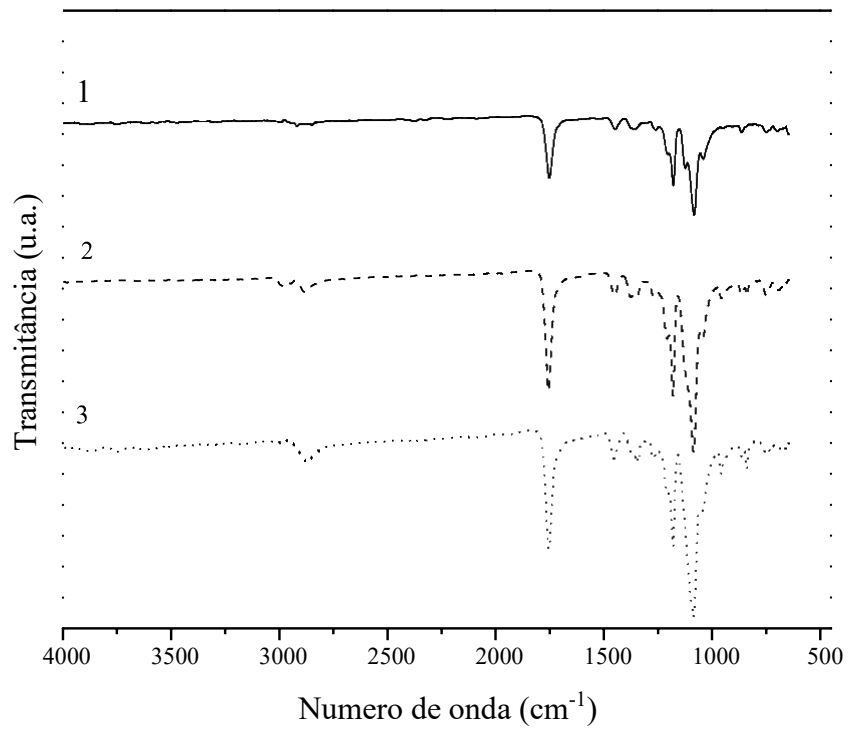


Figura 3

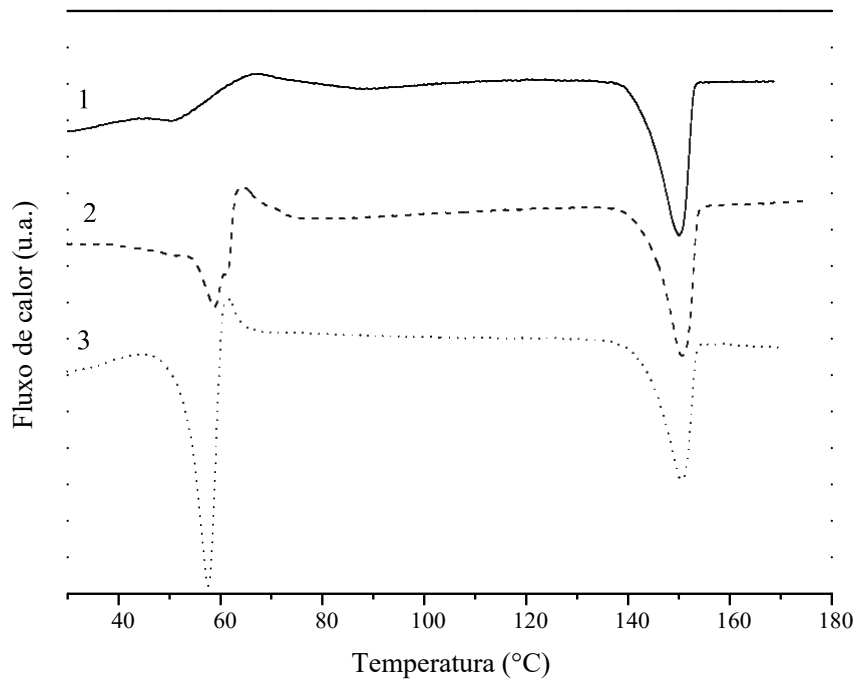


Figura 4

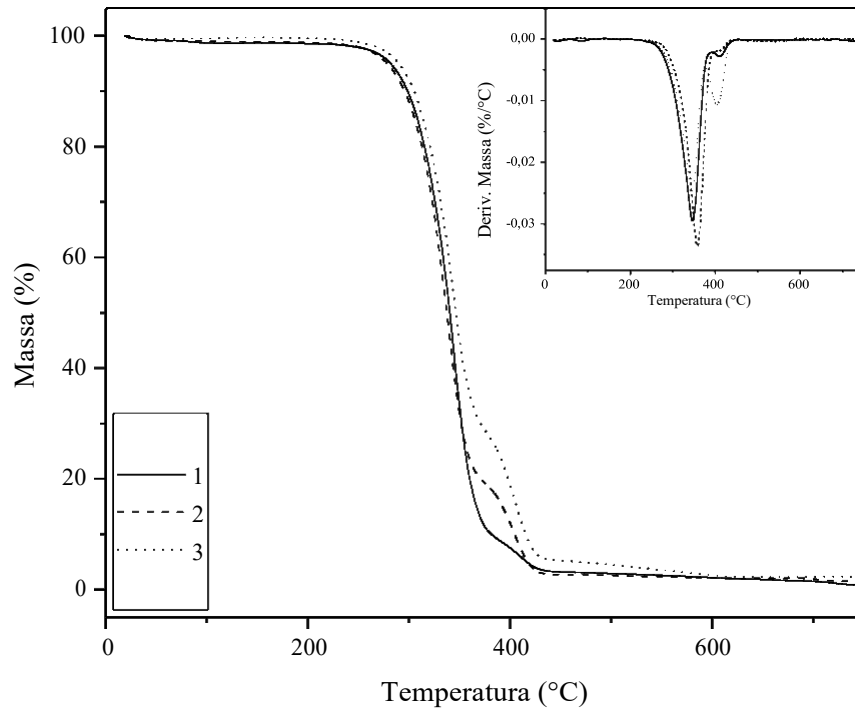


Figura 5

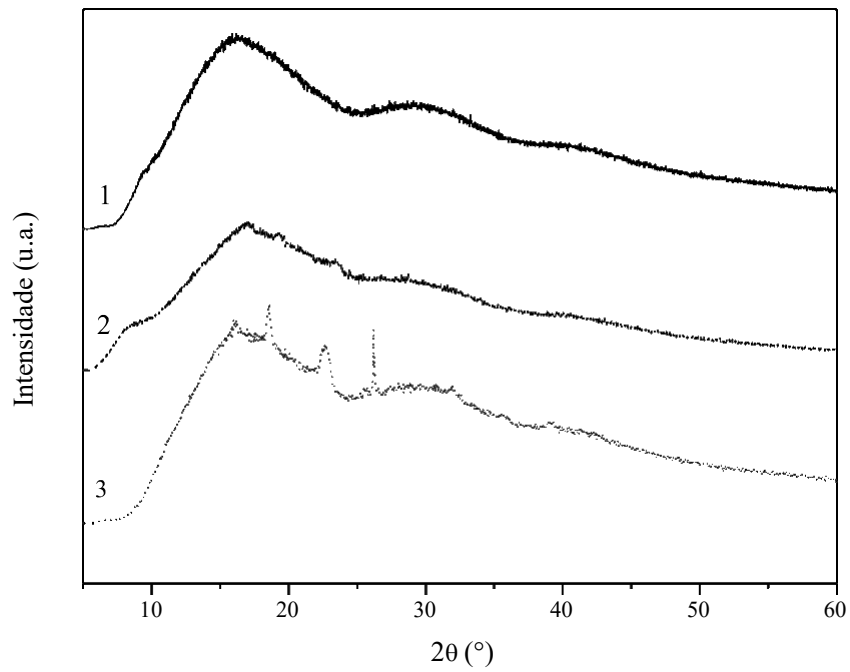


Figura 6

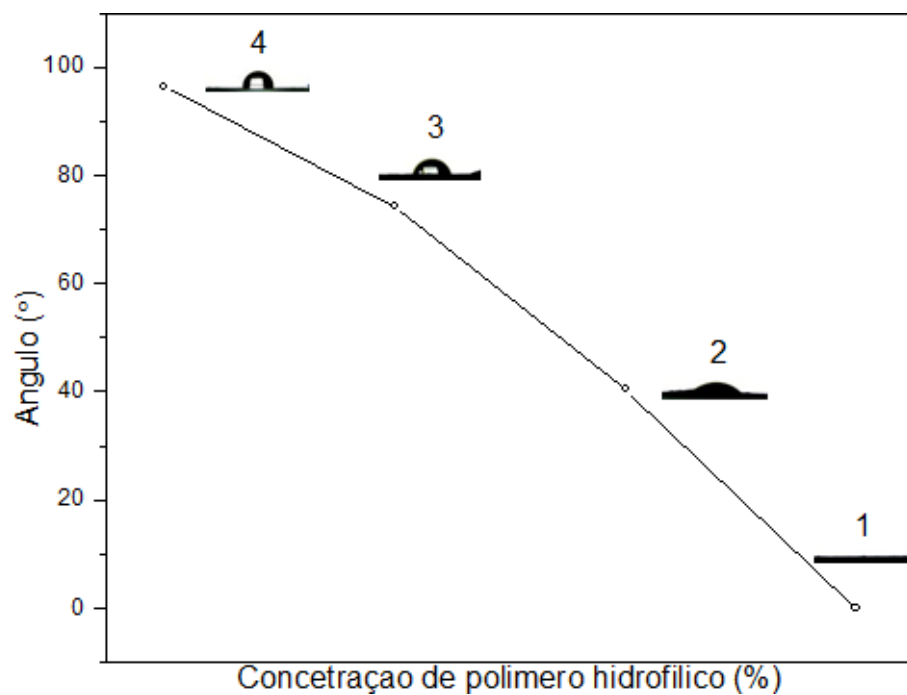


Figura 7

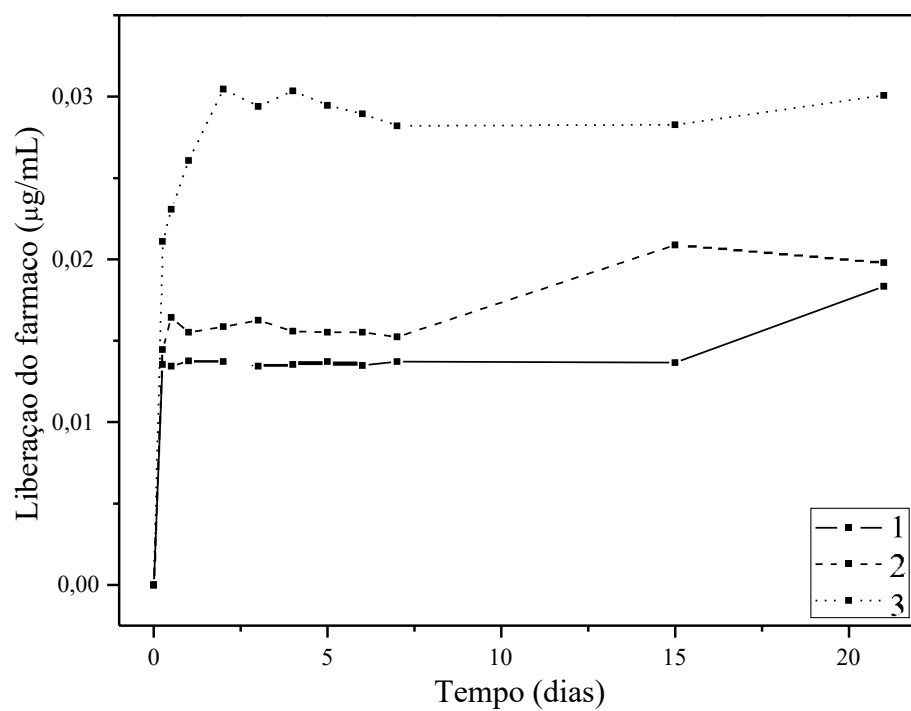


Figura 8

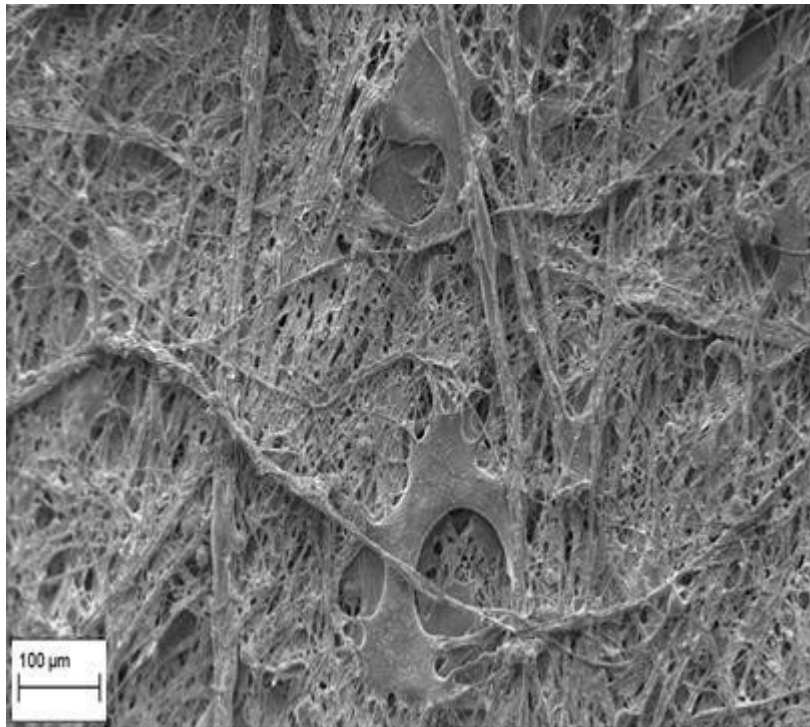


Figura 9

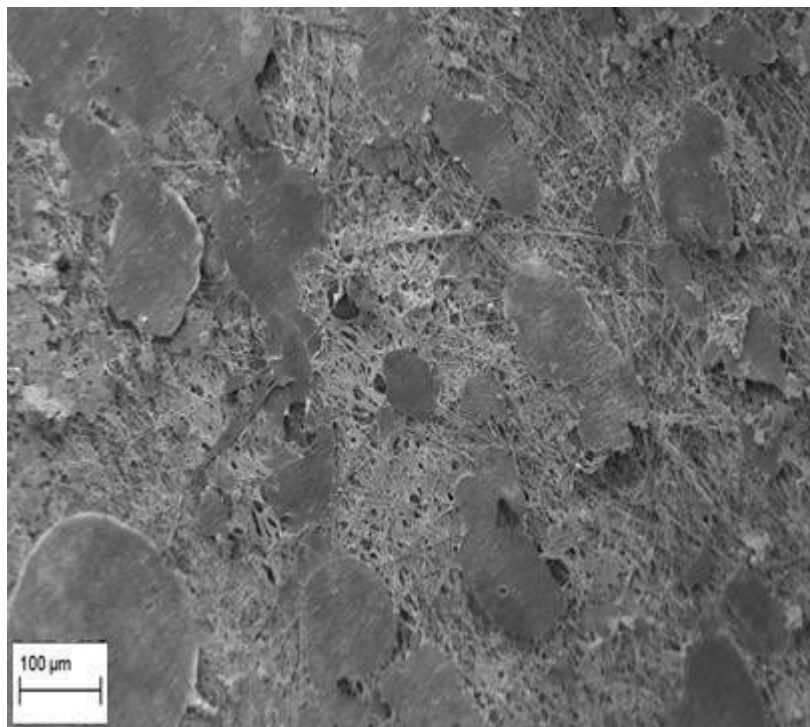


Figura 10

## RESUMO

**“COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA CONTENDO AGENTE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA”**

A presente invenção trata de uma composição e processo de um dispositivo polimérico contendo agente(s) osteoindutivo(s) e osteocondutor(es) para o tratamento de fraturas ósseas para a engenharia de tecidos. Tal dispositivo é constituído por blendas poliméricas ao qual se atribuem características mecânicas, estruturais e hidrofóbicas/hidrofílicas apropriadas para a interação fluídica biológica. A invenção tem o objetivo de promover a cicatrização de fraturas através da formação óssea, potencializando a atividade osteoblástica, por conter sinalizadores celulares para estimulação, formação e regeneração tecidual óssea.

# PARTE II:

Kit, Método de PCR Multiplex *one-tube* e Oligonucleotídeos com e sem marcação fluorescente: uso individual e/ou combinado para o diagnóstico diferencial de 22 síndromes respiratórias humanas

## Capítulo 3 – Fundamentação Teórica

### 3.1 – Introdução

Em 30 de janeiro de 2020 a Organização Mundial da saúde declarou emergência de saúde mundial devido ao crescente número de casos pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) (1, 2). O novo coronavírus pertence ao grupo beta, junto com Síndrome Respiratória do Oriente Médio (do Inglês, MERS-CoV) e Síndrome Respiratória Aguda Grave (do Inglês, SARS-CoV) (3, 4). A COVID-19 já levou mais de 4.814.651 pessoas no mundo a óbito até outubro de 2021, por isso é fundamental o diagnóstico rápido e eficaz para direcionar o tratamento e o controle da doença. Além disso, uma metodologia diagnóstica capaz de diferenciar SARS-CoV-2 de outras infecções respiratórias agudas (IRAs), pode conduzir a escolha da terapia individual mais adequada e prevenir a disseminação de infecções hospitalares secundárias (5-7).

A transmissão de SARS-CoV-2 e de IRAs acontece por meio da exposição à fluidos corporais infecciosos, através do contato direto ou indireto com mucosas (8, 9). A principal porta de entrada pode ocorrer através dos olhos, nariz e boca ou através de gotículas respiratórias da tosse ou espirro (10). Os sintomas também são parecidos: tosse, febre, congestão, nasal, fadiga e outros sinais de infecção do trato respiratório superior (11, 12) e para SARS-CoV-2, 75% dos pacientes sintomáticos, podem ainda evoluir para doença grave culminando em dispnéia e pneumonia (13, 14). Os pacientes podem desenvolver IRAs, sendo necessário o uso de suporte respiratório, incluindo terapias com o uso de oxigênio, como ventilação não invasiva e ventilação mecânica invasiva (3, 4).

Foi demonstrado que desde que a COVID-19 chegou ao Brasil houve um aumento da frequência de notificação de outros tipos de infecções respiratórias agudas, e principalmente aumento dos vírus respiratórios Influenza A e B, Parainfluenza (tipos 1, 2, 3 e 4), vírus sincicial respiratório (VSR) e Adenovírus. Isso reforça a necessidade de identificação dos diferentes vírus respiratórios no Brasil e no mundo e ainda temos outros vírus causadores de doenças respiratórias, como: Bocavírus humano (HBoV), Enterovírus (EV), Metapneumovírus humano (HMPV-A e B), Mycoplasma pneumoniae (Mpneu), Parechovírus humano (HPeV), Rinovírus Humano (RV) e Influenza A H1N1. Esse mesmo perfil foi relacionado para o aumento

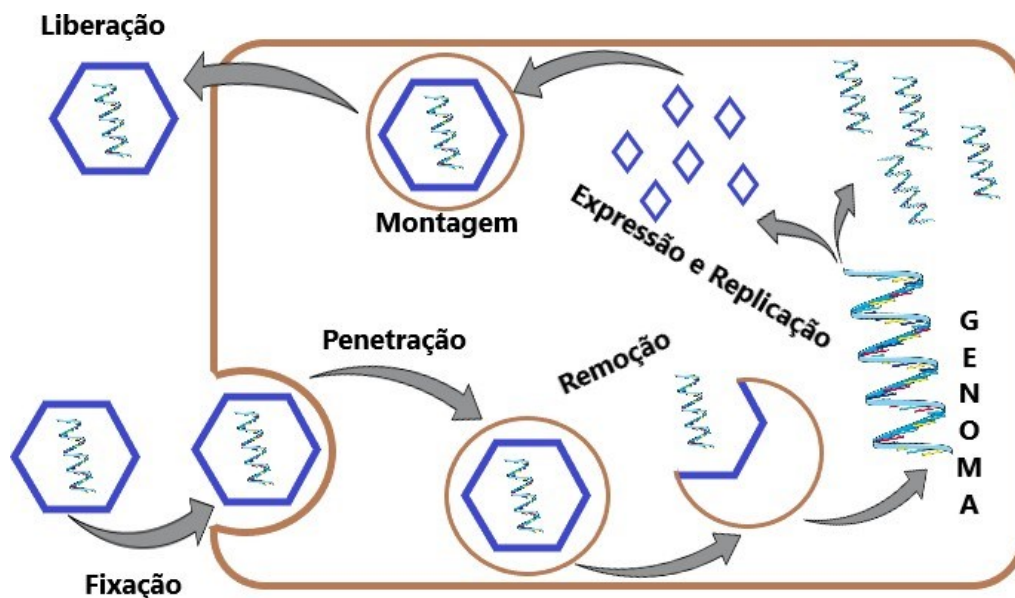
do número de casos das doenças respiratórias que se enquadram na de síndrome respiratória aguda grave (SRAG)(15). O diagnóstico das principais síndromes respiratórias virais tem como padrão a reação em cadeia da polimerase (PCR) (16) e suas variações, como PCR em tempo real (qPCR) (5, 17-19). Os coronavírus (CoVs) são vírus envelopados, com RNA de fita simples e de polaridade positiva (1, 20). Para vírus de RNA é feita a RT-qPCR, onde o RNA é convertido em cDNA antes da amplificação dos fragmentos, utilizando sondas fluorescentes. No teste de PCR em RT multiplex é possível detectar de forma simultânea, específica e sensível vários tipos virais envolvidos nas doenças infecciosas pré-determinadas no kit. Diferenciar doenças respiratórias pode contribuir de forma significativa para redução do uso desnecessário de antibióticos (6) e é essencial para o atual enfrentamento tanto de COVID-19, quanto de outras doenças que culminam em síndrome respiratória aguda grave.

### **3.2 – Vírus e Bactérias que acometem o sistema respiratório**

O trato respiratório humano pode ser acometido por vírus e bactérias que causam vários tipos de manifestações clínicas. Esses sintomas vão desde desconfortos leves até infecções agudas graves, inclusive com risco de morte (21). As infecções agudas do trato respiratório são um grande problema da saúde pública mundial, principalmente em crianças e idosos, que apresentam alta taxa de mortalidade por infecções virais do trato respiratório (21-23). A existência de comorbidades pré-existentes é um fator que influencia no prognóstico destas infecções, estando associados com prolongamento de infecções, progressão da gravidade e aumento da mortalidade (24). Embora a infecção bacteriana tenha uma influência substancial no desenvolvimento de pneumonias graves, os vírus tem maior incidência nos casos de doenças do sistema respiratório e juntas causam um significativo impacto social, político e econômico nos sistemas de saúde dos países (25, 26).

Os vírus são parasitas obrigatórios, que não conseguem se replicar se não estiverem no interior de uma célula, considerados complexos supramoleculares muito ordenados. Embora os vírus sejam muito diversos, espalhando-se por células de todos os reinos da vida, eles compartilham funções e propriedades comuns (27,

28). De forma geral o ciclo de vida dos vírus começa com a entrada no hospedeiro, passando pelas etapas de fixação, penetração e remoção. Após a entrada ocorre a expressão dos genes virais, depois a replicação do seu genoma e pôr fim a montagem de novos vírus e a saída destes. A figura 1 esquematiza o ciclo de vida viral (29, 30).



**Figura 1 - Ciclo de vida viral** - Adaptado de Ryu (30). O ciclo de vida do vírus apresenta seis etapas: fixação, penetração, desencapsulamento (remoção), expressão e replicação gênica, montagem e liberação. O capsídeo em azul e o genoma em marrom estão esquematizados, e o núcleo da célula foi omitido no desenho.

Os mecanismos moleculares por trás do ciclo de vida viral requerem poucos componentes virais essenciais para serem funcionais. A informação genética é armazenada em todas as configurações possíveis conhecidas na biologia: RNA de fita simples (ss) de sentido positivo ou negativo, RNA de fita dupla (ds) ou genomas de DNA. Os vírus são encontrados em diversas morfologias, mas helicoidal e esférica (geralmente simetria icosaédrica) são as morfologias mais comuns (27, 31). Uma característica que muitos vírus têm em comum é a capacidade de formar conchas proteicas ocas (capsídeos), protegendo seu genoma do ambiente

externo. Os capsídeos são formados sem um genoma e após a conclusão, este é encapsulado com a ajuda de um motor de empacotamento acionado por ATP ou os capsídeos são formados diretamente em torno do genoma (27, 32).

Os vírus também apresentam propriedades mecânicas específicas, entre elas observamos nos diferentes estágios da infecção o capsídeo viral passa por mudanças, atravessando estados fortemente estáveis que protegem o genoma, para estados instáveis que facilitam a liberação do genoma. Desta forma, o capsídeo exerce um papel importante no ciclo de vida viral, podendo ser alvo para estudar os mecanismos que regem as etapas sucessivas da infecção viral. Além disso, os estudos sobre a montagem de vírus e a sua mecânica forneceram importantes informações para apoiar o desenvolvimento de novas abordagens em nanobiotecnologia e nanomedicina, como por exemplo sendo veículo de administração direcionada de drogas e na produção de vacinas (27, 33).

As bactérias desempenham um papel importante na manutenção do ambiente em que vivemos e apenas uma pequena porcentagem causa infecções e doenças. As infecções bacterianas podem ser transmitidas por uma variedade de mecanismos, sendo necessário que um número suficiente de organismos sobreviva no ambiente e chegue a um hospedeiro suscetível. As bactérias são organismos procariontes que carregam sua informação genética no DNA circular de fita dupla. Algumas espécies também contêm pequenos plasmídeos de DNA adicional e/ou parede celular. Externamente à parede celular, algumas bactérias têm cápsulas, flagelos ou pili. Normalmente se reproduzem por fissão binária e por isso, sob as condições adequadas, algumas espécies podem se dividir e se multiplicar rapidamente, causando infecções em seres humanos (34).

Algumas infecções requerem apenas um pequeno número de organismos para gerar uma doença potencialmente agressiva. Uma infecção pode destruir as células do corpo ou pode haver dano ao hospedeiro através de uma resposta imunológica exacerbada (34). A capacidade das bactérias de infectar o trato respiratório depende das propriedades do epitélio, das características das espécies bacterianas específicas e de tempo suficiente para ligação bacteriana-mucosa. A aderência bacteriana à superfície da célula epitelial pode levar à colonização, que, por sua vez, leva a uma maior aderência e ao aumento da colonização (35).

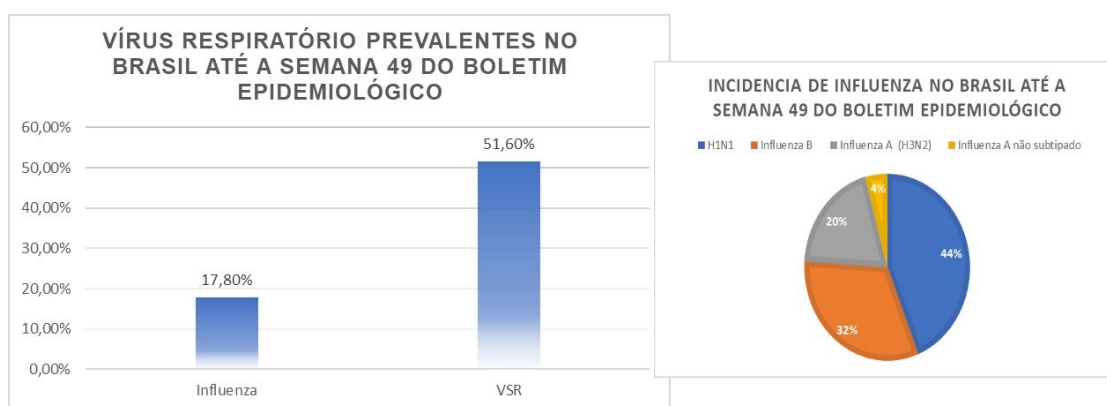
Analisando estudos epidemiológicos podemos citar um realizado em uma favela brasileira por Góes, Zerbinati (36) 2019. Dentre 282 amostras de crianças com 5 anos ou menos, 15 vírus que causam doenças respiratórias foram detectados, sendo predominantemente infecções por vírus sincicial respiratório humano (VSR, 12,1%) e Rinovírus Humano (RV 33,0%), mas também sazonalmente coronavírus endêmicos, e em menor quantidade os Influenzavírus. Além dos subtipos destes já citados foram detectados Parainfluenza (tipo 1, 2, 3 e 4), Enterovírus, Adenovírus e Parechovírus. Estes resultados se mostraram em conformidade com outros relatórios no mundo todo.

Outro estudo feito com 6.266 crianças de países do hemisfério sul também detectou a presença destes mesmos patógenos e alguns outros. Os resultados foram: Rinovírus / enterovírus tiveram a maior prevalência (41,5%), seguido por influenza (15,8%), adenovírus (9,8%), parainfluenza e vírus sincicial respiratório (VSR) (ambos 9,7%), coronavírus (5,6%), metapneumovírus humano (5,5 %) e bocavírus humano (HBov) (2,0%) (37).

Bellei e colaboradores (2008) também fizeram um levantamento, mas agora em adultos. Realizaram a detecção fixando e utilizando um kit de detecção comercial por fluorescência, RT-PCR e Nested PCR. Dentre as amostras coletadas, 61,8% foram positivas para um único vírus: 95 para rinovírus, 49 para influenza A, 35 para influenza B, 23 para metapneumovírus, 10 para coronavírus OC43, 10 para vírus sincicial respiratório, 8 para enterovírus, 7 para adenovírus, 5 para coronavírus 229E, 2 para parainfluenzavírus tipo 3, 1 para parainfluenza tipo 2 e 1 para parainfluenzavírus tipo 1. Quatorze amostras (3,3%) foram diagnosticadas com co-infecções, incluindo 5 rinovírus mais adenovírus, 2 influenza A mais adenovírus, 1 adenovírus influenza B, mais 1 adenovírus coronavírus OC43, mais 1 coronavírus OC 1 metapneumovírus mais adenovírus, 1 rinovírus mais influenza A, 1 rinovírus mais coronavírus OC43, 1 rinovírus mais coronavírus 229E e 1 enterovírus influenza B (38).

De acordo com o último Boletim Epidemiológico da Vigilância da Influenza publicado pelo Ministério da Saúde, que data de dezembro de 2019, das amostras coletadas pelas unidades de saúde 25,8% apresentaram positividade para influenza e outros vírus respiratórios. Deste percentual 17,8% foram confirmados para influenza, com maioria de H1N1, estas somando 44% dentro das amostras

confirmadas para influenza. Foram 32,1% de influenza B, 4,3% de influenza A não subtípado e 19,7% de influenza A (H3N2). Entre os outros vírus respiratórios que apareceram, a maioria foi de VSR, 51,6%. As regiões Sudeste e Sul apresentam os maiores índices de amostras positivas, com destaque para a maior circulação de VSR, Influenza A (H1N1) e Influenza B. Nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste a maior circulação foi de VSR. E analisando a ocorrência por faixa etária entre os indivíduos menores de 10 anos, a prevalência também é de VSR e Influenza B. Entre os indivíduos a partir de 10 anos predominam os vírus Influenza A (H1N1), Influenza B e Influenza A (H3N2) (39). A figura 2 mostra a distribuição dos vírus encontrados no Brasil até a semana 49, de publicação deste boletim.



**Figura 2 – Incidência dos vírus respiratórios no Brasil até semana 49 do boletim epidemiológico.** A esquerda, gráfico da distribuição de vírus respiratórios no Brasil até o Boletim 49 do Ministério da saúde. A direita, especificação dos tipos de vírus influenza prevalentes. Dados retirados do último Boletim Epidemiológico da Vigilância da Influenza publicado pelo Ministério da Saúde, que data de dezembro de 2019.

Em janeiro de 2020 a Organização Mundial da saúde (OMS) declarou estado de pandemia devido ao crescente número de casos de infecção por um novovírus, o SARS-CoV-2 (novo coronavírus causador da síndrome respiratória aguda severa) (1, 2), somando-se a já existente diversidade de patógenos que acometemo sistema respiratório. De acordo com o Boletim Epidemiológico Especial do Ministério da saúde número 79, até dia 04 de setembro de 2021 foram confirmados 220.282.354 casos no mundo. Os Estados Unidos foram o país com o maior número de casos (39.906.426), seguido pela Índia (32.988.673), Brasil

(20.877.864), Reino Unido (6.973.995) e França (6.910.865). Foram confirmados 4.561.159 óbitos no mundo até a mesma data. Os Estados Unidos continuou sendo o país com maior número (648.106), seguido do Brasil (583.362), Índia (440.533), México (262.868) e Peru (198.447) (40).

De acordo com esses dados é possível constatar que o vírus ainda se encontra em taxa alta de circulação e disseminação, que são influenciadas por fatores, como: o tamanho da população hospedeira, densidade, estado imunológico, estrutura etária e taxas de contato são elementos críticos da epidemiologia das doenças respiratórias, além disso existem alguns síndromes gripais apresentam padrão de sazonalidade em alguns estados brasileiros (36, 41), desta forma é importante diferenciar as infecções respiratórias para conduzir a escolha da terapia individual de forma mais adequada e prevenir a disseminação de infecções hospitalares secundárias (5, 6).

### 3.3 – Doenças respiratórias

As doenças respiratórias mais frequentes no Brasil e no mundo são causadas pelo Vírus Sincicial Respiratório (VSR), Metapneumovírus humano (hMPV), Vírus da Parainfluenza (HPIV), Vírus Influenza (FLU), Rinovírus (RV), Bocavírus Humano, Parecovírus Humano, Enterovírus Humano (EV), Adenovírus Humano (HAdV), Coronavírus (CoV) e *Mycoplasma pneumoniae* (*Mpneu*). *Seguem abaixo informações, como classificação, genoma, sintomas e incidência das doenças respiratórias causadas por cada um desses agentes infecciosos:*

- Vírus Sincicial Respiratório (VSR): classificado como um pneumovírus da família *Paramyxoviridae*. Possui RNA linear de fita única e sentido negativo, que está contido em um núcleo capsídeo helicoidal. Seu genoma possui 10 genes que codificam para duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e 9 proteínas estruturais (25). HRSV é relatado como principal causa de pneumonia e bronquiolite em bebês e crianças, mas pode acometer todas as faixas etárias (42). Os sintomas mais comuns são febre, coriza, tosse, rouquidão, otalgia, rinite, conjuntivite, faringite, membranas timpânica anormal e otite aguda média (43-45). Existe um tipo antigênico subdividido em grupos, A e B (25).

- **Metapneumovírus humano (HMPV):** Classificado também como da família *Paramyxoviridae*. Este vírus possui RNA de fita simples e sentido negativo com envelope. A organização do genoma é parecida com HRSV, mas não apresenta os genes NS1 e NS2, as partículas deste vírus são pleomórficas de formas esféricas e filamentosas. O hMPV causa 7 a 19% dos casos de infecções agudas do trato respiratório em crianças hospitalizadas, e a taxa de detecção em adultos é de aproximadamente 3% (46). Os sintomas são parecidos com os do HRSV, sendo os mais comuns febre, coriza, tosse, rouquidão, otalgia, rinite, conjuntivite, faringite, membranas timpânica anormal e otite aguda média (43-45). Existem dois subtipos principais (A e B) compostos pelos subgrupos A1 / A2 e B1 / B2 (25).
- **Vírus da Parainfluenza (HPIV):** Estes vírus pertencem a família *Paramyxoviridae*, e também são semelhantes ao HRSV por possuírem um genoma de RNA de fita simples e sentido negativo, que fica alojado em um nucleocapsídeo helicoidal envolto por envelope lipídico (25, 47, 48). Seu genoma codifica 6 proteínas virais comuns (NP, P, L, M, HN e F) e apresentam 4 sorotipos principais. HPIV1 e HPIV3 são do gênero *Respirovirus* e HPIV2 e HPIV4 são do gênero *Rubulovirus* (25). Estes vírus têm sido associados a vários tipos de doenças do trato respiratório superior e inferior, mas estudos mostram que há grande relação entre HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3 e síndromes clínicas específicas, idade da criança e época do ano. Entre as manifestações comuns temos: Crupe, Bronquiolite, Pneumonia, Traqueobronquite, além de sintomas neurológicos, apneia e braquicardia (48).
- **Vírus Influenza (FLU):** Este grupo pertence à família *Orthomyxoviridae* apresentam três gêneros A, B e C. Estes vírus possuem um genoma de RNA de fita simples e sentido negativo, exclusivamente segmentado. De acordo com o tipo de influenza, existem sete (C) ou oito (A e B) segmentos, e cada um contém um ou dois genes que codificam várias proteínas. O genoma viral é contido em um nucleocapsídeo, que é circundado por um envelope lipídico

(25, 49). O Flu A acomete humanos e animais, pode frequentemente sofrer mutações levando a grandes surtos anuais ou até mesmo pandemias. Flu B e Flu C infectam principalmente humanos e tem menos diversidade genética (25). Pode causar muitos tipos de doenças que vão desde infecções assintomáticas a várias síndromes respiratórias, distúrbios que afetam o pulmão, coração, cérebro, fígado, rins e músculos, até pneumonia viral primária fulminante e bacteriana secundária (49).

- Rinovírus (RV): São vírus que pertencem ao gênero *Enterovírus*, estão inseridos dentro da família *Piriconaviridae* e apresentam três grupos diferentes (A, B e C)(25, 50, 51). São vírus pequenos, com RNA de fita simples e sentido positivo e apresentam capsídeo sem envelope. Seu genoma tem um gene que codifica um polipeptídeo que é clivado em 4 proteínas estruturais e 7 não estruturais. Infecções por RVs são mais comuns em crianças em idade escolar, que acabam introduzindo as infecções em casa. As taxas destes ataques secundário variam de 25 a 70%(52). Ele apresenta em torno de 100 sorotipos (25). Este grupo são a causa dos resfriados comuns, sendo o que mais acomete as vias respiratórias superiores. Apesar de na maiorias das vezes causar doenças benignas, pode trazer formas graves exacerbando doenças pulmonares crônicas, asma e bronquiolite (50).
- Bocavírus Humano: Estes vírus são membros da família *Parvoviridae* e do gênero *Bocaparvovirus* (53, 54). São vírus pequenos (20 nm), sem envelope, com um genoma de DNA de fita simples de aproximadamente 5 kb de nucleotídeos (nt) de comprimento. Seu genoma é organizado em três estruturas *open reading frame* (ORFs) e é dividido em quatro genótipos (HBoV-1 a 4) (54-56). É encontrado em indivíduos de todas as idades, mas comumente em crianças de 6 a 24 meses causando infecção aguda grave e gastroenterites (56).
- Parecovírus Humano: Estes vírus pertencem ao gênero *Parechovírus* da família *Pircornaviridae*. Não se conhece muito a respeito da patogênese e

epidemiologia deste vírus (57). Seu genoma é composto por RNA de fita simples de polaridade positiva, e os 700 nt 5'UTR formam estruturas primárias e secundárias, que está envolto por um capsídeo sem envelope lipídico (57-59). Embora 16 tipos já tenham sido descritos a maioria dos estudos publicados está relacionada aos tipos de HPeV 1-8. Na pediatria, HPeV1, HPeV2 e HPeV4-8 causam doenças gastrointestinais ou respiratórias leves, e podem ocasionar com menos frequência doenças mais graves, incluindo miocardite, encefalite, pneumonia, meningite, paralisia flácida, síndrome de Reye e infecção neonatal fatal. Já o HPeV3 causa doenças graves em crianças, como sepse e doenças que envolvem o sistema nervoso central (60).

- Enterovírus Humano (EV): Os EVs pertencem à família *Picornaviridae*, não são envelopados, tem formato icosaédrico com genomas de RNA de fita única positiva, que possui quatro regiões: uma região 5' não traduzida (NTR), um único ORF, uma 3' NTR e uma cauda poliadenilada. De acordo com a diversidade da sequência, eles foram divididos em 15 espécies (61, 62). Estes vírus podem infectar pessoas de todas as faixas etárias, mas afetam gravemente crianças mais novas e podem causar paralisia permanente e complicações neurológicas (63). A maioria das infecções não apresentam sintomas, mas eles podem causar grande variedade de manifestações. Podem causar febre, dor de cabeça, doença respiratória, dor de garganta, vômito e diarreia. Alguns acometem o sistema nervoso também, causando meningite asséptica e até encefalite mais grave (64).
- Adenovírus Humano (HAdV): Os HAdV são classificados na família *Adenovirida* e no gênero *Mastadenovirus*, que contém sete espécies conhecidas - HAdV-A a HAdV-G e existe uma estimativa de 51 sorotipos conhecidos (65, 66). São vírus de DNA de fita dupla sem envelope e variam em tamanho de 65 a 80 nm de diâmetro. O vírion é composto de um capsídeo proteico e o genoma viral do DNA tem de 26 a 46 kb de comprimento, contendo de 23 a 46 genes codificadores de proteínas, além das proteínas internas. O capsídeo apresenta uma forma icosaédrica (65,

67). São endêmicos na população em geral e muitas vezes causam doenças graves em pacientes imunocomprometidos, especialmente pediátricos. O contágio se dá através de contato e o vírus é extremamente resistente a diversos agentes físicos e químicos (65). A manifestação da doença pode variar de doença respiratória aguda de gravidade variável, conjuntivite a gastroenterite (66).

- **Coronavírus (CoV):** Estes vírus são envelopados, de RNA fita simples e positiva e pertencem a família *Coronaviridae*. Sete espécies acometem humanos que pertencem aos gêneros *Alphacoronavirus* (229E e NL63) e *Betacoronavirus* (OC43, HKU, SARS-CoV, SARS-CoV-2 e MERS-CoV) (25, 68). O genoma coronaviral possui quatro proteínas estruturais: Spike (S), Membrana (M), Envelope (E) e Nucleocapsídeo (N). Este grupo pode causar grande variedade de doenças em animais domésticos e selvagens, podendo ser doenças entéricas, respiratórias e sistêmicas e em humanos causam resfriado comum, pneumonia e síndromes respiratórias agudas graves (IRAs)(53). HCoV-229E e HCoV-OC43 são endêmicos e responsáveis pelo resfriado comum. SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 provocam as IRAS (68).
- *Mycoplasma pneumoniae (Mpneu):* Esta bactéria se apresenta como uma célula de pequeno volume e tamanho, seu genoma consisti em apenas 816.394 pb e 687 genes. Devido a este pequeno genoma, ele é incapaz de sintetizar paredes celulares rígidas de peptidoglicanos (69). o *Mpneu* tem sido considerado uma importante etiologia das doenças respiratórias e é mais frequentemente isolado entre crianças e adultos jovens (26). É uma das principais causas de pneumonia adquirida e pode causar uma série de manifestações quando não manifesta pneumonia, como faringite e traqueobronquite (70). É transmitido por gotículas respiratórias por contato próximo e o período de incubação pode ser de até 1-3 semanas. A falta de uma parede celular torna essa bactéria resistente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Os antibióticos eficazes contra *Mpneu* são macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas (71).

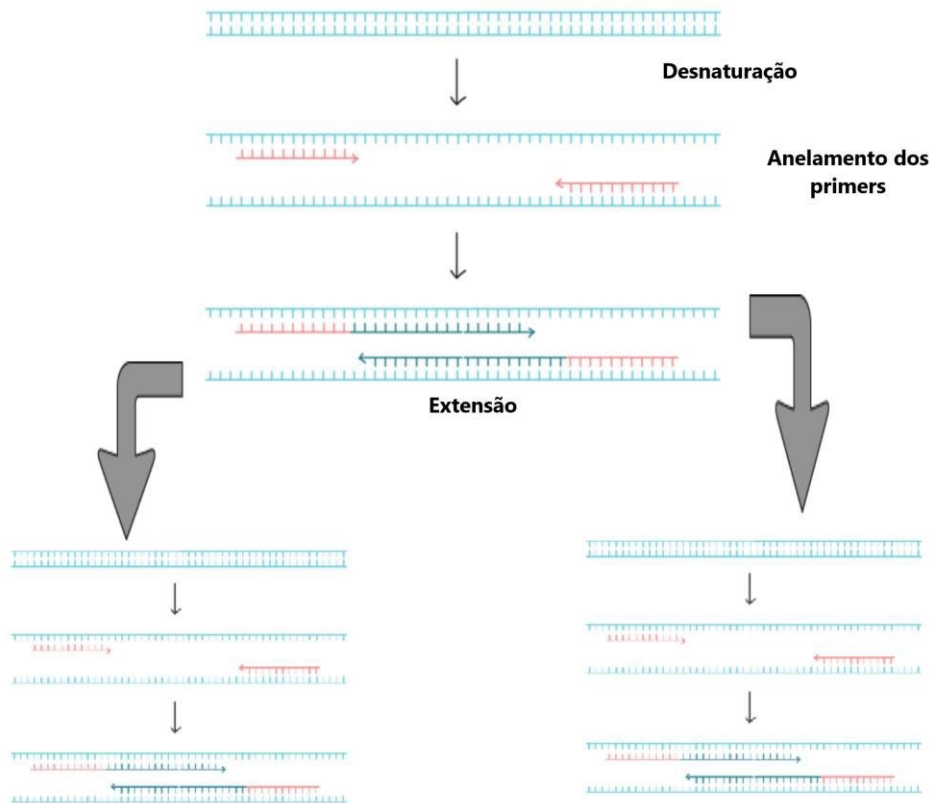
### 3.4 – Diagnóstico diferencial

Como mencionado nas seções anteriores, desde janeiro de 2020 vivemos uma pandemia mundial da COVID-19 e a nova doença possui sintomas muito parecidos com outras síndromes respiratórias. O teste diagnóstico de pessoas infectadas com SARS-CoV-2 tem sido fundamental para controlar o avanço da disseminação, sendo importante em diversos países para nortear ações no sentido de controlar a pandemia (72). Outros microrganismos, que causam infecções respiratórias agudas graves (IRAs) são causas principais de doenças e mortes pelo mundo, principalmente de crianças. As IRAs podem ser causadas por vírus de RNA e DNA, como: Vírus Sincicial Respiratório (RSV), Vírus da Parainfluenza Humana (HPIV), Vírus da Influenza (FLU), Adenovírus Humano (HAdV), Rinovírus Humano (HRV), Metapneumovírus Humano (HMPV), Bocavírus Humano (HBoV), entre outros (73).

Na década de 1990 surgiram diagnósticos para essas doenças virais baseadas nas técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (73). De acordo com a revisão feita por Greene e Sanbrooke em 2019 (74), a PCR é a base da maioria das técnicas amplificação molecular na modernidade. É uma técnica relativamente barata, simples, rápida, flexível e robusta, sobretudo atualmente quando diversos laboratórios tiveram que investir em equipamentos e mão-de-obra especializada em diagnóstico de SARS-CoV-2. De forma mais simplificada essa técnica permite que uma sequência alvo de DNA seja copiada várias vezes de maneira exponencial. Ela foi desenvolvida nos anos 1980 por Kary Mullis e a partir daí foi adaptada para diversos usos, como clonagem molecular, sequenciamento de DNA, alelotipagem e outros (74, 75).

De forma mais detalhada a PCR utiliza ciclos de temperatura para síntese de moléculas de DNA a partir de um molde. As reações são catalisadas pela enzima polimerase e tem basicamente três etapas: Desnaturação, anelamento e extensão. O processo conta com várias repetições dessas etapas, chamadas de ciclos, que podem ser de 20 até mais de 40 e é realizado no equipamento chamado termociclador, que controla as variações de temperatura. As cópias da sequência alvo no primeiro ciclo servem de molde para o próximo e assim até o ciclo final. As reações de PCR precisam da enzima DNA polimerase para catalisar a reação, ao

menos um par de oligonucleotídeos para iniciar a síntese (primers), desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) para ir formando as novas cópias, cátions divalentes e monovalentes, tampão para manter o pH e o DNA molde (74). A figura 3 esquematiza as sequências de eventos em uma reação de PCR.



**Figura 3 – Esquemata da PCR.** A figura mostra as etapas no primeiro ciclo de uma PCR. Em cima temos o DNA dupla fita. Depois da desnaturação acontece a extensão iniciada pelos oligonucleotídeos (primers), a nova fita dupla serve como molde e   desnaturada novamente, suas fitas separadas se anelam aos primers e o processo segue se repetindo.

Atualmente os procedimentos diagnósticos atuais para diagnóstico de vírus respiratórios seguem duas linhas. Primeiro, há a detecção direta de (partes do) vírus. Isso pode ser feito por cultura do vírus, detecção de uma ou mais de suas proteínas. Os ensaios para detecção de anticorpos antivirais ou antígenos virais, são amplamente usados em muitos laboratórios clínicos (76, 77).

Por exemplo para detecção dos vírus Influenza, o padrão ouro que vem sendo utilizado desde 1990, é a cultura de vírus em células específicas. Exige uma

propagação em cultura por pelo menos 10 dias, análise de efeito citotóxico e para confirmar são feitos ensaios de hemoaglutinação com eritrócitos, coloração de anticorpos específicos e imunofluorescência. Existem também testes baseados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Mas estes testes tem a limitação do tempo e no caso do ELISA apresentam em alguns casos baixa sensibilidade (77).

Podemos citar também os kits comerciais para detecção indireta de SARS-CoV-2 que identificam os anticorpos produzidos em resposta a infecção, como: o sorológico, o teste de Imunoglobulina M (IgM) e Imunoglobulina G (IgG). A aplicação desses testes tem a capacidade de fornecer informações sobre infecções ativas e em fase terminal e pode ser ferramenta importante para analisar grandes quantidades de amostras em laboratórios com configurações de recursos limitados. Essas mesmas características podem ser usadas por programas de vigilância de doenças para entender a epidemiologia (78). Existem os testes de detecção de antígeno por fluxo lateral. Estes tipos de testes esbarram na questão que os indivíduos podem não produzir anticorpos suficientes nos primeiros dias dificultando a detecção, ou apresentarem baixa carga viral. Além disso a eficácia e a vida útil dos anticorpos ainda não foram completamente elucidadas (79).

E na segunda linha temos os testes moleculares, que tem sido usados com mais frequência durante a presente pandemia. O segundo utiliza detecção direta de ácidos nucleicos ou detecção via amplificação de ácidos nucleicos (76). E com o desenvolvimento de tecnologias modernas, novas estratégias de diagnóstico, incluindo amplificação de ácido nucleico multiplex e ensaios baseados em *microarray*, estão surgindo (76). A PCR, técnica de amplificação de ácidos nucleicos, pode driblar limitações como a baixa da carga viral (77).

Atualmente, a técnica molecular de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR), é o padrão ouro para diagnóstico de COVID-19 por conseguir detectar diretamente as partes genômicas virais ao invés de marcadores secundários como anticorpos, sendo mais sensível e mais específica (79). Estudos compararam a RT-PCR com os métodos de cultivo e sorologia em pacientes adultos para VSR. A sensibilidade geral do RT-PCR foi de 73% e a especificidade de 99%, indicam que o RT-PCR é um excelente método para o diagnóstico de infecção aguda por VSR em adultos (80). Neste âmbito a PCR se mostra mais sensível e rápida do que os métodos convencionais, e dribla a dificuldade

encontrada na diferenciação de vírus com sintomas semelhantes, sintomaticamente ou clinicamente (81).

Com a versatilidade da técnica e a quantidade de microrganismos que produzem sintomas semelhantes, pode-se utilizar uma variação: a PCR Multiplex. Esta consiste na amplificação de vários alvos simultaneamente em uma única reação, podendo agilizar o início da terapia mais adequada, além de que, se for realizada à amplificação individual de cada vírus em estudo, a metodologia se torna mais cara e morosa (74, 81). PCR Multiplex também auxilia na detecção muito mais rápida em comparação com cultura viral e teste de fluorescência direta para anticorpos (82).

Alguns pesquisadores implementaram e avaliaram um novo kit de diagnóstico PCR multiplex comercial para vários tipos de coronavírus, incluindo SARS-Cov-2, que só estava disponível para fins de pesquisa. Um total de 2673 amostras foram avaliadas por este kit, destas 54 positivaram para COVID-19. Estas foram enviadas para outro laboratório para confirmação juntamente com um conjunto de 621 amostras que foram negativas. Em comparação com o padrão de referência, a sensibilidade do ensaio foi de 100% [intervalo de confiança de 95% (IC) 93,2–100%], especificidade 99,8% (IC 95% 99,1–100%), preditivo positivo valor 98,1% (IC 95% 90,2–99,7%) e valor preditivo negativo 100% (IC 95% 99,4–100%). Estes resultados positivos corroboram com a necessidade de validação de testes abrangentes para apoiar o diagnóstico que uma ferramenta importante para direcionar ações de saúde pública (83).

Para mostrar que não só é importante diferenciar os tipos de coronavírus, Marriot e colaboradores (2020) utilizaram um kit comercial de PCR multiplex para monitorar a prevalência de síndrome respiratória aguda grave por COVID-19 e outros vírus respiratórios na Austrália. Este tipo de teste era incomum na região e possibilitou que os pesquisadores avaliassem a eficiência das medidas tomadas pela saúde pública para enfrentamento da pandemia e para outras doenças respiratórias. Observaram grande declínio da incidência de todos os patógenos respiratórios com as medidas de distanciamento para a pandemia (84).

Outros pesquisadores desenvolveram ensaio multiplex de coronavírus junto com influenza, pela preocupação em relação aos sintomas parecidos e disseminação difusa durante a disseminação sazonal do Influenza. Eles acreditam

que um diagnóstico diferencial pode dar grande suporte a saúde pública. O ensaio desenvolvido detectou e diferenciou cada alvo e coinfeções. Apenas duas coinfeções por influenza foram detectadas nas amostras positivas para SARS-CoV-2 (85). Todos estes estudos reforçam o potencial da PCR Multiplex para uso em testes diagnósticos e como o diagnóstico diferencial é importante para ajudar as políticas públicas.

No entanto, o processo de otimização da PCR Multiplex pode ser demorado e trabalhoso, principalmente se a sequência molde é grande ou complexa. Os primers utilizados devem ter a *temperatura de melting* próxima um dos outros, ser específicas para as suas sequências alvo, não ter homologia significativa entre si e gerar produtos amplificados que sejam distinguíveis por eletroforese em gel de agarose (74). Existem algumas limitações como a queda de rendimento da reação quando se tem muitos alvos, no caso de mais de 8 pares de primers é muito comum ocorrer amplificação de estruturas secundárias e é comum ocorrer amplificação preferencial de alguns alvos, o que pode deixá-los invisíveis na eletroforese em gel. Muitas variáveis podem interferir no processo, então a otimização deve ser sistemática para cada componente e para cada etapa (74).

A atual pandemia de COVID-19 tem mostrado a grande importância dos testes diagnósticos no controle da doença. Para alcançarmos o fim da pandemia, o desenvolvimento e aplicação de testes diagnósticos em grandes quantidades e o uso rápido dos resultados para ajudar a implementar a terapia apropriada continuarão tendo papel primordial (76). Estima-se que antes das restrições de viagens na China, o SARS-CoV-2 não diagnosticado representava a fonte de infecção para 79% dos casos (72). E devido à similaridade dos sintomas, faz-se necessário diferenciar a COVID-19 das outras doenças respiratórias existentes.

Semelhante aos painéis testados por Malhotra e colaboradores (2016), o presente trabalho visou o desenvolvimento e otimização de uma Plataforma de PCR multiplex para diagnóstico diferencial de 22 síndromes gripais, agora incluindo COVID-19 e em apenas uma reação (*one-tube*). Diferentemente dos autorescitados os vírus não são agrupados em reações distintas e a detecção ocorre por eletroforese capilar, utilizando a fluorescência associada e o tamanho do alvo por peso molecular variável (73).

### 3.5 - Referências

1. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Tropical Medicine & International Health*. 2020;25(3):278-80.
2. Hopkins J. Coronavirus 2019-nCoV Global Cases by Johns Hopkins CSSE <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf62019> [cited 2019 23/04/2020].
3. Ali A, Rabaan SHA-A, Shafiul Haque, Ranjit Sah, Ruchi Tiwari, Yashpal Singh Malik, Kuldeep Dhama, M. Iqbal Yatoo, D. Katterine Bonilla-Aldana, Alfonso J. Rodriguez-Morales. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Le Infezioni in Medicina*. 2020;2:174-84.
4. Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yuen K-Y. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: Another Zoonotic Betacoronavirus Causing SARS-Like Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(2):465-522.
5. Bordi L, Nicastri E, Scorzolini L, Di Caro A, Capobianchi MR, Castilletti C, et al. Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020. *Eurosurveillance*. 2020;25(8):2000170.
6. Woo PCY, Chiu S, Seto WH, Peiris JS. Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. *Journal of clinical microbiology*. 1997 07/01;35:1579-81.
7. Organization WH. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard <https://covid19.who.int/2021> [cited 2021 06/10/2021].
8. He F, Deng Y, Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? *Journal of Medical Virology*. n/a(n/a).
9. Chen Z-M, Fu J-F, Shu Q, Chen Y-H, Hua C-Z, Li F-B, et al. Diagnosis and treatment recommendations for pediatric respiratory infection caused by the 2019 novel coronavirus. *World Journal of Pediatrics*. 2020 2020/02/05.
10. Peiris JSM, Yuen KY, Osterhaus ADME, Stöhr K. The Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(25):2431-41. PubMed PMID: 14681510.

11. Follin P, Lindqvist A, Nyström K, Lindh M. A variety of respiratory viruses found in symptomatic travellers returning from countries with ongoing spread of the new influenza A(H1N1)v virus strain. *Eurosurveillance*. 2009;14(24):19242.
12. Puro V, Minosse C, Cappiello G, Lauria FN, Capobianchi MR. Rhinovirus and Lower Respiratory Tract Infection in Adults. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40(7):1068-9.
13. Guan W-j, Ni Z-y, Hu Y, Liang W-h, Ou C-q, He J-x, et al. Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection in China. *medRxiv*. 2020:2020.02.06.20020974.
14. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(13):1199-207. PubMed PMID: 31995857.
15. Bastos LS, Niquini RP, Lana RM, Villela DAM, Cruz OG, Coelho FC, et al. COVID-19 e hospitalizações por SRAG no Brasil: uma comparação até a 12<sup>a</sup> semana epidemiológica de 2020. *Cadernos de Saúde Pública*. 2020;36.
16. Shen M, Zhou Y, Ye J, Abdullah Al-maskri AA, Kang Y, Zeng S, et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2020 2020/03/01/.
17. Wan Z, Zhang Yn, He Z, Liu J, Lan K, Hu Y, et al. A Melting Curve-Based Multiplex RT-qPCR Assay for Simultaneous Detection of Four Human Coronaviruses. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11):1880. PubMed PMID: 27886052. eng.
18. Noh JY, Yoon S-W, Kim D-J, Lee M-S, Kim J-H, Na W, et al. Simultaneous detection of severe acute respiratory syndrome, Middle East respiratory syndrome, and related bat coronaviruses by real-time reverse transcription PCR. *Arch Virol*. 2017;162(6):1617-23. PubMed PMID: 28220326. Epub 02/20. eng.
19. Coiras MT, Aguilar JC, Garcia-Garcia ML, Casas I, Pérez-Breña P. Simultaneous Detection of Fourteen Respiratory Viruses in Clinical Specimens by Two Multiplex Reverse Transcription Nested-PCR Assays. *Journal of medical virology*. 2004 04/01;72:484-95.
20. de Wilde A, Snijder E, Kikkert M, Hemert M. Host Factors in Coronavirus Replication. *Current topics in microbiology and immunology*. 2017 06/23;419.

21. Clementi N, Ghosh S, De Santis M, Castelli M, Criscuolo E, Zaroni I, et al. Viral Respiratory Pathogens and Lung Injury. *Clinical microbiology reviews*. 2021;34(3):e00103-20. PubMed PMID: 33789928. eng.
22. Gottlieb J. Community-acquired respiratory viruses. *Current opinion in organ transplantation*. 2019 Jun;24(3):311-7. PubMed PMID: 31090641. Epub 2019/05/16. eng.
23. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*. 2011;377(9773):1264-75. PubMed PMID: 21435708. Epub 03/22. eng.
24. Hodinka RL. Respiratory RNA Viruses. *Microbiology spectrum*. 2016 Aug;4(4). PubMed PMID: 27726802. Epub 2016/10/12. eng.
25. Hodinka RL, Hayden RT, Wolk DM, Carroll KC, Tang Y-W. Respiratory RNA Viruses. *Microbiology spectrum*. 2016;4(4):4..35.
26. Li J, Song C-L, Wang T, Ye Y-L, Du J-R, Li S-H, et al. Etiological and epidemiological characteristics of severe acute respiratory infection caused by multiple viruses and *Mycoplasma pneumoniae* in adult patients in Jinshan, Shanghai: A pilot hospital-based surveillance study. *PLoS One*. 2021;16(3):e0248750-e. PubMed PMID: 33750952. eng.
27. Buzón P, Maity S, Roos WH. Physical virology: From virus self-assembly to particle mechanics. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2020;12(4):e1613-e. PubMed PMID: 31960585. Epub 01/20. eng.
28. San Martín C. Virus Maturation. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1215:129-58. PubMed PMID: 31317499. Epub 2019/07/19. eng.
29. Pellett PE, Mitra S, Holland TC. Basics of virology. *Handb Clin Neurol*. 2014;123:45-66. PubMed PMID: 25015480. eng.
30. Ryu W-S. Virus Life Cycle. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. 2017:31-45. PubMed PMID: PMC7158286. Epub 05/06. eng.
31. Zlotnick A, Aldrich R, Johnson JM, Ceres P, Young MJ. Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology*. 2000 Nov 25;277(2):450-6. PubMed PMID: 11080492. Epub 2000/11/18. eng.
32. Cuervo A, Daudén MI, Carrascosa JL. Nucleic acid packaging in viruses. *Sub-cellular biochemistry*. 2013;68:361-94. PubMed PMID: 23737058. Epub 2013/06/06. eng.

33. Wen AM, Steinmetz NF. Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chem Soc Rev.* 2016;45(15):4074-126. PubMed PMID: 27152673. eng.
34. Doron S, Gorbach SL. Bacterial Infections: Overview. *International Encyclopedia of Public Health.* 2008:273-82. PubMed PMID: PMC7149789. Epub 08/26. eng.
35. Cappelletty D. Microbiology of bacterial respiratory infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 1998;17(8).
36. Góes LGB, Zerbinati RM, Tateno AF, de Souza AV, Ebach F, Corman VM, et al. Typical epidemiology of respiratory virus infections in a Brazilian slum. *Journal of Medical Virology.* 2020;92(8):1316-21.
37. Taylor S, Lopez P, Weckx L, Borja-Tabora C, Ulloa-Gutierrez R, Lazcano-Ponce E, et al. Respiratory viruses and influenza-like illness: Epidemiology and outcomes in children aged 6 months to 10 years in a multi-country population sample. *The Journal of infection.* 2017 Jan;74(1):29-41. PubMed PMID: 27667752. Pubmed Central PMCID: PMC7112512. Epub 2016/09/27. eng.
38. Bellei N, Carraro E, Perosa A, Watanabe A, Arruda E, Granato C. Acute respiratory infection and influenza-like illness viral etiologies in Brazilian adults. *Journal of Medical Virology.* 2008;80(10):1824-7.
39. Brasil SdVdMdS-. Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 49 de 2019 <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/23/Boletim-epidemiologico-SVS-38-2-interativo.pdf>2019 [cited 2021 14-09].
40. Saúde SdVd. Boletim Epidemiológico Especial - Doença pelo novo coronavírus - COVID-19 [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/setembro/10/boletim\\_epidemiologico\\_covid\\_79\\_1final10set\\_reduzido.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/setembro/10/boletim_epidemiologico_covid_79_1final10set_reduzido.pdf)2021 [cited 2021 15-09].
41. Almeida A, Codeço C, Luz PM. Seasonal dynamics of influenza in Brazil: the latitude effect. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):695-. PubMed PMID: 30587159. eng.
42. Papenburg J, Boivin G. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Reviews in medical virology.* 2010 Jul;20(4):245-60. PubMed PMID: 20586081. Epub 2010/06/30. eng.

43. Papenburg J, Boivin G. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Reviews in medical virology*. 2010;20(4):245-60.
44. Williams JV, Wang CK, Yang CF, Tollefson SJ, House FS, Heck JM, et al. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *J Infect Dis*. 2006 Feb 1;193(3):387-95. PubMed PMID: 16388486. Pubmed Central PMCID: PMC1586246. Epub 2006/01/03. eng.
45. Williams JV, Tollefson SJ, Nair S, Chonmaitree T. Association of human metapneumovirus with acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006;70(7):1189-93. PubMed PMID: 16427144. Epub 01/19. eng.
46. Esposito S, Mastrolia MV. Metapneumovirus Infections and Respiratory Complications. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2016 Aug;37(4):512-21. PubMed PMID: 27486733. Pubmed Central PMCID: PMC7171707. Epub 2016/08/04. eng.
47. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med*. 2001 Jun 21;344(25):1917-28. PubMed PMID: 11419430. Epub 2001/06/23. eng.
48. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Apr;16(2):242-64. PubMed PMID: 12692097. Pubmed Central PMCID: PMC153148. Epub 2003/04/15. eng.
49. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet*. 2003 Nov 22;362(9397):1733-45. PubMed PMID: 14643124. Pubmed Central PMCID: PMC7112395. Epub 2003/12/04. eng.
50. Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(1):135-62. PubMed PMID: 23297263. eng.
51. Greenberg SB. Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2011 Aug;32(4):433-46. PubMed PMID: 21858748. Epub 2011/08/23. eng.
52. Greenberg SB. Update on Human Rhinovirus and Coronavirus Infections. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2016;37(4):555-71. PubMed PMID: 27486736. Epub 08/03. eng.
53. Hasöksüz M, Kiliç S, Saraç F. Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turkish journal of medical sciences*. 2020 Apr 21;50(SI-1):549-56. PubMed PMID: 32293832. Pubmed Central PMCID: PMC7195990. Epub 2020/04/16. eng.

54. Malta FC, Varella RB, Guimarães MAAM, Miagostovich MP, Fumian TM. Human Bocavirus in Brazil: Molecular Epidemiology, Viral Load and Co-Infections. *Pathogens*. 2020;9(8):645. PubMed PMID: 32785066. eng.
55. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*. 2010;201(11):1633-43. PubMed PMID: 20415538. eng.
56. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, et al. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 2016;22(39):8684-97. PubMed PMID: 27818586. eng.
57. Sridhar A, Karelehto E, Brouwer L, Pajkrt D, Wolthers KC. Parechovirus A Pathogenesis and the Enigma of Genotype A-3. *Viruses*. 2019;11(11):1062. PubMed PMID: 31739613. eng.
58. Stanway G, Kalkkinen N, Roivainen M, Ghazi F, Khan M, Smyth M, et al. Molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a new picornavirus group. *J Virol*. 1994 Dec;68(12):8232-8. PubMed PMID: 7966616. Pubmed Central PMCID: PMC237290. Epub 1994/12/01. eng.
59. Wildenbeest JG, Harvala H, Pajkrt D, Wolthers KC. The need for treatment against human parechoviruses: how, why and when? Expert review of anti-infective therapy. 2010 Dec;8(12):1417-29. PubMed PMID: 21133666. Epub 2010/12/08. eng.
60. Esposito S, Rahamat-Langendoen J, Ascolese B, Senatore L, Castellazzi L, Niesters HG. Pediatric parechovirus infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2014 Jun;60(2):84-9. PubMed PMID: 24690382. Epub 2014/04/03. eng.
61. Chen B-S, Lee H-C, Lee K-M, Gong Y-N, Shih S-R. Enterovirus and Encephalitis. *Frontiers in Microbiology*. 2020 2020-February-20;11(261). English.
62. Romero JR. 164 - Human Enteroviruses. In: Cohen J, Powderly WG, Opal SM, editors. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*: Elsevier; 2017. p. 1406-16.e1.
63. Ho B-C, Yang P-C, Yu S-L. MicroRNA and Pathogenesis of Enterovirus Infection. *Viruses*. 2016;8(1):11. PubMed PMID: 26751468. eng.
64. Balada-Llasat JM, Rosenthal N, Hasbun R, Zimmer L, Bozzette S, Duff S, et al. Cost of managing meningitis and encephalitis among infants and children in the

United States. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2019 2019/04/01;93(4):349-54.

65. Ghebremedhin B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2014;4(1):26-33. PubMed PMID: 24678403. Epub 03/14. eng.

66. Kajon AE, Weinberg JB, Spindler KR. Adenoviruses☆. Reference Module in Biomedical Sciences: Elsevier; 2019.

67. Jawetz E, Kimura S, Nicholas AN, Thygeson P, Hanna L. new type of APC virus from epidemic keratoconjunctivitis. *Science*. 1955 Dec 16;122(3181):1190-1. PubMed PMID: 13274081. Epub 1955/12/16. eng.

68. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology*. 2020 Apr;42(1):3-11. PubMed PMID: 32342926. Epub 2020/04/29. eng.

69. Parrott GL, Kinjo T, Fujita J. A Compendium for *Mycoplasma pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*. 2016 2016-April-12;7(513). English.

70. Saraya T. *Mycoplasma pneumoniae* infection: Basics. *Journal of General and Family Medicine*. 2017;18(3):118-25.

71. Meyer Sauter PM, Unger WWJ, van Rossum AMC, Berger C. The Art and Science of Diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* Infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2018;37(11):1192-5. PubMed PMID: 00006454-201811000-00026.

72. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus 2. *Annals of Internal Medicine*. 2020;172(11):726-34.

73. Malhotra B, Swamy MA, Reddy PVJ, Kumar N, Tiwari JK. Evaluation of custom multiplex real - time RT - PCR in comparison to fast - track diagnostics respiratory 21 pathogens kit for detection of multiple respiratory viruses. *Viol J*. 2016;13:91-. PubMed PMID: 27267595. eng.

74. Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2019 June 1, 2019;2019(6):pdb.top095109.

75. Mullis KB, Faloona FA. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: Academic Press; 1987. p. 335-50.

76. Vandenberg O, Martiny D, Rochas O, van Belkum A, Kozlakidis Z. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nature Reviews Microbiology*. 2021 2021/03/01;19(3):171-83.
77. Zhang N, Wang L, Deng X, Liang R, Su M, He C, et al. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *Journal of medical virology*. 2020;92(4):408-17. PubMed PMID: 31944312. Epub 02/04. eng.
78. Rai P, Kumar BK, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(2):441-55. PubMed PMID: 33394144. Epub 01/04. eng.
79. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosens Bioelectron*. 2021;172:112752-. PubMed PMID: 33126180. Epub 10/24. eng.
80. Falsey AR, Formica MA, Walsh EE. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(3):817-20. PubMed PMID: 11880399. eng.
81. Bharaj P, Sullender WM, Kabra SK, Mani K, Cherian J, Tyagi V, et al. Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. *Virol J*. 2009;6:89-. PubMed PMID: 19558656. eng.
82. Tai C-C, Tsai C-H, Huang Y-H, Lee C-L, Chen H-P, Chan Y-J. Detection of respiratory viruses in adults with respiratory tract infection using a multiplex PCR assay at a tertiary center. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2020 2020/08/12/.
83. Williams E, Bond K, Chong B, Giltrap D, Eaton M, Kyriakou P, et al. Implementation and evaluation of a novel real-time multiplex assay for SARS-CoV-2: in-field learnings from a clinical microbiology laboratory. *Pathology*. 2020;52(7):754-9. PubMed PMID: 32943228. Epub 09/01. eng.
84. Marriott D, Beresford R, Mirdad F, Stark D, Glanville A, Chapman S, et al. Concomitant Marked Decline in Prevalence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Other Respiratory Viruses Among Symptomatic Patients Following Public Health Interventions in Australia: Data from St Vincent's

Hospital and Associated Screening Clinics, Sydney, NSW. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;72(10):e649-e51.

85. Mancini F, Barbanti F, Scaturro M, Fontana S, Di Martino A, Marsili G, et al. Multiplex Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assays for Diagnostic Testing of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 and Seasonal Influenza Viruses: A Challenge of the Phase 3 Pandemic Setting. *J Infect Dis*. 2020;223(5):765-74.

**Capítulo 4 – Patente - “Título”: Kit, Método de PCR Multiplex *one-tube* e Oligonucleotídeos com e sem marcação fluorescente: uso individual e/ou combinado para o diagnóstico diferencial de 22 síndromes respiratórias humanas**



03/05/2023 870230036924  
16:12  
  
29409162301228840

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2023 008493 1

Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25648387000118

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. João Naves de Ávila, 2121 - Campus Santa Mônica - Reitoria

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP: 38400-902

País: Brasil

Telefone: (34)3239 4977

Fax:

Email: [propriedade@intelecto.ufu.br](mailto:propriedade@intelecto.ufu.br)

Nome ou Razão Social: IMUNOSCAN ENGENHARIA MOLECULAR LTDA (BR/MG)

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06935380000132

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Empresa de Pequeno Porte assim definidas em lei

Endereço: Av. Nocomedes Alves dos Santos, Lídice

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

#### Dados do Pedido

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Oligonucleotídeos e plasmídeos sintéticos, seu uso e kit para

Utilidade (54): detecção de patógenos causadores de síndrome respiratória

Resumo: O invento proposto pertence ao campo da Biotecnologia e de equipamentos laboratoriais, e descreve 3 plasmídeos e 22 pares de oligonucleotídeos sintéticos para serem utilizados na detecção simultânea de patógenos causadores de síndromes respiratórias em um único tubo. A presente invenção tem como objetivo principal o diagnóstico simultâneo e diferencial para patógenos respiratórios em um sistema de um único tubo por PCR multiplex realizado em apenas 7h.

Figura a publicar: 2

## Dados do Procurador

---

### Procurador:

Nome ou Razão Social: José Carlos Vaz e Dias

Numero OAB: 147.683

Numero API: 187

CPF/CNPJ: 28328868172

Endereço: Rua da Assembleia 10 - Salas 2422 Centro

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20011-000

Telefone: (21) 3176-6530

Fax: (21) 3176-6528

Email: jose.dias@vdav.com.br

### Escritório:

Nome ou Razão Social: Vaz e Dias Advogados & Associados

CPF/CNPJ: 13333343000110

## Dados do Inventor (72)

---

Inventor 1 de 4

Nome: ISABELA LEMOS DE LIMA

CPF: 03793204103

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Denver, 141, Casa 2 - Novo Mundo

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP: 38407-736

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 4

Nome: LUIZ RICARDO GOULART FILHO

CPF: 64070018620

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Santa Catarina, 850 apt 303 Bairro Brasil

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP: 38400-652

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 4

Nome: ADRIANA FREITAS NEVES

CPF: 02903470685

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua 35, 836, Alto da Boa Vista 2

Cidade: Catalão

Estado: GO

CEP: 75713-205

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 4

Nome: VIVIAN ALONSO GOULART

CPF: 60750413115

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Marcolino Ribeiro, 265, Jardim Karaíba.

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP: 38411-382

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

## Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Reivindicação	P3056_Reivindicações_versão final.pdf
Relatório Descritivo	P3056_Rel_Descritivo_versão final.pdf
Desenho	P3056_Desenhos_versão final.pdf
Resumo	P3056_Resumo_versão final.pdf
Procuração	General POA_IMUNOSCAN.pdf
Procuração	General POA_UFU.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU200-P3056-29409162301228840-BIOCHEMIE pg.pdf

## Sequências Biológicas

---

- Declaro que a informação contida na 'Listagem de Sequências' apresentada em formato eletrônico está limitada ao conteúdo da matéria revelada pelas sequências de aminoácidos e/ou de nucleotídeos divulgadas no pedido de patente, conforme depositado

Tipos de Sequências Biológicas	Nome
Listagem de Sequências Biológicas em formato XML	P3056_Sequência_ST26.xml

## Acesso ao Patrimônio Genético

- 
- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

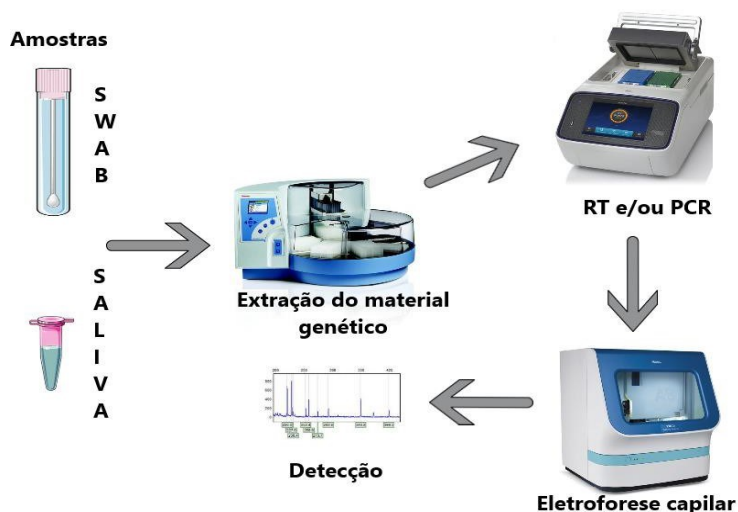
Declaração de veracidade

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações

## Resumo

A presente invenção descreve oligonucleotídeos e seu uso em sistema de diagnóstico simultâneo de 22 síndromes gripais, com uso da tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) antecedida pela reação de transcriptase reversa e seus componentes (reagentes e condições de reação), bem como kit compreendendo o referido sistema e método de diagnóstico em amostras de *swab* da nasofaringe e saliva humana. As sequências de oligonucleotídeos específicos (primers) para os microrganismos foram desenhadas utilizando o Primer Expres®, marcadas com os fluoróforos FAM, VIC e NED, o que permite realizar as 22 reações de PCR simultaneamente em um único tubo em sistema capilar de detecção no sequenciador Applied Bioscience 3500®. Desta forma, esta invenção possibilita o desenvolvimento de um kit, método de diagnóstico diferencial entre 22 síndromes respiratórias, permitindo um tratamento mais adequado e um melhor prognóstico para o paciente.



## **Relatório Descritivo da patente de invenção para: PCR Multiplex *one tube*, Oligonucleotídeos, Sistema de Diagnóstico, Kit, Método e Uso no diagnóstico de 22 síndromes gripais**

### **Campo de invenção**

[01] Refere-se a presente invenção a uma ferramenta clínica que auxilia no diagnóstico diferencial de 22 síndromes respiratórias em um sistema baseado na técnica de biologia molecular de PCR Multiplex (Reação em Cadeia da Polimerase com múltiplos marcadores), utilizando múltiplos oligonucleotídeos específicos e componentes (reagentes e condições de reação) para detecção simultânea de 22 microrganismos que causam infecções respiratórias presentes em amostras de *swab* da nasofaringe e de saliva. As sequências dos primers são descritas e fazem parte da invenção que utiliza a PCR Multiplex *one tube* para a tipagem simultânea com detecção em sistema de capilar. Em particular, a ferramenta serve também para estudo epidemiológico da população e melhor direcionamento das ações políticas e sanitárias, pois ela diferencia a COVID-19 de outras 21 síndromes respiratórias.

### **Fundamento da invenção**

[02] As infecções por vírus respiratórios humanos trazem grande variedade de sintomas respiratórios e amplo espectro de gravidade da doença, contribuindo para morbidade, mortalidade e perdas econômicas em todo o mundo (1). A síndrome clínica mais frequente é o resfriado comum, porém em pacientes com doenças respiratórias crônicas e imunocomprometidos, a infecção pode levar a graves complicações clínicas. Em geral, a maior parte das infecções respiratórias é causada por vírus, mas também podem ser causadas por bactérias (2, 3). Assim, o uso indevido de antibióticos prescritos para as infecções virais é muito grande e contribui para o aumento da resistência bacteriana. As doenças causadas pelos patógenos respiratórios podem cursar um conjunto de sintomas comuns e não específicos, por essa razão é tão importante a utilização de um teste diagnóstico capaz de identificar o agente etiológico. A identificação precisa permitir a intervenção clínica precoce e o melhor manejo terapêutico do paciente (4).

[03] Os coronavírus (CoVs) são vírus envelopados, com RNA de fita simples, de polaridade positiva (5, 6). SARS-CoV-2 pertence ao grupo beta, juntamente com MERS-CoV e SARS-CoV (7, 8).

[04] A rápida disseminação do SARS-CoV-2 tornou-se uma pandemia declarada pela Organização Mundial de Saúde em 30 de janeiro de 2020 e a nova doença denominada COVID-19 já causou a morte de mais de 4.814.651 pessoas no mundo até a data de 06/10/2021 (9, 10). Diante dessa estatística é fundamental diagnosticar o maior número de casos de forma rápida e eficaz para direcionar o tratamento e controle da doença. Entretanto, diferenciar outras infecções respiratórias agudas (IRAs) na atual pandemia por SARS-CoV-2 é essencial para conduzir a escolha da terapia individual mais adequada e prevenir a disseminação de infecções hospitalares secundárias (4, 11). Desde que a COVID-19 chegou ao Brasil houve um aumento da frequência de notificação de outros tipos de infecções respiratórias agudas e principalmente o aumento dos vírus respiratórios Influenza A (H1N1) e B, Parainfluenza (tipos 1, 2, 3 e 4), vírus sincicial respiratório (VSR) e Adenovírus. Isso reforça a importância de identificar os diferentes vírus respiratórios. Outras doenças respiratórias também importantes no contexto epidemiológico atual, incluem os Bocavírus humano (HBoV), Enterovírus (EV), Metapneumovírus humano (HMPV-A e B), *Mycoplasma pneumoniae* (MP), Parechovírus humano (HPeV) e Rinovírus Humano (RVHs). A transmissão de SARS-CoV-2 e de infecções IRAs, acontece por meio da exposição à fluidos corporais infecciosos, através do contato direto ou indireto com mucosas (12, 13) e os sintomas tanto para IRAs, quanto para COVID-19 são tosse, febre, congestão nasal, fadiga e outros sinais de infecção do trato respiratório superior (14, 15).

[05] Em geral, o diagnóstico das principais síndromes respiratórias tem como padrão ouro a reação em cadeia da polimerase (PCR) (16) e suas variações, como PCR em tempo real (qPCR) (11, 17-19). Com uma alta sensibilidade e especificidade, os ensaios moleculares fluorescentes que utilizam a técnica da PCR associada a um sequenciador automático, têm sido a solução utilizada para a detecção simultânea dos múltiplos patógenos mais comumente envolvidos em diversas infecções. Tal método, além de ser

essencial para o atual enfrentamento da COVID-19, também pode contribuir de forma significativa para a redução do uso desnecessário de antibióticos em outras infecções, que também culminam em síndrome respiratória aguda grave (4).

[06] Atualmente, técnicas para diagnóstico destes patógenos foram patenteadas utilizando os diferentes sistemas, como por exemplo a patente PI 0114468-5 A, que reivindica um kit de detecção para o vírus H5 (Influenza A) em um dia, que utiliza dois primers especialmente designados iniciadores A e B, para replicação do vírus H5 e uma sonda de captação específica para imobilização do RNA viral ampliado. Um primer adicional C é também designado para detecção do vírus patogênico H5. Este kit, diferentemente do proposto, é restrito ao vírus influenza A (H5), apesar de utilizar a metodologia multiplex. Ele consegue detectar de forma eficaz o patógeno, mas caso haja resultado negativo são necessários outros testes para detectar o patógeno causador da doença no paciente.

[07] A patente MX2013009755 A reivindica um sistema de detecção de amplo espectro baseado em diferenciação alélica para múltipla do vírus influenza tipo A (subtipos H1N1, H3N2, H5N1, H7N3), tipo B ou tipo C. Compreende oligonucleotídeos *sense* que permitem a discriminação alélica, e oligonucleotídeos *anti-sense* que são específicos para regiões não conservadas, todos fazem parte de uma única reação de PCR (multiplex). Em comparação com a anterior, detecta mais tipos do vírus Influenza, possibilitando uma abrangência maior no diagnóstico. Mas ainda é falho quanto aos outros patógenos com mesmos sintomas.

[08] A patente BR 112016025052-4 A2 reivindica um kit que consiste no método das sequências de primers e das sondas para detecção da presença e/ou ausência de Enterovírus e Parechovírus em amostras biológicas, sem extração direta do ácido nucleico. Este também utiliza a metodologia multiplex otimizando o tempo da detecção, mas se restringe a dois vírus dentre vários que apresentam sintomas similares.

[09] A patente PI 9913893-0 B1 reivindica método, kit, primers e sondas para detectar infecções agudas do trato respiratório, utilizando-se de RT-PCR-multiplex que permita a detecção simultânea de patógenos respiratórios em um dia de trabalho incluindo RNA-vírus (enterovírus, vírus influenza A e B, parainfluenzavírus tipo 1 e 3, vírus sincicial respiratório), um DNA-vírus (adenovírus) e bactéria (*C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*). Esta invenção também é mais abrangente no diagnóstico, diversifica os tipos de vírus, detectando não só os tipos de influenza, como outras espécies. A proposta reivindicada neste pedido ainda é mais abrangente, detectando 22 patógenos em uma única reação.

[10] A patente PI 0413825-2 A reivindica a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real de RT com vários alelos (Multiplex) para coronavírus incluindo o vírus SARS. Várias sequências alvo dentro dos genes S, E, M e N de SARS-CoV são identificadas para aumentar a probabilidade de que a tendência genética fundamental do vírus não levará a um resultado falso negativo. Esta patente utiliza a metodologia multiplex para fazer um diagnóstico mais confiável do vírus por detectar várias regiões do genoma. Mas em contrapartida existem outros vírus do mesmo grupo e de outros que são de importância epidemiológica nas síndromes respiratórias e não detectáveis.

[11] Desta forma, atendendo as deficiências das tecnologias atuais, a presente invenção utiliza *primers* de 22 patógenos para diagnóstico diferencial das infecções por patógenos que causam síndromes respiratórias, inclusive o SARS-CoV-2 em uma reação de PCR multiplex em um único tubo, podendo ser realizada no período de 7h, sendo portanto um kit com o uso de uma metodologia rápida e eficaz. Vários patógenos de importância epidemiológica foram contemplados nesse painel, inclusive alguns com seus subtipos e ainda outros tipos de coronavírus endêmicos. Outro aspecto que pode ser beneficiado são os estudos epidemiológicos da incidência destes patógenos e assim possibilitar melhor planejamento de ações preventivas.

### **Breve descrição dos desenhos**

[12] A Figura 1 ilustra o diagrama de fluxo do processamento da amostra até a etapa de leitura da fluorescência e peso molecular em eletroforese capilar no sequenciador.

[13] A Figura 2 é uma foto da tipagem de amostras de COVID-19 em gel de agarose 1,7% corado com Gel Red®. Na parte superior temos a análise de uma amostra pela eletroforese capilar, mostrando os dois picos das regiões identificadas para COVID-19 (VIC: 5' -UTR e N2). Na parte inferior temos a eletroforese de algumas amostras em gel de agarose (m: marcador de peso molecular 50pb, amostras 1 a 12), onde as amostras 4, 10 e 11 apresentaram duas bandas de peso molecular 228pb e 310pb, como esperado para a amplificação dos genes para COVID-19, as demais foram negativas para os vírus/bactérias do presente painel.

### **Descrição da invenção**

[14] A presente invenção propõe oligonucleotídeos para um novo método diagnóstico simultâneo diferencial para 22 patologias respiratórias em um sistema “one tube” por PCR multiplex realizado em apenas 7h. Para melhor compreensão do método proposto, segue abaixo uma descrição detalhada da invenção.

[15] O presente pedido de patente descreve 22 pares de oligonucleotídeos específicos para a detecção de 22 patógenos alvo com tamanho de amplicon (pb) determinado. Para serem usados associados ou não.

[16] Os oligonucleotídeos são combinados em 3 grupos, sendo cada grupo com um fluoróforo diferente, e com diferença significativa de pelo menos 20 pb, onde o tamanho por pb e a fluorescência se combinam para detecção em sistema de eletroforese capilar simultânea dos 22 patógenos.

[17] O RNA ou DNA (dependente do microrganismo) é extraído de amostras a partir do *swab* da nasofaringe ou saliva de origem humana. Como a maioria dos patógenos do ensaio possuem RNA como material genético é realizada uma reação de Transcriptase Reversa, utilizando primers randômicos.

[18] Após a conversão do RNA em cDNA é realizada a PCR (reação em cadeia da polimerase) que contém 22 pares de primers, divididos em 3 grupos onde cada grupo foi marcado com um fluoróforo (VIC, FAM, NED), que amplificam regiões específicas dos 22 microrganismos (21 vírus e 1 bactéria) baseando-se nas sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

[19] Os oligonucleotídeos desenvolvidos possuem sequências únicas do genoma de cada espécie como alvo de produto para amplificação (Tabela 1). A tabela 1 abaixo apresenta os patógenos alvos com seus respectivos oligonucleotídeos específicos (*Foward e Reverse*). Como descrito na tabela, os produtos gerados a partir da reação de PCR são de tamanho específicos para cada um, o que permite a sua identificação juntamente com a intensidade de fluorescência quando analisado por eletroforese capilar.

**Tabela 1** – Patógenos e seus respectivos oligonucleotídeos

Alvo	Amplicon (pb)	Sequência de Oligonucleotídeos	Identificação de Entrada no Gene Bank	Fluoróforo
Enterovírus	166	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	HQ456309.1	FAM
Influenza A	127	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	MK902667.1	FAM
Parainfluenza 4	156	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	MN369047.1	FAM
HCoV-NL63	191	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	AY567487.2	FAM
Parainfluenza 2	218	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	AF533012.1	FAM
Influenza B	249	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	CY173994.1	FAM
HCoV-229E	283	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	KU291448.1	FAM

HCoV-HKU1	334	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	NC_006577.2	FAM
Parechovirus humano	116	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	JX575746.1	VIC
Virus sincicial respiratório A	148	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	MT422273.1	VIC
Parainfluenza humano 3	200	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	NC_001796.2	VIC
Metapneumovirus humano B	264	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	KU320966.1	VIC
Mycoplasma pneumoniae	292	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	NC_000912.1	VIC
Parainfluenza humano 1	387	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	U70948.1	VIC
Metapneumovirus humano A	107	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	MK357775.1	NED
HCoV-OC43	137	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	KU131570.1	NED
Adenovirus	166	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	KC857700.1	NED
Influenza A (H1N1)	199	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	MT505272.1	NED
Rinovirus humano	239	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	KY093627.1	NED
Bocavirus Humano	286	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	MG195156.1	NED
SARS-CoV-2N2	310	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	MT396241.1	NED
Virus sincicial respiratório B	317	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	MH327947.1	NED

[20] A presente invenção descreve, adicionalmente, o uso deste sistema de diagnóstico, baseado na detecção de 22 patógenos respiratórios em amostras biológicas a partir de intensidade de fluorescência e peso molecular.

[21] A invenção proporciona ainda um kit para detecção de patógenos respiratórios, compreendendo os elementos e instruções necessárias para detecção dos referidos patógenos em *swab* da nasofaringe e/ou saliva.

[22] Os elementos do kit incluem os oligonucleotídeos aqui reivindicados e plasmídeos contendo os insertos de interesse para controle positivo.

[23] A presente invenção também descreve o método diagnóstico, prevendo todas as etapas de processamento das amostras, reação de transcriptase reversa e reação de PCR multiplex.

[24] A primeira etapa consiste em uma reação de conversão do RNA em DNA utilizando ciclos de temperaturas com variações de 37°C à 70°C. Os componentes da reação são: Tampão da Enzima (1x), de 30 a 40u de enzima M-MLV Transcriptase reversa, 106 a 156 pmol de primers randômicos, 100 mM de cada dNTPs, completando-se o volume com água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC) para 25µl até 35 µl finais de reação.

[25] A segunda etapa consiste na PCR (multiplex), que utiliza de 5µL a 10 µL de cDNA oriundo da primeira reação, sendo amplificada simultaneamente pelos 23 pares de oligonucleotídeos em um único tubo, com diversos ciclos de temperaturas variando de 59°C à 94°C. Os estágios se repetem de 25 vezes a 45 vezes. Os componentes de reação são: tampão da Taq (1x), 1,5 a 3 U de Taq DNA polimerase, 100 a 400 µM de cada dNTPs, 6 a 10 pmol de cada primer específico, 0,05 a 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, completando-se o volume da reação com água ultrapura de 25 µl a 35 µl finais. Utilizamos como controle negativo água e como controle positivo plasmídeos que contém os insertos de interesse de cada alvo.

[26] A terceira etapa consiste na eletroforese capilar desnaturante realizada no sequenciador *Applied Biosciences* 3500 ®. Os produtos amplificados são diluídos em água de 1:10 até 1:30. Depois, 1 µL do produto diluído de cada amostra a ser testada passa por processo de desnaturação com formamida a temperatura de 94°C por 3 minutos, e é adicionada do padrão de tamanho de alta densidade marcado com corante para dimensionamento reproduzível para dados de análises de fragmentos (GeneScan™ 600 LIZ®). Após esse processo, a amostra passa por um choque térmico, sendo exposta a temperatura de 4°C e é injetada no sequenciador *Applied Bioscience* 3500® para realização de eletroforese capilar.

[27] A quarta etapa corresponde a leitura da fluorescência e peso molecular para identificação dos picos dos alvos presentes nas amostras. Sendo positivos os resultados que apresentam picos na(s) região(ões) esperadas do eletroferograma. Dado que a presente invenção é apresentada com certo grau de detalhamento, esta é suscetível de quaisquer modificações, adaptações e aplicações adicionais por um técnico no assunto de acordo com os princípios dos métodos, materiais e usos expostos neste documento. Assim, as reivindicações anexas e o próprio relatório cobrem quaisquer modificações, adaptações e aplicações adicionais abrangidas no escopo da presente invenção.

[28] Daqui em diante, são ressaltados, apenas a título de exemplo, os resultados com os procedimentos que permitem uma melhor compreensão dos materiais, métodos e usos apresentados. Contudo, a presente invenção não é limitada aos seguintes exemplos de concretizações.

### **Exemplo de concretização da invenção**

**Exemplo 1: Uso de plasmídeos engenheirados para validação dos primers.**

[29] Três tipos de plasmídeos foram engenheirados contendo os insertos de interesse para todos os alvos. Cada um contém os insertos dos alvos que são marcados com o mesmo fluoróforo.

[30] Foram realizadas reações de PCR “singleplex” e multiplex utilizando os plasmídeos como fonte de DNA molde.

[31] As reações de PCR utilizando os plasmídeos mostraram a amplificação dos insertos de interesse.

**Exemplo 2: Uso de amostras de pacientes para diagnóstico diferencial da COVID-19 e ou outras 21 síndromes respiratórias.**

[32] O protocolo de pesquisa com certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) 30848620.1.0000.5704 foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro Universitário UNA Uberlândia. Todos os pacientes que participaram assinaram o correspondente termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ao coletarem amostras de *swab* nasofarínge ou saliva para exame qualitativo para detecção de COVID-19 (RT-PCR) no Laboratório Biogenetics Diagnósticos, sendo as amostras processadas e analisadas no mesmo ou no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

[33] Os critérios de inclusão das amostras foram pacientes que apresentavam sintomas gripais e procuraram o Laboratório Biogenetics para detecção da COVID-19.

[34] Amostras de *swab* da nasofaringe de 340 indivíduos foram coletadas no Laboratório Biogenetics Diagnósticos. Dessas 114 eram positivas para COVID-19 e 226 eram negativas com sintomas gripais associados, no teste de diagnóstico por qPCR.

[35] As amostras de sangue foram homogeneizadas e submetidas a extração de material genético com kit *MagMax™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Applied Biosystem*, contendo *beads* magnéticas. Esta etapa durou em torno de 40 minutos.

[36] Do material genético extraído foram utilizados de 10 a 15 µL para conversão de RNA em cDNA na reação catalisada pela enzima transcriptase reversa (Reação de RT). A reação foi realizada em termociclador Proflex Thermo com ciclos de temperaturas que vão de 37°C a 70°C por aproximadamente 2h.

[37] Após a reação de RT, 5 a 10 µL de produto foram utilizados para Reação de PCR *one tube*, para haver detecção simultânea de todos os alvos presentes em cada amostra. A reação de amplificação das amostras e controles foi realizada em termociclador Thermo Proflex com o primeiro estágio que passa por etapas que aquecem e se iniciam por volta de 90°C passando por 3 etapas que decrescem até por volta de 70°C, depois um estágio de 4 etapas que se inicia por volta de 90°C e decresce até entorno de 70°C. Os dois estágios juntos apresentam de 40 a 45 ciclos. A figura 1 apresenta os estágios de processamento da amostra até chegar a análise final dos resultados.

### **Exemplo 3: Análise dos dados de eletroforese capilar**

[38] Para detecção e análise da amplificação dos possíveis alvos na amostra foi utilizado o sequenciador Applied Bioscience 3500®.

[39] Após término da amplificação por PCR *one tube*, o produto amplificado foi diluído de 1:10, 1:20 ou 1:30. Da diluição, 1µL foi desnaturado com formamida e para controle da fluorescência foi adicionado de padrão de tamanho de alta densidade marcado com corante para dimensionamento reproduzível para dados de análises de fragmentos (GeneScan™ 600 LIZ®). Essa solução foi desnaturada a 93°C por 3 minutos e depois submetida a 4°C. Depois do choque térmico, as amostras foram levadas ao sequenciador Applied Bioscience 3500® para o processo de eletroforese capilar por volta de 50 minutos.

[40] As análises foram feitas utilizando o software GeneMapper® após eletroforese capilar. Os fluoróforos foram lidos em seus respectivos comprimentos de onda: VIC (538nm), NED (546nm) e FAM (494nm), e os alvos foram detectados por esta fluorescência e por peso molecular. A figura 2 mostra como são exibidos os resultados após análise no GeneMapper, junto com eletroforese em gel de agarose 1,7%.

[41] As análises forneceram resultados qualitativos, ou seja, positivos ou negativos. Os positivos são os que detectam um ou mais alvos, e os negativos são os que não detectam nenhum dos alvos.

### **Exemplo 3: Resultados apresentados pelas amostras testadas utilizando o kit de PCR multiplex**

[42] As 340 amostras submetidas a PCR multiplex para diagnóstico diferencial de 22 síndromes gripais apresentaram os seguintes resultados: 57,1% negativos, 29% positivos para SARS-COV-2, 6,5% para Enterovírus, 3,5% para HCoV-229E, 0,6% para Vírus sincicial respiratório A, 1,5% para HCoV-OC43 e 1,8% inconclusivos (Foram detectados só um dos genes para COVID-19 previstos no painel) (tabela 2).

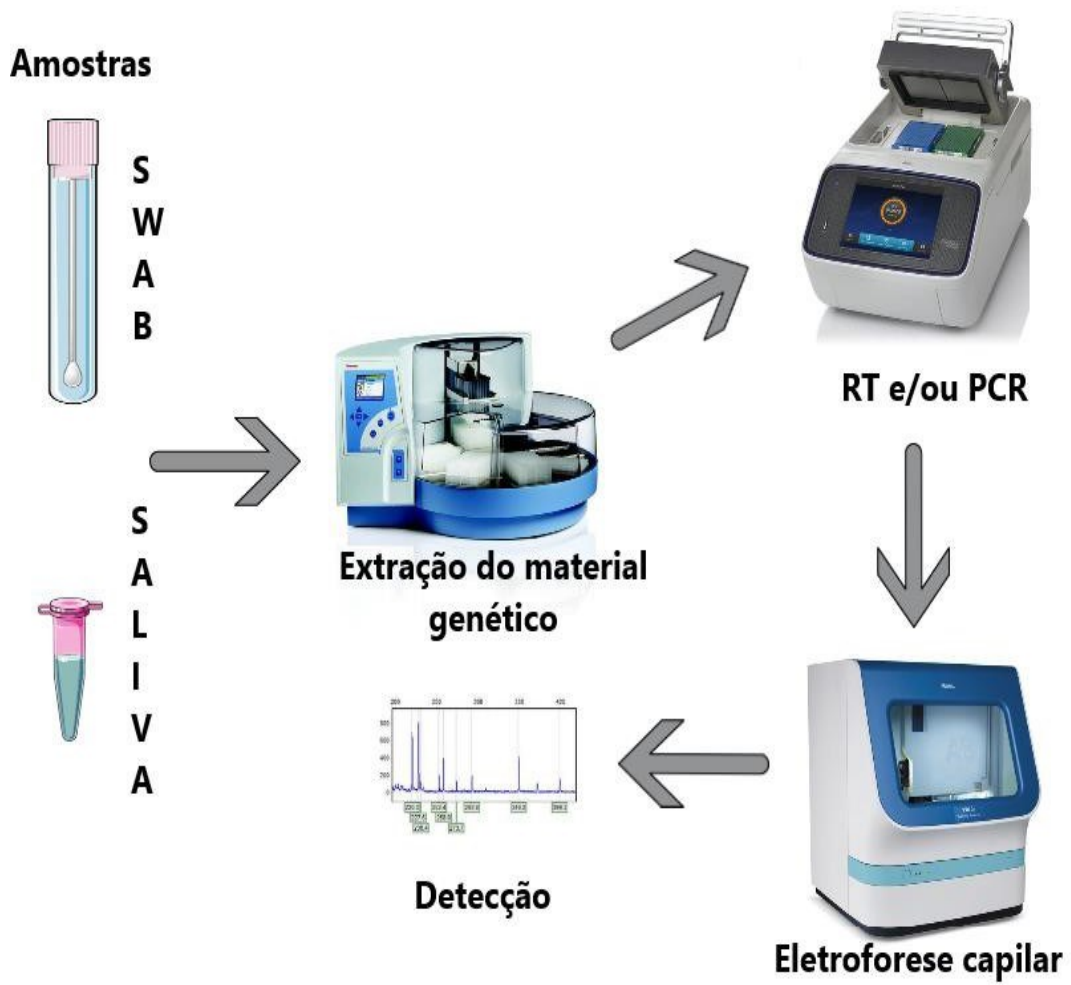
**Tabela 2 – Resultados do kit proposto em 340 amostras de pacientes**

	<b>Quantidade de Amostras</b>	<b>%</b>
<b>Negativos</b>	195	57,1%
<b>SARS-COV-2</b>	98	29%
<b>Enterovírus</b>	22	6,5%
<b>Influenza A</b>	-	-
<b>Parainfluenza 4</b>	-	-
<b>HCoV-NL63</b>	-	-
<b>Parainfluenza 2</b>	-	-
<b>Influenza B</b>	-	-
<b>HCoV-229E</b>	12	3,5%
<b>HCoV-HKU1</b>	-	-

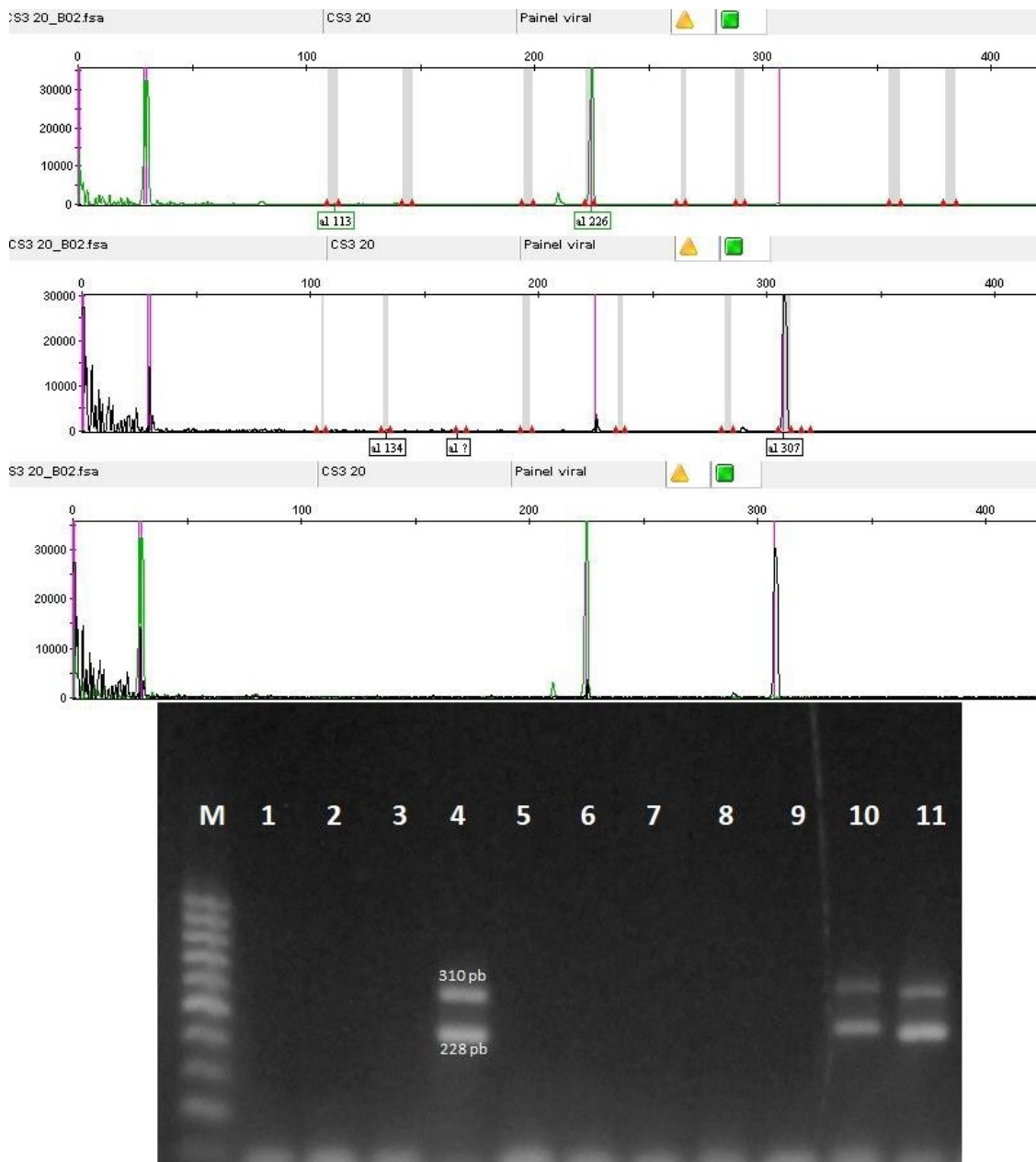
<b>Parechovirus humano</b>	-	-
<b>Virus sincial respiratório A</b>	2	0,6%
<b>Parainfluenza humano 3</b>	-	-
<b>Metapneumovirus humano B</b>	-	-
<b>Mycoplasma pneumoniae</b>	-	-
<b>Parainfluenza humano 1</b>	-	-
<b>Metapneumovirus humano A</b>	-	-
<b>HCoV-OC43</b>	5	1,5%
<b>Adenovirus</b>	-	-
<b>Influenza A (H1N1)</b>	-	-
<b>Rinovirus humano</b>	-	-
<b>Bocavirus Humano</b>	-	-
<b>Virus sincial respiratório B</b>	-	-
<b>Inconclusivos</b>	6	1,8%

[43] Os resultados obtidos em conjunto com a validação dos primers utilizando os plasmídeos engenheirados mostraram que os oligonucleotídeos aqui apresentados são específicos para detecção dos alvos.

**Figura 1**



# Figura 2



## Referências

1. Leung NHL. Transmissibility and transmission of respiratory viruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2021 2021/08/01;19(8):528-45.
2. Li J, Song C-L, Wang T, Ye Y-L, Du J-R, Li S-H, et al. Etiological and epidemiological characteristics of severe acute respiratory infection caused by multiple viruses and *Mycoplasma pneumoniae* in adult patients in Jinshan, Shanghai: A pilot hospital-based surveillance study. *PLoS One*. 2021;16(3):e0248750-e. PubMed PMID: 33750952. eng.
3. Hodinka RL. Respiratory RNA Viruses. *Microbiology spectrum*. 2016 Aug;4(4). PubMed PMID: 27726802. Epub 2016/10/12. eng.
4. Woo PCY, Chiu S, Seto WH, Peiris JS. Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. *Journal of clinical microbiology*. 1997 07/01;35:1579-81.
5. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Tropical Medicine & International Health*. 2020 2020/03/01;25(3):278-80.
6. de Wilde A, Snijder E, Kikkert M, Hemert M. Host Factors in Coronavirus Replication. *Current topics in microbiology and immunology*. 2017 06/23;419.
7. Ali A, Rabaan SHA-A, Shafiul Haque, Ranjit Sah, Ruchi Tiwari, Yashpal Singh Malik, Kuldeep Dhama, M. Iqbal Yatoo, D. Katterine Bonilla-Aldana, Alfonso J. Rodriguez-Morales. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Le Infezioni in Medicina*. 2020;2:174-84.
8. Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yuen K-Y. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: Another Zoonotic Betacoronavirus Causing SARS-Like Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(2):465-522.
9. Hopkins J. Coronavirus 2019-nCoV Global Cases by Johns Hopkins CSSE  
<https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf62019> [cited 2019 23/04/2020].
10. Organization WH. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard  
<https://covid19.who.int/2021> [cited 2021 06/10/2021].
11. Bordi L, Nicastrì E, Scorzolini L, Di Caro A, Capobianchi MR, Castilletti C, et al. Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel

coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020. *Eurosurveillance*. 2020;25(8):2000170.

12. He F, Deng Y, Li W. Coronavirus disease 2019: What we know? *Journal of Medical Virology*.n/a(n/a).

13. Chen Z-M, Fu J-F, Shu Q, Chen Y-H, Hua C-Z, Li F-B, et al. Diagnosis and treatment recommendations for pediatric respiratory infection caused by the 2019 novel coronavirus. *World Journal of Pediatrics*. 2020 2020/02/05.

14. Follin P, Lindqvist A, Nyström K, Lindh M. A variety of respiratory viruses found in symptomatic travellers returning from countries with ongoing spread of the new influenza A(H1N1)v virus strain. *Eurosurveillance*. 2009;14(24):19242.

15. Puro V, Minosse C, Cappiello G, Lauria FN, Capobianchi MR. Rhinovirus and Lower Respiratory Tract Infection in Adults. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40(7):1068-9.

16. Shen M, Zhou Y, Ye J, Abdullah Al-maskri AA, Kang Y, Zeng S, et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2020 2020/03/01/.

17. Wan Z, Zhang Yn, He Z, Liu J, Lan K, Hu Y, et al. A Melting Curve-Based Multiplex RT-qPCR Assay for Simultaneous Detection of Four Human Coronaviruses. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11):1880. PubMed PMID: 27886052. eng.

18. Noh JY, Yoon S-W, Kim D-J, Lee M-S, Kim J-H, Na W, et al. Simultaneous detection of severe acute respiratory syndrome, Middle East respiratory syndrome, and related bat coronaviruses by real-time reverse transcription PCR. *Arch Virol*. 2017;162(6):1617-23. PubMed PMID: 28220326. Epub 02/20. eng.

19. Coiras MT, Aguilar JC, Garcia-Garcia ML, Casas I, Pérez-Breña P. Simultaneous Detection of Fourteen Respiratory Viruses in Clinical Specimens by Two Multiplex Reverse Transcription Nested-PCR Assays. *Journal of medical virology*. 2004 04/01;72:484-95.

## REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleotídeos para tipagem específica de 22 microrganismos que causam síndromes respiratórias (21 vírus e 1 bactéria, com os fluoróforos listados na tabela 3 ou quaisquer outros compatíveis com esse sistema:

**Tabela 3:** Microrganismos e sequências de oligonucleotídeos com seus respectivos fluoróforos que constituem o kit de PCR multiplex proposto

Microrganismo	Sequência de Oligonucleotídeos com fluoróforos
Enterovírus	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  Fam-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Influenza A	Fam-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Parainfluenza 4	Fam-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
HCoV-NL63	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  Fam-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Parainfluenza 2	Fam-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Influenza B	Fam-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
HCoV-229E	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  Fam-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
HCoV-HKU1	Fam-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

	Xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Parachovirus humano	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx Vic-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Virus sincicial respiratório A	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx Vic-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Parainfluenza humano 3	Vic-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Metapneumovirus humano B	Vic-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Mycoplasma pneumoniae	Vic-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Parainfluenza humano 1	Vic-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Metapneumovirus humano A	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx Ned-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
HCoV-OC43	Ned-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Adenovirus	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx Ned-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Influenza A (H1N1)	Ned-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Rinovírus humano	Ned-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx  xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Bocavírus Humano	Ned-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx  xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
SARS-CoV-2N2	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx  Ned-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Vírus sincicial respiratório B	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx  Ned-xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

2. Utilização dos oligonucleotídeos de acordo com a reivindicação 1, combinados ou não, marcados com os fluoróforos citados ou quaisquer outros compatíveis com este sistema de detecção;

3. Método para diagnóstico diferencial de 22 microrganismos que causam síndromes respiratórias em humanos, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma etapa de conversão do RNA em cDNA através da utilização de enzima de transcriptase reversa e primers randômicos e uma segunda etapa de PCR (multiplex) definidos pelos IDs No. 01 a 24, em que compreende os oligonucleotídeos, como definidos na reivindicação 1;

4. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de a etapa de amplificação por técnica de PCR (multiplex) ocorrer em um único tubo em um período de 7h.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 ou 3, **caracterizado** pela tipagem simultânea dos vírus e da bactéria;

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, **caracterizado** pela análise qualitativa relativa entre os tipos de microrganismos encontrados em infecções múltiplas ou não. A análise é feita por meio de identificação dos picos no eletroferograma, de acordo com a intensidade de fluorescência e peso molecular. A amostra apresenta detecção positiva para um ou mais de uns alvos quando apresenta pico na região esperada do eletroferograma. Quando não há detecção de nenhum alvo não é possível visualizar picos no eletroferograma.