

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA**

Camila Akemi Oliveira Yamada

**DESVENDANDO EPÍTOPOS VIRAIS VIA RMN DE INTERAÇÕES
ANTÍGENO-ANTICORPO**

BELO HORIZONTE

2024

Camila Akemi Oliveira Yamada

**DESVENDANDO EPÍTOPOS VIRAIS VIA RMN DE INTERAÇÕES
ANTÍGENO-ANTICORPO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioinformática, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Bioinformática.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Torquato Quezado de Magalhães

Coorientador: Prof. Dr. Adolfo Henrique de Moraes Silva

BELO HORIZONTE

2024

043

Yamada, Camila Akemi Oliveira.

Desvendando epítomos virais via RMN de interações antígeno-anticorpo [manuscrito] / Camila Akemi Oliveira Yamada. – 2024.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães.

Coorientador: Prof. Dr. Adolfo Henrique de Moraes Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Mapeamento de Epitomos. 3. Espectroscopia de Ressonância Magnética. 4. Covid-19. I. Magalhães, Mariana Torquato Quezado de. II. Silva, Adolfo Henrique de Moraes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Akemi Oliveira Yamada

"Desvendando epítomos virais via RMN de interações antígeno-anticorpo"

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos
Professores:

Prof^a Mariana Torquato Quezado de Magalhaes - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^a Glória Regina Franco
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^a Luciana Elena de Souza Fraga Machado
Universidade de São Paulo

Belo Horizonte, 28 de março de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Torquato Quezado de Magalhaes, Professora do Magistério Superior**, em 01/04/2024, às 12:18, 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 **Gloria Regina Franco, Professora do Magistério Superior**, em 01/04/2024, às 18:14, 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 **Luciana Elena de Souza Fraga Machado, Usuária Externa**, em 02/04/2024, às 12:20, 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 **Adolfo Henrique de Moraes**



Silva, Professor do Magistério Superior, em 10/04/2024, às 08:11, 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, informando o código verificador **3146666** e o código CRC **C3BC3739**.

Referência: Processo nº 23072.218898/2024-16

SEI nº 3146666

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvia e Hélio, que sempre me incentivaram a estudar e me tornar independente. Sem a dedicação e carinho de vocês eu jamais teria chegado onde cheguei hoje. Posso não falar muito isso, mas obrigada por todo o esforço de vocês. Amo muito vocês.

À minha irmã, Paula, e ao meu cunhado, Felipe, por me darem todo o apoio que eu precisava, ainda mais após um período tão difícil que foi a pandemia. Não posso deixar de lado a Kira, a Aika e a Hana que, nos momentos de maior estresse, sempre me animaram e me deixaram feliz com seus latidos, brincadeiras e suas fofuras.

Ao Rafa, por sempre estar do meu lado nos momentos mais difíceis e ser essa pessoa tão importante pra mim. Me aguentou fritando desde o TCC e no mestrado não poderia ser diferente. Sei que também estava passando por momentos difíceis da sua trajetória e ainda assim se preocupou comigo e me apoiou nesse processo de escrita da dissertação. Além disso, foi uma das pessoas que mais acreditou que eu conseguia fazer isso tudo e ainda passar na seleção do doutorado. Mesmo mudando de laboratório e me abandonando, nunca deixou de me dizer “relaxa, tudo vai dar errado!”. É por esses e outros momentos que eu te amo!

Ao Flávio Júnior, Gabriel Portwood, Ana Tedeschi e Pedro Reis pelas fofocas do dia a dia, almoços no bandeirão e rolezinhos para a gente fofocar mais ainda.

À Ana Carolina, pelas conversas, consultorias de química e companhia para docinhos pós almoço.

À Júlia Rodrigues, por ter sido minha companheira em algumas disciplinas e na SBBF, onde entendia meus olhares, julgamentos e risadas de nervoso.

Ao Bruno Santos, por sempre se esforçar para me ajudar a descobrir algo que pergunto para ele de curiosidade, pelas discussões nos seminários e pela companhia na AUREMN/BIORNMR e no laboratório sendo meu vizinho de mesa.

À todos os membros do LBM por todos esses anos juntos, pelas discussões e dicas durante os seminários e pelas festas (surpresas e planejadas).

Ao Glads e a Yala, por todos esses anos que passamos juntos, pelas nossas aventuras fazendo trilhas, dirigindo em estradas, pelas festas e encontros aos finais de semana para comer e bater papo e pelos estudos para as provas.

Ao professor Ronaldo Nagem (mesmo me chamando de velhas) e seus alunos, pelo auxílio e por terem cedido o espaço e os equipamentos para a realização dos experimentos.

Ao professor Lucas Bleicher, pelos conselhos sobre os experimentos e pelo apoio em outros assuntos da faculdade.

À professora Glória Franco, por ter aceitado ser da minha banca e por ter sido uma excelente professora de EGTP. Apesar de ter me perguntado se fiquei com medo depois de ver

você na banca da Yala, não consigo pensar em uma pessoa melhor para ser da minha banca. Com certeza que trouxe contribuições importantes para mim.

À doutora Luciana Machado, também por ter aceitado ser da minha banca e pelos momentos de conversa durante a AUREMN, principalmente na apresentação de pôster (aquela sua cachaça estava uma delícia).

Aos técnicos Jamil Silvano, Eneida Valente e Elimar Faria, pelo auxílio ao longo de todos os anos. Sem vocês seria impossível fazer qualquer tipo de experimento.

À Patrícia, pelas nossas conversas no corredor, por sempre se preocupar comigo quando eu sumia por um tempo do ICB e por sempre manter o laboratório limpo.

Ao programa de pós-graduação em Bioinformática, principalmente para os secretários Tiago Silva e a Sheila Santana, pela paciência, atenção e carinho. Sem vocês eu teria surtado com os problemas de bolsa, seleção e matrícula.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG, por fornecerem o auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Ao meu co-orientador, Adolfo Moraes, por todo o auxílio com os experimentos de RMN e por ter sido um ótimo professor desde a graduação. Sem suas aulas eu estaria totalmente perdida em relação a parte matemática do RMN e também não conseguiria fazer os exercícios do Christian Griesinger (que, ainda bem, começaram com apenas dois spins).

À minha orientadora, Mariana Quezado, pelos quase oito anos sendo minha orientadora e por mais quatro anos que estão por vir, já que já me aceitou como sua aluna de doutorado. Temos muitas histórias para contar, principalmente a de quando pinte o laboratório de azul junto com a Yala. Aprendi muito com você nesses últimos anos, não apenas coisas de laboratório mas da vida também. Obrigada por ter confiado e acreditado em mim durante todos esses anos e por todos os momentos que passamos juntas.

“They say that the best blaze burns the brightest
when circumstances are at their worst.”

Howl's Moving Castle

I. RESUMO

Anticorpos são glicoproteínas da resposta imune humoral que, devido à sua notável diversidade de estruturas primárias, podem reconhecer, ligar e neutralizar antígenos derivados de patógenos, erradicando microorganismos por opsonização. Devido a essa capacidade de reconhecer e ligar seletivamente um antígeno específico, alguns estudos visam identificar experimentalmente o epítipo, a região em contato com um anticorpo, em um processo chamado mapeamento de epítipo. A identificação e caracterização desses locais de ligação auxiliam no desenvolvimento de novas terapêuticas, vacinas e diagnósticos. A pandemia de COVID-19 ressaltou essa necessidade de identificar novos alvos para tratamentos e diagnóstico. Neste estudo, utilizamos a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) para mapear os epítipos do domínio de ligação ao RNA (N-NTD) da proteína imunogênica do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2, que interagem com os anticorpos policlonais do soros de pacientes da região metropolitana de Belo Horizonte. Observando as alterações nos espectros de ^1H - ^{15}N HSQC do antígeno ao se ligar aos anticorpos e calculando o CSP, determinamos resíduos específicos envolvidos na interação. Para obter uma compreensão mais aprofundada das propriedades dinâmicas e conformacionais, realizamos experimentos de intensificação da relaxação paramagnético (PRE) com gadolínio (Gd) tanto na proteína livre quanto no complexo proteína-anticorpo, a fim de obter informações sobre a acessibilidade ao solvente. Observamos que os resíduos Leu16, Lys25, Ser38, Asp63, Leu64 e Thr126, localizados principalmente em uma região de volta, foram descritos como tendo um CSP significativo quando a proteína interage com o RNA viral e são também resíduos observados na interação proteína-anticorpo e no experimento de PRE. Isso sugere que a formação do complexo proteína-anticorpo impediria o empacotamento do RNA e a montagem em partículas virais. Os resíduos Lys25, Asp63 e Thr126 também foram observados como sendo importantes para o contato inicial da proteína com ligantes. Além disso, foram propostos três epítipos que podem ser utilizados para o diagnóstico da COVID-19. Assim, os resultados deste estudo contribuirão para uma melhor compreensão da ligação anticorpo-antígeno, estabilidade e propriedades funcionais, proporcionando informações valiosas para o desenvolvimento de vacinas e potenciais intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: Mapeamento de epítipos; RMN; COVID.

II. ABSTRACT

Antibodies are glycoproteins of the humoral immune response that, due to their remarkable diversity of primary structures, can recognize, bind, and neutralize antigens derived from pathogens and eradicate microorganisms by opsonization. Because of this ability to selectively recognize and bind a given antigen, some studies aim to experimentally identify the epitope, the region in contact with an antibody, which is a process called epitope mapping. Identifying and characterizing these binding sites aid in developing new therapeutics, vaccines, and diagnostics. The COVID-19 pandemic has underscored the need to identify new targets for treatments and diagnostics. In this study, we used nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to map the epitopes of the immunogenic SARS-CoV-2 nucleocapsid RNA binding site domain (N-NTD) protein that interacts with polyclonal antibodies from patient sera from the Belo Horizonte metropolitan region. Observing changes in the NMR spectra ^1H - ^{15}N HSQC of the antigen upon binding to the antibodies and calculating the CSP, we determine specific residues involved in the interaction. To gain further insight into the dynamics and conformational properties, we conducted paramagnetic relaxation enhancement experiments (PRE) with gadolinium (Gd) on both the free protein and the protein-antibody complex, elucidating solvent accessibility. We observed that residues Leu16, Lys25, Ser38, Asp63, Leu64, and Thr126, mainly located in a loop region, have been described as having significant CSP when the protein interacts with viral RNA. These residues are also observed in protein-antibody interaction and in the PRE experiment. This suggests that the formation of the complex protein-antibody would prevent the RNA genome packaging and the assembly into virus particles. Residues Lys25, Asp63, and Thr126 have also been observed to be important for the initial contact of the protein with ligands. Additionally, three epitopes have been proposed that could be used for COVID-19 diagnosis. Thus, the results of this study will contribute to a better understanding of antibody-antigen binding, stability, and functional properties, providing valuable information for vaccine development and potential therapeutic interventions.

Keywords: Epitope mapping; NMR; COVID.

III. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática e estrutural de um IgG.....	19
Figura 2 - Representação estrutural da região de paratopo e epítopo.....	20
Figura 3 - Representação esquemática da perturbação do deslocamento químico e do alargamento de linha.....	24
Figura 4 - Representação esquemática da metodologia de HDX de memória por RMN.	25
Figura 5 - Representação esquemática da estrutura do coronavírus humano	27
Figura 6 - Representação esquemática da arquitetura da proteína N do SARS-CoV-2...	28
Figura 7 - Representações do domínio de ligação ao RNA (N-NTD) do SARS-CoV-2..	29
Figura 8 - Separação cromatográfica por afinidade e análise por SDS-PAGE.....	37
Figura 9 - Separação cromatográfica por gel-filtração e análise por SDS-PAGE.....	38
Figura 10 - Alinhamento entre os resíduos localizados na proteína “N” e no domínio “NTD”	39
Figura 11 - Espectro de HSQC ^1H - ^{15}N da proteína N-NTD.....	40
Figura 12 - Avaliação da estabilidade da proteína após o processo de liofilização.....	41
Figura 13 - Comparação dos espectros em dois pHs diferentes.....	43
Figura 14 - Comparação dos espectros coletados em diferentes temperaturas.....	44
Figura 15 - Avaliação da influência da mudança de temperatura na estrutura da proteína.....	45
Figura 16 - Comparação entre os resíduos com maior CSP pela mudança de temperatura e pela ligação ao RNA.....	47
Figura 17 - Análises das interações do complexo proteína-anticorpo.....	49
Figura 18 - Mapeamento dos resíduos com maior CSP, encontrados na interação proteína-anticorpo, na estrutura da N-NTD ligada ao RNA.....	51
Figura 19 - Sobreposição dos espectros da proteína livre e em complexo, em duas concentrações de Gd^{3+}	53
Figura 20 - Representações gráficas dos decaimentos das intensidades dos sinais pela concentração de gadolínio.....	54
Figura 21 - Resíduos que sofreram menor decaimento quando ligados ao anticorpo destacados na proteína ligada ao RNA.....	57
Figura 22 - Mapeamento superficial dos resíduos que sofreram uma diminuição na	

taxa de decaimento e dos resíduos mais expostos de acordo com o VADAR.....	59
Figura 23 - Mapeamento estrutural dos epítomos propostos.....	62
Figura 24 - Alinhamento de estruturas primárias dos coronavírus HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV-2 e SARS-CoV-1.....	63

IV. LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 - Abundância natural do hidrogênio, carbono, nitrogênio e seus respectivos isótopos.....	23
Tabela 2 - Resíduos descritos por Dinesh e colaboradores (2020) por apresentarem maior CSP durante ligação da proteína com RNA.....	46
Tabela 3 - Comparação entre os resíduos encontrados nos experimentos de interação proteína-anticorpo e relaxação paramagnética.....	55
Tabela 4 - Lista dos quatorze primeiros resíduos expostos com base no VADAR.....	58
Tabela 5 - Resíduos relevantes obtidos das análises combinadas.....	61

V. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab	Anticorpo
ASA	Área acessível ao solvente (do inglês, <i>accessible surface area</i>)
BMRB	Banco de Dados de Ressonância Magnética Biológica (do inglês, <i>Biological Magnetic Resonance Bank</i>)
CCPN	<i>Collaborative Computing Project for NMR</i>
CENABIO	Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem
CNRMN	Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear
COVID-19	Doença do Coronavírus (do inglês, <i>Coronavirus Disease 19</i>)
CSP	Perturbação do deslocamento químico (do inglês, <i>chemical shift perturbation</i>)
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática (do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
EMSA	Ensaio de deslocamento de mobilidade eletroforético, do inglês, <i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ESPII	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno (do inglês, <i>fragment antigen binding</i>)
Fc	Fragmento cristalino
FPLC	Cromatografia líquida rápida de proteínas (do inglês, <i>fast protein liquid chromatography</i>)
Gd ³⁺	Gadolínio
HDX	Troca hidrogênio-deutério (do inglês, <i>hydrogen-deuterium exchange</i>)

HSQC	Coerência quântica única heteronuclear (do inglês, <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)
Hz	Hertz
IDR	Região intrinsecamente desordenada (do inglês, <i>Intrinsic disorder region</i>)
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropiltiogalactosidase
LB	Meio <i>Luria Bertani</i>
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome respiratória do Oriente Médio (do inglês, <i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>)
O.D.	Densidade óptica (do inglês, <i>optical density</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	Partes por milhão
PRE	Intensificação do relaxamento paramagnético (do inglês, <i>paramagnetic relaxation enhancement</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (do inglês, <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>)
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (do inglês, <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>)
VADAR	<i>Volume Area Dihedral Angle Reporter</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Anticorpos: estrutura e função.....	18
1.2. Epítomos.....	20
1.2.1. Mapeamento de epítomos.....	21
1.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	22
1.3.1. Técnicas de relaxação paramagnética.....	23
1.3.2. Mapeamento de epítomos por RMN.....	23
1.4. Coronavírus.....	26
1.4.1. SARS-CoV-2.....	27
1.4.1.1. A proteína N.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Obtenção do proteína N recombinante marcada com ¹⁵ N.....	32
3.2. Obtenção dos anticorpos reativos.....	33
3.3. Medidas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear.....	34
3.4. Análise de dados de RMN.....	34
3.5. Avaliação da qualidade da amostra.....	35
3.6. Avaliação da interação proteína-anticorpo.....	35
3.7. Experimento de relaxação paramagnética e análise pelo de resíduos expostos ao solvente.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Obtenção da proteína ¹⁵ N-N-NTD do SARS-CoV-2 para análises estruturais por RMN.....	37
4.2. Avaliação da qualidade da amostra.....	41
4.2.1. Avaliação do processo de liofilização na estabilidade da proteína N e as implicações para as análises estruturais.....	41
4.2.2. Avaliação da sensibilidade da proteína à mudança de pH por meio de RMN....	42
4.2.3. Avaliação da sensibilidade da proteína à mudança de temperatura por meio de espectroscopia de RMN.....	43
4.3. Avaliação da interação proteína-anticorpo por meio da análise da perturbação do deslocamento químico.....	49
4.4. Relaxação paramagnética na análise da interação proteína-anticorpo utilizando gadolínio como agente de perturbação do sinal químico.....	52
4.5. Análise dos resíduos expostos ao solvente por meio de uma técnica in silico.....	57
4.6. Explorando novos epítomos para o diagnóstico da COVID-19.....	61
5. CONCLUSÕES.....	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
7. APÊNDICES.....	73

1. INTRODUÇÃO

Os vírus são agentes etiológicos de várias doenças crônicas e graves e têm uma presença global (HEWITT et al., 2016; MCCARTHY; DAVENPORT; MORRISON, 2018; SHARMA et al., 2023). Devido a sua fácil transmissão e ampla disseminação, alguns vírus podem levar a epidemias ou pandemias, como observado ao longo da história, por exemplo, pelo vírus causador da ebola (FURUYAMA; MARZI, 2019), da influenza (KRAMMER et al., 2018), da imunodeficiência humana adquirida (HIV, do inglês, *human immunodeficiency virus*) (MENÉNDEZ-ARIAS; DELGADO, 2022) e mais recentemente do COVID-19 (do inglês, *Coronavirus Disease 19*) (BIANCOLELLA et al., 2023). Levando em consideração a alta prevalência de infecções virais, o surgimento de novos vírus e a reemergência de outros, a pesquisa em busca de novas formas de tratamento, diagnósticos e vacinas tornou-se extremamente importante (GONÇALVES et al., 2021; KIM, 2022).

Pensando nessa necessidade por novas abordagens para diagnóstico, prognóstico e tratamento, diversos grupos de pesquisa têm focado na procura por biomarcadores. Estes, conforme definido pelo Programa Internacional de Segurança Química (PISQ), podem ser qualquer substância, estrutura ou processo mensurável no corpo ou em seus produtos, que influencia ou prediz a incidência de resultado ou doença (STRIMBU; TAVEL, 2010). Assim, estudos que buscam por biomarcadores podem auxiliar na detecção, na determinação do estágio e do grau da doença, além de poder contribuir no monitoramento do tratamento (BODAGHI; FATTAHI; RAMAZANI, 2023; YAMADA et al., 2024).

Outra abordagem empregada é a utilização de anticorpos policlonais como forma de diagnóstico, seja pela detecção destas moléculas ou pela utilização delas em testes imunológicos (FILCHAKOVA et al., 2022). Anticorpos também podem ser empregados como forma de tratamento de algumas doenças, principalmente utilizando terapias à base de anticorpos monoclonais (LU et al., 2020). Além disso, podem ser usados como sendo os efetores centrais das vacinas (GUO et al., 2023) ou como uma ferramenta na busca por candidatos vacinais (HAJISSA et al., 2022). Essa vasta possibilidade de utilizações dos anticorpos se deve a sua interação específica com os antígenos em regiões de interesse, fazendo com que eles sejam um grande atrativo em pesquisas.

1.1. Anticorpos: estrutura e função

As imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas que desempenham um papel fundamental na resposta imunológica humoral (LU et al., 2018). Os anticorpos (Ab) são moléculas flexíveis, o que permite que eles assumam diversas conformações. Devido a esta alta mobilidade, os Abs são capazes de reconhecer e eliminar corpos estranhos ao organismo, também chamados de antígenos. Devido a isto, eles representam uma linha de defesa importante na prevenção de várias doenças causadas por bactérias, vírus e parasitas (HARRIS et al., 1997). A compreensão básica da estrutura dos anticorpos alavancou a engenharia de anticorpos e terapêuticas relacionadas a eles, onde a afinidade ao antígeno, a função efetora e as propriedades biofísicas puderam ser aprimoradas (SELA-CULANG; KUNIK; OFRAN, 2013).

Em humanos, as imunoglobulinas são classificadas em cinco isotipos, sendo eles: alfa (IgA), delta (IgD), épsilon (IgE), gama (IgG) e mi (IgM). Apesar dos diferentes isotipos, os anticorpos possuem mecanismos de ações semelhantes, seja para erradicar ou marcar um antígeno para ser eliminado pelas células imunes, por exemplo, por meio da neutralização, opsonização, aglutinação e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (KAPINGIDZA; KOWAL; CHRUSZCZ, 2020).

O IgG é o isotipo mais prevalente no soro, compreendendo aproximadamente 85% das imunoglobulinas e, por isso, a maioria dos anticorpos terapêuticos utilizados atualmente pertencem a este isotipo (LOBO; HANSEN; BALTHASAR, 2004; KUMAR et al., 2024). Sua estrutura consiste em quatro cadeias polipeptídicas, compostas por duas cadeias pesadas (H) de 50 kDa e duas cadeias leves (L) de 25 kDa, ligadas por pontes dissulfeto (Figura 1A). Cada cadeia H possui um domínio variável (VH) e três domínios constantes (CH₁, CH₂ e CH₃), enquanto as cadeias L possuem um domínio variável (VL) e apenas um domínio constante (CL) (Figura 1B). A região da articulação inferior e os domínios CH₂ e CH₃ recebem o nome de fragmento cristalino (Fc). Além disso, a associação da cadeia leve aos domínios VH e CH₁ formam um fragmento de ligação ao antígeno (Fab, do inglês, *fragment antigen binding*) e as regiões V de ambas as cadeias interagem formando a região de ligação ao antígeno (VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014; CHIU et al., 2019).

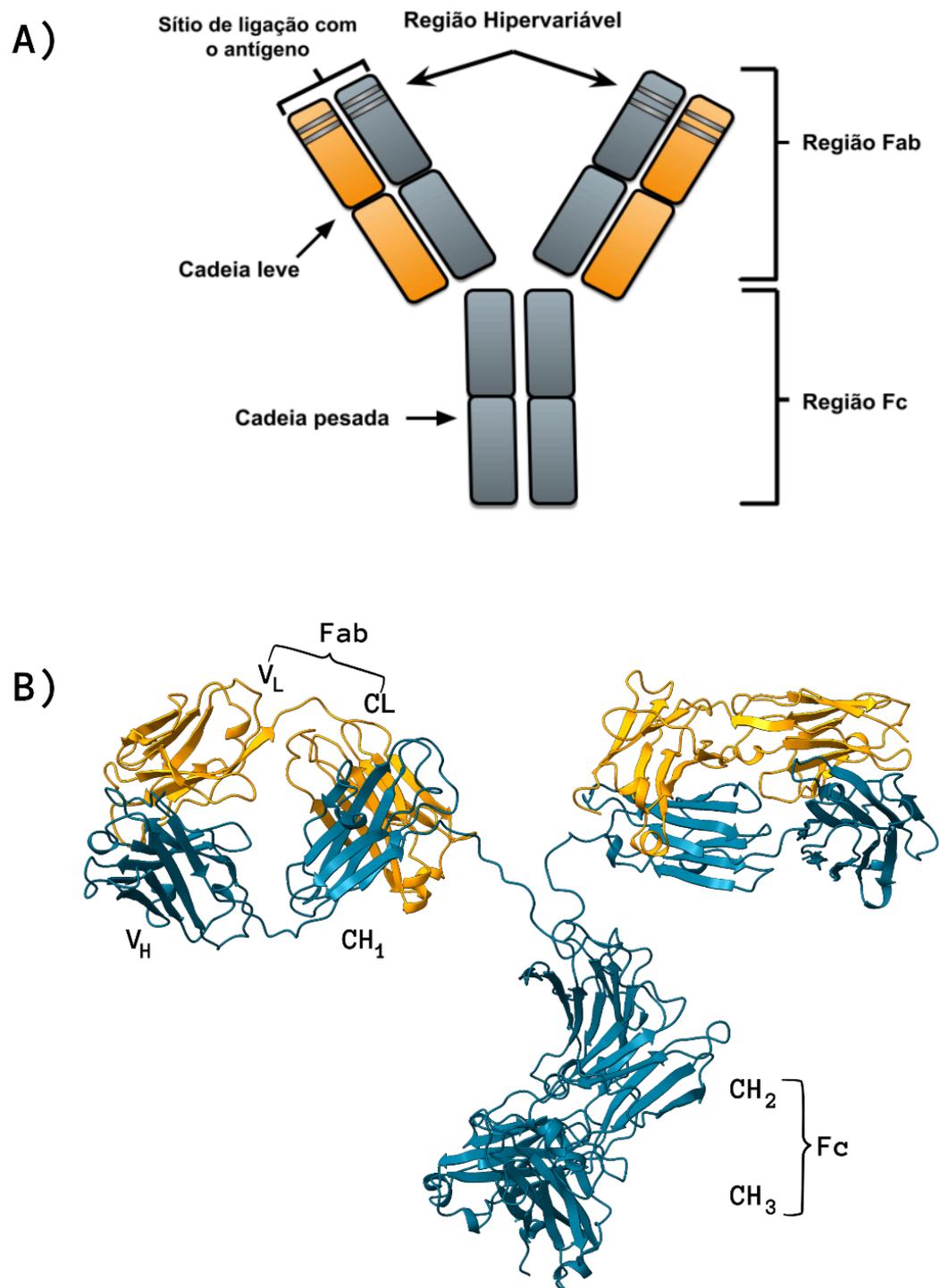


Figura 1 - Representação esquemática e estrutural de um IgG. Em A) está representado esquematicamente um IgG, que é composto por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, sendo que as regiões constantes das cadeias pesadas formam a porção chamada de Fc. Além disso, as regiões variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada formam a porção chamada de Fab, onde também está o sítio de ligação com o antígeno. Já em B) está a representação estrutural do IgG. Em azul estão representadas as cadeias pesadas (H) e em amarelo, as cadeias leves (L). Cada cadeia pesada é composta por três domínios constantes (CH₁-CH₃) e um domínio variável (VH). As cadeias leves por sua vez apresentam um domínio variável (VL) e um domínio constante (CL). Cada cadeia leve se associa a porção CH₁-VH e forma o fragmento de ligação ao antígeno (Fab). Já a região de articulação e os demais domínios da cadeia pesada recebem o nome de fragmento cristalino (Fc). Código PDB da estrutura: 1IGT (Harris *et al.*, 1997).

1.2. Epítomos

As interações entre o anticorpo e o antígeno ocorrem nas regiões chamadas de epítopo, que é o local no antígeno onde o anticorpo se liga, e parátopo, que é a região complementar no anticorpo (VAN REGENMORTEL, 2009). *In vivo*, as imunoglobulinas tendem a ser produzidas contra antígenos intactos encontrados em solução e, por isso, elas identificam preferencialmente epítomos conformacionais, ou seja, que são formados por resíduos geralmente não sequenciais, mas que possuem uma proximidade estrutural (Figura 2) (VAN REGENMORTEL, 2009; AKIBA *et al.*, 2019).

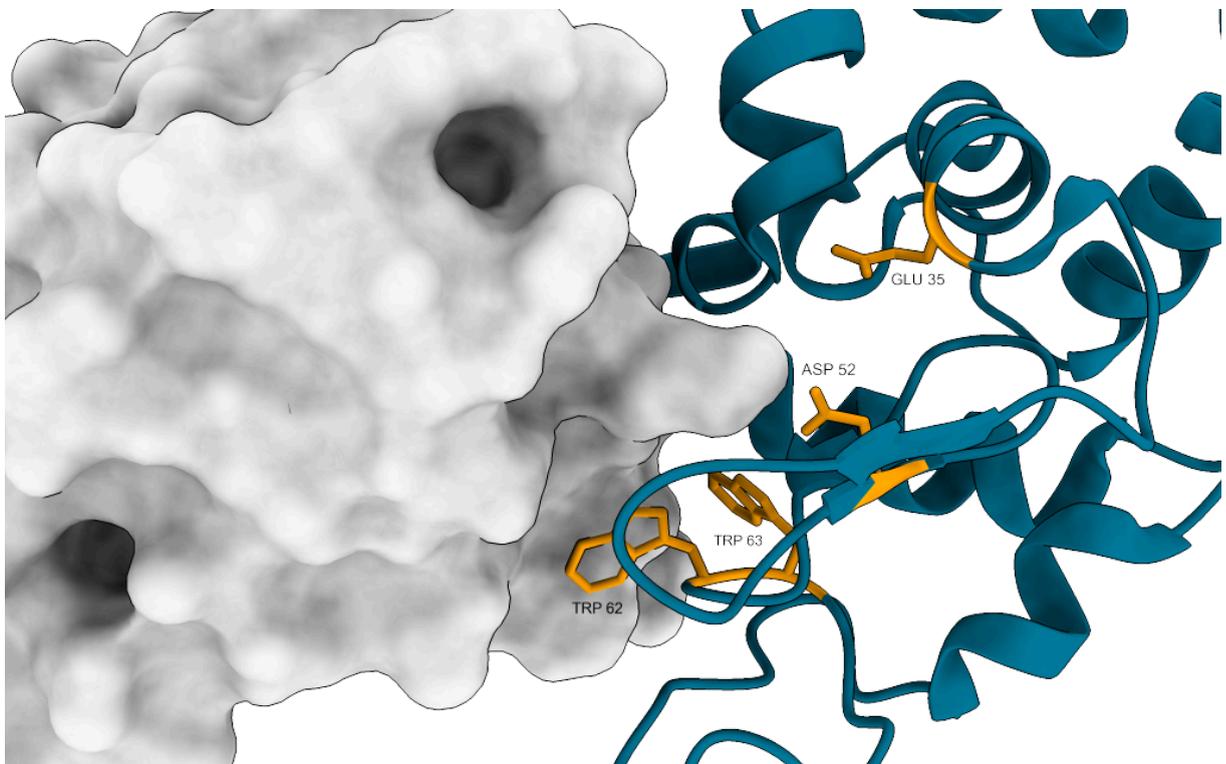


Figura 2 - Representação estrutural da região de paratopo e epítopo. Em cinza está representado o domínio variável do anticorpo (paratopo) e em azul a proteína antigênica com a qual ele interage. Os resíduos destacados em amarelos são aqueles que foram considerados como mais importantes para a interação da proteína antigênica com o anticorpo, formando um epítopo conformacional. Código PDB da estrutura: 6JB8 (Akiba *et al.*, 2019).

A utilização de métodos de biologia estrutural para estudar estes complexos fornece informações importantes para a elucidação da base do reconhecimento molecular entre um anticorpo e seu antígeno específico. Uma vez que se tem conhecimento deste sítio de ligação, é possível utilizar este conhecimento para o desenvolvimento de fármacos e biomarcadores e também para a manipulação de anticorpos (ZHAO; CHALT, 1994; ARASI *et al.*, 2018).

1.2.1. Mapeamento de epítomos

Uma etapa crucial em iniciativas voltadas para o desenvolvimento de novas vacinas, tratamentos inovadores, e de novos métodos de diagnósticos é a análise da interação antígeno-anticorpo. Uma parte importante dessa pesquisa é o mapeamento experimental de epítomos, que pode ser definido como o processo de identificar a região antigênica que se liga a um determinado anticorpo (MORRIS, 2007; DAVIDSON; DORANZ, 20. Isso permite desvendar os locais de interação entre essas moléculas, e é essencial para a compreensão detalhada das respostas imunológicas, e para a formulação de estratégias terapêuticas avançadas.

Este mapeamento pode ser conduzido por diferentes técnicas laboratoriais, como cristalografia de proteínas e difração de raios-x, *phage display* e ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (KING; BROOKS, 2018; AHN *et al.*, 2021; ANAND *et al.*, 2021). Outras técnicas analíticas utilizadas são a espectrometria de massa e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (POSADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2019; YAMADA *et al.*, 2024).

Alguns estudos já demonstraram como o mapeamento de epítomos pode levar ao desenvolvimento de testes como o ELISA, que foi o caso do trabalho de De-Simone e colaboradores (2021). Neste trabalho, foi feito o mapeamento dos epítomos da proteína da toxina diftérica, onde foram identificados vinte epítomos. A partir dessas informações obtidas, foram sintetizados dois peptídeos que serviram como antígenos para revestir placas de ELISA, utilizadas como novo diagnóstico *in vitro* da difteria (DE-SIMONE *et al.*, 2021).

Também há trabalhos como o de Baptista e colaboradores (2023), que identificaram epítomos de células B contra a proteína quimérica GMZ2.6c do *P. falciparum*, agente da malária. Essa proteína já foi relatada por contribuir para a imunidade contra o parasita e é um dos candidatos à vacina. Estes epítomos descritos no estudo foram classificados como imunogênicos e imunodominantes, e ainda forneceram informações adicionais que reforçaram a relevância desta proteína como candidato vacinal contra a malária (BAPTISTA *et al.*, 2023). Estudos como esses reforçam a importância do mapeamento de epítomos para o desenvolvimento de novos recursos terapêuticos, vacinais e diagnósticos.

1.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN é uma técnica analítica que permite a caracterização de macromoléculas, fornecendo informações importantes sobre a estrutura tridimensional e a dinâmica conformacional de uma proteína (PELLECCHIA; SEM; WÜTHRICH, 2002). Ela se baseia na propriedade intrínseca do núcleo chamada de momento angular do *spin*. É devido a isto que são observados os deslocamentos químicos dos resíduos, que dão a esta técnica seu poder de resolução atômica. O *spin* é caracterizado pelo número quântico do *spin* nuclear, I . Núcleos que possuem massa molecular par e número atômico par, possuem o I igual a zero. Devido a isso, eles não são capazes de ser detectados por meio da RMN. Já núcleos que possuem massa molecular ímpar ou massa molecular par e um número atômico ímpar, possuem I diferente de zero e são possíveis de serem detectados (CAVANAGH et al., 2006).

Os espectros de RMN apresentam os dados utilizando partes por milhão (ppm) ao invés de hertz (Hz), uma vez que isso permite que os dados obtidos em magnetos com intensidades de campo diferentes possam ser comparados (MARION, 2013). O deslocamento químico (δ) é uma medida muito sensível ao ambiente químico em que o resíduo se encontra. As mudanças que ocorrem nesse meio, por exemplo, pequenas alterações na estrutura local, podem ser medidas com uma precisão de até 0,0002 ppm. Quando se adiciona um ligante em uma solução, muitas vezes ocorrem perturbações substanciais, de 0,1 ppm ou mais, nos sinais da proteína que estão próximos do local de interação com o ligante (WILLIAMSON, 2018). Devido a isto, a RMN vem sendo muito utilizada em estudos de interação proteína-ligante, pensando na descoberta e desenho racional de medicamentos e métodos diagnósticos. Isso se deve ao fato dela fornecer informações sobre o local de interação, cinética e efeitos alostéricos que possam ser causados por essa interação (CALA; GUILLIÈRE; KRIMM, 2014; BAX; CLORE, 2019).

Para a realização deste tipo de experimento, normalmente é feita a marcação da proteína com o isótopo de interesse, uma vez que a abundância natural de ^{15}N , por exemplo, é muito baixa (Tabela 1) (SMITH et al., 2019). Dessa forma, seria necessário um tempo de coleta muito grande para que fosse possível obter um espectro de qualidade, o que tornaria as análises demoradas e demandaria um alto custo operacional. Além disso, a marcação com o isótopo de interesse permite que sejam coletados espectros de melhor qualidade.

Tabela 1 - Abundância natural do hidrogênio, carbono, nitrogênio e seus respectivos isótopos

Isótopo	Abundância natural (%)	Isótopo	Abundância natural (%)
¹ H	99,98	² H	0,015
¹² C	98,93	¹³ C	1,10
¹⁴ N	99,63	¹⁵ N	0,36

Fonte: Smith *et al.*, 2019

1.3.1. Técnicas de relaxação paramagnética

O paramagnetismo descreve a presença de um elétron desemparelhado em uma estrutura química, e a espectroscopia de RMN é sensível à presença de um centro paramagnético. Isso se deve as força das interações magnéticas, que são 685 vezes mais fortes para um elétron desemparelhado do que para o *spin* nuclear de próton (SOFTLEY et al., 2020). Em sistemas paramagnéticos, existem três experimentos de RMN que fornecem informações estruturais: intensificação da relaxação paramagnética (PRE, do inglês, *paramagnetic relaxation enhancement*), deslocamentos de pseudocontato (PCSs, do inglês, *pseudocontact shifts*) e acoplamentos dipolares residuais (RDC, do inglês, *residual dipolar couplings*).

O PRE surge das interações dipolares magnéticas entre um núcleo e os elétrons desemparelhados do centro paramagnético, resultando em um aumento nas taxas de relaxamento nuclear (CLORE; IWAHARA, 2009). Dessa forma, é observada uma diminuição da intensidade dos sinais e, dependendo da concentração da molécula paramagnética utilizada, pode haver a perda do sinal. Assim, essa técnica permite que seja obtida informações como a acessibilidade de uma proteína ao solvente, por exemplo, além de ajudar a elucidar informações sobre a dinâmica da proteína (THEILLET et al., 2011; GU et al., 2023).

1.3.2. Mapeamento de epítomos por RMN

A ressonância magnética nuclear também vem sendo utilizada para o mapeamento de epítomos devido a sua sensibilidade, que permite o monitoramento de mudanças conformacionais em uma proteína, em nível de aminoácidos. Isso se deve ao fato de que por meio da RMN é possível observar perturbações nos deslocamentos químicos e nas intensidades dos sinais dos resíduos devido a alterações no ambiente químico da amostra

causadas, por exemplo, pela introdução de um ligante como o anticorpo (FENG; PAN; ZHANG, 2011).

Posado-Fernández e colaboradores (2019), descreveram a utilização do RMN no mapeamento do epítipo de dois peptídeos β -amiloides relacionados com a doença de Alzheimer, $A\beta(1-40)$ e $A\beta(1-42)$, utilizando o anticorpo monoclonal STAB-MAb (POSADO-FERNÁNDEZ et al., 2019). Os autores realizaram a coleta de ^{15}N -HSQC dos peptídeos livres e depois realizaram uma nova coleta fazendo a titulação do anticorpo. Os espectros iniciais apresentaram sinais nítidos e bem definidos que foram utilizados de base para o cálculo de perturbação do deslocamento químico (CSP, do inglês, *chemical shift perturbation*). Nos espectros obtidos da titulação com o anticorpo, além das perturbações nos deslocamentos químicos (Figura 3A), foi possível observar um alargamento das linhas (Figura 3B), de maneira dependente da concentração do Ab, servindo como um indicativo de interação direta ou proximidade desses resíduos com o epítipo. Com isso, eles determinaram que os resíduos Glu3, Arg5, Val12, His13, His14, Lys16, Leu17, Phe20 e Asp23 da $A\beta(1-40)$ e os resíduos Arg5, Gly9, Leu10, Glu11, His13, Lys16, Leu17, Val18, Phe19, Asp23, Gly29, Gly33 e Met35 da $A\beta(1-42)$ foram os que apresentaram maior CSP e possivelmente fazem parte do epítipo (POSADO-FERNÁNDEZ et al., 2019).

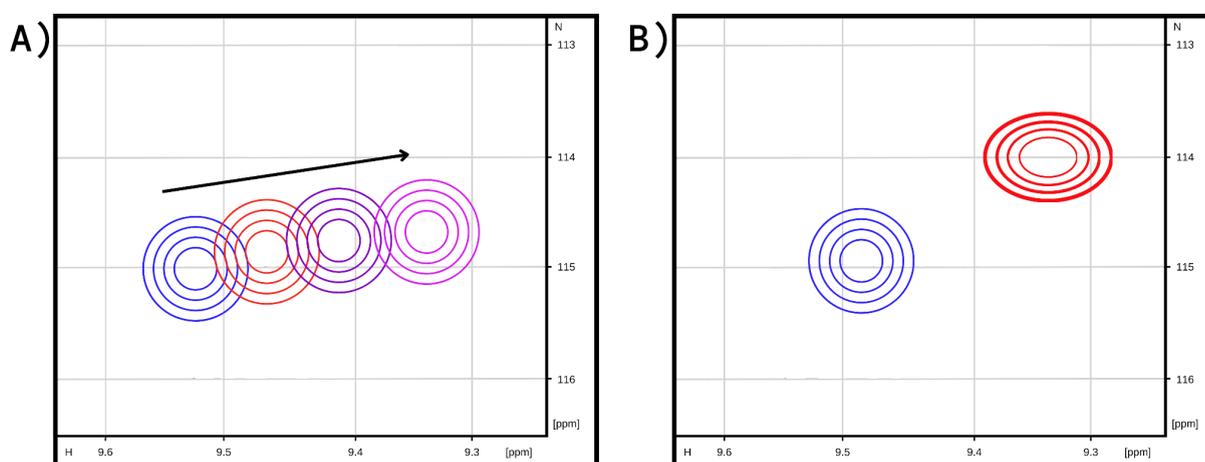


Figura 3 - Representação esquemática da perturbação do deslocamento químico e do alargamento de linha. Em A) está representada a perturbação do deslocamento químico que pode ser observado pela alteração da posição dos sinais em relação ao sinal inicial (em azul). Já em B) é possível observar um sinal mais definido em azul, enquanto em vermelho, se observa um sinal mais alargado.

Uma forma de fazer o mapeamento de epítipos por RMN seria pela implementação da abordagem da troca de hidrogênio com deutério (HDX, do inglês, *hydrogen-deuterium exchange*). Neste tipo de experimento, os hidrogênios de cada grupo amino sofrem uma reação de troca com o deutério, que não é detectado nos experimentos de ressonância. Isto

fornece informações importantes sobre a estrutura, estabilidade, dinâmica e interações das proteínas (KUWAJIMA et al., 2022). Di Muzio e colaboradores (2020) descreveram uma metodologia que recebeu o nome de memória por troca hidrogênio-deutério (HDXMEM, do inglês, *hydrogen/deuterium exchange memory*) (DI MUZIO et al., 2020). O processo consiste em liofilizar a proteína de interesse, marcada com o isótopo de interesse, e ressuspender ela em D_2O , de forma que os prótons das aminas começam a trocar de forma lenta com o deutério e perdem seu sinal no espectro, tendo sua taxa de troca medida. Este processo é repetido, porém, na presença de um anticorpo. Como há um equilíbrio entre a proteína livre e ligada, é possível observar diferentes taxas de trocas, mas como as regiões que estão ligadas ao anticorpo devem estar menos expostas ao solvente, elas apresentam uma taxa menor de troca, quando comparado com a proteína livre (Figura 4). Isso permite que seja feito o mapeamento dos resíduos que possivelmente fazem parte do epítipo e da sua localização na proteína (DI MUZIO et al., 2020).

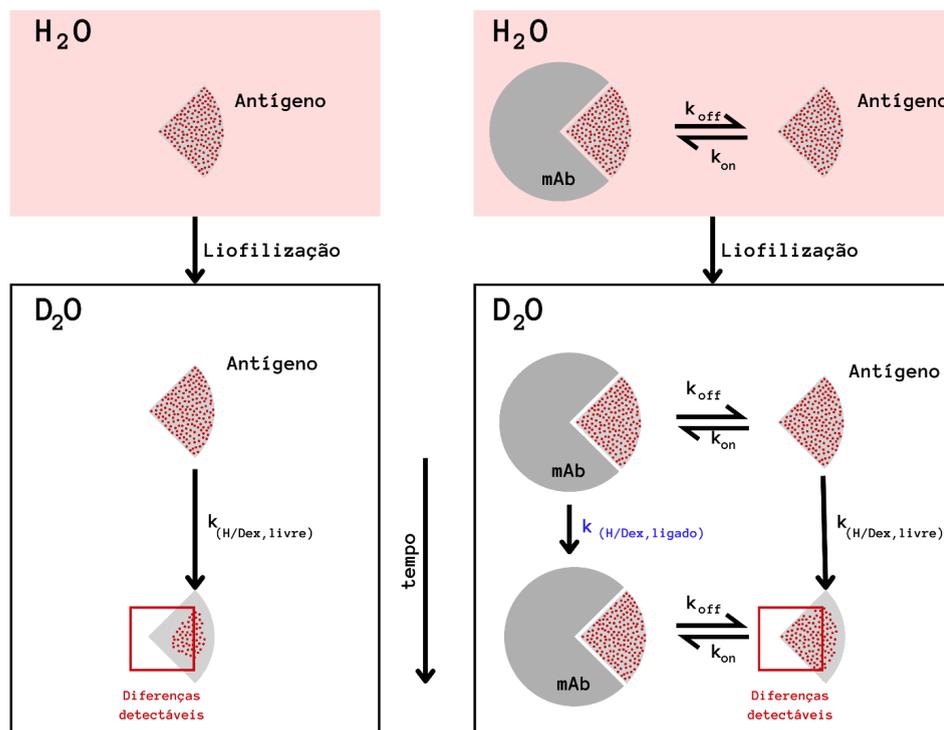


Figura 4 - Representação esquemática da metodologia de HDX de memória por RMN. A proteína marcada com ^{15}N que está em H_2O , contém quase 100% de prótons (indicados pelos pontos vermelhos). Após a liofilização e ressuspensão da proteína em D_2O , os prótons começam a trocar, de forma gradual com o deutério (representado pela diminuição dos pontos vermelhos) e essa taxa de troca é calculada. O mesmo procedimento é realizado com a proteína na presença do anticorpo (mAb) e o experimento é feito de forma que a proteína está presente tanto no estado livre quanto no estado ligado (1:1). Apenas os sinais das amidas da proteína no estado livre são detectados. Contudo, como existe um equilíbrio entre a proteína ligada e a proteína livre, é possível observar diferentes taxas de troca de H/D. Espera-se que as regiões que estão ligadas ao anticorpo apresentem uma taxa menor de troca, comparada com o antígeno livre uma vez que estas regiões estão protegidas pela presença do anticorpo. Adaptado com permissão de Di Muzio *et al.*, 2020, sob *Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY) license*.

A pandemia de COVID-19, por exemplo, enfatizou a urgência na comunidade científica para o desenvolvimento de métodos analíticos e validados para acelerar o desenvolvimento de alvos vacinais e terapêuticos diante de patógenos potencialmente perigosos e altamente transmissíveis. Devido a isso, diversos estudos buscaram alternativas que levassem a uma melhor resposta do sistema imune de humanos, de forma a prevenir ou tratar a doença, sendo umas dessas formas através do mapeamento dos epítomos em algumas proteínas estruturais do SARS-CoV-2 (PAN et al., 2021; PARKER et al., 2021).

1.4. Coronavírus

Os coronavírus (CoVs) são vírus envelopados de RNA de fita simples positiva, capazes de infectar uma vasta gama de pássaros e mamíferos, incluindo os humanos (COLINA et al., 2021; KADAM et al., 2021). Já foram identificados sete CoVs capazes de infectar o ser humano, entre eles o HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, e HCoV-HKU1, que causam infecções leves, parecidas com resfriados, e o coronavírus da síndrome respiratória aguda (SARS-CoV, do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*), o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV, do inglês, *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) e o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda (SARS-CoV-2, do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), que causam uma infecção respiratória grave, podendo levar a óbito (ENJUANES et al., 2022).

Em novembro de 2002, houve uma epidemia causada pelo SARS-CoV, que começou no sul da China e se espalhou para 29 países. Ela levou a mais de 8.000 infecções e 774 óbitos, até ser contida em 2003. Depois, em setembro de 2012, foram reportados os primeiros casos de MERS-CoV, na Arábia Saudita, que se espalhou por 27 países, causando 2.519 infecções e 866 mortes, até janeiro de 2020 (ABDELRAHMAN; LI; WANG, 2020). Já em dezembro de 2019, foram relatados os primeiros casos de COVID-19, na China, causada pelo SARS-CoV-2 (MOHAMADIAN et al., 2021). Devido a rápida disseminação, no dia 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS), declarou que a situação constituía uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) (WHO, 2020). Após 3 anos, em maio de 2023, a OMS declarou o fim do ESPII, tendo mais de 770 milhões de casos positivos, incluindo cerca de 7 milhões de óbitos, até 19 de dezembro de 2023 (WHO, 2023).

1.4.1. SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 possui um genoma com 29,8 a 29,9 quilobases de comprimento, que codifica dezesseis proteínas não estruturais envolvidas na replicação viral e transcrição e quatro proteínas estruturais, sendo elas: espícula (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (Figura 5) (CHAN et al., 2020; KHAN et al., 2020). Ele tem 79,5% e 40% de similaridade com o SARS-CoV e o MERS, respectivamente.

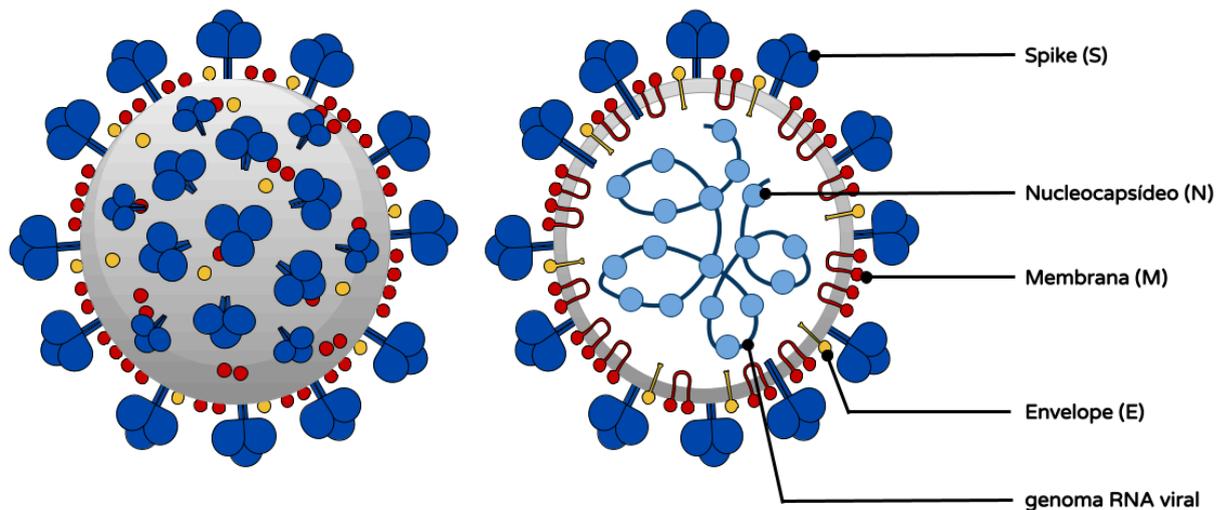


Figura 5 - Representação esquemática da estrutura do coronavírus humano. À esquerda: superfície exterior. À direita: detalhe interno mostrando a organização do material genético. As principais proteínas estruturais e componentes estão identificados.

Estudos mostraram que há cerca de 380 substituições de aminoácidos entre o SARS-CoV-2 e os coronavírus semelhantes ao SARS, sendo que 27 mutações estão envolvidas com a proteína S, responsável pela entrada do vírus na célula, podendo ser um fator importante para a alta taxa de infecção do vírus (KHAN et al., 2020). A proteína E está associada à montagem de vírions e sua transferência ao longo da via secretora, à redução da resposta ao estresse da célula hospedeira, além de promover a aptidão viral e patogênese (KUZMIN et al., 2022). Já a proteína M é um dímero formado por dois domínios transmembranares, cada um composto por três hélices, capazes de interagir com outras proteínas estruturais, desempenhando um papel fundamental na organização da montagem do coronavírus (BAI; ZHONG; GAO, 2022; ZHANG et al., 2022)

1.4.1.1. A proteína N

A proteína N é uma das proteínas imunogênicas importantes no ciclo viral por se ligar ao RNA e desempenhar um papel essencial na replicação, montagem e liberação do vírus (ZENG et al., 2020). Ela apresenta uma similaridade de 91% com a proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-1, 43% com a MERS e 29% com o OC43 e com o HKU-1 (GAO et al., 2021; LINEBURG et al., 2021).

Ela possui 419 resíduos e pode ser dividida em três regiões intrinsecamente desordenadas (IDR, do inglês, *intrinsic disorder region*), sendo elas a região N-terminal, o link central (LINKER) e a região C-terminal. Além disso, ela possui um domínio de ligação ao RNA (N-NTD), que vai do resíduo 44 a 180, e um domínio de dimerização (N-CTD), que abrange os resíduos 247 a 364. Na região do LINKER, próximo ao final da região N-NTD, há uma porção rica em resíduos de serina (S) e arginina (R), também chamada de região SR, que vai dos resíduos 180 a 204 (Figura 6) (BAI et al., 2021).

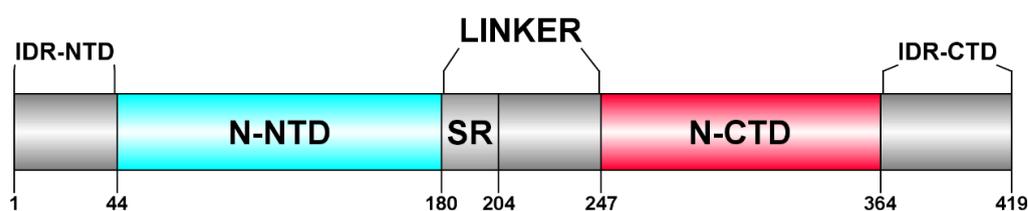


Figura 6 - Representação esquemática da arquitetura da proteína N de Sars-CoV-2. A proteína do nucleocapsídeo possui três regiões IDR, localizadas nas extremidades N e C-terminal e o LINKER. Além disso, possui um domínio de ligação ao RNA (N-NTD), localizado entre os resíduos 44-180, e um domínio de dimerização (C-CTD) localizado entre os resíduos 247-364.

O domínio N-NTD do SARS-CoV-2 possui 17,9 kDa e um núcleo composto por fitas- β antiparalelas e uma volta central, tendo cinco fitas- β , seguindo a topologia β_4 - β_2 - β_3 - β_1 - β_5 , e duas α -hélices curtas (Figura 7A e B). Uma característica marcante desta proteína é uma volta grande entre β_2 e β_3 que forma um grampo- β . Essa volta é chamada de dedo básico por sua estrutura se assemelhar a um dedo e por ser composta principalmente por resíduos de aminoácidos básicos (Figura 7C). O grampo- β se estende a partir do núcleo de β , que também é chamado de palma, e a fenda entre essas duas porções é altamente carregada positivamente, sendo o local de ligação ao RNA (DINESH et al., 2020).

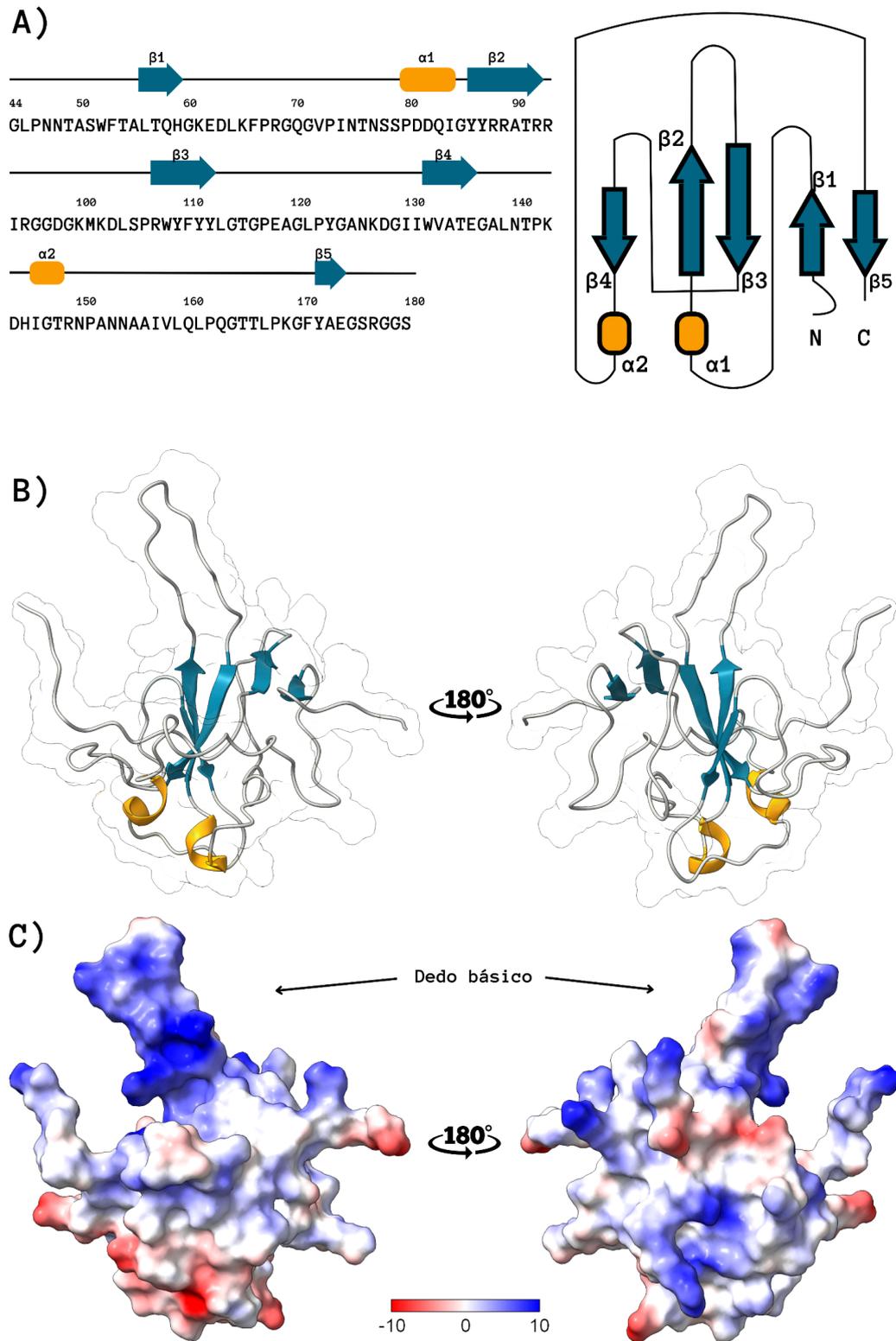


Figura 7 - Representações do domínio de ligação ao RNA (N-NTD) do SARS-CoV-2. A) Estrutura primária e diagrama topológico da proteína N-NTD, com as estruturas secundárias destacadas, sendo em azul, as fitas- β , e em amarelo, as α -hélices. B) Representação esquemática da estrutura terciária do domínio NTD, seguindo os mesmos padrões de cores da imagem A para a representação dos elementos estruturais. C) Representação da superfície da proteína com os potenciais eletrostáticos, destacando a região do dedo básico que é composto, predominantemente, por resíduos com carga positiva (azul). Adaptado com permissão de Dinesh *et al.*, 2020, sob *Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY) license*.

Além de ter essa importante função de regular a replicação viral, a proteína N é uma das mais expressas durante a infecção. Também, há indícios de que ela interage com proteínas do hospedeiro, sendo capaz de induzir uma resposta imunológica ou regular o ciclo celular do mesmo, após a infecção (DIAO et al., 2021; LUAN et al., 2022). Ainda em relação à resposta imunológica, existem anticorpos contra a proteína N que podem ser detectados nos primeiros dias de infecção. Estes anticorpos podem ser utilizados para a realização de diagnóstico precoce e, também, como forma de tratamento (BURBELO et al., 2020; GORDON et al., 2020; BRANDMEIER et al., 2023). Devido a estas características, o nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com a proteína N como um alvo interessante para o desenvolvimento de biofármacos e outras formas de diagnóstico (OLIVEIRA; DE MAGALHÃES; HOMAN, 2020; MAMBELLI *et al.*, 2023).

Dessa forma, neste trabalho buscamos, por meio da análise de experimentos de RMN de interações, determinar a região de epítipo da proteína N-NTD do SARS-CoV-2. Para alcançar este objetivo, a proteína isotopicamente marcada com ^{15}N , juntamente com os anticorpos purificados de pacientes convalescentes da COVID-19, foram submetidos a diferentes medidas de RMN. Deste modo, espera-se estabelecer uma metodologia de mapeamento de epítipos, que possa ser aplicada para outros modelos virais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estabelecer como a RMN pode ser utilizada para fornecer informações detalhadas sobre a dinâmica do domínio de ligação ao RNA (N-NTD) da proteína imunogênica do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 em diferentes condições experimentais e mapear os epítomos desta proteína, a fim de identificar os resíduos específicos envolvidos na interação com os anticorpos policlonais de pacientes da região metropolitana de Belo Horizonte.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer como as mudanças nas condições experimentais, como pH e temperatura, influenciam a dinâmica molecular da proteína alvo, incluindo sua flexibilidade e movimento interno;
- Calcular a perturbação do deslocamento químico, tanto do estado livre quanto do complexo para obter informações sobre a região de interação da proteína com o anticorpo;
- Identificar os possíveis sítios de interação da proteína com o anticorpo;
- Identificar as regiões da proteína, no estado livre e em complexo, que estão expostas ao solvente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do proteína N recombinante marcada com ^{15}N

O plasmídeo contendo a região codificante do domínio NTD da proteína N do SARS-CoV-2 (NCBI Reference Sequence: YP_009724397.2), foi gentilmente cedido pelo COVID-19 NMR project (<https://covid19-nmr.de/>) da unidade CENABIO/CNRMN/UFRJ/BR. A proteína produzida a partir deste construto apresenta uma massa molecular de 17.9 kDa.

A proteína marcada com ^{15}N foi expressa seguindo o protocolo descrito por Marley e colaboradores (2001), que consiste inicialmente no cultivo das células em meio *Luria Bertani* (LB)¹, sem a presença de isótopos marcados, o que permite que haja um rápido crescimento celular (MARLEY; LU; BRACKEN, 2001). Para isso, foram feitos quatro pré-inóculos (cada um contendo 20 ml de meio LB e 20 μl de canamicina - estoque de 50 mg/ml). Estes pré-inóculos foram incubados a 37 °C por 16 horas, com agitação constante, e utilizados para fazer quatro inóculos (cada um contendo 400 ml de meio LB e 400 μl de canamicina), que foram incubados a 37 °C até atingirem a densidade óptica (O.D., do inglês, *optical density*) de 0.6. Em seguida, as células foram centrifugadas a 6.000g a 10 °C por 10 minutos e ressuspensas em um meio mínimo M9², sem glicose e fonte de nitrogênio, e incubadas a 37 °C, por 30 minutos para que toda a fonte de carbono e nitrogênio ainda estivesse presente no meio fosse consumida. Passado este tempo, foram adicionadas glicose, cloreto de amônio contendo o isótopo marcado ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) e isopropiltiogalactosidase (IPTG). A indução foi realizada a 18 °C com agitação a 180 rpm durante vinte horas. Este procedimento resulta em uma otimização da expressão de proteínas marcadas devido à alta densidade celular (MARLEY; LU; BRACKEN, 2001).

Após a indução, a cultura bacteriana foi centrifugada a 6.000 g a 10 °C por 10 minutos e ressuspensa em 40 mL de tampão de corrida de fosfato pH 8.0³. As células foram submetidas a ciclos de sonicação com pulsos e intervalos de 3 segundos, a uma amplitude de 30%, durante 30 minutos. Depois desse procedimento, foram centrifugadas novamente por 60 minutos a 10 °C a 12.000 g. As proteínas foram recuperadas em forma solúvel no sobrenadante.

¹ Anexo B

² Anexo C

³ Anexo D

Uma vez que a proteína N foi expressa, prosseguiu-se para a etapa de purificação, que foi realizada de acordo com Altincekic e colaboradores (ALTINCEKIC et al., 2021). Foi feita uma cromatografia de afinidade em coluna de níquel HiTrap® (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) em um cromatógrafo do tipo FPLC (do inglês, *fast protein liquid chromatography*) ÄKTA™ pure (Cytiva), utilizando o tampão de corrida de fosfato, o mesmo utilizado na etapa de sonicação, e um tampão de eluição fosfato acrescido de imidazol para concentração final de 500 mM, também em pH 8.0⁴. Posteriormente, foi feita uma cromatografia de gel filtração HiPrep™ (16/60 Sephacryl® S-200 HR, Cytiva), utilizando um tampão de corrida fosfato, pH 6.5⁵. Após cada etapa de purificação, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE⁶) das frações coletadas para averiguação da presença da proteína de interesse (ALTINCEKIC et al., 2021).

3.2. Obtenção dos anticorpos reativos

Alíquotas de plasma de pacientes saudáveis pré-pandemia (2017) foram obtidas do banco de controle do Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG, do professor Adriano Sabino, como uma estratégia de grupo controle. Além disso, obteve-se acesso ao plasma de pacientes com sintomas respiratórios e diagnosticados com COVID-19 por meio da técnica de detecção padrão-ouro, a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*). Estes materiais biológicos foram coletados pela equipe de enfermagem do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte nos primeiros meses de 2020, quando ainda não haviam imunizantes para a doença de COVID-19. A utilização das amostras biológicas foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade Federal de Minas Gerais e pelo Conselho Nacional de Ética (CAAE nº 30437020.9.0000.5149), conforme parecer 3.950.637⁷. As amostras foram inativadas por 1 hora em banho seco a 56 °C de acordo com o protocolo de Martinello (MARTINELLO, 2020). Foi montada uma coluna de NHS (HiTrap NHS-activated HP, Cytiva), com a proteína N ligada na resina e foi feita a separação dos anticorpos reativos de acordo com o manual do fornecedor. Os IgGs obtidos na etapa anterior foram purificados por meio de uma cromatografia de afinidade de proteína G HiTrap (Protein G HP Sepharose™, Cytiva), seguindo as instruções do fornecedor, e

⁴ Anexo D

⁵ Anexo D

⁶ Anexo E

⁷ Anexo A

submetidos a uma cromatografia de gel filtração (HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-200 HR, Cytiva).

3.3. Medidas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear

As medidas de RMN foram coletadas em um magneto Bruker Ascend Neo 600, operando à frequência de 600,15 MHz (para ^1H), localizado no Laboratório Institucional de Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LIPq/LAREMAR) da UFMG. Todos os espectros foram processados utilizando o programa Topspin v4.06 (Bruker Corporation, EUA) e interpretados com o programa *Collaborative Computing Project for NMR (CCPN) Analysis 3.1.1* (ou versão anterior quando necessário) (SKINNER *et al.*, 2016). Para fazer o assinalamento da proteína, foram utilizados como base os deslocamentos químicos depositados no Banco de Dados de Ressonância Magnética Biológica (BMRB, do inglês, *Biological Magnetic Resonance Bank*), ID 34511 (DINESH *et al.*, 2020).

As amostras para os experimentos de RMN foram preparadas liofilizando a proteína e ressuspendendo a mesma de modo que a concentração final em 350 μl fosse de 344 mM. Para os experimentos de interação proteína-anticorpo, amostras similares foram utilizadas, contendo, adicionalmente, anticorpos em uma proporção de 1:4 (anticorpo:proteína). As amostras liofilizadas foram ressuspendidas em água *milli-q*, que foi alíquotada e congelada previamente, e 10% de D_2O , e o pH foi ajustado para 6.5, quando necessário. Os espectros de coerência quântica única heteronuclear (HSQC, do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) de ^1H - ^{15}N foram adquiridos no modo editado com NUS. Os experimentos de HSQC possibilitam a determinação das correlações entre dois tipos diferentes de núcleos, nesse caso do nitrogênio com o hidrogênio (EMWAS; MERZABAN; SERRAI, 2015).

3.4. Análise de dados de RMN

As medidas de perturbação de deslocamento químico foram calculadas para determinar as variações nos deslocamentos químicos dos sinais de ressonância de cada resíduo durante a série de experimentos de titulação de anticorpo e de mudança de temperatura, utilizando a fórmula:

$$CSP = \sqrt{\frac{\Delta H_i^2 + (\alpha \times \Delta N_i^2)}{2}}$$

onde ΔH e ΔN são as diferenças nos deslocamentos químicos do 1H e ^{15}N . O α é um valor calculado a partir das faixas de deslocamento tanto do nitrogênio quanto do hidrogênio, para que seja possível combinar os valores obtidos dos dois núcleos. Essa abordagem possibilita a avaliação da contribuição real de cada núcleo, uma vez que determinadas interações podem causar mudanças em um núcleo, mas não no outro (WILLIAMSON, 2013). Além disso, foi feito o cálculo do desvio-padrão (σ) englobando todos os valores de CSP calculados para uma avaliação abrangente. As médias e os respectivos desvios-padrão foram calculados considerando os valores de CSP em cada experimento. Os resíduos de aminoácidos que apresentaram uma perturbação maior que 1,5 desvios-padrão (σ) e $0,5 \sigma$ foram considerados resíduos com CSP significativos. Para fazer a representação gráfica do cálculo do CSP, foi feito um *script* em Python, disponível no Github⁸.

3.5. Avaliação da qualidade da amostra

Para que fosse possível ter um melhor conhecimento das condições de estabilidade da proteína, foram realizados alguns experimentos a fim de determinar as melhores condições de trabalho para manter a amostra com uma boa qualidade. Inicialmente, avaliou-se se a proteína poderia ser submetida ao processo de liofilização. Para isto, foi coletado um espectro de HSQC da proteína antes e após ser liofilizada, para avaliar a sua estabilidade.

A segunda etapa desta avaliação, foi a determinação da influência do pH na amostra. Para isso, duas medidas foram realizadas, sendo uma em pH 8.0 e a outra em pH 6.5. Por fim, avaliou-se a influência da temperatura sob a proteína através da coleta de espectros em quatro temperaturas diferentes: 25 °C, 20 °C, 15 °C e 10 °C, e foi feito o cálculo de CSP para a determinação dos resíduos que sofreram uma maior perturbação.

3.6. Avaliação da interação proteína-anticorpo

Após a determinação das melhores condições de trabalho, foi feita a avaliação da interação proteína-anticorpo. Para isso, foram coletados espectros de 1H - ^{15}N HSQC da proteína livre e da proteína em complexo com o anticorpo (Seção 3.3). As medidas de espectroscopia de RMN foram coletadas a 25 °C. Posteriormente, foi feito o cálculo de CSP, como descrito na seção 3.4.

⁸ Disponível em: https://github.com/cayamada/NMR_plots.git

3.7. Experimento de relaxação paramagnética e análise pelo de resíduos expostos ao solvente

Foram realizados experimentos de intensificação da relaxação paramagnética usando um agente de contraste à base de sal de gadolínio (GBCA-Gd³⁺), a fim de identificar a acessibilidade ao solvente. Este experimento foi realizado como uma forma de complementar as informações obtidas na avaliação da interação proteína-anticorpo (seção 3.6). Para isso, as amostras, tanto da proteína livre, quanto da proteína com o anticorpo, foram liofilizadas, ressuspensas e tituladas com diferentes concentrações de Gd³⁺. Todos os espectros de ¹H-¹⁵N HSQC foram coletados a 25°C.

Para fazer a comparação entre os resíduos que estavam mais expostos na proteína livre e no complexo proteína-anticorpo, foram feitas representações gráficas das intensidades de cada resíduo em cada concentração de Gd³⁺, e calculado a linha de tendência exponencial. Esta linha foi utilizada como base para a determinação e comparação do decaimento dos sinais. Para fazer estas representações, foi feito um *script* em Python, disponível no Github⁹.

Também foi feita a determinação, de forma *in silico*, de quais resíduos estavam mais expostos ao solvente na proteína livre para posterior comparação com resultados obtidos utilizando o gadolínio. Para isto, foi utilizada a ferramenta online VADAR (do inglês, *Volume Area Dihedral Angle Reporter*), que calcula, a partir de um arquivo ou um número de acesso do PDB, parâmetros como a área acessível ao solvente (ASA, do inglês, *accessible surface area*), permitindo a determinação dos resíduos que estão em regiões mais expostas (WILLARD et al., 2003).

⁹ Disponível em: https://github.com/cayamada/NMR_plots.git

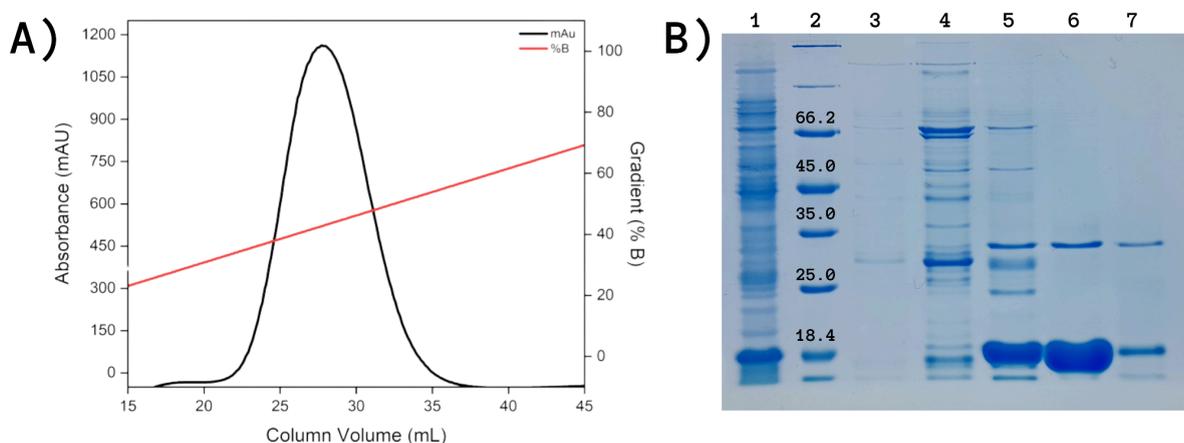
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção da proteína ^{15}N -N-NTD do SARS-CoV-2 para análises estruturais por RMN

Para expressão da proteína, foi utilizado o meio mínimo (M9)¹⁰ com o intuito de controlar os substratos disponíveis para a síntese proteica. Desta forma, o meio de cultura M9 formulado com fontes de nitrogênio que contém exclusivamente o isótopo ^{15}N , permite a substituição completa do nitrogênio presente no meio, garantindo a incorporação do isótopo ^{15}N nas proteínas recombinantes (seção 3.1).

Quando se produz proteínas recombinantes para estudos de RMN é comum haver a incorporação isótopo ^{15}N . Este tipo de abordagem aumenta significativamente a sensibilidade dos experimentos de RMN, permitindo a detecção de sinais mais fracos e melhorando a qualidade dos espectros obtidos, o que é crucial para a análise de proteínas em concentrações baixas ou em amostras complexas. Além disso, a marcação com ^{15}N resulta em uma dispersão mais uniforme dos sinais no espectro, facilitando a identificação e a atribuição de resíduos individuais na proteína. Somado a isso, a marcação com este isótopo é compatível com a realização de experimentos de RMN multidimensionais que foram realizados neste estudo. Esses experimentos são essenciais para a caracterização detalhada da estrutura e da dinâmica das proteínas em solução.

Após a indução com IPTG por 20 horas, as células foram concentradas por centrifugação e lisadas por sonicação. Após uma nova centrifugação, o sobrenadante foi submetido a uma purificação por afinidade utilizando uma coluna de níquel (Figura 8A) e as frações coletadas foram então submetidas a um SDS-PAGE em gel de acrilamida 15% (Figura 8B).



¹⁰ Anexo C

Figura 8 - Separação cromatográfica por afinidade e análise por SDS-PAGE. A) Cromatograma da purificação por afinidade da proteína N-NTD. Em vermelho está representado o gradiente de concentração do tampão de eluição. B) SDS-PAGE das frações coletadas. No poço 1 está uma alíquota do meio de cultura pós-indução tratado com tampão TES, no poço 2 o marcador de peso molecular e nos demais, as frações coletadas no processo de purificação.

Foram aplicados no gel de acrilamida uma alíquota do meio de cultura coletado após o processo de indução e tratado com tampão TES, o marcador molecular (Thermo Scientific cod. 26610) e as frações coletadas durante o processo de purificação, respectivamente. Ao serem coradas com Coomassie Blue G250, foi possível observar proteínas com massa molecular na faixa de 18,4 kDa na fração solúvel, que acredita-se ser correspondentes a proteína N-NTD que, como mencionado anteriormente, possui 17,9 kDa. Além disso, também foram observadas outras proteínas em menor concentração nas frações, provavelmente outras proteínas da *E. coli*, o que indicou a presença de impurezas nas amostras. Devido a isso, as frações onde foram observadas a presença da proteína foram submetidas a uma purificação de gel-filtração, a fim de separar a proteína de interesse das impurezas. As novas frações também foram avaliadas por SDS-PAGE (Figura 9).

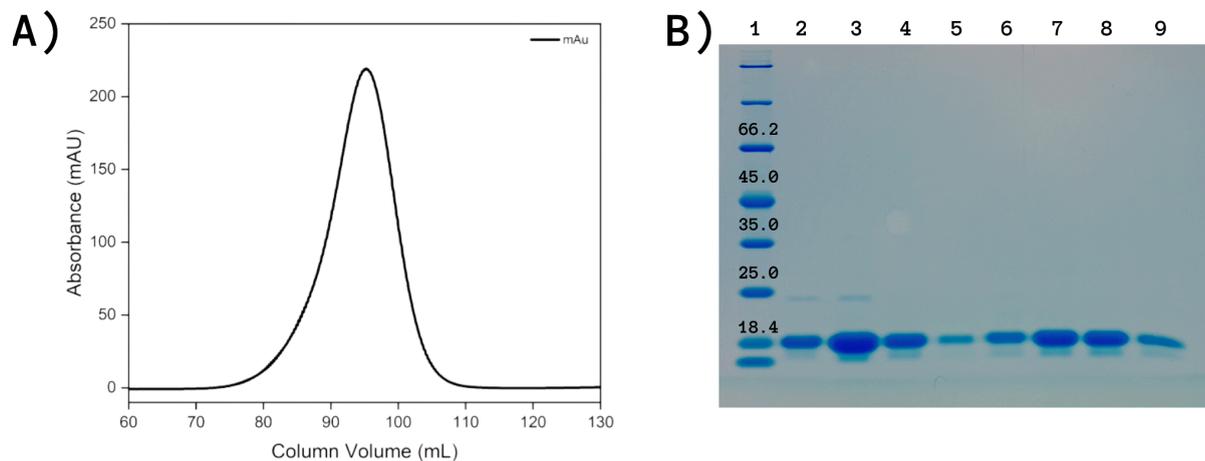


Figura 9 - Separação cromatográfica por gel-filtração e análise por SDS-PAGE. A) Cromatograma da purificação por gel-filtração. B) SDS-PAGE das frações coletadas. No poço 1 está o marcador de peso molecular e nos demais as frações coletadas no processo de purificação.

No novo gel de SDS-PAGE foi aplicado no poço 1 o mesmo marcador molecular utilizado anteriormente e nos demais poços as frações obtidas. Foi possível observar novamente a presença da proteína de interesse na faixa de 18,4 kDa, porém, não havia mais a presença das bandas referentes as impurezas, indicando que através da purificação por gel-filtração foi obtida a proteína pura e solúvel.

Como foi dito anteriormente, a proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 possui 419 resíduos, sendo que a porção N-NTD compreende os resíduos de 44 a 180. Ao longo

deste estudo, foi utilizado uma proteína com o construto correspondente a proteína depositada no PDB com a identificação 6YI3. Assim, o assinalamento e as análises foram feitas seguindo a numeração dos resíduos do PDB, como pode ser observado no alinhamento da Figura 10.

N	MSDNGPQNRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHG	60
N-NTD	-----GAMGLPNNTASWFTALTQHG	20

N	KEDLKFRGQGVPIINTNSSPDDQIGYRRATRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYLLGTGPEAG	120
N-NTD	KEDLKFRGQGVPIINTNSSPDDQIGYRRATRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYLLGTGPEAG	80

N	LPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAEGRGGS	180
N-NTD	LPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAEGRGGS	140

N	QASSRSSRSRNSRNSTPGSSRGTSARMAGNGGDAALALLLDRLNQLESKMSGKGQQ	240
N-NTD	-----	140
N	QQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKH	300
N-NTD	-----	140
N	WPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDKDPNFKDQVILLNKHIDAY	360
N-NTD	-----	140
N	KTFPPTEPKKDKKKKADETQALPQRQKKQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA	419
N-NTD	-----	140

Figura 10 - Alinhamento entre os resíduos localizados na proteína “N” e no domínio “NTD”. Estão destacados no alinhamento a porção correspondente à sequência do domínio NTD (ID PDB: 6YI3) na sequência da proteína N (ID Uniprot: PODTC9). A numeração dos resíduos se refere à sequência da “N-NTD”.

A região destacada representa a porção da sequência referente ao domínio NTD em análise. Foi feita esta padronização para facilitar e evitar erros de interpretação durante as análises que foram desenvolvidas ao longo deste trabalho.

Uma vez que foi obtida a proteína de interesse, foi realizada a aquisição de um espectro ^1H - ^{15}N -HSQC para a análise das condições da amostra. No experimento de HSQC, o grupo amino (HN) de cada resíduo da cadeia principal, exceto a prolina¹¹ são detectados. Esses sinais são sensíveis à conformação estrutural da proteína, uma vez que o ambiente químico influencia os deslocamentos químicos. Assim, o espectro de HSQC é considerado uma "impressão digital" única de cada proteína, refletindo suas características estruturais

¹¹ A prolina possui um anel imidazólico, que liga o grupo amina diretamente ao carbono alfa. Essa estrutura única faz com que a prolina não tenha um próton de amida, dificultando a sua detecção em experimentos de RMN.

(BARDELLI et al., 2015). Dessa forma, foi coletado um HSQC da proteína N-NTD (Figura 11) a fim de averiguar a qualidade da proteína obtida e se ela apresentava os deslocamentos químicos esperados, descritos em estudos prévios que realizam a caracterização da mesma (DINESH et al., 2020).

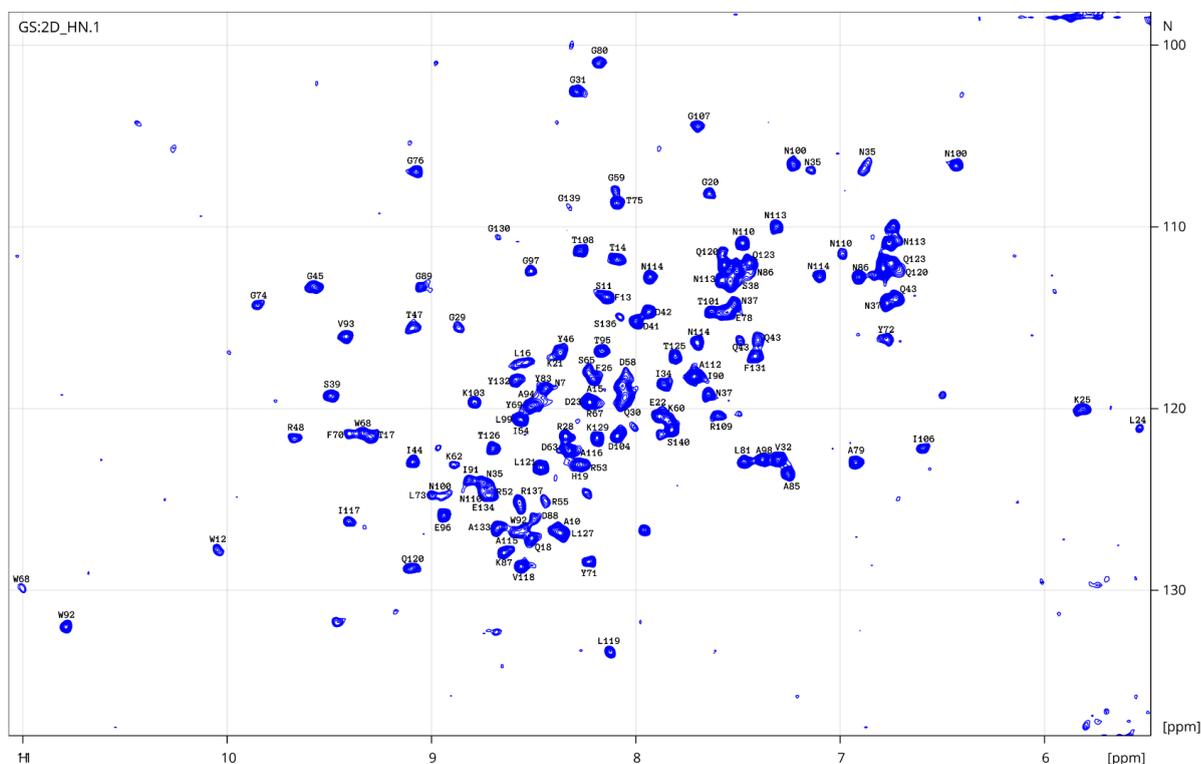


Figura 11 - Espectro de HSQC ^1H - ^{15}N da proteína N-NTD. O eixo vertical representa a faixa dos deslocamentos químicos referentes ao nitrogênio, e o eixo horizontal os deslocamentos referentes ao hidrogênio, em ppm. Ao lado de cada deslocamento químico está o assinalamento do resíduo correspondente. Foi utilizado como base o assinalamento depositado no BMRB (ID: 34511).

Para que fosse possível fazer esta correlação dos resíduos de aminoácido aos sinais correspondentes no espectro de RMN, foi utilizado o assinalamento depositado no BMRB, ID 34511, como referência. No espectro de HSQC, o eixo vertical representa os valores dos deslocamentos químicos, em ppm, referentes ao nitrogênio, enquanto o eixo horizontal representa os valores de deslocamento do hidrogênio.

Foi possível observar que os deslocamentos químicos obtidos estavam consistentes com estudos prévios que investigaram esta proteína. Além disso, os sinais apresentavam uma dispersão adequada, o que caracteriza um espectro de proteína com estrutura terciária bem definida em solução.

Os resíduos de Gly4 e Leu5, bem como os resíduos de prolina, não foram visualizados no espectro. Os resíduos Asn7, Ser11, Phe13, His19, Arg53, Leu64, Tyr83, Ala94, Asn110 e

Figura 12 - Avaliação da estabilidade da proteína após o processo de liofilização. Foi feita a sobreposição dos espectros assinalados para comparação. Em vermelho está representado o espectro da proteína não liofilizada e, em azul, da proteína após a liofilização. As setas indicam os sinais que foram observados apenas no espectro após o processo de liofilização, que não eram referentes à resíduos da proteína. Ao lado de cada deslocamento químico está o assinalamento do resíduo correspondente.

Após o assinalamento e inspeção manual foi possível observar que o espectro da proteína, após o processo de liofilização, manteve os sinais referentes aos resíduos que foram assinalados no espectro da proteína que não foi liofilizada. Além disso, os sinais exibiram o padrão de dispersão esperado, sugerindo que a proteína N pode ser liofilizada sem comprometer sua integridade estrutural. Também foi observado que no espectro após a liofilização havia a presença de alguns sinais que não estavam presentes na proteína antes de ser submetido a este processo. A presença destes sinais de menor intensidade pode ser devido a uma degradação da proteína. Porém não foi um fator limitante ou prejudicial para as análises, uma vez que não houve comprometimento dos sinais da proteína. Contudo, isto deve ser investigado posteriormente para que haja um maior esclarecimento.

Com isto em mente, foi utilizado este processo para concentrar as amostras utilizadas nos experimentos posteriores. O fato de que a proteína N pode ser liofilizada abre a possibilidade de realizar experimentos, por exemplo, de troca hidrogênio-deutério, uma vez que, nestes experimentos é preciso ressuspender a proteína em diferentes concentrações de deutério sem que haja uma diluição da amostra.

4.2.2. Avaliação da sensibilidade da proteína à mudança de pH por meio de RMN

As proteínas manifestam particularidades biofísicas que reagem de modo sensível às mudanças de pH, acarretando modificações na estabilidade e, por vezes, na atividade enzimática intrínseca. Isto se deve ao efeito do pH no estado de protonação dos grupos laterais e terminais dos aminoácidos, combinado com as mudanças nas energias livres relativas de estados conformacionais (DUMETZ *et al.*, 2008; FARRELL *et al.*, 2010). Em alguns casos de pH extremo, as proteínas podem chegar a desnaturar devido a protonação ou desprotonação uniforme de grupos ionizáveis, o que leva a uma grande repulsão entre as cargas semelhantes (ZHOU; PANG, 2018).

Devido a isso, também foi avaliada a influência que a mudança de pH possui na realização dos experimentos de RMN. Para fazer essa avaliação, foram realizadas duas medidas, sendo uma em pH 8.0 e a outra em pH 6.5. Os espectros obtidos foram sobrepostos para comparação inicial (Figura 13).

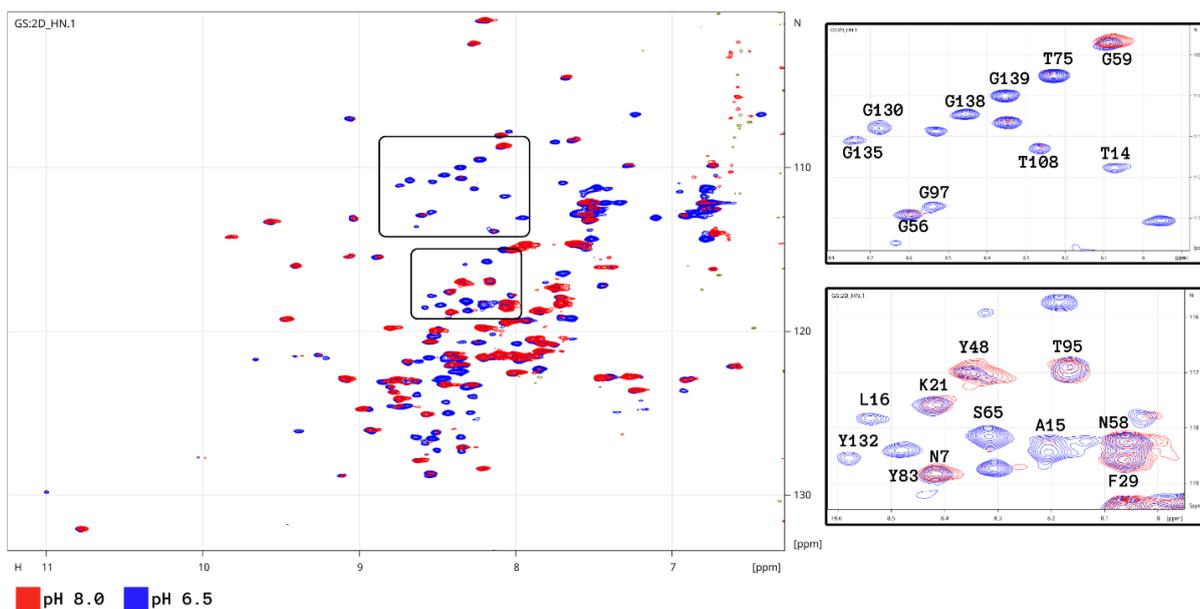


Figura 13 - Comparação dos espectros em dois pHs diferentes. Em vermelho está representado o espectro da proteína em pH 8.0 e em azul, em pH 6.5. As regiões destacadas mostram que houve a perda de alguns sinais quando a proteína se encontrava em pH mais básico. Ao lado de cada deslocamento químico na região destacada está o assinalamento do resíduo correspondente.

Foi observado que quando a proteína estava em um ambiente mais básico houve a perda de alguns sinais de ressonância. Essa observação é consistente com as mudanças na protonação dos resíduos de aminoácidos em resposta às variações no ambiente de pH. Foi possível observar que a maior parte dos resíduos que perderam o sinal, foram resíduos de glicina (Gly97, Gly130, Gly135, Gly138, Gly139). Isso provavelmente ocorreu pois a glicina é um dos aminoácidos que possui o menor pKa, o que facilita a desprotonação do hidrogênio amídico. Apesar da perda parcial de alguns sinais, foi observado que a proteína manteve sua estrutura terciária, mesmo com a alteração do pH, uma vez que os sinais presentes no espectro em pH básico mantiveram o padrão de dispersão. Isso é um indício de que a proteína mantém sua estabilidade conformacional em um pH mais básico, mesmo com a desprotonação de alguns aminoácidos. Contudo, é preciso estar atento ao pH da amostra, uma vez que pode haver perda de informação nas análises devido à ausência de sinais de alguns resíduos devido a mudança de pH.

4.2.3. Avaliação da sensibilidade da proteína à mudança de temperatura por meio de espectroscopia de RMN

A temperatura é um parâmetro crítico que pode influenciar diversos aspectos moleculares, e a alteração controlada dessa variável em experimentos fornece importantes informações em relação a sua estrutura, dinâmica e função (BOUVIGNIES et al., 2011).

Além disso, a variação na temperatura pode facilitar a resolução de sinais que estão sobrepostos, uma vez que eles podem vir a se separar devido a diferentes dependências de temperatura (TRAINOR et al., 2020).

Outro fator importante que levou a avaliação da sensibilidade da proteína à mudança de temperatura foi o experimento de troca hidrogênio-deutério. Neste tipo de experimento é importante diminuir a taxa de troca entre os hidrogênios e os deutérios, além da dinâmica da proteína como um todo, e isso pode ser obtido através da diminuição da temperatura (MASSON et al., 2019). Assim, temperaturas mais baixas podem fornecer experimentos de HDX mais adequados e, por isso, foi necessário averiguar se seria possível fazer a realização deste tipo de experimento. Pensando nisso, foram coletados os espectros em quatro temperaturas diferentes: 25 °C, 20 °C, 15 °C e 10 °C (Figura 14).

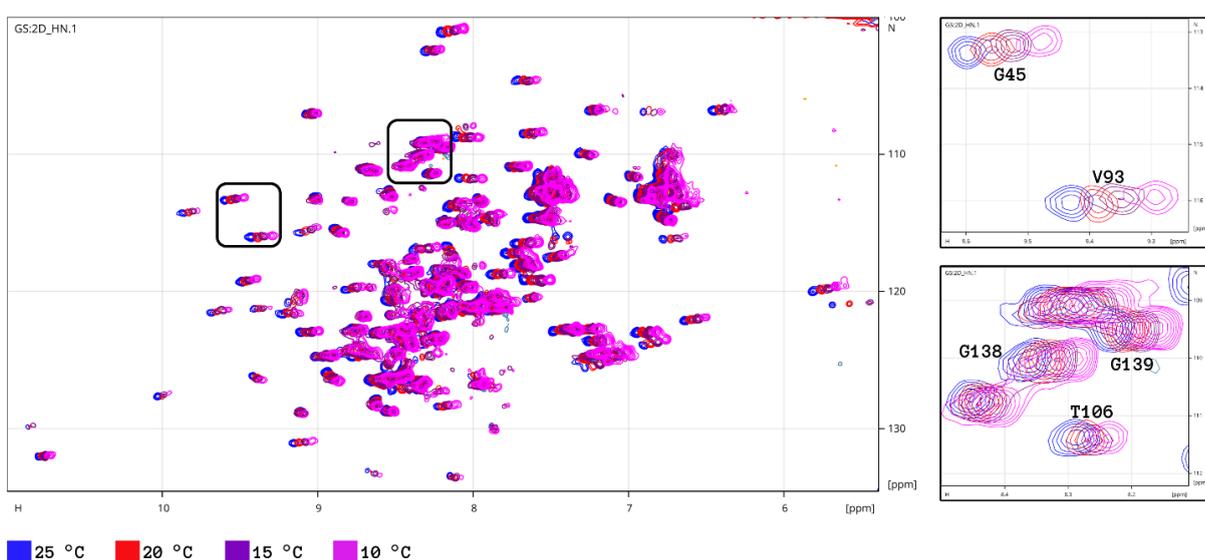


Figura 14 - Comparação dos espectros coletados em diferentes temperaturas. Em azul está representado o espectro da proteína a 25 °C, em vermelho a 20 °C, em roxo a 15 °C e em magenta a 10 °C. As regiões destacadas mostram exemplos de resíduos sofreram uma perturbação no deslocamento químico e de resíduos que não sofreram perturbações significativas em decorrência da mudança de temperatura. Ao lado de cada deslocamento químico, nas regiões destacadas está o assinalamento do resíduo correspondente.

Inicialmente foi feita uma inspeção visual por meio da sobreposição dos espectros assinalados obtidos nas diferentes temperaturas. Apenas com essa observação inicial já é possível ver que alguns resíduos sofreram perturbações no deslocamento químico, enquanto outros não foram muito afetados. Isto já é um indicativo de que estes resíduos estão em regiões mais dinâmicas da proteína e possivelmente sofrem transições conformacionais com a mudança de temperatura. Além de auxiliar na determinação da dinâmica da proteína, este tipo

de experimento também contribuiu para um mapeamento tridimensional mais preciso dos resíduos.

Para determinar efetivamente quais resíduos sofreram maiores perturbações, foi feito o cálculo do CSP de cada resíduo, bem como a sua representação gráfica, utilizando o *script*¹² desenvolvido (Figura 15), uma vez que ele indica alterações no ambiente químico, seja por mudança de temperatura ou interações com um ligante, por exemplo (GÖBL *et al.*, 2014).

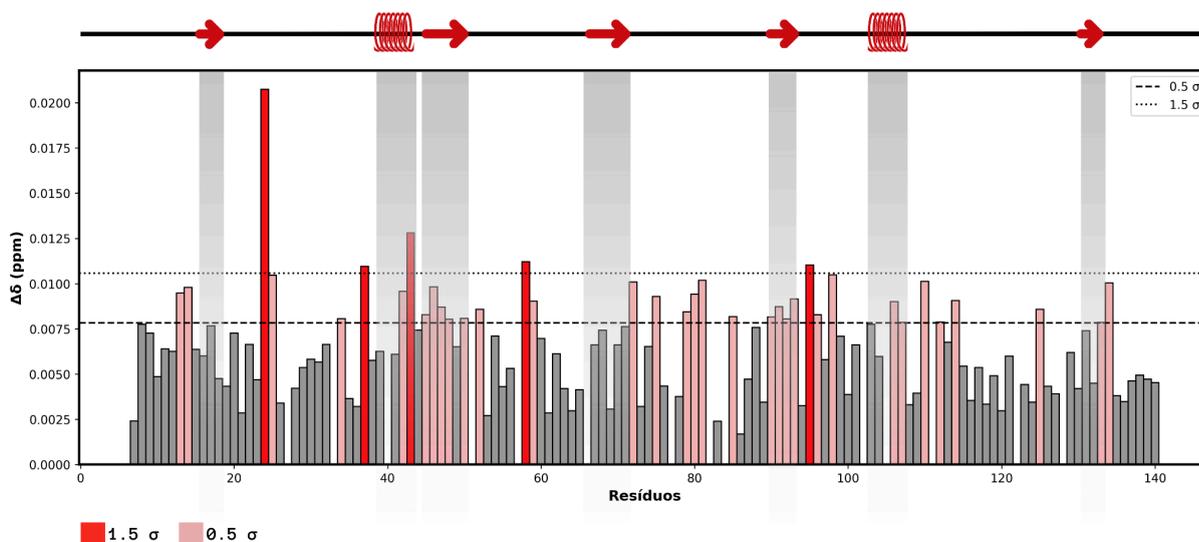


Figura 15 - Avaliação da influência da mudança de temperatura na estrutura da proteína. No eixo x estão representados os resíduos, enquanto as variações nos deslocamentos químicos são mostrados no eixo y, com a estrutura secundária da proteína ilustrada na parte superior. Em vermelho escuro estão representados os resíduos que sofreram uma maior perturbação com a mudança de temperatura ($1,5 \sigma$), em vermelho claro, os que foram levemente perturbados (entre $0,5 \sigma$ e $1,5 \sigma$) e em cinza, os que não sofrem perturbações significativas (deslocamento abaixo de $0,5 \sigma$). A linha tracejada representa o limiar de $0,5 \sigma$ e a linha pontilhada de $1,5 \sigma$.

O cálculo da perturbação do deslocamento químico foi executado com base nos espectros coletados a 25 °C, avaliando as variações nos deslocamentos químicos a 20 °C, 15 °C e 10 °C em relação à temperatura de referência. Os resíduos com CSPs superiores a esses limiares foram considerados como tendo variações razoáveis e significativas, respectivamente. Embora os resíduos Asn7, Ser11, Phe13, His19, Arg53, Leu64, Tyr69, Tyr83, Ala94, Asn110 e Glu134 estejam representados no gráfico, eles não foram incluídos nas análises devido a sobreposição dos sinais.

Os resíduos Leu24, Asn37, Gln43, Asp58 e Thr95 apresentaram um delta maior do que $1,5 \sigma$, sendo que estes estão localizados majoritariamente em regiões de volta, o que justifica os valores elevados de CSP uma vez que estas são porções mais flexíveis da proteína

¹² Disponível em: https://github.com/cayamada/NMR_plots.git

e podem apresentar variabilidade conformacional (BAROZET; CHACÓN; CORTÉS, 2021). Porém, vale ressaltar que nem todos os resíduos em regiões de volta apresentaram o mesmo tipo de comportamento. Isto se deve às interações existentes entre os resíduos e ao seu posicionamento na proteína, ou seja, se está mais voltado para a porção interna ou externa. Além disso, nos experimentos de ressonância magnética são observados as interações mais evidentes, o que não exclui a possibilidade de terem outros resíduos que sofrem transições conformacionais decorrentes da mudança de temperatura. Já os resíduos Thr14, Lys25, Ile34, Asp42, Gly45, Tyr46, Tyr47, Arg48, Ala50, Arg52, Gly59, Tyr72, Thr75, Ala79, Gly80, Leu81, Ala85, Ile90, Ile91, Trp92, Val93, Glu96, Ala98, Ile106, Gly107, Ala112, Asn114, Thr125 e Ala133 apresentaram um CSP entre 0,5 e 1,5 σ , estando localizados principalmente em regiões de fita- β e α -hélice.

Dinesh e colaboradores (2020), descreveram em um estudo, alguns resíduos que foram os que apresentaram um maior CSP quando a proteína se ligava a uma fita de RNA (Tabela 2). Eles observaram que estes resíduos estavam localizados principalmente na região do dedo básico da proteína. Esta informação corroborava com as especulações feitas a partir das análises do potencial eletrostático, uma vez que, por ter uma maior concentração de carga positiva nessa região, já era esperado que houvesse uma interação com o RNA, que possui carga negativa. Dessa forma, eles afirmam que esta região poderia ser potencialmente usada como alvo para intervenção utilizando pequenas moléculas. Contudo, devido a extensa área superficial do sítio de ligação, talvez fosse difícil fazer esse direcionamento ao alvo (DINESH et al., 2020).

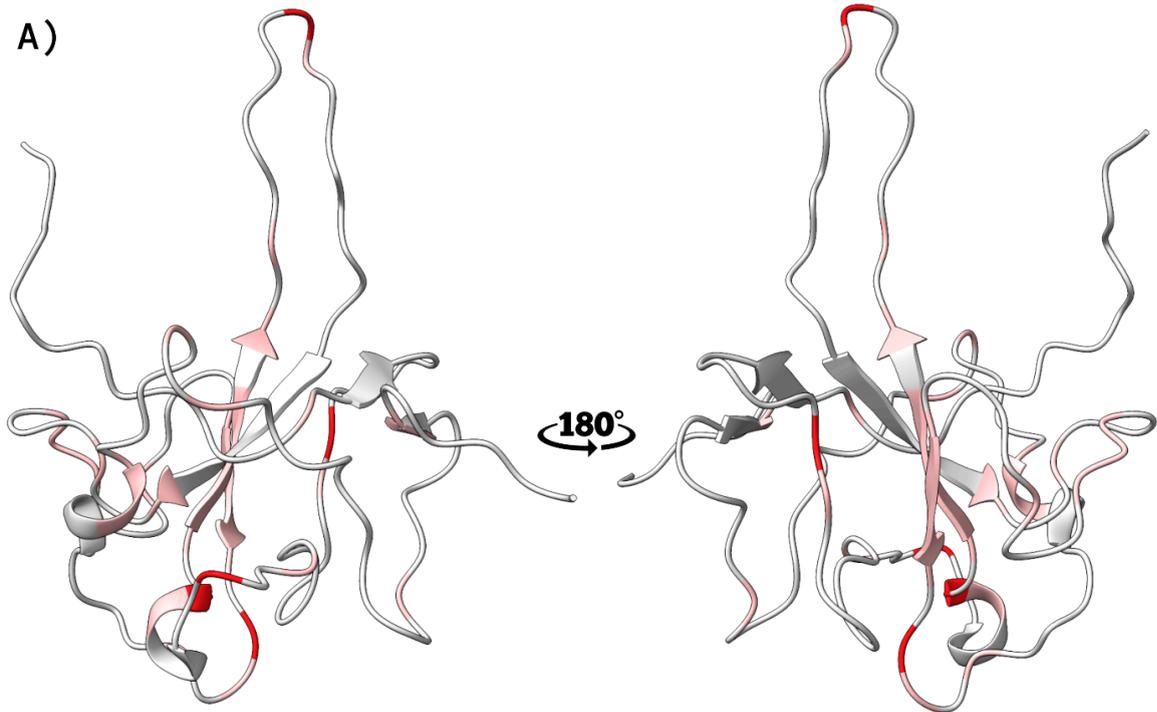
Tabela 2 - Resíduos descritos por Dinesh e colaboradores (2020) por apresentarem maior CSP durante ligação da proteína com RNA

Resíduo	Localização	Resíduo	Localização
Leu16	fita- β	Arg55	Região de volta (dedo básico)
Gly20	Região de volta	Lys62	Região de volta (dedo básico)
Lys21	Região de volta	Asp63	Região de volta (dedo básico)
Lys25	Região de volta	Leu64	Região de volta (dedo básico)
Phe26	Região de volta	Thr125	Região de volta
Ala50	fita- β	Thr126	Região de volta
Arg53	Região de volta (dedo básico)	Gly135	Região de volta

Ile54	Região de volta (dedo básico)	Arg137	Região de volta
-------	-------------------------------	--------	-----------------

Fonte: Dinesh e colaboradores (2020)

Sabendo desta informação, foi feita uma comparação das regiões descritas no trabalho mencionado e das regiões onde se encontram os resíduos afetados pela mudança de temperatura (Figura 16).



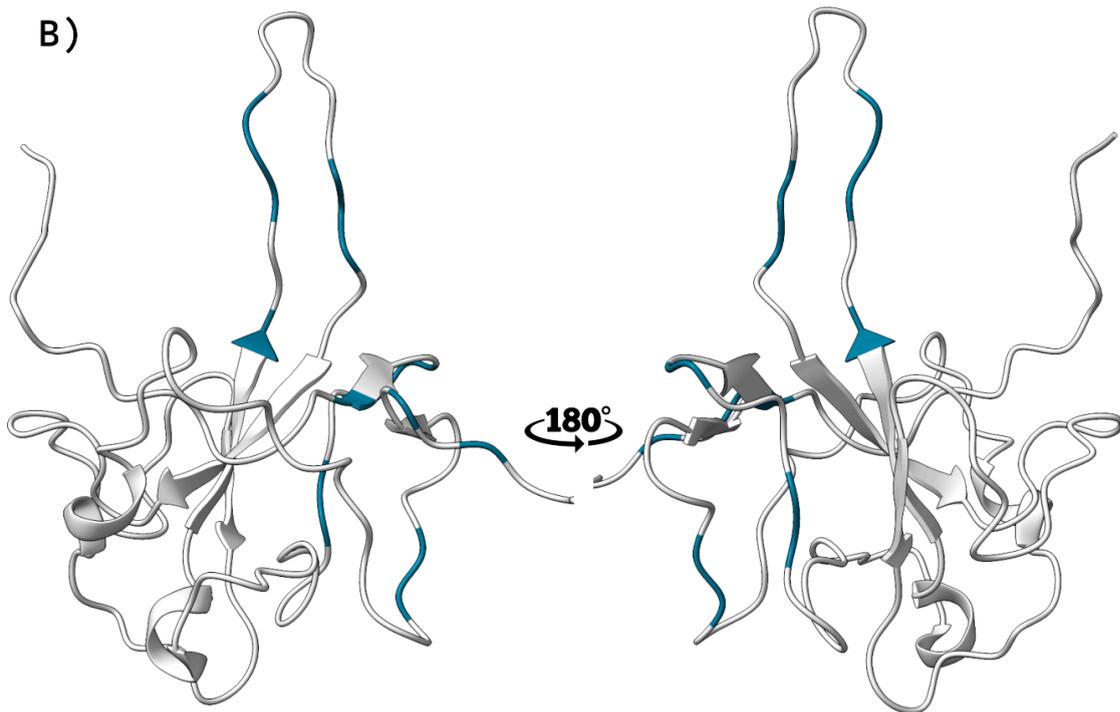


Figura 16 - Comparação entre os resíduos com maior CSP pela mudança de temperatura e pela ligação ao RNA. Estão destacados os resíduos que sofreram A) uma perturbação do deslocamento químico pela mudança de temperatura, seguindo o mesmo esquema de cores do gráfico de CSP (vermelho escuro - 1.5σ ; vermelho claro 0.5σ) e B) os resíduos que descritos por Dinesh e colaboradores (2020) como os que apresentaram maior CSP pela ligação ao RNA.

A partir da observação das estruturas tridimensionais com os resíduos destacados, e da comparação com estudos anteriores, como o realizado por Dinesh e colaboradores (2020), é possível perceber uma similaridade nos locais que sofreram uma maior perturbação do deslocamento químico, tanto pela mudança de temperatura, quanto pela ligação com o RNA. Isso indica uma possível interconexão entre a dinâmica conformacional induzida pela temperatura e pela interação com um ligante.

Embora os resíduos em regiões de volta tenham exibido um comportamento geral de perturbação, principalmente na ligação com o RNA devido a presença de cargas positivas, as interações específicas entre os resíduos e sua posição na proteína desempenharam um papel crucial nesse fenômeno. Além disso, é possível que outras transições conformacionais tenham ocorrido em resíduos não diretamente afetados pela mudança de temperatura.

É interessante ressaltar que os resíduos Asp42, Gly45, Tyr46, Tyr47, Arg48, Ala50, Tyr72, Ile90, Ile91, Trp92, Val93, Ile106, Gly107, Ala133 (48% resíduos com CSP entre $0,5\sigma$ e $1,5\sigma$) se encontram em região de fita- β e α -hélice. Isso sugere uma menor dinâmica conformacional nesses locais sob condições normais. No entanto, a ligação com o ligante

resultou em uma reversão parcial desse padrão e também gerou uma maior dinâmica em regiões próximas. Esses achados destacam a complexidade da dinâmica conformacional das proteínas e ressaltam a importância de considerar não apenas as condições ambientais, mas também as interações específicas com ligantes na análise da estrutura e função proteica.

4.3. Avaliação da interação proteína-anticorpo por meio da análise da perturbação do deslocamento químico

Uma vez realizadas as análises para garantir uma boa qualidade da amostra para os experimentos, prosseguiu-se para a avaliação da interação da proteína com o anticorpo. A ideia do mapeamento de epítomos utilizando o RMN é coletar um espectro da proteína livre e da proteína em complexo e observar as perturbações químicas geradas pela presença do anticorpo. Como a introdução do ligante gera uma alteração no ambiente químico de cada resíduo, e a RMN é sensível a ponto de detectar essas alterações, é possível determinar quais foram aqueles que sofreram uma maior perturbação no seu deslocamento químico. Ou seja, é plausível dizer que estes resíduos possivelmente fazem parte ou estão próximos da região do epítipo (BARDELLI et al., 2015).

Assim, foram adquiridos os espectros de correlação ^1H - ^{15}N HSQC da proteína livre e com anticorpo e foi feito o cálculo de CSP, bem como sua representação gráfica, utilizando o *script*¹³ desenvolvido (Figura 17). Todos os espectros foram coletados a 25 °C.

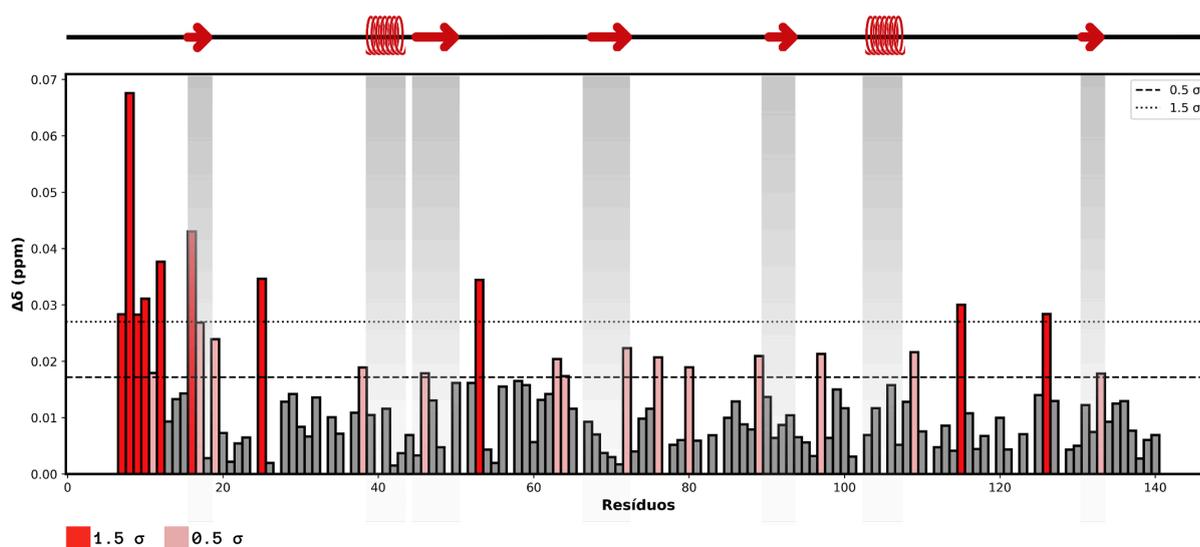


Figura 17 - Análises das interações do complexo proteína-anticorpo. No eixo x estão representados os resíduos, enquanto as variações nos deslocamentos químicos são mostrados no eixo y, com a estrutura secundária da proteína ilustrada na parte superior. Em vermelho escuro estão destacados os resíduos que sofreram uma

¹³ Disponível em: https://github.com/cayamada/NMR_plots.git

maior perturbação com a adição do anticorpo ($1,5 \sigma$), em vermelho claro, os que são levemente perturbados (entre $0,5 \sigma$ e $1,5 \sigma$) e em cinza, os que não sofrem perturbações significativas (deslocamento abaixo dos valores $0,5 \sigma$). A linha tracejada representa o limiar de $0,5 \sigma$ e a linha pontilhada de $1,5 \sigma$.

O cálculo do CSP foi realizado tendo como base os valores dos deslocamentos químicos do espectro da proteína livre. Foram considerados como significativos os valores acima de 0,027 e 0,017 (limites correspondentes a $1,5 \sigma$ e $0,5 \sigma$, respectivamente). Novamente devido a sobreposição dos sinais dos resíduos Asn7, Ser11, Phe13, His19, Arg53, Leu64, Tyr69, Tyr83, Ala94, Asn110 e Glu134, eles não foram considerados nas análises, apesar de estarem representados no gráfico. Os resíduos Asn8, Thr9, Ala10, Trp12, Leu16, Lys25, Ala115, Thr126, localizados em regiões de volta, foram os que apresentaram maior deslocamento. Já os resíduos Thr17, His19, Ser38, Tyr46, Asp63, Leu64, Tyr72, Gly76, Gly80, Gly89, Gly97, Arg109 e Ala133 apresentaram um CSP entre $0,5$ e $1,5 \sigma$ e estão localizados majoritariamente em região de fita- β .

Como Bardelli e colaboradores (2015) descreveram em seu estudo, os resíduos que interagiram de alguma forma com o anticorpo sofreram alterações em seu ambiente químico (BARDELLI et al., 2015). Isso faz com que haja perturbações nos deslocamentos químicos que são possíveis de serem detectadas utilizando o RMN. Assim, por terem apresentado uma perturbação significativa no deslocamento químico, é possível inferir que estes resíduos descritos anteriormente fazem parte da interface de interação proteína-anticorpo. Contudo, como o anticorpo é uma molécula grande (150 kDa), ele pode levar a uma leve perturbação em regiões que vão além da sua área de contato direto com a proteína, além de poder gerar um certo alargamento da linha dos sinais detectados (VALENTE; MANZANO-RENDEIRO, 2021). Devido a isto, seria interessante realizar novas medidas de RMN, porém utilizando fragmentos como a porção Fab do anticorpo, a fim de evitar este alargamento e ter uma maior precisão sobre a área de interação.

Outra inferência pode ser feita a partir da análise da localização destes resíduos na estrutura da proteína N-NTD ligada ao RNA (ID PDB: 7ACT). É possível perceber que os resíduos que sofreram uma perturbação significativa no deslocamento químico pela ligação da N-NTD com o anticorpo estão em regiões próximas ao local onde o RNA se liga à proteína. Fazendo novamente uma comparação com resíduos descritos na Tabela 2, é possível observar também, que os resíduos Leu16, Lys25, Asp63, Leu64 e Thr126 são comuns, tanto a ligação da proteína ao RNA, quanto a ligação com o anticorpo. Além disso, os resíduos Arg52, Arg67 e Arg109 foram descritos por se ligarem diretamente ao RNA viral (WU et al., 2023), sendo

que estes estão localizados próximos aos resíduos que apresentaram maior CSP no experimento de interação proteína-anticorpo. Assim, essas informações levam à hipótese de que a região do epítipo do domínio NTD é a mesma da região da ligação da proteína ao genoma viral. Dessa forma, caso houvesse a formação do complexo proteína-anticorpo, haveria um bloqueio da ligação da proteína com o RNA, impossibilitando o empacotamento do genoma e a montagem em partículas virais (Figura 18).

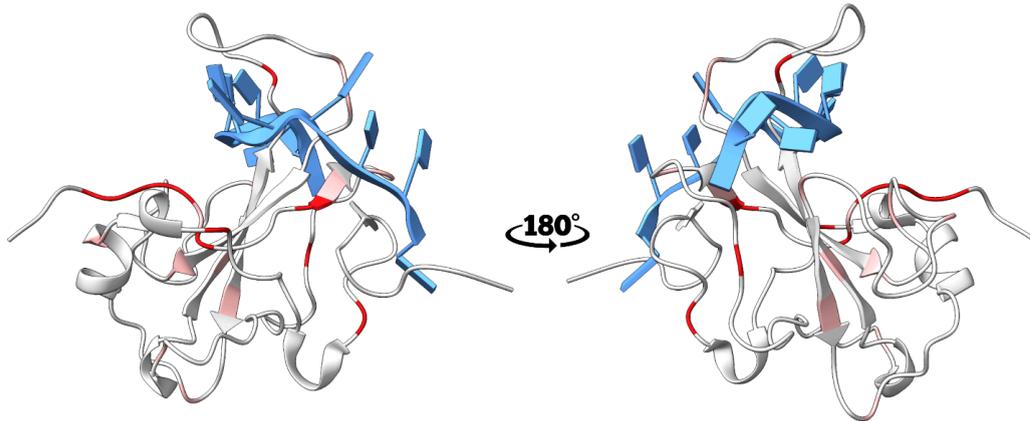


Figura 18 - Mapeamento dos resíduos com maior CSP, encontrados na interação proteína-anticorpo, na estrutura da N-NTD ligada ao RNA. Em vermelho escuro estão destacados os resíduos com CSP superior a $1,5 \sigma$ e em vermelho claro, os resíduos com CSP entre $0,5$ e $1,5 \sigma$. Em azul está representada a fita de RNA.

Apesar de não ser plausível um anticorpo interagir com proteína do nucleocapsídeo, pensando no vírus no interior de uma célula, seria possível utilizar essas informações para desenvolver um fármaco capaz de interagir com estes resíduos identificados a fim bloquear a replicação viral. Por exemplo, durante a pandemia da COVID-19, estudos mostraram o design e a síntese de vários análogos de compostos capazes de inibir a reprodução do SARS-CoV-2, que tinham como objetivo final o desenvolvimento de um medicamento viral (MATYUGINA et al., 2023). Dessa forma, este tipo de informação favorece a formulação de novos compostos pensando no tratamento da doença.

Entretanto, seria interessante a realização de mais análises para que fosse possível confirmar a hipótese levantada. Um possível experimento para isto seria um ensaio de deslocamento de mobilidade eletroforético (EMSA, do inglês, *electrophoretic mobility shift assay*). O EMSA é um método rápido e sensível para detectar interações entre proteínas e ácidos nucleicos, tendo como base que a mobilidade eletroforética de um complexo proteína-ácido nucleico é geralmente menor do que a do ácido nucleico livre. É possível utilizar ácidos nucleicos marcados com radioisótopos ou fluorescência (HELLMAN; FRIED, 2007). Assim, a ideia do experimento seria fazer este ensaio utilizando como amostra apenas

o RNA, o RNA com a proteína, o RNA com anticorpo e o RNA com a proteína e com o anticorpo. Dessa forma, se fosse observado, no poço contendo a última amostra, o padrão diferente da proteína ligada ao RNA, seria mais um indício de que ocorre um bloqueio da ligação da NTD ao RNA devido a presença do anticorpo.

4.4. Relaxação paramagnética na análise da interação proteína-anticorpo utilizando gadolínio como agente de perturbação do sinal químico

Neste trabalho foram feitos experimentos de relaxação paramagnética, a fim de analisar a acessibilidade ao solvente e obter informações complementares sobre a interação da proteína com o anticorpo. Para isso, foi utilizado o gadolínio (Gd^{3+}), que é um agente de intensificação do relaxamento paramagnético. Por ter sete elétrons desemparelhados, o Gd^{3+} possui um dos maiores raios de influência para o efeito de PRE, o que permite que ele seja usado em baixas concentrações (LENARD; MULDER; MADL, 2022). As moléculas que estão mais expostas ao Gd^{3+} sofrem uma diminuição no tempo de relaxamento e, conseqüentemente, apresentam uma perda de intensidade ou do sinal nos espectros. Assim, regiões mais expostas da proteína ao solvente tendem a ter uma influência maior do Gd^{3+} (RAVERA *et al.*, 2021). Contudo, quando há a formação do complexo proteína-anticorpo, alguns resíduos que participam da interação passam a ficar protegidos pela ligação com o anticorpo e, conseqüentemente, ficam menos expostos. Dessa forma, ao comparar os espectros espera-se observar quais resíduos sofreram perda de sinal na proteína livre mas não no complexo.

Para fazer estas análises, foram utilizadas diferentes concentrações de Gd^{3+} a fim de observar qual seria o comportamento da proteína livre e do complexo proteína-anticorpo. Foram utilizadas as concentrações de 1,0 μM , 1,5 μM , 2,0 μM e 2,5 μM , onde foi possível observar a perda parcial de alguns sinais. Fazendo a comparação visual dos espectros da proteína livre e do complexo (Figura 19A e B, respectivamente), sem gadolínio e com 2,5 μM , já é possível notar que há mais sinais no espectro da proteína com o anticorpo. Isso mostra a redução da acessibilidade ao solvente esperada devido ao bloqueio causado pela formação do complexo.

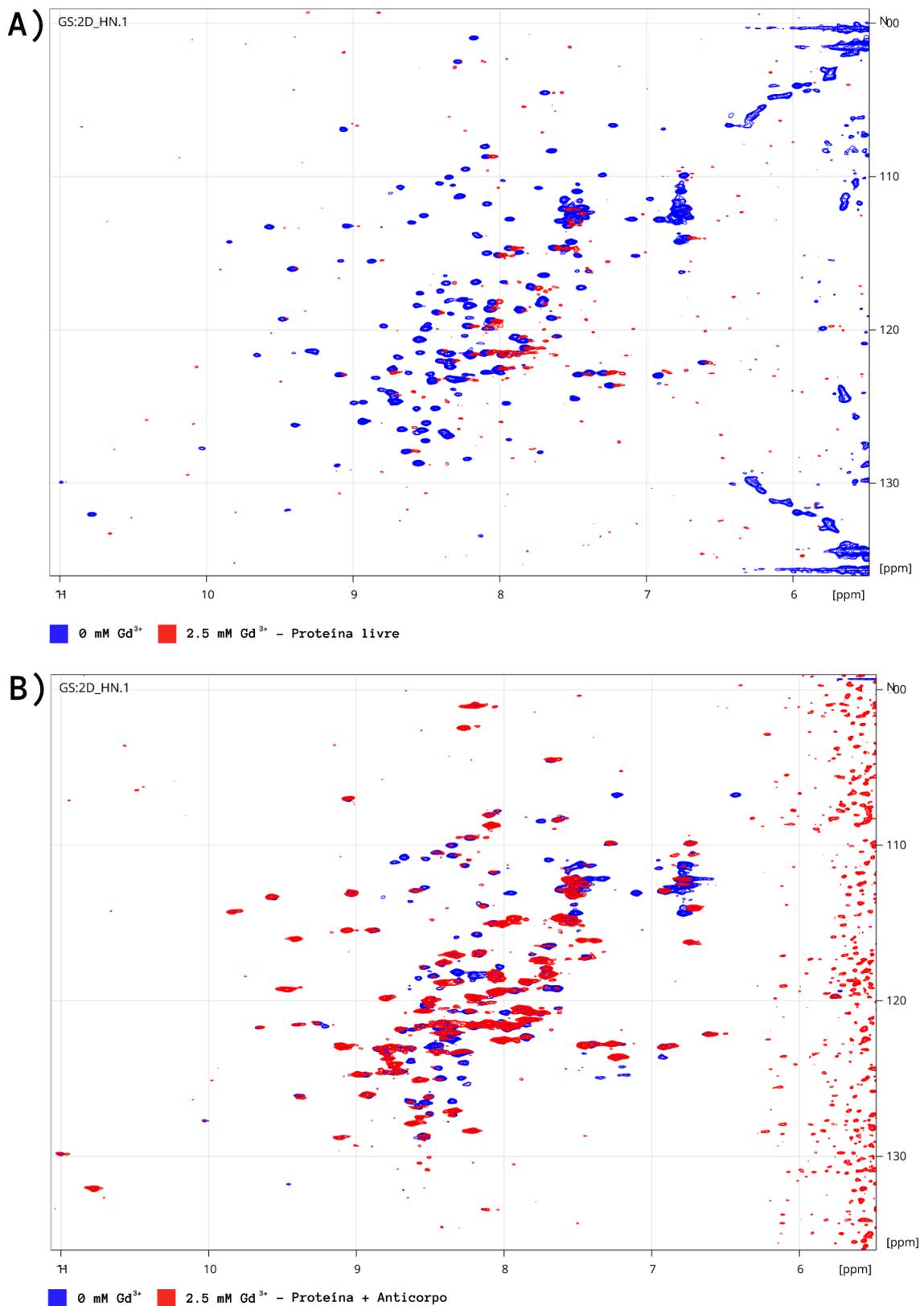
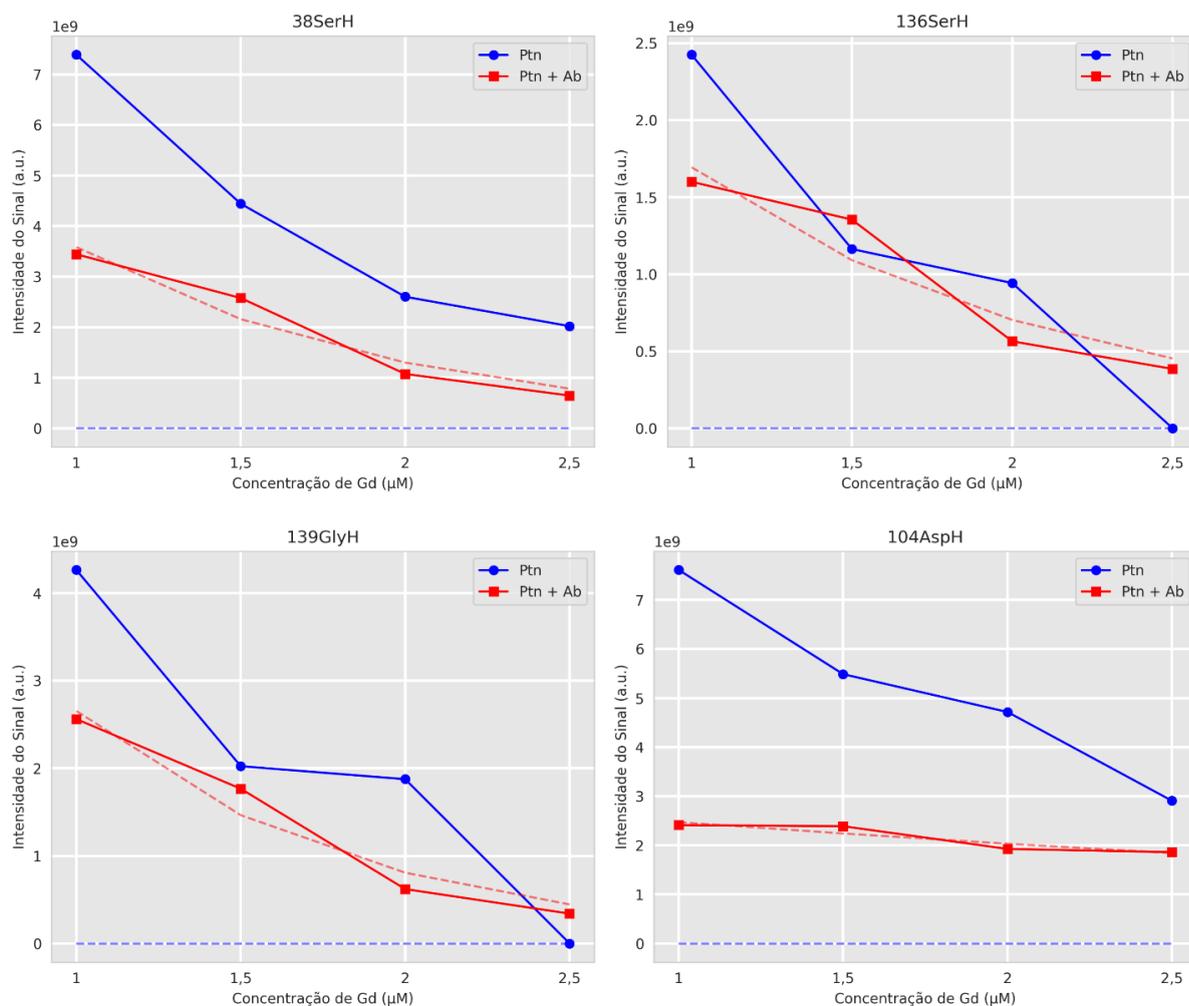


Figura 19 - Sobreposição dos espectros da proteína livre e em complexo, em duas concentrações de Gd³⁺. A) Espectro da proteína livre e B) da proteína na presença do anticorpo. Em azul, estão representados os espectros coletados na ausência do centro paramagnético e em vermelho os espectros com 2,5 mM de gadolínio.

Para fazer as análises e determinar os resíduos que sofreram um maior bloqueio da acessibilidade ao solvente devido a ligação com o anticorpo, foi feito um *script*¹⁴ em Python para fazer representações gráficas das intensidades de cada resíduo nas diferentes concentrações de Gd^{3+} , exemplificadas na Figura 20 e mostradas por completo no apêndice I.



¹⁴ Disponível em: https://github.com/cayamada/NMR_plots.git

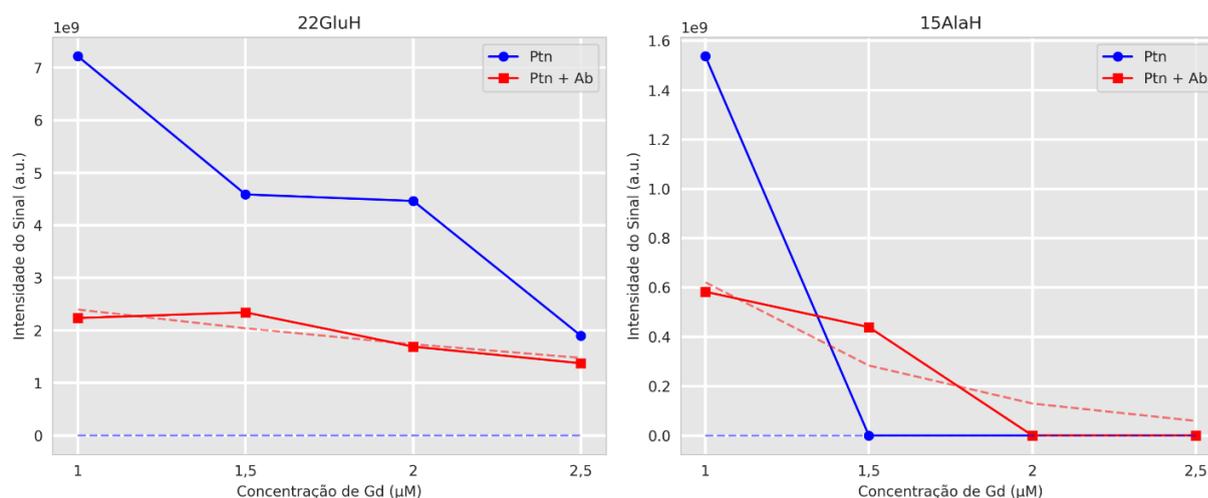


Figura 20 - Representações gráficas dos decaimentos das intensidades dos sinais pela concentração de gadolínio. Em azul, estão representadas as intensidades da proteína livre e, em vermelho, da proteína em complexo com o anticorpo. As linhas contínuas representam as intensidades dos sinais em cada concentração de gadolínio e as linhas pontilhadas representam as linhas de tendência calculadas para cada caso. Na parte superior de cada gráfico está identificado o resíduos que está sendo analisado.

Foram analisadas as intensidades dos sinais de cada resíduo na presença e ausência do anticorpo, variando a concentração do gadolínio. Por meio dessas análises, foi calculada uma linha de tendência exponencial para representar a relação entre a intensidade do sinal e a variação na concentração do agente paramagnético, com o objetivo de determinar a taxa de decaimento do sinal (Apêndice II). Os resultados mostram que alguns resíduos apresentaram uma menor taxa de decaimento do sinal quando a proteína estava ligada ao anticorpo, indicando uma alteração na interação proteína-anticorpo.

De acordo com os dados obtidos, os resíduos Ala10, Ala15, Glu22, Ser38, Ala50, Gly56, Asp104, Thr108, Ala112, Gly130, Tyr132, Gly135, Ser136, Arg137, Gly138 e Gly139 foram os resíduos que apresentaram uma menor taxa de decaimento do sinal quando a proteína se encontrava ligada ao anticorpo. Além disso, foi feita uma comparação com os resíduos descritos na Tabela 3, fornecendo informações adicionais sobre a interação proteica em diferentes condições experimentais.

Tabela 3 - Comparação entre os resíduos encontrados nos experimentos de interação proteína-anticorpo e relaxação paramagnética

Resíduos com CSP 1,5 σ interação proteína-anticorpo	Resíduos com CSP 0,5 σ interação proteína-anticorpo	Resíduos com menor taxa de decaimento (Gd^{3+})
Asn8	Thr17	Ala10
Thr9	His19	Ala15
Ala10	Ser38	Glu22

Trp12	Tyr46	Ser38
Leu16	Asp63	Ala50
Lys25	Leu64	Gly56
Ala115	Tyr72	Asp104
Thr126	Gly76	Thr108
	Gly80	Ala112
	Gly89	Gly130
	Gly97	Tyr132
	Arg109	Gly135
	Ala133	Ser136
		Arg137
		Gly138
		Gly139

Fonte: próprio autor

Nota: são mostrados os resíduos com maior perturbação no deslocamento químico encontrados no experimento de interação proteína-anticorpo e aqueles que apresentaram um menor decaimento da intensidade no experimento de relação paramagnética.

É possível perceber que os resíduos Ala10 e Ser38 são comuns nos dois experimentos e que também há resíduos em posições próximas uns dos outros, por exemplo, Ala15 e Leu16 ou Thr108 e Agr109. Além disso, estes resíduos encontrados no experimento de relaxação paramagnética se encontram principalmente em regiões de *Região de volta* e estão próximos à região onde a proteína N-NTD se liga ao RNA (Figura 21).

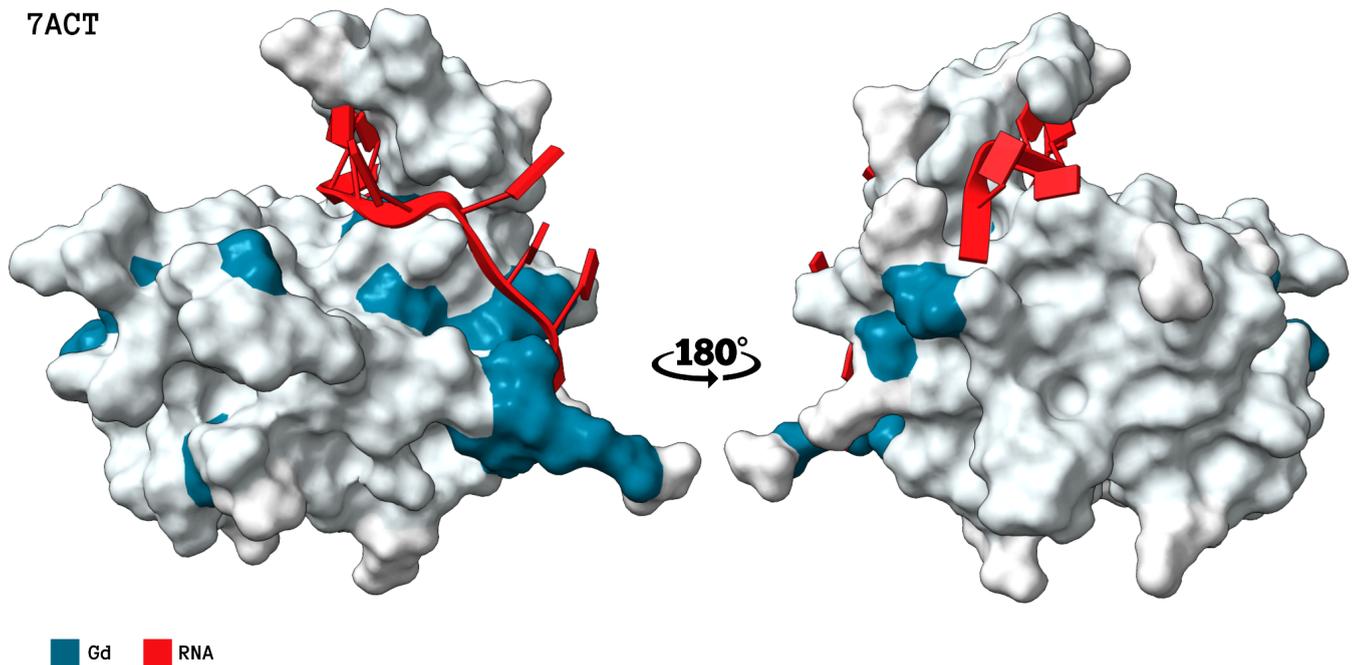


Figura 21 - Resíduos que sofreram menor decaimento quando ligados ao anticorpo, destacados na proteína ligada ao RNA. Em azul estão destacados alguns dos resíduos que sofreram uma diminuição da taxa do caimento do sinal devido a presença do anticorpo. Em vermelho está representada uma fita de RNA.

Essa informação corrobora com os dados encontrados na análise da interação proteína-anticorpo (secção 4.3) e reforça a hipótese de que o anticorpo se liga em uma porção da proteína que bloquearia a ligação da mesma com o RNA, impossibilitando a replicação viral. Isso permite inferir quais resíduos estão envolvidos no epítipo, facilitando o desenvolvimento de imunoenaios altamente padronizados. Estes dados são importantes para a identificação de biomarcadores, como demonstrado em estudos anteriores (STENMAN, 2016).

Além disso, já foram iniciados experimentos de troca hidrogênio-deutério, que tem como objetivo complementar as informações obtidas pelo experimentos de relaxação paramagnética. Os experimentos de HDX permitem também a análise da acessibilidade da proteína ao solvente, na ausência e na presença dos anticorpos, porém utilizando como base a troca do hidrogênio por deutério, seguindo o princípio descrito por Di Muzio e colaboradores (2020) (DI MUZIO et al., 2020).

4.5. Análise dos resíduos expostos ao solvente por meio de uma técnica *in silico*

O VADAR é uma ferramenta online desenvolvida por Willard e colaboradores, especificamente para avaliar, de forma quantitativa e qualitativa, estruturas resolvidas por RMN, cristalografia e difração de raios-x e modelagem por homologia. Ele permite que seja

feito o cálculo de parâmetros como ASA, ângulos diédricos, volume excluído, entre outros, permitindo a determinação dos resíduos que estão em regiões mais expostas, a partir de um arquivo ou um número de acesso do PDB (WILLARD et al., 2003).

Assim, foi utilizada esta ferramenta para calcular a ASA da cadeia principal, uma vez que os resíduos das cadeias laterais não foram considerados nas análises. Foi feito o cálculo usando tanto o modelo de ID 6YI3 do PDB, quanto o modelo de ID 7ACT, disponível no apêndice III, com o intuito de analisar se a mudança conformacional causada pela ligação ao RNA teria influência considerável nos resíduos mais expostos ao solvente. Os resíduos com ASA da cadeia principal fracional acima de 0,5, foram considerados resíduos expostos.

Analisando os primeiros resíduos classificados como expostos, tanto para a proteína livre, quanto para a proteína com o RNA, é possível notar que há nove resíduos (Lys21, Arg55, Asn86, Glu96, Gln123, Lys129, Gly138, Gly139, Ser140 - 64%) que se repetem nas duas estruturas (Tabela 4).

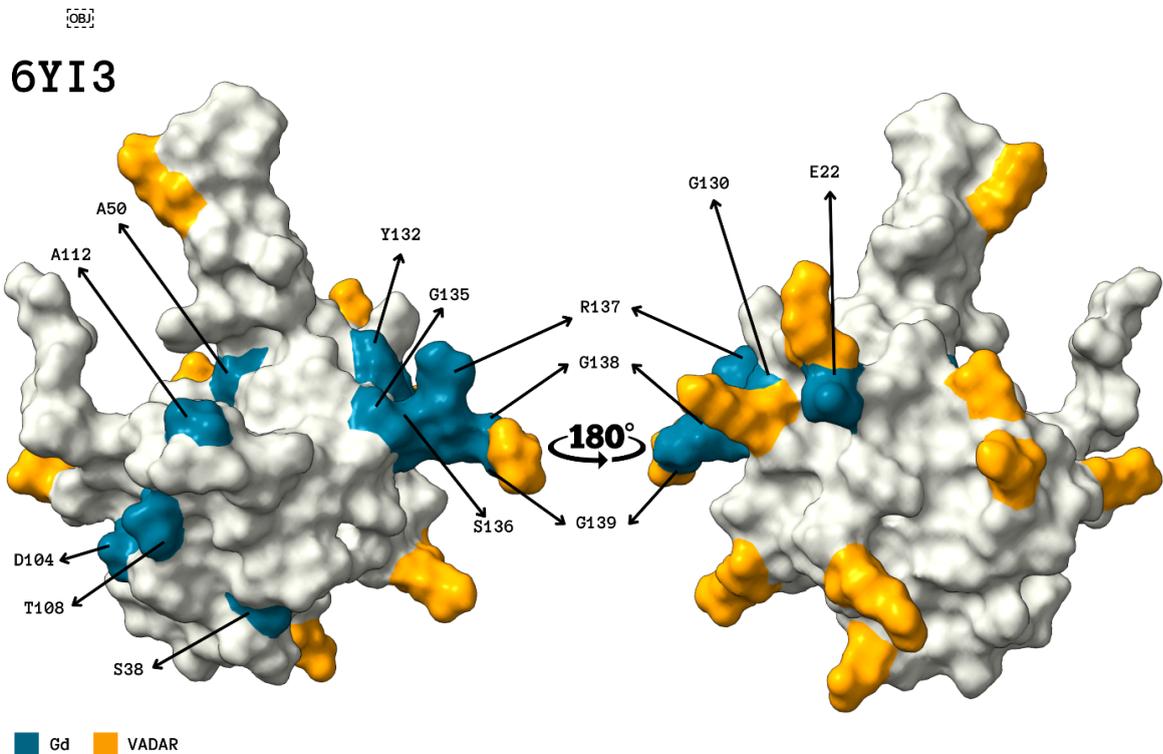
Tabela 4 - Lista dos quatorze primeiros resíduos exposto com base no VADAR

Nº	Nome Resíduo	ASA 6YI3	ASA Fracional 6YI3	Classificação	Nº	Nome Resíduo	ASA 7ACT	ASA Fracional 7ACT	Classificação
21	LYS	213,3	1	Exposto	21	LYS	185,4	0,87	Exposto
28	ARG	229,9	0,94	Exposto	36	THR	136,7	0,9	Exposto
55	ARG	198,2	0,81	Exposto	55	ARG	252,4	1,03	Exposto
78	GLU	163,4	0,86	Exposto	58	ASP	160	1,02	Exposto
86	ASN	145,9	0,88	Exposto	63	ASP	141,6	0,9	Exposto
88	ASP	134,2	0,85	Exposto	80	GLY	83,9	0,92	Exposto
96	GLU	172,2	0,91	Exposto	86	ASN	158,5	0,96	Exposto
123	GLN	186,4	0,98	Exposto	96	GLU	190,6	1	Exposto
124	GLY	81	0,89	Exposto	115	ALA	103,4	0,84	Exposto
129	LYS	207,7	0,97	Exposto	123	GLN	185,2	0,98	Exposto
137	ARG	219,7	0,9	Exposto	129	LYS	208,4	0,97	Exposto
138	GLY	73,9	0,81	Exposto	138	GLY	87,7	0,97	Exposto
139	GLY	76,9	0,85	Exposto	139	GLY	82,4	0,91	Exposto
140	SER	176,1	1,34	Exposto	140	SER	181,5	1,38	Exposto

Fonte: próprio autor

Nota: são apresentados os valores de ASA e ASA fracional das cadeias principais das proteínas 6YI3 e 7ACT depositadas no PDB, bem como sua classificação quanto à exposição ao solvente com base nas informações do VADAR. Os resíduos que não estão destacados são comuns para ambas as proteínas, já os resíduos destacados são aqueles que estão entre os mais expostos em apenas um dos modelos.

Estes resíduos se encontram principalmente em regiões de volta e estão mais nas extremidades das proteínas, o que explica o fato de estarem mais expostos. Também é possível observar a presença de alguns resíduos que estão entre os mais expostos em apenas uma das proteínas, o que era esperado devido a mudança conformacional que ocorre quando a proteína se liga ao RNA. Ademais, foi feita uma comparação das informações obtidas pelos experimentos de relaxação paramagnética e as informações obtidas pelo VADAR (Figura 22).



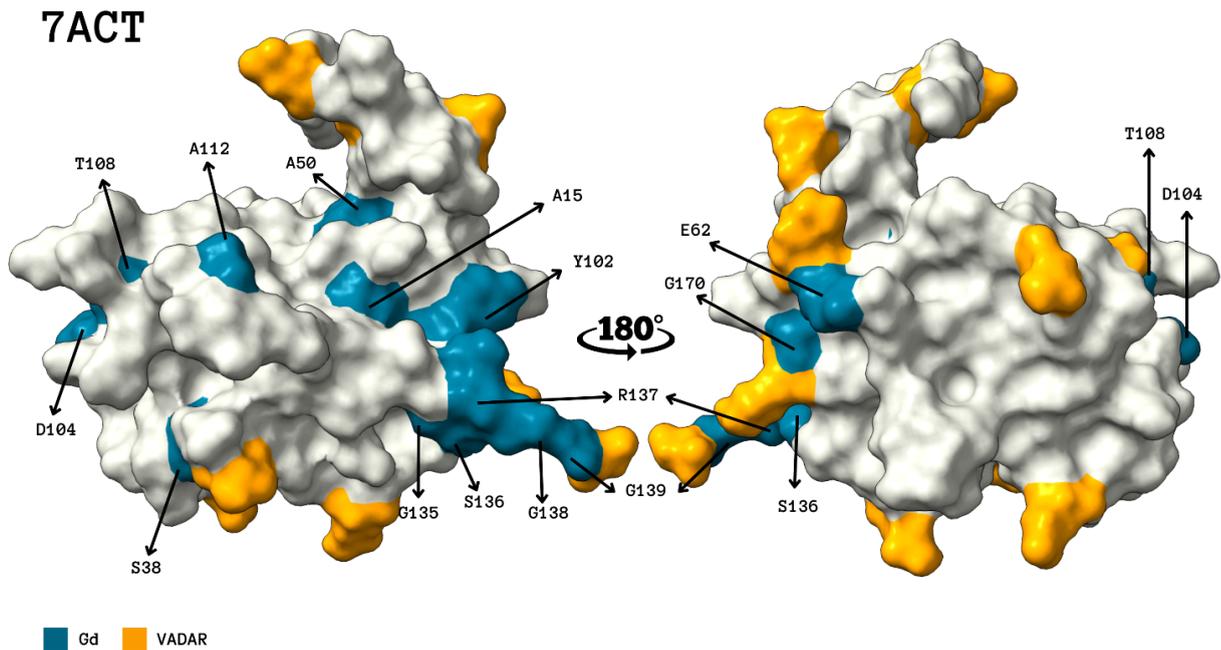


Figura 22 - Mapeamento superficial dos resíduos que sofreram uma diminuição na taxa de decaimento e dos resíduos mais expostos de acordo com o VADAR. Foi feito o mapeamento na superfície da proteína N-NTD livre (ID PDB: 6YI3) e da proteína ligada ao RMN (ID PDB: 7ACT). Em azul estão mapeados os resíduos que sofreram uma diminuição na taxa de decaimento após a ligação com o anticorpo de acordo com os experimentos utilizando o Gd^{3+} . As setas indicam quais são os resíduos destacados. Em amarelo, estão os resíduos que foram classificados como mais expostos, em cada estrutura, de acordo com o VADAR. Os resíduos 137Arg, 138Gly, 139Gly são comuns aos dois casos, porém foram destacados com a cor azul.

É possível observar que alguns dos resíduos mais expostos ao solvente, como Lys21, Arg55 e Lys129, são adjacentes a alguns resíduos que apresentaram uma menor taxa de decaimento da intensidade do sinal após a interação com o anticorpo. Também é possível observar que alguns resíduos, como Ala50 e Asp88, que apesar de não estarem próximos sequencialmente, se encontram em regiões próximas na proteína estruturada. Os resíduos Arg137, Gly138, Gly139 são comuns a ambas as situações. Isso provavelmente indica que houve uma proteção por parte do anticorpo, bloqueando a acessibilidade ao solvente desses resíduos que são considerados como expostos na proteína. Além disso, 10 dos 16 (62,5%) resíduos descritos na Tabela 2 e 8 dos 21 (38%) resíduos (Apêndice IV) que sofreram maior perturbação com a ligação do anticorpo foram classificados como expostos pelo VADAR, sendo que os resíduos Lys25, Asp63 e Thr126 são comuns a ambos os casos. Assim, é possível que estes três resíduos sejam importantes para o contato inicial tanto do anticorpo quanto do RNA no momento de interação com a proteína.

4.6. Explorando novos epítomos para o diagnóstico da COVID-19

A partir das análises detalhadas das interações entre a proteína-N e os anticorpos, bem como da exposição dos resíduos ao solvente, é viável sugerir novos epítomos para o diagnóstico da COVID-19. Epítomos representam áreas específicas em uma proteína que são reconhecidas pelo sistema imunológico, e sua identificação precisa é crucial para o desenvolvimento de testes diagnósticos eficazes.

Analisando todos os dados obtidos, é possível destacar alguns resíduos como candidatos promissores, conforme listado na Tabela 5. Esses resíduos foram identificados como expostos ao solvente e exibiram uma perturbação significativa na presença do anticorpo, sugerindo sua potencial utilidade como epítomos para o desenvolvimento de testes diagnósticos da COVID-19.

A seleção desses como epítomos se baseia na premissa de que eles desempenham um papel crucial na interação entre o vírus SARS-CoV-2 e o sistema imunológico. Ao direcionar essas regiões específicas da proteína viral, é possível criar testes diagnósticos altamente sensíveis e específicos para detectar anticorpos contra o vírus em amostras clínicas.

Tabela 5 - Resíduos relevantes obtidos das análises combinadas

Análises dos dados	Resíduos
Resíduos importantes para contato inicial da proteína com ligantes	Lys25, Asp63 e Thr126
Resíduos comuns ao experimento de Gd ³⁺ e a análise pelo VADAR	Arg137, Gly138, Gly139
Resíduos que são comuns aos experimentos de ligação proteína-anticorpo e Gd ³⁺	Ala10 e Ser38
Resíduos comuns à ligação da proteína ao RNA e aos experimentos de ligação proteína-anticorpo	Leu16, Lys25, Asp63, Leu64 e Thr126

Fonte: próprio autor

Com base nesses resíduos, é possível propor três epítomos que podem ser utilizados no diagnóstico da COVID-19. O primeiro epítopo proposto vai do resíduo 38 ao resíduo 63, que engloba uma porção mais central da proteína, contendo uma α -hélice e uma fita- β , além de uma parte do dedo básico. O segundo epítopo seria uma variação do primeiro, começando do resíduo 25 e indo até o resíduo 63. Dessa forma ele englobaria o resíduo Lys25, que foi um dos resíduos considerados importantes para o contato inicial da proteína com um ligante. Já o

terceiro epítipo, vai do resíduo 126 ao resíduo 139 e se encontra na porção final da proteína, contendo uma fita- β (Figura 23).

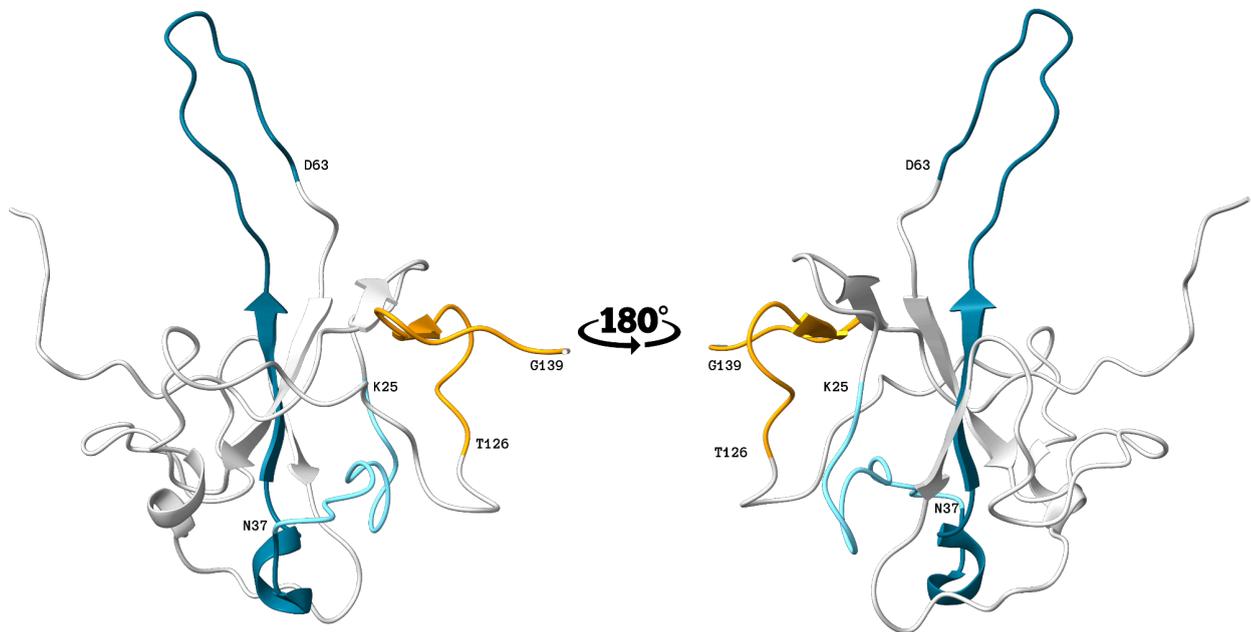


Figura 23 - Mapeamento estrutural dos epítipos propostos. Em azul está representado o primeiro epítipo proposto, que vai dos resíduos 21 a 63. Em amarelo está representado o segundo epítipo proposto, que vai dos resíduos 126 a 139.

Esses epítipos não são conservados em outros coronavírus como HCoV-HKU1, MERS-CoV e SARS-CoV-1 (Figura 24). Isso faz com que eles possam ser aplicados para o diagnóstico específico do SARS-CoV-2. Contudo, o segundo epítipo proposto possui uma pequena porção contendo resíduos conservados em outros coronavírus, o que poderia servir para o desenvolvimento de um teste diagnóstico com o potencial de identificar infecções cruzadas de outros coronavírus, mas que ainda seria mais específico para o SARS-CoV-2. Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (MAMBELLI et al., 2023) também foi descrito um epítipo predito por meio de imunoinformática que é conservado entre outros coronavírus. Este epítipo compreende os resíduos 56 ao 87, ou seja, ele está localizado entre os três epítipos propostos neste trabalho. Assim, é interessante ressaltar essa diferença entre os epítipos encontrados e suas especificidades, que só foram possíveis de serem identificadas por meio das análises desenvolvidas durante este trabalho.

5. CONCLUSÕES

A ressonância magnética nuclear é uma técnica já utilizada para fazer a identificação das regiões de interação da proteína de interesse com os anticorpos por ser capaz de fornecer informações importantes sobre este sítio de ligação. Assim, o desenvolvimento de uma metodologia utilizando a RMN para o mapeamento de epítomos é crucial para a identificação de novos alvos vacinais, terapêuticos e diagnósticos. Além disso, a pandemia de COVID-19, trouxe para a comunidade científica essa necessidade de métodos eficazes para mapear epítomos.

Nesse contexto, este trabalho propôs uma metodologia para o mapeamento de epítomos, utilizando a proteína N-NTD do SARS-CoV-2 como modelo. Esse processo envolveu o estabelecimento de condições experimentais adequadas para garantir a qualidade da amostra, a análise da interação proteína-anticorpo por meio do cálculo da perturbação do deslocamento químico e a avaliação da acessibilidade ao solvente por meio do efeito PRE. A utilização do software VADAR também contribuiu para enriquecer as análises realizadas.

Utilizando esta metodologia, foi possível propor que os resíduos Lys25, Asp63 e Thr126 são importantes para que a proteína estabeleça uma interação inicial com os ligantes, seja um anticorpo ou um RNA. Além disso, os resultados obtidos até o momento permitiram a identificação de duas possíveis regiões de epítomos, envolvendo os resíduos da Lys21 até o Asp63 e do Thr126 a Gly139. Essas informações são cruciais para orientar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, vacinas e métodos de diagnóstico mais eficazes contra a COVID-19 e outras doenças virais.

Observamos que mudanças de temperatura causaram perturbações nos deslocamentos químicos de resíduos na proteína N-NTD do SARS-CoV-2, sugerindo uma interconexão entre dinâmica conformacional, temperatura e interações com ligantes como o RNA viral. Os resíduos afetados pela interação proteína-anticorpo também foram influenciados pela temperatura e pela ligação com o RNA viral, destacando uma complexa interação entre dinâmica conformacional, interações com ligantes e fatores ambientais. Este trabalho ressalta que compreender essa dinâmica é crucial para desenvolver estratégias terapêuticas eficazes contra doenças virais emergentes, como a COVID-19.

As perspectivas deste trabalho estão relacionadas primeiramente a finalização dos experimentos de troca hidrogênio-deutério, a fim de complementar as informações obtidas até o presente momento. Por ser um experimento que tem também como objetivo mostrar as regiões que estão mais expostas ao solvente, será interessante comparar os dados obtidos neste experimento com os do gadolínio. Assim, é esperado que os resíduos Ala10, Ala15, Glu22, Ser38, Ala50, 56Gly, Asp104, Thr108, Ala112, Gly130, Tyr132, Gly135, Ser136, Arg137, Gly138 e Gly139 ou resíduos próximos a estes, também apresentem menor taxa de decaimento após a ligação com o anticorpo. Além disso, seria interessante realizar outros experimentos, como o EMSA, para obter mais informações sobre a região de interação da proteína com o anticorpo e também, realizar uma análise *in silico* sobre os possíveis epítomos da N-NTD e comparar com os obtidos experimentalmente.

Dessa forma, este estudo apresenta uma metodologia robusta para o mapeamento de epítomos por RMN de interações, com resultados promissores que sugerem a viabilidade dessa abordagem para a identificação de alvos terapêuticos e vacinais contra doenças virais emergentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVANAGH, J. et al. **Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice**. 2. ed. Elsevier Academic Press, 2006.

WHO. Listings of WHO's response to COVID-19. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/29-06-2020-covidtimeline>>. Acesso em: 5 jan. 2024

WHO. COVID-19 cases | WHO COVID-19 dashboard. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>>. Acesso em: 5 jan. 2024.

ABDELRAHMAN, Z.; LI, M.; WANG, X. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

AHN, W.-S. et al. Production, characterization, and epitope mapping of monoclonal antibodies of ribosomal protein S3 (rpS3). **Animal Cells and Systems**, v. 25, n. 5, p. 323–336, 2021.

AKIBA, H. et al. Structural and thermodynamic basis for the recognition of the substrate-binding cleft on hen egg lysozyme by a single-domain antibody. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 15481, 29 out. 2019.

ALTINCEKIC, N. et al. Large-Scale Recombinant Production of the SARS-CoV-2 Proteome for High-Throughput and Structural Biology Applications. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 653148, 10 maio 2021.

ANAND, T. et al. Phage Display Technique as a Tool for Diagnosis and Antibody Selection for Coronaviruses. **Current Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1124–1134, 2021.

ARASI, S. et al. Precision medicine in food allergy. **Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology**, v. 18, n. 5, p. 438–443, out. 2018.

BAI, C.; ZHONG, Q.; GAO, G. F. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. **Science China. Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 280–294, 2022.

BAI, Z. et al. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1115, 10 jun. 2021.

BAPTISTA, B. DE O. et al. B-Cell Epitope Mapping of the Plasmodium falciparum Malaria Vaccine Candidate GMZ2.6c in a Naturally Exposed Population of the Brazilian Amazon. **Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 446, 15 fev. 2023.

BARDELLI, M. et al. Epitope mapping by solution NMR spectroscopy. **Journal of molecular recognition: JMR**, v. 28, n. 6, p. 393–400, jun. 2015.

BAROZET, A.; CHACÓN, P.; CORTÉS, J. Current approaches to flexible loop modeling. **Current Research in Structural Biology**, v. 3, p. 187–191, 2021.

BAX, A.; CLORE, G. M. Protein NMR: Boundless Opportunities. **Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)**, v. 306, p. 187–191, set. 2019.

BIANCOLELLA, M. et al. COVID-19 annual update: a narrative review. **Human Genomics**, v. 17, p. 68, 24 jul. 2023.

BODAGHI, A.; FATTAHI, N.; RAMAZANI, A. Biomarkers: Promising and valuable tools towards diagnosis, prognosis and treatment of Covid-19 and other diseases. **Heliyon**, v. 9, n. 2, p. e13323, 30 jan. 2023.

BOUVIGNIES, G. et al. Measuring 1HN Temperature Coefficients in Invisible Protein States by Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy. **Journal of biomolecular NMR**, v. 50, n. 1, p. 13–18, maio 2011.

BRANDMEIER, J. C. et al. Digital and Analog Detection of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein via an Upconversion-Linked Immunosorbent Assay. **Analytical Chemistry**, v. 95, n. 10, p. 4753–4759, 14 mar. 2023.

BURBELO, P. D. et al. Sensitivity in Detection of Antibodies to Nucleocapsid and Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 2, p. 206–213, 29 jun. 2020.

CALA, O.; GUILLIÈRE, F.; KRIMM, I. NMR-based analysis of protein-ligand interactions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 4, p. 943–956, fev. 2014.

CHAN, J. F.-W. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 1 jan. 2020.

CHIU, M. L. et al. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. **Antibodies**, v. 8, n. 4, p. 55, 3 dez. 2019.

CLORE, G. M.; IWAHARA, J. Theory, Practice, and Applications of Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Characterization of Transient Low-Population States of Biological Macromolecules and Their Complexes. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 9, p. 4108–4139, 9 set. 2009.

COLINA, S. E. et al. Clinical and molecular aspects of veterinary coronaviruses. **Virus Research**, v. 297, p. 198382, 1 maio 2021.

DAVIDSON, E.; DORANZ, B. J. A high-throughput shotgun mutagenesis approach to mapping B-cell antibody epitopes. **Immunology**, v. 143, n. 1, p. 13–20, set. 2014.

DE-SIMONE, S. G. et al. Epitope Mapping of the Diphtheria Toxin and Development of an ELISA-Specific Diagnostic Assay. **Vaccines**, v. 9, n. 4, p. 313, 26 mar. 2021.

DI MUZIO, M. et al. Hydrogen/deuterium exchange memory NMR reveals structural epitopes involved in IgE cross-reactivity of allergenic lipid transfer proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 51, p. 17398–17410, 18 dez. 2020.

DIAO, B. et al. Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 289.e1-289.e4, fev. 2021.

DINESH, D. C. et al. Structural basis of RNA recognition by the SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 12, p. e1009100, dez. 2020.

- DUMETZ, A. C. et al. Effects of pH on protein–protein interactions and implications for protein phase behavior. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 4, p. 600–610, 1 abr. 2008.
- EMWAS, A.-H. M.; MERZABAN, J. S.; SERRAI, H. Chapter 3 - Theory and Applications of NMR-Based Metabolomics in Human Disease Diagnosis. Em: UR-RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I. (Eds.). **Applications of NMR Spectroscopy**. [s.l.] Bentham Science Publishers, 2015. p. 93–130.
- ENJUANES, L. et al. Nature of viruses and pandemics: Coronaviruses. **Current Research in Immunology**, v. 3, p. 151–158, 2022.
- FARRELL, D. et al. Titration_DB: Storage and analysis of NMR-monitored protein pH titration curves. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 4, p. 843–857, mar. 2010.
- FENG, W.; PAN, L.; ZHANG, M. Combination of NMR spectroscopy and X-ray crystallography offers unique advantages for elucidation of the structural basis of protein complex assembly. **Science China. Life Sciences**, v. 54, n. 2, p. 101–111, fev. 2011.
- FILCHAKOVA, O. et al. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. **Talanta**, v. 244, p. 123409, 1 jul. 2022.
- FURUYAMA, W.; MARZI, A. Ebola Virus: Pathogenesis and Countermeasure Development. **Annual Review of Virology**, v. 6, n. 1, p. 435–458, 2019.
- GAO, T. et al. Identification and functional analysis of the SARS-COV-2 nucleocapsid protein. **BMC Microbiology**, v. 21, p. 58, 22 fev. 2021.
- GÖBL, C. et al. NMR approaches for structural analysis of multidomain proteins and complexes in solution. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 80, p. 26–63, jul. 2014.
- GONÇALVES, B. C. et al. Antiviral therapies: advances and perspectives. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 35, n. 2, p. 305–320, abr. 2021.
- GORDON, D. E. et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, v. 583, n. 7816, p. 459–468, jul. 2020.
- GU, X. et al. Quantitative Paramagnetic NMR-Based Analysis of Protein Orientational Dynamics on Membranes: Dissecting the KRas4B-Membrane Interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 145, n. 18, p. 10295–10303, 10 maio 2023.
- GUO, L. et al. Neutralising antibodies against human metapneumovirus. **The Lancet Microbe**, v. 4, n. 9, p. e732–e744, set. 2023.
- HAJISSA, K. et al. The SARS-CoV-2 Antibodies, Their Diagnostic Utility, and Their Potential for Vaccine Development. **Vaccines**, v. 10, n. 8, p. 1346, 18 ago. 2022.
- HARRIS, L. J. et al. Refined Structure of an Intact IgG2a Monoclonal Antibody : **Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 1581–1597, 1 fev. 1997.
- HELLMAN, L. M.; FRIED, M. G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. **Nature Protocols**, v. 2, n. 8, p. 1849–1861, ago. 2007.

- HEWITT, R. et al. The role of viral infections in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, v. 10, n. 2, p. 158–174, abr. 2016.
- KADAM, S. B. et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 180–202, mar. 2021.
- KAPINGIDZA, A. B.; KOWAL, K.; CHRUSZCZ, M. Antigen–Antibody Complexes. Em: HOEGER, U.; HARRIS, J. R. (Eds.). **Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins**. Subcellular Biochemistry. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 465–497.
- KHAN, M. et al. COVID-19: A Global Challenge with Old History, Epidemiology and Progress So Far. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 39, 23 dez. 2020.
- KIM, S. COVID-19 Drug Development. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 1–5, 28 jan. 2022.
- KING, M. T.; BROOKS, C. L. Epitope Mapping of Antibody-Antigen Interactions with X-ray Crystallography. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1785, p. 13–27, 2018.
- KRAMMER, F. et al. Influenza. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 3, 2018.
- KUMAR, M. et al. Therapeutic antibodies for the prevention and treatment of cancer. **Journal of Biomedical Science**, v. 31, n. 1, p. 6, 12 jan. 2024.
- KUWAJIMA, K. et al. DMSO-Quenched H/D-Exchange 2D NMR Spectroscopy and Its Applications in Protein Science. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3748, 10 jun. 2022.
- KUZMIN, A. et al. Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer. **Proteins**, v. 90, n. 5, p. 1102–1114, maio 2022.
- LENARD, A. J.; MULDER, F. A. A.; MADL, T. Solvent paramagnetic relaxation enhancement as a versatile method for studying structure and dynamics of biomolecular systems. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 132–133, p. 113–139, out. 2022.
- LINEBURG, K. E. et al. CD8⁺ T cells specific for an immunodominant SARS-CoV-2 nucleocapsid epitope cross-react with selective seasonal coronaviruses. **Immunity**, v. 54, n. 5, p. 1055- 1065.e5, 11 maio 2021.
- LOBO, E. D.; HANSEN, R. J.; BALTHASAR, J. P. Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 11, p. 2645–2668, nov. 2004.
- LU, L. L. et al. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. **Nature reviews. Immunology**, v. 18, n. 1, p. 46–61, jan. 2018.
- LU, R.-M. et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, p. 1, 2 jan. 2020.
- LUAN, X. et al. Antiviral drug design based on structural insights into the N-terminal domain and C-terminal domain of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Science Bulletin**, v. 67, n. 22, p. 2327–2335, 30 nov. 2022.

- MAMBELLI, F. et al. Recombinant Bacillus Calmette-Guérin Expressing SARS-CoV-2 Chimeric Protein Protects K18-hACE2 Mice against Viral Challenge. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 210, n. 12, p. 1925–1937, 15 jun. 2023.
- MARION, D. An Introduction to Biological NMR Spectroscopy. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, v. 12, n. 11, p. 3006–3025, nov. 2013.
- MARLEY, J.; LU, M.; BRACKEN, C. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. **Journal of biomolecular NMR**, v. 20, n. 1, p. 71–75, maio 2001.
- MARTINELLO, F. Biossegurança laboratorial na pandemia do SARS-CoV-2. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 52, n. 2, 2020.
- MASSON, G. R. et al. Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments. **Nature Methods**, v. 16, n. 7, p. 595–602, jul. 2019.
- MATYUGINA, E. et al. Nucleoside Analogs That Inhibit SARS-CoV-2 Replication by Blocking Interaction of Virus Polymerase with RNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3361, 8 fev. 2023.
- MCCARTHY, M. K.; DAVENPORT, B. J. J.; MORRISON, T. E. Chronic Chikungunya Virus Disease. Em: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- MENÉNDEZ-ARIAS, L.; DELGADO, R. Update and latest advances in antiretroviral therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 43, n. 1, p. 16–29, jan. 2022.
- MOHAMADIAN, M. et al. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. **The Journal of Gene Medicine**, v. 23, n. 2, p. e3303, fev. 2021.
- MORRIS, G. Epitope Mapping: B -cell Epitopes. Em: JOHN WILEY & SONS, LTD (Ed.). **eLS**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2007.
- 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, p. 587615, 28 out. 2020.
- PAN, K. et al. Immunogenic SARS-CoV2 Epitopes Defined by Mass Spectrometry. **bioRxiv**, p. 2021.07.20.453160, 21 jul. 2021.
- PARKER, R. et al. Mapping the SARS-CoV-2 spike glycoprotein-derived peptidome presented by HLA class II on dendritic cells. **Cell Reports**, v. 35, n. 8, p. 109179, maio 2021.
- PELLECCHIA, M.; SEM, D. S.; WÜTHRICH, K. Nmr in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 3, p. 211–219, mar. 2002.
- POSADO-FERNÁNDEZ, A. et al. Epitope Mapping by NMR of a Novel Anti-A β Antibody (STAB-MAb). **Scientific Reports**, v. 9, p. 12241, 22 ago. 2019.
- RAVERA, E. et al. Characterization of lanthanoid-binding proteins using NMR spectroscopy. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, 2021. v. 651p. 103–137.
- SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The Structural Basis of Antibody-Antigen Recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 302, 8 out. 2013.

- SHARMA, P. et al. Management of Hepatitis C Virus and Hepatitis B Virus Infection in the Setting of Kidney Disease. **Advances in Kidney Disease and Health**, v. 30, n. 4, p. 343–355, jul. 2023.
- SKINNER, S. P. et al. CcpNmr AnalysisAssign: a flexible platform for integrated NMR analysis. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 66, n. 2, p. 111–124, 1 out. 2016.
- SMITH, A. N. et al. Natural Isotopic Abundance ¹³C and ¹⁵N Multidimensional Solid-State NMR Enabled by Dynamic Nuclear Polarization. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, 30 jul. 2019.
- SOFTLEY, C. A. et al. Paramagnetic NMR in drug discovery. **Journal of Biomolecular Nmr**, v. 74, n. 6, p. 287–309, 2020.
- STENMAN, U.-H. Biomarker development, from bench to bedside. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 53, n. 2, p. 69–86, 3 mar. 2016.
- STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are Biomarkers? **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, nov. 2010.
- THEILLET, F.-X. et al. Paramagnetic relaxation enhancement to improve sensitivity of fast NMR methods: application to intrinsically disordered proteins. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 51, n. 4, p. 487–495, dez. 2011.
- TRAINOR, K. et al. Temperature dependence of NMR chemical shifts: Tracking and statistical analysis. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 29, n. 1, p. 306–314, jan. 2020.
- VALENTE, A. P.; MANZANO-RENDEIRO, M. Mapping conformational epitopes by NMR spectroscopy. **Current Opinion in Virology**, v. 49, p. 1–6, ago. 2021.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V. What Is a B-Cell Epitope? Em: SCHUTKOWSKI, M.; REINEKE, U. (Eds.). **Epitope Mapping Protocols: Second Edition**. Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 3–20.
- VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 520, 20 out. 2014.
- WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, n. 1–2, p. 1–60, ago. 2000.
- WILLARD, L. et al. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3316–3319, 1 jul. 2003.
- WILLIAMSON, M. P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 73, p. 1–16, ago. 2013.
- WILLIAMSON, M. P. Chemical Shift Perturbation. Em: WEBB, G. A. (Ed.). **Modern Magnetic Resonance**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 995–1012.
- WU, W. et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. **Virology Journal**, v. 20, n. 1, p. 6, 10 jan. 2023.
- YAMADA, C. A. O. et al. Applications of Mass Spectrometry in the Characterization,

Screening, Diagnosis, and Prognosis of COVID-19. Em: VERANO-BRAGA, T. (Ed.). **Mass Spectrometry-Based Approaches for Treating Human Diseases and Diagnostics**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2024. p. 33–61.

ZENG, W. et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 527, n. 3, p. 618–623, 30 jun. 2020.

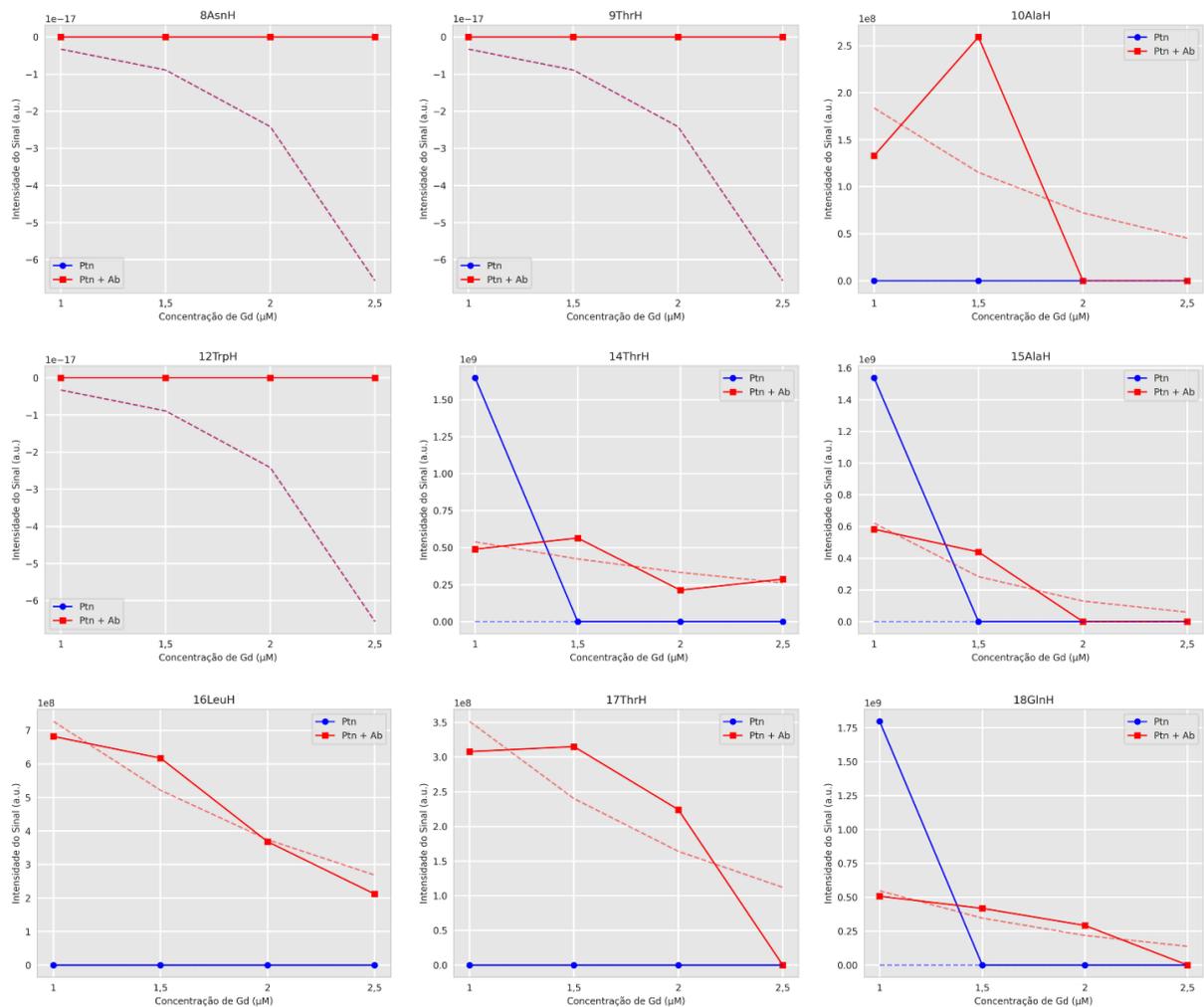
ZHANG, Z. et al. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 4399, 5 ago. 2022.

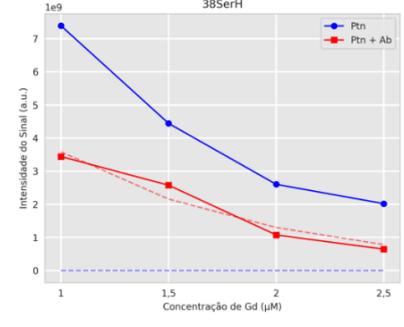
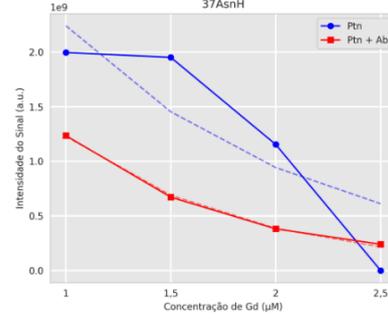
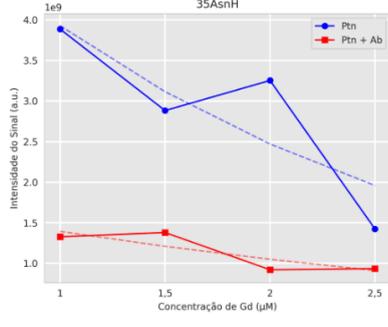
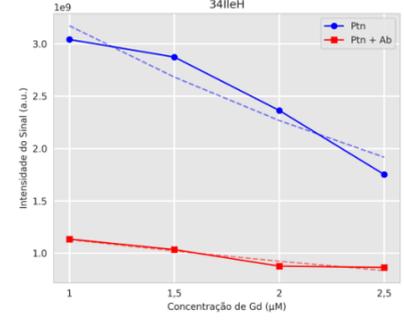
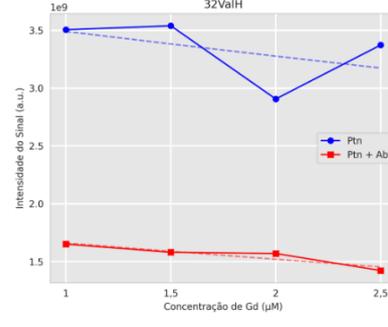
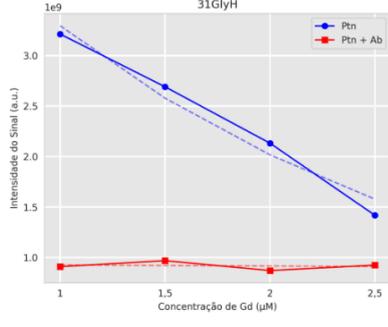
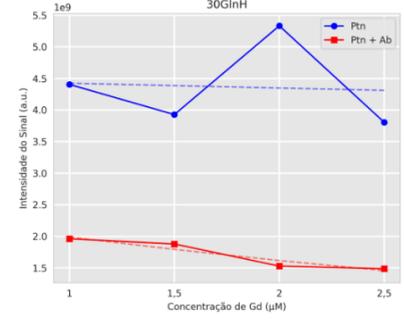
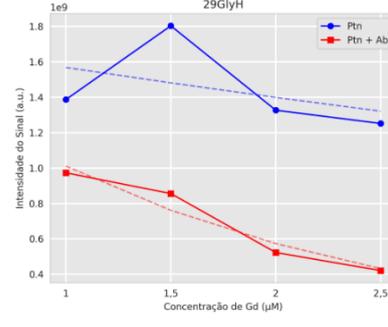
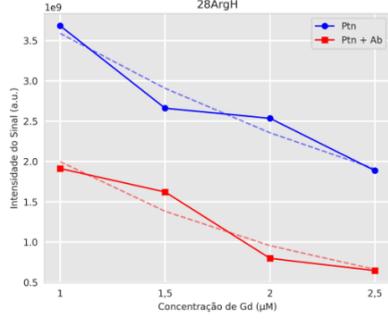
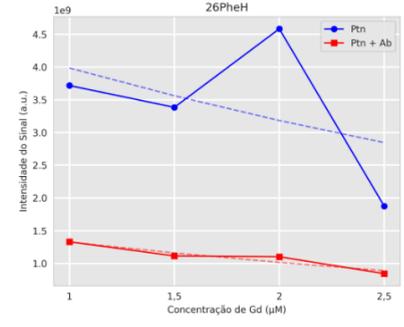
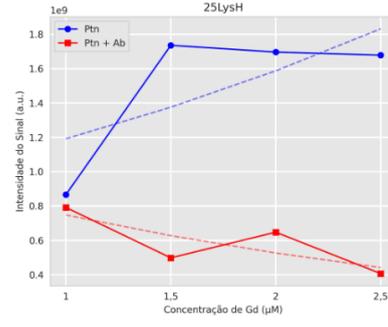
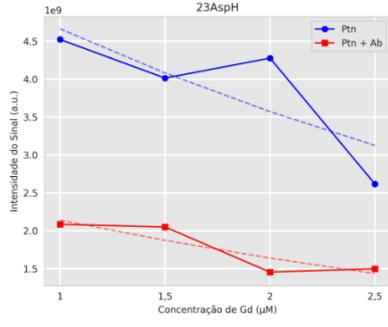
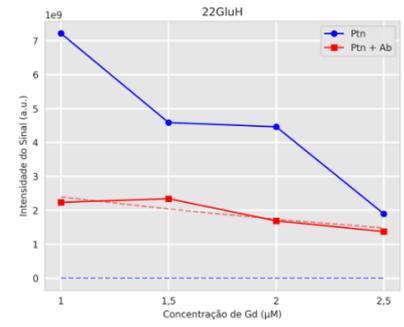
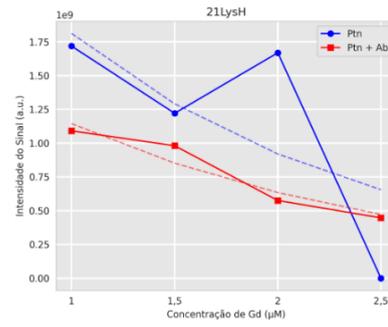
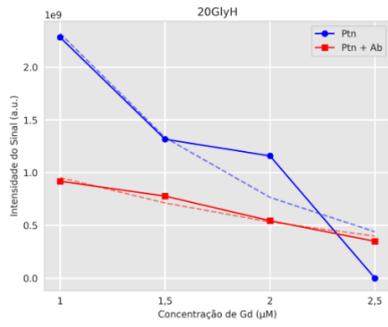
ZHAO, Y.; CHALT, B. T. Protein epitope mapping by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 21, p. 3723–3726, 1 nov. 1994.

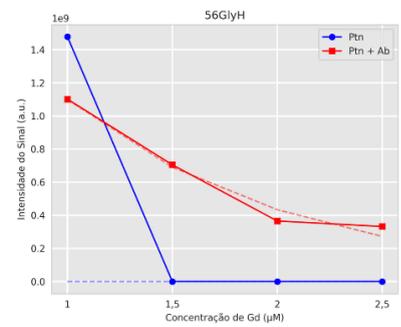
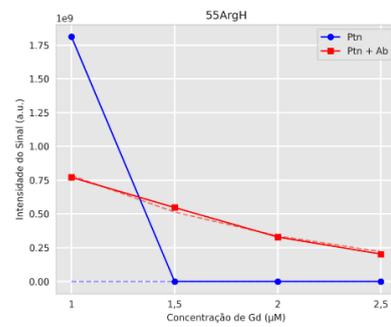
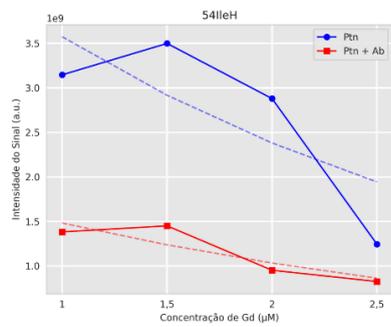
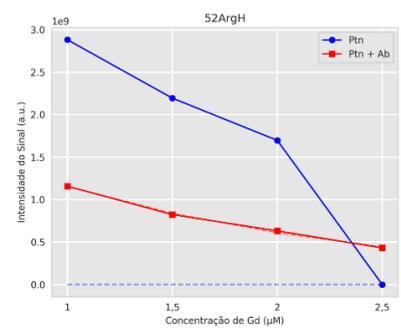
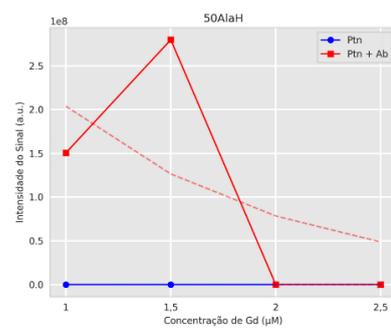
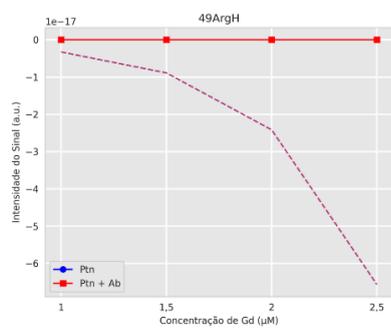
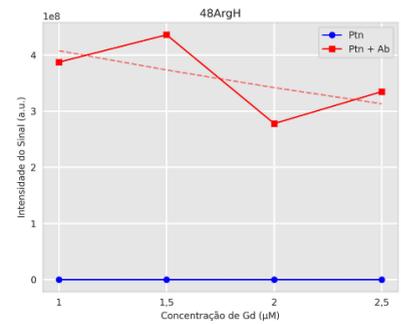
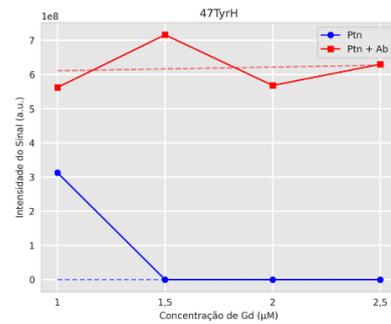
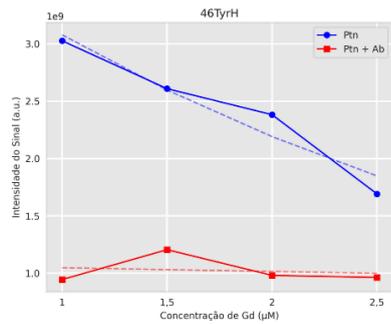
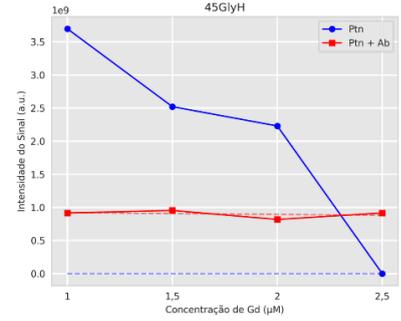
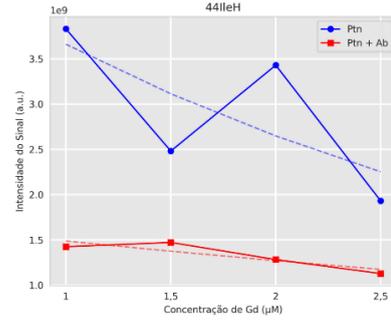
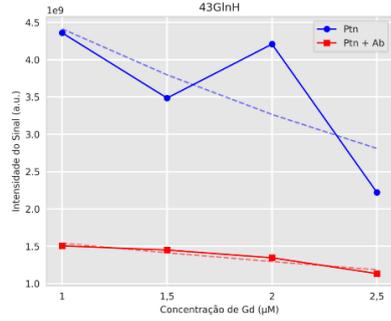
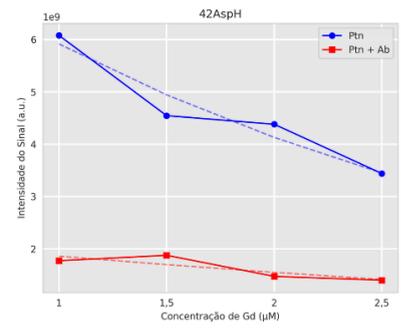
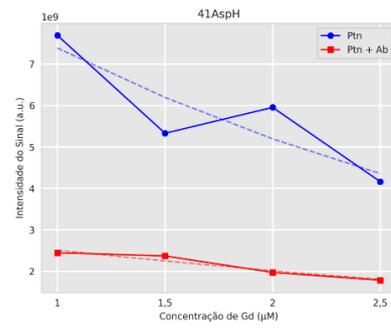
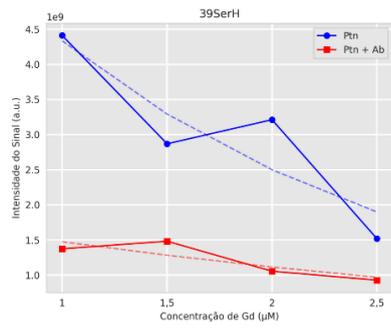
ZHOU, H.-X.; PANG, X. Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation. **Chemical reviews**, v. 118, n. 4, p. 1691–1741, 28 fev. 2018.

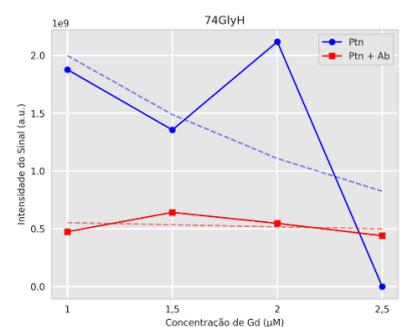
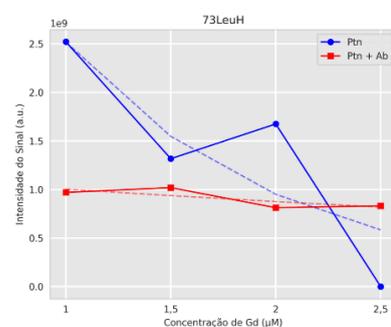
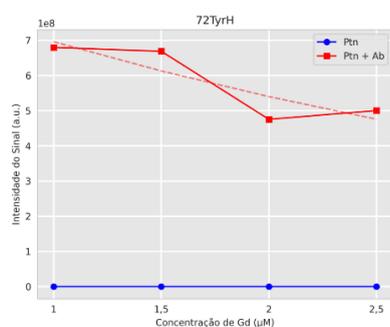
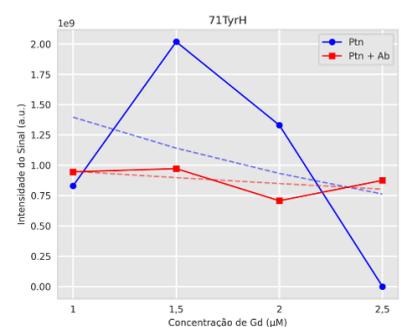
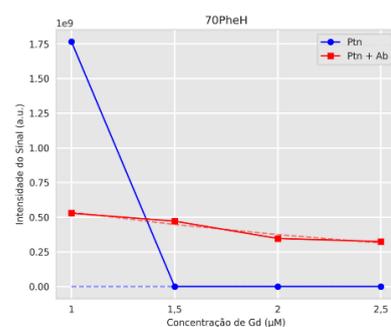
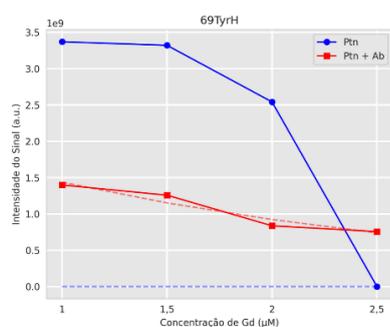
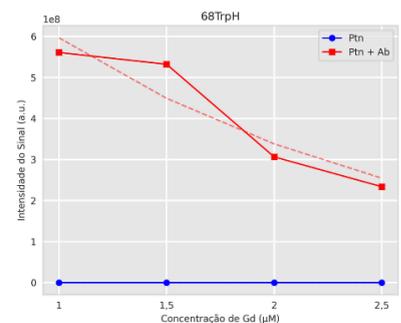
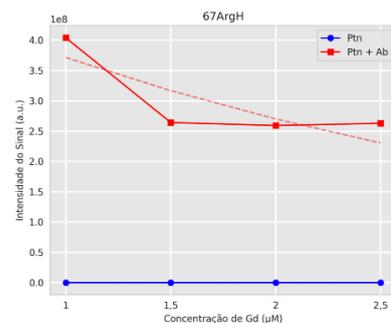
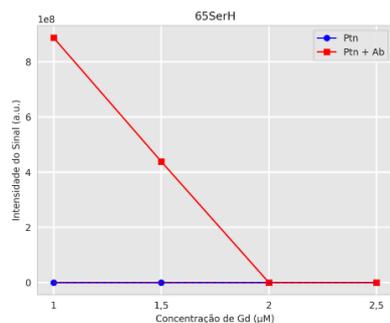
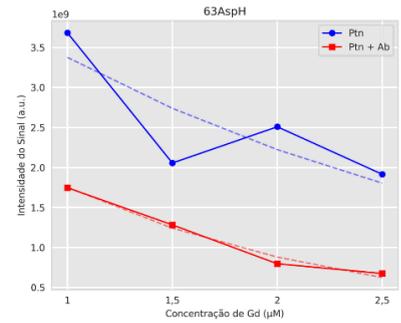
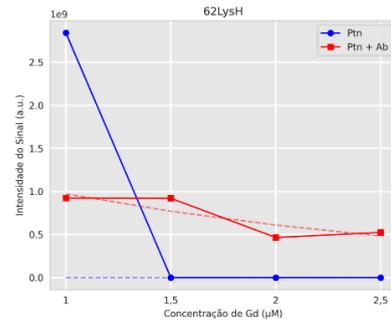
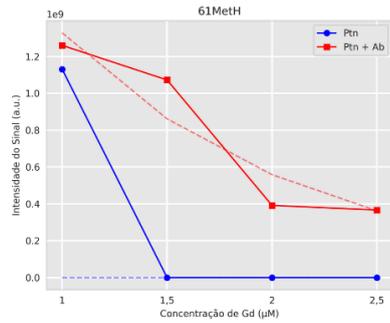
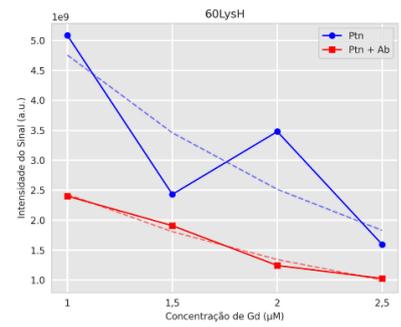
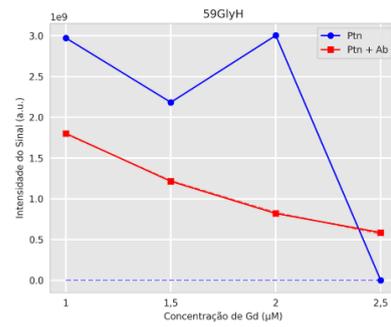
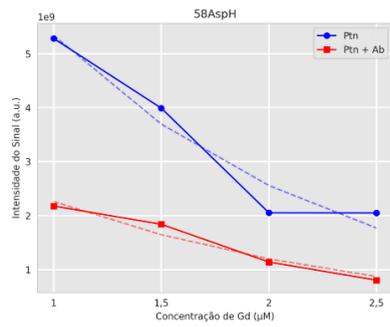
7. APÊNDICES

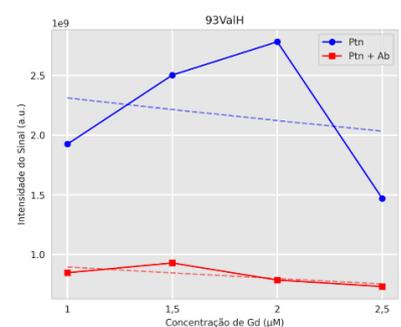
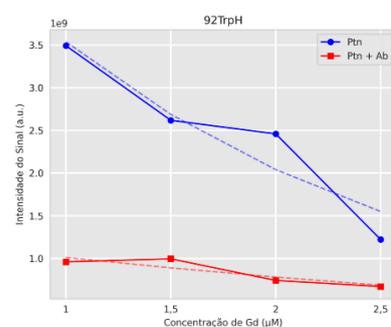
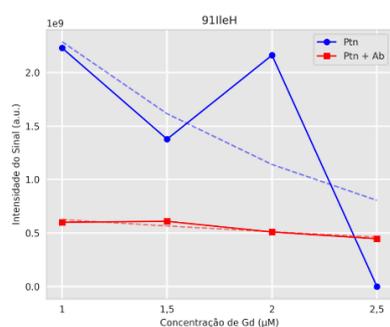
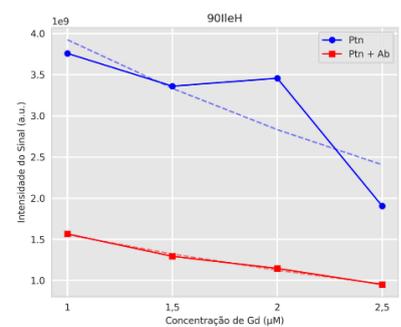
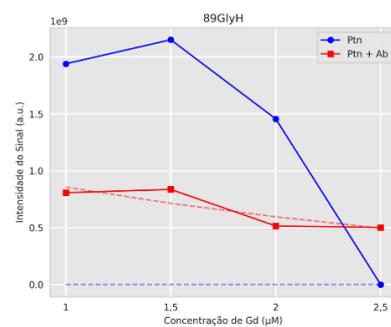
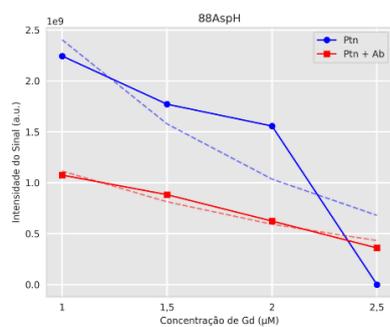
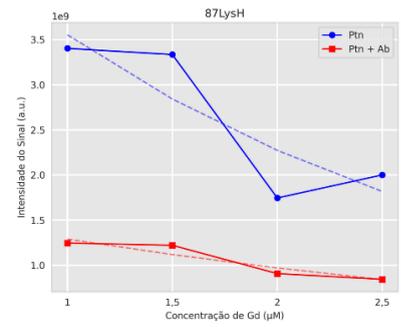
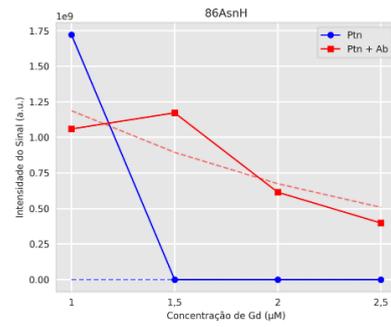
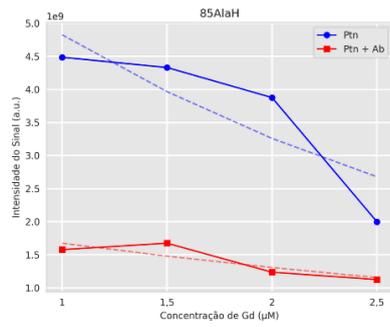
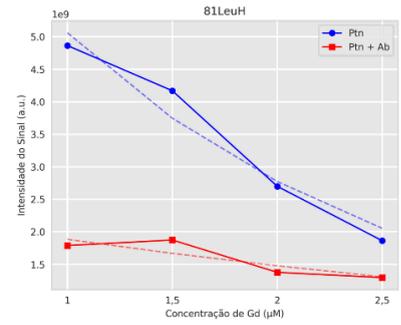
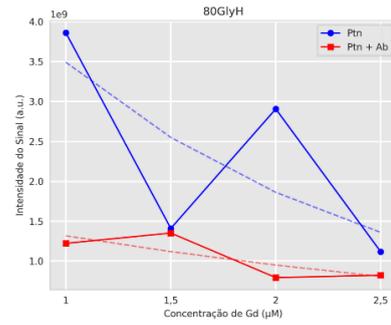
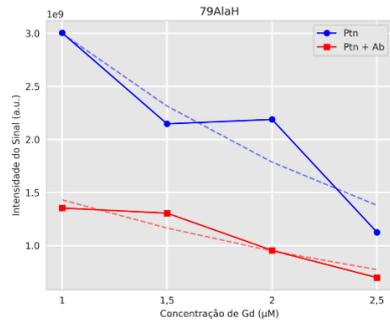
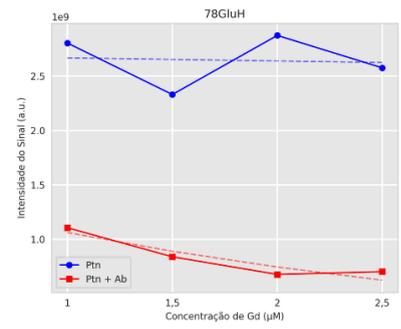
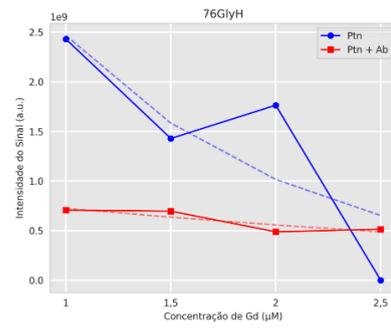
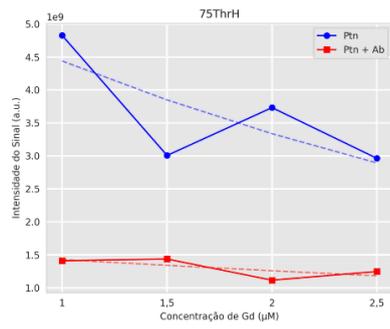
APÊNDICE I - Representações gráficas das intensidades dos sinais dos resíduos pela concentração de gadolínio e suas linhas de tendência. Foram feitos os gráficos das correlações das intensidades dos sinais de cada resíduo pela concentração de gadolínio. As linhas tracejadas representam as linhas de tendência calculadas. Os dados da proteína livre estão representados em azul, enquanto os dados da proteína na presença do anticorpo estão representados em vermelho.

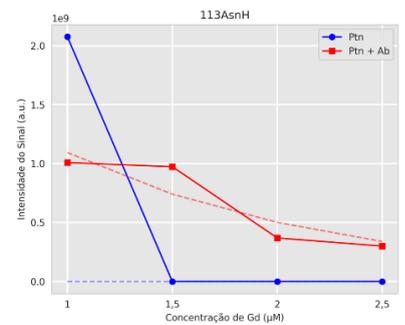
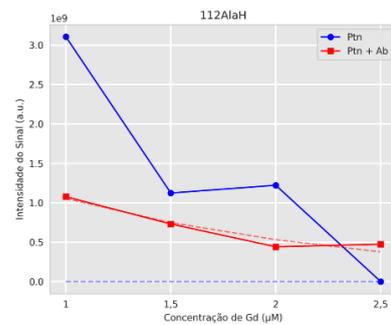
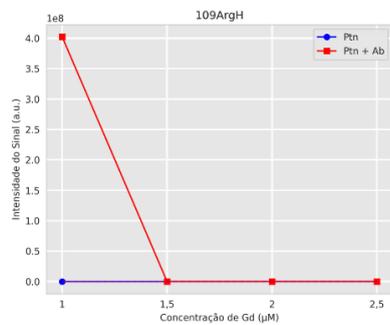
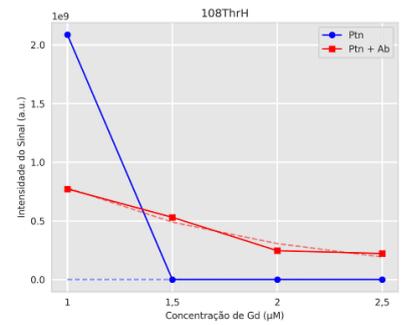
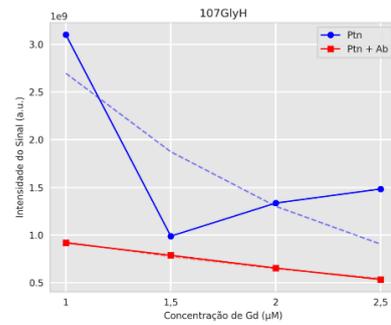
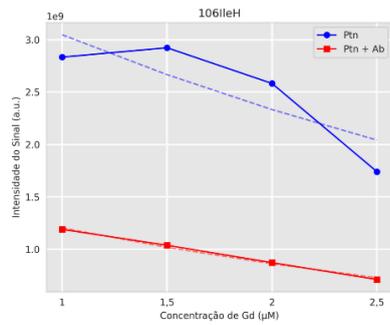
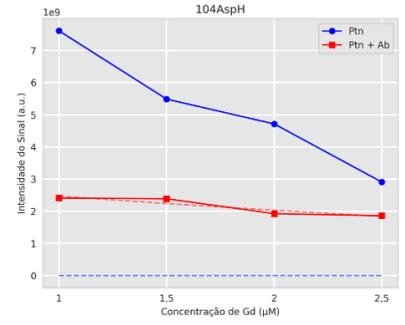
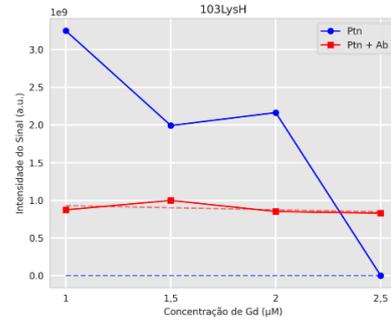
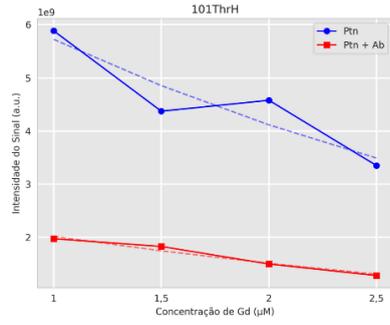
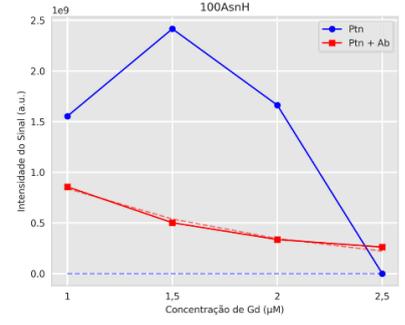
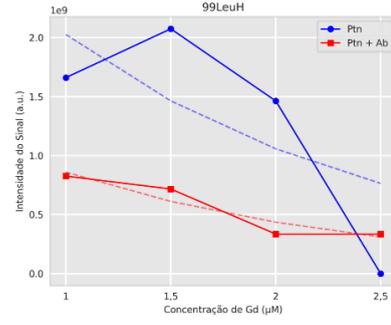
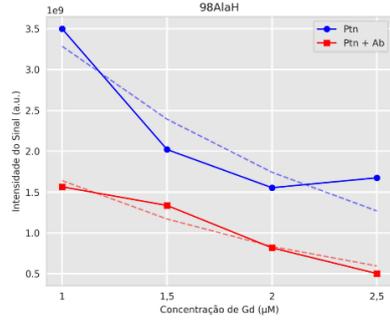
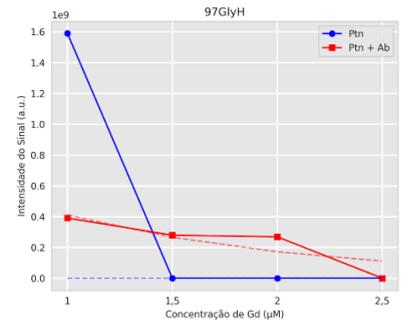
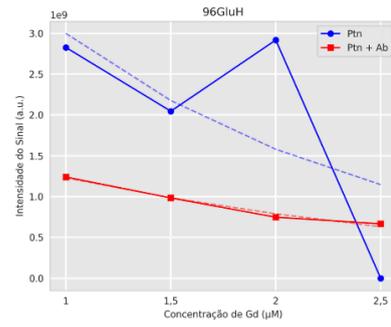
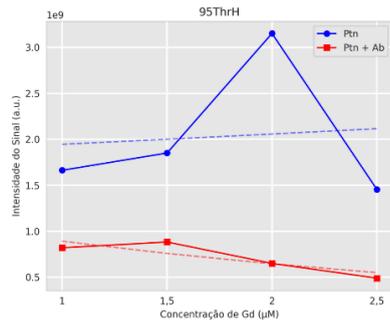


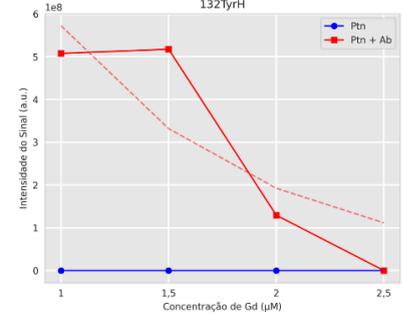
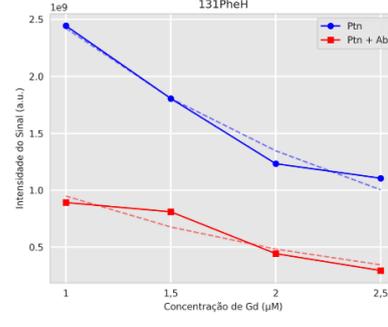
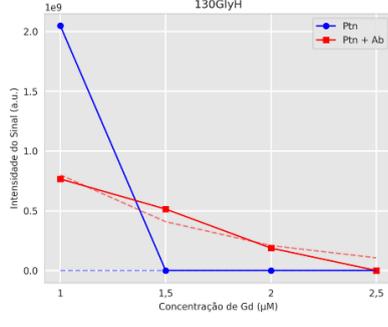
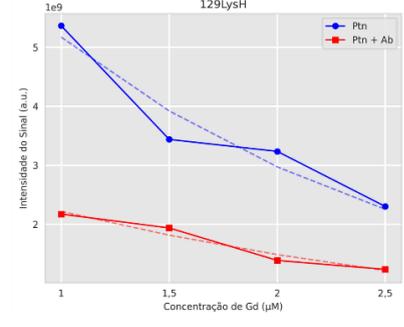
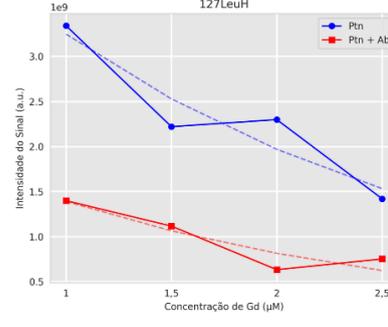
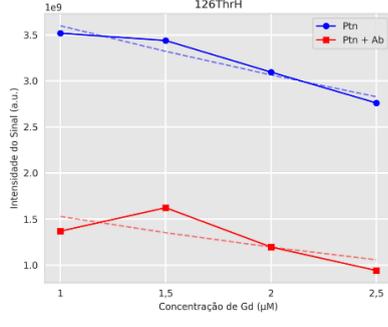
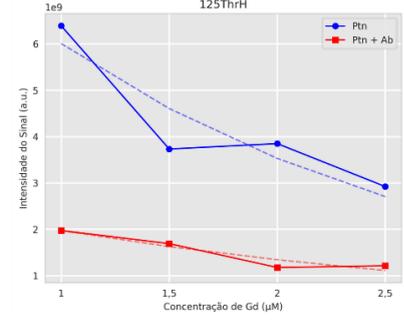
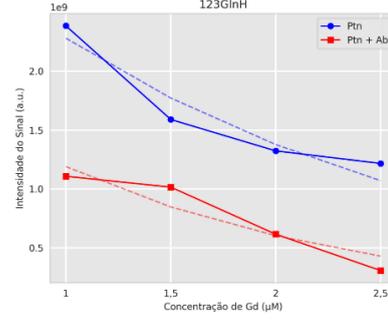
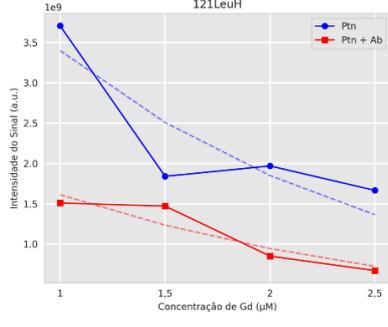
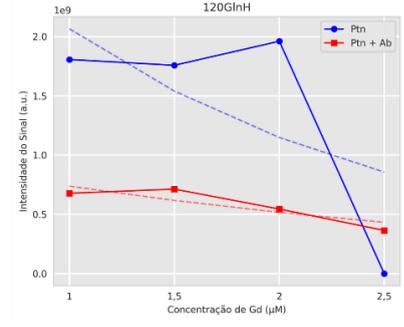
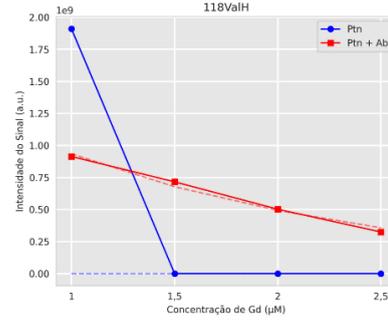
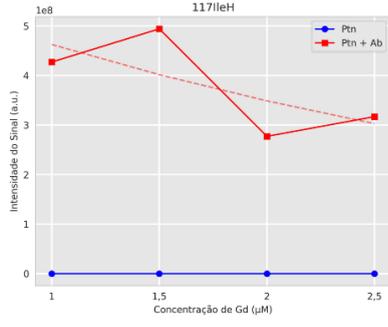
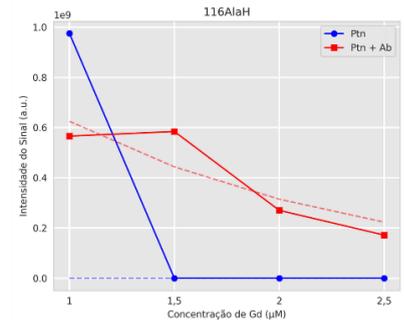
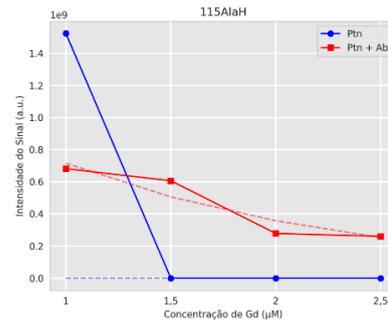
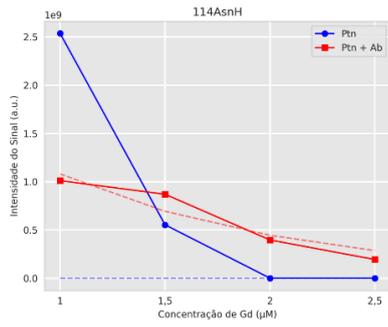


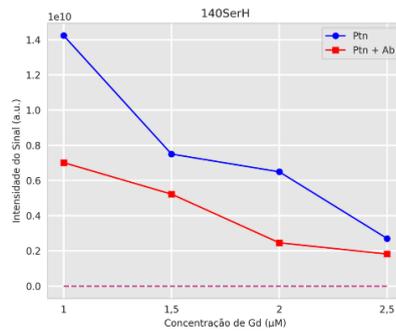
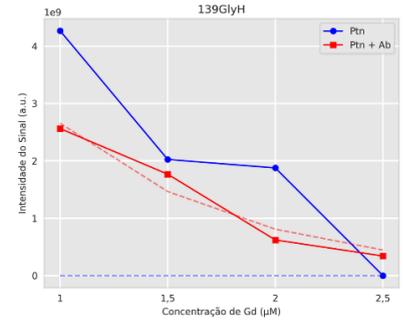
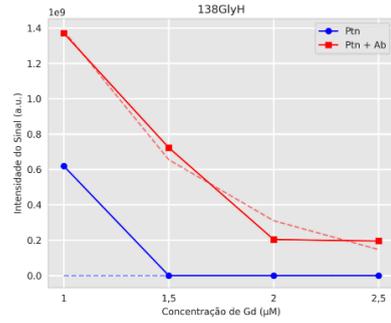
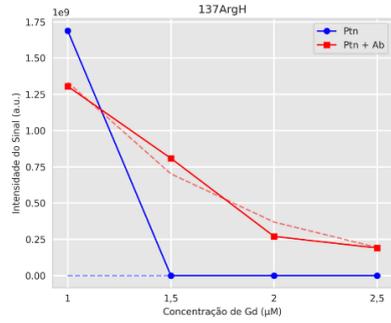
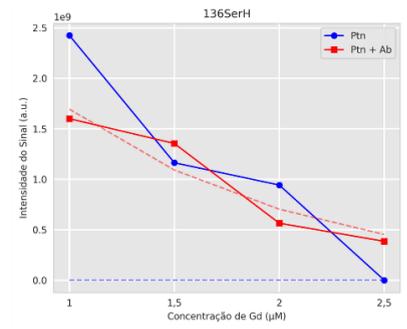
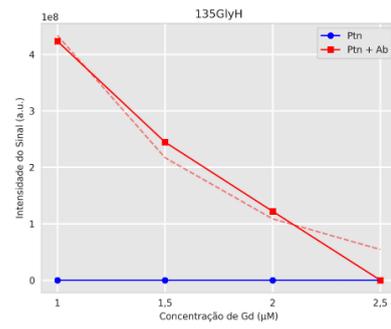
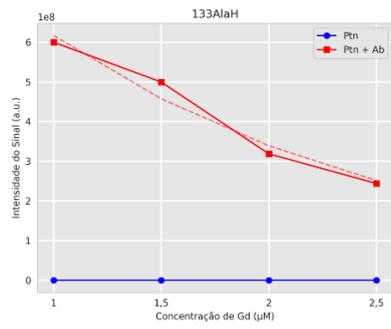












APÊNDICE II - Lista das diferenças na inclinação das linhas de tendência. São mostradas as diferenças, em ordem crescente, entre as linhas de tendência para o decaimento da intensidade do sinal de cada resíduo. Valores negativos indicam uma inclinação menor da linha de tendência dos dados referentes ao complexo proteína-anticorpo, e conseqüentemente, uma taxa de decaimento menor. Os resíduos destacados de vermelho são resíduos em que os sinais se encontram sobrepostos, impossibilitando a utilização dos mesmos nas análises.

Resíduo	Diferença Inclinação						
38SerH	-2.279756606	53ArgH	-1.353721367	37AsnH	-0.1453762519	41AspH	0.06601148008
136SerH	-2.025997338	115AlaH	-1.346820617	63AspH	-0.135642877	34IleH	0.06700346491
139GlyH	-2.006479182	116AlaH	-1.34327001	30GlnH	-0.09493459983	85AlaH	0.07226829861
104AspH	-1.945341481	16LeuH	-1.331916477	123GlnH	-0.08775348673	125ThrH	0.0743676181
22GluH	-1.931364521	118ValH	-1.320138485	140SerH	-0.07455591307	129LysH	0.07659245382
13PheH	-1.819430236	52ArgH	-1.319733292	131PheH	-0.04368440812	75ThrH	0.07968561845
15AlaH	-1.783324126	133AlaH	-1.29983443	126ThrH	-0.04270711502	87LysH	0.08109942031
112AlaH	-1.75432679	68TrpH	-1.284017758	106IleH	-0.03390875328	44IleH	0.08314165951
138GlyH	-1.747752968	86AsnH	-1.283136188	98AlaH	-0.02084362589	42AspH	0.08894203376
135GlyH	-1.692261136	14ThrH	-1.241589905	26PheH	-0.02046463684	35AsnH	0.09028175721
130GlyH	-1.671655154	62LysH	-1.23352471	127LeuH	-0.01711428005	96GluH	0.098222434
137ArgH	-1.642309291	69TyrH	-1.221253334	93ValH	-0.01476499828	88AspH	0.1050516876
132TyrH	-1.544886083	110AsnH	-1.189125897	99LeuH	-0.01464670068	120GlnH	0.1151968902
50AlaH	-1.477698943	134GluH	-1.188588969	32ValH	-0.01262166084	39SerH	0.1353909817
108ThrH	-1.46813623	89GlyH	-1.182183753	109ArgH	-2.25E-09	71TyrH	0.145975266
10AlaH	-1.466554111	70PheH	-1.178725082	8AsnH	0	92TrpH	0.1460252575
56GlyH	-1.464732493	67ArgH	-1.159276506	9ThrH	0	80GlyH	0.1512793704
18GlnH	-1.459812493	117IleH	-1.141290224	12TrpH	0	46TyrH	0.1543142085
100AsnH	-1.443432345	72TyrH	-1.126868183	49ArgH	0	81LeuH	0.1789694522
114AsnH	-1.443270348	48ArgH	-1.087939577	23AspH	9.19E-05	83TyrH	0.1822112904
103LysH	-1.442518644	45GlyH	-1.014822062	90IleH	0.0006546624854	107GlyH	0.1863270717
97GlyH	-1.435396153	94AlaH	-1.008547388	101ThrH	0.02009421972	31GlyH	0.2396334567
61MetH	-1.433049115	47TyrH	-0.9912811665	60LysH	0.02170906696	91IleH	0.2475696742
55ArgH	-1.421996603	25LysH	-0.3188382018	54IleH	0.02233693695	74GlyH	0.2607483028
113AsnH	-1.389669398	29GlyH	-0.226579404	121LeuH	0.03756569692	20GlyH	0.2635857955
59GlyH	-1.384651312	95ThrH	-0.1890920986	21LysH	0.04380010327	76GlyH	0.3116144698
17ThrH	-1.380823499	78GluH	-0.1717936837	58AspH	0.05050564076	7AsnH	0.3761911583
19HisH	-1.378923858	28ArgH	-0.1579752018	79AlaH	0.05350309995	65SerH	0.4023722495
64LeuH	-1.359270758	11SerH	-0.1507946398	43GlnH	0.06286582862	73LeuH	0.4196237122

APÊNDICE III - Lista dos resíduos com os valores de ASA e sua classificação (exposto ou enterrado) de acordo com o VADAR. São mostrados os valores calculados utilizando o VADAR tanto para o modelo da proteína livre (ID PDB:6YI3), quanto ligada ao RNA (ID PDB: 7ACT). Em ordem são apresentados o número dos resíduos, nomenclatura, ASA das cadeias principais, ASA fracional das cadeias principais e classificação.. Resíduos com ASA fracional da cadeia principal superior a 0.5 foram considerados expostos. Estão representados apenas os resíduos classificados como expostos.

Nº	Nome Resíduo	ASA 6YI3	ASA Fracional 6YI3	Classificação	Nº	Nome Resíduo	ASA 7ACT	ASA Fracional 7ACT	Classificação
140	SER	176,1	1,34	Exposto	140	SER	181,5	1,38	Exposto
21	LYS	213,3	1	Exposto	55	ARG	252,4	1,03	Exposto
123	GLN	186,4	0,98	Exposto	58	ASP	160	1,02	Exposto
129	LYS	207,7	0,97	Exposto	96	GLU	190,6	1	Exposto
28	ARG	229,9	0,94	Exposto	123	GLN	185,2	0,98	Exposto
96	GLU	172,2	0,91	Exposto	129	LYS	208,4	0,97	Exposto
137	ARG	219,7	0,9	Exposto	138	GLY	87,7	0,97	Exposto
124	GLY	81	0,89	Exposto	86	ASN	158,5	0,96	Exposto
86	ASN	145,9	0,88	Exposto	80	GLY	83,9	0,92	Exposto
78	GLU	163,4	0,86	Exposto	139	GLY	82,4	0,91	Exposto
88	ASP	134,2	0,85	Exposto	36	THR	136,7	0,9	Exposto
139	GLY	76,9	0,85	Exposto	63	ASP	141,6	0,9	Exposto
55	ARG	198,2	0,81	Exposto	21	LYS	185,4	0,87	Exposto
112	ALA	99,5	0,81	Exposto	115	ALA	103,4	0,84	Exposto
138	GLY	73,9	0,81	Exposto	37	ASN	132,4	0,8	Exposto
57	GLY	72,5	0,8	Exposto	112	ALA	98,2	0,8	Exposto
80	GLY	71,6	0,79	Exposto	136	SER	102,1	0,78	Exposto
126	THR	113,7	0,75	Exposto	28	ARG	189,2	0,78	Exposto
77	PRO	113,3	0,73	Exposto	60	LYS	159,3	0,74	Exposto
115	ALA	89,9	0,73	Exposto	57	GLY	64,3	0,71	Exposto
19	HIS	146	0,72	Exposto	114	ASN	116,6	0,7	Exposto
58	ASP	112,5	0,72	Exposto	137	ARG	169,9	0,7	Exposto

113	ASN	119,8	0,72	Exposto	40	PRO	107,3	0,69	Exposto
22	GLU	134,1	0,71	Exposto	126	THR	104,4	0,69	Exposto
40	PRO	109,4	0,71	Exposto	100	ASN	114,9	0,69	Exposto
52	ARG	172	0,71	Exposto	113	ASN	113,7	0,69	Exposto
108	THR	106,3	0,7	Exposto	56	GLY	61,9	0,68	Exposto
36	THR	101,2	0,67	Exposto	88	ASP	105,5	0,67	Exposto
100	ASN	108,2	0,65	Exposto	82	PRO	101,7	0,66	Exposto
135	GLY	58,1	0,64	Exposto	19	HIS	128,2	0,63	Exposto
20	GLY	56	0,62	Exposto	104	ASP	98,1	0,62	Exposto
25	LYS	133,7	0,62	Exposto	105	HIS	124,9	0,61	Exposto
82	PRO	94,7	0,61	Exposto	64	LEU	127	0,61	Exposto
97	GLY	55,2	0,61	Exposto	22	GLU	114,5	0,6	Exposto
60	LYS	127,7	0,6	Exposto	53	ARG	143,4	0,59	Exposto
102	PRO	91,7	0,59	Exposto	62	LYS	123,8	0,58	Exposto
27	PRO	90,2	0,58	Exposto	102	PRO	87,9	0,57	Exposto
62	LYS	124,9	0,58	Exposto	116	ALA	69,2	0,56	Exposto
84	GLY	51,9	0,57	Exposto	27	PRO	84,5	0,55	Exposto
105	HIS	116,2	0,57	Exposto	25	LYS	117,8	0,55	Exposto
8	ASN	91,9	0,56	Exposto	109	ARG	132,2	0,54	Exposto
59	GLY	50,6	0,56	Exposto	97	GLY	48,6	0,53	Exposto
99	LEU	109,8	0,53	Exposto	20	GLY	48,3	0,53	Exposto
53	ARG	126	0,52	Exposto	10	ALA	64,6	0,52	Exposto
63	ASP	81,8	0,52	Exposto	30	GLN	98,2	0,52	Exposto
132	TYR	125,2	0,52	Exposto	52	ARG	126,3	0,52	Exposto
					61	MET	113,9	0,52	Exposto
					135	GLY	45,9	0,51	Exposto
					125	THR	77,2	0,51	Exposto
					110	ASN	85,1	0,51	Exposto
					132	TYR	123,8	0,51	Exposto
					134	GLU	97,1	0,51	Exposto
					34	ILE	98,4	0,5	Exposto
					87	LYS	107,1	0,5	Exposto

APÊNDICE IV - Comparação dos resíduos encontrados nas diferentes análises realizadas e no trabalho de Dinesh e colaboradores (2020). São apresentados os resíduos que apresentaram um CSP maior que $1,5 \sigma$ e um CSP entre $0,5 \sigma$ e $1,5 \sigma$ no experimento de interação proteína-anticorpo, uma diminuição da taxa de decaimento da intensidade no experimento de relaxação paramagnética, que foram classificados como expostos pelo VADAR e que foram descritos por apresentarem CSP significativo quando a proteína se liga ao RNA, respectivamente.

CSP 1.5 ptn-ab	CSP 0.5 ptn-ab	Gadolínio	VADAR 6YI3	Dinesh e colaboradores (2020)
8Asn	17Thr	15Ala	19His	16Leu
9Thr	19His	16Leu	20Gly	20Gly
10Ala	38Ser	17Thr	21Lys	21Lys
12Trp	46Tyr	18Gln	22Glu	25Lys
16Leu	63Asp	19His	25Lys	26Phe
25Lys	64Leu	22Glu	27Pro	50Ala
115Ala	72Tyr	38Ser	28Arg	53Ag
126Thr	76Gly	50Ala	36Thr	54Ile
	80Gly	52Arg	40Pro	55Arg
	89Gly	53Arg	52Arg	62Lys
	97Gly	55Arg	53Ag	63Asp
	109Arg	56Gly	55Arg	64Leu
	133Ala	59Gly	57Gly	125Thr
		61Met	58Asp	126Thr
		64Leu	59Gly	135Gly
		97Gly	60Lys	137Arg
		100Asn	62Lys	
		103Lys	63Asp	
		104Asp	77Pro	
		108Thr	78Glu	
		10Ala	80Gly	
		112Ala	82Pro	
		113Asn	84Gly	
		114Asn	86Asn	
		115Ala	88Asp	
		116Ala	8Asn	
		118Val	96Glu	

		130Gly	97Gly	
		132Tyr	99Leu	
		135Gly	100Asn	
		136Ser	102Pro	
		137Arg	105His	
		138Gly	108Thr	
		139Gly	112Ala	
			113Asn	
			115Ala	
			123Gln	
			124Gly	
			126Thr	
			129Lys	
			132Tyr	
			135Gly	
			137Arg	
			138Gly	
			139Gly	
			140Ser	

ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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:

Versão: 1

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: 3.950.637

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma coorte prospectiva, único centro, realizado no HC-UFMG, localizado na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Coleta de material biológico: será coletado amostra de sangue (volume total de 25 ml), dividida da seguinte forma: tubo seco para soro (10 ml), tubo com adição de citrato (5 ml) e tubo com heparina (10 ml), à admissão e nos dias 3 e 7 de seguimento. O material será separado em alíquotas e armazenado em freezer a -80o do Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina da UFMG (freezer Grupo NIIMI) para posterior análise. Em pacientes intubados, coletaremos também aspirado bronco-alveolar em sistema fechado no dia da intubação e nos dias 3 e 7 de seguimento, ou no dia da extubação.

Hipótese: As características dos pacientes com infecção por coronavírus diferem nos pacientes com outras infecções conhecidas. No grupo de pacientes normalmente atendidos no HC-UFMG, devido às suas doenças de base como doenças hematológicas, transplantados (fígado, rins, medula óssea), a COVID 19 terá comportamento diferente. A resposta inflamatória poderá ter associação com a gravidade, como desfechos relacionados à mortalidade, tempo de internação, tempo de ventilação mecânica entre outros.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O objetivo deste estudo é avaliar as características clínicas, laboratoriais e de imagem (incluindo dados de ultrassonografia, radiografia e tomografia de tórax), investigando a

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 3.950.637

associação entre essas variáveis, em pacientes adultos internados com suspeita ou confirmação de COVID 19 no Hospital das Clínicas da UFMG durante a duração da epidemia.

Objetivo Secundário: Descrever em pacientes admitidos em enfermaria e CTI as seguintes variáveis:• Casuística: idade, sexo, presença de comorbidades (diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica (12), doença pulmonar obstrutiva crônica [DPOC], neoplasias sólidas, neoplasias hematológicas, doenças auto-imunes e inflamatórias), escores de gravidade clínica à admissão tais como SAPS-3 (21), SOFA (22) e APACHE-II (23).• Características radiográficas encontradas. • Características ultrassonográficas: utilização de protocolo pulmonar previamente utilizado em estudos realizados na instituição (24) Figuras 1 e 2. • Comparar os achados ultrassonográficas com as radiográficas • Comparar os achados ultrassonográficas com os níveis de marcadores inflamatórios séricos • Comparar os

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No TCLE, TCLE_COVID_HC_UFMG, informa: "A participação em qualquer projeto de pesquisa possui riscos, mas garantimos que nosso interesse principal o restabelecimento completa da sua saúde. Os exames e coletas adicionais propostos nesse projeto são de baixo risco e não irão interferir na capacidade do seu corpo em combater o vírus. Por exemplo, o ultrassom é uma ferramenta que não traz nenhum prejuízo para o paciente, já que não é invasivo e não emite radiação, à diferença de outros métodos de imagem. O exame será realizado em menos de 15 minutos sem necessidade de transporte. Da mesma, a pesquisa realizará procedimentos simples de coleta de sangue na veia do braço do Sr./ da Sra. por 5 dias (5 ml de sangue por dia), juntamente com a coleta de sangue da manhã e de 15 ml nos dias 0 (hoje), 3 e 7. A coleta de sangue pode causar hematoma no local, mas vamos utilizar a mesma punção que será utilizada para exames de rotina. Caso você precise de CTI, além das coletas de sangue, vamos também coletar aspirado do seu pulmão para avaliar como o sistema imunológico está combatendo o vírus direto no pulmão. O aspirado pulmonar é um procedimento de rotina em pacientes com suporte ventilatório em CTI e não será realizado apenas para o propósito dessa pesquisa, apenas vamos guardar o aspirado feito rotineiramente e estudá-lo. Você tem o direito de retirar a autorização (ou consentimento) para essa pesquisa a qualquer momento sem sofrer nenhuma alteração no seu atendimento ou tratamento nesse hospital, basta comunicar a equipe da pesquisa. Você não irá se beneficiar diretamente ao participar desse estudo, mas contribuirá para que o COVID-19 seja melhor entendido ajudando a equipe da pesquisa a desenvolver novos exames e estratégias para lidar com essa doença. O (A) Sr (a) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.950.637

receberá remuneração por sua participação. No caso de algum dano, nossa equipe assumirá toda responsabilidade e ressarcimentos cabíveis. Caso receba alta, a coleta não será mais necessária para a pesquisa e sua participação será encerrada. Gostaríamos ainda de informar que os pesquisadores assumem o dever de dar assistência aos participantes da pesquisa para problemas relacionados aos procedimentos citados acima ou mesmo para quaisquer outros problemas da saúde apresentados durante a pesquisa. Os registros (informações dos pacientes) serão mantidos de forma confidencial com códigos de identificação de acesso limitado e o nome do paciente não será mencionado em nenhum momento."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Protocolo com tramitação prioritária por se tratar de pesquisa relacionada com o covid-19.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No TCLE, TCLE_COVID_HC_UFGM, informa: "Como todos têm acompanhado, em dezembro de 2019 houve infecção de um grupo de pessoas na China causado por um novo tipo de coronavírus, o SARS-CoV-2 ou causador do COVID-19). Aproximadamente em 5% dos casos, a infecção respiratória se torna grave, com necessidade de internação em terapia intensiva e necessidade de algum tipo de suporte ventilatório e a mortalidade até o momento foi de 3,7% acometendo principalmente pacientes idosos com outras doenças. Precisamos entender como esse vírus adoece a população brasileira para melhorar o atendimento. Para isso, pretendemos investigar como os pacientes com coronavirus estão adoecendo, quais implicações na sua saúde e nos seus exames e como o sistema imunológico está combatendo a infecção. Se você aceitar participar, iremos coletar amostras de sangue e, caso você precise de ajuda de um aparelho para respirar, vamos coletar amostras aspiradas do seu pulmão também. Iremos fazer vários exames para entender as alterações do seu corpo diante da infecção e vamos fazer exames de ultrassom e analisar os dados clínicos da sua papeleta."

Foja de rosto sem assinatura da instituição proponente.

Recomendações:

Recomenda-se retirar do texto que introduz o TCLE a parte que cita a China, para evitar estigmatização. Recomenda-se melhorar a descrição dos riscos. Recomenda-se inserir a declaração da Gerência de Ensino e Pesquisa do HC-UFGM/Ebserh. Recomenda-se inserir o parecer consubstanciado da Câmara Departamental. Recomenda-se inserir o Termo de Constituição de Biorrepositório, conforme a Resolução CNS 441/2011.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.950.637

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprova-se para a avaliação da CONEP, conforme orientação na Plataforma Brasil.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1531497.pdf	31/03/2020 17:52:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa_emergencial_COVID_300320.pdf	31/03/2020 17:44:07	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_COVID_HC_UFMG.pdf	31/03/2020 17:34:21	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_COVID.pdf	31/03/2020 17:21:41	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

BELO HORIZONTE, 02 de Abril de 2020

Assinado por:
Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Anexo B - Meio de cultura rico para *E.coli*Meio de cultura Luria Bertani (LB)

Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
Cloreto de sódio	1% (p/v)
Triptona	1 % (p/v)
Água bidestilada	q.s.p. volume desejado

O meio foi autoclavado para esterilização.

Anexo C - Meio de cultura mínimo para *E.coli*Meio de cultura mínimo M9

Meio M9 10X pH 7,5	10 % (v/v)
Sulfato de Magnésio	1 mM
Cloreto de cálcio	100 μ M
Vitamina BME	
Glicose	3 % (p/v)
Cloreto de amônio	1 % (p/v)
Água Milli-Q estéril	q.s.p. volume desejado

O meio M9 10X foi preparado contendo fosfato de sódio bibásico 420 mM, fosfato de potássio monobásico 220 mM e cloreto de sódio 86 mM; sendo filtrado em membranas 0,2 μ m. As soluções de sulfato de magnésio e cloreto de cálcio também foram previamente filtradas em membranas 0,2 μ m.

Anexo D - Tampões para a purificação de proteínasTampão de corrida fosfato pH 8.0

Na ₂ HPO ₄	2.65 mM
NaH ₂ PO ₄	47.35 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	20 mM
Água Milli-Q estéril	q.s.p. volume desejado

Tampão de eluição fosfato pH 8.0

Na ₂ HPO ₄	2.65 mM
NaH ₂ PO ₄	47.35 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM
Água Milli-Q estéril	q.s.p. volume desejado

Tampão de corrida fosfato pH 6.5

Na ₂ HPO ₄	7.2 mM
NaH ₂ PO ₄	12.8 mM
NaCl	50 mM
Água Milli-Q estéril	q.s.p. volume desejado

Anexo E – SDS-PAGE 15%Gel de poliacrilamida para corrida

Tris-HCl pH 8.8	1.5 M
SDS	10% (p/v)
Bisacrilamida	30% (p/v)

Persulfato de amônio (APS)	10% (p/v)
TEMED	
Água Milli-Q estéril	q.s.p. volume desejado

Os reagentes foram solubilizados em água milli-Q e aplicados em suporte para polimerização.

Gel de poliacrilamida concentrador

Tris-HCl pH 6.8	1 M
SDS	10% (p/v)
Bisacrilamida	30% (p/v)
Persulfato de amônio	10% (p/v)
TEMED	
Água Milli-Q estéril	q.s.p. volume desejado

Os reagentes foram solubilizados em água milli-Q e aplicados em suporte para polimerização.