

Universidade Federal do ABC
Pós-Graduação em Biosistemas
Projeto de Pesquisa
Iniciação Científica

**Avaliação do gene que codifica a proteína E de SARS-CoV-2 para o
diagnóstico qualitativo por RT-PCR**

Resumo

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA fita simples e sentido positivo, pertencente ao gênero beta-coronavírus e à família *Coronaviridae*. Desde a sua descoberta, em dezembro de 2019 na China, este vírus se disseminou rapidamente ao redor do mundo, infectando milhares de pessoas e levando ao óbito cerca de 2% dos infectados. Uma das formas de evitar a dispersão do vírus é através do diagnóstico e isolamento das pessoas infectadas. O método recomendado pela Organização Mundial da Saúde para identificação do vírus é amplificação de ácidos nucleicos realizada em equipamentos capazes de identificar a presença do vírus em tempo real. A grande dificuldade na realização deste diagnóstico é o alto custo dos materiais utilizados, que são geralmente importados. Além disso, este método não possibilita a caracterização molecular do vírus, a fim de distinguir possíveis mutações. Considerando as limitações diagnósticas e o alto índice de casos subnotificados da COVID-19 no Brasil, é de extrema importância o desenvolvimento de métodos alternativos que possibilitem a identificação de infecção comunitária em indivíduos sintomáticos e assintomáticos. A caracterização do SARS-CoV-2, mediante sequenciamento genético do vírus permite também a constatação de possíveis mutações que possam interferir na eficácia de vacinas e esquemas terapêuticos. Este projeto tem como objetivo a padronização de método de diagnóstico molecular qualitativo para a detecção do SARS-CoV-2 com utilização do gene que codifica a proteína do envelope viral (E), e a investigação de polimorfismo genético em amostras coletadas em 2021.

Palavras-Chave: SARS-CoV-2, COVID-19, diagnóstico molecular, sequenciamento.

Introdução

SARS-CoV-2: Origem, estrutura e replicação

Os coronavírus são vírus de RNA pertencentes à família *Coronaviridae* e subfamília *Orthocoronaviridae*, existindo quatro gêneros pertencente à essa família: α -CoV e β -CoV, caracterizados por infectar mamíferos; e γ -CoV e δ -CoV, encontrados em aves.¹ A primeira identificação de coronavírus ocorreu na década de 1930 em galinhas, e na década de 1960 foram identificados em humanos.^{1 e 2}

Em janeiro de 2020 uma nova doença respiratória foi descoberta no município de Wuhan, na China.³ Em poucos dias, o agente etiológico desta doença foi elucidado, uma nova espécie de coronavírus humano, causador de sintomas similares ao do vírus da Síndrome Aguda Respiratória Severa (SARS-CoV-1).⁴ O novo coronavírus, designado SARS-CoV-2, se disseminou rapidamente pelo mundo, sendo responsável pela pandemia que já produziu milhares de casos letais e milhões de pessoas infectadas.³

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado que pertence ao grupo dos beta-coronavírus e possui genoma de fita única de RNA de orientação positiva com aproximadamente 30 kilobases. O genoma viral possui 14 produtos gênicos com fase aberta de leitura (Open Reading Frame – ORF), responsáveis pela síntese de proteínas estruturais e não estruturais.^{5 e 6}

A replicação e transcrição do genoma viral são realizados por um complexo de proteínas associadas à RNA polimerase dependente de RNA, endonucleases e exonucleases, produzidas a partir das sequências ORF1a e ORF1b, sintetizadas a partir da extremidade 5' do genoma viral, e que codificam uma poliproteína com propriedade auto-proteolítica e que produz 16 proteínas não estruturais (Nsp1-16).⁵

Os outros 13 produtos gênicos com fase aberta de leitura são expressos a partir da extremidade 3' do genoma viral, incluindo as quatro proteínas estruturais: Spike (S), Envelope (E), Membrane (M) e Nucleocapsid (N). As proteínas estruturais fazem parte do capsídeo e do encapsulamento do genoma

viral, e participam do processo de invasão de células humanas por meio do receptor da enzima conversora de angiotensina humana (ACE2).⁵

Homotrímeros de proteína S formam espículas na superfície viral, as quais são responsáveis pela ligação com os receptores da célula hospedeira.⁷ A proteína M, com três domínios transmembrana, liga-se a proteína N e é responsável pela estrutura curvada da membrana⁸, enquanto a proteína E participa da montagem e liberação da partícula viral, estando envolvida no processo de patogênese.^{9 e 10} A proteína N liga-se ao genoma de RNA do vírus por meio de dois domínios e tem propriedade antagonista ao interferon (IFN) e ao RNA de interferência produzido pela célula para impedir a replicação.^{12 e 13}

O processo de interação do SARS-CoV-2 e a células hospedeiras humanas está associado à presença do receptor ACE-2 (angiotensin-converting enzyme 2), expresso em abundância em células do trato respiratório inferior, endotélio, rins e miócitos¹⁴. A proteína de membrana Spike (proteína S) do SARS-CoV-2 possui cerca de 10 a 20 vezes mais afinidade pelo receptor ACE-2, quando comparado com o SARS-CoV responsável pela epidemia de 2003.¹¹

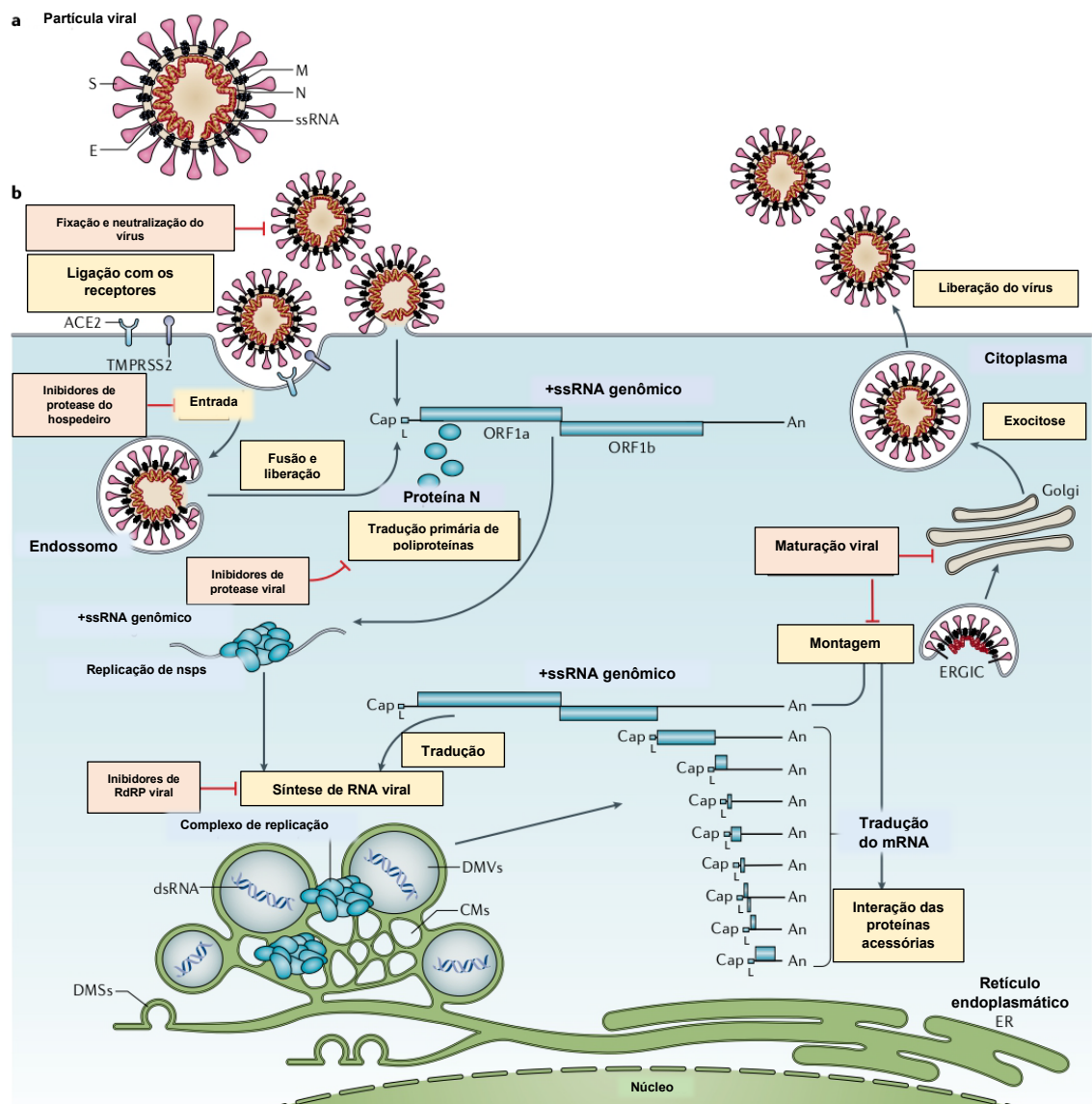
A proteína S interage inicialmente com a serinopeptidase 2 da célula hospedeira (TMpRSS2), gerando a clivagem e ativação da proteína S em duas subunidades: S1 e S2.¹⁴ As mudanças conformacionais e estruturais na proteína S possibilitam a interação com o receptor ACE-2 (subunidade S1) e a fusão entre o envelope viral e a membrana da célula hospedeira (subunidade S2), resultando na entrada da partícula viral via endossomo e na liberação do RNA viral no citoplasma.¹⁵ O as sequencias ORF1a e ORF1b do RNA liberado são imediatamente traduzidas, gerando as poliproteínas pp1a e pp1b, que através de processos pós-traducionais dão origem às proteínas não estruturais Nsp1-16.^{14 e 15}

A Nsp1 é a primeira proteína a ser expressa, e atua diretamente na maquinaria de tradução da célula hospedeira. As demais Nsps (2-16) serão responsáveis por compor o complexo de replicação e transcrição viral (RTC). A síntese de novas moléculas de RNA viral ocorre em organelas associadas ao Retículo Endoplasmático (RE) que conferem um microambiente protetor para a replicação viral. Além da síntese de RNA, o RTC também é responsável pela

transcrição de RNA mensageiro subgenômico que é usado como modelo para a expressão de proteínas estruturais e acessórias.¹⁵

As proteínas estruturais traduzidas se deslocam pelo RE e são transportadas para o Complexo de Golgi onde ocorrerá a associação com o genoma viral replicado e o processo de maturação. As partículas virais são secretadas da célula infectada por exocitose.¹⁵

Figura1: Mecanismo de entrada e replicação do SARS-CoV-2 em célula hospedeira.



Adaptado de V'KOVSKI et al., 2020.

Transmissão e Diagnóstico

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre pelo contato direto entre pessoas infectadas e suscetíveis ou indireto, através da manipulação de objetos e alimentos com a presença de partículas virais que podem contaminar a região dos olhos e boca do indivíduo suscetível. Gotículas de saliva e secreções das vias aéreas superiores de indivíduos infectados expelidos ao falar, espirrar e tossir são as principais fontes disseminadoras do vírus.^{16 e 17}

Os testes para SARS-CoV-2 podem ser realizados por meio de detecção do genoma viral por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), ou por detecção de anticorpos por ELISA ou imunocromatografia (teste rápido).^{18 - 20} O método diagnóstico padrão-ouro, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a detecção de SARS-CoV-2 em pessoas infectadas é a RT-qPCR. Este método consiste na amplificação exponencial de sequências específicas do vírus, detectado por fluorimetria.²¹

O SARS-CoV-2 infecta prioritariamente as células do sistema respiratório, através da interação da proteína viral S com os receptores celulares ACE2. Devido essa interação, o material utilizado para o diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 envolve a introdução de um Swab via nasal e orofaríngea, com armazenamento do material coletado em solução salina.^{20 e 21}

Esta técnica de coleta, além de ser incômoda ao paciente, eleva o risco de contaminação dos profissionais envolvidos, pois pode induzir o espirro ou vômito do paciente infectado, dispersando partículas virais no ambiente. Pode haver lesões nasais, provocadas pela coleta, que desencadeiam a presença de interferentes na amostra, como o sangue. A coleta indevida do material, resultando em quantidades insuficientes de amostra é uma outra limitação que interfere nas análises laboratoriais, elevando o número de falsos-negativos.²²

As condições de transporte e armazenamento da amostra são fatores limitantes, pois há a necessidade de acondicionamento a 4°C. A estrutura laboratorial para o diagnóstico do SARS-CoV-2 em amostras de Swab nasal precisam atender os critérios de nível 3 de biossegurança, havendo poucos laboratórios habilitados no Estado de São Paulo.²²

Outra dificuldade consiste no alto preço dos insumos necessários aos testes que são, na sua maioria importados.²² Portanto, alternativas que permitam a utilização de laboratórios de análises clínicas com infraestrutura básica para diagnóstico molecular, com nível 2 de biossegurança, e que permitam a utilização de insumos produzidos no mercado nacional, auxiliariam na realização dos testes em massa.

Objetivo geral

Desenvolvimento de método diagnóstico qualitativo em termociclador convencional para detecção de SARS-CoV-2 em amostras de saliva humana com a finalidade de investigar mutações no gene que codifica a proteína do envelope do vírus.

Objetivos específicos

1. Padronizar o método diagnóstico qualitativo em termociclador convencional (RT-PCR) com oligonucleotídeos complementares ao gene que codifica a proteína E do SARS-CoV-2 a partir de amostras do Instituto Adolfo Lutz coletadas em novembro de 2021 e comparar com os resultados obtidos na PCR em tempo real para fins de validação do método;
2. Sequenciar as amostras positivas na PCR qualitativa e verificar a existência de mutações no gene que codifica a proteína E do vírus.

Métodos

População de estudo e aspectos éticos

As amostras a serem utilizadas nesse estudo correspondem a RNA extraído de swab nasal de indivíduos da região do ABC paulista, com diagnóstico positivo por RTqPCR, e foram cedidas por pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz, regional de Santo André.

PCR convencional

Serão realizados testes de padronização utilizando oligonucleotídeos correspondentes ao gene que codifica a proteína E do SARS-CoV-2. As condições da reação de PCR serão padronizadas e os produtos de PCR serão visualizados por eletroforese em gel de agarose após coloração brometo de etídeo e exposição em fotodocumentador com transiluminador de luz UV. Os fragmentos de PCR obtidos serão submetidos à sequenciamento pelo método de Sanger, utilizando-se BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer).

Cronograma

	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr-Jun	Jul-Ago
1		X	X			X	X		
2			X	X	X	X	X		
3	X	X	X	X	X	X	X	X	
4	X	X	X	X	X	X	X	X	
5							X		X

1. Levantamento bibliográfico; 2. Aprofundamento teórico; 3. Coleta de dados; 4. Análise de dados; 5. Relatório

Referências

1. DIAS, Ricardo Augusto. Discutindo a origem do SARS-CoV-2 e as contribuições da Medicina Veterinária na prevenção de novas pandemias. **Revista CFMV**, Brasília, v. 1, n. 84, p. 8-13, 2020.
2. Human Coronavirus Types – CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html>. Acesso em: 04 dec. 2020

3. Wu, F., S. Zhao, et al. (2020). "A new coronavirus associated with human respiratory disease in China." Nature 579(7798): 265-269.

Wu, F., S. Zhao, et al. (2020). "Author Correction: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China." Nature 580(7803): E7.
4. Yang, R., X. Gui, et al. (2020). "Patients with respiratory symptoms are at greater risk of COVID-19 transmission." Respir Med 165: 105935.
5. Chen, Y., Q. Liu, et al. (2020). "Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis." J Med Virol 92(4): 418-423.
6. Lu, R., X. Zhao, et al. (2020). "Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding." Lancet 395(10224): 565-574.
7. Beniac, D. R., A. Andonov, et al. (2006). "Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike." Nat Struct Mol Biol 13(8): 751-752.
8. Neuman, B. W., G. Kiss, et al. (2011). "A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology." J Struct Biol 174(1): 11-22.
9. DeDiego, M. L., E. Alvarez, et al. (2007). "A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo." J Virol 81(4): 1701-1713.
10. Nieto-Torres, J. L., M. L. DeDiego, et al. (2014). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis." PLoS Pathog 10(5): e1004077.
11. Kumar S., Nyodu R., Maurya VK, Saxena SK (2020) Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Em: Saxena S. (eds) Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Virologia Médica: Da Patogênese ao Controle de Doenças. Springer, Cingapura. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_3
12. Hurst, K. R., R. Ye, et al. (2010). "An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA." J Virol 84(19): 10276-10288.

13. Fehr, A. R. and S. Perlman (2015). "Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis." Methods Mol Biol 1282: 1-23.
14. UDDIN, Mohammed; MUSTAFA, Farah; RIZVI, Tahir A.; LONEY, Tom; SUWAIDI, Hanan Al; AL-MARZOUQI, Ahmed H. Hassan; ELDIN, Afaf Kamal; ALSABEEHA, Nabeel; ADRIAN, Thomas E.; STEFANINI, Cesare. SARS-CoV-2/COVID-19: viral genomics, epidemiology, vaccines, and therapeutic interventions. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 1-18, 10 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v12050526>.
15. V'KOVSKI, Philip; KRATZEL, Annika; STEINER, Silvio; STALDER, Hanspeter; THIEL, Volker. Coronavirus biology and replication: implications for sars-cov-2. *Nature Reviews Microbiology*, [S.L.], p. 1-16, 28 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.
16. Patel, J. (2020). "Transmission routes of SARS-CoV-2." J Dent Sci.
17. ROTHAN, Hussin A.; BYRAREDDY, Siddappa N.. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. **Journal Of Autoimmunity**, [S.L.], v. 109, p. 1-4, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102433>.
18. MATHURIA, Jitendra Prasad; YADAV, Ramakant; RAJKUMAR. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *Journal Of Infection And Public Health*, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 901-905, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.005>.
19. YOUNES, Nadin; AL-SADEQ, Duaa W.; AL-JIGHEFEE, Hadeel; YOUNES, Salma; AL-JAMAL, Ola; DAAS, Hanin I.; YASSINE, Hadi. M.; NASRALLAH, Gheyath K.. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 2-27, 26 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v12060582>.
20. KHURSHID, Zohaib; ASIRI, Faris Yahya Ibrahim; WADAANI, Hamed Al. Human Saliva: non-invasive fluid for detecting novel coronavirus (2019-ncov). *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, [S.L.], v.

17, n. 7, p. 1-4, 26 mar. 2020. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17072225>.

21. **OMS: Coronavirus disease (COVID-19): Vaccines.** Disponível em:
([https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines)) Acesso em: 01 dec. 2020
22. ANVISA, Ministério da Saúde. Disponível em: (<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/fique-por-dentro-do-mapa-das-vacinas-em-teste-no-brasil>) Acesso em: 05 dec. 2020