



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Henrique Borges da Silva Grisard

Variantes Genômicas de SARS-CoV-2 e sua relação com o perfil expressional e genômico da
Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e da Protease da Proteína Transmembrana 2
(TMPRSS2)

Florianópolis

2024

Henrique Borges da Silva Grisard

Variantes Genômicas de SARS-CoV-2 e sua relação com o perfil expressional e genômico da
Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e da Protease da Proteína Transmembrana 2
(TMPRSS2)

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências do Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador(a): Prof. Dr. Glauber Wagner
Coorientador(a): Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo

Florianópolis

2024

Grisard, Henrique Borges da Silva

Variantes Genômicas de SARS-CoV-2 e sua relação com o perfil expressional e genômico da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e da Protease da Proteína Transmembrana 2 (TMPRSS2) / Henrique Borges da Silva Grisard ; orientador, Glauber Wagner, coorientador, Maria Luiza Bazzo, 2024.

48 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. SARS-CoV-2. 3. ACE2. 4. TMPRSS2. 5. Variante genômicas. I. Wagner, Glauber. II. Bazzo, Maria Luiza . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Henrique Borges da Silva Grisard

Variantes Genômicas de SARS-CoV-2 e sua relação com o perfil expressional e genômico da
Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e da Protease da Proteína Transmembrana 2
(TMPRSS2)

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 21 de maio de 2024, pela banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Gislaine Fongaro
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Caetana Paes Zamparette
Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Taiane Freitas Medeiros
Centro Universitário Estácio Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado
para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. Glauber Wagner

Orientador

Florianópolis, 2024

Dedico o presente trabalho a todos que não mediram esforços para me ajudar na minha vida
pessoal e acadêmica

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fabiane Borges da Silva e Edmundo Carlos Grisard, e minha irmã, Isabella Borges da Silva Grisard, pelo apoio, amor e pela estrutura para eu conseguir chegar aonde estou.

À Julia Kinetz Wachter, por estar ao meu lado em todos os momentos e fazendo com que tudo seja mais feliz e tranquilo. Que, para sempre, nosso caminho seja acompanhado pelo amor.

À minha irmã canina, Milly (“Mimi” para os mais íntimos) por diariamente ser uma faísca de alegria na minha vida, regada de amor e felicidade;

À minha família, por terem feito parte da minha construção como pessoa e como profissional;

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Glauber Wagner e Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo, por me guiar durante essa trajetória, aconselhando em quesitos técnicos e pessoais. Por isso, serei sempre grato;

A todos da equipe do Laboratório de Bioinformática e do LBMMS, mas principalmente gostaria de agradecer ao Fernando Hartmann Barazzetti e o Marcos André Schörner pela amizade e parceria, e claro, pelas “reuniões” online diárias;

Aos colegas do PPGBTC, pela parceria nas disciplinas e seminários;

Aos meus amigos, por estarem junto e fazendo com que tudo fosse mais divertido e mais fácil ao longo dos semestres;

“Devemos ensinar como pensar, e não o que pensar.”

Barbara Coloroso

RESUMO

A infecção por SARS-CoV-2 se tornou presente no nosso cotidiano a partir de 2020, se disseminando e causando a doença denominada COVID-19. É transmitida principalmente por vias aéreas, e sua patogenia é variada podendo ser assintomática ou levando a sintomas respiratórios, neurológicos e digestórios. Para dar início ao ciclo viral em humanos, SARS-CoV-2 se liga à Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e a proteína viral *Spike* deve ser clivada pela Serina Protease da Proteína Transmembrana 2 (TMPRSS2), fazendo com que ACE2 e TMPRSS2 tenham um papel crucial para o desenvolvimento da infecção. Dada essa importância, ambas as proteínas ficaram sob o holofote da ciência durante a pandemia, buscando elucidar a relação dos seus perfis expressionais e genéticos com o desenvolvimento de COVID-19 sintomática. No entanto SARS-CoV-2 apresentou uma vasta gama de variantes genômicas que cursaram com quadros clínicos e taxas de transmissibilidade diferentes, devido a mutações no genoma viral. Apesar de se conhecer a interação da Spike com ACE2 e TMPRSS2, não se tem informação do comportamento desses receptores frente às diferentes variantes genômicas de SARSCoV-2. Neste sentido, o presente trabalho busca elucidar o comportamento dos perfis expressionais e genômicos de ACE2 e TMPRSS2 em células da nasofaríngeas frente às diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2. Para tal, 160 amostras de nasofaringe detectadas para SARS-CoV-2 foram selecionadas, seus RNA total e viral foram extraídos, visando avaliar a expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2 via RT-qPCR e identificar as variantes genômicas de SARS-CoV-2, por meio de sequenciamento por Nanoporos, assim como Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) nos genes codificantes para as proteínas receptoras. As variantes identificadas no presente trabalho foram B.1.1.28, Zeta, Gamma e Ômicron. Os níveis de expressão de ACE2 foram mais elevados quando na presença de B.1.1.28 do que quando Ômicron estava presente. Sabendo que a infecção por SARS-CoV-2 induz a expressão de ACE2 via sinalização por interferons, e que a afinidade da Spike com seu receptor na variante Ômicron é três vezes maior que a cepa original, foi possível observar que a maior afinidade de ligação Spike/ACE2 pode ter influenciado na redução nos níveis de ACE2. Os níveis de TMPRSS2 foram mais elevados em B.1.1.28, comparando com Ômicron e Gamma. A expressão de TMPRSS2 é regulada pelo Fator de Transcrição do Regulador Mestre GATA2, que também regula a expressão de citocinas como a IL1 β , e durante a infecção por SARS-CoV-2 a expressão de IL1 β é estimulada, induzindo também a de TMPRSS2. Considerando que em infecções pela variante Ômicron os níveis de IL1 β são reduzidos, e que Ômicron é ineficiente no uso da via da protease, reforça-se que em infecções por Ômicron a via da TMPRSS2 não é utilizada, e sugere-se que exista uma redução nos fatores de transcrição da protease. Dos quatro SNPs avaliados somente um demonstrou uma frequência elevada nas variantes Zeta, Gamma e Ômicron quando comparados com B.1.1.28, sendo ele rs2285666. Esse SNP é presente no gene codificante para ACE2 e aumenta a sua afinidade de ligação com a Spike, concordando com a hipótese sugerida anteriormente. Ainda, foi visto que profissionais da saúde expressam mais ACE2 e TMPRSS2 durante a infecção, e mesmo que não tenham dados demonstrando o contexto biológico dessa diferença, profissionais da saúde foram expostos continuamente ao SARS-CoV-2 nesses últimos anos, o que aumentada as chances de contato com o vírus antes da evolução da COVID ou da positividade em testes moleculares, sugerindo que o contato preliminar ao SARS-CoV-2 pode levar a um aumento nos níveis de ACE2 e TMPRSS2 potencialmente explicando os resultados apresentados. Porém, dados de aderência ao uso de máscaras, aderência as diretrizes epidemiológicas e vacinais não foram obtidos e pode influenciar na maior expressão dos profissionais de saúde.

Palavras-chave: Infecção viral; parasita-hospedeiro; variantes genômicas

ABSTRACT

SARS-CoV-2 infection has become a global concern since 2020, spreading and causing a disease known as COVID-19. This disease is primarily transmitted through the upper airways, and its pathogenesis varies, ranging from asymptomatic cases to respiratory, neurological, and digestive symptoms. The initiation of the viral cycle within humans involves the binding of SARS-CoV-2 to Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), and its Spike viral protein must be cleaved by the Serine Protease of Transmembrane Protein 2 (TMPRSS2). ACE2 and TMPRSS2 play a crucial role in the development of the infection. Consequently, these proteins have been under the spotlight of scientific research to understand their expression and genetic profiles for symptomatic COVID-19. However, SARS-CoV-2 has exhibited a wide range of genomic variants leading to different clinical presentations and transmissibility rates due to mutations in the viral genome. Considering the interaction of Spike with ACE2 and TMPRSS2, information is lacking on the behaviour of these receptors in response to the genomic variants of the novel coronavirus. This study aims to elucidate the nasopharyngeal expression and genomic profiles of ACE2 and TMPRSS2 in response to different genomic variants of SARS-CoV-2. To achieve this, 160 SARS-CoV-2 positive nasopharyngeal samples were selected. Total and viral RNA were extracted, and ACE2 and TMPRSS2 gene expression was assessed using RT-qPCR. Additionally, SARS-CoV-2 genomic variants were identified through nanopore sequencing, along with Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in ACE2 and TMPRSS2 encoding genes. In order of appearance, B.1.1.28, Zeta, Gamma, and Omicron variant were identified in this study. ACE2 expression levels were higher when B.1.1.28 was present compared to Omicron. Considering that SARS-CoV-2 infection induces ACE2 expression via interferon signalling and that Omicron spike has a three times higher binding affinity to its receptor when compared to the Wuhan virus, a high Spike/ACE2 binding affinity is a potential factor in reducing ACE2 expression levels. TMPRSS2 levels were higher in B.1.1.28 compared to Omicron and Gamma. TMPRSS2 expression is regulated by the transcription factor GATA2, which also regulates cytokine expression such as IL1 β , so during a SARS-CoV-2 infection IL1 β expression is stimulated, with TMPRSS2 expression alongside it. In Omicron infections, IL1 β levels are reduced, and the inefficiency of Omicron in using the protease pathway suggests a reduction in TMPRSS2 transcription factor activity. Among the four evaluated SNPs, only one showed an increased frequency in Zeta, Gamma, and Omicron variants compared to B.1.1.28, being the rs2285666 SNP. This SNP is present in ACE2 gene increasing its binding affinity with Spike, reinforcing the above-mentioned hypothesis. Health professionals expressed higher levels of ACE2 and TMPRSS2 during infection, and besides not having data exploring the biological context behind this different expression patterns, health workers were submitted to a higher exposure to SARS-CoV-2 thereby possibly increasing the chances of a previous contact with the virus. Taking into consideration the results involving the expression profiles of ACE2 and TMPRSS2 a previous contact with SARS-CoV-2 apparently increases the expression levels of both proteins, potentially explain these results. However, data on mask usage, adherence to epidemiological guidelines, and vaccination were not obtained, which could influence the higher expression of these proteins in healthcare professionals.

Keywords: Viral infection; host-parasite; genomic variants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação da partícula viral de SARS-CoV-2 com suas proteínas estruturais identificadas.....	15
Figura 2 Genoma de SARS-CoV-2 e suas regiões codificantes para proteínas estruturais e não-estruturais	16
Figura 3 Entrada de SARS-CoV-2 na célula do hospedeiro mediada por ACE2 e TMPRSS2.	17
Figura 4 Dinâmica da pandemia de SARS-CoV-2 no Brasil de 2020 até início de 2022	18
Figura 5 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona circulatório.....	20
Figura 6 Número de casos de cada variante genômica de SARS-CoV-2 ao longo da amostragem do estudo	29
Figura 7 Expressão gênica de ACE2 em amostras de nasofaringe com a presença de diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2.....	30
Figura 8 Expressão gênica de TMPRSS2 em amostras de nasofaringe com a presença de diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2.....	32
Figura 9 Gel de agarose com os produtos de PCR para as quatro regiões analisadas.....	34
Figura 10 Frequência de ocorrência da mutação rs2285666 em amostras de nasofaringe com a presença de diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2	35
Figura 11 Expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2 em amostras de nasofaringe de não profissionais e profissionais da saúde.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Especificações das sequências nucleotídicas dos amplicons alvo das sondas e iniciadores comerciais utilizados para a RT-qPCR.	25
Tabela 2 Especificações das sequências nucleotídicas dos amplicons alvo dos iniciadores utilizados para a PCR de amplificação das regiões com potenciais SNPs.	26
Tabela 3 Frequências de ocorrência dos SNPs em amostras de nasofaringe com a presença de diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2.	35
Tabela 4 Especificações das sequências nucleotídicas dos amplicons de plasmídeos desenhados para a quantificação absoluta dos alvos.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GATA2	Fator de Transcrição do Regulador Mestre GATA2
ISGF3	Fator Genético-3 Estimulado por Interferon
ISRE	Elemento de Resposta Estimulada por Interferon
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
pb	Pares de base
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAAS	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
RBD	Domínio de Ligação do Receptor
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real com Transcrição Reversa
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMPRSS2	Serina Protease da Transmembrana 2
UTM [®]	Meio de Transporte Universal
VOC	Variantes de Preocupação
VOI	Variantes de Interesse

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
®	Marca Registrada
™	Marca Comercial

SUMÁRIO

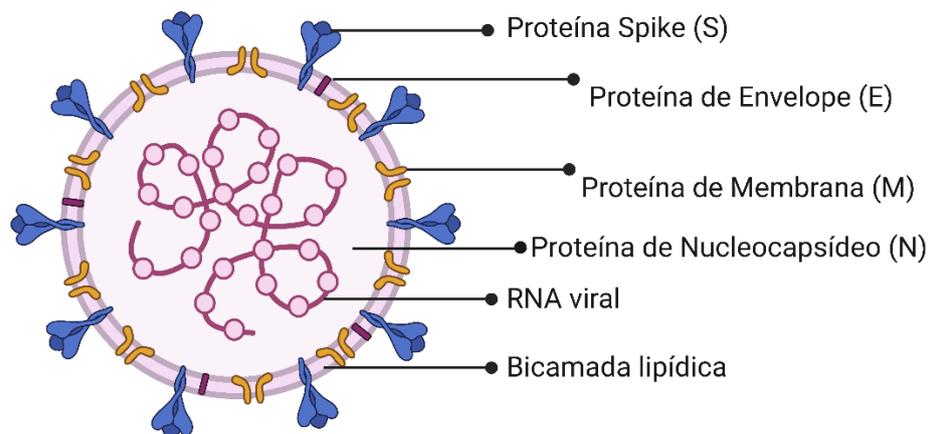
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 SARS-CoV-2.....	15
1.2 ACE2 E TMPRSS2	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 METODOLOGIA.....	23
3.1 AMOSTRAGEM.....	23
3.2 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO	24
3.3 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL, RNA TOTAL E DNA.....	24
3.4 RT-QPCR E QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA.....	24
3.5 PCR DAS REGIÕES DE INVESTIGAÇÃO DOS SNPS	25
3.6 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO	26
3.7 ANÁLISE GENÔMICA	27
3.8 ANÁLISE DE DADOS	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DE SARS-COV-2	29
4.2 EXPRESSÃO DE ACE2 FRENTE ÀS VARIANTES DE SARS-COV-2.....	30
4.3 EXPRESSÃO DE TMPRSS2 FRENTE ÀS VARIANTES DE SARS-CoV-2	32
4.4 SNPs EM ACE2 E TMPRSS2 FRENTE ÀS VARIANTES DE SARS-CoV-2.....	33
4.5 EXPRESSÃO DE ACE2 E TMPRSS2 EM PROFISSIONAIS E NÃO PROFISSIONAIS DE SAÚDE	36
5 CONCLUSÃO.....	38
6 PERSPECTIVAS.....	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
8 ANEXO A – TCLE DO PROJETO CAAE: 31521920.8.0000.0121 (UFSC)	43
9 ANEXO B – SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS PLASMÍDEOS.....	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 SARS-CoV-2

Desde o final de 2019 o mundo teve que se adaptar a uma nova variável em seu cotidiano. Um novo vírus denominado SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) foi detectado em Wuhan, na China, e rapidamente se disseminou pelo mundo causando a doença denominada COVID-19 (do inglês, *Coronavirus Disease 2019*). Essa doença tem sua transmissão por aerossóis, tendo uma patogenia diversa, afetando principalmente os sistemas respiratório, digestivo e neurológico (Gasmi *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020). SARS-CoV-2 é um vírus envelopado pertencente à família Coronaviridae, medindo aproximadamente 125nm (Laue *et al.*, 2021) e tendo RNA fita simples senso positivo como seu material genético (Figura 1).

Figura 1: Representação da partícula viral de SARS-CoV-2 com suas proteínas estruturais identificadas



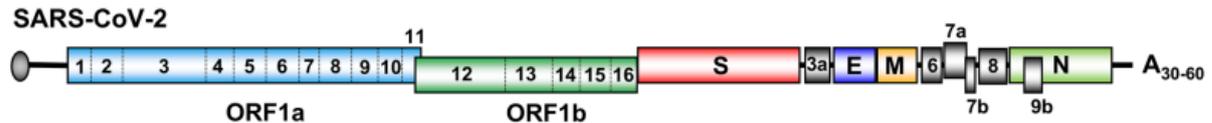
Fonte: autoria própria (imagem gerada no programa BioRender®)

Partícula viral de SARS-CoV-2, enfatizando suas proteínas estruturais Spike (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N); junto ao seu genoma (RNA viral).

O genoma de SARS-CoV-2 contém informações para traduzir 16 proteínas não-estruturais (nsp, do inglês *non-structural protein*), sendo a região ORF1a codificante para a nsp1 até a nsp11 e a região ORF1b para a nsp12 até nsp16. Além das proteínas não-estruturais, o genoma viral codifica cinco proteínas estruturais sendo elas *Spike* (S), Envelope (E), Membrana (M), Nucleocapsídeo (N) e Hemaglutinina esterase (HE); e ainda diversas proteínas

accessórias como a RNA Polimerase Dependente de RNA (RdRP). O genoma viral fica empacotado dentro do Nucleocapsídeo (N) que por sua vez é envelopado por uma membrana contendo lipídeos e as proteínas virais *Spike*, de membrana e de envelope (Brant *et al.*, 2021) (Figura 2).

Figura 2: Genoma de SARS-CoV-2 e suas regiões codificantes para proteínas estruturais e não-estruturais

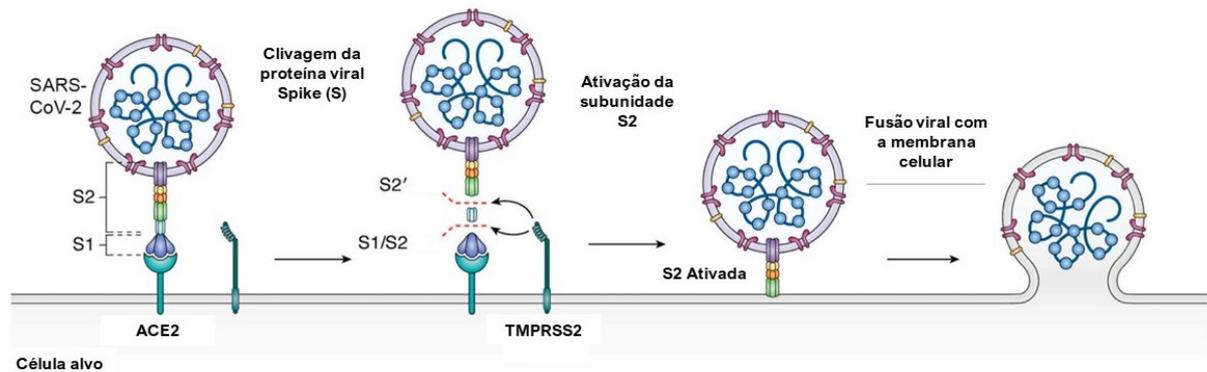


Fonte: Adaptado de Brant *et al.*, 2021

Genoma completo de SARS-CoV-2, sendo da esquerda para a direita (sentido 5' - 3') representadas as regiões ORF1a, que codifica para as nsp1 – nsp11; ORF1b, codificando para as nsp12 – nsp16; Gene codificante para a proteína Spike (S); ORF3a; Gene codificante para a proteína de envelope (E); Gene codificante para a proteína de membrana (M), ORF's 6, 7^a, 7b, 8 e 9b; Gene codificante para a proteína de nucleocapsídeo (N); cauda poli-A (A₃₀₋₆₀).

Para que o SARS-CoV-2 infecte seu hospedeiro é necessária a ligação da proteína viral *Spike* (S) com seu receptor presente na membrana da célula hospedeira, a ACE2 (Enzima Conversora de Angiotensina 2), e a clivagem dessa proteína viral pela TMPRSS2 (Serina Protease da Transmembrana 2) para que a partícula viral adentre na célula, dando continuidade ao processo infeccioso (Benetti *et al.*, 2020; Lieberman *et al.*, 2020) (Figura 3). A clivagem da proteína *Spike* (S) divide a proteína em suas subunidades funcionais S1 e S2, onde S1 contém o domínio de ligação ao receptor (RBD) que influencia na interação do vírus com o hospedeiro, influenciando na patogenicidade e tropismo celular de SARS-CoV-2. Já na subunidade S2 está localizado o peptídeo de fusão que é responsável por mediar a fusão da partícula viral com a membrana do hospedeiro a partir de modificações conformacionais (V'kovski *et al.*, 2020). Ao adentrar na célula, o vírus sofre o desnudamento de seu capsídeo, expondo seu material genético para a sua transcrição, replicação e posteriormente empacotamento, formando novas partículas virais (Beyerstedt; Barbosa Casaro; Bevilaqua Rangel, 2021; Hoffmann *et al.*, 2020).

Figura 3: Entrada de SARS-CoV-2 na célula do hospedeiro mediada por ACE2 e TMPRSS2.



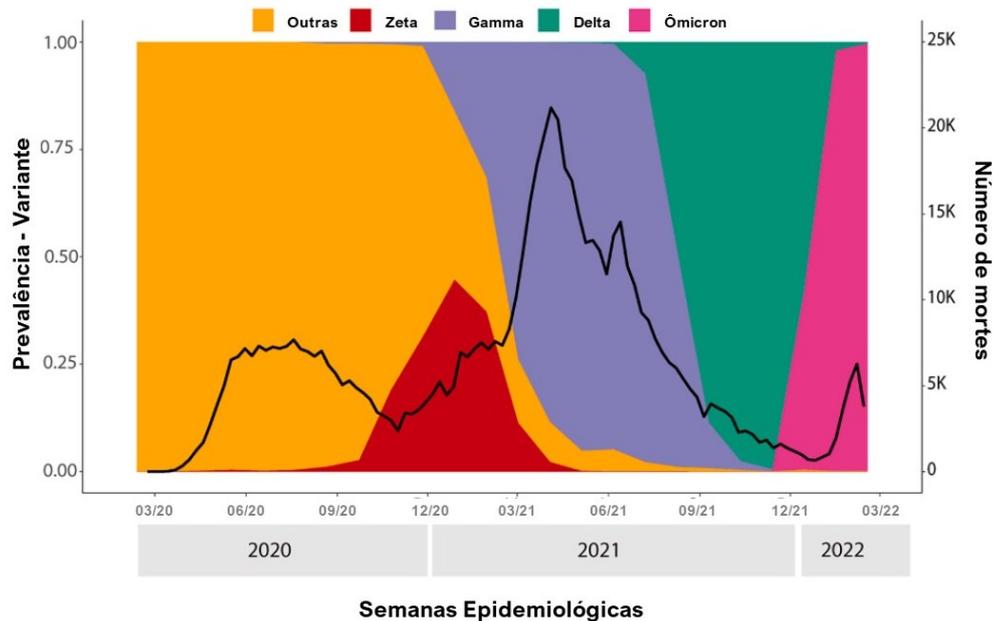
Fonte: Adaptado de Hartenian *et al.*, 2020

Processo de entrada de SARS-CoV-2 na célula hospedeira, ocorrendo primeiro a ligação da Spike com a proteína de membrana ACE2, seguida da clivagem da proteína viral Spike em suas subunidades S1 e S2 levando a ativação da subunidade S2, permitindo então a fusão viral com a membrana da célula.

Apesar de os vírus da família Coronaviridae possuírem uma taxa de erro na replicação menor do que outras famílias de vírus (Domingo *et al.*, 2004), foi visto uma vasta gama de variações genômicas de SARS-CoV-2 nesse período pandêmico (WHO, 2024). Ao início da pandemia a evolução do novo coronavírus se demonstrou limitada por alguns meses, no entanto uma primeira mutação que conferiu ao vírus uma vantagem de aproximadamente 20% em sua replicação (D614G) fez essa variante (B.1) se tornar altamente prevalente em território europeu. Com isso, a partir de outubro de 2020 variante genômicas de SARS-CoV-2 começaram a apresentar altas taxas mutacionais, principalmente na região codificante para a proteína *Spike* (S) (Carabelli *et al.*, 2023).

No Brasil, diferentes variantes de preocupação (VOC, do inglês *Variant of Concern*) e variantes de interesse (VOI, do inglês *Variant of Interest*) foram identificadas durante diferentes períodos: de fevereiro de 2020 até novembro do mesmo ano não havia prevalência de uma variante, devido aos diversos focos introdutórios de diferentes variantes; de dezembro de 2020 até agosto de 2021 as variantes mais comuns foram Gamma (P.1) e Zeta (P.2); de setembro de 2021 a dezembro de 2021 a variante Delta (B.1.617.2) tomou o lugar da Gamma como mais prevalente no país; e a partir de janeiro de 2022 a variante Ômicron (B.1.1.529) se tornou a principal variante não somente a nível nacional, mas internacional (Alcantara *et al.*, 2022) como é visto na Figura 4.

Figura 4: Dinâmica da pandemia de SARS-CoV-2 no Brasil de 2020 até início de 2022



Fonte: Adaptado de Alcantara *et al.*, 2022

Representação gráfica da prevalência das diferentes variantes virais de SARS-CoV-2 (eixo y esquerdo) no Brasil no período de 2020 até o início de 2022, junto ao número de mortes causadas pela infecção (eixo y direito).

Três dessas variantes apresentaram uma maior relevância clínica e epidemiológica em território nacional. Gamma (P.1) teve sua primeira detecção mundial no Brasil em viajantes provindos do continente asiático, e se demonstrou como a variante com a maior taxa de óbitos por COVID-19 no país, acarretando também casos de reinfecção. Ainda, no oeste do estado de Santa Catarina P.1 demonstrou uma alta taxa de letalidade no período em que foi mais prevalente, sendo ainda encontradas sublinhagens da variante, como a P.1.1, P.1.2, P.1.10, P.1-like-1 e P.1-like-II (Padilha *et al.*, 2022). Zeta (P.2) foi primeiro detectada no estado do Rio de Janeiro apresentando uma infecciosidade e capacidade de escape imune elevada devido a mutações em seu genoma como a E484K, podendo ocasionar mais casos de reinfecção. Já Ômicron detinha em seu genoma 4 vezes mais mutações do que as variantes antecessoras, concedendo-lhe uma taxa de transmissibilidade e escape imune muito superior, já sua patogenicidade permaneceu mais amena, podendo ter influência das campanhas de vacinação, visto que o surgimento da variante foi após o início da administração de doses (Vieira *et al.*, 2024).

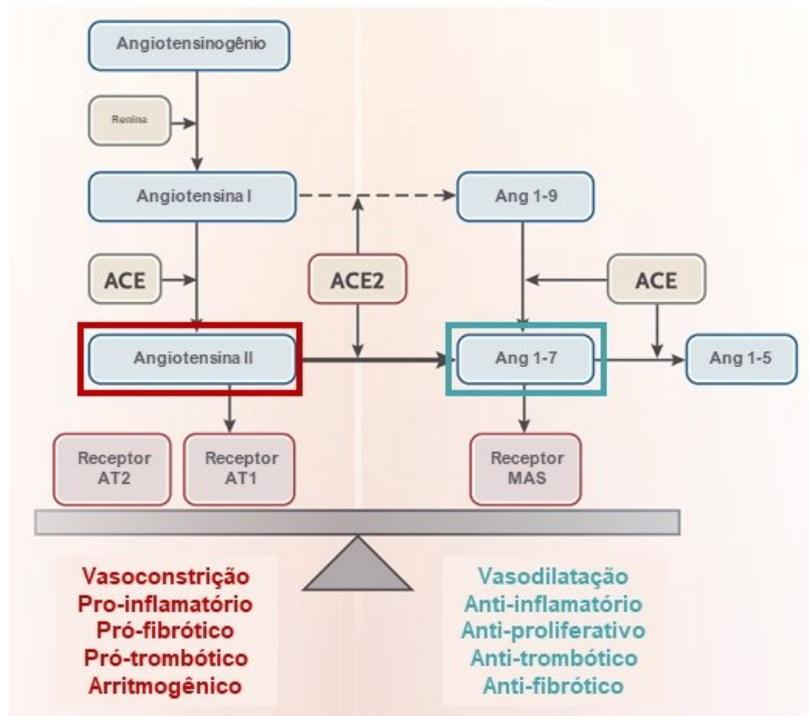
1.2 ACE2 E TMPRSS2

Amplamente expressa no corpo humano (Beyerstedt; Barbosa Casaro; Bevilaqua Rangel, 2021; Ni *et al.*, 2020), a ACE2 humana é uma proteína que, além de ter um papel como receptora para a *Spike* (S), pertence ao Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS). O RAAS é um sistema responsável pela manutenção do equilíbrio hemodinâmico e da tonicidade dos vasos sanguíneos, surtindo seus efeitos por meio da regulação do balanço de sódio e potássio, da pressão arterial e do volume intersticial (Muñoz-Durango *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2017). A ativação desse sistema se dá quando a Renina é produzida nos rins, devido a um desbalanço nas concentrações de sódio e potássio e/ou quando ocorre uma queda brusca na pressão arterial (Patel *et al.*, 2017); quando a Renina entra na corrente sanguínea ela é convertida por mecanismos proteolíticos em sua forma ativa, Pro-renina, a qual cliva o Angiotensinogênio (proteína hepática circulante) tendo como produto a Angiotensina I (Ang I). Posteriormente, a Ang I sofre duas clivagens: uma sendo por parte da ACE produzindo Angiotensina II (Ang II), principal molécula efetora do RAAS; e a outra utilizando das endopeptidases tendo como produto a Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)), a qual desencadeia efeitos antagonistas aos da Ang II. Ang-(1-7) ainda pode ser produzida por meio da clivagem da Ang II pelo seu receptor, a ACE2 (Muñoz-Durango *et al.*, 2016; Nishimura, 2017). Porém Ang II quando não convertida por ACE2, se liga aos seus receptores AT1 e AT2, mas principalmente ao AT1 devido à rápida internalização do receptor (Deng *et al.*, 2001); assim, quando ligada ao receptor AT1, Ang II surte efeitos vasoconstritores, pró-inflamatórios, pró-fibróticos, entre outros (Benigni; Cassis; Remuzzi, 2010; Kuba; Imai; Penninger, 2013; Rüster; Wolf, 2006; Turner; Hiscox; Hooper, 2004) (Figura 5).

Junto à ACE2, TMPRSS2 tem um papel de suma importância no processo infeccioso de SARS-CoV-2 (Hoffmann *et al.*, 2020), além dos seus papéis vinculados ao processo infeccioso deste vírus e à carcinogênese de câncer de próstata (Tomlins *et al.*, 2005). Apesar da localização do seu gene e estrutura proteica serem sabidas a função fisiológica dessa protease no organismo ainda não aparece bem elucidada na literatura (Antalis *et al.*, 2011). Dentre a infecção por SARS-CoV-2 a TMPRSS2 é responsável por clivar a proteína viral *Spike* (S) em suas subunidades S1 e S2, sendo que a S1 contém o domínio de ligação ao receptor e S2 é essencial para a fusão viral com a membrana celular, visto que possui os elementos funcionais necessários (Shen *et al.*, 2017). Além da via da TMPRSS2 já foi visto que o vírus pode também

utilizar da via das catepsinas, onde ocorre uma internalização das partículas virais via endocitose e as subunidades são clivadas pela catepsina L. No entanto catepsinas são proteases não-específicas fazendo com que a sua ação não seja eficiente para a entrada de SARS-CoV-2 na célula e levando o vírus a preferir a via da TMPRSS2 (Jackson *et al.*, 2022), exceto na variante Ômicron, onde essa tende utilizar das catepsinas devido a melhor clivagem da sua *Spike* por meio dessa via (Meng *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022).

Figura 5: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona circulatório



Fonte: Adaptado de Lubel; Garg, 2020

Via de funcionamento do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS), onde a partir do Angiotensinogênio, com a ação da Renina, é produzida Angiotensina I (Ang I). A partir de Ang I pode-se produzir Angiotensina II (Ang II) quando a primeira é convertida pela Enzima Conversora de Angiotensina (ACE), ou Angiotensina 1-9 (Ang 1-9) quando Ang I sofre a ação da Enzima Conversora de Angiotensina II (ACE2). Ang II ao se ligar no seu receptor AT1 leva a vasoconstrição, surtindo efeitos pró-inflamatórios, pró-fibróticos, pró-trombóticos e arritmogênicos. Mas para equilibrar esses efeitos, Ang 1-9 é então convertida por ACE em Ang 1-7 que ao se ligar no seu receptor, MAS induz vasodilatação, levando a efeitos contrários aos de Ang II.

Ao longo dos últimos anos, ACE2 e TMPRSS2 foram protagonistas na busca pela compreensão da relação da expressão gênica e das sequências gênicas de ambas as proteínas

com a gravidade do quadro clínico da COVID-19. Rossi e colaboradores (2021) demonstraram que durante a infecção uma expressão reduzida de ACE2 e aumentada de TMPRSS2, no trato respiratório superior, se demonstrou como fator de risco para uma maior dificuldade respiratória durante a COVID-19. Além de sintomas respiratórios a alta expressão de ACE2 e TMPRSS2 no sistema gastrointestinal e cardiovascular foi demonstrada como um fator agravante na patogenicidade de COVID-19, levando a sintomas como diarreia, náusea e lesões cardíacas (Dong *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2023)

Além da expressão gênica, a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) nas sequências codificantes para as proteínas têm capacidade de modificar a morfologia e funcionalidade das proteínas. Para ACE2 os SNPs podem interferir na sua afinidade com a proteína *Spike*, como por exemplo o SNP rs2285666 (G14934A, NG_012575.3), que apesar de estar localizado em um íntron, aumenta a afinidade de ligação da *Spike* com ACE2 (Alimoradi *et al.*, 2022) assim como rs4646116 (A6324G, NG_012575.3), que quando presente incrementa a ligação entre ACE2 e *Spike*, facilitando a disseminação viral (Bierhals *et al.*, 2022) Já para TMPRSS2 rs2070788 (C66056T, NG_047085.2) é um SNP associado com uma reduzida expressão da protease, enquanto rs383510 (A49677G, NG_047085.2) demonstrou uma associação com um maior risco de infecção por SARS-CoV-2 (Schönfelder *et al.*, 2021).

Mesmo com um robusto entendimento da influência de ACE2 e TMPRSS2 na infecção por SARS-CoV-2 já construído, quando se adiciona as diversas variantes virais à equação é trazida uma complexidade de relações ainda a se explorar. Com isso o presente trabalho busca incrementar a plêiade de conhecimento da influência de ambas as proteínas na patogenia da COVID-19 utilizando de dados de comportamento expressional e genômico de ACE2 e TMPRSS2 frente à diferentes variantes de SARS-CoV-2.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da relação entre as variantes genômicas de SARS-CoV-2 com a expressão e sequência gênica de ACE2 e TMPRSS2 em células de nasofaringe de pacientes infectados com o vírus.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os níveis de expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2 em células nasofaríngeas quando na presença de polimorfismos de nucleotídeo único as suas sequências codificantes;
- b) Relacionar variantes genômicas de SARS-CoV-2 e os possíveis Polimorfismos de Nucleotídeo Único em regiões codificantes para ACE2 e TMPRSS2 em células de nasofaringe;
- c) Avaliar a expressão de ACE2 e TMPRSS2 na nasofaringe quando na presença de diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAGEM

Amostras de nasofaringe providas do estudo intitulado “Avaliação da expressão gênica da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e Serina Protease da Proteína Transmembrana 2 (TMPRSS2) em pacientes antes e após a infecção por SARS-CoV-2” CAAE: 57722022.2.0000.0121 (UFSC), coletadas e armazenadas (freezer -80°C) no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS/UFSC) no período entre 2020 e 2022 foram consideradas para o presente estudo amostras seguindo os seguintes critérios de escolha: ciclo de detecção (Cq) menor que 25 na Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real por Transcrição Reversa (RT-qPCR, do inglês *Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction*) para a detecção de SARS-CoV-2, com a data de coleta contemplada dentre os períodos demonstrados na Figura 6.

Figura 6 Descrição dos períodos de amostragem, com as variantes mais prevalentes em cada e número de amostras escolhidas junto ao número de amostras disponíveis.

Período I (06/20 – 10/20)	Período II (11/20 – 03/21)	Período III (04/21 – 08/21)	Período IV (09/21 – 01/22)	Período V (02/22 – 06/22)	Período VI (07/22 – 11/22)
N = 109	N = 110	N = 15	N = 202*	N = 190*	N = 54
46 amostras	44 amostras	5 amostras	21 amostras	25 amostras	19 amostras
B.1.1.28	Zeta	Zeta Gamma	Ômicron Delta	Ômicron	Ômicron

Descrição dos períodos de amostragem (Período I – Período VI), sendo que cada período tem uma duração de 4 meses. Abaixo do quadro com os períodos estão descritas as variantes virais mais prevalente naquele tempo, e acima o número de amostras disponíveis para serem analisadas, cumprindo com os critérios de escolha. *indica uma diferença maior entre o número de amostras disponíveis e amostras escolhidas.

Dentre as amostras contempladas nos critérios de escolha, foram selecionadas aleatoriamente dentro do banco de amostras do LBMMS/UFSC 46 amostras do Período 1 (de 109 disponíveis), 44 do Período 2 (de 110 disponíveis), 5 do Período 3 (de 15 disponíveis), 21 do Período 4 (de 202 disponíveis), 25 do Período 5 (de 190 disponíveis) e 19 do Período 6 (de 54 disponíveis), totalizando 160 amostras providas de coletas de nasofaringe (Figura 6). Nos Períodos 4 e 5, uma porcentagem inferior de amostras foram selecionadas devido a uma menor

qualidade do material genético das amostras coletadas nesses períodos, possivelmente graças ao uso de Tampão Fosfato-Salino (PBS do inglês, *Phosphate-Saline Buffer*) ao invés de Meio de Transporte Universal (UTM[®] do inglês, *Universal Transport Medium*), limitando o quantitativo de amostras aptas a serem analisadas. Os dados dos pacientes foram obtidos no momento da coleta mediante a apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do estudo supracitado.

3.2 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS/CCS/UFSC) e no Laboratório de Bioinformática (MIP/CCB/UFSC).

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL, RNA TOTAL E DNA

A obtenção do RNA viral para a análise do genoma de SARS-CoV-2 foi feita utilizando o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, USA[®]) seguindo o protocolo do fabricante. Já o RNA total para a avaliação da expressão gênica foi obtido utilizando de um protocolo estabelecido por Amirouche *et al.*, 2021 que faz uso de TRIzol (solução monofásica de isotiocianato de guanidina e fenol). O isolamento do DNA para a análise das sequências gênicas de *ACE2* e *TMPRSS2* foi executado utilizando o kit comercial *ReliaPrepTM Blood gDNA Miniprep System* (Promega[®]), seguindo as instruções do fabricante.

3.4 RT-qPCR E QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

Após extraído, o RNA total foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento *Nanovue Plus* (General Electric[®]) sendo que esse valor serve para a realização de uma diluição das diferentes amostras, utilizando água livre de DNAses e RNAses, para uma

concentração de 5 ng/ μ l visando igualar os parâmetros de análise de expressão gênica. Após a dosagem/diluição das amostras, a quantificação absoluta da expressão gênica de *ACE2* e *TMPRSS2* foi verificada utilizando uma RT-qPCR junto à quantificação do gene humano *B2M*, que serve como controle interno para validar a reação. Para a amplificação, em conjunto com o kit *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR* (Promega®), foram utilizadas as sondas e primers *PrimePCR™ Probe Assay: ACE2, Human* (BioRad®), *PrimePCR™ Probe Assay: TMPRSS2, Human* (BioRad®) e *PrimePCR™ Probe Assay: B2M, Human* (BioRad®), específicos para cada alvo e tendo suas especificações listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Especificações das sequências nucleotídicas dos amplicons alvo das sondas e iniciadores comerciais utilizados para a RT-qPCR.

Alvo	Sequência 5'-3'
<i>PrimePCR™ Probe Assay: ACE2, Human</i> (BioRad®)	TAATGCATGCCATTCTCAATCCTTGCAGCTACACCAGTCCCAGGCACTGTCC TTACAAGTGATCCATCCATATTCATACAAGATCCAACACTTGCTCCAATGA TATATCC
<i>PrimePCR™ Probe Assay: TMPRSS2, Human</i> (BioRad®)	CAGACAAGTTCAGTCTTTAATAAAAAATGAAGTGACCTCTGAATCATCTCTAA GAGTAAATCATGCACGGGAAGCAAACCAGCCCCATTGTTTTCTTGTAATA CGACGTCAAGGACGAAGACCATGTGGATTAGCCGTCTGCCCTCATTTGTGCGA TAAATCCAGTCCGTGAATACCATC
<i>PrimePCR™ Probe Assay: B2M, Human</i> (BioRad®)	TCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTAT CCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGA AAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGAC

Visando a quantificação absoluta dos alvos, junto às amostras foram amplificados plasmídeos comercialmente fabricados para os três alvos, sendo o gene *B2M* (beta-2-microglobulina) exclusivamente utilizado como controle interno da reação, com concentrações conhecidas o que permite com que o termociclador elabore uma curva padrão, utilizada como referência para quantificar de maneira absoluta o RNA presente na amostra. Os plasmídeos utilizados foram desenhados por Grisard, 2022 em seu trabalho de conclusão de curso e as suas sequências estão disponíveis no Anexo B.

3.5 PCR DAS REGIÕES DE INVESTIGAÇÃO DOS SNPs

Visando incrementar a quantidade inicial do DNA das amostras para a realização do sequenciamento genômico para a verificação dos SNPs nos genes *ACE2* e *TMPRSS2* foram

feitas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) multiplex para amplificar as regiões onde os possíveis SNPs podem ocorrer. A PCR foi realizada utilizando o kit *Phusion Plus DNA Polimerase* (Thermo Scientific®) seguindo os protocolos do fabricante, junto aos conjuntos de primers listados no Tabela 2. Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese com gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídio no transluminador *ImageQuant™ LAS 500* (General Electronics®), sendo que somente as amostras que tivessem os 4 produtos amplificados seriam sequenciadas utilizando da tecnologia de nanoporos no sequenciador MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies®).

Tabela 2: Especificações das sequências nucleotídicas dos amplicons alvo dos iniciadores utilizados para a PCR de amplificação das regiões com potenciais SNPs.

SNP	Sequência do Iniciador 5'	Sequência do Iniciador 3'	Artigo Referência
rs2285666	TTCTCCCTGCTCCTATACTACCG	TTCATTCATGTCCTTGCCCTTA	Alimoradi <i>et al.</i> , 2022
rs4646116	ACCGGTTTTGATTGGCCAT	CCCTTTTCAGTTTCACGGGC	Bierhals <i>et al.</i> , 2022
rs2070788	GAAGTGCTTAGTGGCAGGCA	AGTTTCTGCTGATGAGGAGCC	Schönfelder <i>et al.</i> , 2021
rs383510	ATGGCTGTGCTTGGGAAATAAC	CTTATTCCTGGCCGGACGC	Schönfelder <i>et al.</i> , 2021

3.6 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

Para a obtenção do genoma completo de SARS-CoV-2 presente nas amostras foi utilizado o kit *Midnight RT-PCR Expansion* (Oxford Nanopore Technologies®) para amplificar regiões do genoma viral visando enriquecer o material para o sequenciamento utilizando o kit *Rapid Barcoding Kit 96* (Oxford Nanopore Technologies®) no sequenciador MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies®), seguindo as instruções do fabricante. Já para a investigação dos SNPs, os produtos da amplificação foram sequenciados utilizando o kit *Rapid Barcoding Kit 96* (Oxford Nanopore Technologies®) também junto ao sequenciador MinION Mk1B e seguindo o protocolo do fabricante. Durante ambos os sequenciamentos é utilizado o programa *MinKNOW* v23.07.12 (disponível em: <https://community.nanoporetech.com/downloads>) para acompanhar em tempo real a quantidade, e qualidade, das leituras e realizar o processo de *basecalling*, no qual o sinal elétrico é interpretado nas diferentes bases nitrogenadas. As leituras

com uma boa qualidade (determinada pelo próprio programa *MinKNOW*) foram salvas em arquivos “fastq_pass”, utilizados para as análises genômicas.

3.7 ANÁLISE GENÔMICA

As sequências “fastq_pass” do sequenciamento de genoma completo de SARS-CoV-2 foram submetidas a um processo de remoção dos adaptadores e limpeza das leituras utilizando o programa *Guppy* v6.5.7 (disponível em: <https://community.nanoporetech.com/downloads>); as sequências limpas, então, foram utilizadas para montar o genoma do vírus utilizando o protocolo *Artic nCoV-2019* v1.1.0 (<https://artic.network/ncov-2019/ncov2019-bioinformatics-sop.html>) com uma profundidade mínima de 100x e cobertura mínima de 98%. As sequências consenso (.fasta) do genoma viral geradas com o protocolo *Artic nCoV-2019* foram utilizadas para realizar a identificação das variantes genômicas utilizando o programa *Nextclade* v2.14.1 (<https://clades.nextstrain.org/>). Essas sequências consenso foram submetidas no banco de dados público GISAID.

Já as sequências “fastq_pass” do sequenciamento dos produtos de PCR para a identificação dos possíveis SNPs passaram também por um processo de limpeza e de remoção dos adaptadores utilizando o programa *Guppy* v6.5.7. Após a limpeza as sequências foram alinhadas com as sequências de referência (ACE2: NG_012575.2 / TMPRSS2: NG_047085.2) utilizando o programa *minimap2* v2.15-r905 (disponível em: <https://github.com/lh3/minimap2>), com uma profundidade mínima de 60x; o arquivo de alinhamento está foi organizado (sorted.bam) e indexado utilizando o programa *samtools* v1.18 (disponível em: <https://github.com/samtools/samtools>), por fim a montagem da sequência consenso (.fasta) foi feita também utilizando o programa *samtools* v1.18. A sequências consenso foram alinhadas com a sequência de referência e verificar a existência de SNPs utilizando o programa IGV v2.16.2 (disponível em: <https://igv.org/>).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado do Teste *T* de *Student* para comparar as médias dos valores absolutos de expressão gênica dentre as amostras com as diferentes variantes de SARS-CoV-2, visto que a análise foi feita em pares de grupos; para a avaliar a diferença entre a ocorrência dos diferentes SNPs dentre as diferentes variantes virais foi utilizado do teste ANOVA de uma via, na qual a média das variantes virais foram comparadas. Isso foi realizado no programa *GraphPad Prism*[®] v9.5.2.

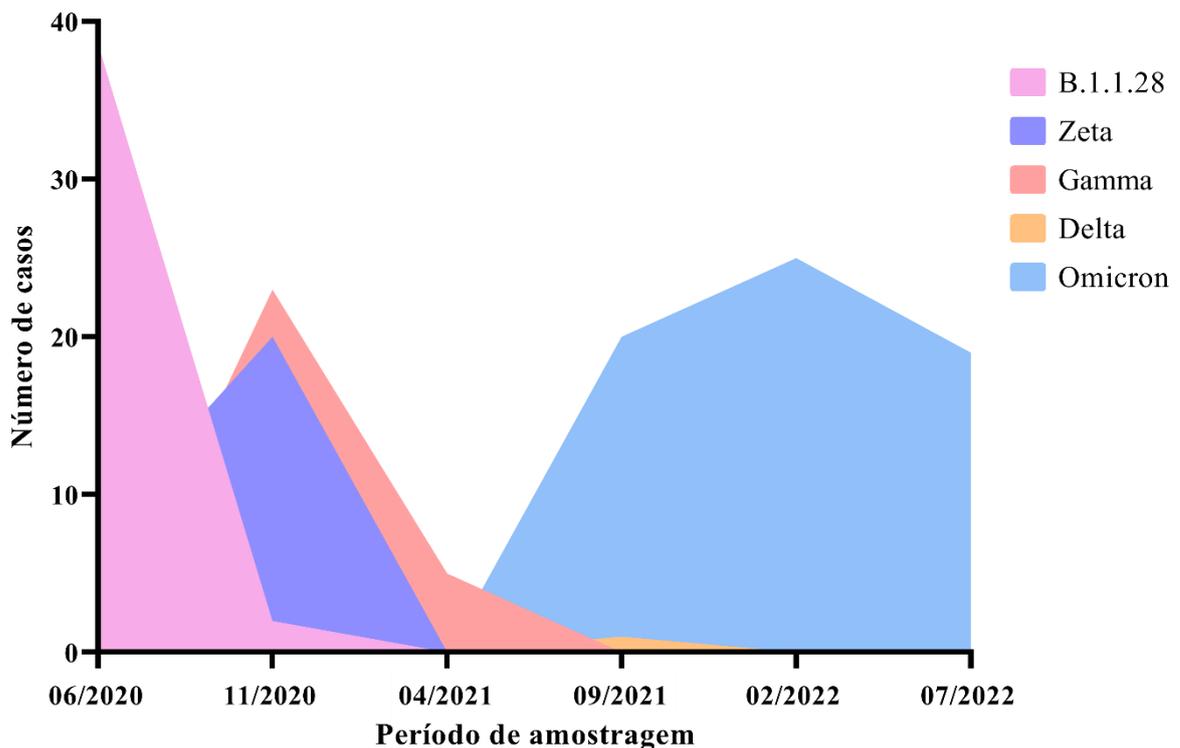
Visto que uma grande diferença foi observada entre o número de amostras detectadas para Ômicron com relação às outras variantes genômicas, foi realizado um teste de normalização que buscou equalizar o número de amostras dentre as variantes aos daquela que apresentou o menor número de detecções (Zeta) e reanalisar a significância das diferenças estatísticas utilizando número amostrais iguais dentre os grupos de análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DE SARS-COV-2

Com os períodos pré-estabelecidos na amostragem foi possível verificar quais as variantes genômicas de SARS-CoV-2 presentes dentre eles. Ao observar a Figura 7 é visto que no período 1 a variante B.1.1.28 se demonstrou mais presente, enquanto nos períodos 2 e 3 as variantes Zeta e Gamma foram as mais encontradas. A partir do período 4 a variante Ômicron foi predominante, sendo observado um caso da variante Delta no período 4. Esses resultados vão de encontro com o estudo de Padilha e colaboradores (2022) que realizaram um monitoramento genômico de SARS-CoV-2 no estado de Santa Catarina no mesmo período. A variante Delta não foi incluída nas análises visto seu baixo número de casos.

Figura 7: Número de casos de cada variante genômica de SARS-CoV-2 ao longo da amostragem do estudo

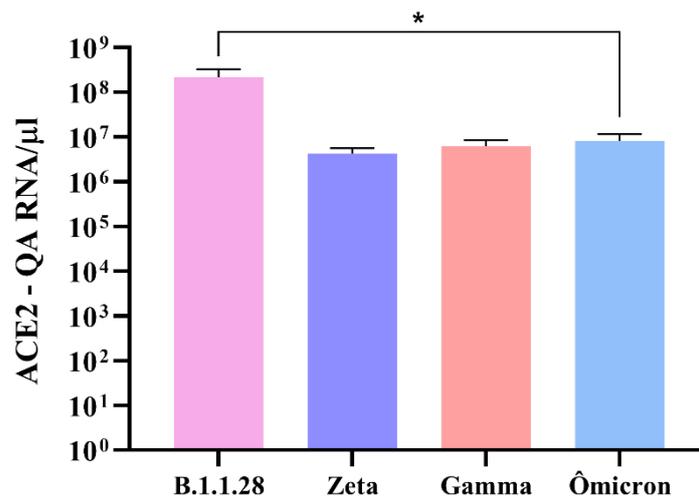


Demonstração do número de casos identificados para diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2 ao longo dos períodos de amostragem.

4.2 EXPRESSÃO DE ACE2 FRENTE ÀS VARIANTES DE SARS-COV-2

Com relação aos níveis de expressão de ACE2 frente às diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2 (Figura 8) observa-se que nas amostras em que a variante B.1.1.28 foi identificada a expressão da proteína se mostrou significativamente mais elevada ($p < 0.05$) do que nas amostras nas quais a variante Ômicron foi detectada. É possível notar diferença na expressão de ACE2 em amostras com B.1.1.28 detectada e amostras com Zeta ($p = 0.11$) e Gamma ($p = 0.11$) detectadas, mas após a realização do teste de normalização foi confirmado que essas diferenças não eram significativas. No entanto é perceptível que existe uma potencial desigualdade na expressão da proteína, fazendo-se necessária a discussão do achado.

Figura 8: Expressão gênica de ACE2 em amostras de nasofaringe com a presença de diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2



Comparação dos níveis de expressão de ACE2 em amostras de nasofaringe detectadas para as variantes virais B.1.1.28, Zeta, Gamma e Ômicron. Após a realização de um Teste *T* de *Student* entre os grupos se estabeleceram diferenças significativas, sendo representadas por: * $p < 0.05$. As barras representam o Erro Padrão e o eixo Y plota a Quantidade Absoluta de RNA por microlitro de amostra.

É conhecido que a afinidade de ligação da proteína *Spike* com ACE2 não é uniforme entre as diferentes variantes virais, alterando de acordo com mutações presentes no gene codificante para a *Spike*, mais especificamente no domínio de ligação do receptor (RBD, do inglês, *Receptor Binding Domain*) (Han *et al.*, 2022; Meng *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021). Com mutações presentes no RBD, Gamma apresenta uma afinidade de ligação significativamente superior à cepa original, assim como a Zeta, a qual além de aumentar sua

afinidade pelo receptor, essas mutações facilitam o seu escape do sistema imune (Barton *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2024). Já Ômicron apresenta quatro vezes mais mutações do que suas variantes antecessoras, tendo oito substituições nos resíduos de ligação com ACE2, levando assim a um aumento na afinidade de ligação três vezes maior que a cepa original (Han *et al.*, 2022; Meng *et al.*, 2022).

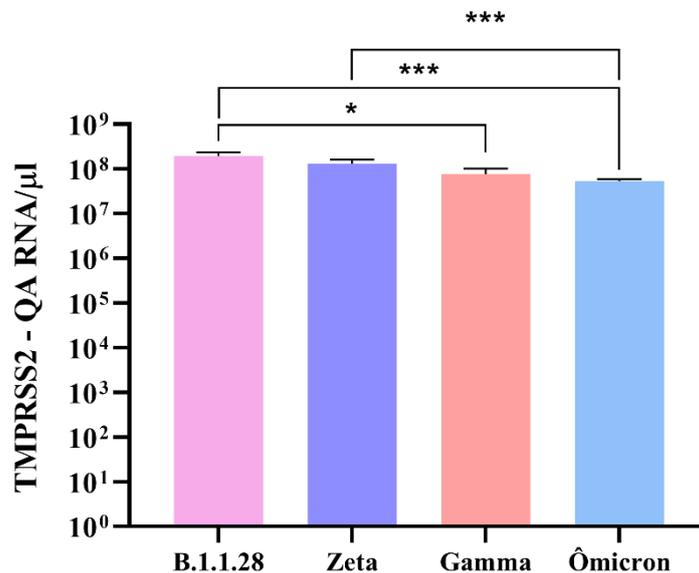
Com isso, ao observar a Figura 8, percebe-se que nas amostras onde variantes de SARS-CoV-2 que apresentam uma maior afinidade de ligação com ACE2 (Zeta, Gamma e Ômicron) foram identificadas também apresentam uma menor expressão do mesmo receptor, enquanto em amostras que a variante mais próxima à cepa original, B.1.1.28, foi detectada demonstrou-se uma maior expressão da proteína. Ou seja, uma maior afinidade de ligação do vírus à ACE2 se demonstra como um possível fator para a redução da expressão de ACE2, podendo indicar que variantes mais adaptadas para uma melhor afinidade com o receptor potencialmente conseguem ter sucesso no seu ciclo viral sem necessariamente uma ampla disponibilidade de ACE2.

A expressão de ACE2 pode ser estimulada pela infecção de SARS-CoV-2 por um aumento na expressão do Elemento de Resposta Estimulada por Interferon (ISRE – do inglês, *IFN-Stimulated Response Element*), que é receptor para o Fator Genético-3 Estimulado por Interferon (ISGF3 – do inglês *Interferon Stimulated Gene Factor 3*). Após uma ativação de sinalização por interferon, como ocorre na infecção por SARS-CoV-2, é produzido ISGF3, no entanto a sequência gênica do ISRE é similar a uma parte do gene codificante para ACE2, fazendo com que ISGF3 possa se ligar nessa região similar, estimulando assim a expressão de ACE2 (Malvankar *et al.*, 2023). Até o momento da escrita deste trabalho, não foram encontrados estudos demonstrando se há uma diferença no estímulo da expressão de ACE2 por parte das diferentes variantes virais. No entanto, ao observar os resultados demonstrados na Figura 8, e considerando que esse estímulo ocorre em infecções por todas as variantes, a hipótese de que uma maior afinidade de ligação com a ACE2 possivelmente diminui a expressão da proteína é reforçada, pois mesmo que exista o estímulo via ISGF3 nas variantes Zeta, Gamma e Ômicron, a expressão ainda é menor do que quando na presença da variante B.1.1.28.

4.3 EXPRESSÃO DE TMPRSS2 FRENTE ÀS VARIANTES DE SARS-COV-2

Já a expressão de TMPRSS2 se demonstrou significativamente mais elevada nas amostras com a variante B.1.1.28 detectada quando comparada as amostras com as variantes Gamma ($p < 0.05$) e Ômicron ($p < 0.001$) detectadas (Figura 9). Além disso, amostras com a variante Zeta apresentaram maior expressão de TMPRSS2 quando comparadas com amostras com variante Ômicron ($p < 0.001$).

Figura 9: Expressão gênica de TMPRSS2 em amostras de nasofaringe com a presença de diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2



Comparação dos níveis de expressão de TMPRSS2 em amostras de nasofaringe detectadas para as variantes virais B.1.1.28, Zeta, Gamma e Ômicron. Após a realização de um Teste *T de Student* entre os grupos se estabeleceram diferenças significativas, sendo representadas por: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. As barras representam o Erro Padrão e o eixo Y plota a Quantidade Absoluta de RNA por microlitro de amostra.

Visto o elevado número de mutações na proteína *Spike* da variante Ômicron, estudos demonstraram que ela é ineficiente no uso da TMPRSS2 para sua entrada na célula pois não é devidamente clivada por esta protease. Dessa maneira, as partículas virais dessa variante preferem utilizar da via das catepsinas para entrar na célula via endocitose, diferentemente das outras variantes e da cepa original (Meng *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022). Então, ao observar uma reduzida expressão de TMPRSS2 quando na presença da variante Ômicron (Figura 9) a

não utilização da protease para a entrada viral na célula poderia ser um fator contribuinte para essa redução na expressão de TMPRSS2 em relação às outras variantes.

A expressão de TMPRSS2 não é induzida diretamente por SARS-CoV-2, assim como a de ACE2, onde a expressão da protease é regulada pelo Fator de Transcrição do Regulador Mestre GATA2 (GATA2), que também está envolvido no controle de expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL1 β (Clinkemalie *et al.*, 2013; Katsumura *et al.*, 2016). Em uma infecção por SARS-CoV-2, GATA2 é ativado para expressar IL1 β , e conseqüentemente induz a expressão de TMPRSS2 (Cioccarelli *et al.*, 2021). Dito isso, foi demonstrado por Korobova e colaboradores (2022) que em infecções por SARS-CoV-2 da variante Ômicron os níveis de IL1 β são reduzidos, sendo GATA2 potencialmente menos ativado e levando a uma possível redução dos níveis de TMPRSS2. Ou seja, na presença da variante Ômicron, a via da protease aparentemente é menos utilizada, e existe uma possível redução nos fatores de transcrição para TMPRSS2 concordando com os resultados apresentados na Figura 9.

No entanto a expressão de TMPRSS2 também se demonstrou reduzida em infecções pela variante Gamma (Figura 9), quando comparada com B.1.1.28, e apesar de não ter estudos descrevendo uma possível relação entre infecção pela variante Gamma e uma redução no perfil expressional de TMPRSS2, no presente trabalho foi possível verificar as sequências genômicas das variantes, e observou-se que depois de Ômicron, Gamma foi a variante que mais apresentou mutações na região codificante para a proteína *Spike*. Uma das mutações compartilhadas entre Gamma e Ômicron leva à substituição H655Y, que quando presente reduz a utilização de TMPRSS2 (Hu *et al.*, 2022), corroborando com o resultado demonstrado na Figura 9 e com a hipótese apresentada anteriormente.

4.4 SNPS EM ACE2 E TMPRSS2 FRENTE ÀS VARIANTES DE SARS-COV-2

Todas as amostras do presente trabalho apresentaram amplificação para as quatro regiões onde os possíveis SNPs poderiam ocorrer. Os produtos de PCR de 28 das 160 amostras podem ser observados na Figura 10 junto ao padrão de 100 pares de base (pb).

Figura 10: Gel de agarose com os produtos de PCR amplificados para as quatro regiões onde os possíveis SNPs poderiam ocorrer.

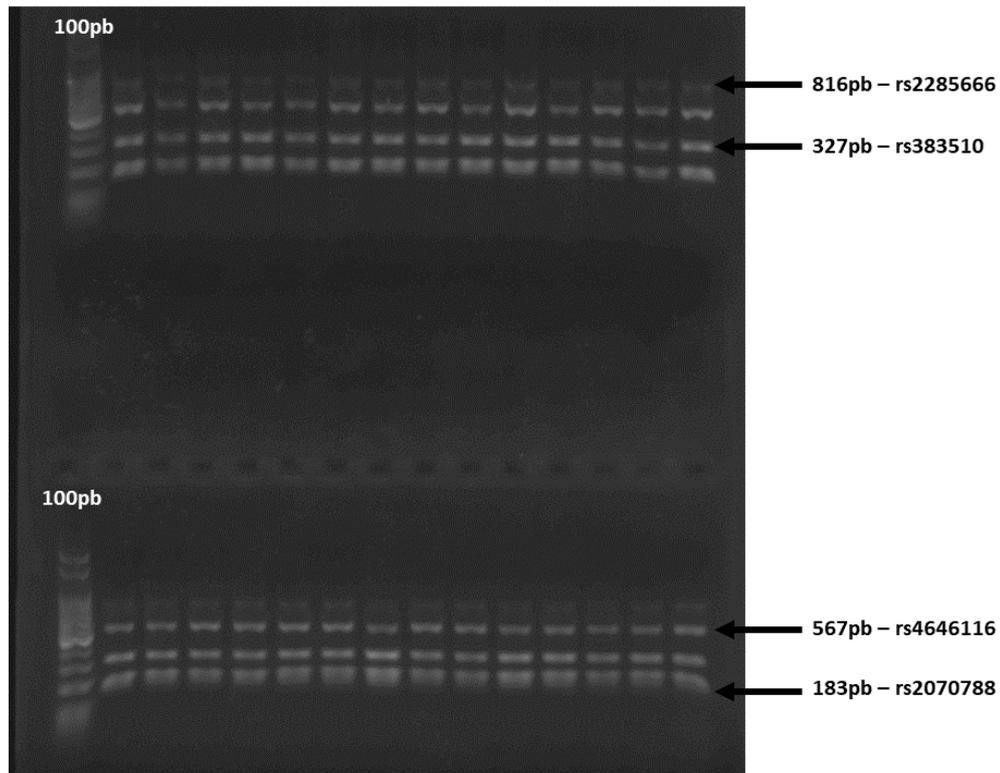
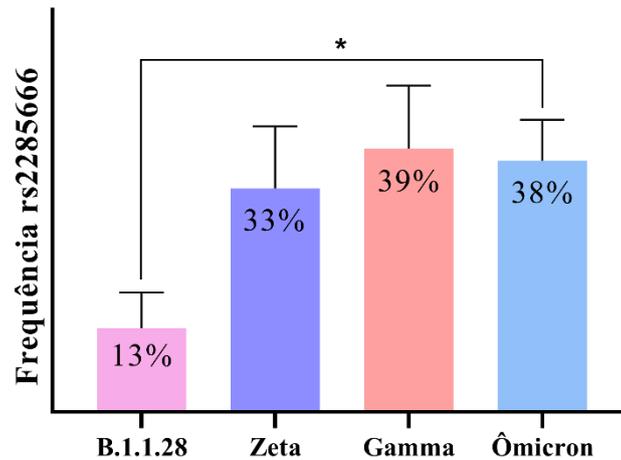


Foto do gel de agarose 1.5% com produtos de PCR *multiplex* para as quatro regiões onde os possíveis SNPs poderiam ocorrer. pb: pares de base.

Ao observar a frequência dos SNPs nos genes *ACE2* e *TMPRSS2* quando na presença das diferentes variantes (Figura 11) identifica-se que a frequência da mutação rs2285666 foi inferior frente à variante B.1.1.28 quando comparada as amostras em que Ômicron foi identificada ($p < 0.05$), apresentando também uma diferença com relação a Zeta ($p = 0.25$) e Gamma ($p = 0.08$), mas julgada não-significante pelo teste de normalização amostral. Para os outros SNPs analisados não foi possível estabelecer nenhuma diferença significativa, no entanto as frequências de ocorrência de cada um são demonstradas na Tabela 3. Importante ressaltar que assim como nos resultados apresentados na Figura 8, a diferença na frequência de rs2285666 entre B.1.1.28 e Zeta/Gamma, apesar de não-significativa, vale a discussão dos resultados.

Figura 11: Frequência de ocorrência da mutação rs2285666 em amostras de nasofaringe com a presença de diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2



Comparação da frequência de ocorrência da mutação rs2285666 em amostras de nasofaringe detectadas para as variantes virais B.1.1.28, Zeta, Gamma e Ômicron. Após a realização de um Teste ANOVA de uma via entre os grupos se estabeleceram diferenças significativas, sendo representadas por: $*p < 0.05$. As barras representam o Erro Padrão e o eixo Y plota a frequência de ocorrência da mutação rs2285666.

Tabela 3: Frequências de ocorrência dos SNPs em amostras de nasofaringe com a presença de diferentes variantes genômicas de SARS-CoV-2.

	B.1.1.28	Zeta	Gamma	Omicron
rs2285666	13%	33%	39%	38%
rs4646116	-	-	-	1.4%
rs2070788	83%	70%	79%	86%
rs383510	83%	89%	82%	81%

Segundo Sheikhian e colaboradores (2023) quando na ausência do SNP rs2285666 ocorre um aumento no índice de mortalidade por COVID-19 frente as variantes geneticamente próximas da cepa selvagem, e a frequência do genótipo com rs2285666 é significativamente superior na presença da variante Ômicron. Visto que no período em que B.1.1.28 era mais prevalente (abril até outubro de 2021) havia um elevado número de mortes (LACEN-SC, 2021; MS, 2024), e dentre as variantes identificadas no presente trabalho ela é a mais próxima da cepa original, a baixa frequência de rs2285666 observada frente à essa variante é coerente, assim como a alta frequência quando na presença da Ômicron, indo de acordo com o estudo supracitado.

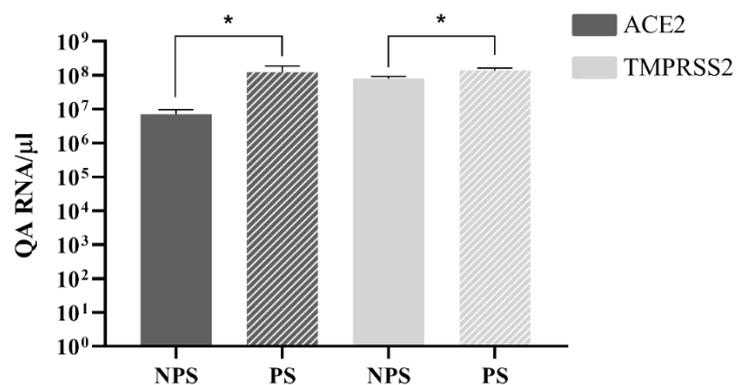
Além disso, rs2285666 quando presente aumenta a afinidade da *Spike* com a ACE2 (Alimoradi *et al.*, 2022). Então, ao observar os resultados das Figuras 8 e 10 percebe-se que nas

amostras em que Zeta, Gamma e Ômicron foram identificadas foi observada uma menor expressão de ACE2 (Figura 8) e uma maior frequência de rs2285666 (Figura 11), complementando a hipótese de que uma maior afinidade de ligação entre ACE2 e *Spike* pode levar a uma menor expressão de ACE2. Ainda, na única amostra em que rs4646116 foi detectada a variante Ômicron também foi detectada, e como esse SNP também aumenta a afinidade de ligação *Spike*/ACE2, vai de acordo com a hipótese anteriormente constatada.

4.5 EXPRESSÃO DE ACE2 E TMPRSS2 EM PROFISSIONAIS E NÃO PROFISSIONAIS DE SAÚDE

Profissionais da saúde foram tidos como um importante grupo sentinela para a vigilância de infecções por SARS-CoV-2 e para o monitoramento de variantes genômicas do vírus (Padilha *et al.*, 2023). Visto que 88 amostras analisadas no presente estudo são providas de profissionais de saúde se viu a oportunidade de analisar as diferenças na expressão, e na genômica, de ACE2 e TMPRSS2 entre profissionais e não profissionais da saúde. Não houve diferença significativa quando comparando a frequência dos SNPs entre os grupos, no entanto profissionais da saúde demonstraram uma maior expressão de ACE2 ($p < 0.05$) e TMPRSS2 ($p < 0.05$), como é mostrado na Figura 12.

Figura 12: Expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2 em amostras de nasofaringe de não profissionais e profissionais da saúde.



Comparação dos níveis de expressão de ACE2 e TMPRSS2 em amostras de nasofaringe detectadas em não profissionais da saúde (NPS) e profissionais da saúde (PS). Após a realização de um Teste *T* de *Student* entre os grupos se estabeleceram diferenças significativas, sendo representadas por: $*p < 0.05$. As barras representam o Erro Padrão e o eixo Y plota a Quantidade Absoluta de RNA por microlitro de amostra.

Apesar de não ter evidências científicas trazendo uma possível explicação para essa diferença nos níveis de expressão, o fato de que durante a pandemia a população de profissionais da saúde estava possivelmente sujeita a uma maior exposição ao SARS-CoV-2 faz com que um contato prévio com o vírus seja muito provável, e como visto anteriormente, tendo contato com as partículas virais de SARS-CoV-2 a expressão de ACE2 e TMPRSS2 é estimulada, sendo uma possível explicação a diferença observada na Figura 12. No entanto, dados de aderência ao uso de máscara, vacinação contra SARS-CoV-2 e aderência às políticas públicas epidemiológicas não foram obtidos, mas seriam fatores que poderiam influenciar nessa diferença de perfil expressional dos receptores (Angeli *et al.*, 2022; Rader *et al.*, 2021).

5 CONCLUSÃO

Com o presente estudo foi possível demonstrar que aparentemente a expressão de ACE2 e TMPRSS2 varia de acordo com a variante genômica de SARS-CoV-2 que está promovendo a infecção, podendo influenciar na patogenia da infecção viral; e que presumivelmente profissionais da saúde apresentam uma maior expressão de ambos os receptores, sendo a maior exposição ao SARS-CoV-2 um potencial fator indutor de aumento de expressão.

6 PERSPECTIVAS

A realização de estudos com uma amostragem maior, e mais diversificada, buscando avaliar a dinâmica de expressão e polimorfismos em ACE2 e TMPRSS2 em outros tecidos do corpo humano seria muito benéfica. Além disso, para melhor explorar a possível diferença entre a expressão de ambas as proteínas entre profissionais e não profissionais da saúde seria crucial a obtenção de dados de vacinação, infecções prévias e aderência ao uso de máscara e políticas públicas durante a pandemia, sendo que todos possivelmente influenciam nessa comparação. Outro fator a ser estudado é a dinâmica de adaptação das variantes de SARS-CoV-2 ao seu hospedeiro, que ao buscar o sucesso, e a prolongação do seu ciclo viral poderiam ocasionar infecções mais brandas, mantendo seu hospedeiro vivo, e podendo impactar no comportamento de ACE2 e TMPRSS2.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcantara, L. C. J. *et al.* **SARS-CoV-2 epidemic in Brazil: how the displacement of variants has driven distinct epidemic waves.** *Virus Research*, v. 57, jul. 2022.
- Alimoradi, N. *et al.*, **SNPs of ACE1 (rs4343) and ACE2 (rs2285666) genes are linked to SARS-CoV-2 infection but not with the severity of disease.** *Virology Journal*, v. 19, p. 48. mar. 2022.
- Amirouche, A. *et al.* **TRIZOL-based RNA extraction for detection protocol for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019.** *New Microbes and New Infections*, v. 41. 2021.
- Angeli, F. *et al.* **COVID-19, vaccines and deficiency of ACE2 and other angiotensinas.** **Closing the loop on the "Spike effect".** *European Journal of Internal Medicine*, v. 103, p. 23-28. jun. 2022.
- Antalis, T. M.; Bugge, T. H.; Wu, Q. **Membrane-Anchored Serine Proteases in Health and Disease.** *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 99, p. 1-50. 2011.
- Barton, M. I. *et al.* **Effects of common mutations in the sars-cov-2 spike rbd and its ligand the human ace2 receptor on binding affinity and kinetics.** *eLife*, v. 10, ago. 2021.
- Benetti, E. *et al.* **ACE2 gene variants may underlie interindividual variability and susceptibility to COVID-19 in the Italian population.** *European Journal of Human Genetics*, v. 28, p. 1602-1614, jul. 2020.
- Benigni, A.; Cassis, P.; Remuzzi, G. **Angiotensin II revisited: New roles in inflammation, immunology and aging.** *EMBO Molecular Medicine*, v. 2, jul. 2010.
- Beyerstedt, S.; Barbosa Casaro, E.; Bevilaqua Rangel, É. **COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 40, p. 905-919, jan. 2021.
- Boletim de Vigilância Genômica do SARS-CoV-2, **Laboratório Centra de Saúde Pública de Santa Catarina.** 14 jun. 2021. Disponível em: http://lacen.saude.sc.gov.br/arquivos/boletim_2-genomica-lacen-dive-16.pdf. Acesso em: 10 fev. 2024.
- Brant, A. C. *et al.* **SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication.** *Cell & Bioscience*, v. 11, jul. 2021.
- Carabelli, A. M. *et al.* **SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 21, p. 162-177, jan. 2023.
- Cioccarelli, C. *et al.* **IL1 β Promotes TMPRSS2 Expression and SARS-CoV-2 Cell Entry Through the p38 MAPK-GATA2 Axis.** *Frontiers in Immunology*, v. 12, dez. 2021.
- Clinckemalie, L. *et al.* **Androgen Regulation of the TMPRSS2 Gene and the Effect of a SNP in an Androgen Response Element.** *Molecular Endocrinology*, v. 27, p. 2028-2040, dez. 2013.
- Coronavírus Brasil, Painel Coronavírus. **Ministério da Saúde.** 10 fev. 2024. Disponível em <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em 10 fev. 2024.
- Deng, G. F. *et al.* **The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins** **Cell Research.** *Cell Research*, v. 11, p. 165-180, sep. 2001.
- Deng, H.; YAN, X.; YUAN, L. **Human genetic basis of coronavirus disease 2019.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, p. 344, sep. 2021.
- Dong, M. *et al.* **ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 131, ago. 2020.

- Domingo, E. *et al.*, **Quasispecies dynamics and RNA virus extinction**. *Virus Research*, v. 107, p. 129-139, dec. 2004.
- Gasmi, A. *et al.* **Neurological Involvements of SARS-CoV2 Infection**. *Molecular Neurobiology*, v. 58, p. 944-949, oct. 2021.
- Glotov, O. S. *et al.* Genetic Risk Factors for the Development of COVID-19 Coronavirus Infection. **Russian Journal of Genetics**, v. 57, p. 878–892, ago. 2021.
- Grisard, H. B. S. **Avaliação da expressão gênica da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e Serina Protease da Proteína Transmembrana 2 (TMPRSS2) em pacientes antes e após infecção por SARS-CoV-2**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 39. 2022.
- Han, P. *et al.* **Receptor binding and complex structures of human ACE2 to spike RBD from omicron and delta SARS-CoV-2**. *Cell*, v. 185, p. 630-640, fev. 2022.
- Hartenian, E. *et al.* **The molecular virology of coronaviruses**. *J. Biol. Chem*, v. 295, p. 12910-12934, jul. 2020.
- Hoffmann, M. *et al.* **SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor**. *Cell*, v. 181, p. 271-280, abr. 2020.
- Hu, B. **Spike mutations contributing to the altered entry preference of SARS-CoV-2 omicron BA.1 and BA.2**. *Emerging Microbes & Infections*, v. 11, p. 2275-2287, jun. 2022.
- Jackson, C. B. *et al.* **Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 23, p. 3-20. out. 2021.
- Katsumura, K, R. *et al.* **GATA Factor-Dependent Positive-Feedback Circuit in Acute Myeloid Leukemia Cells**. *Cell Reports*, v. 16, p. 2428-2441. ago. 2016.
- Korobova, Z, R. **Cytokine Profiling in Different SARS-CoV-2 Genetic Variants**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, out. 2022.
- Kuba, K.; Imai, Y.; Penninger, J. M. **Multiple functions of angiotensin-converting enzyme 2 and its relevance in cardiovascular diseases**. *Circulation Journal*, v. 77, p.301-308. 2013.
- Laue, M. *et al.* **Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures**. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.
- Lieberman, N. A. P. *et al.* **In vivo antiviral host transcriptional response to SARS-CoV-2 by viral load, sex, and age**. *PLoS Biology*, v. 18, set. 2020.
- Lin, L. *et al.* **Expression of ACE2, TMPRSS2, and SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in gastrointestinal tissues from COVID-19 patients and association with gastrointestinal symptoms**. *The American Journal of the Medical Sciences*, v. 366, p. 430-437, dez. 2023.
- Lubel, J; Garg, M. *et al.* **Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Covid-19**. *New England Journal of Medicine*, v. 382, jun. 2020.
- Malvankar, S. *et al.* **Modulation of various host cellular machinery during COVID-19 infection**. *Reviews om Medical Virology*, v. 33, nov. 2023.
- Meng, B. *et al.* **Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity**. *Nature*, v. 603, mar. 2022.
- Muñoz-Durango, N. *et al.* **Role of the renin-angiotensin-aldosterone system beyond blood pressure regulation: Molecular and cellular mechanisms involved in end-organ damage during arterial hypertension**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, p. 797, jul. 2016.
- Ni, W. *et al.* **Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19**. *Critical Care BMC*, v. 24, p. 422, jul. 2020.
- Nishimura, H. **Renin-angiotensin system in vertebrates: phylogenetic view of structure and function**. *Anatomical Science International*, v. 92, p. 215-247, mar. 2017.

- Padilha, D. A. *et al.* **Emergence of Two Distinct SARS-CoV-2 Gamma Variants and the Rapid Spread of P.1-like-II SARS-CoV-2 during the Second Wave of COVID-19 in Santa Catarina, Southern Brazil.** *Viruses*, v. 14, abr. 2022.
- Padilha, D. A. *et al.* **Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 in Healthcare Workers: A Critical Sentinel Group for Monitoring the SARS-CoV-2 Variant Shift.** *Viruses*, v. 15, abr. 2023.
- Patel, S. *et al.* **Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies.** *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 94, p. 317–325, out. 2017.
- Rader, B. *et al.* **Mask-wearing and control of SARS-CoV-2 transmission in the USA: a cross-sectional study.** *The Lancet Digital Health*, v. 3, p. E148-E157. jan. 2021.
- Ravaioli, S. *et al.* **ACE2 and TMPRSS2 Potential Involvement in Genetic Susceptibility to SARS-COV-2 in Cancer Patients.** *Cell Transplantation*, v. 29. out. 2020.
- Rossi, Á. D. *et al.* **Association between ACE2 and TMPRSS2 nasopharyngeal expression and COVID-19 respiratory distress.** *Scientific Reports*, v. 11, dez. 2021.
- Rüster, C.; Wolf, G. **Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease.** *Journal of the American Society of Nephrology*, nov. 2006.
- Sheikhian, F. **The impact of ACE2 polymorphisms (rs1978124, rs2285666, and rs2074192) and ACE1 rs1799752 in the mortality rate of COVID-19 in different SARS-CoV-2 variants.** *Human Genomics*, v. 54, jun. 2023.
- Shen, L. W. *et al.* **TMPRSS2: A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections.** *Biochimie*, v. 142, p. 1-10, nov. 2017.
- Singh, H. O. *et al.* **ACE2 and TMPRSS2 polymorphisms in various diseases with special reference to its impact on COVID-19 disease.** *Microbial Pathogenesis*, v. 150, jan. 2021.
- Tarek, M. *et al.* **Bioinformatics analysis of allele frequencies and expression patterns of ace2, tmprss2 and furin in different populations and susceptibility to SARS-CoV-2.** *Genes*, v. 12, jul. 2021.
- Tomlins, S. A. *et al.* **Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer.** *Science*, v. 310, p. 644-648, oct. 2005.
- Tracking SARS-CoV-2 variants, **World Health Organization (WHO)**, 18 jan. 2023.
Disponível em: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>. Acesso em: 06 fev. 2024.
- Turner, A. J.; HISCOX, J. A.; HOOPER, N. M. **ACE2: from vasopeptidase to SARS virus receptor.** *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 25, p. 291-294, jun. 2004.
- Vieira, B. F. B. *et al.* **Comparative analysis of SARS-CoV-2 variants Alpha (B.1.1.7), Gamma (P.1), Zeta (P.2) and Delta (B.1.617.2) in Vero-E6 cells: ultrastructural characterization of cytopathology and replication kinetics.** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 28, dez. 2023.
- V'kovski, P. *et al.* **Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, p. 155-170, out. 2020.
- Wu, A. *et al.* **Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China.** *Cell Host & Microbe*, v. 27, p. 325-328, mar. 2020.
- Zhao, H. *et al.* **SARS-CoV-2 Omicron variant shows less efficient replication and fusion activity when compared with Delta variant in TMPRSS2-expressed cells.** *Emerging Microbes & Infections*, v. 11, p. 277-283, dez. 2021.
- Zhang, X. *et al.* **SARS-CoV-2 Omicron strain exhibits potent capabilities for immune evasion and viral entrance.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, p. 430. 2021.

8 ANEXO A – TCLE DO PROJETO CAAE: 31521920.8.0000.0121 (UFSC)

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Centro de Ciências Biológicas
CEP: 88040-970 - Florianópolis - Santa Catarina

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os Pacientes Internados

Apresentação:

Pesquisa proposta pela Força Tarefa de Diagnóstico da COVID-19 integrada por pesquisadores do CCS e CCB da UFSC e denominada “**Vigilância e Diagnóstico contínuo do SARS-CoV-2 e avaliação dos genótipos virais circulantes no Estado de Santa Catarina - Sul Brasil**”, a Coordenação do Estudo é da professora Gislaíne Fongaro do Laboratório de Virologia Ambiental/CCB e da professora Maria Luiza Bazzo do Laboratório de biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia/CCS.

Convidamos você a participar deste estudo que segue os preceitos éticos da resolução 466/12. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos e deveres como participante e é elaborado em duas vias, será rubricado em todas as páginas e assinado ao final e uma via ficará com você e outra com os pesquisadores.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com as pesquisadoras. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Objetivo:

O presente estudo tem por objetivo: Diagnosticar, monitorar infecções assintomáticas e sequenciar variantes de SARS-CoV-2 (tipos do vírus) a partir de pacientes e trabalhadores de hospitais da Capital Catarinense, Florianópolis, possibilitando identificar origens e rotas virais essenciais para tomada de decisões no enfrentamento da pandemia.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a: permitir a coleta de uma amostra para fazer o teste molecular que detecta o vírus no organismo. A melhor amostra para o caso de pessoas sem sintomas ou no início da infecção é de dois locais um no final da língua e começo da garganta (região orofaríngea) e outra do final do nariz (nasofaríngea). A coleta da amostra será feita por um profissional treinado. Para cada um dos locais será utilizado um cotonete de cabo longo (*swab*). Essa coleta dura menos de cinco minutos. Nós também pedimos autorização para consultar seu prontuário para obter algumas informações sobre você (idade, local de residência, motivo da internação, doenças que você pode ter, duração dos sintomas e tratamento utilizado) esses dados ajudarão os pesquisadores a entender como o vírus se espalha pela cidade.

Desconfortos, Riscos e Assistência:

A coleta pode ser desconfortável. Dependendo da sua sensibilidade você pode fazer ânsia, quando coletar a amostra do final da língua e começo da garganta amostra (orofaríngea). A coleta do nariz pode causar espirros e muito raramente pode o nariz pode sangrar. Se algum desses desconfortos acontecer vamos parar a coleta imediatamente. Se houver sangramento do nariz vamos aplicar um pouco de gelo para conter o sangramento que é passageiro. Ao se restabelecer você decidirá se quer continuar a coleta ou se prefere desistir de participar do estudo.

Nós tomaremos todas as medidas para manter o sigilo da sua participação, mas o resultado do seu exame será informado ao seu médico. Nesses casos poderá haver possibilidade de quebra de sigilo, uma vez que pode ser necessário tomar medidas de isolamento para proteger você e para evitar que o vírus se espalhe.

Benefícios:

Ao participar desta pesquisa você contribuirá para estudarmos como ocorre a transmissão do coronavírus-2 (SARS-CoV-2) na cidade e caso sua amostra teste positivo, os médicos que estão cuidando de você poderão modificar o seu tratamento. Além disso, os resultados vamos conhecer o tipo de vírus que está causando sua doença com uma técnica chamada de sequenciamento do vírus que vai ver se houve alguma mudança no vírus que circula em Santa Catarina e se há localidades que necessitam de melhor monitoramento.

Sigilo e Privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e que as informações fornecidas somente serão utilizadas em publicações de artigos científicos ou outros trabalhos em eventos científicos, sem nunca haver menção a nomes ou identidade dos participantes. Entretanto, como já mencionamos no item riscos, o seu médico será avisado do resultado do seu exame.

Ressarcimento e Indenização:

As pesquisadoras se comprometem a cobrir despesas comprovadamente resultantes desta pesquisa. Da mesma forma, as pesquisadoras garantirão a indenização diante de eventuais danos decorrentes desta pesquisa.

Liberdade de Recusar ou Retirar o Consentimento:

Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo livre de penalidades.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com Prof. Maria Luiza Bazzo na UFSC, por e-mail marialuizabazzo@gmail.com, pelo telefone (48)37212066 ou pessoalmente no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, junto ao segundo piso do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC/EBSERH.

Ou entre em contato com a professora Gislaine Fongaro pelo e-mail gislainefongaro@gmail.com ou pelo telefone (48)37212957.

Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre sua participação no estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEPSH/UFSC) da UFSC: Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), Rua: Desembargador Vitor Lima, número 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC; CEP 88040400; telefone (48) 3721-6094; e-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br.

Consentimento Livre e Esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _____.

Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante)

Responsabilidade do Pesquisador: Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

9 ANEXO B – SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS PLASMÍDEOS

Tabela 4 Especificações das sequências nucleotídicas dos amplicons de plasmídeos desenhados para a quantificação absoluta dos alvos.

Amplicon	Sequência 5' - 3'
Plasmídeo para quantificação absoluta de ACE2	ATGGATTAAATGAAAGTGAGCTAATGCATGCCATTCTCAATCCTTGCAGCTA CACCAGTTCCCAGGCACTGTCCTTACAAGTGATCCATCCATATTCCATACAA GATCCAACACTTGCTCCAATGATATATCCTTGTTTTCAACTTCAGAAAT
Plasmídeo para quantificação absoluta de TMPRSS2	ATGGCAGAGAGTGCCAAAGCCAGACAAGTTCCTGTTTAATAAAAAATGAAG TGACCTCTGAATCATCTCTAAGAGTAAATCATGCACGGGGAAGCAAAACCA GCCCCATTGTTTTCTTGTA AACGACGTCAAGGACGAAGACCATGTGGATTA GCCGTCTGCCCTCATTGTGCGATAAATCCAGTCCGTGAATACCATCACATTCC CGTACACTCCTGG
Plasmídeo para quantificação absoluta de B2M	TTCGGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCT CTTTCTGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCAC GTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTCCTGAATTGCTATGTGTCTGG GTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAA