



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ISABELLE BARROSO DE PAULA

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE CODIFICADOR DA
PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2 NO ESTADO DO ESPÍRITO
SANTO**

VITÓRIA, ES

2022

ISABELLE BARROSO DE PAULA

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE CODIFICADOR DA
PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2 NO ESTADO DO ESPÍRITO
SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Sonia Alves Gouvea

VITÓRIA, ES

2022

ISABELLE BARROSO DE PAULA

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE CODIFICADOR DA
PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2 NO ESTADO DO ESPÍRITO
SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 23 de agosto de 2022.

Prof^a. Dr^a. Sonia Alves Gouvea
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

P324i Paula, Isabelle Barroso de, 1996-
identificação de mutações no gene codificador da proteína spike
do SARS-CoV-2 no Estado do Espírito Santo / Isabelle Barroso
de Paula. - 2022.
41 f. : il.

Orientadora: Sonia Alves Gouvea.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Espírito Santo. 2. Vírus. I. Gouvea, Sonia Alves. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DO CANDIDATO
AO GRAU DE MESTRE PELO PPG BIOTECNOLOGIA.**

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada “**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2 NO ES**” elaborada por **ISABELLE BARROSO DE PAULA**, candidata ao Grau de Mestre em Biotecnologia, recomendou, após apresentação da Dissertação, realizada no dia 23 de agosto de 2022, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

Aprovada

Reprovada

Os membros da Comissão deverão indicar a natureza de sua decisão através de sua assinatura na coluna apropriada que segue:

Aprovada

Reprovada



Documento assinado digitalmente
SUWELLEN SARDINHA DIAS DE AZEVEDO
Data: 20/09/2022 14:17:24-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
SONIA ALVES GOUVEA - SIAPE 1671557
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 19/09/2022 às 16:16

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/563732?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARAES - SIAPE 2622289
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 19/09/2022 às 16:42

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/563783?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

Meu sentimento de gratidão se expande primeiramente a Deus, que mesmo em meio a todo turbilhão no mundo e em mim, me sustentou em dias que eu achei que não iria conseguir e por me lembrar que sem Ele eu nada posso fazer.

Ao meu fiel escudeiro Thiago pelo seu amor incondicional e por compreender meus momentos de renúncia a ele, para me dedicar a pesquisa e por minimizar a saudade por várias ligações e áudios no WhatsApp. Sou grata aos meus pais por sempre me incentivarem da forma que puderam e acreditarem que eu conseguiria superar os obstáculos que fui apresentada. Aos meus familiares que sempre me assistiram em todas as minhas necessidades.

À minha orientadora Sonia que aceitou me incluir no grupo de pesquisa quando estava sem esperanças e me fez perceber que a ciência pode ser pesada e cansativa, mas podemos fazê-la com leveza. Aos meus companheiros de pesquisa e laboratório Leonardo, Pablo, Tathiana, Antônio e Karine, vocês foram essenciais para o meu crescimento. Aos meus amigos e nesta representação a minha amiga Amanda que foi meu suporte nos momentos de exaustão e alegria e a maior responsável por eu embarcar nessa aventura. Às agências de apoio e financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) com bolsa de mestrado.

“Assim como tu não sabes o caminho do vento, nem como se formam os ossos no ventre da que está grávida, assim também não sabes as obras de Deus, que faz todas as coisas”.

(Eclesiastes 11:5)

RESUMO

PAULA, I. B. **Identificação de Mutações no Gene Codificador da Proteína Spike do SARS-CoV-2 no Estado do Espírito Santo**. 2022. 40f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O SARS-CoV-2 é um coronavírus que possui uma glicoproteína de superfície (S) e esta desempenha um papel essencial na ligação através da formação de trímeros com os aminoácidos da proteína S e da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) presentes na célula hospedeira. A glicoproteína S é crucial para determinar o tropismo do hospedeiro, através da ECA2, e a capacidade de transmissão, mediando a ligação ao receptor (ECA2) e a fusão da membrana celular. Certas comorbidades estão associadas a uma forte expressão do receptor ECA2 e maior liberação de pró-proteína convertase que aumenta a entrada viral nas células hospedeiras, portanto, faz-se necessário investigar as mutações e o quadro de infecção dos pacientes com COVID-19 no Estado do Espírito Santo. A análise das amostras coletadas dos pacientes, no período de junho de 2020 a maio de 2021, do Estado do Espírito Santo revelou a existência de 269 mutações na proteína Spike. As mutações com maior ocorrência foram N501Y, E484K, K417N e D427N, respectivamente em 20,44%, 34,57%, 20,07% e 1,49%. Dentre as mutações detectadas, 5 são pertencentes às variantes de preocupação Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.135) e Gama (P.1). A comparação das mutações com os dados clínico-patológicos foi realizada pelo Teste Exato de Fisher, para comparação de duas amostras independentes. Ao avaliarmos os sintomas e comorbidades não observamos significância quanto a gravidade dos sintomas e a presença de comorbidade entre os pacientes. Concluímos que o vírus possui alta capacidade mutacional e que as mutações detectadas no Espírito Santo não diferem do resto do mundo.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. Spike. ECA2. Mutações. Espírito Santo.

IDENTIFICATION OF MUTATIONS IN THE GENE ENCODING THE SPIKE PROTEIN OF SARS-COV-2

ABSTRACT

PAULA, I. B. **Identification of mutations in the gene encoding the Spike protein of SARS-COV-2 in the state of Espírito Santo.** 2022. 40f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

SARS-CoV-2 is a coronavirus that has a surface glycoprotein (S) that plays an essential role in binding through the formation of trimers with the S protein and Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) amino acids present in the cell. host. S-glycoprotein is crucial for determining host tropism, through ACE2, and transmission capacity, mediating receptor binding (ACE2) and cell membrane fusion. Certain comorbidities are associated with a strong expression of the ACE2 receptor and greater release of proprotein convertase that increases viral entry into host cells, therefore, it is necessary to investigate the mutations and the infection status of patients with COVID-19 in the state. of the Holy Spirit. The analysis of samples collected from patients, from June 2020 to May 2021, in the State of Espírito Santo revealed the existence of 269 mutations in the Spike protein. The most frequent mutations were N501Y, E484K, K417N and D427N, respectively in 20.44%, 34.57%, 20.07% and 1.49%. Among the mutations detected, 5 belong to the variants of concern Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.135) and Gamma (P.1). Comparison of mutations with clinical pathological data was performed by Fisher's Exact Test, for comparison of two independent samples. When evaluating the symptoms and comorbidities, we did not observe any significance regarding the severity of the symptoms and the presence of comorbidity among the patients. We conclude that the virus has a high mutational capacity and that the mutations detected in Espírito Santo do not differ from the rest of the world.

Key words: SARS-CoV-2. Spike. ECA2. Mutations. Espírito Santo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte transversal do vírus SARS-Cov-2 representando suas estruturas..	10
Figura 2: Principais mutações da variante Alfa - B.1.1.7.....	15
Figura 3: Principais mutações da variante Beta - B.1.351.....	16
Figura 4: Principais mutações da variante Gama - P.1.....	16
Figura 5: Principais mutações da variante Delta - B.1.617.....	17
Figura 6: Principais mutações da variante Ômicron - B.1.1.529.....	18
Figura 7: Exemplo de arquivo FASTA contendo as sequências de nucleotídeos em formato de texto. O arquivo FASTA é composto por um cabeçalho e as sequências, iniciando sempre com um sinal de maior (>)	17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 ESTRUTURA VIRAL E MECANISMO DE INFECÇÃO.....	9
1.2 TRATAMENTO E IMUNIZAÇÃO.....	12
1.3 VARIANTES CIRCULANTES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO.....	13
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 METODOLOGIA.....	20
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	20
3.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA S E SEQUENCIAMENTO...21	21
3.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE ALINHAMENTO.....	21
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
5 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRUTURA VIRAL E MECANISMO DE INFECÇÃO

No ano de 2019 em Wuhan - China foi relatado o primeiro caso de SARS-CoV-2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2*), em humanos. Conhecido como novo coronavírus e causador da doença COVID-19 (do inglês *CoronaVirus Disease 2019*), a disseminação da doença foi rápida e gerou uma pandemia que levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar estado de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) (BRASIL, 2020). São conhecidas por causar infecções em humanos sete espécies de coronavírus, 4 dessas (HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV HKU1 e HCoV OC43) normalmente causam sintomas de resfriado em indivíduos imunossuprimidos. Os outros, SARS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave) e MERS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio) são de origem zoonótica e causam doenças respiratórias graves e mortes (HASÖKSÜZ, 2020).

Em vista das semelhanças do novo vírus e do SARS-CoV-1, um estudo demonstrou no primeiro paciente positivado para COVID-19 uma suspeita do surto ter tido uma origem zoonótica ligada a um mercado de produtos frescos de Wuhan, onde vários animais, incluindo peixes, mariscos, aves selvagens e animais exóticos, foram vendidos. No entanto, outros casos com início bem antes do período correlacionado com o cluster associado ao mercado de Wuhan foram observados, sugerindo a possibilidade de outras fontes (WU, 2020). No ano de 2018 já haviam estudos que corroboram que os coronavírus 1 e 2 estão intimamente relacionados e foram encontrados em pangolins e em morcegos, particularmente aqueles que residem na China, Europa e África (HU, 2018; SHI, 2018). A cocirculação de diferentes clados genéticos foi observada em vários países, bem como a migração de linhagens genéticas da Europa para a América do Sul (MICHELON, 2021).

O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, pertence à subfamília *Coronavirinae* da família *Coronaviridae* da ordem *Nidovirales*, de fita simples não segmentados que variam de 26 a 32 quilobases de comprimento e inclui um número variável de quadros de leitura aberta (ORFs) (WEISS, 2011; SONG, 2019). O arranjo de genes no genoma do SARS-CoV-2 é: 5'UTRreplicase (orf1ab)- Spike (S)- orf3a- Envelope (E)- Membrane (M)- orf6- orf7a- orf8-Nucleocapsid (N)- orf10- 3'UTR (SONG, 2019).

O SARS-CoV-2 apresenta quatro proteínas estruturais principais: a glicoproteína de superfície (do inglês *spike*) (S), a proteína do envelope (E), a proteína da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (LIMA, 2020) (Figura 1).

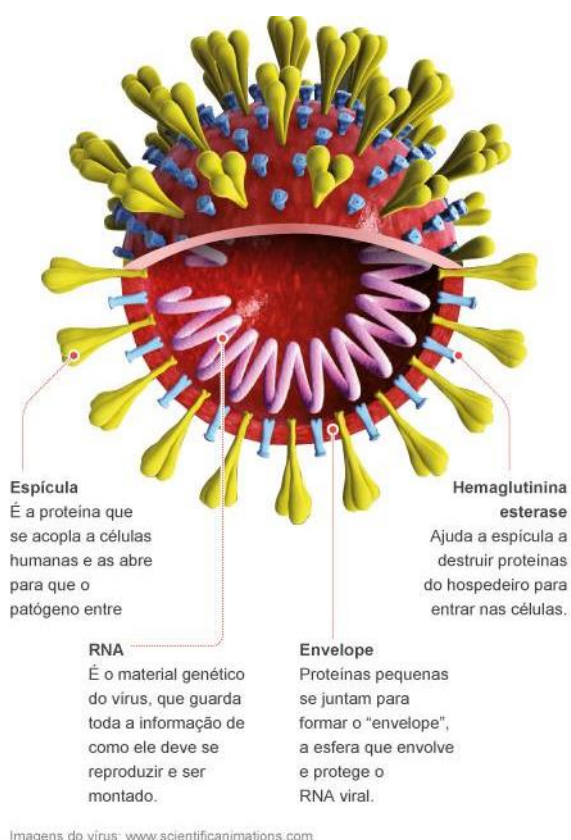


Figura 1. Corte transversal do vírus SARS-Cov-2 representando suas estruturas. Fonte: Jornal O Globo (saúde), Rafael Garcia. Ciência analisa estrutura do coronavírus e busca drogas para 'neutralizar' sua ação, (2020).

A glicoproteína de superfície desempenha um papel essencial na ligação a receptores na célula hospedeira. Sendo crucial para determinar o tropismo do hospedeiro e a capacidade de transmissão, mediando a ligação ao receptor e a fusão da membrana (ZHU, 2018). O receptor de ligação da glicoproteína S é a Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA2), estando em maior proporção nos pulmões, vinculando-se aos sintomas respiratórios dos acometidos.

O mecanismo de infecção pelos coronavírus na célula é dependente das proteases presentes em sua estrutura, podendo ser tomada como exemplo: a tripsina, presente nas vias respiratórias (HAT), a transmembranar serina 2 (TMPRSS2) e a catepsina L, estas com atuação direta na proteína S, que para se ligar ao coronavírus requer a compatibilidade específica com o receptor ECA2 (Enzima Conversora de Angiotensina 2) (LI, 2020; SHEREEN, 2020).

O papel fisiológico primário da ECA2 é facilitar a maturação de angiotensina II, um hormônio peptídico que controla a vasoconstrição e a pressão sanguínea. A ECA2 é uma proteína de membrana tipo I expressa no pulmão, coração, rim e intestino (ZISMAN, 2003).

O SARS-CoV-2 possui duas formas de invasão da célula hospedeira por endossomos ou por fusão da membrana plasmática, utilizando a proteína S, através da ECA2. No primeiro caso, quando os vírus são absorvidos pelos endossomos, a catepsina L ativa a proteína S no endossomo; enquanto, na fusão com a membrana, a proteína S é ativada por proteases celulares na proximidade do receptor ECA2. A entrada por fusão com a membrana plasmática tem menor probabilidade de desencadear imunidade antiviral das células hospedeiras, portanto, é mais eficiente para a replicação viral (WANG, 2020; WALLS, 2020).

A replicação viral ocorre inteiramente no citoplasma e a síntese de um grupo de RNAs subgenômicos durante a replicação viral na célula infectada é um aspecto comum aos vírus da ordem Nidovirales. Ela pode gerar mutações naturais, sendo mais frequentes

nos vírus RNA do que no vírus do DNA. Os mutantes gerados durante a replicação, quando apresentam uma vantagem seletiva são amplificados com maior eficiência e rapidamente tornam-se predominante na população viral (FLORES & KREUTZ, 2007). Dessa forma, as linhagens de variantes de SARS-CoV-2 são geradas.

Certas comorbidades estão associadas a uma forte expressão do receptor ECA2 e maior liberação de pro-proteína convertase que aumenta a entrada viral nas células hospedeiras. As comorbidades levam o paciente com COVID-19 a um círculo vicioso infeccioso de vida e estão substancialmente associadas a morbidade e mortalidade (WILLIAMS, 2021).

Os indivíduos com comorbidades devem adotar a medida preventiva vigilante e exigir uma gestão eficiente (EJAZ, 2020). Desde o início da pandemia no Brasil, março de 2020, até agosto de 2022, foram 34.223.207 casos confirmados, 33.128.198 casos recuperados e 682.010 óbitos (BRASIL, 2022).

Sabendo disso, a necessidade de um diagnóstico rápido da doença foi de extrema importância. Uma das formas mais eficientes na detecção do vírus no organismo humano é através do teste de Reação em Cadeia da Polimerase transcriptase reversa (qRT-PCR).

Este é feito por meio da coleta de materiais das vias respiratórias e para se obter um resultado fidedigno, espera-se que o indivíduo o faça pelo menos 8 dias após o início dos seus sintomas, pois o nível do RNA viral do SARS-CoV-2 estará atingindo o seu pico, contribuindo para um resultado de confiabilidade (LIMA, 2020).

1.2 TRATAMENTO E IMUNIZAÇÃO

O estudo realizado por WEN, 2021 mostrou que três novos medicamentos antivirais orais (molnupiravir, fluvoxamina e Paxlovid) são eficazes na redução das taxas de mortalidade e hospitalização em pacientes com COVID-19, além de não aumentarem

a ocorrência de eventos adversos. Além da medicação, estudos apontam a necessidade de vacinação em massa da população para a criação de resposta imunológica no corpo e intensificação do combate ao vírus (SARINHO, 2020; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020).

A maioria das vacinas estudadas para COVID-19 tem como objetivo induzir anticorpos neutralizantes contra as subunidades virais, a maioria delas direcionadas para a região RBD da proteína Spike (S), evitando assim a captura do vírus por o receptor ACE2 humano (CADDY, 2020). No Brasil quatro vacinas estão em circulação como imunizantes, são elas: Comirnaty (Pfizer/Wyeth), Coronavac (Butantan), Janssen Vaccine (Janssen-Cilag), Oxford/Covishield (Fiocruz e Astrazeneca) e Chadox 1 NCOV 19 (Astrazeneca) (GOVERNO DO BRASIL, 2022).

Os coronavírus são sensíveis à exposição ao calor (56 °C por 30 min), bem como a solventes, incluindo éter, etanol a 75%, desinfetante contendo cloro, ácido peroxiacético e clorofórmio. Outros solventes lipídicos também podem efetivamente inativar o vírus, exceto a clorexidina (SONG, 2019). A contaminação do fômites é provável de ser causada pelas vias aéreas/mãos. Atualmente, a transmissão respiratória e a transmissão por contato direto são as principais vias para o SARS-CoV-2.

Por isso, a estratégia sanitária da OMS para evitar a transmissão do vírus é o uso de equipamento de proteção individual como máscaras, que dificultam as gotículas de saliva de se espalharem no ar, o distanciamento social e a higienização das mãos com água e sabão e com o uso de álcool em gel.

1.3 VARIANTES CIRCULANTES NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Depois que surgiu o primeiro caso de COVID-19 em Wuhan no ano de 2019 até outubro de 2021 foram identificadas mais de 1.536 variantes circulantes no mundo por meio do sequenciamento do genoma viral (O'TOOLE et al., 2021). Foram identificadas

diferentes linhagens do SARS-CoV-2 circulando no Brasil, mais de 30 foram identificadas em São Paulo.

Segundo a Fiocruz, em 2021, a linhagem de predominância no país era a B.1.617.2 (Delta) com 63,5% dos genomas sequenciados, seguida pela AY.4 (Delta) com 9% dos genomas sequenciados, linhagem AY.39 (Delta) com 6,9% dos genomas sequenciados e tendo as outras linhagens 20,6% dos genomas sequenciados (REDE GENÔMICA, 2021). Vale ressaltar que a nova variante Ômicron cresceu e passou a atingir um número elevado a partir de novembro de 2021.

A evolução e surgimento de múltiplas variantes do SARS-CoV-2 tornou-se uma preocupação mundial. Essas variantes foram classificadas como variantes de preocupação (VOCs) ou variantes de interesse (VOIs) pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention - EUA) e pela OMS. As VOCs incluem linhagens como B.1.1.7 (variante 20I/501Y.V1), P.1 (variante 20J/501Y.V3), B.1.351 (variante 20H/501Y.V2) e B.1.617.2 (CHAKRABORTY et al, 2021) (tabela 1). Em contraste, a categoria VOI inclui B.1.525, B.1.526, P.2 e B.1.427/B.1.429 (tabela 2).

Tabela 1: Variantes de preocupação (VOC) registradas no mundo pela OMS. Fonte: GISAID, junho de 2022

OMS	NEXTRAIN CLADO	PANGO LINHAGEM	GISAID CLADO	PRIMEIRA DETECÇÃO	PRIMEIRAS AMOSTRAS	MUTAÇÕES CARACTERÍSTICAS
Alfa	20J/501Y.V1	B.1.1.7	GRY GR/501Y.V1	Reino Unido	set. 2020	H69/V70del, Y144del, N501Y, A570D, P681H, S106/G107/F108del
Beta	20H/501Y.V2	B.1.351	GH/501Y.V2	África do Sul	ago. 2020	L242/A243/L244del, K417N, E484K, N501Y, S106/G107/F108del
Gama	20J/501Y.V3	B.1.1.28.1 conhecida como P.1	GR/501Y.V3	Brasil e Japão	dez. 2020	K417T, E484K, N501Y, S106/G107/F108del

OMS	NEXTRAIN CLADO	PANGO LINHAGEM	GISAID CLADO	PRIMEIRA DETECÇÃO	PRIMEIRAS AMOSTRAS	MUTAÇÕES CARACTERÍSTICAS
Delta	21A; 21J /S:478K	B.1.617.2	G/452R.V3	Índia	out. 2020	T19R, (G142D), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N
Omicron	21K, 21L, 21M, 22A, 22B, 22C, 22D	B.1.1.529	GR/484A	Vários países	nov. 2021	A67V, H69del, V70del, T95I, G142D, V143del, Y144del, Y145del, N211del, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F

Tabela 2: Variantes de interesse (VOI) registradas no mundo pela OMS. Fonte: Adaptado de *Main SARS-CoV-2 variants notified in Brazil*, maio 2022

OMS	NEXTRAIN CLADO	PANGO LINHAGEM	GISAID CLADO	PRIMEIRA DETECÇÃO	PRIMEIRAS AMOSTRAS	MUTAÇÕES CARACTERÍSTICAS
Epsilon	20C/S.452R	B.1.427/ B.1.429	GH/452R.V1	Estados Unidos	jun. 2020	L452R, W152C, S13I, D614G
Zeta	20B/S.484K	B.1.1.28.2 conhecida como P.2	GR	Brasil	abril 2020	L18F, T20N, P.26S, F157L, E484K, D614G, S929I, V1176F
Eta	20A/S484K	B.1.525	G/484K.V3	Múltiplos países	dez. 2020	H69-V70del, Y144del, Q52R, E484K, Q677H, D616G, S929I, V1176F

OMS	NEXTRAIN CLADO	PANGO LINHAGEM	GISAID CLADO	PRIMEIRA DETECÇÃO	PRIMEIRAS AMOSTRAS	MUTAÇÕES CARACTERÍSTICAS
Teta	20B/S:265C	B.1.1.28.3 conhecida como P.3	GR	Filipinas e Japão	fev. 2021	141-143del, E484K, N501Y, P681H
Lota	20C/S:484K	B.1.526	GH	Estados Unidos	nov. 2020	LSF, T95I, D253G, D614G, V483A, H655Y, G669S, Q949R, N1187D
Kapa	21A/S:154K	B.1.617.1	G/452R.V3	Índia	out. 2020	(T95I), G142D, E154K, L452R, E484Q, D614G, P681R, Q1071H
Lambda	21G	C.37	GR/452Q.V1	Peru	dez. 2020	246-252del, G75V, T76I, L452Q, F490S, D614G e T859N

Dentre as principais variantes está a variante Alfa (B.1.1.7) que possui uma mutação de interesse N501Y no sítio de ligação RBD (figura 2). Essa mutação aumentou em sete vezes a afinidade do vírus pelo receptor ECA-2 (MICHELON, 2021)

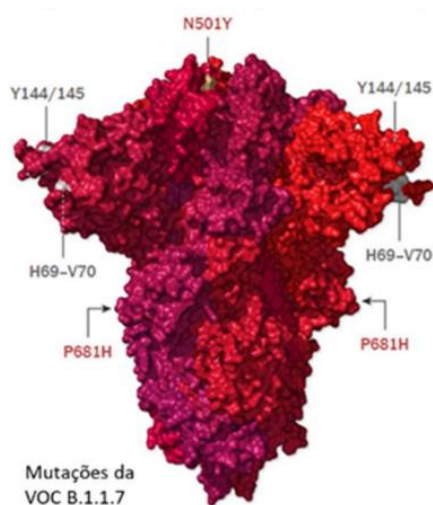


Figura 2: Principais mutações da variante Alfa - B.1.1.7. Fonte: Adaptado de *Variantes do SARS-CoV-2: o que significam e qual o seu impacto na pandemia, dez 2021*

A variante Beta (B.1.351) agrupa três mutações de interesse, N501Y, E484K e K417N (figura 3). Elas aumentam a capacidade de propagação do SARS-CoV-2 por meio de estratégias de ligação efetiva à ECA2 (SPINELLO, 2021).

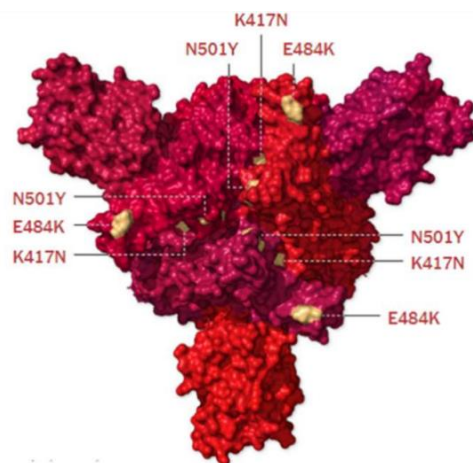


Figura 3: Principais mutações da variante Beta - B.1.351. Fonte: Adaptado de *Variantes do SARS-CoV-2: o que significam e qual o seu impacto na pandemia, dez 2021*

A variante Gama, também conhecida como 20J/501Y.V3, da linhagem P.1 apresenta como principais mutações de interesse no sítio de ligação do receptor RBD a K417T, a E484K e a N501Y (figura 4), também presentes na variante B.1.351, identificada na África do Sul. Esta variante não tem relação genética com as variantes B.1.1.7 e B.1.351. Esse fator se dá a convergência evolutiva, processo que confere a seleção de características semelhantes em diferentes locais por apresentarem vantagens claras como maior transmissibilidade, sucesso na replicação ou no escape imunológico.

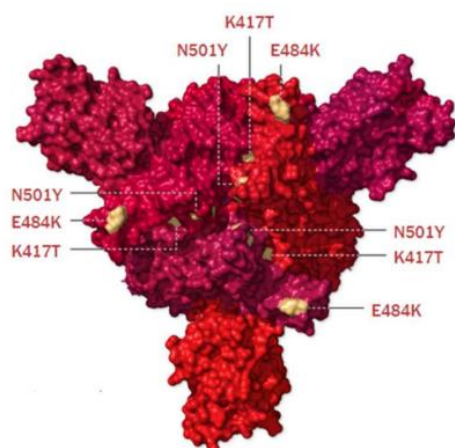


Figura 4: Principais mutações da variante Gama - P.1. Fonte: Adaptado de *Variantes do SARS-CoV-2: o que significam e qual o seu impacto na pandemia, dez 2021*

A variante Delta (B.1.617), teve sua primeira identificação na Índia no final de 2020, essa é a quarta a ser designada pela OMS como sendo de preocupação global e já foi detectada em diversos países.

Apesar de apresentar 13 mutações, pode ter a combinação única de mutações L452R, E484Q e P681R indicando uma evolução convergente (PATIL, 2021) (figura 5). As mutações que mais preocupam são as encontradas na proteína S, incluindo duas mutações na região NTD (G142D e E154K), duas na região RBD (L452R e E484Q) e uma, no local de clivagem da furina polibásica no limite S1/S2 (P681R) (EDARA, 2021).

O aparecimento repentino da variante Ômicron é de interesse extremo para a ciência, já que a hipótese principal do seu surgimento é que ela não se desenvolveu de variantes que já existiam, mas aparentemente surgiu antes ou em concomitância com as variantes Alfa, Beta, Gama e Delta (KUPFERSCHMIDT, 2021). Os cientistas veem essencialmente três explicações possíveis: O vírus pode ter circulado e evoluído em uma população com pouca vigilância e sequenciamento. Poderia ter gestado de forma crônica um paciente infectado com COVID-19, provavelmente alguém cuja resposta imunológica estava comprometida por outra doença ou medicamento, podendo ser pacientes com câncer ou pacientes com HIV, por exemplo, porque em pessoas imunodeprimidas, o corpo luta mais contra o vírus e este no que lhe concerne, tem mais tempo para desenvolver mutações a fim de escapar da resposta imune. Ou pode ter evoluído em uma espécie não humana, que se espalhou de volta para os humanos recentemente (GAO, 2022; RITCHIE, 2021; CELE, 2021).

Segundo o boletim epidemiológico do Estado do Espírito Santo, até o mês de setembro de 2022 o Estado apresentou 1.215.184 casos confirmados, 1.179.649 casos curados e 14.815 óbitos. Além disso, o Estado apresenta que os municípios que apresentaram o maior número de casos confirmados de trabalhadores são: Vila Velha (12,4%), Serra (11,5%), Vitória (10,1%), Cariacica (7,1%), Colatina (5,1%) e Linhares (4,5%). Podemos observar que a região metropolitana concentra aproximadamente 41,1% dos casos de trabalhadores infectados. As faixas etárias mais acometidas são: 30 a 39 anos (29,5%), seguido de 40 a 49 anos (24,7%) e 20 a 29 anos (20,6%), representando a parcela economicamente ativa dos trabalhadores.

Mediante o cenário apresentado observou-se a necessidade de se estudar as mutações presentes nas cepas de SARS-Cov-2 no Estado do Espírito Santo, através do mapeamento genético de amostras das vias respiratórias por teste (qRT-PCR) para conhecimento e para associação da mutação com o prognóstico do paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar e mapear as mutações presentes nas cepas infectantes no Espírito Santo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as mutações encontradas nas cepas presentes no Espírito Santo;
- Correlacionar o estado clínico do paciente com as mutações encontradas;
- Descrever o prognóstico da COVID-19 em relação ao desfecho de recuperação e mortalidade, comorbidade, tipo de variante e mutação do vírus de cada paciente;
- Avaliar a relação entre sintomatologia e prognóstico final e quantidade e tipo de mutação.

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Este trabalho trata-se de um estudo prospectivo transversal, descritivo. No estudo foram utilizadas amostras enviadas ao LACEN (Laboratório Central) providas de hospitais referência do estado do Espírito Santo (Hospital Dório Silva, Hospital Roberto Arnizaut Silvaes, Hospital Doutor Jayme Santos Neves e Hospital Maternidade Silvio Ávidos) considerando todos os resultados positivos para COVID-19 no período de julho de 2020 a maio de 2021, a fim de verificar as cepas circulantes. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob n.º 4.270.971/2020 e autorizado pela Secretaria de Estado de Saúde do ES, por meio do Instituto Capixaba de Ensino Pesquisa e Inovação em Saúde-ICEPi.

Foram coletadas 179 amostras de secreção nasal e analisadas pelo PCR. Das amostras que amplificaram (total 165) foi feito o sequenciamento e ao final analisamos 101 que apresentaram mutações na proteína Spike. As amostras cedidas de RNA isolado foram identificadas com o pseudônimo do paciente (ex: AP 1) e a data da coleta. O transporte das amostras seguiu os regulamentos de remessa para Substância Biológica UN 3373, categoria B e todas as amostras foram armazenadas em freezer -80.

O resultado positivo se deu por meio do fornecimento da planilha CSV (e-SUSve) que já está alimentada pelo sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) vinculado ao LACEN. Foram excluídas as amostras que após a avaliação por PCR deram negativas para o vírus SARS-Cov-2 e que não apresentaram mutações.

Os resultados obtidos da mutação genética foram correlacionados com o perfil do paciente presente na planilha (idade, sexo, raça), sintomas, comorbidades e fatores de risco.

3.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA S E SEQUENCIAMENTO

O RNA extraído no LACEN foi tratado com DNase I (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante utilizado na síntese da fita de DNA complementar (cDNA). 1µL de oligonucleotídeos randômicos (250 µM) (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 1 µl de dNTPmix 10mM. A desnaturação do ssRNA do SARS-CoV-2 foi realizada e em seguida foi adicionado 4 µL do tampão de enzima 2X First-Strand Buffer, 1 µL de DTT 0,1 M e 1 µL da enzima Super Script III RT (200 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, USA) em um volume final de 20 µL. Já a reação de transcrição reversa foi realizada seguindo as instruções do fabricante.

Para as reações de PCR foi utilizada a enzima SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante em um termociclador Mastercycler (Eppendorf) com a temperatura de anelamento configurada em 58 °C. Nos microtubos para a reação de PCR foi utilizado 1µL de cada par de oligonucleotídeo (10 µM), 12,5 µL de 2X Reaction Mix (um buffer contendo 0,4 mM para cada 1 µL de dNTP, 3,2 mM de MgSO₄), 1 µL de Taq DNA Polymerase Platinum, 1 µL do cDNA em um volume final de 50 µL.

Os produtos da amplificação foram visualizados em géis de agarose a 0,8%. O tampão TAE (Tris, Ácido Cético, EDTA 0,5M e H₂O) para a corrida do gel foi preparado contendo um estoque de 200 mL. Após as reações de PCR as amostras foram enviadas para a ACTGENE - Análises Moleculares LTDA-ME (RS) para o sequenciamento, que utilizou o método de Sequenciamento Sanger.

3.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE ALINHAMENTO

A etapa de alinhamento de sequências visou calcular a porcentagem de conservação de sentenças proteicas e através desses resultados analisar mutações, proteínas homólogas e funções genômicas e proteicas. Os procedimentos de leitura foram executados usando o software CodonCode Aligner para alinhar as sequências,

gerando um arquivo de entrada FASTA contendo uma sequência de nucleotídeos em formato de texto - ATGC (Figura 7).

Paste your protein or nucleotide FASTA sequence(s) into the text area below.
([Sample FASTA sequence: Example hCoV-19 genome](#))

```
>Montagem 55FR
ACTTCTAACTTTAGAGTCCAACCAACAGAATCTATTGTTAGATTTCTAATATTACAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAA
CGCCACCAGATTTGCATCTGTTTATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGCCTATATAATTCC
GCATCATTTCCTACTTTAAGTGTATGGAGTGTCTCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCAGATTCATT
GTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGAT
TTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGAATTCTAACAATCTTGATTCTAAGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTGA
GAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAAATGGTGGTGAAGG
TTTTAATTGTTACTTTCTTTACAATCATATGGTTTCAACCCACTAATGGTGGTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTT
```

Figura 7: Exemplo de arquivo FASTA contendo as sequências de nucleotídeos em formato de texto. O arquivo FASTA é composto por um cabeçalho e as sequências, iniciando sempre com um sinal de maior (>).

Usando o banco de dados de sequências genômicas National Center for Biotechnology Information - NCBI, a ferramenta básica de pesquisa e alinhamento Protein BLAST - BLASTP e GenBank que armazena informações nucleotídicas, as sequências obtidas para ORF codificando a proteína S foram comparadas com as sequências de proteínas depositadas. Para essa comparação priorizamos o uso do GISAID. A estimativa da taxa de mutações sinônimas (dS) em relação às mutações não sinônimas (dN) foi calculada e identificaram-se as mutações na sequência codificadora da proteína S dos isolados virais.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados e analisados utilizando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, EUA) versão 20.0. As análises descritivas foram apresentadas como frequência. A comparação das mutações com os dados clínico-patológicos foi realizada pelo Teste Exato de Fisher, para comparação de duas amostras independentes. Os resultados foram representados em percentual de ocorrência. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta pesquisa, foram analisadas 165 amostras por sequenciamento e consideradas para análises 101 que apresentaram mutações na proteína Spike. Nas amostras obtivemos 269 mutações nos resíduos de interface de ligação do SARS-Cov-2. De todas as amostras analisadas 1 amostra apresentou 245 mutações, gerando uma diluição no número de variantes detectadas no geral. Dentre as 269 mutações encontradas, 5 mutações se caracterizam representantes das variantes de interesses denominadas como Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron. Foram avaliadas em 34 amostras a relação com sintomas e comorbidades apresentadas pelos pacientes com COVID.

Devido à relação com os aumentos de novos casos e a severidade da doença, algumas destas estão sob a vigilância em inúmeros países. Atualmente, quatro variantes foram definidas como variantes de preocupação (VOCs), já que as mutações presentes nestas demonstraram estar associadas a uma ou mais alterações significativas para a saúde pública e conferem vantagens seletivas ao SARS-CoV-2 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2021).

No Brasil, 30 diferentes linhagens do SARS-CoV-2 foram identificadas circulando no Estado de São Paulo (REDE GENÔMICA FIOCRUZ, 2021). Segundo o que apresenta a Fiocruz, em seu último censo no ano de 2021, a linhagem de predominância no país é a B.1.617.2 (Delta) com 63,5% dos genomas sequenciados, seguida pela AY.4 (Delta) com 9% dos genomas sequenciados, linhagem AY.39 (Delta) com 6,9% dos genomas sequenciados e tendo as outras linhagens 20,6% dos genomas sequenciados. Vale ressaltar que a variante Ômicron cresce em predominância no país sendo encontrada em 99,3% das amostras sequenciadas no estado de São Paulo (INSTITUTO BUTANTAN, 2022).

A evolução genética do SARS-CoV-2 foi baixa durante a fase inicial da pandemia, com o surgimento de uma variante globalmente dominante chamada D614G, associada à

maior transmissibilidade, mas sem aumento da gravidade da doença de sua cepa ancestral (ALEEM, 2022). Essa mutação não foi identificada na nossa pesquisa. Outras variantes foram identificadas em humanos, atribuída à transmissão por animais do gênero *Martes* para criação domiciliar infectadas na Dinamarca, que não foi associada ao aumento da transmissibilidade, desde então, várias variantes do SARS-CoV-2 foram descritas (WORLD, 2021).

A mutação N501Y foi identificada 55 vezes (20,44%), apresentando-se apenas em concomitância com outras mutações. Essa mutação é representante da variante Alfa (B.1.1.7). Pesquisadores demonstraram que a B.1.1.7 apresenta vantagem replicativa duplicada em relação à variante 20A.EU1 predominante no Reino Unido em 2020 (GRABOWSKI, 2021). Em contrapartida, outros estudos indicam não haver aumento na taxa de replicação da linhagem B.1.1.7 nas células epiteliais das vias aéreas humanas (BROWN, 2021).

O domínio do receptor de ligação (RBD) da proteína spike da B.1.1.7 apresenta a mutação N501Y, que confere maior afinidade ao receptor ECA2 (RAMANATHAN, 2021), indicando que esta é uma mutação crítica e que, possivelmente, promove o aumento da transmissibilidade do SARS-CoV-2 devido sua maior afinidade de ligação a ECA2, além de uma taxa de associação mais rápida e uma taxa de dissociação mais lenta (TIAN, 2021; KUMAR, 2021). Duas mutações presentes na B.1.1.7 foram encontradas em nossa pesquisa, são elas N501Y, em maior abundância, e A570D, aparecendo duas vezes.

Nas análises realizadas obtivemos uma dominância de 34,57% da mutação E484K, aparecendo em 93 amostras, apresentando-se sozinha ou em concomitância com outras mutações. Essa mutação foi identificada pela primeira vez na África do Sul e pelo menos três linhagens principais como a B.1.351 (sul-africana), a P.1 (brasileira) e a B.1.1.7 (britânica) apresentam essa mutação (NONAKA, 2021). Ela está localizada na proteína spike e tem impacto na resposta imune do corpo por anticorpos monoclonais ou soros convalescentes, aumentando levemente a ligação a ECA2

(COLLIER, 2021; STARR, 2020) e, possivelmente, na eficácia da vacina (WISE, 2021).

A variante Beta (B.1.351) agrupa três mutações de interesse, N501Y, E484K e K417N. Elas aumentam a capacidade de propagação do SARS-CoV-2 por meio de estratégias de ligação efetiva à ECA2. Essa estratégia se dá por meio de uma sinalização alostérica entre os elementos estruturais do RBD e pela redução da ligação de anticorpos produzidos por pacientes infectados/vacinados (SPINELLO, 2021).

A afinidade do RBD da B.1.351 à ECA2 é 4,62 vezes maior do que a estimada para o RBD de SARS-CoV-2 originário de Wuhan, sugerindo a maior transmissibilidade dessa variante e que a relação das mutações sejam uma característica evolutiva convergente das variantes mais transmissíveis, visto que algumas também foram observadas na linhagem B.1.1.7 (RAMANATHAN, 2021).

A mutação K417T foi identificada 54 vezes (20,07%) e apresenta-se apenas em concomitância com outras mutações. Essa mutação possui o potencial de modulação da afinidade ACE2/RBD, levando potencialmente ao aumento da transmissibilidade. Além disso, possui também o potencial de modular a neutralização do SARS-CoV-2 por respostas de anticorpos naturais ou induzidas por vacinas (DEJNIRATTISAI, 2021). Essa mutação não possui caráter independente, ou seja, quando presente, está sempre em conjunto com outras mutações, geralmente com E484K e N501Y. Um estudo demonstra que as mutações E484K e K417T se compensam como afinidade de ligação (RIOFRÍO et al., 2022).

Outra variante que apresenta como principais mutações de interesse a K417T, a E484K e a N501Y é a variante Gama, também conhecida como 20J/501Y.V3, da linhagem P.1, identificada na África do Sul. Esta variante não tem relação genética com as variantes B.1.1.7 e B.1.351. Esse fator se dá a convergência evolutiva, processo que confere a seleção de características semelhantes em diferentes locais por apresentarem vantagens claras como maior transmissibilidade, sucesso na

replicação ou no escape imunológico (WILLIAMS, 2021). Essa variante possui 12 mutações na proteína S, incluindo três mutações de interesse em comum com B.1.351, ou seja, K417N/T, E484K e N501Y, que podem afetar a transmissibilidade e a resposta imune do hospedeiro (FREITAS, 2021). Um estudo demonstrou que a P.1 é significativamente menos resistente a respostas de anticorpos naturalmente adquiridas ou induzidas por vacina do que a B.1.351, sugerindo que alterações fora do domínio de ligação ao receptor (RBD) impactam na neutralização (DEJNIRATTISAI).

Nesse estudo não observamos a presença de nenhuma mutação da variante Delta (B.1.617). Essa variante foi identificada primeiramente em 2020 na Índia, mas já foi detectada em diversos países. Segundo a OMS, a variante foi classificada em três linhagens, denominadas B.1.617.1, B.1.617.2 e B.1.617.3, com pequenas diferenças por mutações potencialmente relevantes e distinta distribuição geográfica (Comitê Extraordinário de Monitoramento, 2021).

A variante Ômicron (B.1.1.529) não foi analisada neste estudo, pois a sua detecção foi feita após a coleta das nossas amostras. Essa variante foi detectada pela primeira vez em novembro de 2020, na África do Sul.

Mutações virais naturais que circundam pontos de acesso de ligação do vírus promovem impactos significativos na afinidade de ligação, estrutura e resposta imune do hospedeiro (CARVALHO, 2021). Algumas dessas mutações têm se mostrado associadas com a atenuação da atividade neutralizante de anticorpos (WANG, 2021).

Apesar das VOCs estarem presentes em todos os estados brasileiros — variante Alfa 14 estados, variante Beta 2 estados, variante Gama 27 estados e variante Delta 23 estados — e sua alta taxa de transmissibilidade, o Brasil realizou o sequenciamento de uma quantidade reduzida de genomas completos de SARS-CoV-2 (Brasil, 2021), causando um impacto prejudicial ao compararmos mutações encontradas no estudo com mutações já descritas.

O primeiro registro dessa mutação ocorreu no Reino Unido e também está presente nas linhagens principais B.1.351, P.1 e a B.1.1.7. Ela se caracteriza pela substituição do aminoácido asparagina pela tirosina na posição 501, no domínio de ligação ao receptor (RDB) da proteína S (LEUNG, 2021). Essa mutação aumentou em sete vezes a afinidade do vírus pelo receptor ECA-2 e a maior resistência à neutralização por anticorpos (DEJNIRATTISAI, 2021; SUPASA, 2021).

A quarta mutação em maior abundância foi a D427N, representando 1,49% de ocorrência entre as amostras, aparecendo em 4 amostras. As outras amostras se apresentaram em predominância de 0,74% aparecendo 2 vezes, são elas N331X, F592X, A520S, P337L, A570D e V367F. Sendo a mutação A570D característica da variante Alfa (B.1.1.7), um estudo sugeriu que essa mutação combinada a outras presentes nessa variante permitem uma ligação de alta afinidade ao ACE2 e propriedades de replicação aprimoradas (OSTROV, 2021). Assim também a mutação V367F possui uma maior afinidade de ligação ao ACE2 humano (OU, 2021).

As outras mutações seguintes apareceram apenas 1 vez nas amostras, representando 0,37%, cada uma e juntas somam um total de 260 mutações e representam 96,65% de ocorrência entre as amostras.

Abaixo estão descritas as mutações que ocorreram uma vez e estão divididas entre mutações com poucas informações (apenas local onde foi encontrado) e mutações sem descrição na literatura.

Quadro 1. Mutações encontradas na população testada no Espírito Santo.

Mutações encontradas na glicoproteína Spike
Mutações com descrição na literatura: Q321V, P322S, N331I, I332Y, T333S, N334L, L335I, C336I, F338L, G339V, E340T, V341S, N343R, T345R, R346N, F347W, N354R, K356A, R357N, I358F, S359V, ins360GFP, V362L, A363N, Y365I, S366N, V367P, Y369R, N370V, S371I, A372S, S373E, F374T, S375P, K378R, S383L, P384I, T385E, K386L, L387T, N388Q, D389P, L390D,

C391R, F392V, T393A, N394D, V395T, I402G, R403F, D405Q, E406F, A411K, Q414E, K417V, N422L, D427F, D428N, T430C, I434V, A435L, W436N, N437T, N439K, N440K, L441P, D442G, S443C, K444V, V445T, G446A, G447P, Y449H, N450L, L452E, Y453F, R454S, F456V, K458V, S459R, N460Y, E465V, D467N, I468T, S469P, T470Q, E471F, I472G, A475Q, G476L, S477P, T478F, P479Y, G482F, V483G, G485V(486), F486G, Y489P, F490T, P491S, L492G, Q493A, S494Q, G496I, F497E, Q498T, P499S, T500I, N501D, G502R, V503E, G504F, Y505P, Q506K, Y508N, R509S, S514R, L517Y, L518N, H519Y, A520N, P521G, A522G, T523V, G526D, P527L, K528N, K529N, T531N, V534I, N540D, T549A, E554Q, D574N, R577C, P463S, V327I, E324D, S591T, V367L, V367F.

Mutações sem descrição na literatura: F318C, R319E, V320M, T323L, E324L, S325P, I326F, V327H, R328H, F329P, P330I, F342I, A344K, S349Y, Y351S, W353F, R355T, N360E, D364T, L368F, T376Q, F377V, C379F, Y380T, 25G381I, V382D, Y396T, A397D, D398A, S399I, F400D, V401R, G404Q, V407P, R408L, Q409F, I410K, P412N, G413S, G416L, I418G, A419T, D420G, Y421T, Y423G, K424N, L425F, P426N, F429V, G431K, C432N, V433K, N448A, Y451L, R457V, L461P, K462Q, P463Y, F464G, R466G, Q474S, P507L, V510K, V511R, V512F, F515Y, E516L, V524K, C525S, N532W, L533A, K535V, N536C, K537G, C538T, V539F, F541D, N542P, F543L, N544K, G545Y, L546N, T547Y, G548D, G550I, V551K, L552G, S555G, N556P, K557A, K558I, F559Q, L560R, P561V, F562E, Q563D, Q564G, F565R, G566I, R567V, D568F, I569S, D571A, T572Y, T573V, A575T, V576F, D578L, P579D, Q580N, T581L, L582K, E583T, I584P, L585S, D586V, I587G, T588Y e E324X.

O observado no Estado do Espírito Santo foi a predominância de mutações relacionadas a variante Alfa, Beta e Gama, esse quadro se compara as expectativas de NAVECA et.al (2020), ao esperar que as mutações K417T, E484K e N501Y pudessem conferir alguma vantagem seletiva para a transmissibilidade viral e em pouco tempo aumentariam a frequência e se espalhariam pelo Brasil.

Foram avaliados 32 pacientes, sendo 12 mulheres e 20 homens, em relação aos dados clínicos disponibilizados na planilha CSV (e-SUSve), pelo LACEN. Dividimos os pacientes mediante as mutações encontradas, sendo um grupo representado pela mutação E484K (n=28) e o outro representado por outras mutações variadas (n= 4). Analisamos a ocorrência de vários sintomas característicos da COVID-19 e

observamos que nenhum paciente apresentou: tiragem intercostal, cianose, coma, saturação, dificuldade de engolir, irritabilidade, exsudato, conjuntivite e convulsões. Outros sintomas foram apresentados por esses pacientes, conforme a tabela 3 e comparados entre os dois grupos. Não observamos diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3: Sintomas apresentados pelos pacientes com COVID-19 relacionados à mutação E484K (N=28) e a outras mutações (N=4) encontradas na população testada no Espírito Santo.

		OUTRAS MUTAÇÕES	MUTAÇÃO E484K	p-valor
Febre	SIM	1	17	
	NÃO	3	11	0,295
Dificuldade Respiratória	SIM	0	4	
	NÃO	4	24	1
Tosse	SIM	3	17	
	NÃO	1	11	1
Escarro	SIM	1	4	
	NÃO	3	24	0,512
Congestão Nasal	SIM	4	1	
	NÃO	24	3	0,512
Coriza	SIM	8	0	
	NÃO	20	4	0,55
Garganta	SIM	1	8	
	NÃO	3	20	1
Diarréia	SIM	0	3	
	NÃO	4	25	1
Náusea	SIM	1	2	
	NÃO	3	26	0,34
Cefaléia	SIM	1	18	
	NÃO	3	10	0,279

	SIM	0	6	
Adinamia	NÃO	4	22	0,566
	SIM	0	6	
Perda de Olfato	NÃO	4	22	0,566
	SIM	0	4	
Perda de Paladar	NÃO	4	24	1
	SIM	0	1	
Comorbidade Hepática	NÃO	4	27	1
	SIM	0	4	
Comorbidade Cardíaca	NÃO	4	24	1

Ao avaliarmos a presença de comorbidades, observamos as cardíacas (n=4) e hepáticas (n=1) no grupo com a mutação E484K, enquanto no grupo com outras mutações não houve nenhuma ocorrência. Outras comorbidades comuns na COVID-19 não foram encontradas nas nossas amostras como: renal, diabetes, neoplasias, tabagismo, obesidade, tuberculose, HIV, imunossuprimidos.

Os coronavírus tornaram-se uma grande ameaça à saúde pública nas últimas duas décadas, exemplificado por epidemias de síndromes respiratórias agudas e, mais recentemente, pela pandemia da doença de coronavírus de 2019. A manifestação dos sintomas pode variar, neste estudo muitos sintomas não foram encontrados na amostra de pacientes e todos os pacientes tiveram a cura em seu prognóstico final. No entanto, uma limitação deste estudo foi o número pequeno de indivíduos analisados.

Apesar de encontrarmos limitações, estudos antecessores a este apontam de acordo com os nossos resultados que os principais sintomas apresentados dentre os pacientes infectados com o vírus são, respectivamente, tosse, cefaleia, coriza e dor de garganta. A comorbidade mais prevalente dentre os óbitos foi a doença cardiovascular crônica (DELAI; NETO, 2020). No entanto, na amostra analisada não observamos a ocorrência de óbitos, o que requer outras avaliações , como relação

com idade, histórico de doenças prévias e comorbidades diversas. O importante é a observação que uma variedade enorme de complicações que devem ser estudadas no futuro para que se possa relacionar ou não essa ocorrência com as várias mutações encontradas e qual a relação de fato da proteína Spike com a gravidade do quadro clínico e transmissão.

5 CONCLUSÃO

O estudo detectou 269 mutações presentes na proteína Spike associadas ao SARS-CoV-2 no estado do Espírito Santo, no período de julho de 2020 a maio de 2021. Dentre as mutações detectadas, 5 eram pertencentes às variantes de preocupação Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.135) e Gama (B.1.617). Quanto aos sintomas e comorbidades não houve significância, o que não descarta a alta capacidade de virulência do coronavírus. Em virtude dos fatos mencionados espera-se que mais estudos sobre o coronavírus no Estado do Espírito Santo sejam realizados.

6 PERSPECTIVAS

Ainda há muito a se estudar sobre a distribuição virológica do estado Espírito Santo em relação ao SARS-CoV-2. Como o vírus tem sua capacidade de mutação bem avançada novas mutações têm surgido na mesma proporção e cabe à comunidade científica investigar mais sobre a ação dessas mutações frente à ECA2.

REFERÊNCIAS

ALEEM, Abdul; SAMAD, Abdul Bari Akbar; SLENKER, Amy K. **Emerging variants of SARS-CoV-2 and novel therapeutics against coronavirus (COVID-19)**. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2022.

BRASIL, Coronavírus. **Painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) no Brasil pelo Ministério da Saúde**. 2022.

BROWN, Jonathan C. et al. **Increased transmission of SARS-CoV-2 lineage B. 1.1. 7 (VOC 202012/01) is not accounted for by a replicative advantage in primary airway cells or antibody escape**. BioRxiv, 2021.

CADDY, Sarah. **Developing a vaccine for covid-19**. Bmj, v. 369, 2020.

CARVALHO, Patrícia Pereira Duzi. **Caracterização da interação dos coronavírus SARS-CoV e SARS-CoV-2 com o receptor ACE2 por meio de um padrão evolutivo conservado de aminoácidos**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CELE, Sandile et al. **SARS-CoV-2 evolved during advanced HIV disease immunosuppression has Beta-like escape of vaccine and Delta infection elicited immunity**. medRxiv, 2021.

CHAKRABORTY, Chiranjib et al. **Evolution, mode of transmission, and mutational landscape of newly emerging SARS-CoV-2 variants**. Mbio, v. 12, n. 4, p. e01140-21, 2021.

COLLIER D ; DE MARCO A ; FERREIRA I, et ai. **O SARS-CoV-2 B.1.1.7 escapa de anticorpos neutralizantes induzidos pela vacina de mRNA**. medRxiv 2021.01.19.21249840v2 [Pré-impressão]. 2021

Comitê Extraordinário de Monitoramento Covid_AMB. **Variantes do SARS-CoV-2: o que significam e qual o seu impacto na pandemia**. Boletim 012/2021: CEM COVID_AMB

DEJNIRATTISAI, Wanwisa et al. **Antibody evasion by the P. 1 strain of SARS-CoV-2**. Cell, v. 184, n. 11, p. 2939-2954. e9, 2021.

EDARA, Venkata-Viswanadh et al. **Infection and vaccine-induced neutralizing-antibody responses to the SARS-CoV-2 B. 1.617 variants**. New England Journal of Medicine, v. 385, n. 7, p. 664-666, 2021.

EJAZ, Hasan et al. **COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected patients**. Journal of infection and public health, v. 13, n. 12, p. 1833-1839, 2020.

ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. **Boletim Epidemiológico**. Disponível em :

FREITAS, André Ricardo Ribas; GIOVANETTI, Marta; ALCANTARA, Luiz Carlos Junior. **Variantes emergentes do SARS-CoV-2 e suas implicações na saúde coletiva**. InterAm J Med Health, v. 4, p. 1-8, 2021.

FLORES, Eduardo Furtado; KREUTZ, Luiz Carlos. **Replicação viral**. ORG., p. 107, 2007.

GAO, Shou-Jiang; GUO, Haitao; LUO, Guangxiang. **Omicron variant (B. 1.1. 529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert!**. Journal of medical virology, v. 94, n. 4, p. 1255, 2022.

GOVERNO DO BRASIL. **Informe Semanal nº 37 de Evidências sobre Variantes de Atenção de SARS-CoV-2**. 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes-tecnicas/informes-de-variantes/informe_s37.pdf/view]

GOVERNO DO BRASIL. **OMS declara emergência de saúde pública internacional para novo coronavírus**. 2020. Disponível em: [<https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2020/01/oms-declara-emergencia-de-saude-publica-internacional-para-novo-coronavirus>]. Acesso 22 out. 2020.

GOVERNO DO BRASIL. **Vacinas - Covid-19**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Disponível em: [<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>]. Acesso 04 out 2022

GRABOWSKI, Frederic et al. **SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 has about twofold replicative advantage and acquires concerning mutations**. Viruses, v. 13, n. 3, p. 392, 2021.

HASÖKSÜZ, Mustafa; KILIC, Selcuk; SARAÇ, Fahriye. **Coronaviruses and sars-cov-2**. Turkish journal of medical sciences, v. 50, n. 9, p. 549-556, 2020.

HU, Dan et al. **Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats**. Emerging microbes & infections, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2018.

INSTITUTO BUTANTAN. **Ômicron continua a ser a variante da Covid-19 predominante no estado de São Paulo, segundo rede de alerta**. Publicado: 29 de março de 2022.

KUMAR, V. et al. **Possible link between higher transmissibility of B. 1.617 and B. 1.1. 7 variants of SARS-CoV-2 and increased structural stability of its spike protein and hACE2 affinity**. bioRxiv 2021. preprint.

KUPFERSCHMIDT, Kai. **Where did ‘weird’ Omicron come from?**. Science, vol 374, 2021.

LEUNG, Kathy et al. **Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020**. Eurosurveillance, v. 26, n. 1, p. 2002106, 2021.

LI, Q., et al. **Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirusinfected pneumonia**. New England Journal of Medicine, 382 (13), 1199-1207, 2020.

LIMA, Felicson Leonardo Oliveira et al. **Diagnóstico da COVID-19: importância dos testes laboratoriais e dos exames de imagem.** Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento , v. 9, n. 9, pág. e259997162-e259997162, 2020.

LIMA, Luana Nepomuceno Gondim Costa; DE SOUSA, Maisa Silva; LIMA, Karla Valéria Batista. **As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19.** Journal of Health & Biological Sciences, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2020.

MICHELON, Cleonice Maria. **Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil.** RBAC, v. 53, n. 2, p. 109-116, 2021.

NONAKA, Carolina KV et al. **Genomic evidence of SARS-CoV-2 reinfection involving E484K spike mutation, Brazil.** Emerging infectious diseases, v. 27, n. 5, p. 1522, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **COVID-19 vaccines: Safety Surveillance Manual. Module: Introduction** [Internet]. 2020. Disponível em: [https://www.who.int/vaccine_safety/committee/Introduction.pdf?ua=1].

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **OMS anuncia nomenclaturas simples e fáceis de pronunciar para variantes de interesse e de preocupação do SARS-CoV-2. Nomenclaturas de variantes do SARS-CoV-2** [Internet]. Disponível em: [https://www.paho.org/pt/noticias/1-6-2021-oms-anuncia-nomenclaturas-simples-e-faceis-pronunciar-para-variantes-interesse-e].

OSTROV, David A. **Structural consequences of variation in SARS-CoV-2 B. 1.1. 7.** Journal of cellular immunology, v. 3, n. 2, p. 103, 2021.

O'TOOLE Á, HILL V, PYBUS OG *et al.* **Rastreamento da disseminação internacional das linhagens B.1.1.7 e B.1.351/501Y-V2 do SARS-CoV-2 com Grinch** [versão 2; revisão por pares: 3 aprovados] . Wellcome Open Res 2021, 6 :121. Disponível em: [https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16661.2]

OU, Junxian et al. **V367F mutation in SARS-CoV-2 spike RBD emerging during the early transmission phase enhances viral infectivity through increased human ACE2 receptor binding affinity.** Journal of virology, v. 95, n. 16, p. e00617-21, 2021.

PATIL, Sucheta et al. **Evolução convergente de mutações de pico SARS-CoV-2, L452R, E484Q e P681R, na segunda onda de COVID-19 em Maharashtra, Índia.** bioRxiv, maio 2021.

RAMANATHAN, Muthukumar et al. **SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 and B. 1.351 spike variants bind human ACE2 with increased affinity.** The Lancet Infectious Diseases, v. 21, n. 8, p. 1070, 2021.

Rede Genômica Fiocruz. **Genomahcov - Fiocruz.** Disponível em: <<http://www.genomahcov.fiocruz.br/>>.

RIOFRÍO, W. A.; ARCINIEGA, M.; CAVANI, M. **Molecular Dynamics and MM-PBSA Analysis of the SARS-CoV-2 Gamma Variant in Complex with the hACE-2 Receptor.** 2022.

RITCHIE, Hannah et al. **Our World in Data. Coronavirus (COVID-19) vaccinations.** 2021.

SARINHO, Filipe W. et al. **Vacinas COVID-19 e imunobiológicos.** 2021.

SHEREEN, M. A., et al. **COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses.** Journal of Advanced Research. (24), 91-98, 2020.

SHI, Mang et al. **The evolutionary history of vertebrate RNA viruses.** Nature, v. 556, n. 7700, p. 197-202, 2018.

SONG, Zhiqi et al. **From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight.** viruses, v. 11, n. 1, p. 59, 2019.

SPINELLO, Angelo et al. **Allosteric Cross-Talk Among SARS-CoV-2 Spike's Receptor-Binding Domain Mutations Triggers an Effective Hijacking of Human Cell Receptor.** bioRxiv, 2021.

STARR, Tyler N. et al. **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, 2020.

SUPASA, Piyada et al. **Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 variant by convalescent and vaccine sera.** Cell, v. 184, n. 8, p. 2201-2211. e7, 2021.

TIAN, Fang et al. **Mutation N501Y in RBD of Spike Protein Strengthens the Interaction between COVID-19 and its Receptor ACE2.** BioRxiv, 2021.

VAUGHAN, Adam. **Omicron emerges.** Newscientist, v 252, e3363, p. 7, 2021.

WALLS, Alexandra C. et al. **Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein.** Cell, v. 181, n. 2, p. 281-292. e6, 2020.

WANG, Huihui et al. **The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 39, n. 9, p. 1629-1635, 2020.

WANG, Qihui et al. **Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2.** Cell, v. 181, n. 4, p. 894-904. e9, 2020.

WANG, Zijun et al. **mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants.** Nature, v. 592, n. 7855, p. 616-622, 2021.

WEISS, Susan R.; LEIBOWITZ, Julian L. **Coronavirus pathogenesis.** Advances in virus research, v. 81, p. 85-164, 2011.

WEN, Wen et al. **Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis.** Annals of medicine, v. 54, n. 1, p. 516-523, 2022.

WISE, Jacqui. **Covid-19: The E484K mutation and the risks it poses.** The bmj, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **SARS-CoV-2 mink-associated variant strain–Denmark.**(2020). 2021.

WU, Fan et al. **A new coronavirus associated with human respiratory disease in China.** Nature, v. 579, n. 7798, p. 265-269, 2020.

ZHU, Zhaozhong et al. **Predicting the receptor-binding domain usage of the coronavirus based on kmer frequency on spike protein.** Infection, Genetics and Evolution, v. 61, p. 183, 2018.

ZISMAN, Lawrence S. et al. **Increased angiotensin-(1-7)–forming activity in failing human heart ventricles: Evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme homologue ACE2.** Circulation, v. 108, n. 14, p. 1707-1712, 2003.