

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE:  
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

**MARIANA DE MELO CARDOSO**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE  
UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA  
RECOMBINANTE PARA O DIAGNÓSTICO  
DA COVID-19 USANDO AMOSTRAS DE  
SORO E URINA DOS PACIENTES**

Belo Horizonte

2025

Mariana de Melo Cardoso

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA PROTEÍNA  
QUIMÉRICA RECOMBINANTE PARA O DIAGNÓSTICO DA COVID-19  
USANDO AMOSTRAS DE SORO E URINA DOS PACIENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

**Orientadores:**

Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho – UFMG  
Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila – UNESC

**Co-Orientadora:**

Dra. Fernanda Ludolf Ribeiro – Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais

**Linha de Pesquisa:**

Clínica, diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e tropicais.

Belo Horizonte

2025

C268d Cardoso, Mariana de Melo.  
Desenvolvimento e avaliação de uma proteína quimérica recombinante para o diagnóstico da COVID-19 usando amostras de soro e urina dos pacientes [recurso eletrônico]. / Mariana de Melo Cardoso. - - Belo Horizonte: 2025.  
83f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antônio Ferraz Coelho  
Orientador (a): Ricardo Andrez Machado de Ávila.  
Coorientador (a): Fernanda Ludolf Ribeiro.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. COVID-19. 2. Diagnóstico. 3. Urina. 4. Proteínas Recombinantes. 5. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 6. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antônio Ferraz. II. Ávila, Ricardo Andrez Machado de. III. Ribeiro, Fernanda Ludolf. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WC 506

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL  
**ATA DE DEFESA DE TESE**

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e cinco (28/02/2025), às 09:00 (nove) horas, por videoconferência pela plataforma GOOGLE MEET (<https://meet.google.com/rqg-tyrk-kcm>), realizou-se a sessão pública para a 237ª defesa de tese de **MARIANA DE MELO CARDOSO**, número de registro 2021677375, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL. A presidência da sessão coube ao professor **EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - ORIENTADOR (UFMG)**, **PROF. RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA – ORIENTAÇÃO DUPLA (UNESC)**, **DR. JOÃO AUGUSTO OLIVEIRA DA SILVA (UFMG)**, **DRA CAMILA SIMÕES DE FREITAS (UFMG)**, **PROF. MIGUEL ANGEL CHÁVEZ FUMAGALLI (UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARIA DE AREQUIPA - PERU)**, **DRA. RAHISA SCUSSEL (UNESC)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE PARA O DIAGNÓSTICO DA COVID-19 USANDO AMOSTRAS DE SORO E URINA DOS PACIENTES"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público, e decidiu considerar a tese **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata e ao público, pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão, sendo lavrada a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada eletronicamente por todos os membros titulares da Comissão Examinadora presente através do SEI (Sistema Eletrônico de Informações) do Governo Federal.

**Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2025.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Andrez Machado de Ávila, Usuário Externo**, em 28/02/2025, às 09:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rahisa Scussel, Usuário Externo**, em 28/02/2025, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Augusto Oliveira da Silva, Usuário Externo**, em 28/02/2025, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miguel Angel Chavez Fumagalli, Usuário Externo**, em 28/02/2025, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Simões de Freitas, Usuária Externa**, em 28/02/2025, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 28/02/2025, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3985041** e o código CRC **5CA69D23**.

---

*Dedico este trabalho a todas as vidas que sofreram com a pandemia do COVID-19. Que a união que ecoou da destruição causada por este vírus e os incansáveis esforços empregados pela ciência possam inspirar a esperança e amenizar a dor da perda.*

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho é fruto do esforço de muitas pessoas extraordinárias a quem não posso deixar de agradecer. Expresso minha mais profunda gratidão ao meu orientador, Dr Eduardo Antônio Ferraz Coelho, à minha coorientadora, Dra Fernanda Ludolf, e a todos os colegas do grupo, a quem devo este trabalho. Durante esses quatro anos, mesmo à distância, jamais hesitaram em oferecer apoio, generosidade e conhecimento. Em especial, nos dias desafiadores da pandemia, quando se dividiram entre inúmeras frentes de trabalho, incluindo esta, dedicando-se com incansável esforço e entregando resultados de grande relevância.

Agradeço ao meu orientador Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, que esteve comigo durante toda a minha trajetória científica, que me deu tantas oportunidades, que por inúmeras vezes me ajudou muito mais do que eu merecia. Agradeço a sua paciência, cuidado e dedicação conosco. Seus ensinamentos me formaram enquanto pessoa e pesquisadora e é um privilégio fazer parte do seu grupo. Estendo meus agradecimentos aos meus colegas de laboratório Airam, Eduarda, Flávia, Gabriel, Gabriela, Jéssica, Leticia, Lidiane, Luana, Maria Eduarda, Mírian, Nicolý, Rahisa e Rafaela, com quem aprendo todos os dias. Também e especialmente à Ellen e Lariani, que além de colegas são minhas amigas e me consolaram em tantos momentos. Todos eles têm uma jornada brilhante pela frente, da qual eu espero fazer parte.

Agradeço ao Dr. Christophe Nguyen, Dra. Magali Gary-Bobo e aos demais pesquisadores, do grupo Glyco et Nanovecteurs, do Institut de Biomolécules Max Mousseron, especialmente a Laure, que me receberam com tanto amor e carinho. Foi uma alegria e um orgulho imenso conhecê-los e fazer parte, mesmo que brevemente, deste grupo. Para além da pesquisa, estar com vocês me ensinou muito mais do que eu poderia imaginar.

Agradeço às minhas amigas Bia, Martina e Renata, que durante todo o meu processo de internacionalização foram a minha base. Vocês me ajudaram a entender o meu lugar no mundo e me ensinam o significado de amizade todos os dias. Aos demais colegas e amigos, o meu muito obrigada, sem o seu apoio eu jamais teria chegado aqui. Saibam que é um prazer estar ao lado de vocês.

Agradeço especialmente à minha mãe, pelos conselhos, pelo apoio, pelo amor e principalmente pelo exemplo. Vê-la prosperar, sempre forte, persistente e feliz acima de tudo, é o meu maior incentivo.

A todos os citados, tenham a certeza de que toda ajuda e companhia, palavras, risadas, almoços e conselhos foram imprescindíveis para a conclusão desta etapa e serão para sempre lembrados com muito carinho.

Agradeço ainda as instituições que por meio de seus pesquisadores, funcionários e infraestrutura fomentaram a viabilidade deste trabalho: Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

*“Botas...as botas apertadas são uma das maiores venturas da terra, porque, fazendo doer os pés, dão azo ao prazer de as descalçar.”*

*MACHADO DE ASSIS, As Memórias Póstumas de Brás Cubas.*

## RESUMO

O impacto da pandemia de COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2 ressaltou o papel dos testes laboratoriais como estratégia para o controle de doenças, principalmente, por indicar a presença de anticorpos específicos em amostras de pacientes infectados. Assim, antígenos recombinantes são relevantes para o desenvolvimento de testes confiáveis e, proteínas quiméricas recombinantes têm sido usadas para tal fim. O presente estudo utilizou ferramentas de bioinformática para selecionar epítomos específicos de células B das proteínas Spike (S) e Nucleocapsídeo (N) do vírus SARS-CoV-2, com o objetivo de produzir um novo antígeno quimérico recombinante (N4S11-SC2) e testá-lo como antígeno diagnóstico da infecção pelo SARS-CoV-2. Onze epítomos derivados da proteína S e quatro da proteína N foram preditos e utilizados para construir a proteína, que foi expressa, purificada e avaliada por ensaios de ELISA contra amostras de soro e urina de pacientes e controles. Resultados mostraram que a proteína N4S11-SC2 apresentou 83,7% de sensibilidade e 100% de especificidade ao utilizar amostras de soro, e 91,1% de sensibilidade e 100% de especificidade usando amostras de urina. O desempenho da proteína foi também avaliado nas amostras em comparação com as proteínas recombinantes N e S, com melhores resultados sendo alcançados para a N4S11-SC2, ao usar amostras pareadas de soro. Em adição, anticorpos anti-N4S11-SC2 não foram identificados em indivíduos vacinados, mas não infectados, com Janssen Ad26.COVID.S, utilizando amostras de soro ou urina pareadas. Em conclusão, o estudo apresenta dados preliminares da eficácia de um novo antígeno quimérico recombinante como marcador diagnóstico alternativo para a infecção por SARS-CoV-2 usando amostras de soro ou urina dos pacientes.

**Palavras-chave:** COVID-19; diagnóstico; urina; proteína N4S11-SC2; SARS-CoV-2; ELISA.

## ABSTRACT

The impact of the COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus has highlighted the role of laboratory tests as a strategy for disease control, mainly by indicating the presence of specific antibodies in samples from infected patients. Therefore, recombinant antigens are relevant for the development of reliable tests, and recombinant chimeric proteins have been used for this purpose. The present study used bioinformatics tools to select B-cell-specific epitopes from the Spike (S) and Nucleocapsid (N) proteins of the SARS-CoV-2 virus, with the aim of producing a new recombinant chimeric antigen (N4S11-SC2), and testing it as a diagnostic antigen for SARS-CoV-2 infection. Eleven epitopes derived from the S protein and four from the N protein were predicted and used to construct the new protein, which was expressed, purified, and evaluated through ELISA experiments against serum and urine samples from patients and controls. Results showed that N4S11-SC2 showed 83.7% sensitivity and 100% specificity, when using serum samples were used; and 91.1% sensitivity and 100% specificity, when using urine samples were used in the texts. The protein performance was also evaluated in samples comparing with the recombinant N and S proteins, with better results being achieved for N4S11-SC2, when using paired serum samples. In addition, anti-N4S11-SC2 antibodies were not detected in individuals vaccinated, but not infected, with Janssen Ad26.COVS, using paired serum or urine samples. In conclusion, the study presents preliminary data on the efficacy of a novel recombinant chimeric antigen as an alternative diagnostic marker for SARS-CoV-2 infection using serum or urine samples from patients.

**Keywords:** COVID-19; diagnosis; urine; N4S11-SC2 protein; SARS-CoV-2; ELISA.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AUC – Área sobre a curva

DO – Densidade Óptica

COVID-19 – Doença do Coronavírus, do inglês: *Coronavirus Disease 2019*

ESPII – Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional

FDA – do inglês: *Food and Drug Administration*

IFN – Interferon

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

LB – Luria Bertani

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORFs – Fases de leitura aberta

PDB – do inglês: *Protein Data Bank*

ROC – do inglês: *Receiver Operator Characteristic*

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SARS-CoV-2 – do inglês: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SDRA – Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda

VPP – Valor preditivo positivo

VPN – Valor preditivo negativo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura viral e genoma do SARS-CoV-2.....	22
Figura 2. Mecanismos de invasão da célula hospedeira pelo SARS-CoV-2.....	25
Figura 3. Ciclo do SARS-CoV-2.....	26
Figura 4. Perfil temporal dos Biomarcadores na Infecção por SARS-CoV-2.....	27
Figura 5. Construção da proteína quimérica N4S11-SC2.....	40
Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	41
Figura 7. Desempenho diagnóstico da proteína N4S11-SC2 com amostras de urina e soro.....	44
Figura 8. Desempenho diagnóstico comparativo entre as proteínas recombinantes N, S e N4S11-SC2.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Regiões selecionadas para a construção da proteína quimérica.....	39
Tabela 2. Resultados do teste diagnóstico.....	42

## SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	16
1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	20
2.1 SINTOMATOLOGIA DA COVID-19 .....	21
2.2 TRATAMENTO .....	21
2.3 CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS .....	22
2.3.1 Estrutura viral do SARS-CoV-2 .....	24
2.4 MECANISMOS DE INFECÇÃO E RESPOSTA IMUNE .....	25
2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	30
2.5.1 Seleção de epítomos por ferramentas de bioinformática .....	33
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GERAL .....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	35
3.2 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B E CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA.....	35
3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA.....	36
3.4 AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	37
3.5 IMUNOBLOTTING.....	38
3.6 ELISA .....	38
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4 RESULTADOS .....	40
4.1. CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA.....	40
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA N4S11-SC2 RECOMBINANTE .....	42
4.3. AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DA PROTEÍNA QUIMÉRICA N4S11-SC2 .....	42
5 DISCUSSÃO.....	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
7 CONCLUSÃO .....	52
REFERÊNCIAS .....	53
ANEXOS.....	59
ANEXO 1- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa .....	59
ANEXO 2 – Artigo publicado.....	62
ANEXO 3 – Patente depositada .....	85

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Esta tese é requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical (PPG-IMT) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e está inserida dentro da linha de pesquisa —Clínica, diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e tropicais II, que propõe a avaliação de biomarcadores diagnósticos, assim como do tratamento e do seguimento terapêutico dos pacientes acometidos por doenças infecciosas e tropicais.

Durante os quatro anos do doutorado, a aluna realizou suas atividades no laboratório do Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, em Criciúma (SC), por meio de uma parceria com o Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, orientador da tese. Nesse período, dedicou-se à predição de epítomos para diferentes projetos, resultando nas publicações de diversos artigos e no depósito de patentes. Além disso, desenvolveu projetos na área de biotecnologia sob a supervisão do Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, que também resultaram em diversas publicações.

A aluna realizou um Doutorado Sanduíche no Exterior (SWE) pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob o protocolo nº 200509/2022-5. Durante seis meses, esteve no Instituto de Biomoléculas Max Mousseron, vinculado à Universidade de Montpellier, na França, sob a supervisão da Prof. Dra. Magali Gary-Bobo. Nesse período, desenvolveu pesquisas sobre nanopartículas aplicadas ao tratamento de diversas condições, incluindo as leishmanioses.

Toda a minha trajetória me possibilitou me desenvolver como pesquisadora, adquirindo experiência nas áreas de Bioinformática, Biologia Molecular, Imunologia, Parasitologia e Biotecnologia, de forma que me encontro capacitada para contribuir com minha formação no enfrentamento de grandes questões sociais, econômicas e de saúde pública em nosso país.

## 1 INTRODUÇÃO

A doença por coronavírus, ou COVID-19 (do inglês *coronavirus disease*), causada pelo vírus denominado SARS-CoV-2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), surgiu em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, na China, e rapidamente se tornou uma pandemia global, desafiando sistemas de saúde, economias e sociedades em escala sem precedentes. A infecção é caracterizada por uma ampla gama de manifestações clínicas, que vão desde casos assintomáticos ou leves, com sintomas semelhantes aos de uma gripe, até formas graves que podem evoluir para pneumonia, insuficiência respiratória e óbito (ASSELAH *et al.*, 2021; PASCARELLA *et al.*, 2020). Com elevada transmissibilidade e uma dinâmica viral complexa, o controle da doença depende de estratégias abrangentes que incluem medidas de prevenção, tratamentos eficazes e diagnósticos precisos (XIE *et al.*, 2023).

A rápida disseminação do SARS-CoV-2 ressaltou a importância de diagnósticos confiáveis e acessíveis para a contenção da pandemia. A identificação precisa e eficiente de agentes infecciosos é fundamental para conter a propagação de doenças e mitigar seus impactos na saúde pública (CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022). Um diagnóstico rápido, seguro, sensível e específico é crucial para reduzir a transmissão viral, otimizar a vigilância epidemiológica e direcionar intervenções clínicas eficazes. No contexto da COVID-19, o diagnóstico envolve diferentes abordagens, incluindo técnicas baseadas em ácido nucleico, imunoenaios, radiografias e biossensores (NEMATI *et al.*, 2023).

Entre essas metodologias, a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) destaca-se como a mais amplamente utilizada, sendo considerada o padrão-ouro para a detecção do SARS-CoV-2 (EL-DALY, 2024). O método baseia-se na amplificação e detecção de ácidos nucleicos virais em amostras respiratórias, como swabs nasofaríngeos e orofaríngeos. Sua elevada especificidade o tornou a principal referência para o diagnóstico molecular da COVID-19. Contudo, a janela de detecção do RT-PCR depende da fase da infecção e da carga viral presente nas amostras. A sensibilidade do teste é maior nos primeiros dias após o início dos sintomas, quando a concentração viral nas vias respiratórias superiores atinge níveis mais elevados (NEMATI *et al.*, 2023; TAHAMTAN; ARDEBILI, 2020).

Além do diagnóstico molecular, a identificação de anticorpos específicos é uma ferramenta valiosa, especialmente para a detecção de infecções assintomáticas ou em casos suspeitos com resultados negativos de RT-PCR. Os níveis de anticorpos são indicadores importantes em estudos epidemiológicos para avaliar a extensão da disseminação do vírus, a intensidade da infecção, a eficácia de programas de controle e o monitoramento de surtos (CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022; LI, D.; LI, 2021).

As imunoglobulinas mais comumente avaliadas nesses testes são a IgM, a IgG e a IgA. A IgM é o primeiro anticorpo produzido durante a resposta imune inicial, geralmente detectável entre 4 e 10 dias após a infecção, sendo um marcador de infecção ativa e recente. Posteriormente, a IgG é gerada para respostas imunológicas mais específicas, com níveis detectáveis entre 11 e 24 dias após a infecção (CHENG *et al.*, 2020). A IgA, por sua vez, desempenha um papel importante na resposta imune mucosa, potencializando mecanismos celulares que contribuem para a inibição de microrganismos (ZHANG, Q. *et al.*, 2021). Essas imunoglobulinas podem ser detectadas em diversas matrizes biológicas, como sangue, saliva, secreções nasofaríngeas, lágrimas e amostras do trato genitourinário, embora o sangue seja a matriz mais amplamente validada (NEMATI *et al.*, 2023).

Nos testes sorológicos para COVID-19, as proteínas S (spike) e N (nucleocapsídeo) são os principais alvos antigênicos. A proteína N, mais conservada entre os coronavírus, é capaz de induzir uma resposta imune precoce, enquanto os anticorpos neutralizantes estão predominantemente direcionados para a proteína S. Testes específicos para IgA anti-SARS-CoV-2, direcionados à proteína S, demonstram sensibilidade de 96,9% e especificidade de 98,3% quando realizados entre 11 e 60 dias após a infecção (GRZELAK *et al.*, 2020; VENGESAI *et al.*, 2023b).

Apesar de sua relevância, os testes sorológicos apresentam limitações, como a possibilidade de reatividade cruzada entre anticorpos gerados contra o SARS-CoV-2 e outros coronavírus (TALEGHANI; TAGHIPOUR, 2021). Para mitigar essa imprecisão, estratégias específicas podem ser adotadas, incluindo a utilização de anticorpos direcionados a epítomos exclusivos do SARS-CoV-2, reduzindo a chance de resultados falso-positivos (GRIFONI *et al.*, 2020). A combinação de métodos moleculares e sorológicos continua a ser uma abordagem estratégica para o diagnóstico preciso e o monitoramento epidemiológico da COVID-19,

especialmente em cenários onde a dinâmica da transmissão viral apresenta desafios constantes (RAJADHYAKSHA; LONDHE, 2021).

Apesar dos avanços no diagnóstico e prognóstico da COVID-19, desafios significativos persistem quanto à melhoria da precisão diagnóstica e acessibilidade. A heterogeneidade clínica da doença dificulta a identificação de biomarcadores universalmente confiáveis para a detecção precoce, estratificação de risco e monitoramento a longo prazo (NEMATI *et al.*, 2023). Assim, têm se a integração de abordagens inovadoras para superar tais limitações.

O avanço científico no enfrentamento da COVID-19 trouxe também a oportunidade de explorar novas fontes biológicas para diagnósticos. Nesse sentido, a utilização de amostras não invasivas, como a urina, tem ganhado destaque devido à sua facilidade de coleta e potencial para análise longitudinal (YE, Y. *et al.*, 2021). A investigação de biomarcadores nessa matriz pode contribuir para uma abordagem diagnóstica mais acessível e diversificada, ampliando a capacidade de resposta a emergências em saúde pública (NAGAOKA *et al.*, 2021). Essas características tornam a urina uma matriz ideal para estudos longitudinais e exames de monitoramento de rotina, além de aumentar a adesão dos pacientes e viabilizar programas de rastreamento em larga escala (RAMOS *et al.*, 2023b).

Desta forma, este estudo propôs o desenvolvimento de um antígeno quimérico recombinante expresso em sistema procariótico, posicionado como um marcador diagnóstico alternativo para a infecção por SARS-CoV-2. Esse antígeno apresenta potencial para ser utilizado em amostras de soro e urina de pacientes infectados, ampliando as possibilidades diagnósticas com uma abordagem menos invasiva e mais acessível. Tal estratégia pode contribuir para a implementação de novas soluções diagnósticas, especialmente em contextos em que a coleta de amostras tradicionais apresenta limitações.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A pandemia de COVID-19 teve início em dezembro de 2019, quando a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi alertada sobre diversos casos de pneumonia de etiologia desconhecida que estavam ocorrendo na população da cidade de Wuhan, província de Hubei, na República Popular da China. No início a COVID-19 surgiu em vários hospitais locais de Wuhan (JIN *et al.*, 2020). Com base em manifestações clínicas, exames de sangue e radiografias torácicas, os médicos diagnosticaram a doença como pneumonia induzida por vírus (XIONG *et al.*, 2020). A investigação epidemiológica inicial sugeriu que a maioria dos casos suspeitos estava associada à exposição ao mercado de frutos do mar de Huanan. Além de frutos do mar, muitos tipos de animais selvagens vivos eram vendidos nesse mercado durante todo o ano, até que foi fechado em 1º de janeiro do ano seguinte. O vírus posteriormente denominado SARS-CoV-2 foi isolado em amostras ambientais do mercado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças da China, indicando a origem do surto (HUANG *et al.*, 2020; JIN *et al.*, 2020).

Em janeiro de 2020, semanas após a identificação do novo coronavírus pelas autoridades chinesas, a OMS declarou o surto como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), constituindo um estado de alerta que evoca uma resposta internacional coordenada e imediata. Em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi caracterizada pela OMS como uma pandemia, atestando a existência de surtos de COVID-19 em diferentes países e regiões do mundo. No Brasil, em 20 de março de 2020 foi decretado estado de calamidade pública (BRASIL, 2023). Desde então, o vírus se disseminou intensamente, somando mais de 775 milhões de casos confirmados e mais de 7 milhões de óbitos no mundo todo, até abril de 2024 (JOHNS HOPKINS, 2024). No Brasil, ainda sob perspectiva de subnotificações, foram registrados mais de 38 milhões casos da doença e mais de 712 mil mortes (BRASIL, 2024). O controle da doença e a melhoria do cenário epidemiológico avançaram concomitantemente com a campanha de vacinação. Em abril de 2022, quase dois anos após o início da pandemia, o Ministério da Saúde publicou a Portaria GM/MS no 913/20223, que declarou o encerramento da ESPII da COVID-19 ao considerar a capacidade de resposta do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2023).

## 2.1 SINTOMATOLOGIA DA COVID-19

Inicialmente, os primeiros sintomas observados incluíam febre alta, tosse seca persistente e fadiga extrema. Além destes, pacientes relataram dores musculares, nas articulações, dor de garganta e, menos frequentemente, sintomas gastrointestinais como diarreia e náuseas. A inespecificidade dos sintomas e a similaridade com outras doenças respiratórias, somados ao desconhecimento acerca da transmissão, contribuíram para a dificuldade na identificação do novo vírus (HUANG *et al.*, 2020).

Com a evolução da compreensão da doença, os sintomas relacionados à COVID-19 se expandiram para incluir uma gama mais ampla de manifestações. Atualmente, a lista de manifestações inclui congestão nasal, náusea, vômito e diarreia. Os pacientes apresentam sintomatologia de intensidade variando de leve a grave, sendo que alguns pacientes desenvolvem pneumonia e dificuldade respiratória, evidenciadas por achados em exames de imagem. Além disso, uma parcela dos pacientes apresenta a infecção de forma assintomática. Em casos mais severos, a condição pode progredir para síndrome de dificuldade respiratória aguda (SDRA), necessitando de suporte ventilatório. Adicionalmente, alguns pacientes manifestam septicemia e choque séptico, exigindo cuidados intensivos. Nos quadros mais críticos, essas complicações podem resultar em falência múltipla de órgãos e, eventualmente, óbito (GUAN *et al.*, 2020; ZHANG, D. *et al.*, 2024; ZHU *et al.*, 2020).

Hoje, sabe-se que a gravidade dos casos de COVID-19 é influenciada por fatores como idade, comorbidades como diabetes, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares crônicas, carga viral e resposta imunológica individual, e exacerbada por condições pré-existentes como doenças renais e hepáticas. Estudos confirmam que a presença de condições subjacentes, como diabetes, doenças cardíacas e câncer, aumenta significativamente o risco de mortalidade em pacientes infectados pelo vírus (HARCOURT *et al.*, 2020; WANG; TANG; WEI, 2020; WU *et al.*, 2020).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS

O SARS-CoV-2, um novo membro da família *Coronaviridae*, foi identificado como o agente etiológico da COVID-19 (DUAN *et al.*, 2020a). Nesta família, os coronavírus pertencem à ordem *Nidovirales*. Esta família se divide em duas subfamílias: *Coronavirinae* e *Torovirinae*. A subfamília *Coronavirinae* se

subdivide ainda em quatro gêneros: Alpha-, Beta-, Gamma- e Deltacoronavirus. Análises filogenéticas mostraram que o SARS-CoV-2 está intimamente relacionado aos beta-coronavírus (KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020; NAQVI *et al.*, 2020)

Os coronavírus são vírus envelopados de RNA de sentido positivo, variando de 60 nm a 140 nm de diâmetro, com projeções em forma de espícula na superfície que lhes conferem uma aparência de coroa, de onde recebem o nome “coronavírus” (CHAN-YEUNG; XU, 2003). Dois Alfacoronavírus, NL63, 229E e dois Betacoronavírus HKU1, e OC43, têm circulado entre humanos há muitas décadas, geralmente causando doenças respiratórias leves como resfriados comuns. Nos últimos vinte anos, os betacoronavírus romperam a barreira das espécies duas vezes, quando transitaram de animais para humanos provocando doenças graves (SINGHAL, 2020).

A primeira ocorrência foi em 2002-2003, quando um novo coronavírus originário de morcegos, foi transmitido para humanos através do hospedeiro intermediário na província de Guangdong, China (CHAN-YEUNG; XU, 2003). Este vírus, denominado SARS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave), afetou 8422 pessoas, principalmente na China e em Hong Kong, com uma taxa de mortalidade de 11%, causando a morte de em torno de 916 pessoas antes de ser contido (PRABAKARAN *et al.*, 2006). Em 2012, o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), também de origem em morcegos, surgiu na Arábia Saudita com camelos dromedários como hospedeiros intermediários, afetando 2494 pessoas e causando 858 mortes, com uma taxa de letalidade superior de 34% (JIN *et al.*, 2020).

### 2.3 TRATAMENTO

O tratamento da COVID-19 baseia-se no cuidado de suporte e manejo dos sintomas, variando conforme a gravidade (YE, Q.; WANG; MAO, 2020). Os casos podem ser classificados de acordo com a saturação de oxigênio (SpO<sub>2</sub>) do paciente. O manejo de casos leves (SpO<sub>2</sub> de 94%-97%) inclui isolamento domiciliar e tratamento sintomático. Casos moderados (SpO<sub>2</sub> de 90%-94%) requerem admissão hospitalar e oxigenoterapia. Casos graves (SpO<sub>2</sub> ≤ 90% ou SDRA) necessitam de Unidade de Terapia Intensiva (UTI), oxigênio nasal de alto fluxo e ventilação invasiva ou não-invasiva, além do manejo intensivo da SDRA. Em situações de choque séptico, além do manejo de fluidos e antimicrobianos para

infecções secundárias, pode ser necessário o suporte hemodinâmico (ASSELAH *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2020).

Até o momento, alguns tratamentos foram aprovados para o combate à COVID-19 no Brasil e no mundo, abrangendo uma variedade de medicamentos antivirais e terapias com anticorpos monoclonais. Esses tratamentos são indicados com base em critérios específicos, como o estágio da doença, a presença de fatores de risco e a resposta vacinal dos pacientes. A escolha do tratamento mais eficaz e sua administração adequada devem sempre ser guiadas por profissionais de saúde, seguindo diretrizes atualizadas conforme a evolução do cenário pandêmico (FOCOSI *et al.*, 2024).

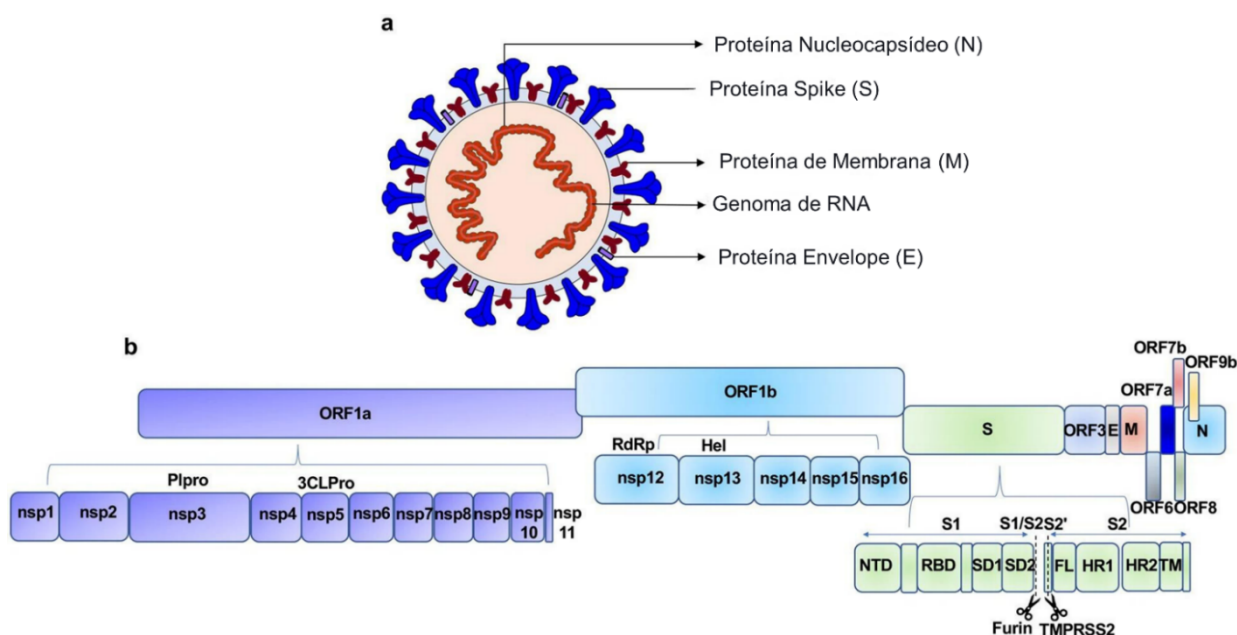
No Brasil, a combinação de nirmatrelvir e ritonavir, conhecida comercialmente como Paxlovid, é recomendada para pacientes com COVID-19 leve a moderada que apresentam alto risco de agravamento, devendo ser administrada dentro de cinco dias após o início dos sintomas. O nirmatrelvir é um inibidor da protease 3CL, que impede a replicação do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras. O ritonavir, por sua vez, é utilizado para retardar o metabolismo do nirmatrelvir. O desenvolvimento do nirmatrelvir foi direcionado especificamente para o tratamento da COVID-19. O Paxlovid foi aprovado de maneira emergencial durante a pandemia pelo Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos e no Brasil pela ANVISA. Os ensaios clínicos conduzidos mostraram benefícios claros no uso do medicamento, demonstrando que o Paxlovid pode reduzir significativamente a hospitalização e a morte em pacientes com risco elevado quando administrado precocemente durante a infecção (FOCOSI *et al.*, 2024; JOYCE; HU; WANG, 2022; ANVISA, 2024).

Outro antiviral, o Molnupiravir, é indicado para casos leves a moderados e precisa ser iniciado logo após os primeiros sintomas. O Remdesivir, um antiviral administrado por via intravenosa, é utilizado principalmente em pacientes hospitalizados com COVID-19 grave, visando impedir a replicação do vírus. Além disso, o Baricitinibe é usado em combinação com Remdesivir para tratar pacientes hospitalizados que necessitam de oxigênio suplementar, incluindo aqueles em ventilação mecânica, enquanto o Tocilizumabe, um anticorpo monoclonal, é empregado para tratar pacientes com uma resposta inflamatória exacerbada. Outros tratamentos incluem o Sotrovimabe, um anticorpo monoclonal utilizado para casos leves a moderados em pacientes com alto risco de agravamento, e a combinação de

Casirivimabe e Imdevimabe, que teve sua aprovação suspensa temporariamente devido à eficácia reduzida contra novas variantes do vírus. O Evusheld, composto por Cilgavimabe e Tixagevimabe, também foi suspenso por questões de eficácia contra variantes emergentes (ANVISA, 2024; FOCOSI *et al.*, 2024).

### 2.3.1 Estrutura viral do SARS-CoV-2

O sequenciamento do genoma do SARS-CoV-2 em janeiro de 2020 mostrou uma identidade de 96% com o genoma do coronavírus de morcego (BatCoV) RaTG13 e 80% com o genoma do SARS-CoV (HARCOURT *et al.*, 2020). O genoma do SARS-CoV-2 possui menos de 30 quilobases e contém 14 fases de leitura aberta (ORFs) que codificam diversas proteínas essenciais para a replicação e montagem do vírus (MOHAMADIAN *et al.*, 2021). O primeiro ORF (1a e 1b) abrange 65% do genoma viral e traduz as poliproteínas virais pp1a (nsp1-11) ou pp1ab (nsp1-16), que após clivadas originam diversas proteínas não estruturais, as quais desempenham papéis importantes na replicação viral (NAQVI *et al.*, 2020). Os demais codificam as principais proteínas estruturais: Spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), além de outras proteínas acessórias (Figura 1).



**Figura 1.** Representação da estrutura viral e genoma do SARS-CoV-2. **(a)** Quatro proteínas estruturais do SARS-CoV-2, incluindo a proteína Spike (S), proteína de Membrana (M), proteína do Nucleocapsídeo (N) e proteína Envelope (E). **(b)** ORFs codificados pelo genoma do vírus, sendo eles: ORF 1a e 1b, S, ORF3, E, M, ORF6, ORF7a e 7b, ORF8, ORF9b e N. Dezesesseis proteínas não estruturais (nsp1–11, 12–16) são codificadas pelos ORFs 1a e 1b, seis proteínas acessórias são codificadas pelos ORFs 3,6,7a e 7b,8, e 9b. Os demais ORFs codificam as proteínas homônimas. Siglas: Plpro: protease tipo papaína. 3CLPro: protease tipo 3C-like. RdRp: RNA polimerase dependente de RNA. Hel: helicase. ORF S codifica: domínio N-terminal NTD, RBD (domínio de

ligação ao receptor), subdomínio 1 (SD1), subdomínio 2 (SD2), laço de fusão (FL), repetição heptad 1 e heptad 2 (HR1 e HR2), domínio transmembrana (TM). A linha pontilhada indica o sítio de clivagem S1/S2 e S2' por Furina e TMPRSS2.

Fonte: Adaptado de Zhang et al., 2021.

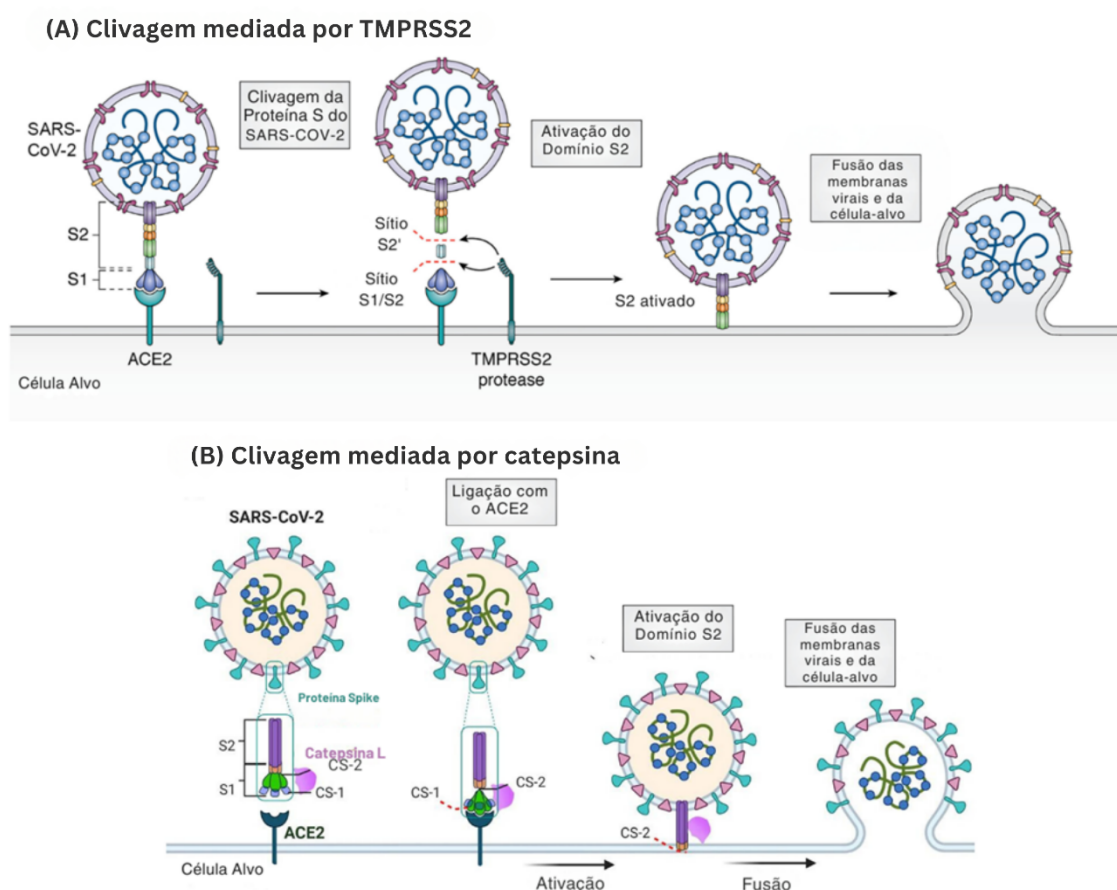
A proteína S é uma proteína transmembranar do tipo I, expressa na superfície do vírus (Figura1a), e composta por subunidades de ligação ao receptor (S1) e de fusão a membrana celular (S2) (DUAN *et al.*, 2020b). Ela possui um papel central na infecção viral e consequentemente na elicitação da resposta imune durante a infecção, pois regula o processo de invasão celular. Já a proteína N, recobre o genoma viral formando o nucleocapsídeo. Ela é uma proteína de ligação ao RNA, crucial para a replicação e a transcrição do SARS-CoV-2, sendo altamente expressa durante a infecção. A proteína M é uma das mais abundantes e bem conservadas na estrutura do vírion, que promove a montagem e brotamento das partículas virais por meio da interação com as proteínas N e acessórias 3a e 7a (ZHANG, Q. *et al.*, 2021). Por fim, a proteína E é o menor componente da estrutura do SARS-CoV-2 e possui a função de facilitar a produção, maturação e liberação dos vírions (KUMAR, S.; SAXENA, 2021).

#### 2.4 MECANISMOS DE INFECÇÃO E RESPOSTA IMUNE

A forma de transmissão mais comum do SARS-CoV-2 ocorre de pessoa para pessoa, após o contato com secreções mucosas nasais e orais de indivíduos infectados, ou da inalação de gotículas provenientes de tosse ou espirro, além da transmissão vertical através da placenta. O período de incubação da COVID-19 varia de 3 a 14 dias, dependendo da saúde imunológica do paciente. Durante a fase assintomática, o SARS-CoV-2, transmitido por aerossóis respiratórios, se liga às células epiteliais nasais no trato respiratório superior (CHAN *et al.*, 2020).

Os coronavírus envelopados provocam infecção através da entrada nas células mediada pela fusão entre as membranas virais e celulares. No caso desta família, a fusão é facilitada pela interação entre proteína S (presente no envelope viral) e pelo receptor correspondente na superfície das células hospedeiras. Neste aspecto, a estrutura da proteína S determina o tropismo e a transmissibilidade viral, sendo que o receptor ao qual a proteína se liga varia de acordo com o vírus (PRABAKARAN *et al.*, 2006).

Mais especificamente, a entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras ocorre através da ligação do domínio S1-RBD da proteína S ao receptor humano da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2). Este receptor é uma proteína de membrana tipo I, expressa principalmente nos pulmões, coração, rins e intestino, associada principalmente a doenças cardiovasculares (CURE; CUMHUR CURE, 2020). O processo de fusão da proteína S com a membrana da célula hospedeira se dá após uma reorganização estrutural, onde proteases de superfície celular do hospedeiro, como a TMPRSS2 (protease serina 2 transmembranar), atuam clivando a proteína S em sítios específicos, expondo regiões que se ligam ao receptor ACE2 formando o núcleo de fusão (Figura 2A) (HARTENIAN *et al.*, 2020). Na ausência de proteases serina, esta ligação é mediada por catepsinas (Figura 2B) (ZHAO *et al.*, 2022).

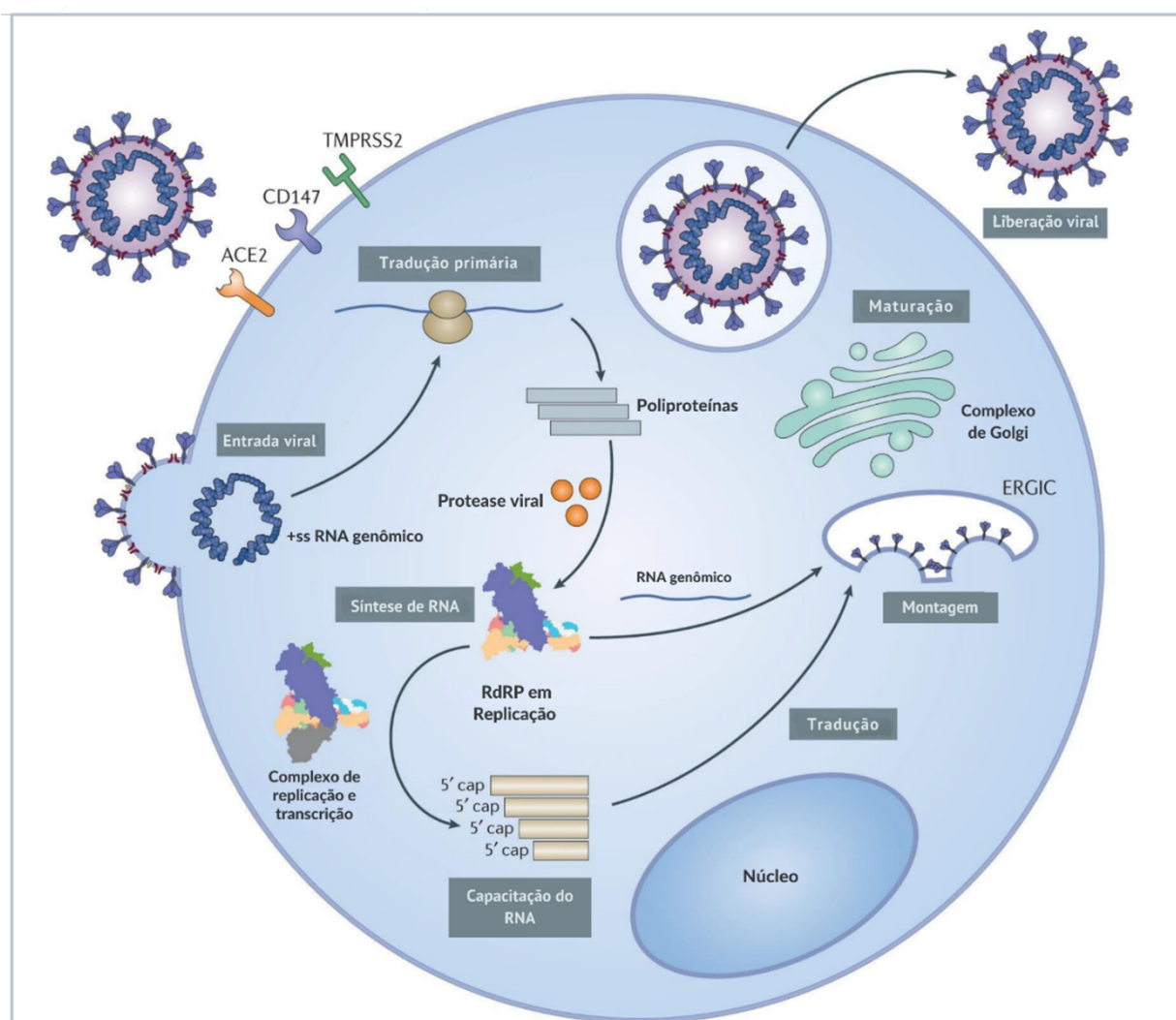


**Figura 2. Mecanismos de invasão da célula hospedeira pelo SARS-CoV-2. (A)** A proteína S do vírus interage com o receptor ACE2 do hospedeiro e é clivada nos sítios S1/S2 e S2' pela protease TMPRSS2. Isso leva à ativação do domínio S2 e promove a fusão das membranas viral e da célula-alvo. **(B)** O sítio CS-1 está localizado no domínio NTD da subunidade S1, e CS-2 está localizado próximo ao sítio S1/S2. Catepsina L (CSTL) cliva a proteína S do SARS-CoV-2 e, ao se ligar à

proteína S, faz a clivagem nos sítios CS-1/CS-2. A clivagem aumenta a dinâmica do RBD e o torna acessível ao ACE2 para ligação. A clivagem do sítio CS-2 expõe a subunidade S2, ativando o domínio para a fusão de membrana. Por fim, o vírus se funde com a membrana da célula alvo, e o material genético viral é liberado na célula hospedeira.

Fonte: Adaptado de Hartenian et al., 2020 e Zhao et al., 2022.

Após a fusão com a membrana, o vírus entra nas células epiteliais alveolares pulmonares e seu conteúdo viral é liberado (Figura 3). O RNA genômico é inicialmente traduzido em poliproteínas (pp1a e pp1ab) que são posteriormente clivadas em proteínas não-estruturais, conforme descrito anteriormente (Figura 3) (KUMAR, S.; SAXENA, 2021). Estas proteínas são responsáveis por garantir a replicação viral e evadir o mecanismo imunológico do hospedeiro.



**Figura 3. Ciclo do SARS-CoV-2:** Após a entrada do vírus na célula hospedeira, as poliproteínas virais são clivadas e se montam nos complexos de replicação e transcrição. Os mRNAs virais subgenômicos (após a capacitação) atuam como templates para a tradução das proteínas virais. Os vírions progenitores são montados no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi e por fim são excitados para completar o ciclo de vida.

Fonte: Adaptado de Yang e Rao, 2021.

A proteína Nsp1, por exemplo, pode impedir as respostas interferon (IFN)-I através da inibição do sistema de tradução do hospedeiro, além de induzir a degradação do mRNA e a repressão da fosforilação do fator de transcrição STAT1 (CHAN *et al.*, 2020). A Nsp3 antagoniza a produção de interferons e citocinas, bloqueando a fosforilação do fator de regulação do interferon 3 (IRF3) e interrompendo a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). As NSPs 14 e 16 cooperam para formar um cap 5' viral semelhante ao do hospedeiro, fazendo com que o genoma de RNA viral não seja reconhecido pelas células do sistema imunológico (HUANG *et al.*, 2020; YANG; RAO, 2021).

Completo o processo de replicação descrito na Figura 3, as novas partículas virais são liberadas via exocitose e iniciam o processo de infecção das células epiteliais adjacentes. Esta fase da infecção dura alguns dias e a resposta imune gerada é limitada, apesar da carga viral baixa, tornando os indivíduos altamente contagiosos e detectáveis (ZHOU; ZHANG; QU, 2020). Nesta etapa, o vírus migra do epitélio nasal para o trato respiratório superior através das vias aéreas condutoras, podendo dar início ao aparecimento dos sintomas como febre, mal-estar e tosse seca. A infecção destas células é acompanhada pelo aparecimento de uma resposta imune, onde o vírus é detectado através de padrões moleculares associados a patógenos, ativando células como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Essas células inatas atuam na contenção inicial do vírus e na apresentação de antígenos para as células T, crucial para a ativação da resposta adaptativa e para a produção subsequente de imunoglobulinas específicas contra o SARS-CoV-2. Além disso, há o recrutamento de células T auxiliares que produzem interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucinas IL-2 e IL-12, além da liberação de CXCL-10 e interferons (IFN- $\beta$  e IFN- $\lambda$ ) produzidos pelas células infectadas. Frequentemente esta resposta é suficiente para conter a disseminação da infecção, fazendo com que a maioria dos pacientes não progrida além desta fase (HOSSEINI *et al.*, 2020; SINGHAL, 2020; XIE *et al.*, 2023).

Quando há a progressão da infecção, o aumento exacerbado da quimiotaxia leva ao desenvolvimento de um desequilíbrio da resposta imune denominado "tempestade de citocinas", que pode precipitar danos aos tecidos e falência de múltiplos órgãos observados em casos graves. Durante o processo de infecção, macrófagos alveolares detectam a lesão celular e respondem às citocinas liberadas inicialmente **pelos células lesionadas**, secretando outras citocinas e

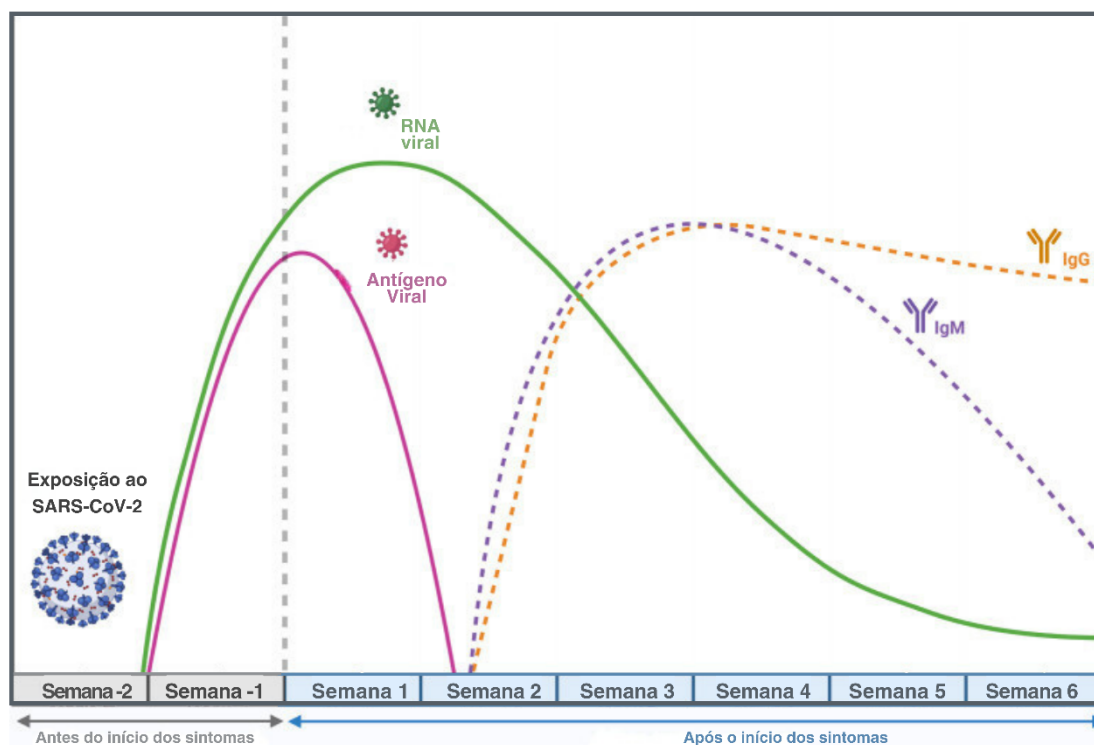
quimiocinas (YE, Q.; WANG; MAO, 2020). Concomitantemente, esta reação no parênquima pulmonar estimula as terminações nervosas responsáveis pelo reflexo da tosse, justificando o aparecimento da tosse seca. Dentre as citocinas secretadas, o fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  contribuem para o processo inflamatório aumentando a permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão e induzindo o recrutamento de mais células, incluindo neutrófilos e monócitos (MERAD *et al.*, 2022).

As células recrutadas se ligam a proteínas de adesão na superfície dos tecidos, adentrando o local da lesão. No entanto, o aumento na permeabilidade vascular causa vazamento de fluido para o espaço intersticial e alvéolos, resultando em edema intersticial e pulmonar (FU; XU; WEI, 2020). Com danos extensos às células alveolares, há uma diminuição na produção de surfactante. Reduzido o controle da tensão superficial, é reduzida também a capacidade de oxigenação, que somada ao edema pode gerar dispneia ou hipoxemia.

Além disso, leucotrienos e prostaglandinas também são produzidas pelas células inflamatórias na tentativa de conter a infecção. Um dos efeitos dos leucotrienos é a broncoconstrição, que levam ao prejuízo na ventilação, contribuindo com a hipoxemia (XIE *et al.*, 2023). A diminuição dos níveis de oxigênio no sangue estimula quimiorreceptores que causam um aumento na taxa inspiratória, visando o aumento dos níveis de oxigênio no sangue, associado ao aumento da frequência cardíaca. Nos pacientes que desenvolvem este nível de infecção, a soma do tecido alveolar danificado, com o acúmulo de fluido, desequilíbrio na ventilação/perfusão e hipoxemia, levam à apresentação da SDRA, considerada a principal causa de mortalidade na COVID-19 (CURE; CUMHUR CURE, 2020; FU; XU; WEI, 2020; SINGHAL, 2020).

Paralelamente, a infecção pelo SARS-CoV-2 também gera uma resposta humoral, com a produção de anticorpos específicos contra proteínas do SARS-CoV-2 (KUMAR, G. V.; JEYANTHI; RAMAKRISHNAN, 2020). Após a ativação pelas células T auxiliares e o reconhecimento de antígenos virais, as células B se diferenciam em plasmócitos que secretam imunoglobulinas específicas. No contexto da infecção pelo SARS-CoV-2, os primeiros anticorpos detectáveis são as IgM, que aparecem geralmente dentro de 7 a 10 dias após o início dos sintomas. As IgM têm um papel crucial na neutralização inicial do vírus, mas sua presença é transitória, geralmente diminuindo após semanas. Paralelamente, as IgA também são

produzidas, especialmente nas mucosas respiratórias, desempenhando um papel importante na defesa das vias aéreas superiores, sendo detectáveis no sangue e nas secreções mucosas aproximadamente na mesma época que as IgM (HOSSEINI *et al.*, 2020; ONG *et al.*, 2021a).



**Figura 4. Perfil temporal dos Biomarcadores na Infecção por SARS-CoV-2.** Variação da presença de Antígeno viral, RNA viral, IgM e IgG detectáveis ao longo do tempo após a exposição ao vírus ao longo de seis semanas após o aparecimento dos sintomas.

Fonte: Adaptado de Christensen; Azar; Turbett, 2022.

Posteriormente, a produção de IgG se intensifica, representando uma resposta mais duradoura e específica. As IgG aparecem aproximadamente duas semanas após a infecção e aumentam gradualmente, atingindo o pico em torno de 3 a 4 semanas, como pode ser observado na Figura 4. Diferente das IgM, as IgG permanecem detectáveis no sangue por um período prolongado. A duração da presença das IgA pode variar, mas elas geralmente permanecem detectáveis por algumas semanas a meses após a infecção inicial (CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022; HOSSEINI *et al.*, 2020).

## 2.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Os ensaios de diagnóstico *in vitro* provaram ser uma parte essencial da estratégia completa para controlar a pandemia da COVID-19. A detecção do SARS-

CoV-2 através de abordagens moleculares, como testes de ácido nucleico, foram fundamentais para confirmar casos suspeitos. Esses métodos são rápidos e eficazes na detecção da infecção pelo novo coronavírus (EL-DALY, 2024). Após o surto inicial, testes diagnósticos baseados na detecção da sequência viral por RT-qPCR ou plataformas de sequenciamento de próxima geração tornaram-se prontamente disponíveis, tendo sido rapidamente implementados como parte das estratégias de saúde pública para controlar a disseminação da COVID-19.

Muitos kits foram disponibilizados para detectar o genoma viral, com foco nos genes ORF 1b, N, E ou S. O vírus pode ser encontrado em amostras provenientes de swabs de garganta, saliva posterior orofaríngea, swabs nasofaríngeos, escarro e fluido brônquico, embora amostras do trato respiratório inferior tenham sido encontradas com a carga viral mais alta (UMAKANTHAN *et al.*, 2020; XIE *et al.*, 2023; ZHANG, D. *et al.*, 2024). Os testes moleculares, no entanto, podem resultar em resultados falsos positivos e negativos, e apresentam uma janela de detecção limitada ao período inicial da infecção apesar de sua sensibilidade e especificidade. Além disso, requerem infraestrutura laboratorial especializada, muitas vezes indisponível em áreas com recursos limitados (HUANG *et al.*, 2020).

Quando a carga viral diminui com a progressão da doença, outros métodos de detecção são necessários para diagnosticar a COVID-19. Embora os testes sorológicos não sejam atualmente aplicáveis para diagnosticar uma infecção aguda por si só, eles podem indicar a presença de anticorpos gerados por uma infecção anterior e/ou vacinação (EL-DALY, 2024). Os testes sorológicos desempenham um papel fundamental não apenas em estudos populacionais de vigilância epidemiológica, mas também no contexto clínico, especialmente para pacientes com diagnóstico tardio de COVID-19. Sua relevância se destaca entre indivíduos com comorbidades, complicações associadas à doença e sintomas persistentes característicos da chamada "COVID longa." Além disso, fatores como histórico vacinal e infecções prévias podem interferir na interpretação diagnóstica, tornando os testes sorológicos ferramentas valiosas para complementar o diagnóstico e monitoramento dessas condições (MATTA *et al.*, 2022; ONG *et al.*, 2021b).

O vírus SARS-CoV-2 sofreu mutações ao longo do tempo, resultando em variação genética na população de cepas virais circulantes. Essas mutações afetaram o desempenho diagnóstico de testes moleculares e sorológicos distintos,

levando à redução da precisão. Portanto, é importante buscar e obter opções alternativas de diagnóstico com o objetivo de melhorar a qualidade do diagnóstico da infecção, especialmente entre as populações vulneráveis que apresentam comorbidades (ONG *et al.*, 2021b).

A seleção de proteínas recombinantes do SARS-CoV-2 é essencial para o desenvolvimento de um teste sorológico confiável. Entre as quatro proteínas estruturais do SARS-CoV-2, as proteínas N e S são as mais imunogênicas e, portanto, as mais empregadas em testes sorológicos. A proteína N pode ser expressa com eficiência em sistemas procarióticos, mantendo uma boa imunorreatividade. No entanto, a proteína S tem sido expressa preferencialmente em sistemas eucarióticos, que frequentemente geram modificações pós-traducionais (LI, D.; LI, 2021; LIU *et al.*, 2020).

Os testes sorológicos usam comumente amostras de soro para detectar a doença. No entanto, a coleta de amostras de soro apresenta uma taxa significativa de complicações, pois pode ser desagradável e requer um flebotomista treinado. Em contrapartida, a coleta de urina para detectar anticorpos específicos é menos dispendiosa e as amostras são fáceis de armazenar e, portanto, podem ser convenientes para estudos clínicos e epidemiológicos (LUDOLF *et al.*, 2022; RAMOS *et al.*, 2023a).

Testes baseados em urina para detectar anticorpos foram sugeridos como uma alternativa não invasiva, de simples execução e segura para detectar anticorpos N e S anti-SARS-CoV-2. Nesses estudos, um teste de ELISA baseado em urina para identificar anticorpos anti-proteína N apresentou sensibilidade e especificidade de 94,0% e 100%, respectivamente em pacientes não vacinados. Enquanto isso, o mesmo ensaio usando a proteína S purificada de um sistema procariótico mostrou sensibilidade e especificidade de 89,0% e 97,0%, respectivamente. Curiosamente, quando amostras de soro coletadas dos mesmos pacientes foram testadas contra o antígeno procariótico S, os resultados mostraram sensibilidade de 40,0% e especificidade de 98,0%, destacando a dificuldade de obter antígenos com alta precisão derivados de sistemas procarióticos de purificação (LUDOLF *et al.*, 2022; RAMOS *et al.*, 2023b).

### 2.5.1 Seleção de epítomos por ferramentas de bioinformática

Independente da amostra biológica avaliada, os antígenos diagnósticos devem ser empregados para elevar a sensibilidade e especificidade dos testes laboratoriais. Nesse contexto, proteínas quiméricas baseadas em epítomos de células B são propostas como vantajosas em comparação com as proteínas recombinantes individuais, pois apresentam maior antigenicidade contra diversas amostras biológicas (JAVADI MAMAGHANI *et al.*, 2021; VENGESAI *et al.*, 2023a).

Além disso, as ferramentas de bioinformática usadas para a predição de epítomos de células B permitem a identificação de regiões de importância das proteínas virais que são reconhecidas pelo sistema imunológico, podendo ser empregados para o desenvolvimento de testes sorológicos contribuindo para uma identificação mais sensível de anticorpos específicos do SARS-CoV-2 (OLIVEIRA; DE MAGALHÃES; HOMAN, 2020; SCUSSEL *et al.*, 2022).

Análises de bioinformática e/ou *microarray* foram aplicadas para identificar epítomos de células B derivados do SARS-CoV-2, com os peptídeos correspondentes demonstrando um bom desempenho diagnóstico (LI, D.; LI, 2021; MUSICÒ *et al.*, 2021; VENGESAI *et al.*, 2023a). Javadi Mamaghani *et al.*, projetaram uma proteína SARS-CoV-2 com múltiplos epítomos e o antígeno mostrou boa eficácia sorodiagnóstica (JAVADI MAMAGHANI *et al.*, 2021). Os epítomos de células B do SARS-CoV-2 identificados pela análise de síntese SPOT foram incorporados como uma proteína quimérica, e o antígeno também mostrou potencial diagnóstico contra a infecção, sugerindo que este pode ser um caminho viável para a produção de testes diagnósticos com maior acurácia (GOMES *et al.*, 2021).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo geral aplicar ferramentas de bioinformática para projetar uma nova proteína quimérica contendo epítomos específicos de células B preditos nas sequências de aminoácidos das proteínas S e N do vírus SARS-CoV-2, a fim de desenvolver um novo antígeno recombinante alternativo para a detecção de COVID-19 em amostras de soro e urina dos pacientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nova proteína quimérica recombinante baseada em epítomos específicos de células B preditos nas sequências das proteínas Spike (S) e Nucleocapsídeo (N) do vírus SARS-CoV-2, e avaliar seu uso no diagnóstico da infecção por COVID-19 em amostras de soro e urina dos pacientes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a predição de epítomos específicos de células B das proteínas Spike (S) e Nucleocapsídeo (N) do vírus SARS-CoV-2, através dos programas de bioinformática ABCpred e IEDB.
- Desenhar o gene codificador da proteína quimérica a partir dos epítomos selecionados; expressar e purificar a proteína utilizando tecnologia recombinante.
- Avaliar a presença de anticorpos específicos em amostras de soro e urina de pacientes sintomáticos e com RT-qPCR confirmatório para SARS-CoV-2, através do teste de ELISA.
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da proteína quimérica em comparação com as proteínas N e S recombinantes.
- Comparar os resultados obtidos com amostras de soro e urina em pacientes imunizados com a vacina Janssen Ad26.COVID-19.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, Brasil) sob o protocolo CAAE 30.437.020.9.0000.5149. (ANEXO I). Foram incluídos no estudo adultos do sexo masculino ou feminino que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os pacientes (n = 79) com sintomas clínicos e que procuraram assistência hospitalar foram avaliados pelo médico assistente e incluídos neste estudo após a confirmação da infecção por SARS-CoV-2 através do teste de qRT-PCR positivo. Além disso, foram incluídos no estudo indivíduos vacinados contra a COVID-19 com a vacina Janssen Ad26.COV2.S e qRT-PCR negativo para SARS-CoV-2.

#### 3.2 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B E CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA

Para a predição de epítopos foram consideradas as proteínas Spike (S) e Nucleocapsídeo (N). A predição seguiu o protocolo descrito por Scussel *et al.*, 2022. Para tal, os códigos YP\_009724390.1 (Proteína S) e YP\_009724397.2 (Proteína N) foram identificados e as sequências FASTA disponibilizadas pelo programa GenBank. Utilizou-se o programa IEDB ([www.iedb.org](http://www.iedb.org)) para identificar na estrutura primária das proteínas os aminoácidos com maior probabilidade de acessibilidade. Para determinação dos aminoácidos acessíveis nas proteínas, utilizou-se a ferramenta “*B Cell Epitope Prediction*” do programa IEDB, através do recurso “*Antigen Sequence Properties*” para a predição de epítopos lineares, com o método “*Emini Surface Acessibility Prediction*”. Foram utilizados três parâmetros de análise diferentes para posterior comparação: Valores de *window size* 10 e *threshold*: 1,0; valores de *window size* 12 e *threshold*: 1,0; e valores de *window size* 14 e *threshold*: 1,0. Os aminoácidos considerados positivos pelo programa (com score acima do *threshold* selecionado) foram então destacados na estrutura da proteína.

Posteriormente também foi utilizado o programa ABCpred <[www.imtech.res.in/raghava/abcpred/](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/)> para a predição de epítopos lineares de células B com base em padrões de comprimento fixo através de uma rede neural

artificial. Utilizaram-se como parâmetros de análise os valores de *window size*: 10 e *threshold* 0,85; valores de *window size*: 12 e *threshold* 0,85; e valores de *window size*: 14 e *threshold* 0,85. Estas sequências foram também destacadas na estrutura primária da proteína. Os resultados encontrados forneceram diferentes regiões potencialmente epitópicas, as quais foram comparadas com o auxílio do programa *Clustal Omega* <<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>, que faz o alinhamento de múltiplas sequências.

Por fim, as sequências foram observadas na estrutura tridimensional das proteínas para analisar sua posição e distribuição. A configuração espacial das proteínas foi analisada para observar se as sequências previstas estavam posicionadas de forma a permitir e/ou facilitar o reconhecimento. Para isso, as estruturas foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) <<https://www.rcsb.org/>> e os epítomos foram selecionados e identificados na estrutura tridimensional utilizando o software SwissPDB-viewer, versão 4.10. Para a proteína S (YP\_009724390.1) e a proteína N (YP\_009724397.2), foram utilizadas as estruturas do PDB com código "6xr8A" e "8FD5", respectivamente.

Foram selecionados onze epítomos para a proteína S e quatro para a proteína N. Para construção da quimera, os epítomos designados de ambas as proteínas foram unidos por peptídeos de ligação -GPGPG- com o objetivo de proporcionar flexibilidade e evitar a sobreposição espacial (ABRAHAM PEELE *et al.*, 2021). A disposição dos peptídeos na proteína quimérica foi atribuída de acordo com as suas posições nas proteínas originais, preservando a sequência em que aparecem. A ferramenta Protparam, disponível no portal ExPASy <<https://web.expasy.org/protparam/>> foi utilizada para a caracterização físico-química *in silico* da proteína quimérica. Nessa etapa, a nova proteína foi submetida novamente ao ABCPred para confirmar se os peptídeos ainda seriam sugeridos como regiões epitópicas.

### 3.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA

As sequências de aminoácidos da nova proteína foram traduzidas para sequência de códons de DNA correspondente, utilizando o Mapa do Código Genético Padrão (STRYER; TYMOCZKO; BERG, 2004). Para a expressão da proteína quimérica, bactérias *E. coli* BL21 foram transformadas pela adição do vetor pET28a-TEV obtido comercialmente (Genscript®, Piscataway, NJ, EUA), contendo a

sequência do gene codificante da proteína de interesse. A proteína foi expressa pela adição de 0,2 mM de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG; Promega, Madison, WI, EUA) por 2 h a 37 °C em 1 litro de meio Luria Bertani (LB), 36 mg/L. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 3000×g por 10 min a 4°C e suspensas em tampão de lise (Tris-HCL, 20 mM, pH 8,0; NaCl, 0,5M; imidazol, 5mM; ureia, 8M;  $\beta$ -mercaptoetanol, 1mM), seguido de seis ciclos de ultrassom por 30s cada (a 90 Hz). Os restos celulares foram removidos após centrifugação de 5000 × g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A proteína N4S11-SC2 foi purificada em uma coluna de afinidade HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EUA) conectada a um sistema AKTA. Os corpos de inclusão foram solubilizados em tampão de ureia 2M. Foi realizado um SDS- PAGE de 12,5% (p/v) para avaliar a pureza da proteína recombinante. A escada de proteínas sem coloração de amplo alcance Page Ruler (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lituânia) foi utilizada (RAMOS *et al.*, 2023b).

### 3.4 AMOSTRAS HUMANAS

Amostras pareadas de urina e soro (n = 135) de pacientes hospitalizados foram coletadas no primeiro dia de inclusão e, sempre que possível, nos dias 1, 3, 7 e 14 após o recrutamento; assim, variando o dia correspondente ao início pós-sintoma para cada paciente. As amostras foram coletadas antes do início da vacinação contra a COVID-19 no Brasil e amostras coletadas antes de 2019 foram consideradas verdadeiramente negativas e chamadas de "negativas pré-COVID-19" (n = 10 de urina e n = 14 de soro). Amostras de indivíduos que mantiveram uma quarentena rigorosa e não apresentaram nenhum sintoma foram consideradas teoricamente negativas e chamadas de "negativas pós-COVID-19" (n = 11 urina e n = 6 soros). Amostras de indivíduos vacinados contra a COVID-19 pela Janssen Ad26.COV2.S (n = 40) foram incluídas neste estudo e coletadas após o início da vacinação contra a COVID-19 no Brasil. As amostras de urina e soro foram coletadas e armazenadas conforme descrito por Ludolf *et al.* (LUDOLF *et al.*, 2022). As urinas foram diluídas em azida sódica a 0,1% (p/v) e armazenadas a 4 °C, enquanto as amostras de soro foram armazenadas a -20 °C, até o uso.

### 3.5 IMUNOBLOTTINGS

Para avaliar a capacidade do antígeno em ser reconhecido pelos anticorpos presentes nas amostras dos pacientes, foram conduzidos ensaios de imunoblotting. Foi preparado um gel SDS-PAGE 12,5%, ao qual foram aplicados 2µg da proteína quimérica purificada. Em seguida a proteína foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (tamanho de poro de 0,2 µm, Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução de PBS mais 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) e 1% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA; Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Alemanha), por 16 horas a 37°C, seguida de incubação com anticorpo 6-HIS tag (1 mg/mL, MA1-21315; Invitrogen; Rockford, IL, EUA). Os pools de soros infectados (n= 9) e negativos pré-pandemia (n=9) foram adicionados por 1h a 37°C, com diluição de 1:100 em PBS-T e anticorpo anti-HIS diluído 1:3000 em PBS-T. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS-T, e incubadas com uma solução de anti-corpo IgG anti-humano conjugado com peroxidase (A18811; Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA), diluído 1:15.000 em PBS-T, por 1h a 37°C. A revelação das bandas foi realizada através da adição de cloronaftol, diaminobenzidina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 min, sendo interrompidas com água destilada. O padrão de massa molecular para proteínas Page Ruler™ Pre-stained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific Baltics, Vilnius, Lituânia) foi utilizado.

### 3.6 ELISA

Inicialmente, curvas de titulação foram realizadas para determinar a concentração mais adequada de antígenos, anticorpos, diluição da amostra e tempo de incubação a serem utilizados nos ensaios. Após a determinação das concentrações, placas de imunoensaio com 96 poços (Nunc MaxiSorp™; Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) foram revestidas com 400 ng/poço da proteína quimérica em tampão carbonato pH 9,6 por 18 horas a 4°C para sensibilização. Em seguida, os poços foram bloqueados com uma solução de PBS-T e 1% de BSA por 2 horas a 37°C. Após o bloqueio, foram adicionados 100 µL/poço de amostras de urina (não diluída) ou soro (diluído 1:100 em PBS-T) e a incubação ocorreu por 1 hora ou 30 min para amostras de urina ou soro respectivamente, a 37°C. O anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (A18811, diluído 1/10.000 em PBS-T; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas novamente por 1 hora ou 30 min a 37°C, para amostras de

urina ou soro respectivamente. Foram realizadas lavagens antes e após a etapa de incubação e após a etapa de adição do conjugado. Após a última lavagem, as reações foram reveladas pela adição de TMB (3,3',5,5-tetrametilbenzidina) e incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz. As reações foram interrompidas com a adição de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5M e os valores de densidade óptica (DO) foram lidos em um espectrofotômetro de microplacas (Multiskan Go, ThermoFisher, Finlândia), a 450 nm. Os valores de corte foram determinados como a média mais 2,5 e 2,3 vezes o desvio padrão das amostras negativas para o ensaio de urina e soro respectivamente. O índice (I) para cada amostra foi calculado usando a equação  $I = (\text{DO } \lambda 450 \text{ nm}) / (\text{cut-off})$ . O valor do índice foi classificado como positivo acima de 1,1, indeterminado entre 0,8 e 1,1 e negativo abaixo de 0,8. As proteínas recombinantes procarióticas, N e S (Prok2-S1) foram utilizados como controles para comparar o desempenho da proteína quimérica usando amostras de soro e urina (n = 72 cada), que foram obtidas oito dias após o início dos sintomas.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism™ (versão 8.0 para Windows; EUA). As distribuições de valores (média (M)  $\pm$  desvio padrão) foram obtidas para variáveis contínuas, enquanto as categóricas foram avaliadas como proporções. As curvas ROC (Receiver Operator Characteristic) foram construídas com os valores de DO de amostras positivas (infecção por SARS-CoV-2) versus negativas (pré-COVID-19 e pós-COVID-19 negativas). O desempenho do diagnóstico foi avaliado pela estimativa da sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sobre a curva (AUC) e índice de Youden (J). Os intervalos de confiança (IC) foram definidos no nível de confiança de 95% (IC 95%). Um teste t pareado foi usado para comparar diferentes grupos e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os valores preditivos positivos e negativos (VPP e VPN respectivamente) foram calculados com base no valor do índice, excluindo as amostras de valor indeterminado e usando a equação  $\text{VPN} = \text{verdadeiro negativo} / \text{falso negativo} + \text{verdadeiro negativo}$  e  $\text{VPP} = \text{verdadeiro positivo} / \text{falso positivo} + \text{verdadeiro positivo}$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1. CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA

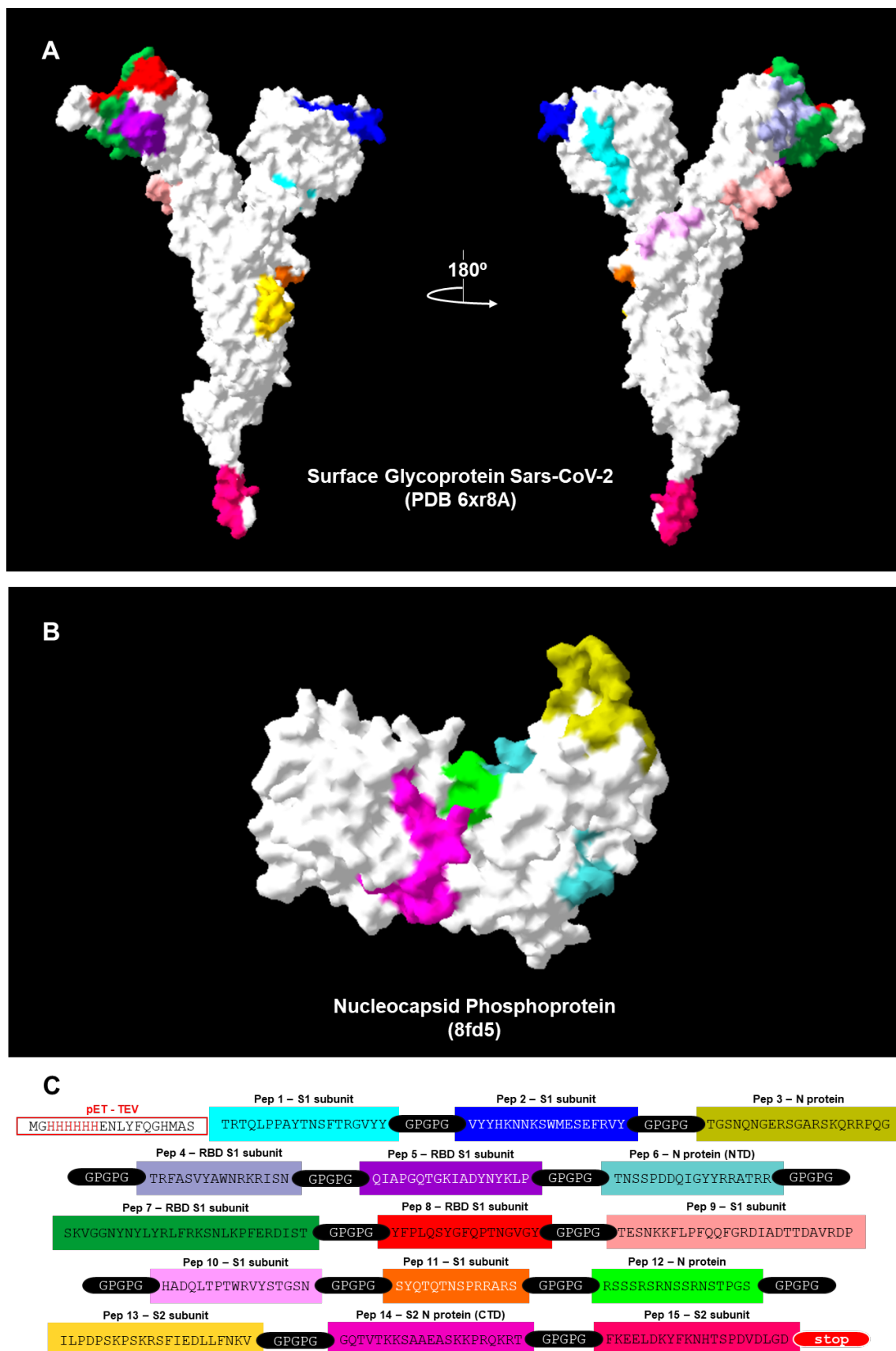
As sequências da Proteína S (YP\_009724390.1) e Proteína N (YP\_009724397.2) foram avaliadas por bioinformática e os resultados são mostrados (Figura 1A). Foram selecionados onze epítomos de células B para a Proteína S e quatro para a Proteína N (Figura 5A e 5B) e suas sequências de aminoácidos foram utilizadas para construir o gene de codificação da quimera no vetor pET-TEV. As sequências de aminoácidos estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1 – Regiões selecionadas para a construção da proteína quimérica.**

Proteína	Epítomos selecionados
Proteína S (YP_009724390.1)	TRTQLPPAYTNSFTRGVYY, VYYYHKNNKSWMESEFRVY, TRFASVYAWNKRISN, QIAPGQTGKIADYNYKLP, SKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDIST, YFPLQSYGFQPTNGVGY, TESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDP, HADQLTPTWRVYSTGSN, SYQTQTNSPRRARS, ILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKV, FKEELDKYFKNHTSPDVDLGD.
Proteína N (YP_009724397.2)	TGSNQNGERSGARSKQRRPQG, TNSSPDDQIGYRRATTR, RSSRSRNSSRNSTPGS, GQTVTKKSAAEASKKPRQKRT

Fonte: Elaborado pela autora.

Todos os epítomos foram unidos utilizando aminoácidos -GPGPG- como espaçadores com o objetivo de proporcionar flexibilidade e para evitar a sobreposição espacial, conforme demonstrado na Figura 5C. A proteína recombinante foi denominada N4AS11-SC2 e apresenta uma marca N-terminal (MGHHHHHHHENLYFQGHMAS) contendo a metionina inicial e a marca HIS do vetor pET-TEV (Figura 5C).



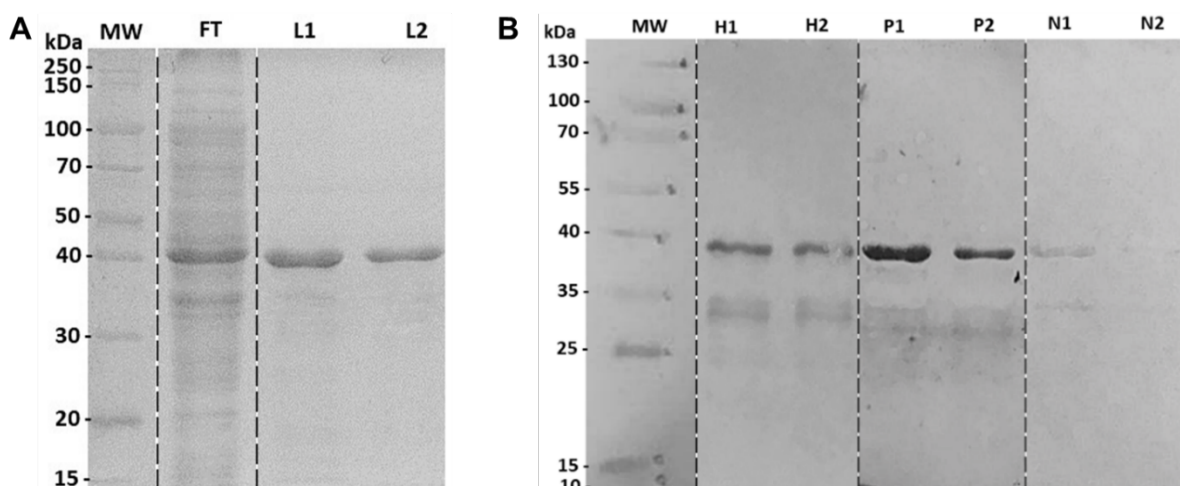
**Figura 5.** Construção da proteína quimérica N4S11-SC2. (A,B): Identificação dos epítomos de células B escolhidos para construir a proteína quimérica representada na estrutura 3D de (A) glicoproteína de superfície (YP\_009724390.1) (PDB: 6xr8A) e (B) fosfoproteína do nucleocapsídeo (YP\_009724397.2) (PDB: 8FD5). As estruturas foram obtidas do PDB e os epítomos foram selecionados e identificados com o SwissPDB- viewer. (C): Os epítomos de células B selecionados foram agrupados em uma sequência linear com a inclusão de resíduos de ligação -GPGPG- entre cada epítomo, e a sequência da proteína quimérica é mostrada. O gene N4S11-SC2 foi inserido no vetor de expressão pET-TEV usando as enzimas de restrição NheI e NotI. A região N-terminal do pET-TEV contendo a M inicial e

6X-HIS foi mantida na construção e um códon STOP foi adicionado. Cada sequência é representada por uma cor na estrutura 3D (A,B,C).

Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA N4S11-SC2 RECOMBINANTE

Foi realizada a caracterização físico-química da proteína N4S11-SC2, onde a mesma apresentou um peso molecular de 41,3 KDa, um ponto isoelétrico de 10,17, uma meia-vida estimada de >10h em *E. coli* e um índice de instabilidade (II) de 38,08, sugerindo que a proteína é estável. O SDS-PAGE mostrou uma banda de ~41,0 KDa, como esperado (Figura 6A). A expressão da proteína N4S11-SC2 foi confirmada por um ensaio de imunotransferência usando um anticorpo monoclonal anti-HIS. As imunotransferências indicaram um reconhecimento positivo mais forte da proteína N4S11-SC2 nos pools de pacientes com COVID-19 em comparação com os pools de soro negativo pré-pandêmico (Figura 6B).



**Figura 6.** Eletroforese em gel de poliacrilamida. SDS mostrando a purificação da N4S11-SC2 e imunoblotting da proteína N4S11-SC2 contra o anticorpo anti-HIS e amostras de soro combinadas de pacientes com COVID-19 e indivíduos de controle negativo. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS mostrando a purificação da N4S11-SC2. FT = Flow-Through; L1 = Primeira Eluição de N4S11-SC2; L2 = Segunda Eluição de N4S11-SC2; MW = Escada de Proteína de Ampla Faixa Não Corada PageRuler™. (B) H1 e H2: Primeira e segunda eluições do anticorpo anti-HIS; P1 e P2: Primeira e segunda eluições de pools de soro de pacientes positivos para COVID-19; N1 e N2: Primeira e segunda eluições de pools de soro de indivíduos pré-pandêmicos negativos; MW = Page Ruler™ Prestained Protein Ladder.

Fonte: Elaboração da autora.

#### 4.3. AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DA PROTEÍNA QUIMÉRICA

A eficácia imunodiagnóstica da proteína N4S11-SC2 para detectar a presença de SARS-CoV-2 foi avaliada através do teste de ELISA. Foram usadas amostras pareadas de soro e urina de pacientes positivos para qRT-PCR, bem como amostras negativas não pareadas de indivíduos pré-COVID-19 e pós-COVID-19. Os

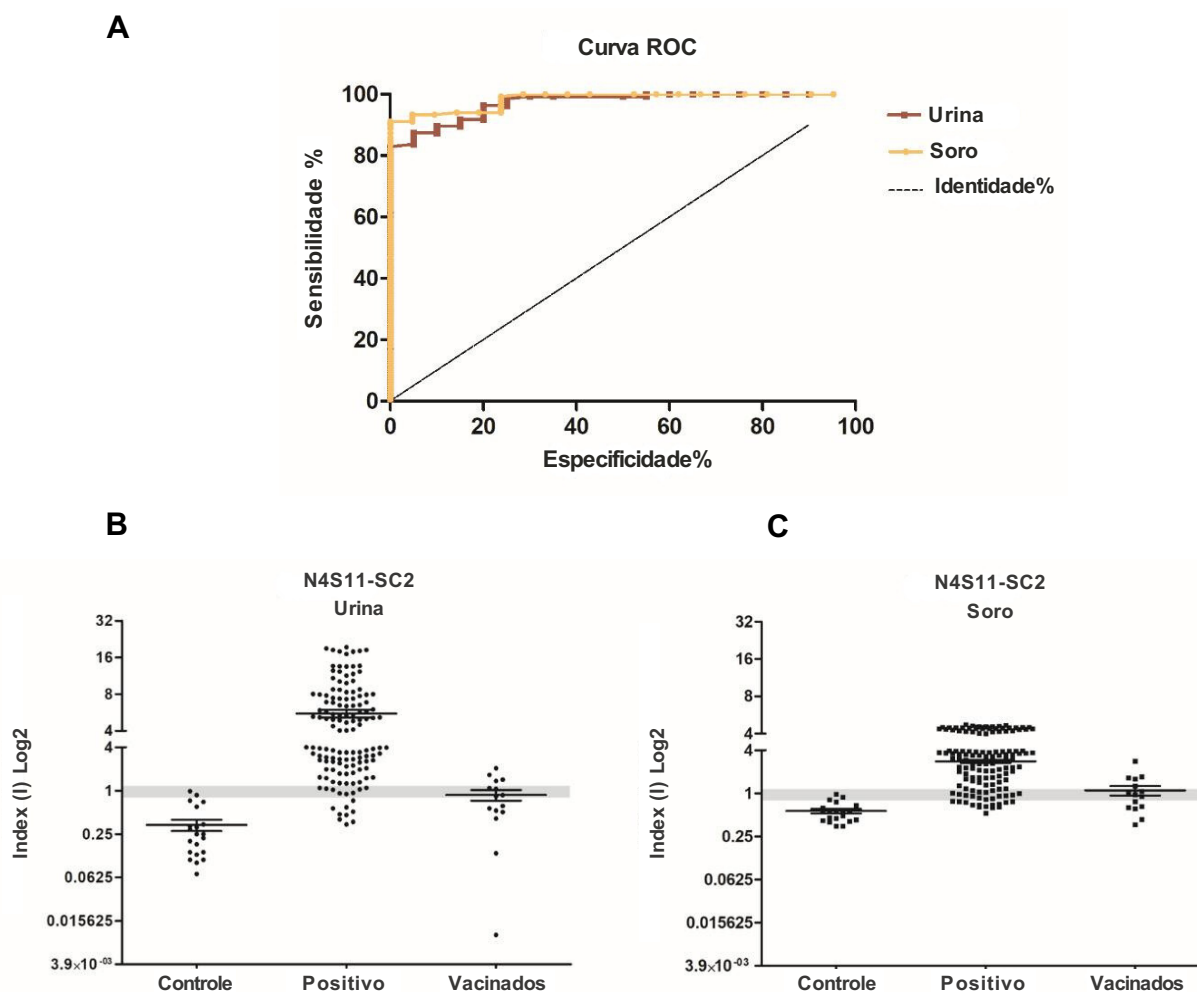
testes ELISA em amostras de urina resultaram em valores de sensibilidade e especificidade de 91,1% e 100%, respectivamente, enquanto os ensaios realizados com amostras de soro apresentaram valores de sensibilidade e especificidade de 83,7% e 100%, respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2- Resultados do teste diagnóstico.**

Amostra	AUC	Valor de p	Cut-Off (Abs)	Se	95%IC	Es	95%IC	J	VPP	VPN
Urina	0.9841	<0.0001	>0.1900	91.11	84.99% a 95.32%	100.0	83.89% a 100.0%	0.9111	1.000	0.679
Soro	0.9722	<0.0001	>0.7525	83.70	76.37% a 89.50%	100.0	83.16% a 100.0%	0.7525	1.000	0.607

Comparação dos resultados obtidos no teste de diagnóstico da proteína N4S11- SC2 para COVID-19 com base na pesquisa de anticorpos IgG específicos na urina e no soro. Foram usadas amostras de pacientes sintomáticos para COVID-19 e com rtPCR positivo para SARS- CoV-2, bem como de indivíduos de controle negativo. O valor do índice individual (I) obtido pela relação Abs/cut-off foi usado para construir curvas ROC. O desempenho diagnóstico do antígeno em relação ao tipo de amostra utilizada baseou-se na avaliação da sensibilidade (95% CI), especificidade (95% CI), área sob a curva (AUC) e índice de Youden (J).  $J = (Se + Sp) - 1$ ; n = número de amostras, + = amostra positiva, - = amostra negativa. Os valores preditivos positivos e negativos (VPP e VPN, respectivamente) foram calculados com base no valor do índice, excluindo as amostras de valor indeterminado (2 amostras de urina e 3 amostras de soro no grupo de controle negativo e 8 amostras de urina e 16 amostras de soro no grupo positivo tiveram um índice indeterminado entre 0,8 e 1,1) e usando as seguintes equações: NPV = verdadeiro negativo/falso negativo + verdadeiro negativo e PPV = verdadeiro positivo/falso positivo + verdadeiro positivo. IC: intervalo de confiança.

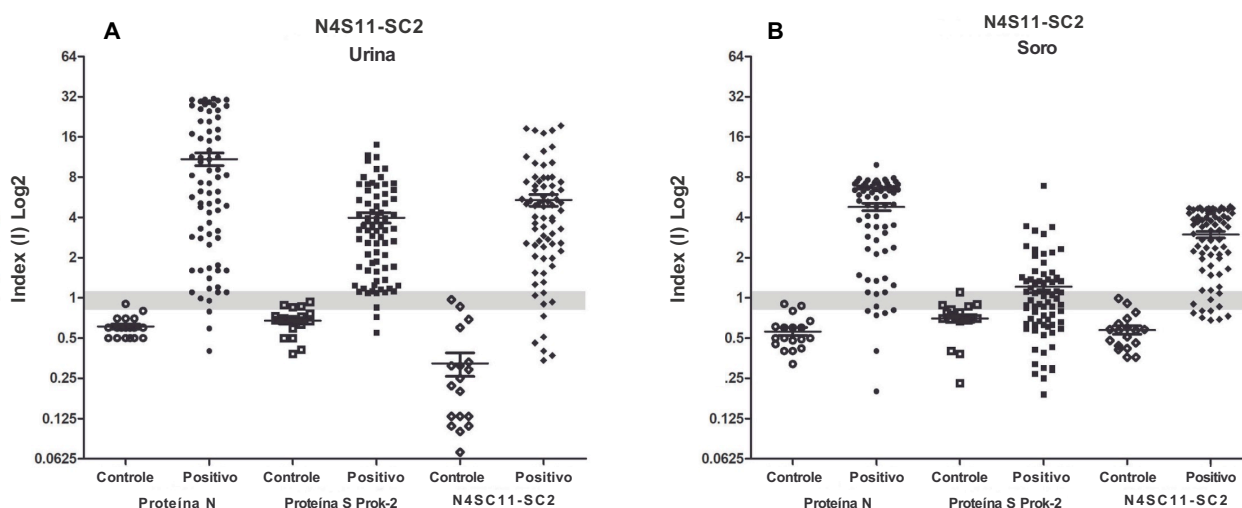
As curvas ROC foram construídas para avaliar a precisão dos ensaios e os resultados indicaram que o teste de ELISA realizado com amostras de urina apresentou maior precisão com um valor de AUC de 0,9841, em comparação com o ELISA baseado no soro que apresentou uma AUC de 0,9722 (Figura 7A). Para padronizar e comparar os resultados, os valores de índice individuais (I) foram calculados a partir dos valores de DO e os dados do ELISA baseado em urina demonstraram que, das 135 amostras coletadas de 79 pacientes com teste positivo para qRT-PCR em diferentes dias após o início dos sintomas (PSO), 118 amostras apresentaram uma reação positiva com a proteína N4S11-SC2, conforme indicado por um valor de índice positivo acima de 1,1. Além disso, oito amostras foram classificadas como "indeterminadas" com valores de índice variando de 0,8 a 1,1, enquanto nove amostras apresentaram um valor de índice negativo abaixo de 0,8. Entre as 21 amostras de urina de controle negativo, duas delas apresentaram um valor de índice indeterminado, enquanto nenhuma apresentou um valor de índice positivo (Figura 7B).



**Figura 7.** Desempenho diagnóstico da proteína N4S11-SC2 com amostras de urina e soro. (A) As curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foram construídas usando o valor do índice individual (I) de cada amostra para obter os valores de sensibilidade, especificidade e área sob a curva. (B) Os ensaios ELISA foram realizados com amostras de urina e soro pareadas ( $n = 135$ ) de pacientes com COVID-19 com qRT-PCR previamente positivo. Amostras de urina e de soro pareadas ( $n = 40$ ) foram analisadas de indivíduos previamente vacinados. Também foram usadas amostras de urina e soro não pareadas de indivíduos de controle saudáveis ( $n = 21$  e  $n = 20$ , respectivamente). A média de cada grupo é mostrada e a faixa cinza indica valores indeterminados para cada amostra, enquanto os valores de índice abaixo da faixa ( $<0,8$ ) são negativos e os valores acima ( $>1,1$ ) são considerados positivos.

Simultaneamente, 108 das 135 amostras de soro coletadas de 79 pacientes com teste positivo para qRT-PCR em diferentes dias após o início dos sintomas (PSO) apresentaram uma reação positiva à proteína N4S11-SC2, com valores de índice positivo superiores a 1,1 (Figura 7C). Além disso, 16 amostras foram classificadas como "indeterminadas", com valores de índice variando de 0,8 a 1,1, e 11 amostras apresentaram um valor de índice negativo abaixo de 0,8. Entre as 20 amostras de soro de controle negativo, apenas três apresentaram valores de índice "indeterminados", e nenhuma delas apresentou valores de índice positivos (Figura

7B). O VPP e o VPN foram calculados com base nos valores de índice, que excluíram as amostras de valor de índice "indeterminado". Foram obtidos valores de 0,679 e 1,000 para urina, respectivamente, e 0,607 e 1,000 para soro, respectivamente. As amostras ( $n = 40$ ) de indivíduos vacinados com Janssen Ad26.COV2.S COVID-19 incluídas no estudo indicaram que duas amostras de soro e onze de urina apresentaram reações contra a proteína N4S11-SC2, indicando um valor de índice positivo superior a 1,1. Além disso, seis amostras de soro e três amostras de urina foram classificadas como indeterminadas, com valores de índice variando de 0,8 a 1,1, e 32 amostras de soro e 26 amostras de urina apresentaram valores de índice negativos abaixo de 0,8 (Figura 7B e C).



**Figura 8.** Desempenho diagnóstico comparativo entre as proteínas recombinantes N, S e N4S11-SC2. Os ensaios ELISA com N, S e N4S11-SC2 foram realizados com as mesmas amostras de urina (A) e soro (B) de pacientes com COVID-19 com qRT-PCR previamente positivo acima de 8 dias pós início dos sintomas ( $n = 72$ ) e de indivíduos de controle saudáveis ( $n = 18$ ). A média de cada grupo é mostrada e a faixa cinza indica valores indeterminados para cada amostra, onde os valores de índice abaixo do intervalo ( $<0,8$ ) são negativos e os valores acima ( $>1,1$ ) são considerados positivos.

As proteínas recombinantes procarióticas, N e S (Prok2-S1) foram previamente validadas por Ludolf *et al.*, 2022 e Ramos *et al.*, 2023. No presente estudo, foram obtidos resultados comparáveis utilizando o mesmo conjunto de amostras de urina para a proteína N4S11-SC2 em comparação com as proteínas recombinantes N e S expressas no sistema procariótico. No entanto, foi observada maior sensibilidade para a proteína N4S11-SC2, em comparação com a Proteína S recombinante, utilizando o mesmo *pool* de amostras de soro (Figura 8).

## 5 DISCUSSÃO

Os ensaios de diagnóstico *in vitro* se mostraram importantes no controle da pandemia da COVID-19, no entanto, ainda se faz necessário o desenvolvimento de novas soluções de diagnóstico para evitar uma eventual nova onda dessa doença no mundo. Neste cenário, a busca por antígenos diagnósticos mais adequados e econômicos é desejável, dado o constante surgimento de novas variantes. No presente estudo, foi desenvolvida uma proteína quimérica, nomeada N4S11-SC2. Ela foi construída combinando epítomos lineares de células B, preditos a partir de sequências de aminoácidos das proteínas Nucleocapsídeo e Spike do SARS-CoV-2. A N4S11-SC2 foi expressa em um sistema procariótico e utilizada em um teste de ELISA, contra amostras de soro e urina de pacientes com COVID-19 diagnosticados por RT-PCR, onde apresentou valores relevantes de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de SARS-CoV-2.

O uso de ferramentas de bioinformática para prever epítomos antigênicos específicos para patógenos têm avançado no desenvolvimento de novos diagnósticos. Epítomos de proteínas do SARS-CoV-2 foram identificados anteriormente através da bioinformática ou por imunoenaios, e alguns peptídeos foram validados por ensaios sorológicos, como por ELISA (PHAN *et al.*, 2021; POLYIAM *et al.*, 2021; RODRIGUES-DA-SILVA *et al.*, 2023; SCUSSEL *et al.*, 2022). Proteínas quiméricas baseadas em epítomos foram então propostas como proteínas recombinantes para o desenvolvimento de novas vacinas ou diagnósticos para a COVID-19, mostrando imunogenicidade mais forte com a possibilidade de expressar proteínas em um sistema procariótico mais simples (JAVADI MAMAGHANI *et al.*, 2021; VENGESAI *et al.*, 2023a).

Neste estudo, N4S11-SC2 apresentou 83,7% e 91,1% de sensibilidade ao usar amostras de soro e urina, respectivamente, e 100% de especificidade para ambas. Outra proteína quimérica recombinante do SARS-CoV-2, contendo epítomos identificados por meio da análise de SPOT, mostrou-se promissora como teste de sorodiagnóstico ao usar amostras de soro (GOMES *et al.*, 2021). Corroborando com estes dados, o presente estudo sugere que os antígenos recombinantes baseados em polipeptídeos são candidatos alternativos promissores para o sorodiagnóstico do SARS-CoV-2.

A produção de anticorpos contra o SARS-CoV-2 geralmente ocorre dentro de 1 a 3 semanas após o início dos sintomas (PSO) (CDC, 2023). Desta forma, a inclusão de amostras coletadas durante os primeiros dias da PSO neste estudo, pode ter contribuído para a limitação em alcançar um desempenho de sensibilidade de 100%, conforme descrito para alguns testes relatados na literatura ou disponíveis comercialmente. Uma variedade de antígenos recombinantes para o diagnóstico do SARS-CoV-2 está disponível no mercado e descrita na literatura, embora com relatos de desempenho variável, como consequência da natureza do antígeno utilizado (LI, D.; LI, 2021; LI, Y. *et al.*, 2021). A proteína N do SARS-CoV-2 pode ser expressa de forma eficiente com sistemas procarióticos, mantendo uma boa imunorreatividade.

No entanto, a proteína S tem sido expressa preferencialmente em sistemas eucarióticos, que frequentemente geram modificações pós-tradução do antígeno (LI, D.; LI, 2021). Diferentemente do ensaio padrão baseado em soro, a expressão procariótica da proteína S do SARS-CoV-2 recombinante não foi uma barreira para a obtenção de uma eficiência relativamente alta para o ELISA baseado em urina, porém ainda não é adequada para a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em amostras de soro (RAMOS *et al.*, 2023a). Nesse sentido, a proteína N4S11-SC2 demonstrou seu potencial como uma proteína recombinante alternativa expressa em um sistema procariótico, mostrando a capacidade de reconhecer anticorpos contra as proteínas N e S do SARS-CoV-2 em amostras de soro ou urina.

Contudo, nosso estudo apresenta algumas limitações, como a ausência de um painel sorológico mais diversificado, incluindo amostras de pacientes infectados com outras variantes de SARS-CoV-2 e com outras doenças que apresentam reação cruzada. Também não foram testadas amostras obtidas de pacientes com infecções respiratórias causadas por outros tipos de coronavírus, vírus comuns em circulação (influenza, sarampo e parvovírus, arbovírus e outros tipos de coronavírus, como HCoVs, que causam apenas uma infecção respiratória leve ou indivíduos vacinados contra influenza.

Por outro lado, não foi observada reatividade humoral em amostras de soro de indivíduos coletadas antes de 2019, o que indica que a proteína N4S11-SC2 pode ser específica para SARS-CoV-2 no teste de ELISA proposto. Essas mesmas amostras de controle foram testadas anteriormente usando antígenos N e S com

resultados de alta especificidade (LUDOLF *et al.*, 2022; RAMOS *et al.*, 2023a). Além disso, os pacientes incluídos em nosso estudo não haviam recebido nenhuma vacina no momento da coleta da amostra, portanto, pode-se inferir razoavelmente que os anticorpos detectados foram produzidos predominantemente em resposta à exposição ao vírus.

Sabe-se que a resposta imunológica que ocorre durante a vacinação é diferente da infecção natural. A presença de anticorpos gerados pelo processo de vacinação foi avaliada aqui usando amostras de indivíduos vacinados com Ad26.COV2.S. Como resultado, foi observado que os anticorpos anti-N4S11-SC2 não foram claramente identificados usando amostras de soro ou de urina pareadas. A proteína N4S11-SC2 apresentou baixa reatividade contra amostras coletadas de indivíduos vacinados, especialmente quando foram usadas amostras de soro, mostrando assim um potencial para distinguir entre indivíduos vacinados e indivíduos infectados. Isso pode ser explicado pelas muitas respostas imunológicas variáveis encontradas na população, influenciadas pela idade, status imunológico, manifestação assintomática, doses e tipo de vacina tomada, o que poderia afetar a intensidade e a durabilidade dos anticorpos (LE GARS *et al.*, 2022).

Naranbhai *et al.* (2022) compararam a imunogenicidade provocada pelas vacinas disponíveis e descobriram que a Ad26.COV2.S produziu concentrações mais baixas de anticorpos, o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo (NARANBHAI *et al.*, 2022). Eles também observaram uma variação significativa nas concentrações de anticorpos, dependendo da infecção prévia, do tipo de vacina e da dose da vacina, e que os indivíduos vacinados com Ad26.COV2.S sem infecção prévia tinham concentrações de anticorpos aproximadamente 25 vezes menores do que os indivíduos convalescentes não vacinados. Além disso, devido à alta infectividade da COVID-19, também é desafiador diferenciar entre as extensões de imunidade induzida por infecção versus imunidade induzida por vacina em uma população (WHO, 2022). No entanto, não podemos descartar a possibilidade de uma baixa capacidade de reconhecimento dos epítomos S incluídos no N4S11-SC2. Nesse sentido, um número maior de amostras e uma boa caracterização de suas variáveis seriam cruciais para compreender a presença de anticorpos N4S11-SC2 da vacina.

É importante observar que a proteína N4S11-SC2 foi projetada com base na sequência do isolado Wuhan-Hu-1 (YP\_009724390.1) e que os anticorpos foram identificados em amostras coletadas em 2020/2021, quando as variantes gama e anteriores estavam circulando no Brasil (ALCANTARA *et al.*, 2022). O uso de vários segmentos das proteínas S e N foi proposto como uma forma de manter a precisão do teste à medida que surgem novas variantes (THAKUR *et al.*, 2022). Neste caso, a mutação de aminoácidos pode afetar a sensibilidade de qualquer teste disponível, inclusive o teste proposto com a proteína N4S11-SC2, portanto, ainda é necessário realizar estudos futuros para estabelecer a sensibilidade do ensaio em pacientes infectados com variantes reais e emergentes do SARS-CoV-2.

Em resumo, nossos dados são preliminares e devem ser considerados como prova de conceito do N4S11-SC2 para o diagnóstico de SARS-CoV-2 ao usar amostras de soro e urina. Eles sugerem que a N4S11-SC2 merece ser avaliada em grandes populações em estudos futuros e que sua adequação como antígeno de diagnóstico também deve ser examinada em outras plataformas, por exemplo, em testes rápidos *point-of-care* de fluxo lateral.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho possibilitou a geração de novo antígeno recombinante quimérico N4S11-SC2 para diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 e ampliou o conhecimento sobre a utilização de proteínas quiméricas baseadas em epítomos de células B em testes diagnósticos. Além disso, trouxe contribuições importantes para a validação de amostras biológicas alternativas, como a urina, para a detecção de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2.

O estudo teve caráter exploratório e buscou avaliar a sensibilidade e especificidade do antígeno N4S11-SC2 em ensaios ELISA utilizando amostras de soro e urina de pacientes previamente confirmados por RT-qPCR para SARS-CoV-2. Os resultados demonstraram uma elevada eficiência diagnóstica, com taxas de sensibilidade e especificidade de 83,7% e 100% para amostras de soro e 91,1% e 100% para amostras de urina, respectivamente. Esses achados sugerem que o antígeno N4S11-SC2 tem potencial para ser utilizado como um marcador confiável em testes diagnósticos, com a vantagem adicional da possibilidade de uso de urina como espécime clínico.

A utilização da urina como amostra apresenta benefícios significativos, especialmente no contexto de vigilância epidemiológica. Diferentemente do soro, a coleta de urina é não invasiva, indolor, e pode ser realizada com maior aceitação por parte dos pacientes, sem a necessidade de profissionais especializados para coleta. Essa característica facilita o monitoramento em larga escala, incluindo populações em áreas remotas ou com difícil acesso a serviços de saúde. Além disso, a urina é um fluido biológico que permite a coleta repetida ao longo do tempo, possibilitando o acompanhamento dinâmico da resposta imunológica de pacientes infectados. No contexto da COVID-19, essa abordagem pode ser estratégica para monitorar surtos, avaliar a cobertura vacinal e investigar a exposição prévia ao vírus em diferentes regiões.

Entretanto, a ausência de detecção clara de anticorpos anti-N4S11-SC2 em amostras de pacientes vacinados com a vacina Janssen Ad26.COV2.S destacou a necessidade de futuras investigações. O avanço genético do vírus e a introdução de variantes de preocupação também sugerem a necessidade de revisar as sequências epítópicas utilizadas e avaliar a aplicabilidade do antígeno em diferentes cenários epidemiológicos e imunológicos. Para isso, serão conduzidas análises

bioinformáticas para comparar as variantes virais circulantes atualmente com as sequências utilizadas no desenvolvimento do antígeno, bem como a análise de bancos de dados genômicos e epidemiológicos para identificar variantes predominantes na região e período das amostras coletadas.

Por fim, será fundamental reavaliar a eficácia do teste em pacientes vacinados, incluindo comparações entre vacinados e não vacinados, para entender melhor a resposta imunológica nesses contextos. A realização de protótipos e regulamentação do teste, incluindo sua aplicação em amostras de soro e urina, são passos futuros para consolidar uma inovação diagnóstica em benefício da sociedade. Os achados deste estudo reforçam a importância de investigações contínuas sobre proteínas quiméricas e novas abordagens diagnósticas, além de destacarem a relevância de amostras alternativas para diagnósticos imunológicos em cenários de evolução viral e vacinação.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o novo antígeno quimérico recombinante se apresenta com potencial diagnóstico para a infecção por SARS-CoV-2. A proteína quimérica mostrou elevada sensibilidade e especificidade nos ensaios realizados, sendo uma alternativa promissora para testes diagnósticos utilizando amostras de soro ou urina dos pacientes.

Estudos adicionais são necessários para avaliar a generalização dos resultados observados em diferentes contextos clínicos e epidemiológicos, como populações variadas e fases distintas da infecção. Além disso, a investigação da resposta imune de pacientes previamente vacinados com diferentes tipos de vacina, poderia contribuir para a validação desta proteína como um antígeno e consequentemente para a vigilância e manejo da infecção por COVID-19.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM PEELE, K. *et al.* Design of multi-epitope vaccine candidate against SARS-CoV-2: a *in-silico* study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 39, n. 10, p. 3793–3801, 3 jul. 2021.
- ALCANTARA, L. C. J. *et al.* SARS-CoV-2 epidemic in Brazil: how the displacement of variants has driven distinct epidemic waves. *Virus Research*, v. 315, p. 198785, jul. 2022.
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. *Versão 2*, p. 1–48, 2013.
- ASSELAH, T. *et al.* COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *Journal of Hepatology*, v. 74, n. 1, p. 168, 1 jan. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC7543767/>. Acesso em: 21 maio 2024.
- CHAN-YEUNG, M.; XU, R. SARS: epidemiology. *Respirology*, v. 8, n. s1, 14 nov. 2003.
- CHAN, J. F.-W. *et al.* A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 514–523, fev. 2020.
- CHENG, M. P. *et al.* Serodiagnostics for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 : A Narrative Review. *Annals of internal medicine*, v. 173, n. 6, p. 450–460, 15 set. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32496919/>. Acesso em: 10 fev. 2025.
- CHRISTENSEN, B. B.; AZAR, M. M.; TURBETT, S. E. Laboratory Diagnosis for SARS-CoV-2 Infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 36, n. 2, p. 327, 1 jun. 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC9141924/>. Acesso em: 10 jul. 2024.
- CURE, E.; CUMHUR CURE, M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers may be harmful in patients with diabetes during COVID-19 pandemic. *Diabetes & metabolic syndrome*, v. 14, n. 4, p. 349–350, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32311651>.
- DUAN, L. *et al.* The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 7 out. 2020a.
- DUAN, L. *et al.* The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 7 out. 2020b.
- EL-DALY, M. M. Advances and Challenges in SARS-CoV-2 Detection: A Review of Molecular and Serological Technologies. *Diagnostics 2024, Vol. 14, Page 519*, v. 14, n. 5, p. 519, 29 fev. 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4418/14/5/519/htm>. Acesso em: 30 jun. 2024.
- FOCOSI, D. *et al.* COVID-19 therapeutics. *Clinical microbiology reviews*, v. 37, n. 2,

p. e0011923, 13 jun. 2024. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/cmvr>>. Acesso em: 10 jul. 2024.

FU, B.; XU, X.; WEI, H. Why tocilizumab could be an effective treatment for severe COVID-19? *Journal of translational medicine*, v. 18, n. 1, p. 164, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32290839>>.

GOMES, L. R. *et al.* Multiepitope proteins for the differential detection of IgG antibodies against RBD of the spike protein and non-RBD regions of SARS-CoV-2. *Vaccines*, v. 9, n. 9, p. 986, 1 set. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-393X/9/9/986/htm>>. Acesso em: 3 jul. 2024.

GRIFONI, A. *et al.* Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>>. Acesso em: 15 jun. 2021.

GRZELAK, L. *et al.* A comparison of four serological assays for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations. *Science Translational Medicine*, v. 12, n. 559, 2 set. 2020.

GUAN, W. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 30 abr. 2020.

HARCOURT, J. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Patient with Coronavirus Disease, United States. *Emerging infectious diseases*, v. 26, n. 6, p. 1266–1273, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32160149/>>. Acesso em: 24 jun. 2024.

HARTENIAN, E. *et al.* The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 37, p. 12910–12934, set. 2020.

HOSSEINI, A. *et al.* Innate and adaptive immune responses against coronavirus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 132, p. 110859, 1 dez. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34806777/>>. Acesso em: 10 jul. 2024.

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020.

JAVADI MAMAGHANI, A. *et al.* In-silico design of a multi-epitope for developing sero-diagnosis detection of SARS-CoV-2 using spike glycoprotein and nucleocapsid antigens. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*, v. 10, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13721-021-00347-x>>. Acesso em: 3 jul. 2024.

JIN, Y. *et al.* Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of covid-19. *Viruses*, v. 12, n. 4, p. 1–17, 2020.

JOYCE, R. P.; HU, V. W.; WANG, J. MEDICINAL CHEMISTRY RESEARCH The history, mechanism, and perspectives of nirmatrelvir (PF-07321332): an orally bioavailable main protease inhibitor used in combination with ritonavir to reduce COVID-19-related hospitalizations. *Medicinal Chemistry Research*, v. 31, p. 1637–1646, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00044-022-02951-6>>. Acesso em: 10 jul. 2024.

KHAILANY, R. A.; SAFDAR, M.; OZASLAN, M. Genomic characterization of a novel

SARS-CoV-2. *Gene Reports*, v. 19, p. 100682, jun. 2020.

KUMAR, G. V.; JEYANTHI, V.; RAMAKRISHNAN, S. A short review on antibody therapy for COVID-19. *New microbes and new infections*, p. 100682, 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32313660>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7167584>>.

KUMAR, S.; SAXENA, S. K. Structural and molecular perspectives of SARS-CoV-2. *Methods*, v. 195, p. 23–28, 1 nov. 2021.

LE GARS, M. *et al.* Immunogenicity and efficacy of Ad26. <scp>COV2</scp> .S: An adenoviral vector–based <scp>COVID</scp> -19 vaccine. *Immunological Reviews*, v. 310, n. 1, p. 47–60, 11 set. 2022.

LI, D.; LI, J. Immunologic testing for SARS-CoV-2 infection from the antigen perspective. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 59, n. 5, 1 maio 2021. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.02160-20>>. Acesso em: 3 jul. 2024.

LI, Y. *et al.* Systematic evaluation of IgG responses to SARS-CoV-2 spike protein-derived peptides for monitoring COVID-19 patients. *Cellular & molecular immunology*, v. 18, n. 3, p. 621–631, 1 mar. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33483707/>>. Acesso em: 15 jul. 2024.

LIU, W. *et al.* Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 58, n. 6, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.00461-20>>. Acesso em: 3 jul. 2024.

LUDOLF, F. *et al.* Detecting anti–SARS-CoV-2 antibodies in urine samples: A noninvasive and sensitive way to assay COVID-19 immune conversion. *Science Advances*, v. 8, n. 19, 13 maio 2022.

MATTA, J. *et al.* Association of Self-reported COVID-19 Infection and SARS-CoV-2 Serology Test Results With Persistent Physical Symptoms Among French Adults During the COVID-19 Pandemic. *JAMA Internal Medicine*, v. 182, n. 1, p. 19, 1 jan. 2022.

MERAD, M. *et al.* The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*, v. 375, n. 6585, p. 1122–1127, 11 mar. 2022.

MOHAMADIAN, M. *et al.* COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *The Journal of Gene Medicine*, v. 23, n. 2, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33483707/>><<https://pmc/articles/PMC7883242/>>. Acesso em: 20 maio 2024.

MUSICÒ, A. *et al.* SARS-CoV-2 Epitope Mapping on Microarrays Highlights Strong Immune-Response to N Protein Region. *Vaccines 2021, Vol. 9, Page 35*, v. 9, n. 1, p. 35, 11 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-393X/9/1/35/htm>>. Acesso em: 3 jul. 2024.

NAGAOKA, F. *et al.* Detection of Urinary Antibodies and Its Application in Epidemiological Studies for Parasitic Diseases. *Vaccines*, v. 9, n. 7, p. 778, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33483707/>><<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8310028/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

NAQVI, A. A. T. *et al.* Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution,

pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n. 10, p. 165878, out. 2020.

NARANBHAI, V. *et al.* Comparative Immunogenicity and Effectiveness of mRNA-1273, BNT162b2, and Ad26.COVS COVID-19 Vaccines. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 225, n. 7, p. 1141–1150, 1 abr. 2022.

NEMATI, M. *et al.* Laboratory methods: A concise review and update for COVID-19 diagnosis. *Cell Biochemistry and Function*, v. 41, n. 4, p. 413–422, 1 jun. 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbf.3799>>. Acesso em: 30 jan. 2025.

OLIVEIRA, S. C.; DE MAGALHÃES, M. T. Q.; HOMAN, E. J. Immunoinformatic Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Identification of COVID-19 Vaccine Targets. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 28 out. 2020.

ONG, D. S. Y. *et al.* How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. 2021a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.001>>. Acesso em: 10 jul. 2024.

ONG, D. S. Y. *et al.* How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 27, n. 7, p. 981–986, jul. 2021b.

PASCARELLA, G. *et al.* COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *Journal of internal medicine*, v. 288, n. 2, p. 192–206, 1 ago. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32348588/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

PHAN, I. Q. *et al.* In silico detection of SARS-CoV-2 specific B-cell epitopes and validation in ELISA for serological diagnosis of COVID-19. *Scientific Reports 2021 11:1*, v. 11, n. 1, p. 1–11, 22 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-83730-y>>. Acesso em: 15 jul. 2024.

POLYIAM, K. *et al.* Immunodominant linear B cell epitopes in the spike and membrane proteins of SARS-CoV-2 identified by immunoinformatics prediction and immunoassay. *Scientific Reports 2021 11:1*, v. 11, n. 1, p. 1–17, 14 out. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-99642-w>>. Acesso em: 15 jul. 2024.

PRABAKARAN, P. *et al.* Structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor-binding domain complexed with neutralizing antibody. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 23, p. 15829–15836, 9 jun. 2006.

RAJADHYAKSHA, M.; LONDHE, V. Microsampling: A role to play in Covid-19 diagnosis, surveillance, treatment and clinical trials. *Drug Testing and Analysis*, v. 13, n. 7, p. 1238–1248, 2021.

RAMOS, F. F. *et al.* A urine-based ELISA with recombinant non-glycosylated SARS-CoV-2 spike protein for detecting anti-SARS-CoV-2 spike antibodies. *Scientific Reports 2023 13:1*, v. 13, n. 1, p. 1–11, 16 mar. 2023a. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-023-31382-5>>. Acesso em: 3 jul. 2024.

RAMOS, F. F. *et al.* A urine-based ELISA with recombinant non-glycosylated SARS-CoV-2 spike protein for detecting anti-SARS-CoV-2 spike antibodies. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 4345, 16 mar. 2023b.

RODRIGUES-DA-SILVA, R. N. *et al.* Identification of B-Cell Linear Epitopes in the

Nucleocapsid (N) Protein B-Cell Linear Epitopes Conserved among the Main SARS-CoV-2 Variants. *Viruses*, v. 15, n. 4, p. 923, 1 abr. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/15/4/923/htm>>. Acesso em: 15 jul. 2024.

SCUSSEL, R. *et al.* Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins. *ACS applied nano materials*, v. 5, n. 1, p. 642–653, 28 jan. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35098045/>>. Acesso em: 22 jan. 2024.

SINGHAL, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian Journal of Pediatrics*, v. 87, n. 4, p. 281–286, 2020.

TAHAMTAN, A.; ARDEBILI, A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 00, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

TALEGHANI, N.; TAGHIPOUR, F. Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 174, p. 112830, 15 fev. 2021.

THAKUR, S. *et al.* SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines. *Frontiers in Medicine*, v. 9, 22 fev. 2022.

UMAKANTHAN, S. *et al.* Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgraduate Medical Journal*, v. 96, n. 1142, p. 753, 1 dez. 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC10016932/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35098045/)>. Acesso em: 20 maio 2024.

VENGESAI, A. *et al.* Peptide microarray analysis of in-silico predicted B-cell epitopes in SARS-CoV-2 sero-positive healthcare workers in Bulawayo, Zimbabwe. *Acta Tropica*, v. 238, p. 106781, fev. 2023a.

VENGESAI, A. *et al.* Peptide microarray analysis of in-silico predicted B-cell epitopes in SARS-CoV-2 sero-positive healthcare workers in Bulawayo, Zimbabwe. *Acta Tropica*, v. 238, p. 106781, 1 fev. 2023b.

WANG, W.; TANG, J.; WEI, F. Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. *Journal of Medical Virology*, v. 92, n. 4, p. 441–447, 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.25689>>. Acesso em: 24 jun. 2024.

WU, J. *et al.* Clinical Features of Maintenance Hemodialysis Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 15, n. 8, p. 1139–1145, ago. 2020.

XIE, N. NA *et al.* Clinical Characteristics, Diagnosis, and Therapeutics of COVID-19: A Review. *Current medical science*, v. 43, n. 6, p. 1066–1074, 1 dez. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37837572/>>. Acesso em: 15 jun. 2024.

XIONG, C. *et al.* Evolution and variation of 2019-novel coronavirus. *bioRxiv*, p. 2020.01.30.926477, 30 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.30.926477v1>>. Acesso em: 3 jul. 2024.

YANG, H.; RAO, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology* 2021 19:11, v. 19, n. 11, p. 685–700, 17 set. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-021-00630-8>>. Acesso em: 3 jul. 2024.

YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. The pathogenesis and treatment of the “Cytokine Storm” in COVID-19. *Journal of Infection*, v. 80, p. 607–613, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037>>. Acesso em: 21 maio 2024.

YE, Y. *et al.* A Pilot Study of Urine Proteomics in COVID-19–Associated Acute Kidney Injury. *Kidney International Reports*, v. 6, n. 12, p. 3064, 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8494995/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

ZHANG, D. *et al.* A comprehensive review on immunogen and immune-response proteins of SARS-CoV-2 and their applications in prevention, diagnosis, and treatment of COVID-19. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 259, n. P2, p. 129284, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129284>>.

ZHANG, Q. *et al.* Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, n. 1, p. 233, 11 jun. 2021.

ZHAO, M.-M. *et al.* Novel cleavage sites identified in SARS-CoV-2 spike protein reveal mechanism for cathepsin L-facilitated viral infection and treatment strategies. *Cell Discovery*, v. 8, n. 1, p. 53, 6 jun. 2022.

ZHOU, M.; ZHANG, X.; QU, J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Frontiers of Medicine*, v. 2019, 2020.

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020.

## ANEXOS

### ANEXO 1- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Características clínicas, de imagem pulmonar e laboratoriais de pacientes com infecção por SARS-CoV-2 admitidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

**Pesquisador:** Vandack Alencar Nobre Jr

**Área Temática:** A critério do CEP

**Versão:** 7

**CAAE:** 30437020.9.0000.5149

**Instituição Proponente:** PRO REITORIA DE PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.828.788

##### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1580819\_E2.pdf, de 27/06/2021) e/ou do Projeto Detalhado (Projeto\_pesquisa\_emergencial\_COVID\_300320\_VERSAO\_APROVADA\_CONEP\_HMCC\_sem\_marcacoes\_junho\_21.docx).

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.828.788

### Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram identificados óbices éticos nesta emenda.

### Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1580819_E2.pdf	27/06/2021 10:53:18		Aceito
Outros	Projeto_pesquisa_emergencial_COVID_300320_VERSAO_APROVADA_CONEP_HMCC_com_marcacoes_junho_21.docx	27/06/2021 10:51:04	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	Projeto_pesquisa_emergencial_COVID_300320_VERSAO_APROVADA_CONEP_HMCC_sem_marcacoes_junho_21.docx	27/06/2021 10:50:34	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	Resposta_analise_documental_junho_2021.pdf	27/06/2021 10:50:08	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_4085678_E1.pdf	29/05/2021 15:11:59	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_4082383_E1.pdf	29/05/2021 15:09:55	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	Aprovacao_Departamento_Clinica_Medica_FM_UFMG.pdf	29/05/2021 15:06:54	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	Aprovacao_GEP_HC_UFMG.pdf	29/05/2021 15:06:31	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_3974420_APROVADO.pdf	29/05/2021 15:06:09	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.828.788

Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_3965370_PENDENTE.pdf	29/05/2021 15:05:58	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	Anuencia_HSH_Projeto_Covid.pdf	29/05/2021 15:03:53	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_parecer_4645345.pdf	29/05/2021 15:03:39	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMO_BIORREPOSITORIO_PROJETO_COVID.pdf	29/05/2021 15:03:10	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_com_marcas_responsavel_emenda_3.pdf	22/03/2021 18:22:12	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_sem_marcas_responsavel_emenda_3.pdf	22/03/2021 18:21:59	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_com_marcas_participante_ante_emenda_3.pdf	22/03/2021 18:21:00	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_sem_marcas_participante_ante_emenda_3.pdf	22/03/2021 18:20:45	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_SCLARECIDO_Pac_V3.pdf	03/08/2020 13:05:59	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_SCLARECIDO_Resp_V3.pdf	03/08/2020 13:04:36	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	SEI_GOVMG_Parecer_TEcnico.pdf	03/06/2020 13:57:00	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	SOLICITACAO_INCLUSAO_HEM.pdf	03/06/2020 13:56:39	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa_emergencial_COVID_300320.pdf	31/03/2020 17:44:07	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_COVID.pdf	31/03/2020 17:21:41	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br



Article

# B-Cell Epitopes-Based Chimeric Protein from SARS-CoV-2 N and S Proteins Is Recognized by Specific Antibodies in Serum and Urine Samples from Patients

Fernanda F. Ramos <sup>1,†</sup> , Isabela A. G. Pereira <sup>1,†</sup> , Mariana M. Cardoso <sup>1,†</sup> , Raquel S. Bandeira <sup>1</sup>, Daniela P. Lage <sup>1</sup>, Rahisa Scussel <sup>2</sup> , Rafaela S. Anastacio <sup>2</sup>, Victor G. Freire <sup>2</sup>, Marina F. N. Melo <sup>1</sup>, Joao A. Oliveira-da-Silva <sup>1</sup>, Vivian T. Martins <sup>1</sup>, Grasiela S. V. Tavares <sup>1</sup>, Danniele L. Vale <sup>1</sup>, Camila S. Freitas <sup>1</sup> , Ana Thereza Chaves <sup>1</sup>, Júlia F. M. Caporali <sup>1,3</sup> , Paula F. Vassallo <sup>3</sup>, Cecilia G. Ravetti <sup>3</sup> , Vandack Nobre <sup>1,3</sup> , Flavio G. Fonseca <sup>4,5</sup> , Myron Christodoulides <sup>6</sup> , Ricardo A. Machado-de-Ávila <sup>2,‡</sup> , Eduardo A. F. Coelho <sup>1,7,‡</sup> and Fernanda Ludolf <sup>1,8,\*‡</sup>



Citation: Ramos, F.F.; Pereira, I.A.G.; Cardoso, M.M.; Bandeira, R.S.; Lage, D.P.; Scussel, R.; Anastacio, R.S.;

Freire, V.G.; Melo, M.F.N.;

Oliveira-da-Silva, J.A.; et al. B-Cell Epitopes-Based Chimeric Protein from SARS-CoV-2 N and S Proteins Is Recognized by Specific Antibodies in Serum and Urine Samples from Patients. *Viruses* 2023, 15, 1877. <https://doi.org/10.3390/v15091877>

Academic Editor: Jason Yiu Wing Kam

Received: 16 August 2023

Revised: 30 August 2023

Accepted: 1 September 2023

Published: 5 September 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, Minas Gerais, Brazil; fe.fonseca@gmail.com (F.F.R.); amorim.gpereira@gmail.com (I.A.G.P.);

marianademeloc@gmail.com (M.M.C.); eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F.C.)

- <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma 88806-000, Santa Catarina, Brazil; r\_andrez@yahoo.com.br (R.A.M.-d.-Á.)
- <sup>3</sup> Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, Minas Gerais, Brazil
- <sup>4</sup> Centro de Tecnologia de Vacinas (CT Vacinas), BH-Tec, UFMG, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil
- <sup>5</sup> Laboratório de Virologia Molecular e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil
- <sup>6</sup> Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital, Southampton SO16 6YD, UK
- <sup>7</sup> Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Minas Gerais, Brazil
- <sup>8</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-110, Minas Gerais, Brazil
- \* Correspondence: feludolf@gmail.com; Tel.: +55-31-3409-4983
- † These authors contributed equally as first authors.
- ‡ These authors contributed equally as senior authors.

**Abstract:** The impact of the COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus underscored the crucial role of laboratorial tests as a strategy to control the disease, mainly to indicate the presence of specific antibodies in human samples from infected patients. Therefore, suitable recombinant antigens are relevant for the development of reliable tests, and so far, single recombinant proteins have been used. In this context, B-cell epitopes-based chimeric proteins can be an alternative to obtain tests with high accuracy through easier and cheaper production. The present study used bioinformatics tools to select specific B-cell epitopes from the spike (S) and the nucleocapsid (N) proteins from the SARS-CoV-2 virus, aiming to produce a novel recombinant chimeric antigen (N4S11-SC2). Eleven S and four N-derived B-cell epitopes were predicted and used to construct the N4S11-SC2 protein, which was analyzed in a recombinant format against serum and urine samples, by means of an in house-ELISA. Specific antibodies were detected in the serum and urine samples of COVID-19 patients, which were previously confirmed by qRT-PCR. Results showed that N4S11-SC2 presented 83.7% sensitivity and 100% specificity when using sera samples, and 91.1% sensitivity and 100% specificity using urine samples. Comparable findings were achieved with paired urine samples when compared to N and S recombinant proteins expressed in prokaryotic systems. However, better results were reached for N4S11-SC2 in comparison to the S recombinant protein when using paired serum samples. Anti-N4S11-SC2 antibodies were not clearly identified in Janssen Ad26.COVS COVID-19-vaccinated subjects, using serum or paired urine samples. In conclusion, this study presents a new chimeric recombinant antigen expressed in a prokaryotic system that could be considered as an alternative

diagnostic marker for the SARS-CoV-2 infection, with the potential benefits to be used on serum or urine from infected patients.

**Keywords:** B-cell epitopes; chimeric protein; diagnosis; urine; serum; SARS-CoV-2

---

## Introduction

Considering the impact of the COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus, scientists around the world have continued to look for new solutions to curb virus transmission and prevent a new wave of this life-threatening disease. *In vitro* diagnostic assays have proven to be a critical part of the complete strategy to control the COVID-19 pandemic. While serological tests are not currently applicable to diagnose an acute infection on their own, they can indicate the presence of antibodies generated from a previous infection and/or vaccination [1]. In addition to the importance of serological tests at the population level to support surveillance studies, they are currently relevant for patients seeking medical care with late diagnosis, those with co-morbidities and complications of the disease presenting persistent symptoms caused by 'long COVID' [2-4].

The SARS-CoV-2 virus has mutated over time, resulting in genetic variation in the population of circulating viral strains. Such mutations have impacted the diagnostic performance of distinct molecular and serological tests leading to reduced accuracy. Therefore, it is relevant to search and obtain alternative diagnostic options aiming to improve the quality of the diagnosis of infection, especially among the vulnerable populations presenting comorbidities [5].

Selecting SARS-CoV-2 recombinant proteins is essential for developing a reliable serological test. SARS-CoV-2 is an envelope virus with a positive-sense, single-stranded RNA genome, comprising several non-structural proteins and four structural proteins: Nucleocapsid (N), Membrane (M), Spike (S) and Envelope (E). S protein is a surface-exposed protein which plays an important role during the viral infection by binding to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) receptors of the host cells. N protein is an RNA-binding protein crucial for the replication and transcription of SARS-CoV-2, being highly expressed during infection [6,7]. Among the four structural proteins of SARS-CoV-2, N and S proteins are the most immunogenic and, therefore, the most used in serological tests [8,9]. The SARS-CoV-2 N protein can be efficiently expressed in prokaryotic system(s) maintaining good immunoreactivity; however, the S protein has been preferentially expressed in eukaryotic systems, which often generate post-translational modifications of this antigen [10].

Laboratorial tests have used serum samples to detect the disease. Although considered less invasive than swabs, the sample's collection presents a significant rate of complication, since it can be unpleasant and requires a trained phlebotomist. By contrast, the collection of urine to detect specific antibodies is less costly and samples are easy to store and thus could be convenient for clinical and epidemiological studies [11]. Urine-based tests to detect antibodies have been recently suggested as a non-invasive, simple and safe alternative to detect anti-SARS-

CoV-2 N and S antibodies. In these studies, a urine-based ELISA targeting to identify anti-N protein antibodies showed sensitivity and specificity of 94.0% and 100%, respectively. Meanwhile, the same assay using the S protein purified from a prokaryotic system showed sensitivity and specificity of 89.0% and 97.0%, respectively. Interestingly, when sera samples collected from the same patients were tested against the prokaryotic S antigen, results showed sensitivity of 40.0% and specificity of 98.0%, highlighting the difficulty to obtain antigens with high accuracy derived of prokaryotic systems of purification [11,12].

Despite the biological sample evaluated, diagnostic antigens are required to be used in sensitive and specific laboratorial tests. In this context, B-cell epitope-based chimeric proteins have been proposed as advantageous in comparison to individual proteins, since they show higher antigenicity against diverse biological samples [13,14]. In addition, bioinformatics tools used to predict B-cell epitopes offer advantages in terms of speed and biosafety, being unbiased by specific peptide selection [15]. Bioinformatics and/or microarray analyses have been applied to identify B-cell epitopes derived from SARS-CoV-2, with corresponding peptides demonstrating a good diagnostic performance [10,14,16–18]. Javadi Mamaghani et al. [13] designed a multi-epitope SARS-CoV-2 protein and the antigen showed good serodiagnostic efficacy. B-cell epitopes of SARS-CoV-2 identified by SPOT synthesis analysis were incorporated as a chimeric protein, and the antigen showed also diagnostic potential against the infection [19].

In this study, we apply bioinformatic tools to design a new chimeric protein containing specific B-cell epitopes predicted by the amino acid sequences from S and N proteins of SARS-CoV-2 virus, with the purpose to develop an alternative antigen for the detection of COVID-19 cases, which will be easy to produce and presents better cost-effective conditions. The results obtained in the in-house ELISA experiments indicated that the chimeric protein, which was expressed in a prokaryotic system, could be effectively employed as a target to reach a high-performance diagnostic test, by using both serum and urine samples from patients.

## Material and Methods

### *Research Subjects*

This study was approved by the Human Research Ethics Committee from Federal University of Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, Brazil) with protocol number CAAE 30,437,020.9.0000.5149. All included participants were male or female adults who signed an informed consent form. Patients ( $n = 79$ ) with clinical symptoms and seeking hospital assistance were assessed by the attending physician and included in this study after confirmation of SARS-CoV-2 infection by positive qRT-PCR.

### *1.1. Biological Samples*

Paired urine and serum samples ( $n = 135$ ) from hospitalized patients were collected on the first day of inclusion and whenever possible, on days 1, 3, 7 and 14 after recruitment; thus, varying the

corresponding day Post-Symptom Onset (PSO) for each patient. These samples were collected before COVID-19 vaccination began in Brazil. Samples collected before 2019 were considered truly negative and called “pre-COVID-19 negative” ( $n = 10$  urine and  $n = 14$  sera). Samples from subjects who had maintained a rigorous quarantine and did not show any symptoms, were considered theoretically negative and called “post- COVID-19 negative” ( $n = 11$  urine and  $n = 6$  sera). Samples from Janssen Ad26.COVS COVID-19-vaccinated subjects ( $n = 40$ ) were included in this study, and they were collected after COVID-19 vaccination began in Brazil. Urine and serum samples were collected and stored as described by Ludolf et al. [12]. Briefly, urines were diluted in 0.1% (*w/v*) sodium azide and stored at 4 °C, while sera samples were stored at −20 °C, until use.

### 1.2. Prediction of B-Cell Epitopes and Construction of Chimeric Protein

The amino acid sequences of surface glycoprotein (YP\_009724390.1) and nucleocapsid phosphoprotein (YP\_009724397.2) proteins [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2] were obtained from the Genbank. The IEDB server v2.26 ([www.iedb.org](http://www.iedb.org), accessed on 16 August 2023) was used to identify the most accessible amino acids in the primary structures using the B-Cell epitope prediction tool, through the parameter “Antigen Sequence Properties”. The method Emini Surface Accessibility Prediction was chosen with different window sizes of 14, 12 and 10. All the amino acids with the threshold value above 1.0 were considered. Next, the ABCpred server ([www.imtech.res.in/raghava/abcpred/](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/), accessed on 16 August 2023) was used to predict the B-cell epitopes with window sizes of 14, 12 and 10. All the sequences with the threshold value above 0.85 were considered. Overlapping regions were assembled using Clustal Omega tool (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, accessed on 16 August 2023), comparing all the parameters with each other and with the existing literature. The most frequent regions were considered as the final predicted

epitopes. After assessment, the possible sequences were observed in the 3D structure of the proteins to analyze their position and distribution (Figure 1A,B). At this point, the spatial configuration of the proteins was analyzed to observe if the predicted sequences were positioned in a way to enable and/or facilitate recognition. To do so, the structures were obtained from Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>, accessed on 16 August 2023), and epitopes were selected and identified using the software SwissPDB-viewer v4.10. For the surface glycoprotein (YP\_009724390.1) and the nucleocapsid phosphoprotein (YP\_009724397.2), the PDB structures “6xr8A” and “8FD5” were used, respectively. Eleven Spike and four Nucleocapsid B-cell epitopes were selected, and their amino acid sequences were joined by -GPGPG- linker peptides aiming to provide flexibility and to avoid spatial overlap [20]. The arrangement of the peptides in the chimeric protein was distributed in a position as similar as possible to the original proteins, preserving the order in which they appear. The Protparam tool from Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>, accessed on 16 August 2023) was used for the physical-chemical characterization of the multi-epitope chimeric protein, which was called N4S11-SC2 (Figure 1C). In this step, the new protein was analyzed again by ABCPred to confirm if the peptides would still be suggested as antigenic regions.

### 1.3. Production of Recombinant N4S11-SC2 Protein

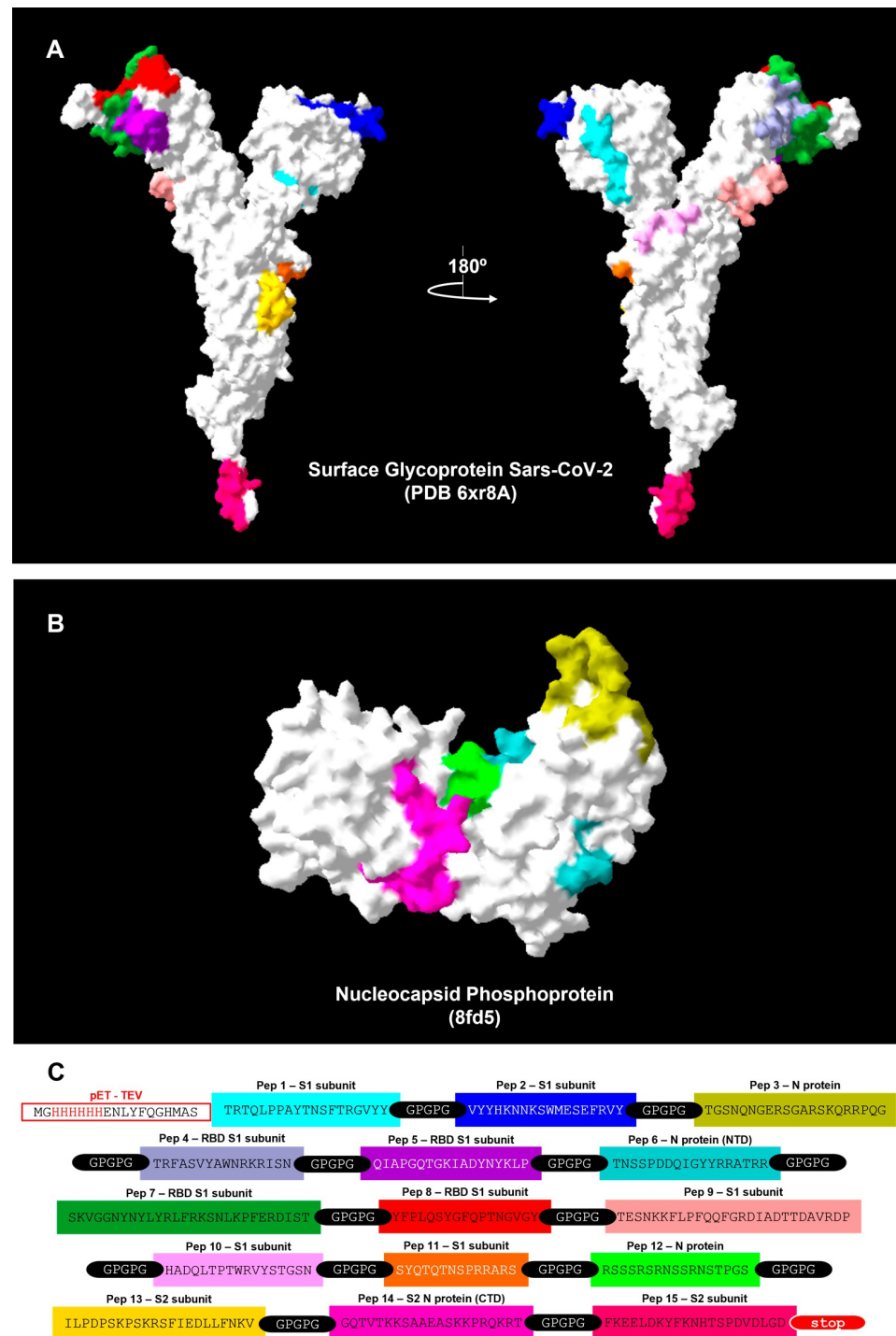
The chimeric protein-codifying gene sequence was commercially synthesized as having 1107 bp and it was cloned into prokaryotic expression vector pET28a-TEV (Genscript®, Piscataway, NJ, USA). The construct was transformed into *Escherichia coli* BL-21 strain cells, and the protein was expressed by addition of 0.2 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG; Promega, Madison, WI, USA) for 2 h at 37 °C in 1 L of LB medium (with yield of 36 mg/L of culture). Next, bacteria were centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min at 4 °C and suspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCL, pH 8.0; 0.5 M NaCl; 5 mM imidazole; 8 M urea; 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol), followed by six cycles of ultrasonication for 30 s each (at 90 Hz). Cellular debris was removed after  $5000 \times g$  centrifugation for 15 min at 4 °C and the supernatant was collected. The N4S11-SC2 protein was purified on a HisTrap HP affinity column (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA) connected to an AKTA system. Inclusion bodies were solubilized in 2 M urea buffer. A 12.5% (*w/v*) SDS-PAGE was done to evaluate the purity of the recombinant protein. A Page Ruler broad range unstained protein ladder (Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania) was used.

### 1.4. Immunoblottings

Immunoblottings were performed using the purified N4S11-SC2 protein, which was applied (2  $\mu$ g) to 12.5% SDS-PAGEs and blotted onto a nitrocellulose membrane (0.2  $\mu$ m pore size, Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Germany). Next, membrane was blocked with a solution of phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) plus 0.05% (*v/v*) Tween 20 (PBS-T) and 1% (*w/v*) bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Germany), for 16 h at 37 °C, followed by incubation with 6-HIS tag antibody (1 mg/mL, MA1-21315; Invitrogen; Rockford, IL, USA). Infected ( $n = 9$ ) and negative pre-

---

pandemic sera ( $n = 9$ ) pools were added for 1 h at 37 °C, with samples diluted 1:100 in in PBS-T and anti-HIS antibody diluted 1:3000 in PBS-T. Next, membranes were washed with PBS-T and an anti-human goat IgG peroxidase conjugated antibody (A18811; Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) was added in the plates (diluted 1:15,000 in PBS-T), with a new incubation occurring for 1 h at 37 °C. After, reactions were developed using a solution composed by chloronaphtol, diaminobenzidine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min, and stopped by adding distilled water. A Page Ruler pre-stained protein ladder (ThermoFisher Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania) was used.



**Figure 1. Construction of the N4S11-SC2 chimeric protein.** (A,B): Identification of the B-cell epi- topes chosen to build the chimeric protein represented on the 3D structure of (A) surface glycoprotein (YP\_009724390.1) (PDB: 6xr8A) and (B) the nucleocapsid phosphoprotein (YP\_009724397.2) (PDB: 8FD5). Structures were obtained from PDB and epitopes were selected and identified using SwissPDB- viewer. (C): The selected B-cell epitopes were grouped in a linear sequence with the inclusion of –GPGPG- linker residues between each epitope, and the chimeric protein sequence is shown. N4S11- SC2 gene was inserted into pET-TEV expression vector using NheI and NotI restriction enzymes. pET-TEV N-terminal tag containing the initial M and 6X-HIS was maintained into the constructed and a STOP codon was added. Each sequence is represented by color on the 3D structure (A,B). Peptides 3 and 12 are not represented as the amino acids are not available on the 3D structure.

### 1.5. ELISA

ELISA experiments were conducted according to Ludolf et al., with few modifications [21]. Briefly, previous titration curves were performed to determine the most appropriate concentration of antigens, antibodies/sample dilution and time of incubations to be used in the assays. High-binding ELISA plates (Nunc MaxiSorp™ flat-bottom; Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) were coated with 400 ng/well of N4S11-SC2 diluted in carbonate buffer pH 9.6 for 18 h at 4 °C. Wells were then blocked with a solution of PBS-T and 1% (*w/v*) BSA for 2 h at 37 °C. Then, 100 µL/well of urine (undiluted) or serum (diluted 1:100 in PBS-T) samples were added and the incubation occurred for 1 h or 30 min for urine or serum samples, respectively, at 37 °C, after which they were again washed. Peroxidase-conjugated anti-human IgG antibody (A18811, 1/10,000 dilution in PBS-T; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added to the wells and plates were incubated for 1 h or 30 min at 37 °C, for urine or serum samples, respectively. Next, wells were washed and reactions were developed by addition of TMB (3,3',5,5-tetramethylbenzidine) for 15 min in the dark. Reactions were stopped by adding 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the optical density (OD) values were read on a microplate spectrophotometer (Multiskan Go, ThermoFisher, Finland), at 450 nm. The cut-off values were determined as the mean plus 2.5 and 2.3 times the standard deviation of negative samples for urine and serum assay, respectively. The index

(I) value for each sample was calculated using the equation  $I = (OD_{\lambda 450 \text{ nm}})/(\text{cut-off})$ . The index value was classified as positive above 1.1, indeterminate between 0.8 and 1.1 and negative below 0.8.

The prokaryotic recombinant proteins, N and S (Prok2-S1) were validated by Ludolf et al. [12] and Ramos et al. [11]. These antigens were used as controls to compare the performance of chimeric protein by using serum and urine samples ( $n = 72$  each), which were obtained after eight days PSO.

### 1.6. Statistical Analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism™ program (version 8.0 for Windows; La Jolla, CA, USA). Value distributions [mean (M) ± standard deviation (SD), as indicated] were obtained for continuous variables, while categorical ones were evaluated as proportions. Receiver Operator Characteristic (ROC) curves were constructed with the OD values of positive (SARS-CoV-2 infection) versus negative (pre-COVID-19 and post-COVID negative) samples. Diagnostic performance was evaluated by estimation of sensitivity (Se), specificity (Sp), Area Under the Curve (AUC) and Youden index (J). Confidence intervals (CI) were defined at the 95% confidence level (95% CI). A paired t-test was used to compare the distinct groups and  $p < 0.05$  values were considered significant. Positive and Negative Predictive Values (PPV and NPV, respectively) were calculated based on the index value, excluding the indeterminate value samples, and using the equation  $NPV = \text{true negative}/\text{false negative} + \text{true negative}$  and  $PPV = \text{true positive}/\text{false positive} + \text{true positive}$ .

## Results

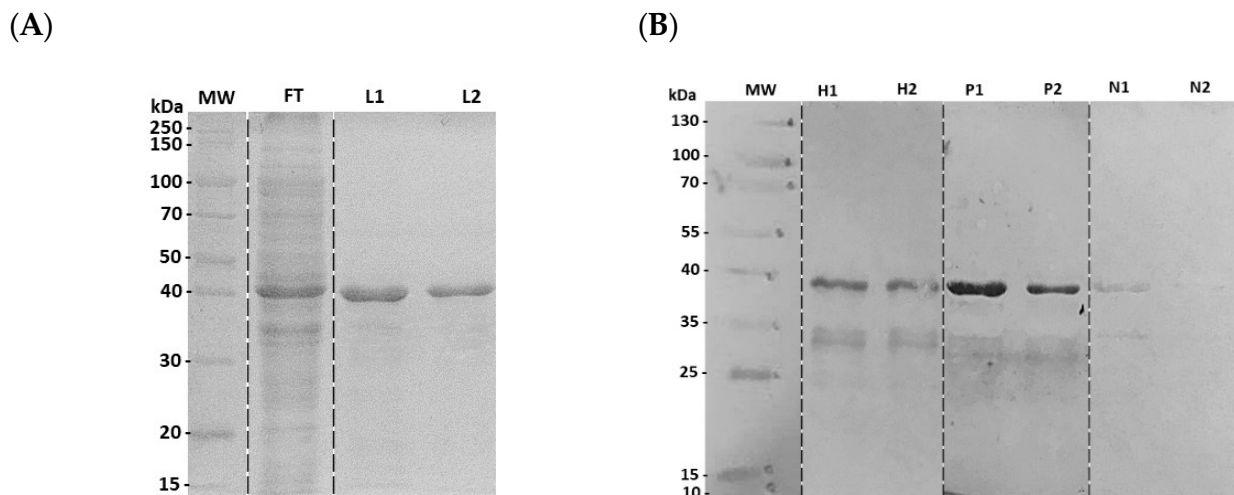
### 1.7. Construction of the Chimeric Protein

The amino acid sequences of surface glycoprotein (YP\_009724390.1) and nucleocapsid phosphoprotein (YP\_009724397.2) proteins were evaluated by bioinformatics and the results are shown (Figure 1A). Eleven Spike and four Nucleocapsid B-cell epitopes were selected (Figure S1) and their amino acid sequences were used to construct the chimera-coding gene in the pET-TEV vector. The amino acid sequences were: TRTQLPPAYTNSFTRGVYY, VYYHKNNKSWMESEFRVY, TRFASVYAWNRKRISN, QIAPGQTGKIADYNYKLP, SKVG-GNYYNYLYRLFRKSNLKPFFERDIST, YFPLQSYGFQPTNGVGY, TESNKKFLPFQQFGRDIADTT-DAVRDP, HADQLTPTWRVYSTGSN, SYQTQTNSPRRARS, ILPDPSPSKRSFIEDLLFNKV and FKEELDKYFKNHTSPDVDLGD for the S protein and TGSNQNGERSGARSKQRRPQG, TNSSPDDQIGYYRRATTR, RSSSRSRNSSRNSTPGS and GQTVTKKSAAEASKKPRQKRT for the N protein. All epitopes were joined by -GPGPG- linker peptides aiming to provide flexibility

and to avoid spatial overlap. The recombinant protein N4S11-SC2 presents an N-terminal tag (MGHHHHHHENLYFQGHMAS) containing the initial methionine and HIS tag from the pET-TEV vector (Figure 1C).

#### 1.8. Characterization of Recombinant N4S11-SC2 Protein

A physical-chemical characterization of the N4S11-SC2 protein was performed and results showed a molecular weight of 41.3 KDa, an isoelectric point of 10.17, an estimated half-life of >10 h in *E. coli* and an instability index (II) of 38.08, suggesting that the protein is stable. SDS-PAGE showed a band of ~41.0 KDa, as expected (Figure 2A). The expression of the N4S11-SC2 protein was confirmed by an immunoblotting assay using an anti-HIS monoclonal antibody. The immunoblottings indicated a stronger positive recognition of the N4S11-SC2 protein to the COVID-19 patient's pools as compared to pre-pandemic negative serum pools (Figure 2B).



**Figure 2.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showing the purification of N4S11-SC2 and immunoblotting of N4S11-SC2 protein against anti-HIS antibody and pooled serum samples from COVID-19 patients and negative control individuals. (A) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showing the purification of N4S11-SC2. FT = Flow-Through; L1 = First N4S11-SC2 Elution; L2 = Second N4S11-SC2 Elution; MW = PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder. (B) H1 and H2: First and second elutions of anti-HIS antibody; P1 and P2: First and second elutions of COVID-19 positive patient's serum pools; N1 and N2: First and second elutions of negative pre-pandemic individuals' serum pools; MW = Page Ruler™ Pre-stained Protein Ladder.

#### 1.9. Diagnostic Evaluation of Chimeric N4S11-SC2 Protein

The immunodiagnostic efficacy of the N4S11-SC2 protein to detect COVID-19 cases was evaluated using an in-house serum- and urine-based ELISA. Paired samples from qRT-PCR-positive patients were used, as well as unpaired negative samples from pre-COVID-19 and post-COVID-19 individuals. Those samples were collected before vaccination had started in Brazil. The ELISA testing urine samples resulted in sensitivity and specificity values of 91.1% and 100%, respectively, while assays performed using serum samples showed sensitivity and specificity values of 83.7% and 100%, respectively (Table 1).

**Table 1.** Comparative table of the results obtained from the diagnostic test of N4S11-SC2 protein for COVID-19 based on the search for specific IgG antibodies in urine and serum. Samples from symptomatic patients for COVID-19 and with PCR + for SARS-CoV-2, as well as from negative control subjects were used. The individual index (I) value obtained by the Abs/cut-off ratio was used to construct ROC curves. The diagnostic performance of the antigen in relation to the type of sample used was based on the evaluation of sensitivity (95% CI), specificity (95% CI), Area Under the Curve (AUC) and Youden index (J). Legend:  $J = (Se + Sp) - 1$ ;  $n$  = samples number, + = positive sample, − = negative sample. Positive and negative predictive values (PPV and NPV, respectively) were calculated on the basis of the index value, excluding the indeterminate value samples (2 urine and 3 serum samples in negative control group, and 8 urine and 16 serum samples in positive group, had an indeterminate index between 0.8 and 1.1) and using the following equations:  $NPV = \frac{\text{true negative}}{\text{true negative} + \text{false negative}}$  and  $PPV = \frac{\text{true positive}}{\text{true positive} + \text{false positive}}$ . CI: confidence interval.

Sample	AUC	p-Value	Cut-Off (Abs)	Se	95%CI	Sp	95%CI	J	PPV	NPV
URINE	0.9841	<0.0001	>0.1900	91.11	84.99% to 95.32%	100.0	83.89% to 100.0%	0.9111	1.000	0.679
SERUM	0.9722	<0.0001	>0.7525	83.70	76.37% to 89.50%	100.0	83.16% to 100.0%	0.7525	1.000	0.607

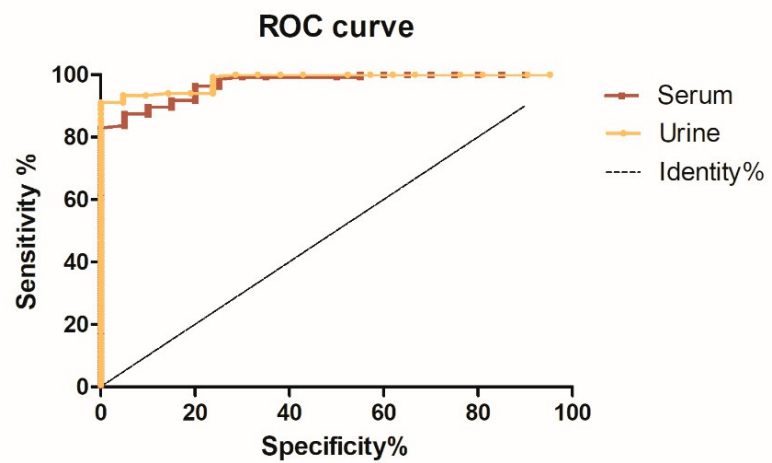
ROC curves were constructed to assess the accuracy of the assays and the results indicated that the urine-based ELISA had a slightly better accuracy with an AUC of 0.9841, as compared to the serum-based ELISA that presented an AUC of 0.9722 (Figure 3A). To standardize and compare the results, individual index values (I) were calculated from OD values and the data of the urine-based ELISA demonstrated that out of 135 samples collected from 79 patients who tested positive for qRT-PCR on different days post-symptom onset (PSO), 118 samples exhibited a positive reaction with the N4S11-SC2 protein, as indicated by a positive index value above 1.1. Additionally, eight samples were classified as “indeterminate” with index values ranging from 0.8 to 1.1, while nine samples showed a negative index value below 0.8. Among the 21 negative control urine samples, two of them showed an indeterminate index value, whereas none exhibited a positive index value (Figure 3B).

Simultaneously, 108 out of 135 serum samples collected from 79 patients who tested positive for qRT-PCR on different days post-symptom onset (PSO) exhibited a positive reaction to the N4S11-SC2 protein, with positive index values exceeding 1.1. Additionally, 16 samples were classified as “indeterminate”, with index values ranging from 0.8 to 1.1, and 11 samples presented a negative index value below 0.8. Among 20 negative control serum samples, only three showed “indeterminate” index values, and none of them displayed positive index values (Figure 3B). PPV and NPV were calculated based on the index values, which excluded the “indeterminate” index value samples, and the NPV and PPV results were 0.679 and 1.000 for urine, respectively, and 0.607 and 1.000 for serum, respectively. Samples ( $n =$

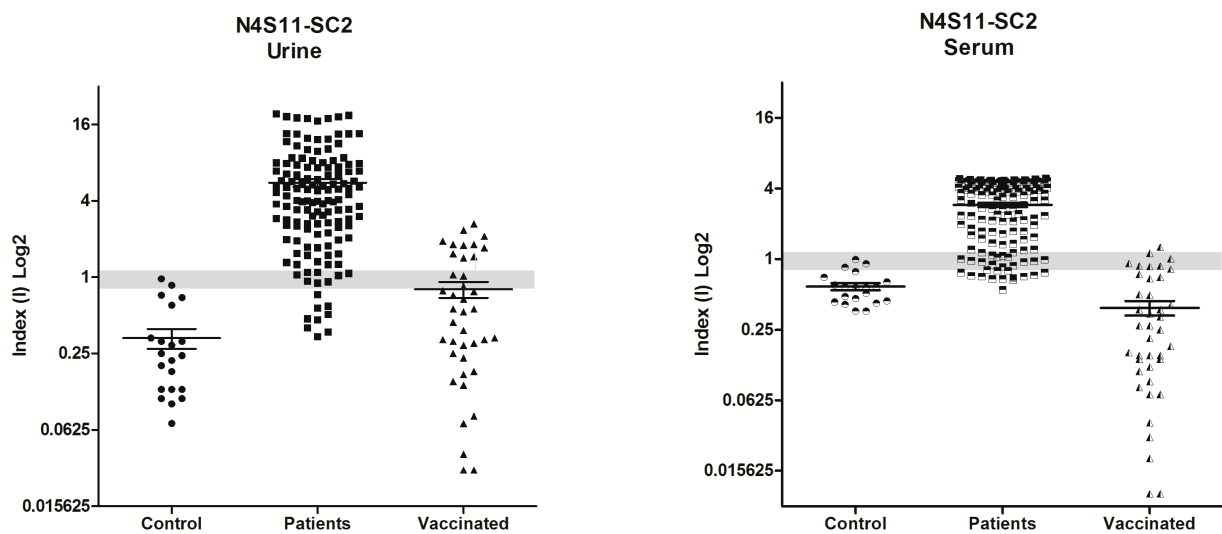
40) from Janssen Ad26.COVS.2 COVID-19-vaccinated subjects included in the study indicated that two serum and eleven urine samples exhibited reactions against the N4S11-SC2 protein, indicating a positive index value exceeding 1.1. Additionally, six serum and three urine samples were classified as indeterminate, with index values ranging from 0.8 to 1.1, and 32 serum and 26 urine samples showed negative index values below

0.8 (Figure 3B). Comparable findings were achieved using the same pool of urine samples for the N4S11-SC2 protein when compared to the N and S recombinant proteins expressed in the prokaryotic system. However, higher sensitivity was observed for the N4S11-SC2 protein, as compared to the S recombinant protein using the same pooled serum samples (Figure 4).

A



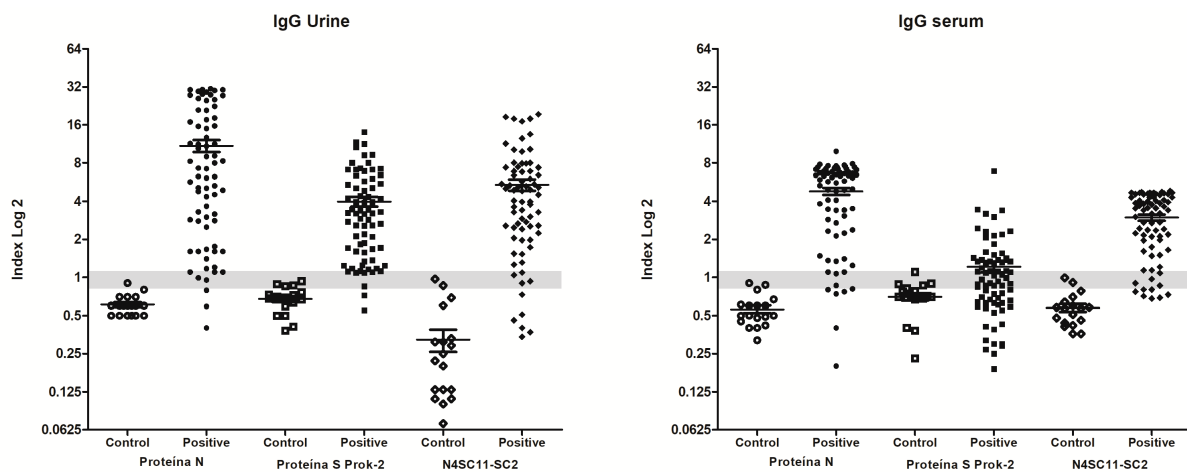
B



**Figure 3.** Comparative diagnostic performance of N4S11-SC2 protein with urine and serum samples.

(A) Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were constructed using the individual index (I) value for each sample to obtain sensitivity, specificity and area under the curve values. (B) ELISA assays were done using urine and paired serum samples ( $n = 135$ ) from COVID-19 patients with previously positive qRT-PCR. Urine and paired serum samples ( $n = 40$ ) were analyzed from previously vaccinated subjects. Urine and unpaired serum samples from healthy control subjects ( $n = 21$  and  $n = 20$ , respectively) were also used. The mean of each group is shown and the gray band indicates

indeterminate values for each sample, while index values below the range ( $<0.8$ ) are negative and values above ( $>1.1$ ) are considered positive.



**Figure 4.** Comparative diagnostic performance among the recombinant N, S and N4S11-SC2 proteins. ELISA assays with the N, S and N4S11-SC2 were conducted using the same urine and serum samples from COVID-19 patients with previously positive qRT-PCR above 8 days PSO ( $n = 72$ ) and from healthy control subjects ( $n = 18$ ). The mean of each group is shown and the gray band indicates indeterminate values for each sample, while index values below the range ( $<0.8$ ) are negative and values above ( $>1.1$ ) are considered positive.

## Discussion

*In vitro* diagnostic assays have shown importance in helping control the COVID-19 pandemic. Serological tests may indicate the presence of antibodies from a previous infection or vaccination, and researchers have remained continuous in the search for new diagnostic solutions to prevent an eventual new wave of this disease in the world. Therefore, the development of more suitable and cost-effective diagnostic antigens is still desirable. Given the constant emergence of new variants, having alternative diagnostic options in place also becomes of paramount importance. In the present study, we constructed a chimera protein called N4S11-SC2 by combining linear B-cell epitopes predicted from amino acid sequences of the Nucleocapsid and Spike proteins from SARS-CoV-2. N4S11-SC2 was expressed in a prokaryotic system and used in an in-house ELISA platform against serum and urine samples from COVID-19 patients diagnosed by RT-PCR. The major findings from the study were that N4S11-SC2 showed relevant sensitivity and specificity values for the diagnosis of SARS-CoV-2, by using the urine and sera of the patients.

Bioinformatic tools to predict antigenic epitopes that are specific for the pathogens have been advancing the development of new diagnostics. Many epitopes have been identified by immunoinformatics prediction or immunoassays and the peptides validated by serological assays, such as ELISA [22–25]. Epitope-based chimeric proteins have been then proposed as recombinant proteins for the development of new COVID-19 vaccines or diagnostics, showing stronger immunogenicity with the possibility to express proteins in a simpler prokaryotic system [13,14]. In our study, N4S11-SC2 showed 83.7% and 91.1% sensitivity when using serum and urine samples, respectively, and 100% specificity for both. Another recombinant chimeric protein of SARS-CoV-2, containing epitopes identified through SPOT synthesis analysis, had shown promise as a serodiagnostic test when using serum samples [19]. Taken together, our

---

current study, supported by these additional studies, suggests that polypeptide-based recombinant antigens are promising alternative candidates for the serodiagnosis of SARS-CoV-2. The production of SARS-CoV-2 antibodies typically occurs within 1 to 3 weeks post symptoms onset (PSO) [2]. Thus, one possible reason for our inability to achieve a 100% sensitivity performance, as described for some tests reported in the literature or commercially available, could be the inclusion in our study of samples collected during the early days of PSO. The immune conversion of IgG antibodies in urine and serum samples, with an increase in the IgG levels along the PSO days, were observed for the N4S11-SC2 protein in patients with more than one collection over time, and is herein

represented by eight patients in Figure S4. In general, samples from patients that had a negative index on the initial days of collection, from the 21<sup>st</sup> day onwards, already had an index > 1.1 for serum and urine. This finding corroborates previous studies conducted with the Spike [11] and Nucleocapsid proteins [12].

A variety of recombinant antigens for the diagnosis of SARS-CoV-2 are available in the market and described in the literature, although with reports of variable performance, as a consequence of the nature of the antigen used [10,26]. The SARS-CoV-2 N protein can be efficiently expressed with prokaryotic system(s) maintaining good immunoreactivity. However, the S protein has been expressed preferentially in eukaryotic systems, which often generate post-translational modifications of the antigen [10]. Differing from the standard serum-based assay, the prokaryotic expression of the rSARS-CoV-2 S protein was not a barrier to obtain relatively high efficiency for the urine-based ELISA. In this context, the SARS-CoV-2 S protein expressed in the prokaryote system is still not suitable for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies in sera samples [11]. In this sense, the N4S11-SC2 protein has demonstrated its potential as an alternative recombinant protein expressed in a prokaryotic system, showing the capability to recognize antibodies against N and S proteins of SARS-CoV-2 in serum or urine samples. Given that urine is not yet in practical use, the employment of the N4S11-SC2 protein also presents advantages of expression in a prokaryotic system, as well as its use against serum and urine samples from patients.

Nonetheless, our study has some limitations, such as the absence of a more diverse serological panel, including samples from other variants of SARS-CoV-2 patients and from other cross-reactive diseases. We have not tested our in-house ELISA against samples obtained from patients with respiratory infections caused by other types of coronaviruses, common circulated viruses (influenza, measles and parvovirus, arboviruses and other types of coronavirus, such as HCoV, that cause only a mild respiratory infection) and individuals vaccinated against influenza. However, we observed no humoral reactivity in serum samples from individuals collected before 2019, sounding that the N4S11-SC2 protein may be specific for SARS-CoV-2 in our in-house ELISA. These same control samples were previously tested using N and S antigens with results of high specificity [11,12]. The patients enrolled in our study had not received any vaccinations at the time of sample collection, so it can be reasonably inferred that the antibodies detected were predominantly produced in response to exposure to the virus.

It is known that the immune response that occurs during vaccination differs from the natural infection. The presence of antibodies generated from the vaccination process was here evaluated using samples from Ad26.COVID.S-vaccinated individuals. Here, we observed that anti-N4S11-SC2 antibodies were not clearly identified using either serum or paired urine samples. The N4S11-SC2 protein exhibited low reactivity against samples collected from vaccinated subjects, particularly when serum samples were used, thus showing a potential to distinguish between those only vaccinated from infected

individuals. This may be explained because of the many variable immunological responses found among the population, influenced by age, immunological status, asymptomatic manifestation, doses and type of vaccine taken, which could impact the intensity and durability of antibodies [27]. Naranbhai et al. have compared the immunogenicity elicited by the available vaccines and found that Ad26.COV2.S yielded lower antibody concentrations, which corroborate the results found here [28]. They also found significant variation in antibody concentrations depending on prior infection, vaccine type and vaccine dose and that recipients of Ad26.COV2.S without prior infection had approximately 25-fold lower antibody concentrations than convalescent unvaccinated individuals. Additionally, due to the high infectivity of COVID-19, it is also challenging to differentiate between the extents of infection-induced immunity versus vaccine-induced immunity within a population [29]. However, we cannot discard the possibility of a low binding ability of the S epitopes included in N4S11-SC2. In this sense, a greater number of samples and a good characterization of their variables would be crucial for understanding the presence of N4S11-SC2 antibodies from the vaccine.

Comparing SARS-CoV-2 with six other HCoVs for the N and S protein sequences shows that SARS-CoV-2 and SARS-CoV have the highest sequence identity, 72% (S) and 88% (N), and the other five types are below 50% [30]. A multi-alignment of N4S11-SC2 with other coronaviruses revealed a significant similarity between some of the N4S11-SC2 selected epitopes and SARS-CoV-1, while showing less similarity with MERS-CoV and common cold coronaviruses (Figure S2). However, it seems commonly found in other studies. While there may be some potential cross-reactivity between SARS and MERS, it is important to note that these two coronaviruses do not typically co-occur worldwide. Previous studies revealed that SARS-CoV-1 memory B cell responses tend to be short-lived after infection [31]. The main concern for antigen test cross-reactivity lies with the common cold coronaviruses (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1), however, we found low similarity in the epitopes used here [24].

It is worth noting that the N4S11-SC2 protein was designed based on the Wuhan-Hu-1 isolate sequence (YP\_009724390.1) and that antibodies were herein identified in samples collected in 2020/2021, when gamma and previous variants were circulating in Brazil [32]. The use of multiple segments of S and N proteins has been proposed as a way to potentially keep test accuracy as new variants arise [33]. An alignment among the amino acid sequences of all peptides from the N4S11-SC2 chimera and some of the key variants of interest was conducted, revealing few amino acid variations among the analyzed strains (Figure S3). Yet, comprehensive studies on variant effects on the sensitivity of approved antibody tests, where continuous monitoring and assessing kits for prompt variant detection remain crucial, are lacking. Regarding the appearance of new SARS-CoV-2 variants, amino acid mutation may impact the sensitivity of any available test, including our in-house ELISA N4S11-SC2, so future studies are still required to be conducted in order to establish assay sensitivity in patients infected with actual and emerging SARS-CoV-2 variants.

In summary, our data should be considered as providing proof-of-concept of N4S11-SC2 for SARS-CoV-2 diagnosis when using sera and urine samples. They suggest that N4S11-SC2 deserves to be evaluated in large populations in future studies and that its suitability as a diagnostic antigen should also be examined on other platforms, e.g., in rapid point-of-care lateral flow tests.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15091877/s1>, Figure S1: Identification of linear B-cell epitopes by bioinformatics analysis; title; Figure S2: Amino acid sequence alignment of N4S11-CoV2 and some other CoV virus of interest; Figure S3: Comparative analysis of amino acid sequences of selected peptides in N4S11-CoV2 and some SARS-2 variants of interest [32,34]; Figure S4: Dynamics of IgG antibody conversion in patient urine and serum samples.

**Author Contributions:** Conceptualization: R.A.M.-d.-Á., E.A.F.C. and F.L. Study design: F.L., F.F.R., D.P.L., R.A.M.-d.-Á. and E.A.F.C. Technical support: F.L., F.F.R., I.A.G.P., M.M.C., F.G.F. and D.P.L.

Execution: F.L., F.F.R., I.A.G.P., M.M.C., R.S.B., R.S., R.S.A., V.G.F., M.F.N.M., R.S.B., D.P.L., V.T.M.,

G.S.V.T., D.L.V. C.S.F. and A.T.C. Data analysis and interpretation: F.L., F.F.R., R.A.M.-d.-Á. and

E.A.F.C. Figures: F.L., R.S.B., M.M.C., and F.F.R. Patient recruitment, TCLE application (informed consent form) and sample collection: J.A.O.-d.-S., P.F.V., J.F.M.C., M.F.N.M. and C.G.R. Funding acquisition and infrastructure: R.A.M.-d.-Á., V.N., M.C., J.F.M.C. and E.A.F.C. Writing—Original draft: F.L., F.F.R., R.S.B., R.A.M.-d.-Á., M.M.C. and E.A.F.C. Writing—Review and editing: F.L., F.F.R., R.A.M.-d.-Á. and E.A.F.C. Directly accessed and verified the underlying data reported: F.L., F.F.R.,

M.M.C., R.A.M.-d.-Á. and E.A.F.C. All authors have read and agreed to the published version of

the manuscript.

**Funding:** This work was supported by Secretaria de Educação Superior do Ministério da Educação (SESU/MEC), grant 04/2020, Enfrentamento da COVID-19 (to V.N.); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), grant APQ-02167-21 (to E.A.F.C.); and Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and CNPq fellowships/scholarships (to F.L., F.F.R., I.A.G.P., M.M.C., R.S.B., D.P.L., R.S., R.S.A., V.G.F., M.F.N.M.,

V.T.M., G.S.V.T., D.L.V., C.S.F., A.T.C., J.F.M.C. and P.F.V.).

**Data Availability Statement:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** We acknowledge the help of all students, nurses and clinicians involved in the collection and organization of the samples. We also thank the Hospital das Clínicas/UFMG and Hospital Santa Helena for allowing the collection of samples.

**Conflicts of Interest:** A patent application at the Brazilian National Institute of Industrial Property was issued under case number BR 10 2021 014066 6. The authors declare that they have no other competing interests.

## References

1. FDA. EUA Authorized Serology Test Performance. Food and Drug Administration. Available online: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance> (accessed on 22 August 2022).
2. CDC. COVID-19 Testing: What You Need to Know. Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/testing.html> (accessed on 16 August 2023).
3. Matta, J.; Wiernik, E.; Robineau, O.; Carrat, F.; Touvier, M.; Severi, G.; de Lamballerie, X.; Blanché, H.; Deleuze, J.-F.; Gouraud, C.; et al. Association of Self-reported COVID-19 Infection and SARS-CoV-2 Serology Test Results with Persistent Physical Symptoms among French Adults during the COVID-19 Pandemic. *JAMA Intern. Med.* **2022**, *182*, 19–25. [CrossRef] [PubMed]
4. Ong, D.S.; Fragkou, P.C.; Schweitzer, V.A.; Chemaly, R.F.; Moschopoulos, C.D.; Skevaki, C. How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 981–986. [CrossRef] [PubMed]
5. FDA. SARS-CoV-2 Viral Mutations: Impact on COVID-19 Tests. Food and Drug Administration. Available online: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests> (accessed on 16 August 2023).
6. Kumar, S.; Saxena, S.K. Structural and molecular perspectives of SARS-CoV-2. *Methods* **2021**, *195*, 23–28. [CrossRef] [PubMed]
7. Verheije, M.H.; Hagemeijer, M.C.; Ulasli, M.; Reggiori, F.; Rottier, P.J.M.; Masters, P.S.; de Haan, C.A.M. The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. *J. Virol.* **2010**, *84*, 11575–11579. [CrossRef]
8. Grzelak, L.; Temmam, S.; Planchais, C.; Demeret, C.; Tondeur, L.; Huon, C.; Guivel-Benhassine, F.; Staropoli, I.; Chazal, M.; Dufloo, J.; et al. A comparison of four serological assays for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eabc3103. [CrossRef]
9. Liu, W.; Liu, L.; Kou, G.; Zheng, Y.; Ding, Y.; Ni, W.; Wang, Q.; Tan, L.; Wu, W.; Tang, S.; et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e00461–20. [CrossRef]
10. Li, D.; Li, J. Immunologic Testing for SARS-CoV-2 Infection from the Antigen Perspective. *J. Clin. Microbiol.* **2021**, *59*, e02160–20. [CrossRef]
11. Ramos, F.F.; Bagno, F.F.; Vassallo, P.F.; Oliveira-Da-Silva, J.A.; Reis, T.A.R.; Bandeira, R.S.; Machado, A.S.; Lage, D.P.; Martins, V.T.; Fernandes, A.P.; et al. A urine-based ELISA with recombinant non-glycosylated SARS-CoV-2 spike protein for detecting anti-SARS-CoV-2 spike antibodies. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 4345. [CrossRef]
12. Ludolf, F.; Ramos, F.F.; Bagno, F.F.; Oliveira-Da-Silva, J.A.; Reis, T.A.R.; Christodoulides, M.; Vassallo, P.F.; Ravetti, C.G.; Nobre, V.; da Fonseca, F.G.; et al. Detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine samples: A noninvasive and sensitive way to assay COVID-19 immune conversion. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabn7424. [CrossRef]
13. Mamaghani, A.J.; Arab-Mazar, Z.; Heidarzadeh, S.; Ranjbar, M.M.; Molazadeh, S.; Rashidi, S.; Niazipour, F.; Vishteh, M.N.; Bashiri, H.; Bozorgomid, A.; et al. In-silico design of a multi-epitope for developing sero-diagnosis detection of SARS-CoV-2 using spike glycoprotein and nucleocapsid

- antigens. *Netw. Model. Anal. Health Inform. Bioinform.* **2021**, *10*, 61. [CrossRef]
14. Vengesai, A.; Naicker, T.; Midzi, H.; Kasambala, M.; Muleya, V.; Chipako, I.; Choto, E.; Moyo, P.; Mdluluz, T. Peptide microarray analysis of in-silico predicted B-cell epitopes in SARS-CoV-2 seropositive healthcare workers in Bulawayo, Zimbabwe. *Acta Trop.* **2023**, *238*, 106781. [CrossRef] [PubMed]
  15. Oliveira, S.C.; de Magalhães, M.T.Q.; Homan, E.J. Immunoinformatic Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Identification of COVID-19 Vaccine Targets. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 587615. [CrossRef] [PubMed]
  16. Lorenzo, M.A.; Pachón, D.; Maier, A.; Bermúdez, H.; Losada, S.; Toledo, M.; Pujol, F.H.; de Noya, B.A.; Noya, O.; Serrano, M.L. Immunoinformatics and Pepsan strategies on the path of a peptide-based serological diagnosis of COVID-19. *J. Immunol. Methods* **2021**, *495*, 113071. [CrossRef] [PubMed]
  17. Musicò, A.; Frigerio, R.; Mussida, A.; Barzon, L.; Sinigaglia, A.; Riccetti, S.; Gobbi, F.; Piubelli, C.; Bergamaschi, G.; Chiari, M.; et al. SARS-CoV-2 Epitope Mapping on Microarrays Highlights Strong Immune-Response to N Protein Region. *Vaccines* **2021**, *9*, 35. [CrossRef] [PubMed]
  18. Schwarz, T.; Heiss, K.; Mahendran, Y.; Casilag, F.; Kurth, F.; Sander, L.E.; Wendtner, C.-M.; Hoehstetter, M.A.; Müller, M.A.; Sekul, R.; et al. SARS-CoV-2 Proteome-Wide Analysis Revealed Significant Epitope Signatures in COVID-19 Patients. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 629185. [CrossRef]
  19. Gomes, L.R.; Durans, A.M.; Napoleão-Pêgo, P.; Waterman, J.A.; Freitas, M.S.; De Sá, N.B.R.; Pereira, L.V.; Furtado, J.S.; Aquino, R.G.; Machado, M.C.R.; et al. Multiepitope Proteins for the Differential Detection of IgG Antibodies against RBD of the Spike Protein and Non-RBD Regions of SARS-CoV-2. *Vaccines* **2021**, *9*, 986. [CrossRef]
  20. Abraham Peele, K.; Srihansa, T.; Krupanidhi, S.; Ayyagari, V.S.; Venkateswarulu, T.C. Design of multi-epitope vaccine candidate against SARS-CoV-2: A in-silico study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, *39*, 3793-3801. [CrossRef]
  21. Ludolf, F.; Ramos, F.F.; Bagno, F.; Coelho, E.A.; Fonseca, F.G. Urine-based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to detect anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein antibodies. *Bio Protocol.* **2022**, preprint. [CrossRef]
  22. Phan, I.Q.; Subramanian, S.; Kim, D.; Murphy, M.; Pettie, D.; Carter, L.; Anishchenko, I.; Barrett, L.K.; Craig, J.; Tillery, L.; et al. In silico detection of SARS-CoV-2 specific B-cell epitopes and validation in ELISA for serological diagnosis of COVID-19. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 4290. [CrossRef]
  23. Polyiam, K.; Phoolcharoen, W.; Butkhot, N.; Srisaowakarn, C.; Thitithanyanont, A.; Auewarakul, P.; Hoonsuwan, T.; Ru- engjitchatchawalya, M.; Mekvichitsaeng, P.; Roshorm, Y.M. Immunodominant linear B cell epitopes in the spike and membrane proteins of SARS-CoV-2 identified by immunoinformatics prediction and immunoassay. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 20383. [CrossRef]
  24. Rodrigues-Da-Silva, R.N.; Conte, F.P.; da Silva, G.; Carneiro-Alencar, A.L.; Gomes, P.R.; Kuriyama, S.N.; Neto, A.A.F.; Lima-Junior, J.C. Identification of B-Cell Linear Epitopes in the Nucleocapsid (N) Protein B-Cell Linear Epitopes Conserved among the Main SARS-CoV-2 Variants. *Viruses* **2023**, *15*, 923. [CrossRef] [PubMed]
  25. Scussel, R.; Feuser, P.E.; Luiz, G.P.; Galvani, N.C.; Fagundes, M.; Dal-Bó, A.G.; de Araújo, P.H.H.; Coelho, E.A.F.; Chávez- Olórtégui, C.; Machado-De-Ávila, R.A. Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins. *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**, *5*, 642-653. [CrossRef] [PubMed]
  26. Li, Y.; Lai, D.-Y.; Lei, Q.; Xu, Z.-W.; Wang, F.; Hou, H.; Chen, L.; Wu, J.; Ren, Y.; Ma, M.-L.; et al. Systematic evaluation of IgG responses to SARS-CoV-2 spike protein-derived peptides for monitoring COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.* **2021**, *18*, 621-631. [CrossRef] [PubMed]
  27. Le Gars, M.; Hendriks, J.; Sadoff, J.; Ryser, M.; Struyf, F.; Douoguih, M.; Schuitemaker, H. Immunogenicity and efficacy of Ad26.COVS.2: An adenoviral vector-based COVID-19 vaccine. *Immunol. Rev.* **2022**, *310*, 47-60. [CrossRef]
  28. Naranbhai, V.; Garcia-Beltran, W.F.; Chang, C.C.; Mairena, C.B.; Thierauf, J.C.; Kirkpatrick, G.; Onozato, M.L.; Cheng, J.; Denis, K.J.S.; Lam, E.C.; et al. Comparative Immunogenicity and Effectiveness of mRNA-1273, BNT162b2, and Ad26.COVS.2 COVID-19 Vaccines. *J. Infect. Dis.* **2022**, *225*, 1141-1150. [CrossRef]
  29. WHO. Interim Statement on Hybrid Immunity and Increasing Population Seroprevalence Rates. 2022. Available on-line: <https://www.who.int/news/item/01-06-2022-interim-statement-on-hybrid-immunity-and-increasing-population-seroprevalence-rates> (accessed on 16 August 2023).
  30. Zhang, B.; Tian, J.; Zhang, Q.; Xie, Y.; Wang, K.; Qiu, S.; Lu, K.; Liu, Y. Comparing the

Nucleocapsid Proteins of Human Coronaviruses: Structure, Immunoregulation, Vaccine, and Targeted Drug. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 761173. [[CrossRef](#)]

31. Channappanavar, R.; Fett, C.; Zhao, J.; Meyerholz, D.K.; Perlman, S. Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Virol.* **2014**, *88*, 11034–11044. [[CrossRef](#)]
32. Alcantara, L.C.J.; Nogueira, E.; Shuab, G.; Tosta, S.; Fristch, H.; Pimentel, V.; Souza-Neto, J.A.; Coutinho, L.L.; Fukumasu, H.; Sampaio, S.C.; et al. SARS-CoV-2 epidemic in Brazil: How the displacement of variants has driven distinct epidemic waves. *Virus Res.* **2022**, *315*, 198785. [[CrossRef](#)]
33. Thakur, S.; Sasi, S.; Pillai, S.G.; Nag, A.; Shukla, D.; Singhal, R.; Phalke, S.; Velu, G.S.K. SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines. *Front. Med.* **2022**, *9*, 815389. [[CrossRef](#)]
34. Sanches, P.R.S.; Charlie-Silva, I.; Braz, H.L.B.; Bittar, C.; Freitas Calmon, M.; Rahal, P.; Cilli, E.M. Recent advances in SARS-CoV-2 Spike protein and RBD mutations comparison between new variants Alpha (B.1.1.7, United Kingdom), Beta (B.1.351, South Africa), Gamma (P.1, Brazil) and Delta (B.1.617.2, India). *J. Virus Erad.* **2021**, *7*, 100054. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## ANEXO 3 – Patente depositada



10/08/2023 870230070698  
13:58  
  
29409162304085861

**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 016112 0

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala  
2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: [patentes@ctit.ufmg.br](mailto:patentes@ctit.ufmg.br)

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 10/08/2023 às  
13:58, Petição 870230070698