

**Hospital de Clínicas de Porto Alegre**  
**Programa de Residência em Área Profissional da Saúde**

**Trabalho de Conclusão da Residência:**

Variantes de preocupação do SARS-CoV-2: identificação presuntiva por sequenciamento de Sanger da região do domínio de ligação ao receptor do gene S para vigilância genômica viral no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Grazielle Motta Rodrigues**

**Porto Alegre, janeiro de 2023**

**Hospital de Clínicas de Porto Alegre**  
**Programa de Residência em Área Profissional da Saúde**

**Trabalho de Conclusão da Residência:**

Variantes de preocupação do SARS-CoV-2: identificação presuntiva por sequenciamento de Sanger da região do domínio de ligação ao receptor do gene S para vigilância genômica viral no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Grazielle Motta Rodrigues**

**Orientadora: Dra. Fernanda de Paris**

**Co-orientador: Dr. Rodrigo Minuto Paiva**

Trabalho de conclusão de residência apresentado como requisito parcial para obtenção do título de especialista em Biologia Molecular pelo Programa de Residência em Área Profissional da Saúde em Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Porto Alegre, janeiro de 2023**

### CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Grazielle Motta  
Variantes de preocupação do SARS-CoV-2:  
identificação presuntiva por sequenciamento de Sanger  
da região do domínio de ligação ao receptor do gene S  
para vigilância genômica viral no Hospital de Clínicas  
de Porto Alegre. / Grazielle Motta Rodrigues. -- 2023.  
51 f.  
Orientadora: Fernanda de-Paris.

Coorientador: Rodrigo Minuto Paiva.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de  
Clínicas de Porto Alegre, Residência em Área  
Profissional da Saúde - Análises Clínicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2023.

1. Sequenciamento. 2. Covid-19. 3. SARS-CoV-2. 4.  
Vigilância. I. de-Paris, Fernanda, orient. II. Paiva,  
Rodrigo Minuto, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## SUMÁRIO

<b>1. Resumo</b>	<b>5</b>
<b>2. Introdução</b>	<b>6</b>
<b>3. Revisão da literatura</b>	<b>10</b>
3.1 A linha do tempo histórica do SARS-CoV-2	10
3.2 A origem do SARS-CoV-2	11
3.3 A estrutura viral e a organização genômica	12
3.4 A proteína spike e o domínio de ligação ao receptor	13
3.5 As mutações e as variantes	14
3.6 A identificação das variantes	18
<b>4. Objetivos</b>	<b>20</b>
4.1 Objetivo geral	20
4.2 Objetivos específicos	20
<b>5. Resultados e Discussão</b>	<b>21</b>
5.1 Artigo	22
<b>6. Considerações finais</b>	<b>39</b>
<b>7. Referências</b>	<b>41</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>46</b>
Anexo I - Parecer Consubstanciado do CEP (Plataforma Brasil)	46
Anexo II - Carta de aprovação pelo Grupo de Pesquisa e Pós Graduação	51

## 1. Resumo

Em dezembro de 2019, a rápida disseminação de uma pneumonia de origem desconhecida chamou a atenção das autoridades de saúde em Wuhan, na China. Mais tarde, em janeiro de 2020, o agente etiológico foi anunciado como sendo um novo vírus pertencente à família dos coronavírus. Em fevereiro de 2020 o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus nomeia o novo coronavírus como SARS-CoV-2 (do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* – SARS-CoV-2) e em março de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) decreta pandemia por COVID-19, doença causada pelo novo coronavírus. Mesmo mais de dois anos após a declaração de pandemia por COVID-19, e com todos os esforços mundiais em busca do esclarecimento da doença e da contínua tentativa de limitar sua transmissão, a rápida disseminação do vírus tem levado à contínua geração de diferentes sequências de SARS-CoV-2.

Essa evolução genômica dá origem a diversas variantes e novas linhagens que têm características diferentes em comparação com seus ancestrais. Algumas dessas linhagens têm demonstrado mudanças com alto grau de significância para a saúde pública global. As novas linhagens podem apresentar aumento da transmissibilidade ou aumento da virulência e alteração na apresentação clínica da doença. A classificação utilizada cita variantes de preocupação (do inglês “*variants of concern*” - VOCs) que englobam as variantes alfa (ou B.1.1.7, primeiramente descrita na Inglaterra), beta (ou B.1.351, primeiramente descrita na África do Sul), gama (ou P1, primeiramente descrita no Brasil), delta (ou B.1.617.2, primeiramente descrita na Índia) e ômicron (ou B.1.1.529, identificada em diversos países em novembro de 2021).

Para realizar a caracterização dessas linhagens é recomendado a análise do genoma completo de SARS-CoV-2, utilizando-se de ferramentas moleculares como o sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês “*new generation sequencing*”). Apesar das inúmeras vantagens, ainda é uma ferramenta com custo alto para ser utilizada em larga escala e ser absorvida pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e sistemas de vigilância epidemiológica do país. Nesse sentido, alternativas devem ser pensadas para que seja possível fazer a identificação das variantes e realizar a vigilância genômica das VOCs.

Uma vez que as VOCs apresentam importantes mutações definidoras de linhagem na porção denominada *receptor binding domain* (RBD) da proteína da *spike* do SARS-CoV-2, o sequenciamento de Sanger, considerado método de referência para determinação de sequências nucleotídicas, é uma alternativa ao uso do NGS por ser uma metodologia mais acessível, principalmente quando se trata de custo por amostra processada.

## 2. Introdução

Em dezembro de 2019, a rápida disseminação de uma pneumonia de origem desconhecida chamou a atenção das autoridades de saúde em Wuhan, na China. Mais tarde, em janeiro de 2020, o agente etiológico foi anunciado como sendo um novo vírus pertencente à família dos coronavírus (ZHU *et al.*, 2020), amplamente distribuídos em mamíferos, incluindo os humanos, capazes de causar doenças respiratórias, hepáticas e até mesmo neurológicas (WEISS; LEIBOWITZ, 2011). Semelhantemente aos sintomas do coronavírus causador da síndrome respiratória aguda (SARS-CoV, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus*) e do coronavírus causador da síndrome respiratória do oriente médio (MERS-CoV, do inglês *Middle East respiratory syndrome coronavirus*), os pacientes infectados com o novo coronavírus apresentavam sinais de pneumonia viral, desconforto no peito, febre e tosse (ZHU *et al.*, 2020).

Em fevereiro de 2020 o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus nomeia o novo coronavírus como SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) e em março de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) decreta pandemia por COVID-19, doença causada pelo novo coronavírus. Até janeiro de 2023, segundo o *Center for System Science and Engineering*, da Universidade de John Hopkins, já foram identificados mais de 670 milhões de casos de SARS-CoV-2 ao redor do mundo e contabilizadas mais de 6,8 milhões de mortes por COVID-19 (JOHN HOPKINS UNIVERSITY, 2022).

Mesmo mais de dois anos após a declaração de pandemia por COVID-19, e com todos os esforços mundiais em busca do esclarecimento da doença e da contínua tentativa de limitar sua transmissão, a rápida disseminação do vírus tem levado à contínua geração de diferentes sequências de SARS-CoV-2 (RAMBAUT *et al.*, 2020). O ritmo acelerado da transmissão resulta em um processo contínuo de geração e extinção de linhagens com o passar do tempo, levando a novas ondas de surtos de COVID-19 que têm sido atribuídas principalmente ao surgimento de novas variantes (CASCELLA *et al.*, 2021).

Existem duas principais linhagens de SARS-CoV-2 circulantes ao redor do mundo, inicialmente chamadas de linhagens A e B. O primeiro genoma de SARS-CoV-2 identificado em Wuhan é pertencente à linhagem A, que possui alta semelhança genômica às linhagens RmYN02 e RaTG13 presentes em morcegos. A alteração de alguns nucleotídeos dessa linhagem deu origem à linhagem B, que rapidamente se espalhou ao redor do mundo (HU *et al.*, 2021; RAMBAUT *et al.*, 2020). As linhagens refletem as mudanças genômicas associadas a eventos epidemiológicos e biológicos importantes, que podem traduzir surtos

ou a introdução e disseminação do vírus em uma região geográfica distinta (O'TOOLE *et al.*, 2021; RAMBAUT *et al.*, 2020).

Essa evolução genômica segue dando origem a diversas variantes e novas linhagens que têm características diferentes em comparação com seus ancestrais. Algumas dessas variantes têm demonstrado mudanças com alto grau de significância para a saúde pública global. As novas variantes podem apresentar aumento da transmissibilidade ou aumento da virulência e alteração na apresentação clínica da doença. Essas novas variantes podem ainda impactar na efetividade do diagnóstico, vacinas ou de outras medidas terapêuticas disponíveis. Para organizar o grande volume de informações que foram surgindo e sendo documentadas sobre as variantes do SARS-CoV-2, a OMS propôs uma reclassificação das variantes, a fim de facilitar as discussões por um público não científico. Essa atualização tem como base o uso das letras do alfabeto grego (alfa, beta, gama etc.). A classificação utilizada cita variantes de preocupação (VOCs, do inglês "*variants of concern*") que englobam as variantes alfa (ou B.1.1.7, primeiramente descrita na Inglaterra), beta (ou B.1.351, primeiramente descrita na África do Sul), gama (ou P.1, primeiramente descrita no Brasil), delta (ou B.1.617.2, primeiramente descrita na Índia) e ômicron (ou B.1.1.529, identificada em diversos países em novembro de 2021) (O'TOOLE *et al.*, 2021; RAMBAUT *et al.*, 2020; WHO, 2022).

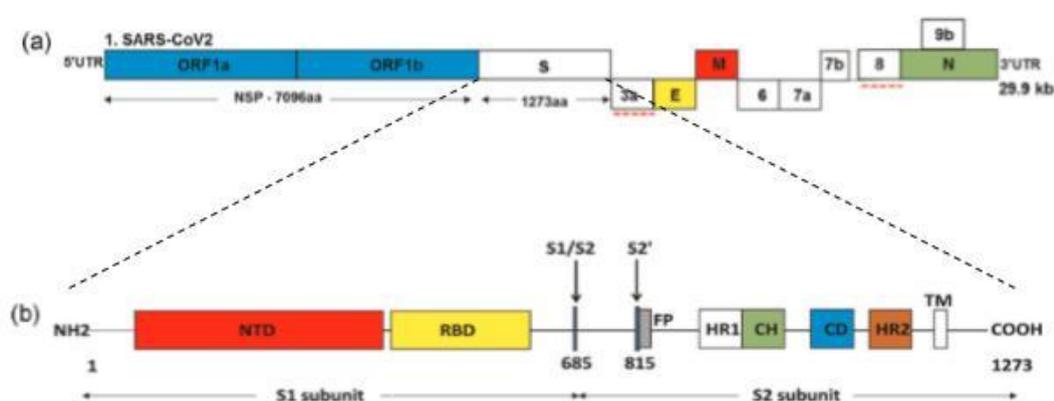
Em comum, as variantes de preocupação possuem mutações com significado funcional no gene S, responsável por expressar a glicoproteína que forma a espícula viral (ou proteína *spike*). Formada por duas subunidades principais (S1 e S2), essa glicoproteína desempenha um papel importante no reconhecimento do receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2, do inglês "*angiotensin-converting enzyme 2*"). Essa interação é necessária para a fusão da partícula viral com a membrana celular do hospedeiro e liberação do material genético do vírus (GURUPRASAD, 2021). No domínio S1, fica localizada a região de ligação ao receptor (RBD, do inglês "*receptor binding domain*"), que abriga um grande número de mutações comuns às VOCs (NAVECA, Felipe *et al.*, 2021; O'TOOLE *et al.*, 2021).

Para realizar a caracterização dessas linhagens é recomendada a análise do genoma completo do SARS-CoV-2, utilizando-se de ferramentas moleculares como o sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês "*new generation sequencing*"). Através dessa metodologia é possível realizar o sequenciamento completo do genoma (WGS, do inglês "*whole genome sequencing*") e gerar uma grande quantidade de informações genômicas do vírus, possibilitando o rastreamento da origem e propagação bem como o monitoramento de sua evolução. Entretanto, trata-se de uma técnica complexa e com um

grande tempo de envolvimento na sua execução (CHIARA *et al.*, 2021). Apesar das inúmeras vantagens, ainda é uma ferramenta com custo alto para ser utilizada em larga escala e ser absorvida pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e sistemas de vigilância epidemiológica do país. Nesse sentido, alternativas devem ser pensadas para que seja possível fazer a identificação das variantes e realizar a vigilância genômica das VOCs.

Uma alternativa à utilização do NGS para a obtenção de informações genômicas é o sequenciamento de Sanger, considerado método de referência para determinação de sequências nucleotídicas. Através dessa metodologia é possível obter-se a sequência de nucleotídeos de até 1.000 pares de bases por reação, podendo ser aplicado para obtenção de genomas totais ou de regiões específicas de interesse. Essa limitação de número de pares de base sequenciados por reação torna o sequenciamento de Sanger uma técnica com baixo rendimento quando comparado ao NGS, mas é capaz de fornecer uma análise que possibilita a identificação de patógenos emergentes ou ainda mudanças evolutivas em patógenos conhecidos, com um custo menor por amostra processada (CROSSLEY *et al.*, 2020). O sequenciamento de Sanger vem sendo utilizado como uma abordagem para determinação das VOCs por ser uma metodologia mais amplamente utilizada e mais acessível que o NGS (DORLASS *et al.*, 2021; BEZERRA *et al.*, 2021).

As VOCs carregam suas principais mutações entre os 749 nucleotídeos da porção RBD da *spike* e isso parece conferir vantagens evolutivas às linhagens que as possuem, e isso possibilita a identificação por sequenciamento de Sanger em uma única reação (CASCELLA *et al.*, 2021).



**Figura 1 - Organização genômica do SARS-CoV-2.** (a) Genes responsáveis por codificar proteínas estruturais e não estruturais da partícula viral do SARS-CoV-2; (b) as regiões dentro do gene responsável por codificar a proteína Spike, onde fica localizada a região RBD. Adaptado de Kadam *et al.*, 2020.

Essa característica possibilita que o perfil mutacional dessa região seja identificado e torne possível a predição e discriminação das VOCs através do sequenciamento de Sanger, através da comparação de substituições nucleotídicas frente a sequência de referência, podendo ser utilizado em sistemas públicos de saúde e vigilância. O sequenciamento de Sanger da região RBD da proteína *spike* pode contribuir com a compreensão do perfil epidemiológico da infecção por SARS-CoV-2, sua vigilância genômica e promover uma triagem de novas variantes que possam surgir.

### 3. Revisão da literatura

#### 3.1 A linha do tempo histórica do SARS-CoV-2

No final de dezembro de 2019, a cidade de Wuhan, na China, identificou uma série de casos de pneumonia de origem desconhecida. As autoridades de saúde pública locais identificaram um vínculo epidemiológico entre esses casos e um mercado atacadista de frutos do mar e animais vivos da cidade (ZHU *et al.*, 2020). Em comum, os pacientes apresentavam sintomas de uma pneumonia: tosse, febre, desconforto torácico e, nos casos mais graves, dispnéia e infiltrado pulmonar. Esses sintomas assemelhavam-se muito a sintomas de outras infecções virais como Influenza, SARS-CoV e MERS-CoV, mas essas suspeitas logo foram descartadas pelas autoridades sanitárias locais (GRALINSKI; MENACHERY, 2020; ZHU *et al.*, 2020).

Em janeiro de 2020, as autoridades sanitárias da China anunciaram que o agente causador da pneumonia foi identificado como pertencente à família dos betacoronavírus, até então nunca identificado (HU *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2020). A rápida disseminação do vírus evidenciou a transmissão entre humanos, à medida que novos casos foram sendo identificados em indivíduos que não tiveram exposição ao mercado atacadista de frutos do mar e infecções nosocomiais foram sendo relatadas (CHAN *et al.*, 2020). Com a proximidade do Ano Novo Lunar, data festiva comemorada em países do oriente, uma intensa movimentação entre as cidades favoreceu a disseminação ainda mais rápida do vírus na China e, em um mês, o vírus já havia chegado a 34 províncias da China (HU *et al.*, 2021). Ao final de janeiro, já se somavam mais de 800 casos e 25 mortes na China, além da identificação do vírus em outros 10 países (GRALINSKI; MENACHERY, 2020). Nesse momento, a OMS declara que o surto do novo coronavírus é uma emergência de saúde pública internacional (HU *et al.*, 2021).

O Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus classifica, em fevereiro de 2020, o novo coronavírus pertencente a um clado derivado do coronavírus que causa a síndrome respiratória aguda grave de humanos e de morcegos (SARS-CoVs), e o designa como SARS-CoV-2 (GORBALENYA *et al.*, 2020). Ainda em fevereiro de 2020, a OMS define como COVID-19 a doença causada pelo SARS-CoV-2 e em março determina pandemia mundial pela COVID-19 (HU *et al.*, 2021). Até janeiro de 2023 já foram registrados mais de 670 milhões de casos de SARS-CoV-2 ao redor do mundo, com mais de 36 milhões de casos e mais de 696 mil mortes somente no Brasil, sendo o segundo país em número de mortes no mundo. Somente na região sul, já foram registrados mais de 7,8 milhões de casos e mais de 110 mil mortes (JOHN HOPKINS UNIVERSITY, 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

### 3.2 A origem do SARS-CoV-2

Os coronavírus são pertencentes à família *Coronaviridae* e subfamília *Coronavirinae*, a qual é subdividida em alfa, beta, gama e deltacoronavirus (CUI; LI; SHI, 2019; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2020). Os alfacoronavirus e betacoronavirus, infectam somente mamíferos, enquanto gamacoronavirus e deltacoronavirus são capazes de infectar aves e, eventualmente, mamíferos (CUI; LI; SHI, 2019). Os betacoronavirus possuem quatro subgêneros, nomeados *Embecovirus*, *Sarbecovirus*, *Merbecovirus* e *Nobecovirus* sendo SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 pertencentes ao subgênero *Sarbecovirus* (VERMA; SUBBARAO, 2021; WONG *et al.*, 2019). A análise filogenética do genoma do SARS-CoV-2 demonstrou semelhanças com isolados de coronavírus de morcego (RaTG13, RmYN02, ZC45 e ZXC21) bem como novos coronavírus recentemente identificados em pangolins, que apresentam semelhanças ao SARS-CoV e outros coronavírus relacionados ao SARS-CoV (SARSr-CoVs) (HU *et al.*, 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Os morcegos desempenham um papel importante como hospedeiros naturais dos betacoronavirus e acredita-se que a maioria dos coronavírus que infectam humanos tenham se originado em morcegos. Um exemplo dessa relação de proximidade genética é a alta semelhança genômica entre o SARS-CoV-2 e RaTG13, um coronavírus que tem como principal hospedeiro um morcego *Rhinolophus affinis*, apresentando uma identidade de sequência genômica em torno de 96%. Apesar do vírus RaTG13 possuir alta similaridade genômica com SARS-CoV-2, divergências na sequência da proteína viral que se liga ao receptor das células humanas impedem que este vírus infecte humanos. Entretanto, essa alta similaridade genômica sustenta a hipótese de que morcegos sejam o hospedeiro principal do SARS-CoV-2 (HU *et al.*, 2021; NIE *et al.*, 2021).

O contato direto entre humanos e morcegos é raro e parece ser mais provável que a introdução do SARS-CoV-2 no homem tenha passado por um hospedeiro intermediário, como no caso do SARS-CoV e do MERS-CoV. Uma hipótese é que o pangolim malaio (*Manis javanica*) fosse um possível hospedeiro intermediário, uma vez que possuem sequências semelhantes ao receptor presente na célula humana e estão presentes nos mercados atacadistas de frutos do mar e animais silvestres vivos na China - considerados uma iguaria tradicional chinesa. Entretanto, apesar de existirem evidências de que os pangolins são hospedeiros naturais de betacoronavirus, o potencial desses vírus para infectar humanos ainda é desconhecido (FRUTOS *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020).

### 3.3 A estrutura viral e a organização genômica

Os vírus pertencentes à família *Coronaviridae* são partículas esféricas com tamanho variando entre 150 e 160 nm, com projeções de glicoproteínas na sua superfície. O genoma viral dos coronavírus é composto de RNA fita simples (ssRNA) de senso positivo que possui cerca de 29 a 32 mil bases nucleotídicas, com uma estrutura cap-5' e uma cauda 3' poli-A (DATTA; SINGH; NAQVI, 2021). O SARS-CoV-2 possui cerca de 29 mil nucleotídeos e difere de outros coronavírus devido à capacidade de produzir uma glicoproteína que possui propriedades de hemaglutinação e acetil-transferase. A estrutura viral compreende um nucleocapsídeo (N) empacotado por um envelope viral (E) associado às proteínas estruturais de membrana (M) e espícula viral (ou proteína *spike* - S) (PARASKEVIS *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020).

Seu genoma possui regiões responsáveis por codificar proteínas não estruturais (nsps - do inglês *non-structural proteins*), proteínas estruturais e proteínas acessórias (BRANT *et al.*, 2021). As regiões ORF1a e ORF1ab (do inglês *open reading frames*) codificam poliproteínas não estruturais indispensáveis para a ativação do complexo de replicação viral, a protease do tipo 3-quimiotripsina (3CLpro), e a protease do tipo papaína (PLpro). Além disso, a região ORF1ab codifica a proteína catalítica RNA-dependente de RNA polimerase (RdRp), que faz parte de um complexo contendo entre 500 e 600 resíduos de aminoácidos embutido na capsídeo viral. Esse complexo é importante na replicação e transcrição das proteínas virais, pois a enzima RdRp é responsável por gerar as cópias de ssRNA senso negativo que servirá como template para gerar as cópias de ssRNA senso positivo (DATTA; SINGH; NAQVI, 2021).

O gene *N* possui 1.260 nucleotídeos e é responsável pela codificação da proteína do nucleocapsídeo. Essa proteína possui três domínios distintos e ainda bem conservados: domínio N-terminal, domínio C-terminal e domínio de ligação do RNA e possui um papel importante na replicação e transcrição viral, no empacotamento dos vírions e na formação e manutenção do complexo ribonucleoproteína (RNP), podendo ser detectada em amostras de *swab* nasofaríngeo. A alta taxa de conservação da sequência genômica do gene *N* permite que essa região seja utilizada como alvo para testes diagnósticos (DATTA; SINGH; NAQVI, 2021; KADAM *et al.*, 2021).

Uma região genômica que possui um alto grau de conservação entre os coronavírus é o gene *M*, responsável pela codificação da glicoproteína M, proteína estrutural mais abundante nos coronavírus. O gene *M* é composto por 669 nucleotídeos e codifica uma proteína de 222 aminoácidos que desempenha um papel importante na montagem da

partícula viral e no direcionamento da formação do envelope viral, além de ser um alvo para a ação da resposta imune do hospedeiro (BIANCHI *et al.*, 2020; BAI; ZHONG; GAO, 2022).

Outra região importante para a codificação de proteínas estruturais é o gene *E*. Este gene é formado por 228 nucleotídeos e é responsável por codificar a proteína E, a menor das principais proteínas estruturais. A proteína E é um polipeptídeo formado por 75 aminoácidos, composta por dois domínios distintos - um domínio transmembranar hidrofóbico e uma cauda citoplasmática carregada. Essa proteína é altamente conservada entre os coronavírus, desempenhando uma função em comum entre eles de polimerizar-se formando um canal iônico - a viroporina - que permite a liberação das partículas virais da célula hospedeira. Devido ao seu importante papel para a patogênese do vírus, vacinas de vírus vivo atenuado baseada na deleção da proteína E foram desenvolvidas (BIANCHI *et al.*, 2020; KADAM *et al.*, 2021; BAI; ZHONG; GAO, 2022).

O gene *S* é formado por 3.822 nucleotídeos responsáveis por conter a informação genética para codificar a proteína da espícula viral, ou proteína *spike*, uma glicoproteína composta por 1.282 aminoácidos - a maior proteína do grupo das proteínas estruturais. Essa proteína recobre a superfície da partícula viral, projetando-se extensivamente a partir do envelope. É a partir da proteína *spike* que a partícula viral liga-se ao receptor da célula humana e medeia a fusão do vírus e da membrana do hospedeiro (BAI; ZHONG; GAO, 2022; KADAM *et al.*, 2021). Devido à função crítica e determinante na entrada do vírus à célula hospedeira, o surgimento de repetidas variantes do SARS-CoV-2 tem sido atribuído a mutações da proteína *spike* (MENGIST *et al.*, 2021). Além disso, a proteína *spike* tem sido o principal alvo para o desenvolvimento de vacinas, por ser um antígeno externo e abundante da partícula viral e ser facilmente detectado pelo sistema imune (AWADASSEID *et al.*, 2021).

### **3.4 A proteína *spike* e o domínio de ligação ao receptor**

Os coronavírus recebem este nome em função da glicoproteína *spike* que cobre sua superfície, formando projeções em formato de uma coroa. (VERMA; SUBBARAO, 2021). A proteína *spike* é uma proteína transmembranar de classe 1, composta por 3 regiões denominadas região transmembranar, domínio intracelular e região do ectodomínio, onde ficam localizadas as subunidades S1 e S2 (KADAM *et al.*, 2021). O subdomínio S1 possui duas unidades distintas, uma região N-terminal (S1-NTD), responsável por ligar-se à açúcares, e uma região C-terminal (S1-CTD) que possui o papel de reconhecer receptores proteicos. Esses dois subdomínios exercem papel fundamental na entrada do vírus à célula hospedeira: a porção S1 liga-se ao receptor da célula hospedeira enquanto a porção S2 tem função de fusão de membranas entre o vírus e o hospedeiro (VERMA; SUBBARAO, 2021).

No subdomínio S1 fica localizado o domínio de ligação ao receptor (RBD), composto por aproximadamente 230 aminoácidos que é responsável pela ligação à ACE-2 para entrar nas células-alvo (BAI; ZHONG; GAO, 2022). A região RBD fica localizada entre os resíduos de aminoácidos 333 e 527 da proteína *spike* e, devido a transições conformacionais nessa região que possibilitam a ocultação ou exposição de determinados resíduos, alterações na sequência de aminoácidos dessa região podem afetar drasticamente a afinidade pela ACE-2 (KADAM *et al.*, 2021; MAGAZINE *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2020). Essa maior afinidade entre a ligação da região RBD do SARS-CoV-2 com a ACE-2 da célula hospedeira pode inclusive ter contribuído para que o SARS-CoV-2 tenha uma transmissibilidade e infecciosidade até 4 vezes maior do SARS-CoV (MAGAZINE *et al.*, 2022). Além disso, a região RBD é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes produzidos durante a infecção por SARS-CoV-2 (TEGALLY *et al.*, 2020).

Alguns resíduos de aminoácidos presentes na região RBD possibilitam a estabilidade na ligação da partícula viral com a ACE-2. A exemplo disso, mutações no resíduo G502 podem impedir a ligação do vírus à célula hospedeira, assim como alterações nos resíduos Y449, L455, F486 e Y505 podem levar à desestabilizar a ligação com a ACE-2, e diminuir a capacidade de ligação da partícula viral à célula hospedeira, dependendo da troca de aminoácido que ocorrer. Da mesma maneira, alterações nesses resíduos podem levar a um aumento da afinidade entre o vírus e a ACE-2, favorecendo sua entrada e replicação na célula hospedeira. Mutações nos resíduos Q493, Q498 e N501 que reduzam o caráter polar dessa região podem aumentar muito a afinidade entre RBD e a célula hospedeira, devido a densa rede de contatos polares com a ACE-2 (STARR *et al.*, 2020).

Além de favorecer a entrada do vírus nas células para permitir a replicação viral, alterações na sequência de aminoácidos da região RBD também podem contribuir para a diminuição da neutralização dos vírus pelo sistema imune. Por exemplo, mutações presentes nos resíduos K417 estão associadas tanto ao aumento da transmissibilidade quanto à redução da sensibilidade aos anticorpos neutralizantes. Uma mutação no resíduo L452 é capaz de aumentar a afinidade de ligação do receptor ACE-2 e diminuir a interação com os anticorpos induzidos pela vacina, assim como alterações no resíduo E484. Da mesma forma, alterações no resíduo N501 estão relacionadas ao aumento da afinidade com a ACE-2 e gera uma concentração maior das partículas virais na faringe e nas cavidades nasais aumentando sua taxa de transmissão (HADJ HASSINE, 2022).

### **3.5 As mutações e as variantes**

Entre os vírus que possuem seu material genético composto de RNA, os coronavírus são os que possuem as menores taxas de mutações. Isso ocorre devido a presença de uma

enzima, a *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp), que tem uma atividade de correção (proofreading) de nucleotídeos erroneamente incorporados, resultando em uma precisão de replicação elevada (FERRON *et al.*, 2018). No entanto, os vírus mutam constantemente e essas mutações podem surgir aleatoriamente quando o vírus entra em contato com a variedade genética do hospedeiro e ambientes celulares distintos. Algumas dessas mutações podem persistir por fornecer vantagens evolutivas aos vírus que as carregam (CHAKRABORTY, 2021).

Com a alta taxa de transmissão, inúmeras mutações no SARS-CoV-2 estão sendo documentadas e novas variantes vêm sendo descritas. Para priorizar o monitoramento e auxiliar nas discussões públicas sobre variantes e o cenário epidemiológico pandêmico com a população, o grupo consultor técnico sobre evolução de vírus da OMS criou um sistema de classificação e nomenclatura para as variantes do SARS-CoV-2. Essas variantes podem ser classificadas como variantes de interesse, variantes sob monitoramento e variantes de preocupação (WHO, 2022).

As variantes sob monitoramento (VUM, do inglês *variants under monitoring*) compreendem variantes do SARS-CoV-2 que possuem alterações em seu genoma em que haja suspeita que possa alterar características do vírus mas ainda não há clareza sobre seu mecanismo. Já as variantes de interesse (ou VOI, do inglês *variants of interest*) apresentam alterações fenotípicas, como mudanças na virulência, antigenicidade ou epidemiologia da doença e possuem alterações genômicas que causam um aumento significativo na transmissão na comunidade ou em *clusters* de infecção. São um alerta de risco emergente para a saúde pública global (JANIK *et al.*, 2021; WHO, 2022).

As variantes de preocupação (ou VOCs, do inglês *variants of concern*) são aquelas que possuem evidências que as alterações no seu genoma estão associadas a um aumento da transmissibilidade, da virulência, da apresentação clínica ou da evasão imune. Das milhões de variantes que surgiram até o momento, 5 variantes foram classificadas pela OMS como variantes de preocupação: variante alfa (ou B.1.1.7, primeiramente descrita na Inglaterra), variante beta (ou B.1.351, primeiramente descrita na África do Sul), variante gama (ou P.1, primeiramente descrita no Brasil), variante delta (ou B.1.617.2, primeiramente descrita na Índia) e variante ômicron (ou B.1.1.529, descrita primeiramente na África do Sul e que rapidamente se espalhou por diversos países em novembro de 2021) (WHO, 2022). Em comum, as VOCs possuem suas principais mutações na região RBD da proteína *spike* que, devido a grande interação com células hospedeiras, tem sido considerado um *hotspot* para mutações (CASCELLA *et al.*, 2021).

A primeira VOC descrita foi a variante alfa (ou B.1.1.7). Identificada pela primeira vez em outubro de 2020 na Inglaterra, se espalhou rapidamente por diversos países europeus e, em pouco tempo, foi identificada em outros países como Brasil, México, China, Coreia do Sul e Índia (COSAR *et al.*, 2022). Essa variante possui 17 mutações ao todo quando comparada com o genoma de referência Wuhan-Hu-1 (NC\_045512.2), sendo 8 localizadas na proteína *spike* e dessas, duas mutações são consideradas “mutações assinatura” e estão localizadas na região RBD: N501Y e A570D (JANIK *et al.*, 2021). Supõe-se que a mutação N501Y, tenha contribuído para a transmissão dessa variante em uma taxa de 40-70% maior que outras variantes circulantes antes do surgimento da alfa, enquanto a mutação A570D leva a alterações conformacionais na região RBD que contribuem para a fusão da partícula viral e a célula do hospedeiro (COSAR *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2021). Embora a variante alfa tenha sido primeiramente identificada na Inglaterra, sua origem exata não é clara. Entretanto, sua identificação foi possível devido ao programa de vigilância genômica de SARS-CoV-2 no Reino Unido que iniciou uma investigação em larga escala (CHAND *et al.*, 2020).

A variante beta (ou B.1.351) teve seu primeiro registro em outubro de 2020 na África do Sul e rapidamente se espalhou pelo país. Cerca de 20 mutações diferentes da sequência genômica de referência NC\_045512.2 foram descritas nessa variante, sendo 9 delas no gene S. Dessas 9 mutações no gene que codifica a proteína *spike*, 3 estão localizadas na porção RBD: N501Y (em comum com a VOC alfa), E484K e K417N. Existem evidências que sustentam que a mutação E484K, assim como a mutação N501Y, aumenta ainda mais a afinidade de ligação da porção RBD à ACE-2. Já a mutação K417N parece ter seu principal impacto na capacidade de manter a porção RBD na conformação aberta, facilitando a ligação do vírus com a célula hospedeira (TEGALLY *et al.*, 2021). Além disso, os resíduos K417 e E484 são posições importantes para o reconhecimento de anticorpos neutralizantes, podendo as mutações nesses resíduos levar potencialmente a um escape imune após infecções naturais ou afetar a potência dos anticorpos induzidos pela vacinação (COSAR *et al.*, 2022).

Em janeiro de 2021 a variante gama (ou P.1, descendente da linhagem B.1.1.28) foi identificada no Brasil, sendo os primeiros casos da variante gama observados entre viajantes que chegaram ao Japão vindos do Brasil. No seu genoma, cerca de 21 novas mutações (quando comparada ao genoma referência) foram identificadas. Entre essas 21 mutações, 12 estão localizadas na proteína *spike*, sendo 3 na porção RBD. As mutações assinatura da variante gama são as mutações K417T, E484K e N501Y que, assim como a variante beta, estão associadas ao aumento da transmissão e ao escape dos anticorpos neutralizantes (JANIK *et al.*, 2021). Embora compartilhe os mesmos resíduos mutados na

região RBD que a variante beta, a mutação no resíduo K417 difere no aminoácido mutado. Entretanto, um estudo mostrou que as mutações K417N e K417T têm consequências idênticas na capacidade de ambas as variantes se ligarem ao ACE-2 (SA *et al.*, 2022). A variante gama foi responsável por um aumento exponencial de casos no primeiro semestre de 2021 no Brasil, estabelecendo uma segunda onda de casos, muito mais agressiva que a anterior (NAVECA, Felipe Gomes *et al.*, 2021).

Já a variante delta (B.1.617.2), primeiramente documentada na Índia em outubro de 2020, foi classificada inicialmente como uma VOI pela OMS. Em maio de 2021 foi reclassificada como VOC, uma vez que rapidamente se espalhou por diversos países, tornando-se a variante mais dominante ao redor do mundo. Sua taxa de transmissão mostrou ser 60% maior quando comparado com as demais variantes (LI; LOU; FAN, 2021; WHO, 2022). Essa variante possui cerca de 15 mutações descritas, sendo 2 mutações características localizadas na porção RBD da proteína *spike* - as mutações L452R e T478K (KANNAN *et al.*, 2021). A mutação no resíduo L452 contribui para a estabilização da interação entre a proteína *spike* e a ACE-2, muito embora esse resíduo não interaja diretamente com o receptor (CHOI; SMITH, 2021), enquanto a mutação no resíduo T478 leva à um aumento na transmissão, na gravidade e no escape de anticorpos neutralizantes, contribuindo para a maior infecciosidade dessa variante (DHAWAN *et al.*, 2022). Diferente das variantes alfa, beta e gama, a variante delta não compartilha mutações com as VOCs anteriormente em circulação.

A última VOC a ser assim classificada pela OMS é a variante ômicron. Essa VOC foi primeiramente identificada na África do Sul em novembro de 2021, mas rapidamente já estava disseminada mundialmente, sendo identificada em múltiplos países em cerca de uma semana. A rápida disseminação dessa variante deve-se possivelmente ao seu perfil mutacional bem distinto das variantes anteriores. A variante ômicron possui uma constelação de mutações, com mais de 50 alterações no seu genoma quando comparado ao genoma de referência NC\_045512.2. Dessas mutações, 30 estão concentradas na proteína *spike*, sendo dessas mais de 15 somente na região RBD. As mutações presentes na região RBD são G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H e T547K (THAKUR; RATHO, 2022; XU *et al.*, 2022).

Além de algumas mutações compartilhadas com outras variantes, como a mutação N501Y, presentes nas alfa, beta e gama, e a mutação T478K compartilhada com a variante delta, já descritas como causadoras de um aumento da infectividade das variantes que as carregam, a variante ômicron possui outras mutações que reforçam esses mecanismos. As

mutações N440K e Y505H também estão associadas a um aumento da infecciosidade, juntamente com a mutação S477N, que leva a um aumento da afinidade com a ACE-2. Embora outras mutações como G339D, S371L, S373P e S375F tenham um impacto relativamente mais suave sobre a afinidade com a ACE-2, esse grande número de substituições não conservativas na região RBD afeta drasticamente a interação entre a proteína *spike* e o receptor na célula humana, tornando sua transmissibilidade maior (AO *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2022).

A variante ômicron rapidamente substituiu a variante delta e se tornou predominante no mundo inteiro. Com a sua rápida disseminação, novas linhagens descendentes e recombinantes foram surgindo. Atualmente, a OMS mantém somente a variante ômicron como VOC, e monitora suas subvariantes BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5 e formas recombinantes circulantes BA.1/BA.2, como XE (WHO, 2022). No Brasil, a subvariante BQ.1 tem mostrado uma importante capacidade de transmissão comparada às outras sublinhagens do coronavírus (ALBERT EINSTEIN, 2022; SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE, 2022)

### **3.6 A identificação das variantes**

Com a rápida disseminação do SARS-CoV-2 e sua introdução em diversos países, novas variantes surgindo e causando aumento no número de casos, a vigilância epidemiológica de surtos tornou-se imprescindível, e pode permitir o controle da disseminação do vírus. A identificação desses vírus é essencial para contenção da pandemia por COVID-19, sendo realizada através da análise da evolução de linhagens, análise filogenética e comparação entre as mutações destas variantes (GILCHRIST *et al.*, 2015; PILLAY *et al.*, 2020).

O sequenciamento do genoma completo do SARS-CoV-2 (ou WGS) pode ser realizado para identificar com precisão a variante presente e permite determinar, inclusive, a rota de transmissão do vírus dentro de uma população (PILLAY *et al.*, 2020). As tecnologias de sequenciamento massivo, como NGS, desempenham um papel fundamental na determinação do surgimento de novas variantes e fornece informações essenciais para o enfrentamento da pandemia, auxiliando no desenvolvimento de vacinas, na análise filogenética do vírus, no monitoramento da disseminação e no desenvolvimento de testes moleculares diagnósticos através das informações da sequência genômica do vírus (JOHN *et al.*, 2021). A identificação de novas variantes e o rastreamento de mutações são estratégias essenciais para a contenção da pandemia, mas atualmente o custo elevado dessa metodologia se soma aos desafios de execução e da análise de resultados, tornando o uso

do NGS massivamente em serviços públicos de saúde um grande desafio (PILLAY *et al.*, 2020).

Uma alternativa ao uso do NGS para realizar a vigilância genômica do SARS-CoV-2 é o emprego do sequenciamento de Sanger, considerado método de referência na identificação de sequências nucleotídicas (CROSSLEY *et al.*, 2020). Isso é possível pois esta técnica, descrita por Frederick Sanger em 1975, realiza a identificação da sequência nucleotídica utilizando o princípio de tamanho de fragmentos associados à fluorescência e determinada por uma eletroforese capilar. Apesar de ser a primeira geração de sequenciamento, sua análise é simples, e é realizada pela comparação à sequência de referência do organismo analisado (SANGER; COULSON, 1975). Além disso, no que se refere à custos, a execução da técnica de sequenciamento de Sanger emprega reagentes com custos mais baixos quando comparado aos reagentes utilizados para realização do sequenciamento de nova geração quando se trata do processamento de amostras individualmente, uma vez que o NGS torna-se vantajoso quando se deseja gerar um grande número de sequências simultaneamente (DORLASS *et al.*, 2021).

O sequenciamento de Sanger possui algumas limitações, como por exemplo, a capacidade de geração de dados devido à limitação no tamanho do fragmento a ser sequenciado e o número relativamente baixo de amostras que podem ser sequenciadas em paralelo (KUMAR; COWLEY; DAVIS, 2019). Entretanto, com o sequenciamento de Sanger é possível realizar a identificação de substituições e pequenas inserções e deleções na sequência de DNA (BEHJATI; TARPEY, 2013). Essa característica possibilita a identificação do perfil mutacional de determinadas regiões ou genes de interesse. No caso do SARS-CoV-2, as VOCs carregam suas principais mutações entre os 749 nucleotídeos da região RBD da proteína *spike*, possibilitando que essas mutações sejam identificadas por sequenciamento de Sanger (CASCELLA *et al.*, 2021).

O sequenciamento de Sanger da região RBD da proteína *spike* pode contribuir com a compreensão do perfil epidemiológico da infecção por SARS-CoV-2, com a sua vigilância genômica e promover um acompanhamento do surgimento de novas variantes. Essa facilidade possibilita que a metodologia seja incorporada a sistemas de saúde públicos permitindo estabelecer uma rede de vigilância genômica com notificação de resultado de variantes em um curto período de tempo a um custo que possa ser incorporado aos sistemas públicos, sendo de extrema importância no contexto de tomada de decisões rápidas durante a pandemia por COVID-19 (BEZERRA *et al.*, 2021).

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo geral

Realizar a validação da técnica de sequenciamento de Sanger da porção RBD do gene S para a identificação das principais mutações presentes nas variantes de preocupação na infecção por SARS-CoV-2.

### 4.2 Objetivos específicos

- Padronizar as reações de transcrição reversa do genoma do SARS-CoV-2 e a PCR da região RBD, bem como a técnica de Sequenciamento de Sanger e sua análise para diferenciação das VOCs do SARS-CoV-2;
- Estabelecer o limite de detecção da metodologia em diferentes Cts (*cycle threshold*) virais identificados por RT-qPCR, para determinar a carga viral mínima necessária para realização do sequenciamento;
- Avaliar a presença das mutações na porção RBD do gene S do SARS-CoV-2 das principais variantes de preocupação circulantes no sul do Brasil (variantes gama, delta, ômicron e algumas de suas subvariantes);
- Comparar os resultados gerados pelo sequenciamento de Sanger com a atribuição de linhagem obtida por WGS, utilizando sequenciamento de nova geração, para verificar índice concordância entre as técnicas.

## **5. Resultados e Discussão**





































## 6. Considerações finais

O sequenciamento de Sanger da região RBD da proteína *spike* do SARS-CoV-2 mostrou-se uma ferramenta efetiva para identificação presuntiva das variantes de preocupação do vírus. Através dela, obtivemos 100% de concordância com os resultados obtidos por sequenciamento genômico completo do SARS-CoV-2. O fragmento 75L/77R compreende uma região do vírus considerada um *hotspot* de mutações, sendo possível manter o protocolo elaborado mesmo em cenário de introdução de novas variantes - como nos casos da introdução das variantes delta, ômicron e das sublinhagens de ômicron que surgiram durante o período de execução desse trabalho.

Durante a elaboração do trabalho, pudemos viabilizar a caracterização de dois surtos de infecção de SARS-CoV-2 durante o período de introdução da variante delta, identificando os primeiros casos dessa variante na instituição. Além disso, pudemos contribuir com a elucidação de um caso de infecção persistente por SARS-CoV-2 em um paciente pediátrico imunossuprimido, pela caracterização das variantes em amostras coletadas em momentos epidemiológicos distintos.

A partir deste trabalho, disponibilizamos o exame SQCOV (Sequenciamento parcial da porção RBD-Spike do SARS-CoV-2) para caracterização presuntiva das variantes do SARS-CoV-2 descritas neste trabalho para vigilância genômica epidemiológica vírus pelo Serviço de Medicina Ocupacional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SMO/HCPA), além de uso eventual por parte do Serviço de Infectologia do hospital para investigar casos de pacientes que apresentam positividade viral por períodos prolongados.

## 7. Referências

- ALBERT EINSTEIN, HOSPITAL. SARS-OMICs | Atlas multi-ômico da COVID-19 brasileira. 2022. Disponível em: <https://sarsomics.com/dashboard/>. Acesso em: 10 dez. 2022.
- AO, D.; LAN, T.; HE, X.; LIU, J.; CHEN, L.; BAPTISTA-HON, D. T.; ZHANG, K.; WEI, X. SARS-CoV-2 Omicron variant: Immune escape and vaccine development. **MedComm**, v. 3, n. 1, p. e126, mar. 2022. <https://doi.org/10.1002/mco2.126>.
- AWADASSEID, A.; WU, Y.; TANAKA, Y.; ZHANG, W. Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 1, p. 8–19, 2021. <https://doi.org/10.7150/ijbs.52569>.
- BAI, C.; ZHONG, Q.; GAO, G. F. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. **Science China. Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 280–294, fev. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4>.
- BEHJATI, S.; TARPEY, P. S. What is next generation sequencing? **Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition**, v. 98, n. 6, p. 236–238, dez. 2013. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>.
- BEZERRA, M. F.; MACHADO, L. C.; DE CARVALHO, V. do C. V.; DOCENA, C.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; AYRES, C. F. J.; PAIVA, M. H. S.; WALLAU, G. L. A Sanger-based approach for scaling up screening of SARS-CoV-2 variants of interest and concern. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 92, p. 104910, ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104910>.
- BIANCHI, M.; BENVENUTO, D.; GIOVANETTI, M.; ANGELETTI, S.; CICOZZI, M.; PASCARELLA, S. Sars-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins: Structural Differences Linked to Virus Characteristics? **BioMed Research International**, v. 2020, p. e4389089, 30 maio 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4389089>.
- BRANT, A. C.; TIAN, W.; MAJERCIK, V.; YANG, W.; ZHENG, Z.-M. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. **Cell & Bioscience**, v. 11, p. 136, 19 jul. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>.
- CASCELLA, M.; RAJNIK, M.; ALEEM, A.; DULEBOHN, S. C.; DI NAPOLI, R. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>. Acesso em: 23 maio 2021.
- CHAKRABORTY, S. Evolutionary and structural analysis elucidates mutations on SARS-CoV2 spike protein with altered human ACE2 binding affinity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 534, p. 374–380, 1 jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.075>.
- CHAN, J. F.-W.; YUAN, S.; KOK, K.-H.; TO, K. K.-W.; CHU, H.; YANG, J.; XING, F.; LIU, J.; YIP, C. C.-Y.; POON, R. W.-S.; TSOI, H.-W.; LO, S. K.-F.; CHAN, K.-H.; POON, V. K.-M.; CHAN, W.-M.; IP, J. D.; CAI, J.-P.; CHENG, V. C.-C.; CHEN, H.; ... YUEN, K.-Y. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 514–523, fev. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9).
- CHAND, M.; HOPIKINS, S.; DABRERA, G.; ALLEN, H.; LAMAGNI, T.; EDEGHERE, O.; ACHISON, C.; MYERS, R. **Investigation of novel SARS-CoV-2 variant: Variant of Concern 202012/01**. [S. l.]: Public Health England, 2020. Disponível em: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/959361/Technical\\_Briefing\\_VOC202012-2\\_Briefing\\_2.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/959361/Technical_Briefing_VOC202012-2_Briefing_2.pdf). Acesso em: 9 dez. 2022.
- CHIARA, M.; D'ERCHIA, A. M.; GISSI, C.; MANZARI, C.; PARISI, A.; RESTA, N.; ZAMBELLI, F.; PICARDI, E.; PAVESI, G.; HORNER, D. S.; PESOLE, G. Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 616–630, 1 mar. 2021.

<https://doi.org/10.1093/bib/bbaa297> .

CHOI, J. Y.; SMITH, D. M. SARS-CoV-2 Variants of Concern. **Yonsei Medical Journal**, v. 62, n. 11, p. 961–968, nov. 2021. <https://doi.org/10.3349/yjm.2021.62.11.961> .

COSAR, B.; KARAGULLEOGLU, Z. Y.; UNAL, S.; INCE, A. T.; UNCUOGLU, D. B.; TUNCER, G.; KILINC, B. R.; OZKAN, Y. E.; OZKOC, H. C.; DEMIR, I. N.; EKER, A.; KARAGOZ, F.; SIMSEK, S. Y.; YASAR, B.; PALA, M.; DEMIR, A.; ATAK, I. N.; MENDI, A. H.; BENGI, V. U.; ... DEMIR-DORA, D. SARS-CoV-2 Mutations and their Viral Variants. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 63, p. 10–22, fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.06.001> .

CROSSLEY, B. M.; BAI, J.; GLASER, A.; MAES, R.; PORTER, E.; KILLIAN, M. L.; CLEMENT, T.; TOOHEY-KURTH, K. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.**, v. 32, n. 6, p. 767–775, nov. 2020. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833> .

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9> .

DATTA, M.; SINGH, D. D.; NAQVI, A. R. Molecular Diagnostic Tools for the Detection of SARS-CoV-2. **International Reviews of Immunology**, v. 40, n. 1–2, p. 143–156, 2021. <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1871477> .

DHAWAN, M.; SHARMA, A.; PRIYANKA, null; THAKUR, N.; RAJKHOWA, T. K.; CHOUDHARY, O. P. Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 18, n. 5, p. 2068883, 30 nov. 2022. <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2068883> .

DORLASS, E. G.; LOURENÇO, K. L.; MAGALHÃES, R. D. M.; SATO, H.; FIORINI, A.; PEIXOTO, R.; COELHO, H. P.; TELEZYNSKI, B. L.; SCAGION, G. P.; OMETTO, T.; THOMAZELLI, L. M.; OLIVEIRA, D. B. L.; FERNANDES, A. P.; DURIGON, E. L.; FONSECA, F. G.; TEIXEIRA, S. M. R. Survey of SARS-CoV-2 genetic diversity in two major Brazilian cities using a fast and affordable Sanger sequencing strategy. **Genomics**, v. 113, n. 6, p. 4109–4115, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.10.015> .

FERRON, F.; SUBISSI, L.; SILVEIRA DE MORAIS, A. T.; LE, N. T. T.; SEVAJOL, M.; GLUAIS, L.; DECROLY, E.; VONRHEIN, C.; BRICOGNE, G.; CANARD, B.; IMBERT, I. Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 2, p. E162–E171, 9 jan. 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718806115> .

FRUTOS, R.; SERRA-COBO, J.; CHEN, T.; DEVAUX, C. A. COVID-19: Time to exonerate the pangolin from the transmission of SARS-CoV-2 to humans. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 84, p. 104493, out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104493> .

GILCHRIST, C. A.; TURNER, S. D.; RILEY, M. F.; PETRI, W. A.; HEWLETT, E. L. Whole-Genome Sequencing in Outbreak Analysis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 541–563, jul. 2015. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-13> .

GORBALENYA, A. E.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; DE GROOT, R. J.; DROSTEN, C.; GULYAEVA, A. A.; HAAGMANS, B. L.; LAUBER, C.; LEONTOVICH, A. M.; NEUMAN, B. W.; PENZAR, D.; PERLMAN, S.; POON, L. L. M.; SAMBORSKIY, D. V.; SIDOROV, I. A.; SOLA, I.; ZIEBUHR, J.; CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, abr. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z> .

GRALINSKI, L. E.; MENACHERY, V. D. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 135, 24 jan. 2020. <https://doi.org/10.3390/v12020135> .

GURUPRASAD, L. Human SARS CoV-2 spike protein mutations. **Proteins**, 17 jan. 2021. DOI 10.1002/prot.26042. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8014176/> . Acesso em: 23

maio 2021.

HADJ HASSINE, I. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. **Reviews in Medical Virology**, v. 32, n. 4, p. e2313, jul. 2022. <https://doi.org/10.1002/rmv.2313> .

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, mar. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7> .

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **SARS-CoV-2 Taxonomy History**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=202001846](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202001846) . Acesso em: 4 out. 2021.

JANIK, E.; NIEMCEWICZ, M.; PODOGROCKI, M.; MAJSTEREK, I.; BIJAK, M. The Emerging Concern and Interest SARS-CoV-2 Variants. **Pathogens**, v. 10, n. 6, p. 633, jun. 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060633> .

JOHN, G.; SAHAJPAL, N. S.; MONDAL, A. K.; ANANTH, S.; WILLIAMS, C.; CHAUBEY, A.; ROJIANI, A. M.; KOLHE, R. Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. 845–867, set. 2021. <https://doi.org/10.3390/cimb43020061> .

JOHN HOPKINS UNIVERSITY. COVID-19 Map. 2022. **Johns Hopkins Coronavirus Resource Center**. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> . Acesso em: 19 maio 2021.

KADAM, S. B.; SUKHRAMANI, G. S.; BISHNOI, P.; PABLE, A. A.; BARVKAR, V. T. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 180–202, mar. 2021. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000537> .

KANNAN, S. R.; SPRATT, A. N.; COHEN, A. R.; NAQVI, S. H.; CHAND, H. S.; QUINN, T. P.; LORSON, C. L.; BYRAREDDY, S. N.; SINGH, K. Evolutionary analysis of the Delta and Delta Plus variants of the SARS-CoV-2 viruses. **Journal of Autoimmunity**, v. 124, p. 102715, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102715> .

KUMAR, K. R.; COWLEY, M. J.; DAVIS, R. L. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 45, n. 7, p. 661–673, out. 2019. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688446> .

LI, M.; LOU, F.; FAN, H. SARS-CoV-2 Variants of Concern Delta: a great challenge to prevention and control of COVID-19. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, p. 349, 27 set. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00767-1> .

LIU, P.; JIANG, J.-Z.; WAN, X.-F.; HUA, Y.; LI, L.; ZHOU, J.; WANG, X.; HOU, F.; CHEN, J.; ZOU, J.; CHEN, J. Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 5, p. e1008421, 14 maio 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008421> .

MAGAZINE, N.; ZHANG, T.; WU, Y.; MCGEE, M. C.; VEGGIANI, G.; HUANG, W. Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 640, 19 mar. 2022. <https://doi.org/10.3390/v14030640> .

MENGIST, H. M.; KOMBE KOMBE, A. J.; MEKONNEN, D.; ABEBAW, A.; GETACHEW, M.; JIN, T. Mutations of SARS-CoV-2 spike protein: Implications on immune evasion and vaccine-induced immunity. **Seminars in Immunology**, v. 55, p. 101533, jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101533> .

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coronavírus Brasil. 2022. **Coronavírus Brasil**. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/> . Acesso em: 9 dez. 2022.

NASCIMENTO, V. A. do; CORADO, A. de L. G.; NASCIMENTO, F. O. do; COSTA, Á. K. A. da; DUARTE, D. C. G.; LUZ, S. L. B.; GONÇALVES, L. M. F.; JESUS, M. S. de; COSTA, C. F. da; DELATORRE, E.; NAVECA, F. G. Genomic and phylogenetic characterisation of an imported case of SARS-CoV-2 in Amazonas State, Brazil. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e200310, 2020. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200310> .

NAVECA, F. G.; NASCIMENTO, V.; DE SOUZA, V. C.; CORADO, A. de L.; NASCIMENTO, F.; SILVA, G.; COSTA, Á.; DUARTE, D.; PESSOA, K.; MEJÍA, M.; BRANDÃO, M. J.; JESUS, M.; GONÇALVES, L.; DA COSTA, C. F.;

SAMPAIO, V.; BARROS, D.; SILVA, M.; MATTOS, T.; PONTES, G.; ... BELLO, G. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. **Nature Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1230–1238, jul. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01378-7>.

NAVECA, F.; NASCIMENTO, V.; SOUZA, V.; CORADO, A.; NASCIMENTO, F.; SILVA, G.; COSTA, Á.; DUARTE, D.; PESSOA, K.; GONÇALVES, L.; BRANDÃO, M. J.; JESUS, M.; FERNANDES, C.; PINTO, R.; SILVA, M.; MATTOS, T.; WALLAU, G. L.; SIQUEIRA, M. M.; RESENDE, P. C.; ... BELLO, G. Relação filogenética de sequências SARS-CoV-2 do Amazonas com variantes emergentes brasileiras que abrigam mutações E484K e N501Y na proteína Spike. **Fiocruz**, 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/en/node/82664>. Acesso em: 23 maio 2021.

NIE, J.; LI, Q.; ZHANG, L.; CAO, Y.; ZHANG, Y.; LI, T.; WU, J.; LIU, S.; ZHANG, M.; ZHAO, C.; LIU, H.; NIE, L.; QIN, H.; WANG, M.; LU, Q.; LI, X.; LIU, J.; LIANG, H.; JIANG, T.; ... WANG, Y. Functional comparison of SARS-CoV-2 with closely related pangolin and bat coronaviruses. **Cell Discovery**, v. 7, p. 21, 6 abr. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00256-3>.

O'TOOLE, Á.; SCHER, E.; UNDERWOOD, A.; JACKSON, B.; HILL, V.; MCCRONE, J. T.; COLQUHOUN, R.; RUIS, C.; ABU-DAHAB, K.; TAYLOR, B.; YEATS, C.; DU PLESSIS, L.; MALONEY, D.; MEDD, N.; ATTWOOD, S. W.; AANENSEN, D. M.; HOLMES, E. C.; PYBUS, O. G.; RAMBAUT, A. Assignment of epidemiological lineages in an emerging pandemic using the pangolin tool. **Virus Evolution**, v. 7, n. 2, 1 out. 2021. DOI 10.1093/ve/veab064. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ve/veab064>. Acesso em: 11 out. 2021.

PARASKEVIS, D.; KOSTAKI, E. G.; MAGIORKINIS, G.; PANAYIOTAKOPOULOS, G.; SOURVINOS, G.; TSIODRAS, S. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 79, p. 104212, abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104212>

PILLAY, S.; GIANDHARI, J.; TEGALLY, H.; WILKINSON, E.; CHIMUKANGARA, B.; LESSELLS, R.; MOOSA, Y.; MATTISON, S.; GAZY, I.; FISH, M.; SINGH, L.; KHANYILE, K. S.; SAN, J. E.; FONSECA, V.; GIOVANETTI, M.; ALCANTARA, L. C.; DE OLIVEIRA, T. Whole Genome Sequencing of SARS-CoV-2: Adapting Illumina Protocols for Quick and Accurate Outbreak Investigation during a Pandemic. **Genes**, v. 11, n. 8, p. 949, 17 ago. 2020. <https://doi.org/10.3390/genes11080949>

RAMBAUT, A.; HOLMES, E. C.; O'TOOLE, Á.; HILL, V.; MCCRONE, J. T.; RUIS, C.; DU PLESSIS, L.; PYBUS, O. G. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1403–1407, nov. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>

SA, G.; N, R.-V.; S, G.; C, C.; A, R. The Role of Spike Protein Mutations in the Infectious Power of SARS-COV-2 Variants: A Molecular Interaction Perspective. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, v. 23, n. 7, 4 maio 2022. DOI 10.1002/cbic.202100393. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34529328/> Acesso em: 10 dez. 2022.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, n. 3, p. 441–448, 25 maio 1975. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)

SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE. **Boletim Genômico 14 - Vigilância Genômica CEVS/SES-RS**. [S. l.: s. n.], 21 nov. 2022. Disponível em: <https://coronavirus.rs.gov.br/upload/arquivos/202211/21171734-211122-informe-vigilancia-genomica.pdf> Acesso em: 10 dez. 2022.

STARR, T. N.; GREANEY, A. J.; HILTON, S. K.; ELLIS, D.; CRAWFORD, K. H. D.; DINGENS, A. S.; NAVARRO, M. J.; BOWEN, J. E.; TORTORICI, M. A.; WALLS, A. C.; KING, N. P.; VEESLER, D.; BLOOM, J. D. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1295-1310.e20, 3 set. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.012>

TEGALLY, H.; WILKINSON, E.; GIOVANETTI, M.; IRANZADEH, A.; FONSECA, V.; GIANDHARI, J.; DOOLABH, D.; PILLAY, S.; SAN, E. J.; MSOMI, N.; MLISANA, K.; GOTTBORG, A. von; WALAZA, S.; ALLAM, M.; ISMAIL, A.; MOHALE, T.; GLASS, A. J.; ENGELBRECHT, S.; ZYL, G. V.; ... OLIVEIRA, T. de. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. **medRxiv**, p. 2020.12.21.20248640, 22 dez. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.12.21.20248640>

TEGALLY, H.; WILKINSON, E.; GIOVANETTI, M.; IRANZADEH, A.; FONSECA, V.; GIANDHARI, J.; DOOLABH, D.; PILLAY, S.; SAN, E. J.; MSOMI, N.; MLISANA, K.; VON GOTTBORG, A.; WALAZA, S.; ALLAM, M.; ISMAIL, A.; MOHALE, T.; GLASS, A. J.; ENGELBRECHT, S.; VAN ZYL, G.; ... DE OLIVEIRA, T. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. **Nature**, v. 592, n. 7854, p. 438–443, 15 abr. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>

THAKUR, V.; RATHO, R. K. OMICRON (B.1.1.529): A new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 5, p. 1821–1824, maio 2022. <https://doi.org/10.1002/jmv.27541>

VERMA, J.; SUBBARAO, N. A comparative study of human betacoronavirus spike proteins: structure, function and therapeutics. **Archives of Virology**, , p. 1–18, 22 jan. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-04961-y>

WANG, M.-Y.; ZHAO, R.; GAO, L.-J.; GAO, X.-F.; WANG, D.-P.; CAO, J.-M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 587269, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>

WEISS, S. R.; LEIBOWITZ, J. L. Coronavirus Pathogenesis. **Advances in Virus Research**, v. 81, p. 85–164, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>

WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso em: 6 jun. 2021.

WONG, A. C. P.; LI, X.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y. Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 174, 20 fev. 2019. <https://doi.org/10.3390/v11020174>

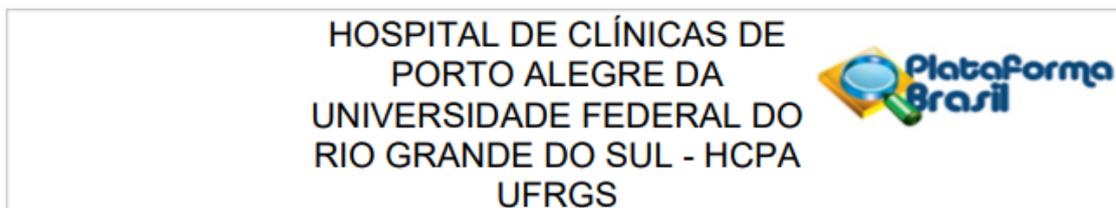
XU, A.; HONG, B.; LOU, F.; WANG, S.; LI, W.; SHAFQAT, A.; AN, X.; ZHAO, Y.; SONG, L.; TONG, Y.; FAN, H. Sub-lineages of the SARS-CoV-2 Omicron variants: Characteristics and prevention. **MedComm**, v. 3, n. 3, p. e172, set. 2022. <https://doi.org/10.1002/mco2.172>

YANG, T.-J.; YU, P.-Y.; CHANG, Y.-C.; LIANG, K.-H.; TSO, H.-C.; HO, M.-R.; CHEN, W.-Y.; LIN, H.-T.; WU, H.-C.; HSU, S.-T. D. Effect of SARS-CoV-2 B.1.1.7 mutations on spike protein structure and function. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 28, n. 9, p. 731–739, set. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00652-z>

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X.; YANG, B.; SONG, J.; ZHAO, X.; HUANG, B.; SHI, W.; LU, R.; NIU, P.; ZHAN, F.; MA, X.; WANG, D.; XU, W.; WU, G.; GAO, G. F.; TAN, W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

## 8. Anexos

### Anexo I - Parecer Consubstanciado do CEP (Plataforma Brasil)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Otimização de um teste presuntivo de VOC (variant of concern) via sequenciamento de Sanger da porção RBD (receptor binding domain) da proteína da espícula viral de SARS-CoV-2

**Pesquisador:** Fernanda de Paris

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 48879321.0.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** FIPE/HCPA

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.862.713

##### Apresentação do Projeto:

Em dezembro de 2019, a rápida disseminação de uma pneumonia de origem desconhecida chamou a atenção das autoridades de saúde em Wuhan, na China. Mais tarde, em janeiro de 2020, o agente etiológico foi anunciado como sendo um novo vírus pertencente à família dos coronavírus. Em fevereiro de 2020 o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus nomeia o novo coronavírus como SARS-CoV-2 (do inglês severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 – SARS-CoV-2) e em março de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) decreta pandemia por COVID-19, doença causada pelo novo coronavírus. Mesmo mais de um ano após a declaração de pandemia por COVID-19, e com todos os esforços mundiais em busca do esclarecimento da doença e da contínua tentativa de limitar sua transmissão, a rápida disseminação do vírus tem levado à contínua geração de diferentes genomas de SARS-CoV-2. Essa evolução genômica dá origem a diversas variantes e novas linhagens que têm características diferentes em comparação com seus ancestrais. Algumas dessas variantes têm demonstrado mudanças com alto grau de significância para a saúde pública global. As novas variantes podem apresentar aumento da transmissibilidade ou aumento da virulência e alteração na apresentação clínica da doença. A

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.862.713

classificação utilizada cita variantes de preocupação (do inglês "variants of concern" - VOCs) que englobam as linhagens Alfa (ou B.1.1.7, primeiramente descrita na Inglaterra), Beta (ou B1.351, primeiramente descrita na África do Sul), Gama (ou P1, primeiramente descrita no Brasil) e Delta (ou B1.617.2, recentemente descrita na Índia). Até o presente momento, para a caracterização dessas linhagens é necessária a análise do genoma completo de SARS-CoV-2, utilizando-se de ferramentas moleculares como o sequenciamento de nova geração (do inglês "new generation sequencing - NGS). Apesar das inúmeras vantagens, ainda é uma ferramenta com custo alto para ser utilizada em larga escala e ser absorvida pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e sistemas de vigilância epidemiológica do país. Nesse sentido, alternativas devem ser pensadas para que seja possível fazer a identificação das variantes e realizar a vigilância genômica das VOCs. Uma vez que as VOCs apresentam importantes mutações definidoras de linhagem na porção denominada receptor binding domain (do inglês, RBD) da proteína da espícula viral de SARS-CoV-2. Uma alternativa ao NGS é o sequenciamento de Sanger, considerado padrão ouro para determinação de sequências nucleotídicas.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Realizar a validação da técnica de sequenciamento de Sanger da porção RBD do gene S (espícula viral) para a identificação de mutações presentes nas variantes de preocupação na infecção por SARS-CoV-2.

Objetivo Secundário:

Padronizar a técnica de Sequenciamento de Sanger frente a dados obtidos por Sequenciamento de Nova Geração (NGS - New Generation Sequencing) para possibilitar a investigação genômica de SARS-CoV-2. Estabelecer a sensibilidade da metodologia em diferentes Cts (cycle threshold) virais identificados por RT-qPCR.

Estabelecer um protocolo de reação para sequenciamento da porção RBD da espícula viral de SARSCoV-2 através da técnica de sequenciamento de Sanger, a um custo que possa ser disponibilizado nos sistemas públicos de saúde e vigilância.

Avaliar a presença de mutações na porção RBD do gene S (espícula viral) do SARS-CoV-2 presentes nas principais variantes de preocupação circulantes no Brasil (linhagens alfa, gama e delta), assim

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.862.713

como outras linhagens que venham a surgir durante a execução do projeto.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Risco potencial de quebra de confidencialidade.

Benefícios:

O sequenciamento de Sanger da região RBD da espícula viral pode contribuir com a compreensão do perfil epidemiológico da infecção por SARSCoV-2, sua vigilância genômica e promover uma triagem de novas variantes que possam surgir, a um custo que possa ser disponibilizado aos sistemas públicos de saúde e vigilância.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Para a identificação das VOC na infecção por SARS-CoV-2, é necessário obter-se inicialmente o RNA viral para a realização da síntese do DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa, utilizando-se primers randômicos. O cDNA sintetizado será utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR será realizada utilizando-se primers específicos previamente descritos, de forma a flanquear a região de ligação ao domínio (do inglês, RBD) localizado no gene S, responsável pela síntese da espícula viral do SARS-CoV-2, gerando um fragmento de 1006 pares de base. O produto dessa reação será verificado em gel de agarose 1,5% para confirmação da amplificação do fragmento. Após a confirmação, será realizada a purificação do produto obtido na PCR para retirada de primers e nucleotídeos não incorporados na reação. O produto purificado será encaminhado para sequenciamento das fitas forward e reverse por eletroforese capilar (sequenciamento de Sanger) na Unidade de Pesquisa Laboratorial (UPL) do HCPA e o resultado será analisado em software adequado. Para a análise das variantes de preocupação, será utilizada como sequência referência o genoma completo da primeira linhagem SARS-CoV-2, identificado em Wuhan, China. Com a amplificação da região RBD, será analisada a sequência nucleotídica do fragmento onde estão contidas as principais mutações que dão origem às VOCs. Dessa forma, será possível prever a qual linhagem pertence o vírus a partir da troca de nucleotídeos que dão origem à substituição de aminoácidos definidores de linhagem na proteína da espícula viral de SARS-CoV-2. As alterações nucleotídicas que dão origem às mutações N501Y e A570D fornecem um resultado presuntivo de VOC Alfa. Já com a identificação de mutações K417N, N501Y e E484K é possível prever a VOC Beta. As mutações K417T, E484K e N501Y fornecem um resultado presuntivo de

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.862.713

VOC gama, enquanto as mutações L452R e

T478K fornecem um resultado presuntivo de VOC delta Serão utilizadas um total de 70 amostras:20 para checar a sensibilidade do método sendo utilizadas amostras com linhagem previamente caracterizada e Ct (cycle threshold) conhecido e determinado pelo LabCovid - HCPA E 50 amostras para validação sendo amostras de linhagens previamente conhecidas pelo método de NGS.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

Propõe dispensa de TCLE uma vez que somente serão analisadas as mutações da porção RBD de amostras positivas, com o intuito de padronizar o método de Sanger para a caracterização da linhagem do SARS-CoV-2. Serão utilizados, somente, o RNA com resultado positivo previamente sequenciado pelo LABRESIS e amostras de descarte oriundas do LabCovid. Com isso, não se faz necessário a utilização dos dados do prontuário do paciente.

As amostras oriundas do LABRESIS que previamente tiveram o genoma completo sequenciado por NGS foram obtidas através de uma solicitação formal ao Biobanco do HCPA. Sendo assim, não será realizada a coleta de amostras exclusivamente para a realização do presente estudo.

**Recomendações:**

Nada a recomendar

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto não apresenta pendências e está apto para aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos que a presente aprovação (projeto versão 29/06/2021 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para revisão de registros de 70 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto está cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa (20210299) para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 4.862.713

Pós-Graduação.

c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.

d) Deverão ser adicionados relatórios semestrais e um relatório final do projeto no cadastro do mesmo, no Sistema AGHUse Pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	FR_assinada_HCPA_20210299.pdf	05/07/2021 08:24:05	Eva Mônica Dias Gonçalves	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1781501.pdf	30/06/2021 13:23:36		Aceito
Outros	Declaracao_LGPD.pdf	30/06/2021 13:23:06	Grazielle Motta Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_sequenciamento_sanger_vocs.p df	29/06/2021 17:42:31	Grazielle Motta Rodrigues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Delegacao_de_funcoes.pdf	29/06/2021 17:38:25	Grazielle Motta Rodrigues	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	29/06/2021 17:27:44	Grazielle Motta Rodrigues	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 22 de Julho de 2021

---

**Assinado por:  
Têmis Maria Félix  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

