

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Henrique Borges da Silva Grisard

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

Florianópolis

2022

Henrique Borges da Silva Grisard

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 submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo
Coorientador(a): Dr. Marcos André Schörner

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
Através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Grisard, Henrique

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 / Henrique Grisard ; orientador, Maria Luiza Bazzo, coorientador, Marcos André Schörner, 2022.

38 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. SARS-CoV-2. 3. ACE2. 4. TMPRSS2. 5. Infecção viral. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Schörner, Marcos André. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Henrique Borges da Silva Grisard

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

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 30 de Setembro de 2022.

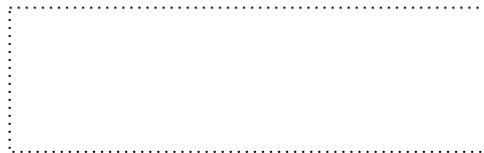


Profa. Dra. Daniela Cristina de Toni
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca examinadora



Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo
Universidade Federal de Santa Catarina
Orientadora



Prof. Dr. Glauber Wagner
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro Titular



Profa. Dra. Thais Cristine Marques Sincero
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro Titular



Me. Bibiana Paula Dambrós
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro Suplente

Florianópolis, 2022.

Dedico esse estudo a todos que me apoiaram incondicionalmente não só na minha trajetória acadêmica, mas também na minha trajetória de vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fabiane e Edmundo, e minha irmã, Isabella, por terem me dado a oportunidade e a estrutura para poder chegar aonde cheguei, e por terem me apoiado em todos os momentos ao longo da minha trajetória;

À Julia Kinetz Wachter, por além de ter auxiliado na execução técnica do trabalho, sempre esteve do meu lado me fazendo uma pessoa, e um profissional, melhor.

À minha “zé ruela” canina, Milly, por todos os dias, independente da hora e do dia, abanar o rabinho com uma felicidade radiante quando eu chegar em casa;

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

À minha orientadora, Profa. Maria Luiza Bazzo, por ter me aceitado no seu laboratório em meio à pandemia e ter me dado liberdade para aprender em todas as áreas do laboratório; além de todas as conversas e ensinamentos, que nem sempre eram estritamente técnicos e sim pessoais, e por isso só tenho a agradecer pelo apoio;

A todos da equipe do LBMMS, pela parceria em todos os momentos, momentos bons, momentos ruins, o “covidão”, o cafezão, e muito mais. Mas principalmente gostaria de agradecer à Manoela Valmorbidia, o Fernando Hartmann Barazzetti e o Marcos André Schörner por terem me acolhido quando entrei no laboratório, por terem deixado com que eu “colocasse a mão na massa”, mas principalmente pela amizade e parceria;

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

À Evelise Maria Nazari, por ter me orientado no início da minha vida acadêmica, levo seus ensinamentos e lições de vida comigo;

E ao meu esporte, a vela (ou iatismo), por ter me ensinado objetividade e tomadas rápidas de decisão, além me permitir ligar a vela com todas as decisões em minha vida.

RESUMO

A emergência do novo coronavírus, SARS-CoV-2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), tornou-se rapidamente uma ameaça à saúde mundial. A doença causada por esse coronavírus é denominada COVID-19 (do inglês *Coronavirus Disease 2019*), sendo o agente etiológico transmitido pelas vias aéreas. Sua patogenia varia desde assintomática até uma síndrome respiratória aguda grave e uma múltipla falência dos órgãos, podendo levar à morte. Para ocorrer a infecção é necessário que a proteína de superfície do envelope viral, denominada *Spike* (S), ligue-se ao receptor celular, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), e sofra a ação da serina protease da transmembrana 2 (TMPRSS2) permitindo a entrada de SARS-CoV-2 na célula do hospedeiro. Visto que ACE2, além do seu papel de importância na infecção viral, faz parte do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS), convertendo Angiotensina II (Ang II), um vasoconstritor potente quando não convertida por ACE2, em Angiotensina 1-7 (Ang 1-7), um vasodilatador; e TMPRSS2 ser necessária para o andamento do processo infeccioso, essas proteínas vêm sendo foco de estudos que buscam correlacionar a expressão gênica dessas proteínas com o desenvolvimento sintomático da COVID-19. Porém esses estudos avaliam amostras de pacientes já infectados pelo vírus, surgindo a questão de como essas proteínas se comportam nos períodos pré e pós a infecção. De forma diversa aos estudos mencionados, neste estudo foram avaliados os níveis de expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2 pré-infecção, durante a infecção e pós-infecção por SARS-CoV-2, em um grupo de 26 pacientes. Para a análise da expressão gênica, amostras de nasofaringe foram coletadas, o RNA total foi extraído, dosado, diluído para igualar as concentrações das amostras e submetido à uma transcrição reversa para produção de cDNA. A partir desse cDNA, dados de quantificação absoluta foram obtidos utilizando a técnica de qPCR em conjunto com padrões plasmidiais. Ao comparar sintomáticos e assintomáticos, os sintomáticos apresentaram uma menor expressão de ACE2 nos períodos pré e pós, tendo aumento no período de infecção; e uma maior expressão de TMPRSS2 previamente infecção, reduzindo nos períodos durante e pós infecção. Os assintomáticos somente demonstraram uma diferença significativa durante a infecção, tendo uma alta expressão de TMPRSS2. Visto a baixa expressão de ACE2 e alta expressão de TMPRSS2 pré infecção em pacientes sintomáticos, é hipotetizado que ocorre uma competição por ACE2 entre SARS-CoV-2 e Ang II, sendo que o vírus com sua rápida dinâmica ocupa a maior parte dos receptores fazendo com que Ang II não fosse convertida por ACE2 surtindo seus efeitos vasoconstritores; e a grande disponibilidade de TMPRSS2 permite uma maior entrada, e consequentemente disseminação viral, visto seu papel crucial nesses processos. Quando dentro do organismo, SARS-CoV-2 aparenta influenciar os padrões expressionais dessas proteínas, como é possível observar pelo aumento de ACE2, e diminuição de TMPRSS2 em pacientes sintomáticos no período de infecção. Dado esses resultados, os níveis expressionais de ambas ACE2 e TMPRSS2 prévios à infecção se demonstram como potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de um quadro sintomático de COVID-19, e a presença de SARS-CoV-2 aparenta modular a expressão dessas proteínas.

Palavras-chave: Infecção viral; parasita-hospedeiro; patogenia; patofisiologia.

ABSTRACT

The emergence of a new coronavirus, SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), quickly became a worldwide threat to public health. COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) is the disease caused by the infectious process caused by this new virus, which has its dissemination via the upper airways. The pathogenicity of this disease varies, going from asymptomatic to severe acute respiratory syndrome and a multiple organ failure, possibly leading to death. For the virus to infect the cell the viral protein Spike (S) needs to bind to the ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2) receptor, which interacts with the TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2) that cleaves the Spike protein, exposing its subdomains S1 and S2, allowing the viral entry in the cell. Knowing that ACE2, besides being of major importance to the SARS-CoV-2 infection process, belongs to the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) converting Angiotensin II (Ang II), a potent vasoconstrictor when not converted by ACE2, into Angiotensin 1-7 (Ang 1-7) a vasodilator; and that TMPRSS2 is necessary to the progress of the viral infection, these proteins have been on the spotlight of studies that aimed to find a relation between their expression levels and the development of COVID-19 symptoms. However, those studies evaluated strictly SARS-CoV-2 positive patients, so in this study, we evaluated the expression levels of both proteins in pre, during, and post-infection nasopharyngeal samples of 26 patients. From these samples, total RNA was isolated, measured, diluted to equalize the concentrations between samples and reverse transcribed into cDNA. Using the cDNA, absolute quantification data was obtained via qPCR alongside plasmid patterns. When comparing symptomatic and asymptomatic patients, the symptomatic presented with a lower ACE2 expression in pre and post infection periods, having an uprise during the infection; and a higher TMPRSS2 levels before the infection, lowering in the following periods. Asymptomatic only showed a significant difference during the infection, with a high TMPRSS2 expression. With the low ACE2, and high TMPRSS2 levels in symptomatic patients before the infection it's suggested that a competition between SARS-CoV-2 and Ang II for ACE2 occurs, but the virus with its rapid dynamic occupies most of the receptors causing Ang II not being converted by ACE2, triggering its vasoconstriction effects; and the vast availability of TMPRSS2 allows a greater viral entrance and dissemination, seeing that it has a crucial part in these processes. When inside the host, SARS-CoV-2 apparently influences the expressional patterns of both proteins, as is possible to observe with the increase of ACE2 and decrease of TMPRSS2 expression levels in symptomatic patients during the infection. Given these results, ACE2 and TMPRSS2 levels previous to the infection show themselves as potential risk factors for the development of a symptomatic COVID-19 case, and the presence of SARS-CoV-2 seems to modulate the expression of both proteins.

Keywords: Viral infection; host-parasite; pathogenicity; pathophysiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Expressão gênica de ACE2 em amostras de nasofaringe de pacientes sintomáticos e assintomáticos nos períodos pré, durante e pós infecção por SARS-CoV-2.....	22
Figura 2 Expressão gênica de TMPRSS2 em amostras de nasofaringe de pacientes sintomáticos e assintomáticos nos períodos pré, durante e pós infecção por SARS-CoV-2.....	23
Figura 3 Comparação da expressão gênica de ACE2 de pacientes sintomáticos e assintomáticos nos diferentes períodos de análise.	24
Figura 4 Comparação da expressão gênica de TMPRSS2 de pacientes sintomáticos e assintomáticos nos diferentes períodos de análise.....	25
Figura 5 Representação hipotética da membrana celular de célula humana com baixa expressão de ACE2 quando infectada por SARS-CoV-2.	26
Figura 6 Representação hipotética da membrana celular de célula humana com alta expressão de ACE2 quando infectada por SARS-CoV-2.	27
Figura 7 Representação hipotética da membrana celular em uma situação de alta entrada viral, acompanhada por um nível expressional elevado de TMPRSS2.	28
Figura 8 Representação hipotética da membrana celular em uma situação de menor entrada viral, acompanhada por um nível expressional reduzido de TMPRSS2.	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Descrição do número de pacientes, pacientes sintomáticos e assintomáticos e o tempo médio entre as coletas nos diferentes períodos de amostragem.	19
Quadro 2 Especificações das sequências nucleotídicas dos amplicons alvo das sondas e primers comerciais utilizados para a qPCR, e dos amplicons presentes nos plasmídeos desenhados para a obtenção da quantificação absoluta.	21

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
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
RAAS	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
RNA	Ácido Ribonucleico
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
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMPRSS2	Serina Protease da Transmembrana 2

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 SARS-COV-2: INFECÇÃO E DOENÇA	15
1.2 ACE2	15
1.3 TMPRSS2	16
1.4 INFLUÊNCIA DE ACE2 E TMPRSS2 NA COVID-19	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 METODOLOGIA.....	17
3.1 AMOSTRAGEM.....	17
3.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	19
3.3 DOSAGEM DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	19
3.4 QPCR E QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA	20
3.5 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA	21
4 RESULTADOS	22
4.1 EXPRESSÃO GÊNICA DE ACE2 E TMPRSS2 EM AMOSTRAS DE NASOFARINGE NOS PERÍODOS PRÉ, DURANTE E PÓS INFECÇÃO	22
4.2 DIFERENÇAS DE EXPRESSÃO DE ACE2 E TMPRSS2 EM AMOSTRAS DE NASOFARINGE DE PACIENTES SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS	23
5 DISCUSSÃO	25
5.1 NÍVEIS EXPRESSIONAIS DE ACE2	25
5.2 NÍVEIS EXPRESSIONAIS DE TMPRSS2.....	28
6 CONCLUSÃO.....	30
7 PERSPECTIVAS.....	30
8 REFERÊNCIAS.....	30
ANEXO A – TCLE DO PROJETO CAAE: 31521920.8.0000.0121 (UFSC)	33
ANEXO B – TCLE DO PROJETO CAAE: 57722022.2.0000.0121 (UFSC).....	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 SARS-CoV-2: INFECÇÃO E DOENÇA

Existe um histórico de infecções causadas por vírus da família Coronaviridae, como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio, causada pelo vírus MERS-CoV (do inglês, *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*), que teve origem na Península Arábica no ano de 2012; e a Síndrome Respiratória Aguda causada pelo SARS-CoV (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*), ambos altamente infectantes e com potencial patogênico. Mais recentemente, ao final de 2019 em Wuhan, na China, foi detectada uma disseminação de um novo coronavírus, denominado SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), que viria a causar a doença denominada COVID-19 (do inglês *Coronavirus Disease 2019*). Essa infecção é transmitida por vias aéreas, possuindo um variado espectro de sintomas, incluindo febre, tosse, e nos casos mais graves, uma síndrome respiratória aguda severa e uma falência múltipla dos órgãos a qual pode vir a ser letal (RAI et al., 2020; VIEIRA; EMERY; ANDRIOLO, 2020)

SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, medindo aproximadamente 125 nm (LAUE et al., 2021) tendo como material genético uma fita simples de RNA senso positivo. O processo de infecção celular pelo vírus se dá pela ligação da proteína viral *Spike* (S) à Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2), que é o receptor presente na membrana da célula do hospedeiro (BENETTI et al., 2020; LIEBERMAN et al., 2020), e pela clivagem da proteína viral *Spike* pela Serina Protease da Transmembrana 2 (TMPRSS2), o que promove a entrada de SARS-CoV-2 na célula. A outra via descrita, a qual utiliza das catepsinas para a clivagem da proteína *Spike* (S) não é tão precisa quanto na via que utiliza a TMPRSS2, fazendo com que o vírus tenda a utilizar da via de ACE2 e TMPRSS2 (JACKSON et al., 2022). Quando dentro da célula, ocorre o desnudamento do capsídeo viral, liberando o RNA viral no citoplasma para ser replicado e transcrito pela maquinaria celular do hospedeiro, e posterior tradução das proteínas estruturais do vírus empacotamento e consequente na exocitose de novas partículas virais (BEYERSTEDT; BARBOSA CASARO; BEVILAQUA RANGEL, 2021; HOFFMANN et al., 2020)

1.2 ACE2

A ACE2 humana é uma metalopeptidase de zinco (FERRARIO; TRASK; JESSUP, 2005) amplamente expressa nos tecidos do corpo humano (BEYERSTEDT; BARBOSA CASARO; BEVILAQUA RANGEL, 2021; NI et al., 2020), tendo uma alta expressão em epitélios vasculares, pulmonares e do intestino delgado (HAMMING et al., 2004). A enzima ACE2 faz

parte do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS), um sistema essencial para a manutenção da tonicidade dos vasos sanguíneos e do equilíbrio hemodinâmico, atuando por meio da regulação da pressão arterial, do volume intersticial, e do balanço de sódio e potássio (MUÑOZ-DURANGO et al., 2016; PATEL et al., 2017). O sistema RAAS é ativado a partir do momento em que ocorre uma queda na pressão arterial e/ou quando ocorre um desbalanço na concentração de sódio (PATEL et al., 2017); nesse momento uma proteína, a Renina, é produzida nos rins e entra na corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, a Renina sofre a ação de mecanismos proteolíticos dando origem à sua forma ativa, a Pro-renina, a qual cliva o Angiotensinogênio, uma glicoproteína hepática circulante, produzindo Angiotensina I, (Ang I). A Ang I sofre uma clivagem por duas vias: por parte da ACE produzindo a Angiotensina II (Ang II), que é a molécula efetora principal do RAAS; ou por parte de endopeptidases, produzindo Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)), que possui efeitos antagonistas à Ang II. Porém Ang-(1-7) pode ser produzida por meio da clivagem de Ang II pelo seu receptor, a ACE2 (MUÑOZ-DURANGO et al., 2016; NISHIMURA, 2017). Ang II quando não convertida por ACE2 pode se ligar aos seus receptores AT1 e AT2, tendo uma maior ligação ao AT1 graças à rápida internalização desse receptor (DENG et al., 2001), aumentando a pressão arterial e podendo surtir efeitos danosos ao hospedeiro (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010; KUBA; IMAI; PENNINGER, 2013; RÜSTER; WOLF, 2006; TURNER; HISCOX; HOOPER, 2004).

1.3 TMPRSS2

Apesar de não ter seu papel fisiológico bem descrito pela literatura (ANTALIS; BUGGE; WU, 2011), TMPRSS2 tem sua expressão modulada por vias androgênicas (BAUGHN et al., 2020) e tem importância reconhecida no processo de entrada de partículas virais na célula humana, tanto do SARS-CoV-2, quanto do SARS-CoV além de participar no processo de carcinogênese de câncer de próstata (TOMLINS et al., 2005). Atuando na clivagem da proteína viral *Spike*, TMPRSS2 permite uma exposição precisa das subunidades S1 e S2 da proteína viral dando segmento ao processo de entrada do vírus no citoplasma (HOFFMANN et al., 2020; ROSSI et al., 2021).

1.4 INFLUÊNCIA DE ACE2 E TMPRSS2 NA COVID-19

Por influenciar diretamente no processo de entrada do vírus na célula, e conseqüentemente na infecção do hospedeiro, tanto ACE2 quanto TMPRSS2 têm sido alvos de diversas pesquisas as quais buscam uma relação entre a quantidade expressa destas proteínas na célula humana e

a patogenia da COVID-19. Um estudo recente demonstrou que uma menor expressão gênica da proteína ACE2 e uma maior expressão de TMPRSS2, no trato respiratório superior, é um fator de risco para maior dificuldade respiratória durante o período de infecção, podendo necessitar, inclusive, de terapia com oxigênio (ROSSI et al., 2021). Porém, os autores utilizaram somente amostras de nasofaringe coletadas em pacientes diagnosticados com COVID-19 quando já estavam iniciando a terapia com oxigênio.

Assim, surgem algumas perguntas: Como são os níveis de expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2 em pacientes antes da infecção? Tais níveis prévios à infecção têm relação com a propensão ao agravamento da doença? O que ocorre com a expressão dessas proteínas no período da infecção? E no pós-infecção? Com base nessas perguntas analisamos, no presente estudo, a expressão de ACE2 e TMPRSS2 em amostras de nasofaringe de pacientes nos períodos pré, durante e após a infecção por SARS-CoV-2, correlacionando-as com os diferentes quadros clínicos e agravos da COVID-19.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2 em pacientes nos períodos pré-infecção, no momento do diagnóstico e pós-infecção por SARS-CoV-2, em pacientes sintomáticos e assintomáticos para a COVID-19.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar a correlação da expressão gênica destes marcadores como fatores preditivos de risco para agravamento da COVID-19 a partir de amostras pré-infecção;
- b. Correlacionar os efeitos da infecção pelo SARS-CoV-2 sobre os níveis de expressão dos marcadores durante o processo infeccioso;
- c. Avaliar a taxa de retorno da expressão dos marcadores para o estágio basal de expressão (pré-infecção) após a infecção pelo SARS-CoV-2;

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAGEM

A partir dos resultados do projeto “Vigilância e Diagnóstico contínuo do SARS-CoV-2 e avaliação dos genótipos virais circulantes no Estado de Santa Catarina - Sul Brasil” CAAE: 31521920.8.0000.0121 (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC), foram fornecidas para este estudo informações clínicas de 26 pacientes, tendo uma amostra de cada paciente em

pelo menos dois dos três períodos analisados (pré, durante ou pós infecção). Esses pacientes foram contemplados nos seguintes grupos de estudo:

1. Pacientes que obtiveram um resultado detectado para SARS-CoV-2, desenvolveram sintomas e possuíam amostras coletadas em, pelo menos, dois dos seguintes períodos: antes, no momento do diagnóstico ou após a detecção da infecção;
2. Pacientes que obtiveram um resultado “detectado” para SARS-CoV-2, não desenvolveram sintomas e possuíam amostras coletadas em, pelo menos, dois dos seguintes períodos: antes, no momento do diagnóstico ou após a detecção da infecção.

Os dados clínicos foram obtidos após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) no momento das coletas do estudo supracitado. A partir desses dados, os participantes que doaram as amostras com potencial de responder aos objetivos do presente projeto foram contactados para convite à participação neste estudo. Em caso de aceite, um novo TCLE (CAAE: 57722022.2.0000.0121 – UFSC) (ANEXO B) foi apresentado solicitando autorização para o estudo da expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2 e preenchimento da situação vacinal contra COVID-19. Os pacientes que assinaram o novo TCLE, tiveram suas amostras incluídas no estudo. No total, foram incluídas nas análises 65 amostras de 26 pacientes, sendo 8 deles assintomáticos e 18 sintomáticos, tendo suas especificações dos tempos de coleta listadas no Quadro 1. Dentre os sintomáticos foram vistos os seguintes sintomas: cansaço, cefaléia, congestão nasal, diarreia, dor articular, dor muscular, febre, perda de olfato/paladar, sinusite, sudorese noturna e tosse. Esses sintomas foram fornecidos no momento da coleta pelo paciente, e consideramos sintomáticos aqueles que descreveram pelo menos um sintoma.

Quadro 1 Descrição do número de pacientes, pacientes sintomáticos e assintomáticos e o tempo médio entre as coletas nos diferentes períodos de amostragem.

Períodos de Amostragem	Pacientes	Pacientes sintomáticos	Pacientes assintomáticos	Tempo médio entre coletas
Pré e COVID-19	11	8	3	14 semanas
COVID-19 e Pós	13	10	3	22 semanas
Pré e Pós	14	8	6	33 semanas
Pré, COVID-19 e Pós	8	6	2	10 semanas (Pré e COVID-19)/ 28 semanas (COVID-19 e Pós)/ 38 semanas (Pré e Pós)

3.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Para avaliar a expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2, as amostras foram inicialmente centrifugadas a 1300 x g por 40 minutos, visando a concentração do conteúdo presente na amostra. Em seguida a extração de RNA total, a partir do sedimento, foi realizada utilizando o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen®, USA), seguindo seu protocolo para células crescidas em suspensão com um total de células entre 5×10^6 e 1×10^7 .

3.3 DOSAGEM DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

Subsequente à extração, o RNA total foi quantificado por meio de espectrofotometria, utilizando o equipamento *Nanovue (General Electric®)*, buscando-se obter as concentrações de RNA das diferentes amostras. Sabidas as concentrações, as concentrações das amostras foram igualadas ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), diluindo com água livre de DNases e RNases as amostras que tinham uma maior concentração. Essa equidade das amostras visa garantir que todas as reações iniciariam com uma mesma quantidade de RNA em uma mesma concentração, necessário para uma análise de expressão gênica visto que se tivermos concentrações distintas não temos embasamento para argumentar se uma expressão é maior ou menor. Após realizada a extração e a dosagem/diluição do RNA total, foi realizada uma reação de transcrição reversa, transcrevendo o RNA humano em um DNA complementar (cDNA), que é necessário para a

qPCR. Para isso, foi utilizado o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®)*, seguindo o protocolo do fabricante.

3.4 qPCR E QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

A técnica de qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real com Transcrição Reversa) foi utilizada para quantificar a expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2 em células humanas. A técnica amplificou o RNA expresso para ambas as proteínas, e para o gene humano (B2M) utilizado para controle de amplificação, sendo que esse último foi escolhido pois é uma região conservada dentro o genoma humano. Essa amplificação foi realizada utilizando sondas específicas para cada alvo, e para isso, foi utilizado o kit *GoTaq® Probe Master Mix (Promega®)* em conjunto com as sondas e primers *PrimePCR™ Probe Assay: ACE2, Human (BioRad®)*, *PrimePCR™ Probe Assay: TMPRSS2, Human (BioRad®)* e *PrimePCR™ Probe Assay: B2M, Human (BioRad®)*, tendo suas especificações listadas no Quadro 1.

Para se obter um valor absoluto de quantificação, foram produzidos comercialmente, e amplificados, plasmídeos com concentrações conhecidas, permitindo a elaboração de uma curva padrão a qual o equipamento termociclador utiliza como referência para quantificar de maneira absoluta a quantidade de RNA presente na amostra. Para cada plasmídeo, a sequência a ser amplificada (listadas no Quadro 1) foi submetida a um BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - NCBI) buscando obter o gene de referência da qual foi obtida. A partir dos genes de referência NM_021804.3 (ACE2), NM_001135099.1 (TMPRSS2) e NM_004048.4 (B2M), foram adicionados 20 pares de base (pb) nas extremidades 5' e 3' da sequência do amplicon das sondas *BioRad®* (listadas no Quadro 1), visando garantir o pareamento dos iniciadores. A sequência dos amplicons, mais os 20 pb em ambos os sentidos, foi a utilizada para a síntese comercial dos plasmídeos, as quais também estão listadas no Quadro 1.

Foram amplificadas triplicatas de cada amostra para cada um dos alvos e dos plasmídeos em três concentrações distintas, para o plasmídeo com a sequência de ACE2 as concentrações utilizadas foram 1^{10} , 1^7 e 1^5 ; para TMPRSS2 e para B2M foram 1^{10} , 1^9 e 1^8 . Após a obtenção dos resultados foram calculados os desvios padrões dos Ct's (*Threshold Cycle* - Ciclo que a fluorescência ultrapassou o limiar de detecção) dentre as triplicatas, e foram excluídas as amostras com um valor superior a 0,5.

Quadro 2 Especificações das sequências nucleotídicas dos amplicons alvo das sondas e primers comerciais utilizados para a qPCR, e dos amplicons presentes nos plasmídeos desenhados para a obtenção da quantificação absoluta.

Amplicon	Sequência 5' - 3'
<i>PrimePCR™ Probe</i> <i>Assay: ACE2, Human</i> <i>(BioRad®)</i>	TAATGCATGCCATTCTCAATCCTTGCAGCTACACCAGTTCCCAGGCACTGTCC TTACAAGTGATCCATCCATATTCCATACAAGATCCAACACTTGCTCCAATGA TATATCC
<i>PrimePCR™ Probe</i> <i>Assay: TMPRSS2,</i> <i>Human (BioRad®)</i>	CAGACAAGTTCCTGTTTAATAAAAAATGAAGTGACCTCTGAATCATCTCTAA GAGTAAATCATGCACGGGGAAGCAAACCAGCCCCATTGTTTTCTGTAAAA CGACGTCAAGGACGAAGACCATGTGGATTAGCCGTCTGCCCTCATTGTGCGA TAAATCCAGTCCGTGAATACCATC
<i>PrimePCR™ Probe</i> <i>Assay: B2M, Human</i> <i>(BioRad®)</i>	TCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTAT CCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGA AAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGCTGGGTTTCATCCATCCGAC
Sequência a ser amplificada - Plasmídeo ACE2	ATGGATTAATGAAAGTGAGCTAATGCATGCCATTCTCAATCCTTGCAGCTA CACCAGTCCCAGGCACTGTCCTTACAAGTGATCCATCCATATTCCATACAA GATCCAACACTTGCTCCAATGATATATCCTTGTTTTCAACTTCAGAAAT
Sequência a ser amplificada - Plasmídeo TMPRSS2	ATGGCAGAGAGTGCCAAAGCCAGACAAGTTCCTGTTTAATAAAAAATGAAG TGACCTCTGAATCATCTCTAAGAGTAAATCATGCACGGGGAAGCAAACCA GCCCCATTGTTTTCTTGTAACGACGTCAAGGACGAAGACCATGTGGATTA GCCGTCTGCCCTCATTGTGCGATAAATCCAGTCCGTGAATACCATCACATTCC CGTACACTCCTGG
Sequência a ser amplificada - Plasmídeo B2M	TTCGGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCT CTTTCTGGCCTGGAGGCTATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCAC GTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGCTGG GTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAA

3.5 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA

Para a realização de análises estatísticas comparamos os grupos de amostras em pares, porém como número de amostras dentro os grupos de análise não são iguais, utilizamos do teste de Distribuição *F* de *Fisher-Snedecor* dentro o programa *GraphPad Prism®*. Sendo que para a expressão de ACE2 o coeficiente de variação dentre as amostras analisadas foi de 2,7%, e para TMPRSS2 foi de 1%.

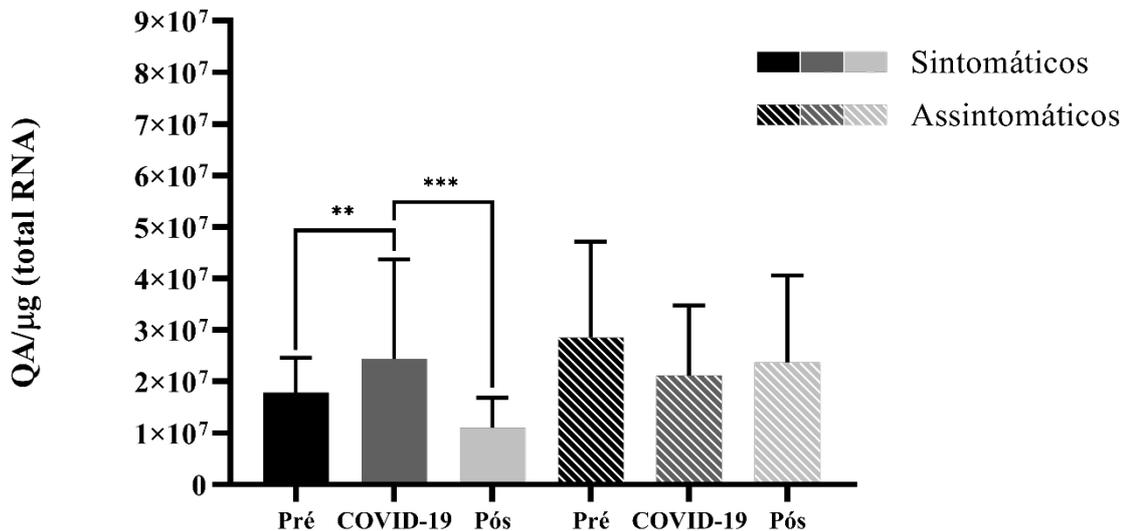
4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO GÊNICA DE ACE2 E TMPRSS2 EM AMOSTRAS DE NASOFARINGE NOS PERÍODOS PRÉ, DURANTE E PÓS INFECÇÃO

Ao observar o perfil dos pacientes sintomáticos, foi observado que, previamente à infecção, eles possuem uma expressão reduzida de ACE2 a qual aumenta significativamente durante a infecção por SARS-CoV-2 ($p < 0.01$) e volta a reduzir após o processo infeccioso ($p < 0.001$) (Figura 1). No entanto para TMPRSS2 os pacientes sintomáticos demonstraram uma expressão elevada prévia à infecção, tendo sido reduzida significativamente quando na presença do vírus ($p < 0.001$) (Figura 2), e diferentemente de ACE2 os níveis de expressão não aparentam retornar aos valores prévios ao processo infeccioso no período pós-infecção, visto a diferença significativa entre o período pré e pós infecção ($p < 0.01$) (Figura 2).

Já nos pacientes assintomáticos não foram encontrados níveis de expressão de ACE2 diferentes nos períodos avaliados (Figura 1). No entanto, apresentaram uma menor expressão de TMPRSS2 pré infecção ($p < 0.05$) (Figura 2), não apresentando diferenças significativas na comparação dos outros períodos.

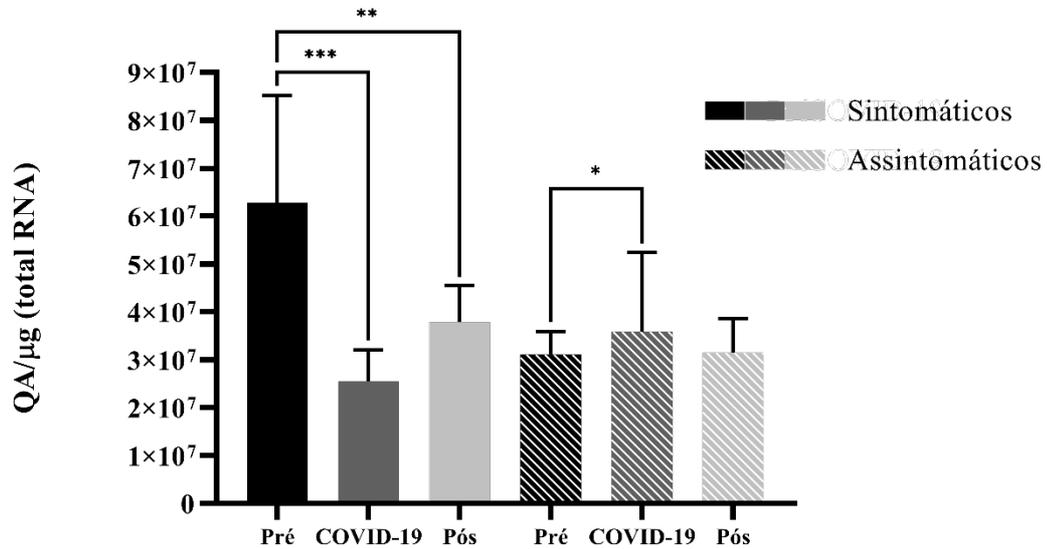
Figura 1 Expressão gênica de ACE2 em amostras de nasofaringe de pacientes sintomáticos e assintomáticos nos períodos pré, durante e pós infecção por SARS-CoV-2



Comparação dos níveis expressionais de ACE2 de pacientes sintomáticos e assintomáticos nos diferentes períodos analisados: pré, durante e pós infecção por SARS-CoV-2. Na imagem os grupos com o padrão listrado demonstram os resultados dos pacientes assintomáticos, e os grupos representados com cores lisas demonstram o comportamento dos resultados dos pacientes sintomáticos. Após a realização de uma *Distribuição F de Fisher*-

Snedecor entre os grupos se estabeleceram diferenças significativas, sendo representadas por: $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

Figura 2 Expressão gênica de TMPRSS2 em amostras de nasofaringe de pacientes sintomáticos e assintomáticos nos períodos pré, durante e pós infecção por SARS-CoV-2

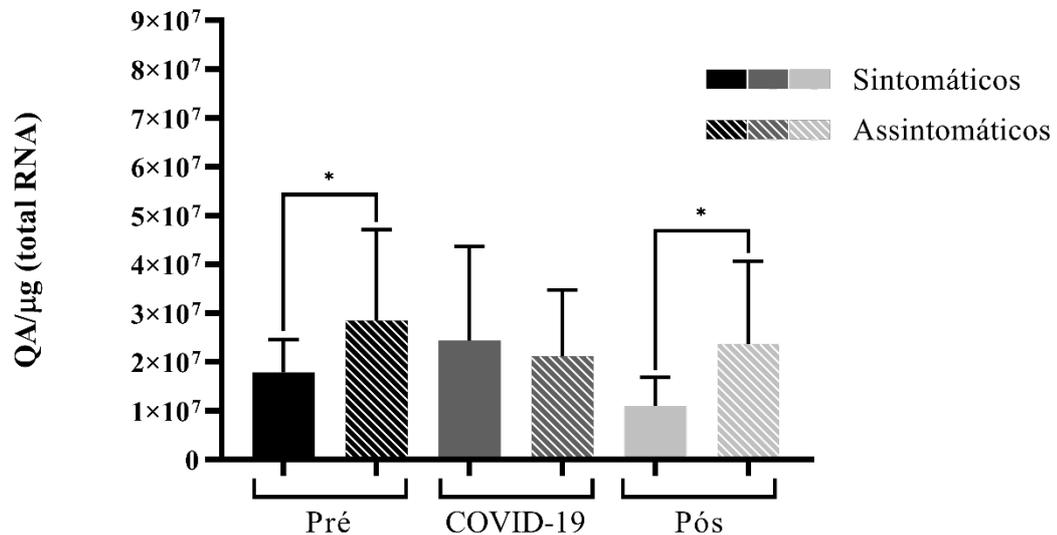


Comparação dos níveis expressionais de TMPRSS2 de pacientes sintomáticos e assintomáticos nos diferentes períodos analisados: pré, durante e pós infecção por SARS-CoV-2. Na imagem os grupos com o padrão listrado demonstram os resultados dos pacientes assintomáticos, e os grupos representados com cores lisas demonstram o comportamento dos resultados dos pacientes sintomáticos. Após a realização de uma *Distribuição F de Fisher-Snedecor* entre os grupos se estabeleceram diferenças significativas, sendo representadas por: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

4.2 DIFERENÇAS DE EXPRESSÃO DE ACE2 E TMPRSS2 EM AMOSTRAS DE NASOFARINGE DE PACIENTES SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS

Analisando os níveis de expressão de ACE2 (Figura 3) foi observado que pacientes sintomáticos apresentam uma menor expressão prévia à infecção em relação aos assintomáticos ($p < 0.05$). Essa diferença aparenta se manter no período pós infecção ($p < 0.05$), sugerindo que a proporção entre os níveis de expressão se mantenha. Já no período de infecção não se verificou uma diferença significativa entre os grupos.

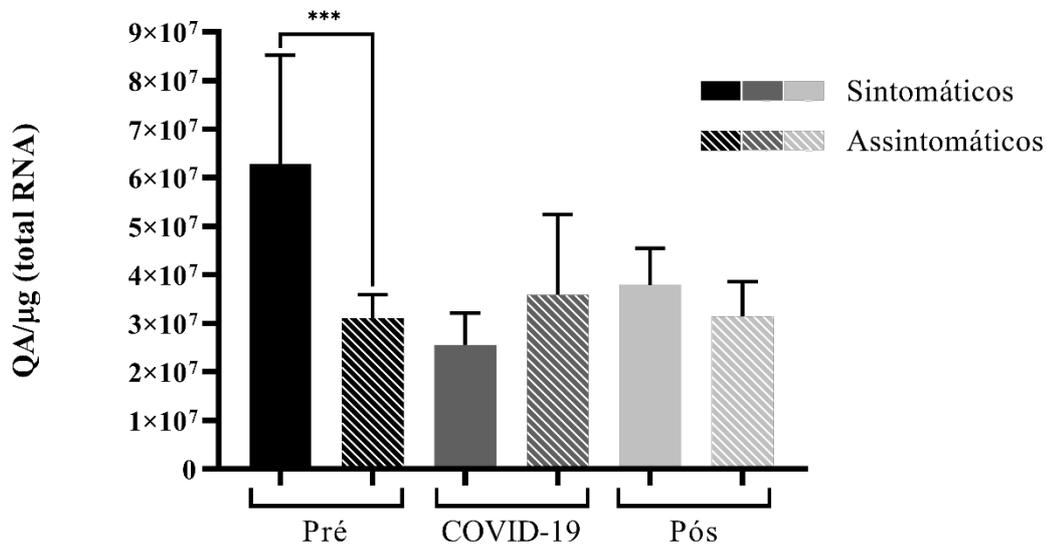
Figura 3 Comparação da expressão gênica de ACE2 de pacientes sintomáticos e assintomáticos nos diferentes períodos de análise.



Avaliação da diferença entre os níveis expressivos de ACE2 de pacientes dentro os mesmos períodos de infecção. Os pacientes sintomáticos estão representados pelas colunas em cores lisas, enquanto os assintomáticos estão representados pelas colunas com os padrões listrados. Na Distribuição *F* de *Fisher-Snedecor* entre os grupos se estabeleceram diferenças significativas, sendo representadas por: * $p < 0.05$.

Ao observar as comparações dos níveis de expressão de TMPRSS2 verificou-se uma diferença no período prévio à infecção por SARS-CoV-2 (Figura 4), no qual pacientes que apresentaram sintomas tiveram uma expressão maior da protease ($p < 0.001$). No entanto, os padrões expressivos de TMPRSS2 somente apresentaram diferenças entre sintomáticos e assintomáticos nesse período. Dentre os sintomáticos a infecção aparenta influenciar nos níveis de expressão dessa proteína de tal maneira que seus níveis não retornam aos observados antes da infecção, diferente do padrão encontrado para ACE2.

Figura 4 Comparação da expressão gênica de TMPRSS2 de pacientes sintomáticos e assintomáticos nos diferentes períodos de análise.



Avaliação da diferença entre os níveis expressionais de TMPRSS2 de pacientes dentre os mesmos períodos de infecção. Os pacientes sintomáticos estão representados pelas colunas em cores lisas, enquanto os assintomáticos estão representados pelas colunas com os padrões listrados. Na Distribuição *F* de *Fisher-Snedecor* entre os grupos se estabeleceram diferenças significativas, sendo representadas por: *** $p < 0.001$.

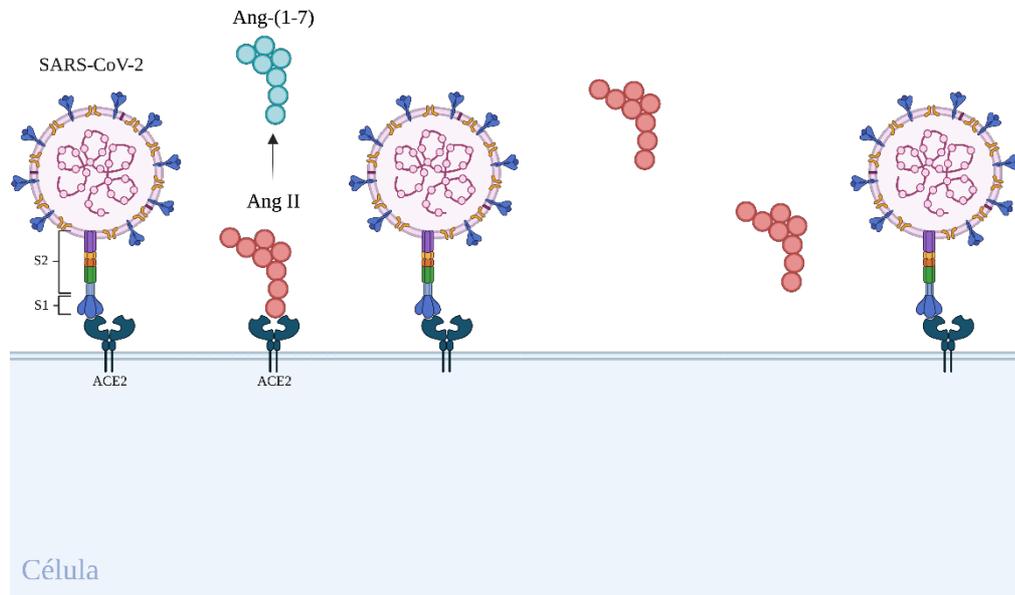
5 DISCUSSÃO

5.1 NÍVEIS EXPRESSIONAIS DE ACE2

No presente estudo demonstrou-se que pacientes sintomáticos e assintomáticos apresentam comportamentos distintos com relação à expressão de ACE2 nos períodos pré e pós infecção por SARS-CoV-2 (Figura 1 e 3). Os assintomáticos não demonstraram nenhuma diferença significativa dentre os três períodos, porém, é notável que pacientes sintomáticos possuem um nível expressional para ACE2 menor antes da infecção, e maior durante a infecção, retomando aos níveis iniciais após infecção (Figura 1 e 3). Visto que a Ang II, quando não convertida por ACE2, e sim pelo receptor AT1 (DENG et al., 2001), é tida como um vasoconstritor potente, tendo efeitos pró-inflamatórios, pró-fibrogênicos e proliferativos, podendo ainda induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e o aumento da retenção de sódio (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010; KUBA; IMAI; PENNINGER, 2013; RÜSTER; WOLF, 2006; TURNER; HISCOX; HOOPER, 2004). Quando observamos uma expressão menor de ACE2 é coerente pensar que haverá maior competição entre Ang II e SARS-CoV-2 pelo receptor. No entanto a afinidade do vírus pelo receptor é maior, fazendo com que haja uma diminuição na

conversão de Ang II em Ang-(1-7) (PATEL et al., 2016; RODRIGUES; DE OLIVEIRA, 2021; SINHA; SEHGAL; SEHGAL, 2020), como evidenciado na Figura 5.

Figura 5 Representação hipotética da membrana celular de célula humana com baixa expressão de ACE2 quando infectada por SARS-CoV-2.

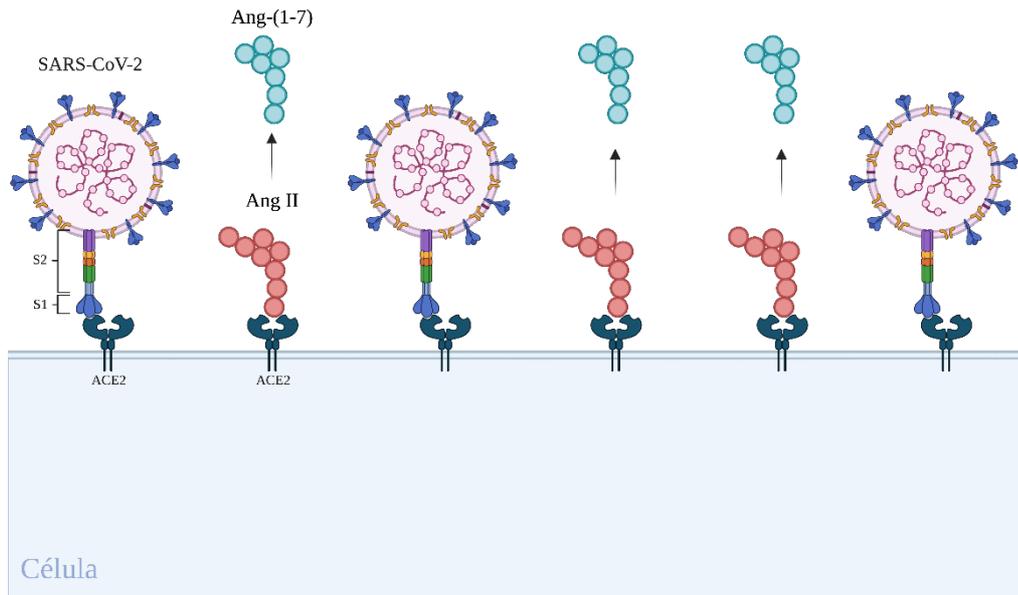


Representação hipotética da membrana celular da célula do hospedeiro infectado por SARS-CoV-2 em uma situação de baixa expressão para ACE2, onde ocorre uma competição entre SARS-CoV-2 e Ang II pelo receptor ACE2, e visto que a dinâmica viral é muito acelerada esse ocupa a maior parte dos receptores, fazendo com que Ang II seja convertida por seu receptor AT1, desencadeando efeitos pró-inflamatórios, pró-fibróticos e proliferativos. Para o período pré infecção não se tem a presença de SARS-CoV-2, porém foi levado em consideração que no momento que o vírus adentrou no nosso organismo o padrão expressional estava como sugerido na imagem (imagem gerada no programa *BioRender*[®]).

Ang-(1-7) tem efeitos antagonistas aos da Ang II (KUBA; IMAI; PENNINGER, 2013; RÜSTER; WOLF, 2006), porém a baixa expressão de ACE2 faz com que a conversão de Ang II em Ang-(1-7) seja reduzida, visto que está demonstrado que o vírus ocupa grande parte dos receptores (PATEL et al., 2016; RODRIGUES; DE OLIVEIRA, 2021; SINHA; SEHGAL; SEHGAL, 2020). Com isso, hipotetizamos que em uma situação de baixa expressão para ACE2 poderia ser gerado um acúmulo de Ang II, a qual poderá desencadear todos seus efeitos citados anteriormente como, vasoconstrição, efeitos pro-inflamatórios, pro-fibróticos, indução à produção de espécies reativas de oxigênio e aumento na retenção de sódio (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010; KUBA; IMAI; PENNINGER, 2013; RÜSTER; WOLF, 2006; TURNER; HISCOX; HOOPER, 2004). A partir dos resultados apresentados na Figura 1 pode-se inferir que os pacientes sintomáticos aparentam responder à presença do vírus, aumentando a

expressão de ACE2 durante a infecção. Esse aumento poderia demonstrar uma resposta fisiológica à baixa conversão de Ang II, buscando diminuir os efeitos adversos decorrentes da diminuição da conversão de Ang II em Ang-(1-7) (Figura 6).

Figura 6 Representação hipotética da membrana celular de célula humana com alta expressão de ACE2 quando infectada por SARS-CoV-2.



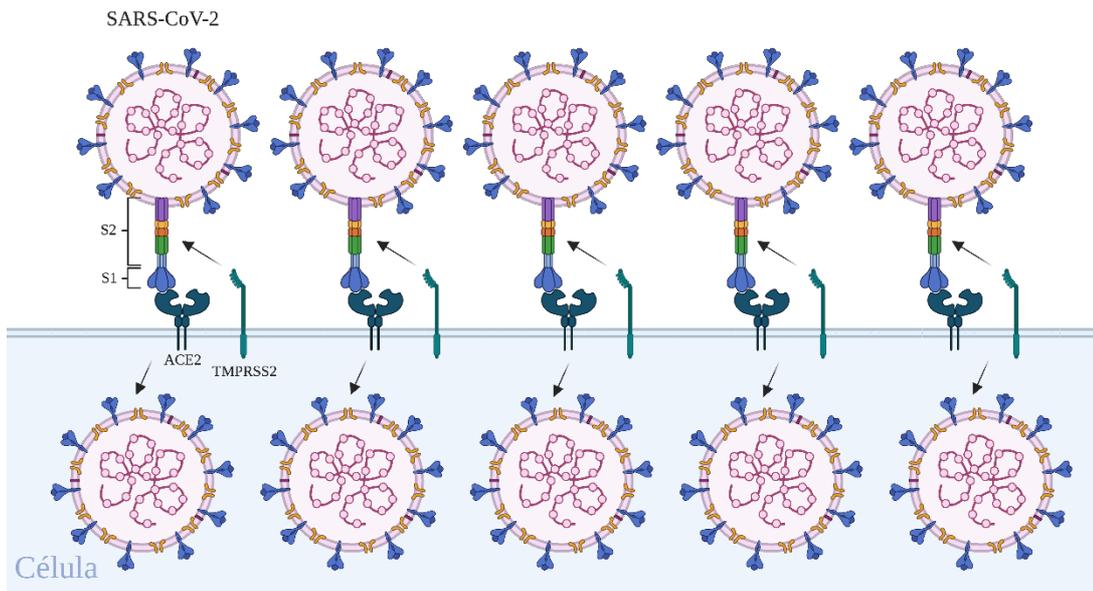
Representação hipotética da membrana celular da célula do hospedeiro infectado por SARS-CoV-2 em uma situação de alta expressão para ACE2, onde ocorre a competição pelo receptor não ocorre, fazendo com que Ang II seja convertida por ACE2 em Ang 1-7, tendo efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e antifibróticos. Para o período pré infecção não se tem a presença de SARS-CoV-2, porém foi levado em consideração que no momento que o vírus adentrou no nosso organismo o padrão expressional estava como sugerido na imagem (imagem gerada no programa *BioRender*[®]).

Cabe ressaltar que as amostras estudadas no presente trabalho representam um escopo de amostras de nasofaringe, podendo assim demonstrar esse comportamento somente para os tipos celulares desse tecido. Porém, ACE2 é amplamente expressa nas células organismo humano, podendo-se supor que o comportamento da expressão de ACE2 discordante entre pacientes sintomáticos e assintomáticos poderia ocorrer nos outros tecidos (BEYERSTEDT; BARBOSA CASARO; BEVILAQUA RANGEL, 2021; NI et al., 2020). Isso corroboraria os achados os quais demonstraram que após a infecção pacientes sintomáticos reduzem a expressão de ACE2 (Figura 1), podendo-se pensar que esse perfil de expressão poderia ser um possível fator de risco para o desenvolvimento de um quadro sintomático em uma reinfecção.

5.2 NÍVEIS EXPRESSIONAIS DE TMPRSS2

Assim como nos níveis expressionais de ACE2, para TMPRSS2 os pacientes sintomáticos e assintomáticos apresentaram padrões distintos de expressão gênica no período pré infecção por SARS-CoV-2. No caso da TMPRSS2 foi observado que pacientes sintomáticos apresentam um nível de expressão elevado pré infecção, a importância desse achado é suportada pelo fato de que TMPRSS2 é essencial para a entrada viral na célula, e conseqüentemente, essencial para o processo infeccioso (HOFFMANN et al., 2020; NI et al., 2020). Nossos resultados permitem hipotetizar que esse alto nível expressional poderia indicar uma maior facilidade para a replicação viral (Figura 7), que conseqüentemente poderia refletir na manifestação de sintomas decorrentes à rápida disseminação viral pelo organismo.

Figura 7 Representação hipotética da membrana celular em uma situação de alta entrada viral, acompanhada por um nível expressional elevado de TMPRSS2.

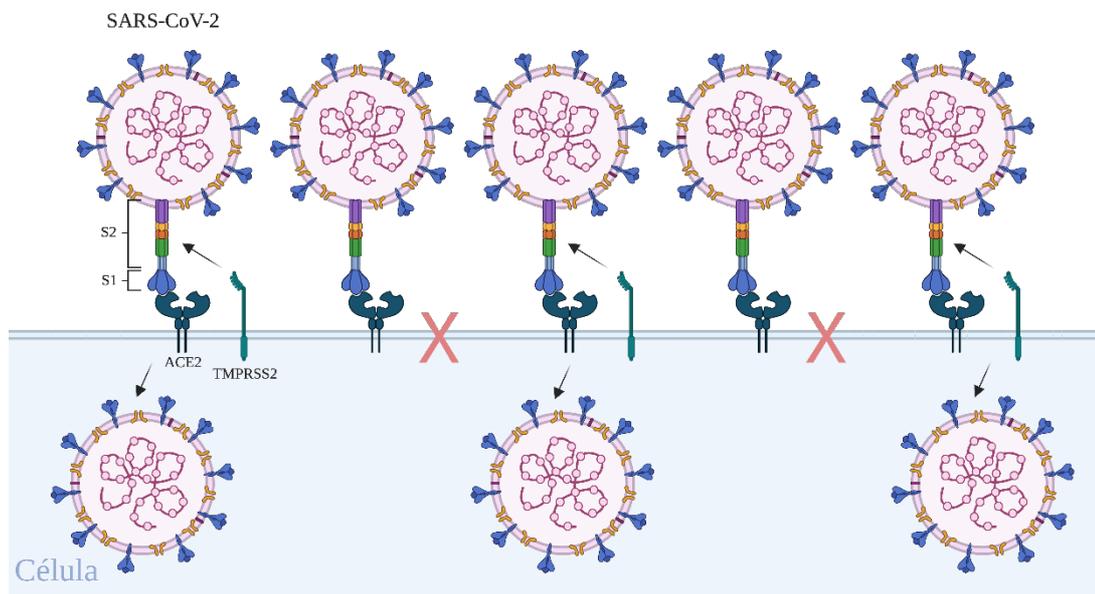


Representação hipotética da membrana celular da célula do hospedeiro infectada por SARS-CoV-2 em uma situação de alta expressão de TMPRSS2, fazendo com que haja uma alta taxa de entrada viral, visto que existe um número elevado de proteases necessárias para tal. Para o período pré infecção não se tem a presença de SARS-CoV-2, porém foi levado em consideração que no momento que o vírus adentrou no nosso organismo o padrão expressional estava como sugerido na imagem (imagem gerada no programa *BioRender*[®]).

Complementando essa hipótese, ao observar as diferenças da expressão de TMPRSS2 dos pacientes sintomáticos nos diferentes períodos (Figura 2), percebe-se que durante e após a infecção ocorre uma redução significativa nos níveis expressionais, podendo demonstrar que o

hospedeiro está reagindo à rápida disseminação viral reduzindo a expressão de uma das proteínas essenciais para sua entrada na célula humana (Figura 8). Ou seja, o baixo nível de expressão de TMPRSS2 pode, possivelmente, representar um fator protetivo contra a infecção e ao desenvolvimento de sintomas. Inclusive, já foi demonstrado em ratos que a inibição farmacológica de TMPRSS2 se demonstra efetiva contra a infecção por SARS-CoV (ZHOU et al., 2015) complementando a hipótese de que a baixa expressão de TMPRSS2 possa ser um fator protetivo.

Figura 8 Representação hipotética da membrana celular em uma situação de menor entrada viral, acompanhada por um nível expressional reduzido de TMPRSS2.



Representação hipotética da membrana celular da célula do hospedeiro infectada por SARS-CoV-2 em uma situação de baixa expressão de TMPRSS2, fazendo com que haja uma redução na taxa de entrada viral, visto que o número de proteases necessárias para tal está reduzido. Para o período pré infecção não se tem a presença de SARS-CoV-2, porém foi levado em consideração que no momento que o vírus adentrou no nosso organismo o padrão expressional estava como sugerido na imagem (imagem gerada no programa *BioRender*[®]).

Já o aumento da expressão de TMPRSS2 durante a infecção observado em pacientes assintomáticos (Figura 2) pode indicar o uso de algum mecanismo viral para aumentar a expressão da protease viabilizando a infecção celular e o ciclo viral. Essa modulação da expressão por parte dos vírus pode se dar através das proteínas virais não-estruturais visto que essas podem ter uma função de desregular as sinalizações intracelulares (RAJ, 2021). A redução da expressão posterior à infecção pode complementar essa hipótese, pois quando há a ausência do vírus a expressão volta a níveis similares aos pré infecção.

Naturalmente deve-se considerar juntamente aos níveis expressionais de ACE2 e TMPRSS2, o perfil vacinal e as variantes virais circulantes, que, no atual cenário da pandemia, parecem ser fatores protetores independentes aos riscos potenciais observados pela baixa expressão de ACE2, e alta expressão de TMPRSS2. Ressalta-se que as amostras selecionadas para este estudo, em sua maioria, são do período de baixa cobertura vacinal e circulação das variantes mais virulentas (PADILHA et al., 2022).

6 CONCLUSÃO

A patogenia da infecção por SARS-CoV-2 vem se demonstrando como um complexo quebra-cabeça, tendo diversos fatores que podem influenciar e contribuir para o sucesso da infecção viral. No entanto, ACE2 e TMPRSS2 têm papéis de importância bem descritos na literatura quando o assunto é infecção por SARS-CoV-2, e com isso seus níveis expressionais aparecem como possíveis fatores influenciadores ao desenvolvimento, ou não, de sintomas. No presente estudo foi demonstrado que, uma baixa expressão de ACE2 em junto a uma alta expressão de TMPRSS2, em amostras de nasofaringe prévias à infecção, aparecem como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de sintomas e agravos da COVID-19; e que o processo infeccioso em si, aumenta a expressão de ACE2, e diminui TMPRSS2 em pacientes sintomáticos.

7 PERSPECTIVAS

O presente estudo somente demonstra esse comportamento em nasofaringe, e cremos que seria benéfica a realização de um estudo avaliando esses níveis expressionais, em diferentes períodos, em outros tecidos do corpo, apesar de sabermos que seria complexa a sua realização.

8 REFERÊNCIAS

ANTALIS, T. M.; BUGGE, T. H.; WU, Q. 1 - Membrane-Anchored Serine Proteases in Health and Disease. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 99, p. 1–50, 2011.

BAUGHN, L. B. et al. Targeting TMPRSS2 in SARS-CoV-2 Infection. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 95, n. 9, p. 1989–1999, 1 set. 2020.

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, n. 11, p. 1602–1614, 1 nov. 2020.

BENIGNI, A.; CASSIS, P.; REMUZZI, G. Angiotensin II revisited: New roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 7, p. 247–257, 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, n. 5, p. 905–919, 2021.

DENG, G. F. et al. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. **Cell Research**, v. 11, n. 3, p. 165–180, 2001.

FERRARIO, C. M.; TRASK, A. J.; JESSUP, J. A. Invited Review Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, p. 2281–2290, 2005.

HAMMING, I. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 631–637, jun. 2004.

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, n. 2, p. 271–280.e8, 16 abr. 2020.

JACKSON, C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–20, 1 jan. 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, n. 2, 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, n. 9, 1 set. 2020.

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, n. 7, p. 797, 1 jul. 2016.

NI, W. et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 422, 13 jul. 2020.

NISHIMURA, H. Renin-angiotensin system in vertebrates: phylogenetic view of structure and function. **Anatomical Science International**, v. 92, n. 2, p. 215–247, 1 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, n. 4, p. 695, 1 abr. 2022.

PATEL, S. et al. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 317–325, 1 out. 2017.

PATEL, V. B. et al. ACE2 deficiency worsens epicardial adipose tissue inflammation and cardiac dysfunction in response to diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 65, n. 1, p. 85–95, 1 jan. 2016.

RAI, P. et al. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 2, p. 441–455, 2021.

RAJ, R. Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 25, p. 2405–5808, mar. 2021.

RODRIGUES, R.; DE OLIVEIRA, S. C. **The impact of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression levels in patients with comorbidities on COVID-19 severity: A comprehensive review**. **Microorganisms** MDPI AG, , 1 ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081692>>. Acesso em: 26 abr. 2022

ROSSI, Á. D. et al. Association between ACE2 and TMPRSS2 nasopharyngeal expression and COVID-19 respiratory distress. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

RÜSTER, C.; WOLF, G. **Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease**. **Journal of the American Society of Nephrology**, nov. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1681/asn.2006040356>>. Acesso em: 27 jun. 2022

SINHA, S.; SEHGAL, A.; SEHGAL, R. Association of ACE2 receptor and ACEIs/ARBs with disease severity in COVID-19. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 14, n. 4, p. 161–170, 31 ago. 2020.

TOMLINS, S. A. et al. Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 644–648, 2005.

TURNER, A. J.; HISCOX, J. A.; HOOPER, N. M. ACE2: from vaso-peptidase to SARS virus receptor. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 6, p. 291–294, 2004.

VIEIRA, L. M. F.; EMERY, E.; ANDRIOLO, A. Covid-19: Laboratory diagnosis for clinicians. An updating article. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 138, n. 3, p. 259–266, 1 maio 2020.

ZHOU, Y. et al. Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. **Antiviral Research**, v. 116, p. 76–84, 2015.

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 Gislaine 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 (orofaringe). 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.

ANEXO B – TCLE DO PROJETO CAAE: 57722022.2.0000.0121 (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

Projeto: Avaliação da expressão gênica para Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e Serina Protease da Proteína Transmembrana 2 (TMPRSS2) em pacientes antes e após infecção por SARS-CoV-2

Apresentação:

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 os pesquisadores. Se você não quiser participar ou se quiser retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Objetivo:

O presente estudo tem por objetivo: Avaliar a expressão gênica de ACE2 e TMPRSS2 em pacientes não infectados e infectados por SARS-CoV-2 e correlacionar com quadros clínicos e agravos de COVID-19.

ACE2 e TMPRSS2 são duas proteínas que estão nas nossas células e que permitem que o vírus entre na célula e cause a doença. Essas duas proteínas são chamadas de receptores viriais.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a permitir a utilização de uma amostra coletada previamente (ente 2020, 2021 e 2022) quando você fez o teste molecular que detecta o vírus no organismo. Para este estudo você não coletará uma nova amostra, apenas autorizará a utilização de sua amostra que está estocada no LBMMS. Esclarecemos que, por determinação da Vigilância Epidemiológica, temos que manter armazenadas todas as amostras que tiveram resultado positivo para COVID-19. O que estamos solicitando a você, além de poder utilizar sua amostra, é que responda a um questionário muito breve sobre vacinação.

Desconfortos, Riscos e Assistência:

Você não terá nenhuma amostra coletada e, por isso, não sentirá dor ou desconforto físico, mas poderá sentir algum desconforto ou constrangimento para responder ao questionário. Caso alguma das perguntas lhe desagrade, fique à vontade para não responder.

Benefícios:

Ao participar desta pesquisa você contribuirá para melhorar o entendimento do processo utilizado pelo vírus para causar a infecção. Vamos verificar se a quantidade de receptores celulares (locais nas células onde o vírus se liga) que sua amostra tem pode estar relacionada com a maior ou menor gravidade da infecção que você teve.

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.

Ressarcimento e Indenização:

Os pesquisadores se comprometem a ressarcir-lhe de quaisquer despesas comprovadamente resultantes desta pesquisa. Da mesma forma, os pesquisadores 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 da Unidade Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC/EBSERH.

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 esclarecido(a) sobre a natureza da 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.

(Assinatura do pesquisador)

Data: ___/_____/___