PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE PROTEÔMICA EM AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES COM COVID-19 INTERNADOS NO HOSPITAL REGIONAL UNIVERSITÁRIO DE MARINGÁ

Vitória Belucci Frachinconi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Déborah de Castro Moreira (coorientadora), Dennis Armando Bertolini (Orientador). E-mail: dabertolini@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Virologia

Palavras-chave: Proteômica; SARS-CoV-2; Proteína.

RESUMO

O SARS-CoV-2 é um vírus que possui 4 proteínas estruturais principais: a espícula (S), envelope (E), proteína de membrana (M) e nucleocapsídeo (N) que são necessárias para formação da partícula viral. A COVID-19 é uma doença infecciosa cujos sintomas mais comuns são: febre, cansaço e tosse seca. Sendo assim, a pandemia causada por esse vírus enfatizou a necessidade de tecnologias que acelerem a compreensão de doenças emergentes, pois ainda há muitos questionamentos em relação à dinâmica e patogenia da COVID-19. O objetivo desse projeto foi padronizar uma metodologia de análise proteômica, por espectrometria de massa, em plasma de pacientes com diferentes evoluções clínicas (desde sintomas leves a casos graves), internados no Hospital Universitário Regional de Maringá. Foi realizado a padronização, a depleção de proteínas de alto peso molecular e a quantificação de proteínas. Desse modo, foi possível encontrar as proteínas do complemento (C3, CBF e C4), de mediadores inflamatórios (SAA1, SAA2 e PCR) e relacionados à resposta imune (AHSG) em quantidades significativas nos pacientes graves, as quais podem servir, de acordo com a literatura, como biomarcadores da progressão do SARS-CoV-2. Portanto, a partir dessa pesquisa, foi possível padronizar a extração de proteínas para análise proteômica em amostras de plasma de pacientes com diferentes evoluções clínicas da COVID-19.

INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 é um beta coronavírus, da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e subfamília *Orthocoronaviridae* (ASHOUR *et al.*, 2020).
A pandemia de SARS-CoV-2 destacou a necessidade de tecnologias que possam acelerar nossa compreensão de doenças (MESSNER *et al.*, 2020). A proteômica baseada em espectrometria de massa (ES) não depende de reagentes de afinidade e pode ser feita de forma não direcionada, de modo que não dependa do conhecimento prévio da doença. Essa tecnologia pode fornecer rapidamente quantidades substanciais de informações clínicas e biológicas a partir de vários tipos

de materiais biológicos, incluindo plasma sanguíneo ou soro. Com isso, a proteômica baseada em ES tem o potencial de se tornar uma tecnologia ideal para ser aplicada em situações em que são necessárias respostas rápidas (MESSNER *et al.*, 2020).

Dessa forma, a comparação do perfil proteico de amostras de pacientes com evoluções clínicas diferentes (desde assintomáticos a casos graves e óbitos) associadas a parâmetros como avaliação de citocinas e marcadores da coagulação pode contribuir para um melhor entendimento da fisiopatologia da doença.

Neste projeto, nosso objetivo foi realizar a padronização de uma metodologia de análise proteômica, por espectrometria de massa, em plasma de pacientes com COVID-19internados no Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM).

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras analisadas foram coletadas de pacientes internados na clínica médica e UTI da ala COVID-19 do HURM, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os dados pessoais dos pacientes foram requeridos juntamente com o acesso ao prontuário desses no GSUS.

As amostras foram centrifugadas e submetidas à depleção de albumina e imunoglobulinas, que juntas representam cerca de 70% das proteínas séricas (Thermo Scientific™ High-Select™ HSA/Immunoglobulin Depletion Resin).

A quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford com uma curva padrão da albumina e as amostras foram quantificadas em duplicata.

Em seguida, 1000 µg de proteínas foram digeridas de acordo com o protocolo do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). Primeiramente, as amostras foram diluídas em uréia a 8 M e reduzidas com ditiotreitol (DTT) a 5 mM, por 25 minutos a 56ºC. Posteriormente, foi realizado a alquilação proteica pela adição de iodoacetamida a 14 mM, protegida da luz à temperatura ambiente, seguida da adição de DTT (5 mM), por 15 minutos nas mesmas condições. Finalmente, adicionou-se cloreto de cálcio a 1 Mm e dois microgramas de tripsina (Promega, EUA), e incubou-se a 37ºC, por 16 horas. No dia seguinte, a atividade enzimática foi interrompida pela adição de ácido trifluoracético (TFA) a 0,4% e as amostras foram centrifugadas. A etapa subsequente consistiu na dessalinização das amostras, utilizando para isso colunas SepPak C18. A princípio, seguíamos o protocolo estabelecido pelo LNBio, entretanto, realizamos uma adaptação nesta etapa, na tentativa de evitar uma possível diluição das amostras, que poderia ser a causa de uma baixa recuperação peptídica no espectrômetro de massas. Desta forma, ao invés de utilizarmos acetonitrila nas proporções 50/50 e 80/20, utilizamos ela pura. Outra modificação proposta com o mesmo intuito foi na secagem das amostras. Substituímos a liofilização, pela secagem em nitrogênio líquido com a adição de água.

A identificação dos peptídeos foi realizada por cromatografia líquida de ultra alto desempenho Nexera X2™ (Shimatzu, Japão), acoplada ao espectrômetro de massas Impact II (Bruker, Alemanha). A separação cromatográfica dos peptídeos foi realizada com gradiente acetonitrila (gradiente A contendo água purificada e 0,1%

de ácido fórmico (v/v) e B contendo acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (v/v)). As amostras foram conduzidas no fluxo com tensão capilar operando em modo de ionização positiva. Os dados foram coletados em razão massa/carga (m/z) 150-2200 com uma taxa de aquisição de 5 espectros por segundo, e os íons de interesse foram selecionados por auto fragmentação MS/MS.
A análise dos dados e a identificação proteica estavam sendo realizadas no Max Quant, entretanto, foi feita uma mudança e essas passaram a serem analisadas no software PatterLab, utilizando-se o banco de dados Swiss Prot. Com isso, foi utilizada a plataforma String para classificação das proteínas encontradas nas amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas amostras de 3 pacientes para a padronização da obtenção de proteínas em amostras de plasma, em duplicata. As amostras foram agrupadas de acordo com a evolução clínica dos pacientes, em casos moderados (n=1) e graves (n=2).Um dos pacientes classificado como caso grave foi a óbito.
Seguindo o protocolo inicial, foi possível identificar aproximadamente 37 proteínas. Após as alterações nos protocolos de dessalinização, secagem e análise das amostras, cerca de 50 proteínas diferentes foram observadas.
As alterações foram identificadas por intermédio da observação em planilhas do Excel, utilizando o spectro count, uma medida semiquantitativa de abundância proteica, que vem ganhando destaque em estudos proteômicos. As principais diferenças foram quanto às proteínas do complemento (C3, CBF e C4), mediadores inflamatórios (SAA1, SAA2 e PCR) e relacionadas à resposta imune (AHSG).
O sistema do complemento é responsável por reconhecer o patógeno para que haja uma resposta imune e este seja destruído (PIRES & CALADO, 2023). Neste estudo foi demonstrado que a infecção pelo vírus SARS-CoV-2, pode levar a uma hiperativação do sistema complemento, resultando em uma resposta inflamatória intensa que poderá agravar o quadro clínico do paciente. Neste caso, os níveis séricos de C5 estariam mais altos, e os níveis de C3 e C4 diminuídos por consequência da hiperativação do complemento. Os resultados desse estudo vão de encontro ao achado nesse projeto, visto que, em ambos os pacientes que evoluíram gravemente foram encontradas uma menor expressão das proteínas C3 e C4 do complemento, quando comparado com o paciente do grupo moderado.
Neste estudo, também se observou nos pacientes graves, o aumento nos níveis séricos de: APOA1, PCR, SAA1, SAA2 e CBF. Essas proteínas estão envolvidas em diferentes vias, tais como: mediadores inflamatórios, principalmente proteínas de fase aguda (SAA1, SAA2 e PCR), resposta imune e fatores do complemento (CBF), vias essas envolvidas diretamente com a resposta do paciente, podendo ser correlacionadas com a evolução para um estado mais grave da doença. Tais resultados também foram encontrados no estudo de Sahin *et al.* (2023), o qual descreve essas proteínas comumente mais expressas em pacientes graves.
Por fim, podemos ressaltar a proteína AHSG que se mostrou significativamente reduzida nos pacientes graves. Estudos mostram que tal proteína pode estar

envolvida em processos biológicos, como a regulação da resposta imune e até mesmo inflamação, pois é caracterizada por ser uma proteína de regulação negativa advinda do fígado. Segundo Kukla *et al.* (2021) foi constatado que os níveis baixos de AHSG podem ser um indicativo de gravidade para a COVID-19, dado esse, que pode explicar o resultado encontrado nas presentes análises.

CONCLUSÕES

A partir dessa pesquisa foi possível padronizar a extração de proteínas para análise proteômica em amostras de plasma de pacientes com diferentes evoluções clínicas da COVID-19. A identificação de proteínas nesses casos pode contribuir com uma melhor compreensão da evolução clínica da doença e evidenciar se a regulação da expressão de determinadas proteínas podem estar envolvidas nesse processo. Neste sentido, destaca-se a importância da proteômica para entender a patogênese e dinâmica do vírus, em uma tentativa de preencher as lacunas deixadas por outras técnicas, assim como auxiliar no enfrentamento dessa doença.

AGRADECIMENTOS

Fundação Araucária e Universidade Estadual de Maringá pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ASHOUR, H. M.; ELKHATIB, W. F.; RAHMAN, M. M.; ELSHABRAWY, H. A. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. Pathogens, v. 9, n. 3, p. 186, Mar. 2020.

KUKLA M.et al. Fetuin-A Deficiency but Not Pentraxin 3, FGF-21, or Irisin, Predisposes to More Serious COVID-19 Course. Biomolecules, v. 11, n. 10, p. 1422, Sep. 2021.

MESSNER, C. B. et al. Ultra-High-Throughput Clinical Proteomics Reveals Classifiers of COVID-19 Infection. Cell Systems, v. 11, n. 1, p. 11- 24.e4, Jul. 2020.
PIRES B.G.& CALADO R.T. Hyper-inflammation and complement in COVID-19. Am J Hematol, v. 98, p. S74-S81, May 2023.

SAHIN A.T. et al. Plasma proteomics identify potential severity biomarkers from COVID-19 associated network. Proteomics Clin Appl, v. 17, n. 2, p. e2200070, Mar. 2023.