

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC**

**PROJETO DE PESQUISA**

**Iniciação Científica**

Diagnóstico e variabilidade Genética do Gene que Codifica a Proteína  
*do Nucleocapsideo de SARS-CoV-2*

**2022**

## **Abstract**

O controle da pandemia causada pelo novo betacoronavírus causador da Síndrome Respiratória Severa Aguda (SARS-CoV-2), tem como base a vacinação, associada a diminuição da circulação do vírus por distanciamento social e bloqueio da transmissão após diagnóstico. Diferente de outras doenças infecciosas, onde as vacinas impedem a transmissão do agente infeccioso, no caso do SARS-CoV-2, as vacinas disponíveis e a infecção natural resultam na diminuição da morbidade associada a infecção pelo vírus, diminuindo as internações e óbitos, mas não impedem sua transmissão. Além disso, a imunidade adquirida contra o vírus tem duração de até seis meses, a partir do qual há aumento de risco de infecção com casos graves. Nesse contexto, é importante monitorar a evolução genética do SARS-CoV-2. Assim, com o intuito de investigar a variabilidade genética do gene que codifica a proteína do Nucleocapsídeo de SARS-CoV-2, este projeto tem por objetivo amplificar o gene por técnica de RT-PCR convencional a partir de amostras de RNA positivas para SARS-CoV-2, cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz em julho e novembro de 2021, para sequenciamento pelo método de Sanger.

## **CONTEXTO ATUAL, DESAFIOS E JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA**

O novo coronavírus SARS-CoV-2, causador da Síndrome Aguda Respiratória Severa (SARS), denominada de COVID-19, constitui-se na mais recente pandemia, com a notificação de milhões de casos e milhares de óbitos desde sua identificação na China em dezembro de 2019. A estrutura do sistema de saúde da China permitiu o rápido reconhecimento de uma Síndrome Aguda Respiratória Severa com características específicas, cujo agente etiológico foi identificado com utilização de ferramentas biotecnológicas, no intervalo de um mês. A partir da identificação do SARS-CoV-2 foram desenvolvidos testes de diagnóstico molecular específicos e as formas de transmissão e disseminação do vírus também foram rapidamente descritas. As informações sobre o novo coronavírus foram notificadas à OMS no início de janeiro de 2020.

O genoma de SARS-CoV-2 é composto de uma molécula de RNA de fita única e orientação positiva, com um tamanho de, aproximadamente, 30 kilobases, e codifica proteínas virais a partir de 14 transcritos (Chen, Liu, and Guo, 2020; Lu et al., 2020). A replicação e transcrição do genoma viral ocorre a partir da ação de um complexo de proteínas associado a RNA polymerase dependente de RNA, endonucleases e exonucleases, classificadas dentre as 16 proteínas não estruturais (Nsp1-16). As proteínas não estruturais 1 a 16 do vírus, são originadas da atividade auto-proteolítica de uma única poliproteína sintetizada a partir do transcrito da região 5' do genoma viral (Chen et al., 2020). Os outros 13 transcritos são expressos na porção 3' do genoma viral, incluindo as quatro proteínas estruturais, Spike (S), proteína do envelope (E), de membrana (M) e do nucleocapsídeo (N). As proteínas estruturais são parte do capsídeo e do processo de encapsidação do genoma viral e participam da invasão das células humanas por meio da enzima conversora de angiotensina humana (ACE2), que está presente em diversos tecidos e órgãos, incluindo pulmão, rins, e em alta concentração nas glândulas salivares (Xu et al., 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre através do contato com saliva, aerossóis ao falar, cantar, respirar, e secreções do trato superior de um indivíduo infectado, que podem contaminar os olhos, as vias respiratórias e a boca de um indivíduo exposto (Patel, 2020). As manifestações clínicas resultantes da infecção por SARS-CoV-2 tem um amplo espectro, desde a ausência de sintomas a febre, dores do corpo, dores de cabeça, conjuntivite, sintomas associados à alterações no sistema cardiovascular, mudanças nas funções do fígado, rins, perda de olfato e paladar, desconforto abdominal, diarreia, e manifestações severas incluindo doenças cardíacas, distúrbios da coagulação, e SARS (Archer, Sharp, and Weir, 2020; Chate et al., 2020; Fried et al., 2020; Jin et al., 2020; Lovato and de Filippis, 2020; Qi et al., 2020; Seah and Agrawal, 2020; Zheng et al., 2020). Os indivíduos que apresentam sintomas associados a alterações do trato respiratório superior apresentam risco aumentado de transmissão do vírus (Yang, Gui, and Xiong, 2020).

Estudos realizados com outros coronavírus que infectam humanos, como o SARS-CoV-1 e o MERS demonstraram que a proteína *Spike* é o antígeno dominante do vírus em respostas imunológicas (Du et al., 2009; Du et al., 2013). Com os conhecimentos prévios adquiridos, rapidamente foram desenvolvidas diferentes estratégias para produção de vacina contra SARS-CoV-2, com base na proteína *Spike* (Creech, Walker, and Samuels, 2021). Assim, com exceção da vacina Coronavac que corresponde ao vírus inteiro SARS-CoV-2 crescido em células de rim de macaco verde (VERO) e inativado, todas as outras vacinas, independente do tipo de tecnologia, possuem como alvo molecular a proteína *Spike*. As vacinas disponíveis no Brasil são a AstraZeneca e a Janssen com tecnologia de utilização de vetor adenovírus não replicante e a Pfizer com tecnologia de vacina de mRNA. A ocorrência de reinfecção após infecção natural por SARS-CoV-2 ou vacinação pode ocorrer em média a partir de quatro meses após a primeira infecção (Nainu et al., 2020; Townsend et al., 2021). A constante circulação de SARS-CoV-2, mesmo na população vacinada contribui para a evolução dos mesmos no sentido de escapar à imunidade adquirida pela vacinação ou infecção natural, o que indica a necessidade de vigilância epidemiológica constante da circulação do vírus para evitar surtos epidêmicos e a seleção de linhagens que escapam a vacinação.

O primeiro caso de COVID-19 no Brasil foi notificado no final de fevereiro na cidade de São Paulo e, atualmente, há transmissão comunitária em todos os Estados com milhares de acometidos, com medidas de controle da circulação do vírus que envolvem restrições na circulação de pessoas. A recomendação da OMS para que possa haver flexibilização do distanciamento físico com maior segurança, consiste em considerar a diminuição das internações, da ocorrência de casos fatais e dos casos de infecção até praticamente zero. Com a vacinação, está ocorrendo a diminuição das internações e óbitos por SARS-CoV-2, mas a circulação do vírus ainda ocorre, mesmo na população vacinada. Portanto preconiza-se a realização de diagnóstico em massa para identificação de indivíduos infectados e os contatos deles, que devem ser orientados a ficarem em isolamento, para evitar a disseminação do vírus. Com o intuito de investigar a evolução da proteína do Nucleocapsídeo de SARS-CoV-2, este projeto tem por objetivo principal amplificar o gene que codifica a proteína do Nucleocapsídeo por RT-PCR qualitativo em termociclador convencional.

## **OBJETIVOS E METAS**

Avaliar a variabilidade genética do gene que codifica a proteína do Nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 em amostras de RNA de indivíduos com diagnóstico positivo cedidas por pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz. Os objetivos específicos são:

- 1) Desenhar oligonucleotídeos que permitam à amplificação de fragmentos genômicos correspondentes a proteína do Nucleocapsídeo de SARS-CoV-2, por técnica de RT-PCR convencional;
- 2) Sequenciamento dos fragmentos de PCR obtidos em (1) por técnica enzimática de Sanger;
- 3) Avaliar os resultados obtidos para gerar e disseminar conhecimento científico em revistas especializadas de divulgação científica e popular.

### CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

2022				2023			
ETAPAS/MÊS	Set-Out	Nov.	Dez.	Jan/Fev	Mar/Abril	Mai/Jun	Jul/Ago.
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X
Coleta e análise de dados					X	X	X
Escrita científica							X
Relatórios					X		X

### REFERÊNCIAS

- Archer, S.L., Sharp, W.W. and Weir, E.K., 2020. Differentiating COVID-19 Pneumonia from Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and High Altitude Pulmonary Edema (HAPE): Therapeutic Implications. *Circulation*.
- Chate, R.C., Fonseca, E., Passos, R.B.D., Teles, G., Shoji, H. and Szarf, G., 2020. Presentation of pulmonary infection on CT in COVID-19: initial experience in Brazil. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia* 46, e20200121.
- Chen, Y., Liu, Q. and Guo, D., 2020. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology* 92, 418-423.
- Creech, C.B., Walker, S.C. and Samuels, R.J., 2021. SARS-CoV-2 Vaccines. *JAMA* 325, 1318-1320.
- Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B.J. and Jiang, S., 2009. The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* 7, 226-36.
- Du, L., Zhao, G., Kou, Z., Ma, C., Sun, S., Poon, V.K., Lu, L., Wang, L., Debnath, A.K., Zheng, B.J., Zhou, Y. and Jiang, S., 2013. Identification of a receptor-binding domain in the S protein of the novel human coronavirus Middle East respiratory syndrome coronavirus as an essential target for vaccine development. *J Virol* 87, 9939-42.
- Fried, J.A., Ramasubbu, K., Bhatt, R., Topkara, V.K., Clerkin, K.J., Horn, E., Rabbani, L., Brodie, D., Jain, S.S., Kirtane, A., Masoumi, A., Takeda, K., Kumaraiah, D., Burkhoff, D., Leon, M., Schwartz, A., Uriel, N. and Sayer, G., 2020. The Variety of Cardiovascular Presentations of COVID-19. *Circulation*.
- Jin, X., Lian, J.S., Hu, J.H., Gao, J., Zheng, L., Zhang, Y.M., Hao, S.R., Jia, H.Y., Cai, H., Zhang, X.L., Yu, G.D., Xu, K.J., Wang, X.Y., Gu, J.Q., Zhang, S.Y., Ye, C.Y., Jin, C.L., Lu, Y.F., Yu, X., Yu, X.P., Huang, J.R., Xu, K.L., Ni, Q., Yu, C.B., Zhu, B., Li, Y.T., Liu, J., Zhao, H., Zhang, X., Yu, L., Guo, Y.Z., Su, J.W., Tao, J.J., Lang, G.J.,

- Wu, X.X., Wu, W.R., Qv, T.T., Xiang, D.R., Yi, P., Shi, D., Chen, Y., Ren, Y., Qiu, Y.Q., Li, L.J., Sheng, J. and Yang, Y., 2020. Epidemiological, clinical and virological characteristics of 74 cases of coronavirus-infected disease 2019 (COVID-19) with gastrointestinal symptoms. *Gut* 69, 1002-1009.
- Lovato, A. and de Filippis, C., 2020. Clinical Presentation of COVID-19: A Systematic Review Focusing on Upper Airway Symptoms. *Ear, nose, & throat journal*, 145561320920762.
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W. and Tan, W., 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395, 565-574.
- Nainu, F., Abidin, R.S., Bahar, M.A., Frediansyah, A., Emran, T.B., Rabaan, A.A., Dhama, K. and Harapan, H., 2020. SARS-CoV-2 reinfection and implications for vaccine development. *Hum Vaccin Immunother* 16, 3061-3073.
- Patel, J., 2020. Transmission routes of SARS-CoV-2. *Journal of dental sciences*.
- Qi, X., Liu, C., Jiang, Z., Gu, Y., Zhang, G., Shao, C., Yue, H., Chen, Z., Ma, B., Liu, D., Zhang, L., Wang, J., Xu, D., Lei, J., Li, X., Huang, H., Wang, Y., Liu, H., Yang, J., Pan, H., Liu, W., Wang, W., Li, F., Zou, S., Zhang, H. and Dong, J., 2020. Multicenter analysis of clinical characteristics and outcome of COVID-19 patients with liver injury. *Journal of hepatology*.
- Seah, I. and Agrawal, R., 2020. Can the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Affect the Eyes? A Review of Coronaviruses and Ocular Implications in Humans and Animals. *Ocular immunology and inflammation* 28, 391-395.
- Townsend, J.P., Hassler, H.B., Wang, Z., Miura, S., Singh, J., Kumar, S., Ruddle, N.H., Galvani, A.P. and Dornburg, A., 2021. The durability of immunity against reinfection by SARS-CoV-2: a comparative evolutionary study. *Lancet Microbe*.
- Xu, J., Li, Y., Gan, F., Du, Y. and Yao, Y., 2020. Salivary Glands: Potential Reservoirs for COVID-19 Asymptomatic Infection. *J Dent Res* 99, 989.
- Yang, R., Gui, X. and Xiong, Y., 2020. Patients with respiratory symptoms are at greater risk of COVID-19 transmission. *Respiratory medicine* 165, 105935.
- Zheng, Y.Y., Ma, Y.T., Zhang, J.Y. and Xie, X., 2020. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nature reviews. Cardiology* 17, 259-260.