

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**

THAUANE DE OLIVEIRA SILVA

**VIGILÂNCIA GENÔMICA DAS VARIANTES EMERGENTES DO SARS-COV-2 EM
CIDADES DO TERRITÓRIO BRASILEIRO**

**Campo Grande - MS
2023**

THAUANE DE OLIVEIRA SILVA

**VIGILÂNCIA GENÔMICA DAS VARIANTES EMERGENTES DO SARS-COV-2 EM
CIDADES DO TERRITÓRIO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Julio Henrique Rosa Croda.

**Campo Grande - MS
2023**



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias
Mestrado

Aos vinte e cinco dias do mês de outubro do ano de dois mil e vinte e três, às oito horas e trinta minutos, na modalidade Videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Julio Henrique Rosa Croda (UFMS), James Venturini (UFMS) e Karla Regina Warszawski de Oliveira (Anhanguera), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **THAUANE DE OLIVEIRA SILVA**, CPF 04862863124, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**VIGILÂNCIA GENÔMICA DAS VARIANTES EMERGENTES DO SARS-COV-2 EM CIDADES DO TERRITÓRIO BRASILEIRO.**" e orientação de Julio Henrique Rosa Croda. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Julio Henrique Rosa Croda (Interno)

Dr. James Venturini (Interno)

Dra. Karla Regina Warszawski de Oliveira (Externo)

Dra. PATRICIA VIEIRA DA SILVA (Externo) (Suplente)

Dr. Wellington Santos Fava (Interno) (Suplente)



Documento assinado digitalmente
JAMES VENTURINI
Data: 25/10/2023 12:18:42-0300
Verifique em <https://validar.jfi.gov.br>

ASSINATURA

RESULTADO FINAL:



Aprovação



Aprovação com revisão



Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Fazer as modificações sugeridas pela banca

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna

DEDICATÓRIA

A todos os seres humanos que foram a óbito em decorrência do SARS-CoV-2, seus familiares, os profissionais de saúde e a toda a humanidade, que foi afetada direta ou indiretamente pela pandemia do Coronavírus. Uma experiência humana que não pode ser desconsiderada. Um período em que precisamos nos adequar aos nossos hábitos de vida frente a um patógeno, o que resultou em danos biopsicossociais à saúde da humanidade e nas suas relações sociais, e repercussões que tendem a persistir ao longo dos próximos anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, pelo cuidado, apoio e incentivo durante toda a minha trajetória de vida.

Ao Dr. Julio Croda, pelo aceite de orientação, pelos ensinamentos e oportunidade de trabalhar nos estudos clínicos, que muito tem somado não só na minha formação profissional, mas também pessoal.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que desde a graduação tem concedido oportunidades para o aprimoramento do meu desenvolvimento profissional, e ter contemplado a tríade (ensino-pesquisa-extensão) que compõem sua visão institucional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, pela chance de cursar num programa de pós-graduação de excelência. Ao ilustre corpo docente, pelos ensinamentos e toda agregação do conhecimento ofertado ao longo das disciplinas cursadas.

A equipe do Centro de Pesquisa Clínica, pelo acolhimento, paciência e ensinamentos. Destaco também aqueles que contribuíram de forma crucial para construção intelectual deste estudo. Um agradecimento, as enfermeiras (Wende, Daniela e Karina), pelo companheirismo e aprendizados durante o período de recrutamento. Obrigada pelas contribuições e parceria nesta empreitada.

A todos os Centros de Pesquisa e laboratórios envolvidos nos processos de recrutamento, processamento e análises das amostras. A todas as instituições responsáveis pelo financiamento do REBRACOVID, frente a importância da pesquisa científica, para compreensão da história natural da doença no país.

A todos os familiares e amigos, que de alguma maneira ofertaram apoio nesta trajetória. Sobretudo, a Deus, por ter me conduzido até aqui, percorrendo caminhos que jamais imaginava ou esperava, o que me fez compreender a passagem bíblica: "O coração do homem planeja o seu caminho, mas é o Senhor quem lhe dirige os passos (Provérbios 16:9)".

“A variabilidade é governada por muitas leis desconhecidas, em especial pela da correlação de crescimento. Alguma coisa pode ser atribuída à ação direta das condições de vida. Alguma coisa deve ser atribuída ao uso e desuso. O resultado é assim tornando infinitamente complexo”

(Charles Darwin, A Origem das Espécies, 1859)

RESUMO

Introdução: Em dezembro de 2019, as autoridades chinesas detectaram um novo tipo de vírus que pode causar infecções em seres humanos. Desde a emergência do SARS-CoV-2, pesquisadores têm monitorado suas mutações, traços do genoma, evolução e comportamento do vírus através de diferentes ferramentas utilizadas no âmbito da vigilância genômica. **Objetivo:** Avaliar a introdução e circulação das variantes emergentes do SARS-CoV-2 em cinco cidades do Brasil (Niterói-RJ, Campo Grande-MS, Dourados-MS, Rondônia-RO, Recife-PE). **Métodos:** O presente estudo é uma pesquisa descritiva, analítica, observacional de corte transversal; com dados primários submetidos a técnicas laboratoriais a partir de amostras positivas para infecção pelo SARS-CoV-2. A análise filogenética foi composta por isolados identificados e um conjunto representativo da diversidade viral numa árvore de alta verossimilhança utilizando as ferramentas Viral MSA e IQ-TREE2 12. Foram coletados dados clínicos, valores do ciclo limiar (Ct) e sorologia para comparar a frequência dessas variáveis em indivíduos acometidos pelas Variantes de Preocupação (VOC) em comparação com outras linhagens do SARS-CoV-2, em termos de transmissibilidade, sintomas clínicos e escape imunológico. **Resultados:** Foram incluídos 209 indivíduos, a maioria mulheres, com média de idade de $39,8 \pm 13,5$ anos e da cor branca. Foram identificadas 13 cepas circulantes no período de outubro de 2020 a maio de 2021. As variantes mais frequentes foram P.2 (46,4%), seguidas por P.1 (22%) e B.1.133 (11,4%). As VOC apresentaram um valor menor de Ct em comparação com outras linhagens, o que pode significar uma maior transmissão viral. Os indivíduos que foram atingidos pelas VOC apresentaram soroconversão em menor proporção em relação às outras cepas. **Conclusão:** Contextualizar os genomas sequenciados permitiu analisar o espalhamento geográfico e a dinâmica viral em escalas local, regional e nacional. Apesar de o sequenciamento genômico ter sido realizado em larga escala, ainda existem lacunas do conhecimento que necessitam ser preenchidas para compreender a história natural do SARS-CoV-2, bem como seus impactos globais.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; Variantes Emergentes; Vigilância Genômica

ABSTRACT

Introduction: In December 2019, Chinese authorities detected a new type of virus that can cause infections in humans. Since the emergence of SARS-CoV-2, researchers have monitored its mutations, genome traits, evolution and behavior of the virus through different tools used within the scope of genomic surveillance. **Objective:** To evaluate the introduction and circulation of emerging variants of SARS-CoV-2 in five cities in Brazil (Niterói-RJ, Campo Grande-MS, Dourados-MS, Rondônia-RO, Recife-PE). **Methods:** The present study is a descriptive, analytical, cross-sectional observational research, with primary data submitted to laboratory techniques from samples positive for SARS-CoV-2 infection. The phylogenetic analysis comprised identified isolates and a representative set of viral diversity in a high-likelihood tree using Viral MSA and IQ-TREE2 tools.¹² Clinical data, Ct values, and serology were collected to compare the frequency of these variables in individuals affected by Variants of Concern (VOC) compared to other SARS-CoV-2 strains regarding transmissibility, clinical symptoms, and immune escape. **Results:** We included 209 individuals, mostly women, with a mean age of 39.8 ± 13.5 years and of white color. Thirteen circulating strains were identified from October 2020 to May 2021. The most frequent variants were P.2 (46,4%), followed by P.1(22%) and B.1.133 (11,4%). VOC showed a lower Ct value than other strains, which may signify greater viral transmission. Individuals affected by VOC showed seroconversion in a lower proportion than the other strains. **Conclusion:** Contextualizing the sequenced genomes allowed us to analyze the geographic spread and viral dynamics on local, regional, and national scales. Although genome sequencing has been performed on an unprecedented scale, knowledge gaps still need to be filled to understand the natural history of SARS-CoV-2 and its global effects.

Keywords: SARS-CoV-2; Emerging Variants; Genomic Surveillance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura morfológica do SARS-CoV-2.....	15
Figura 2 - Representação do genoma do SARS-CoV-2.....	16
Figura 3 - Etapas da infecção posteriores a entrada do genoma viral na célula hospedeira.....	19
Figura 4 - Reconstrução filogenética das primeiras linhagens de SARS-CoV-2	25
Figura 5 - Circulação das principais linhagens do SARS-CoV-2 por período de amostragem.....	29
Figura 6 - Fluxograma de seleção da população de estudo.....	34
Figura 7 – Localização geográfica da população de estudo de cinco Centros de Pesquisa vinculados a REPLICK	38
Figura 8 - Reconstrução Filogenética.....	41
Figura 9 – Valor de Ct de indivíduos com SARS-CoV-2.....	42
Figura 10 - Intervalo entre sintomas até a data de inclusão.....	43
Figura 11 – Sorologia de indivíduos com SARS-CoV-2.....	45

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - Regiões codificadoras do SARS-COV-2.....	17
QUADRO 2 - Etapas para construção de análise filogenética.....	23
QUADRO 3 – Variantes de interesse (VOI) do SARS-COV-2.....	27
QUADRO 4 - Variantes de preocupação (VOC) do SARS-COV-2.....	28
TABELA 1 - Dados demográficos de indivíduos positivos para SARS-COV-2.....	39
TABELA 2 - Distribuição de sintomas clínicos relatados por indivíduos acometidos pelo SARS-COV-2 de acordo com os grupos Brasil.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CT	Valor do ciclo limiar
CoVs	Coronavírus
ECA-2	Enzima conversora de angiotensina tipo 2
ESPII	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
HCoVs	Coronavírus humanos
HE	Hemaglutinina esterase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	Quadro de leitura aberta
SARS-CoV-2	Coronavírus-2 da síndrome respiratória aguda grave
RBD	Domínio de ligação ao receptor
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa em tempo real
TAG-VE	Grupo técnico consultivo sobre a evolução do vírus
TRSs	Sequências reguladoras de transcrição
VG	Vigilância Genômica
VOC	Variante de Preocupação
VOI	Variante de Interesse

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 CORONAVÍRUS	14
2.2 SARS-CoV-2	15
2.2.1 Morfogenese	15
2.2.2 Replicação viral	18
2.3 COVID-19	20
2.3.1 Pandemia do novo Coronavírus	20
2.3.2 Vigilância Genômica	21
2.3.3 Filogenia e evolução viral	22
2.3.4 SARS-CoV-2: Variantes Emergentes	26
2.3.5 Epidemiologia global e cenário brasileiro	29
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 População e amostra	33
4.2 Aspectos Éticos	34
4.3 Recrutamento e Coleta de dados	34
4.3.1 Critérios de elegibilidade	35
4.4 Análise laboratorial	35
4.4.1 Ensaio Sorológico	35
4.4.2 Biologia Molecular	36
4.4.3 Análise filogenética	36
4.4.5 Processamento e análise dos dados	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Características da população estudada	38
5.2 Linhagens do SARS-CoV-2 identificadas na população do estudo	40
5.3 Infecção pelo SARS-CoV-2	42
6 DISCUSSÃO	46
6.1 Limitações do estudo	49

7 Considerações finais	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO A.....	60

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, as autoridades chinesas detectaram um novo tipo de vírus que pode causar infecção em humanos. O patógeno espalhou-se por todo o território chinês e por diversos países, sendo considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) (WHO, 2020).

O SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) é um vírus de RNA de fita simples e polaridade positiva, que exibe proteínas estruturais em seu genoma (Giovanetti *et al.*, 2021a). A doença causada pelo SARS-CoV-2, conhecida como COVID-19, pode se manifestar de forma assintomática ou apresentar diversas manifestações, desde quadros leves até falência múltipla dos órgãos e morte. O período médio de incubação do patógeno é de 5 dias, podendo chegar a 12 dias. A transmissão pelos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 ocorre, em média, 7 dias após o início dos sintomas ou mesmo sem a presença de sintomas. No entanto, essas variáveis podem variar de acordo com as cepas circulantes (Lauer *et al.*, 2020).

Desde a emergência do SARS-CoV-2, os cientistas têm monitorado as variantes, traços do genoma, evolução e comportamento do vírus. A baixa diversidade do SARS-CoV-2 no início da ESPII pode ser parcialmente explicada pelo mecanismo de revisão durante a replicação do RNA (proofreading) realizado por uma exoribonuclease presente no complexo não estrutural (nsp10-nsp14), o qual aumenta consideravelmente a fidelidade na incorporação de nucleotídeos, mantendo a integridade de seu genoma (Liu *et al.*, 2021; Ogando *et al.*, 2020).

Dessa forma, foi sugerido inicialmente que as vacinas que se baseiam em uma única sequência da proteína Spike trariam proteção imunológica para todas as cepas circulantes (Dearlove *et al.*, 2020). Algumas linhagens do SARS-CoV-2 emergiram em 2020, principalmente mutações de pico, alvo dos anticorpos neutralizantes (anti-SARS-CoV-2) e do desenvolvimento de vacinas e outras terapêuticas, pois mediam a interação com a enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA-2) (Walls *et al.*, 2020).

Considerando o cenário epidemiológico de pessoas infectadas nas diferentes regiões do planeta e o fato de que o processo de evolução do vírus pode gerar novas variantes, a mobilização de estratégias globais torna-se crucial para conter a disseminação do vírus, considerando as diferenças socioeconômicas entre as

diferentes localidades, e os efeitos na saúde pública. As organizações e serviços de combate à pandemia incentivam a vigilância e sequenciamento genômico. Desde 2020, o Brasil tem desempenhado um papel fundamental nas atividades de monitoramento genômico do SARS-CoV-2, levando em conta a sua capacidade laboratorial, bem como a sua localização geográfica e diversidade populacional (WHO, 2022; Brasil, 2021a).

Apesar dos esforços colaborativos internacionais e locais para a descoberta das origens do SARS-CoV-2, ainda não existem evidências suficientes para preencher algumas lacunas do conhecimento. Mediante a dimensão da pandemia do novo Coronavírus, e o impacto das variantes emergentes do SARS-CoV-2, compreender o surgimento e a propagação dessas variantes, bem como avaliar seus impactos em termos de transmissibilidade, manifestações clínicas e escape imunológico poderá fornecer maior robustez aos estudos já realizados, e auxiliar na compreensão da história natural do novo Coronavírus no país.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CORONAVÍRUS

Os Coronavírus (CoVs) pertencem à ordem *Nidovirales*, subordem *Cornidovirineae* e família *Coronaviridae*, que é classificada em duas subfamílias, *Letovirinae* e *Orthocoronavirinae*; A *Orthocoronavirinae* apresenta quatro gêneros: *Alphacoronavirus* (α CoV), *Betacoronavirus* (β CoV), *Gammacoronavirus* (γ CoV) e *Deltacoronavirus* (δ CoV). Atualmente, sete espécies de CoVs são reconhecidas por causar infecção em seres humanos (HCoVs), sendo o primeiro caso reportado em 1960. Quatro espécies de HCoVs são reconhecidas pela transmissão por vias aéreas e baixa patogenicidade (*HCoV-229E*, *HCoV-HKU1*, *HCoV-NL63* e *HCoV-OC43*) (Corman *et al.*, 2018; CSG, 2020; Cui *et al.*, 2019).

Outros HCoVs resultaram em consequências de alto impacto para saúde pública, quadros de gravidade e desfechos clínicos fatais. A Síndrome Respiratória Aguda Grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome-SARS-CoV*) foi reconhecida em novembro de 2002, na China, e sua possível origem foi associada ao consumo de carne de civetas. Um surto da síndrome ocorreu em Hong Kong, que resultou em letalidade de 10%, e após intervenções de saúde pública, a epidemia foi controlada (De Wit, 2016; Dolin, 2007).

A Síndrome Respiratória do Oriente Médio (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus-MERS-CoV*) foi a segunda epidemia causada por HCoV. O patógeno foi detectado em 2012, na Arábia Saudita. A epidemia apresentou uma taxa de mortalidade significativa (35%) (Al-Osail *et al.*, 2017).

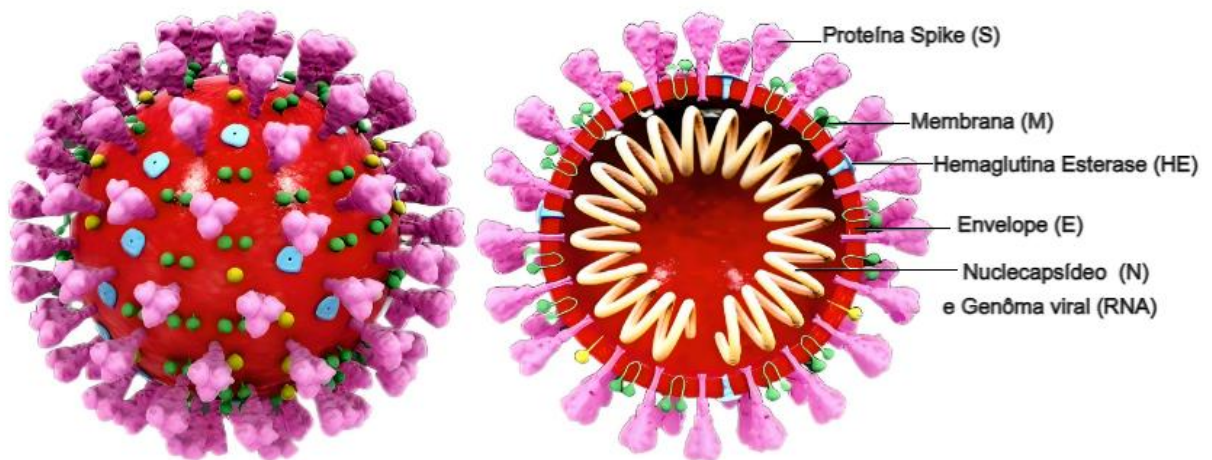
No final de 2019, na cidade de Wuhan, China, foram relatados casos de infecção em humanos, com manifestações clínicas específicas e origem etiológica desconhecidas. A doença causada pelo novo Coronavírus, ou SARS-CoV-2, se espalhou por todo o globo terrestre e foi classificada pela OMS como uma ESPII em 11 de março de 2020 (WHO, 2020).

2.2 SARS-CoV-2

2.2.1 Morfogênese

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples, com aproximadamente 125 nanômetros (nm) de diâmetro. Ele possui polaridade positiva, é esférico e revestido por uma camada lipoproteica (Figura 1). Possui em média 29.900 bases nitrogenadas, que codificam 29 proteínas estruturais, não estruturais e acessórias. O patógeno apresenta quatro proteínas estruturais essenciais em sua estrutura morfológica (Figura 1) (Lima *et al.*, 2020; Vellingiri *et al.*, 2020):

Figura 1 – Estrutura morfológica do SARS-CoV-2. A proteína Spike (S) faz ligação com o receptor, a membrana (M) é a proteína estrutural mais abundante que pode atingir 64,896,6 nm de diâmetro; O envelope (E) é a menor proteína estrutural e, junto com a membrana, forma o envelope viral, auxiliando no processo maturação viral e patogênese. O nucleocapsídeo (N) é composto por 30 a 35 ribonucleoproteínas (RNPs) em formato de G reverso, com 15 nm de diâmetro por vírion



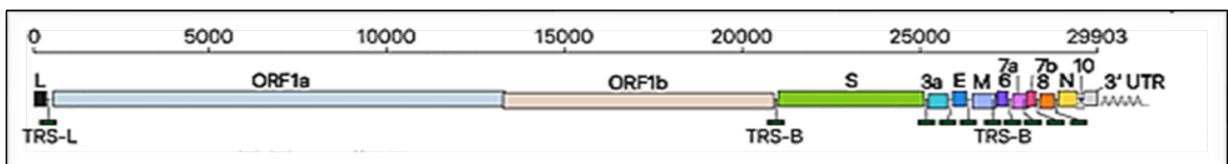
Fonte: Adaptado de <https://www.scientificanimations.com/coronavirus>.

A proteína S reconhece as proteínas receptoras de membrana, viabilizando a entrada do patógeno na célula hospedeira. Ela possui um aspecto globular trimérico que abrange três segmentos: ectodomínio, uma âncora transmembrana de passagem única e uma cauda intracelular. Conforme Li *et al.* (2020), o ectodomínio é dividido em uma subunidade S1, que exibe dois domínios independentes (um domínio N-terminal – S1-NTD, e um domínio C-terminal – S1-CTD). Na subunidade S2, ocorre a fusão da membrana resultante de rearranjos estruturais.

A proteína de menor superfície, a hemaglutinina esterase (HE), também foi identificada na estrutura morfológica do vírus. Em seu interior, a proteína N protege o RNA e auxilia na formação do capsídeo e de toda a estrutura viral (Vashist, 2020; Vellingiri *et al.*, 2020). O termo “coronavírus” foi designado devido ao aspecto de uma coroa, decorrente da organização estrutural de suas glicoproteínas, que formam estruturas circulares chamadas projeções ou espículas (Weiss; Navas-Martin, 2005).

O genoma do SARS-CoV-2 possui entre 26 e 32 kilobases (kb) e é altamente conservado em relação a outros CoVs. Ele segue a mesma ordem na molécula de RNA e possui pelo menos dez quadros de leitura aberta, conhecidos como *Open Reading Frames* (ORF) (Li *et al.*, 2020). Análises genômicas revelam uma similaridade de 80% do SARS-CoV-2 com o SARS-CoV, e aproximadamente 96% de similaridade com o vírus sequenciado de morcegos, o *BatCoV RaTG13*. As principais regiões codificadoras (ORF1a/b, S, 3a, E, M, 6, 7a, 7b, 8, N, 10) e sequências reguladoras de transcrição (TRSs) estão representadas na ordem em que se apresentam no genoma, conforme a figura 2 (Kim *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

Figura 2 - Representação genômica do SARS-CoV-2



Fonte: Adpatdo de Kim *et al.*, 2020.

O primeiro gene codifica a replicase (ORF1ab), seguido dos genes que codificam as proteínas S, Envelope, Membrana e Nucleocapsídeo. O RNA viral possui as mesmas propriedades de maturação do RNA da célula hospedeira e apresenta uma capa na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3', que são necessárias para a integridade da molécula. A estrutura do genoma indica que dois terços de toda a sua estrutura correspondem às ORFs (na direção 5') e destinam-se à produção de proteínas de replicação (De Wit *et al.*, 2016).

De acordo com Fehr e Perlman (2015), as sequências que correspondem a uma menor proporção na direção 3' do RNA estão vinculadas aos genes de codificação das proteínas estruturais do vírion, como as glicoproteínas S do sítio de reconhecimento das células hospedeiras, e os genes para os envoltórios proteicos

que protegem o genoma. A sequência que codifica a poliproteína ORF1ab é a mais extensa, ocupando 72% do genoma e apresentando em sua composição 16 proteínas não-estruturais em uma sequência (nsp1 a nsp16), que constitui a replicase dependente de RNA (RdRP) (Kim *et al.*, 2020). A compreensão das características funcionais de cada nsp foi considerada a partir de estudos realizados com outros HCoV (Quadro 1).

Quadro 1 - Regiões codificadoras do SARS-COV-2. Lista dos genes incluindo sua posição no genoma e função

Gene / orf		Posição (nt)		Função
		Início	Fim	
ORF1a	nsp1	266	805	Acelera a degradação do mRNA, bloqueia respostas imunes inatas.
	nsp2	806	2719	Sofre pressão seletiva positiva.
	nsp3	2720	8554	Liga às proteínas do hospedeiro, media a replicação viral.
	nsp4	8555	10054	Media a interação com membranas celulares.
	nsp5	10055	10972	A principal protease com atividade de processamento da poliproteína dos CoVs.
	nsp6	10973	11842	Restringe a expressão do autofagossomo.
	nsp7	11843	12091	Forma complexo com nsp8, estabilizando-a.
	nsp8	12092	12685	Forma complexo com nsp7, catalisa a síntese de iniciadores de RNA.
	nsp9	12686	13024	Proteína de ligação à ácidos nucleicos.
	nsp10	13025	13441	Interage com nsp14 e nsp16, regula a função da replicase viral.
	nsp11	13442	13480	Função desconhecida.
ORF1b	nsp12	13442	16236	Catalisa a síntese do RNA viral.
	nsp13	16237	18039	Interage com nsp8 e nsp12, regula a atividade da helicase.
	nsp14	18040	19620	Exonuclease. Diminui a incidência de nucleotídeos mal pareados.
	nsp15	19621	20658	Atividade de RNase. Degrada RNA viral.
	nsp16	20659	21552	Atividade de 2-O-Mtase. Escapa da imunidade inata.
S		21563	25384	Liga-se aos receptores celulares do hospedeiro, media a ligação e fusão do envelope e membrana celular do hospedeiro.
ORF3a		25393	26220	Induz apoptose, patogenicidade e liberação dos vírions, media a ativação do inflamassomo.
ORF3b		25814	25882	Está relacionado à ativação de AP-1 pelas vias ERK e JNK.

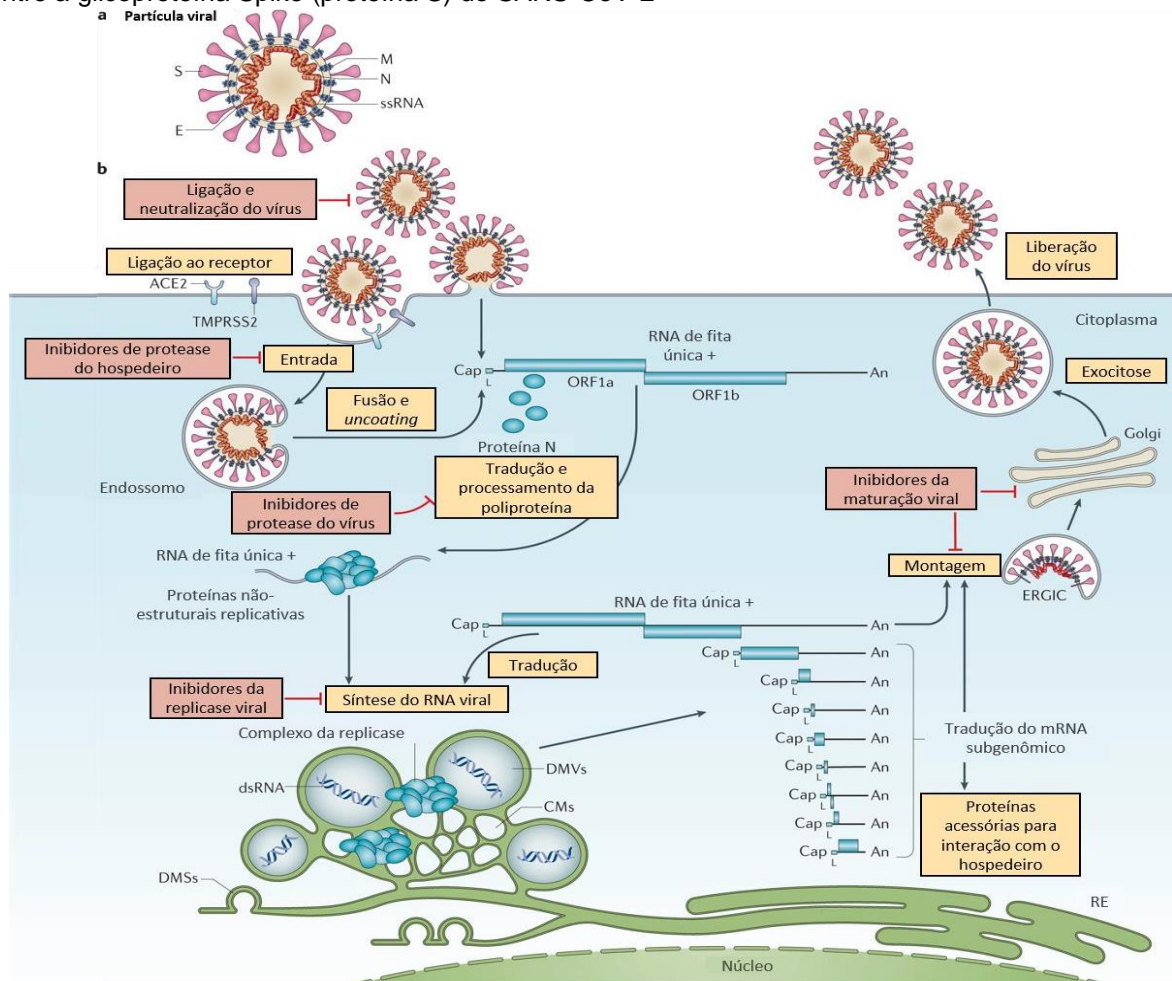
E	26245	26472	Interage com a proteína de membrana para constituir o envelope.
M	26523	27191	Determina a forma do vírion. É central na organização da constituição da estrutura dos CoVs.
ORF6	27202	27387	Inibe a tradução das proteínas celulares.
ORF7a	27394	27759	Relacionado à interação vírus-hospedeiro.
ORF7b	27756	27887	Relacionado à interação vírus-hospedeiro.
ORF8	27894	28259	Interfere com os mecanismos antivirais do hospedeiro
N	28274	29533	A fosfoproteína do nucleocapsídeo protege o genoma do RNA viral e está envolvida no empacotamento do RNA em partículas virais
ORF10	2 9558	29674	Desconhecido. Não foram identificadas transcrições
3'UTR	29675	29903	

Fonte: Adaptado de Chen, Liu e Guo (2020) *apud* Gomez (2021).

2.2.2 Replicação viral

O ciclo de replicação do patógeno (Figura 3) ocorre pelo reconhecimento celular do epitélio nasal e bronquial e pela ligação com a proteína S, por meio do contato com o domínio de ligação ao receptor (RBD) localizado em S1, juntamente com o domínio extracelular do receptor de membrana ECA-2. A proteína S é ativada no sítio específico da subunidade 2 (S2) pela protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2), que cliva a proteína por meio da fusão com a membrana endossômica, permitindo a entrada do vírus na célula hospedeira por endocitose e a liberação e replicação do RNA genômico no citoplasma celular. Também ocorrem processos de expressão gênica viral, por meio da transcrição e tradução gênica, que resultam na formação de proteínas para o metabolismo viral e sua replicação (Hartenian *et al.*, 2020; Walls *et al.*, 2020).

Figura 2: Etapas da infecção posteriores a entrada do genoma viral na célula hospedeira. Etapas da infecção posteriores a entrada do genoma viral na célula hospedeira: Esquema ilustrando a ligação entre a glicoproteína Spike (proteína S) do SARS-CoV-2



Fonte: adaptado de V'kovski *et al.* 2021.

Segundo Hartenian *et al.* (2020), a proteína S abriga um sítio adicional de clivagem, reconhecido pela proteína furina no complexo de Golgi, e está envolvida na maturação das proteínas de superfície viral. Em seguida, os vírus são agrupados e, após a maturação, são transportados para a superfície celular em vesículas, migrando para os pneumócitos, especialmente para o tecido epitelial alveolar do tipo II, e liberados por exocitose (Shang *et al.*, 2020).

O sistema respiratório é o principal alvo na infecção pelo SARS-CoV-2. O patógeno também compromete outros sistemas orgânicos, resultando em falha multissistêmica e desfechos clínicos fatais em uma determinada população de indivíduos. Giovanetti *et al.* (2022a) descreve que fatores ambientais, como temperatura, densidade populacional e poluição do ar, foram associados à

disseminação viral e ao aumento nas curvas de incidência de morbidade/mortalidade. As pesquisas de Ogando *et al.* (2020) e Wang *et al.* (2020) atribuem a correlação entre a amplificação da expressão da ECA2 em grupos populacionais e fatores de risco para desfechos clínicos graves da infecção pelo SARS-CoV-2, especialmente em indivíduos com comorbidades e idosos.

2.3 COVID-19

2.3.1 Pandemia do novo Coronavírus

A pandemia do novo Coronavírus expressou uma diversidade de dados epidemiológicos relacionados a casos, hospitalizações e óbitos. Conforme a OMS, até 21 de setembro de 2023, um total de 770.778.396 casos acumulados e 6.958.499 óbitos foram notificados globalmente. No Brasil, o primeiro caso confirmado da doença ocorreu na cidade de São Paulo em 26 de fevereiro de 2020. Em 20 de março, foi declarada que a transmissão comunitária ocorria em todo o território brasileiro, e até setembro de 2023, os dados preliminares corresponderam a 37.717.062 casos e 704.659 óbitos (Croda; Garcia, 2020; WHO, 2023).

A disseminação do patógeno no Brasil ocorreu por diferentes rotas de transmissão, principalmente por meio de aeroportos internacionais localizados nas grandes metrópoles da costa atlântica brasileira, viagens procedentes do continente europeu e outras vias de transmissão do vírus pelo país, como as rodovias federais e estaduais (Candido *et al.*, 2020). Uma modelagem matemática evidenciou a cidade de São Paulo como responsável por mais de 85% da transmissão. Após a inclusão de 16 cidades nas análises, os resultados estimaram a transmissão do vírus para outras regiões entre 98% a 99% durante os três primeiros meses da pandemia no país (Nicodelis *et al.*, 2021).

Os centros urbanos foram associados à transmissão do SARS-CoV-2 devido à sua relação com os fluxos globais densamente povoados, além dos espaços fronteiriços e litorâneos (Candido *et al.*, 2020; DIRUR, 2020). Diante de sua extensão continental, pesquisadores indicam que a disseminação do SARS-CoV-2 no Brasil ocorreu de forma heterogênea, por meio de diferentes rotas de transmissão ao longo de seu território (Pereira *et al.*, 2020).

2.3.2 Vigilância Genômica

A Vigilância Genômica (VG) consiste no uso de ferramentas que utilizam informações do patógeno para o seu monitoramento e rastreamento, e está diretamente relacionada à evolução (Alberts, 2004). O método de sequenciamento do genoma foi descrito pela primeira vez por Sanger *et al.* (1977) e abrange um conjunto de processos bioquímicos que permite identificar cada nucleotídeo em uma cadeia de DNA ou RNA.

Ao longo dos anos, umas variedades de inovações foram desenvolvidas pelas indústrias visando o aprimoramento dessa técnica. Para que a técnica seja executada com excelência, o sequenciamento genômico demanda uma infraestrutura especializada em robótica, bioinformática, banco de dados e recursos materiais (Mardis, 2008).

Os pesquisadores reconheceram a necessidade da criação e compartilhamento de perfis genômicos de patógenos de interesse médico, com o objetivo de preencher lacunas do conhecimento em pesquisas epidemiológicas. A pesquisa genética em estudos clínicos e epidemiológicos carece de compreender as técnicas de tipagem envolvidas, associadas à integração eficiente dos resultados nas tomadas de decisões clínicas e de saúde pública. Posteriormente, o termo "Vigilância Genômica" passou a ser utilizado em pesquisas relativas ao monitoramento de patógenos, porém, sem uma ferramenta normatizada para sua execução (Sintchenko *et al.*, 2019).

Ferramentas tecnológicas utilizando o Sequenciamento de Próxima Geração (*Next-Generation Sequencing* - NGS) vêm sendo utilizadas para comparar sequências de ácidos nucleicos de importância epidemiológica (Deng; Den Bakker; Hendriksen, 2016). As pesquisas com genomas virais podem ser conduzidas de diversas maneiras, incluindo a avaliação das taxas de evolução de vírus de RNA em rápida evolução, a detecção de mutações resistentes em vacinas e terapias, além da reconstrução da filogenia de linhagens de vírus em estreita conexão para identificar e conectar epidemiologicamente os pacientes infectados durante um surto ou evento de transmissão (Lam; Hon; Tang, 2010).

O sequenciamento do genoma do SARS-CoV foi crucial para compreender as relações evolutivas entre diferentes isolados de pacientes por meio de análises

filogenéticas (Rota *et al.*, 2003). A combinação de dados genéticos e epidemiológicos permitiu às autoridades chinesas identificar as diversidades genotípicas que influenciam a transmissão de vírus (Ruan *et al.*, 2003).

Durante a pandemia do novo Coronavírus, devido à sua capacidade de propagação viral a curto prazo, causada pela rápida mobilidade humana pelo globo terrestre, esforços internacionais colaborativos têm permitido a disponibilização de genomas sequenciados em diversas províncias e países. Essa ferramenta rastreia a evolução e dispersão geográfica do vírus, para que as medidas de saúde pública sejam eficazes. Além disso, auxilia nas medidas de controle da propagação do vírus, no desenvolvimento de métodos diagnósticos e terapêuticas contra a doença (Hu *et al.*, 2021).

A Rede Regional de Vigilância Genômica da COVID-19 dos Estados-Membros da América Latina e Caribe, da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), foi criada em 2020 com o objetivo de fortalecer a capacidade de sequenciamento dos laboratórios e incentivar os países a implementarem a vigilância genômica. A estrutura da rede combina países com capacidade de sequenciamento interno e aqueles que enviam amostras para sequenciamento externo nos Laboratórios Regionais de Sequenciamento (Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Brasil e Instituto de Saúde Pública/ISPCH-Chile) (PAHO, 2023).

A disponibilidade de dados genômicos para responder a questões evolutivas emergentes oferece informações genômicas e geográficas, fornecem pistas sobre a evolução dos organismos, incluindo sua dispersão regional e o entendimento de eventos evolutivos como especiação, radiação adaptativa e extinção (Bermingham; Moritz, 1998; Knowles, 2009). A partir da integração entre dados filogenéticos e geográficos, surgiu o conceito de filodinâmica, que é a análise estatística de dados populacionais de espécies intimamente relacionadas para inferir parâmetros e processos populacionais (Yang; Rannala, 2012).

2.3.3 Filogenia e evolução viral

A filogenia compreende o estudo das relações de parentesco evolutivo entre os organismos e a organização das formas de vida, conforme as características de seu material genético, além do desenvolvimento de técnicas para seu estudo (Domingos;

Perales, 2019). As análises filogenéticas foram, historicamente, fundamentadas em características facilmente observadas, posteriormente, em dados de sequências moleculares de DNA, RNA e proteínas (Pevsner, 2015).

Os pesquisadores têm utilizado vários métodos para alinhar e comparar os genomas sequenciados, com o objetivo de responder a questões relevantes sobre a função e evolução dos organismos, área que ficou conhecida como genômica comparativa (Miller *et al.*, 2004). As etapas da construção de um fluxo de análise filogenética molecular, bem como os principais métodos usados para sua construção, foram representadas no quadro 2.

Quadro 2 - Etapas para construção de análise filogenética

Fluxo para análise filogenética (Pevsner, 2015)	Principais métodos
Seleção de sequências homólogas para análise;	Métodos baseados em distância: analisam alinhamentos em pares das sequências e usam as distâncias genéticas para inferir a filogenia (Felsenstein, 1984);
Alinhamento múltiplo das sequências de interesse;	Máxima parcimônia (MP): método baseado em caracteres no qual colunas de resíduos são analisadas no alinhamento múltiplo para identificar a árvore com o menor comprimento total de ramos possível (Czelusniak <i>et al.</i> , 1990);
Escolha do método e da ferramenta de inferência filogenética;	Máxima verossimilhança (ML): abordagem estatística baseada em modelos, projetada para determinar a topologia da árvore e comprimentos de ramos que têm a maior probabilidade de produzir o conjunto de dados observados, a partir do cálculo da verossimilhança para cada resíduo em um alinhamento com a especificação de um modelo evolutivo (Felsenstein, 1981);
Especificação de um modelo evolutivo;	Inferência Bayesiana: abordagem estatística para modelagem da incerteza em modelos complexos, a qual calcula a probabilidade dos dados fornecidos pelo modelo $P(\text{dados} \text{modelo})$, ou seja, busca a probabilidade condicional de uma árvore em relação aos dados fornecidos (Huelsenbeck <i>et al.</i> , 2001).
Avaliação das filogenias geradas.	*Cada método possui uma variedade de ferramentas que os implementam.

Fonte: Adaptado de Pevsner, 2015; Felsenstein, 1981; Czelusniak *et al.*, 1990.

Dado que os vírus são amplamente difundidos e causam infecções em humanos, a demografia desempenha um papel significativo na determinação da variação genética das populações virais. Os padrões de variação genética viral são afetados tanto pela seleção natural atuando sobre os genomas virais quanto pela rapidez com

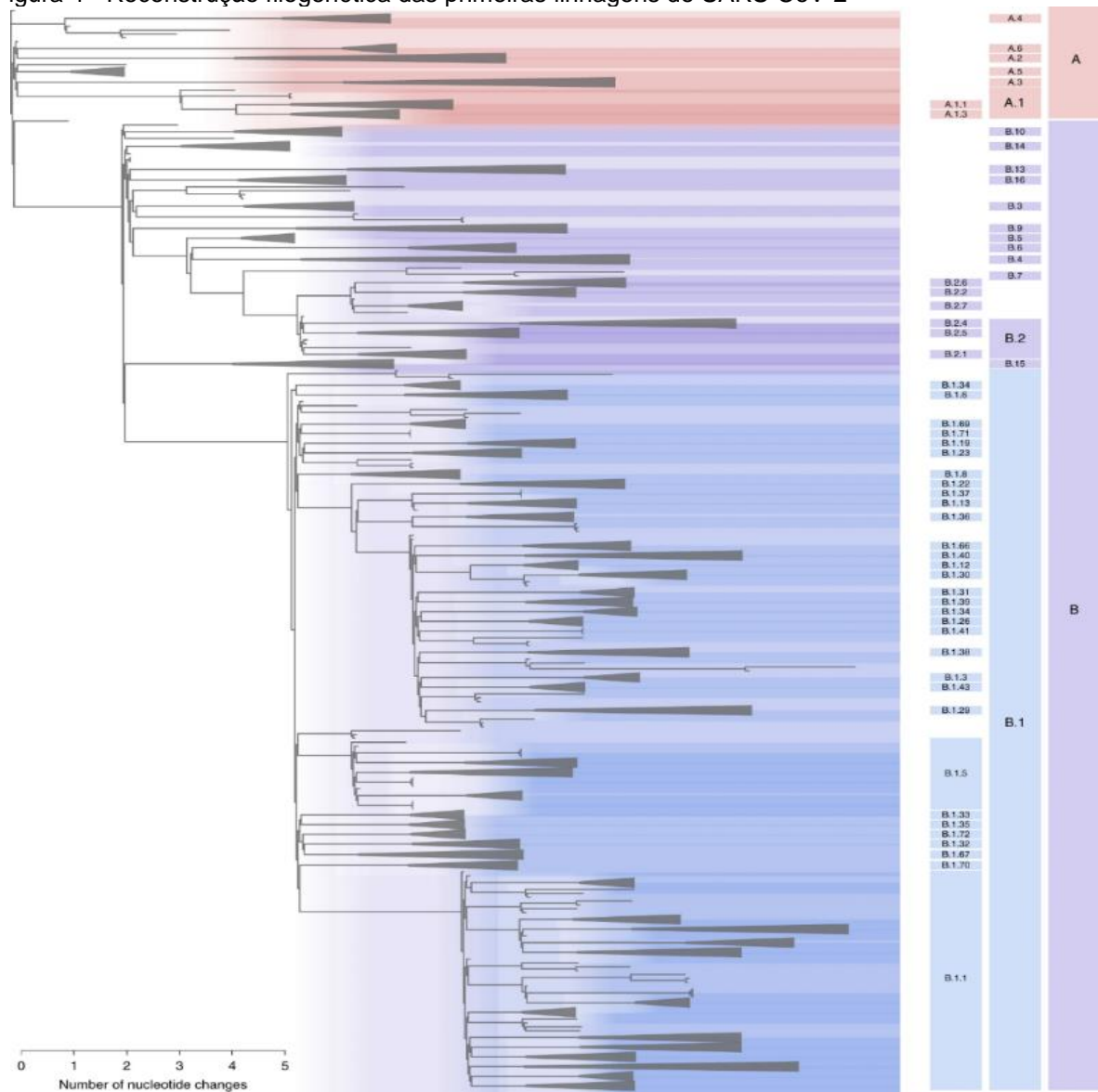
que a transmissão ocorre e pelas medidas adotadas para contê-la (Volz; Koelle; Bedford, 2013). Esses padrões espaciais de dispersão podem ser recuperados pelas análises filodinâmicas.

Devido à taxa de mutação elevada e à diversidade viral, a taxonomia dos vírus apresenta desafios em promover uma abordagem universal que classifique sua diversidade genética. Essa variedade é agrupada em "clados" ("subtipos", "genótipos", "grupos" e "tipos virais"), que correspondem a grupos monofiléticos em uma árvore filogenética (ICV, 2022).

Um conjunto de regras para diferenciar as linhagens do SARS-CoV-2 foi proposto por Rambaut *et al.* (2020a) e posteriormente adotado pela comunidade científica, denominado como sistema de nomenclatura Pango. Conforme os autores, um suposto clado ou uma nova linhagem emergente deve exibir evidência filogenética, ser descendente de um clado ancestral e apresentar evidências de ganho evolutivo, em termos de aumento de sua ancestralidade (Figura 4).

Duas linhagens do SARS-CoV-2 foram detectadas inicialmente nas primeiras amostras sequenciadas em Wuhan (linhagem A em 05-01-2020 e a linhagem B em 26-12-2019). As primeiras análises genômicas revelaram dois nucleotídeos conservados no clado A (posição 8782 na nsp4 da ORF1a e posição 28144 na ORF8) e sua relação com as linhagens de CoV mais próximas que infectam morcegos (*RaTG13* e *RmYN02*). Embora o clado B tenha sido detectado primeiro, não dispõe de nucleotídeos em ambas as posições, sugerindo que o clado A constitui o ramo mais antigo do SARS-CoV-2 (Rambaut *et al.*, 2020b).

Figura 4 - Reconstrução filogenética das primeiras linhagens do SARS-CoV-2



Fonte: Rambaut *et al.*, (2020a).

O fenótipo de um organismo é determinado pelo seu genótipo, bem como pelas influências ambientais sobre esses genes, e essas alterações podem refletir no comportamento do vírus em relação ao hospedeiro. Giovanetti *et al.* (2022a) descrevem que as causas relativas às mutações no genoma do SARS-CoV-2 estão relacionadas à recombinação com o material genético de outros vírus que coinfetam a mesma célula, indução por sistemas de modificação no RNA hospedeiro e replicação viral. Esses fatores contribuíram para que gerações subsequentes de linhagens fossem aptas a se ligar à proteína de superfície das células, que o vírus utiliza como receptor.

2.3.4 Variantes Emergentes

O processo de evolução e mutação do vírus resulta em novas variantes, que podem apresentar riscos para o hospedeiro humano, tornando crucial a avaliação de suas alterações fenotípicas, dispersão e impactos na saúde pública. À medida que uma variante se propaga por diferentes regiões do globo e infecta indivíduos em taxas significativas, ela se torna uma linhagem. Além dos processos de microevolução e pressões de seleção do vírus, que podem gerar mutações adicionais, resultando em distinções dentro de uma linhagem filogenética (GENOMAHCOV, 2022; WHO, 2021a).

O Grupo Técnico Consultivo sobre a Evolução do Vírus SARS-CoV-2 (*Technical Advisory Group on SARS-CoV-2 Virus Evolution – TAG-VE*) da OMS foi estabelecido com foco nas variantes do SARS-CoV-2, seu fenótipo e impactos nas medidas de saúde pública (WHO, 2021). Com o crescimento de variantes que representavam risco para saúde pública global, a OMS passou a caracterizá-las e dispor de nomenclaturas aderidas na comunidade científica para facilitar sua identificação e mitigar estigmas geográficos. As principais variantes monitoradas descritas nos quadros 3 e 4 foram classificadas pela OMS (WHO, 2021a):

- Variante de Interesse (*Variants of Interest - VOI*): Uma variante do SARS-CoV-2 com alterações genéticas previstas por afetar características como transmissibilidade, gravidade, escape imune, diagnóstico ou terapêutica; responsável pela transmissão comunitária significativa ou múltiplos casos de transmissão em vários países com prevalência relativa crescente, ou outros impactos epidemiológicos para sugerir risco emergente para saúde pública global.
- Variante de Preocupação (*Variants of Concern - VOC*): Uma variante de SARS-CoV-2 que atende à definição de VOI e que demonstre estar associada a uma ou mais das seguintes mudanças em grau de importância para a saúde pública: I) Aumento da transmissibilidade ou alteração prejudicial na epidemiologia da COVID-19; II) Aumento da virulência ou alteração da apresentação clínica da doença; III) Diminuição da eficácia das medidas sociais de saúde pública ou diagnósticos disponíveis, vacinas ou terapêuticas.

Quadro 3– Variantes de interesse (VOI) do SARS-COV-2

Rótulo OMS	Linhagem Pango	Mutações Monitoradas	País/Data designação
EPSILON	B.1.427 B.1.429	(L452R, D614G) na B.1.427;(S13I, W152C, L452R, D614G) na B.1.429 (Zhang <i>et al.</i> , 2021)	Estados Unidos, março de 2020; VOI:05-03-2021 VOI anterior: 06-07-2021
ZETA	P.2	(L18F, T20N, P26S, F157L, E484K, D614G, S929I e V1176F) na proteína S (GISAID, 2022)	Brasil, abril de 2020; VOI:17-03-2021 VOI anterior: 06-07-2021
ETA	B.1.525	Mutação E484K e F888L, no domínio S2, da proteína S (GISAID, 2022)	Vários países, dezembro 2020; VOI:17-03-2021 VOI anterior: 20-09-2021
THETA	P.3	(deleção 141-143, E484K N501Y e P681H) na proteína S (GISAID, 2022)	Filipinas, janeiro de 2021; VOI:24-03-2021 VOI anterior: 06-07-2021
LOTA	B.1.526	(E484K e S477N) na proteína S (GISAID, 2022)	Estados Unidos, novembro de 2020; VOI:24-03-2021 VOI anterior: 20-09-2021
KAPPA	B.1.617.1	(T95I, G142D, E154K, L452R, E484Q, D614G, P681R e Q1071H) na proteína S (GISAID, 2022)	Índia, outubro de 2020; VOI:04-04-2021 VOI anterior: 20-09-2021
LAMBDA	C.37	(G75V, T76I, Δ246252, L452Q, F490S, D614G, T859N) na proteína S (GISAID, 2022)	Peru, dezembro de 2020; VOI:14-06-2021 VOI anterior: 09-03-2022
MU	B.1.621	21 mutações, nove (T95I, Y144S, Y145N, R346K, E484K, N501Y, D614G, P681H e D950N) na proteína S (GISAID, 2022)	Colômbia, janeiro de 2021; VOI:30-08-2021 VOI anterior: 09-03-2022

Fonte: Adaptado de WHO, 2022

Quadro 4 - Variantes de Preocupação (VOC)

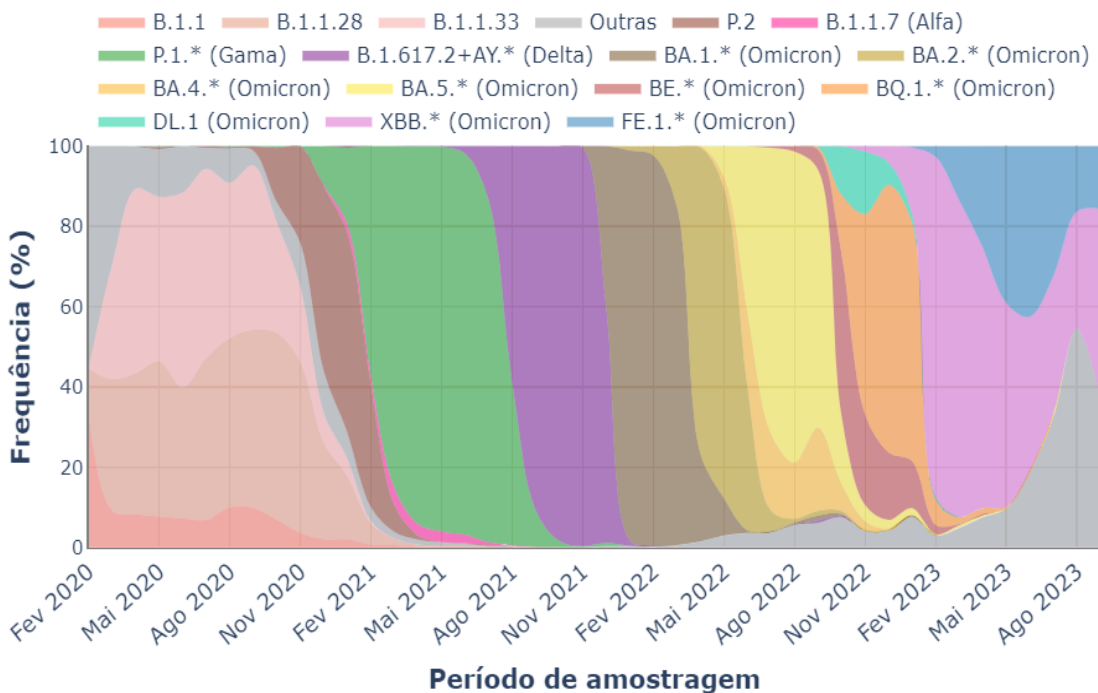
Rótulo OMS	Linhagem Pango	Mutações Monitoradas	País/Data designação
ÔMICRON*	B.1.1.529 *Sublinhagens (BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4 e BA.5); Recombinantes, XE, XD, BQ.1 e XBB (CDC, 2023; Chakraborty <i>et al.</i> , 2022)	S1/RBD e S2 (A67V, T95I, G142D, G33D, S371L, S373P, S37F, K417N, N440K, G44S, S477N, T478K, E484A, Q493K, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F); deleções e uma inserção (Δ 67-70, Δ 143-145, Δ 211-212, ins214EPE) (Vaughan, 2021)	Vários países; Novembro, 2021 VUM: 24-11-2021 VOC: 26-11-2021
ALFA	B.1.1.7	17 mutações em seu genoma (deleção Δ 69-70, deleção Δ 144, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H) na proteína S (Cascella <i>et al.</i> , 2022)	Reino Unido, setembro 2020; VOC: 18-12-2020 VOC anterior: 09-03-2022
BETA	B.1.351	Proteína S (L18F, D80A, D215G, LAL 242-244 del, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G e A701V), Envelope (P71L), ORF1a (K1655N), N (T205I) (Tegally, 2021; Freitas, 2021)	Africa do Sul, maio 2020; VOC: 18-12-2020 VOC anterior: 09-03-2022
GAMMA	P.1	35 substituições de aminoácidos, com 10 na proteína S (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y e T1027I) (Faria <i>et al.</i> , 2021)	Brasil, novembro 2020; VOC: 11-01-2021; VOC anterior: 09-03-2022
DELTA	B.1.617.2	Mutações na proteína S (T19R, (V70F*, T95I, G142D, E156-, F157-, R158G, (A222V*), (W258L*), (K417N*), L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) (CDC, 2023)	Índia, outubro 2020; VOC: 11-05-2021; VOC anterior: 07-06-2022

Fonte: Adaptado de WHO, 2022.

2.3.5 Epidemiologia global e cenário brasileiro

Desde o sequenciamento do primeiro genoma do SARS-CoV-2, esforços internacionais permitiram que sequências genômicas fossem armazenadas no banco de dados da Iniciativa Global de compartilhamento de todos os dados da Influenza (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data - GISAID*). Até junho de 2023, um total de 15.759.242 sequências de genomas do SARS-CoV-2 foram disponibilizadas. As linhagens A e B, detectadas inicialmente em Wuhan, se espalharam por todo o território chinês e por outras regiões do mundo. No início da pandemia, as linhagens descendentes do clado B eram predominantes, principalmente na região europeia, devido a mutações que aumentaram a disseminação viral. Em fevereiro de 2020, as linhagens B.1 e B.1.1 foram relatadas como cepas prevalentes na Itália (GENOMCOV, 2023; GISAID, 2023; WHO, 2020a). A América Latina, e especialmente o Brasil, tornou-se um epicentro da pandemia, apresentando altos índices de morbidade e mortalidade relacionados à doença. Durante a pandemia, à medida que novos genomas eram sequenciados no país, houve uma mudança no cenário epidemiológico das variantes emergentes do SARS-CoV-2 (Figura 5).

Figura 5 - Circulação das principais linhagens do SARS-CoV-2 por período de amostragem



Fonte: GENOMAHCOV, 2023.

Segundo Paiva *et al.* (2020), inicialmente, as linhagens derivadas do clado B, como B.1.1.28 e B.1.1.33, foram responsáveis pelo aumento da disseminação viral. A linhagem B.1.1.33 representou 33% das amostras coletadas até abril de 2020 em alguns estados brasileiros, como Rio de Janeiro, Pernambuco, Pará e Sergipe (Resende *et al.*, 2021; Dos Santos *et al.*, 2021).

Uma pesquisa conduzida por Candido *et al.* (2020) sequenciou 490 genomas, dos quais 99% das amostras eram descendentes do clado B. Os resultados mostraram três cladogramas emergentes durante o período analisado: clado 1, concentrado no estado de São Paulo; clado 2, disseminado por 16 estados, contribuindo para a transmissão local; e clado 3, centrado no Ceará. Os resultados também indicaram que as variantes detectadas no Brasil se alternaram com cepas introduzidas de outros países (Giovanetti *et al.*, 2022a).

O Brasil enfrentou um cenário epidemiológico conturbado com o crescimento da segunda onda de casos e óbitos no final de 2020, decorrente do afrouxamento das medidas de restrição, que atingiu seu ápice em março do ano seguinte. As variantes Gamma e Zeta, ambas derivadas de B.1.1.28, foram detectadas e foram responsáveis por 75% das amostras sequenciadas em fevereiro de 2021 (GENOMAHCOV, 2022). A variante Zeta foi identificada em outubro de 2020 e se disseminou em todas as regiões do país, especialmente no Sul e Sudeste. A variante Gamma foi responsável por 96% dos casos notificados no primeiro semestre de 2021, com múltiplas introduções da cepa em diferentes estados. Os autores concluíram que indivíduos que residiam nas regiões Norte e Sudeste atuaram como propagadores da variante para outras regiões (Giovanetti *et al.*, 2022a).

A variante Delta foi detectada em julho de 2021 e apresentou uma capacidade de infecção peculiar em relação a outras cepas que circulavam anteriormente no território brasileiro. Silva *et al.* (2022), observaram que, 16 semanas após sua detecção, a variante ultrapassou a Gamma em número de casos confirmados e, até agosto de 2021, foi responsável por até 60% das infecções pelo patógeno no país. Em outubro de 2021, a variante Delta foi sequenciada em 90% das amostras, e sua rápida disseminação não resultou em um aumento proporcional de infecções e óbitos, como observado em outros países. Esses achados foram associados à introdução da vacinação em massa na população brasileira e à imunidade natural adquirida após infecção prévia com a variante Gamma (Giovanetti *et al.*, 2022b).

A variante Ômicron foi detectada em 2021 e atingiu altos níveis de evasão imune na população brasileira. Inicialmente, a sublinhagem BA.1 era responsável pelo maior número de casos, e subsequentemente a BA.2 se disseminou rapidamente a partir de janeiro de 2022. As linhagens BA.4 e BA.5 foram detectadas em amostras coletadas na África do Sul e outros países, juntamente com outras subvariantes/sublinhagens de Ômicron, principalmente BA.2.11 e BA.2.12.1. Duas subvariantes recombinantes (BQ.1 e XBB) foram detectadas circulando na região europeia, China e EUA. No Brasil, a BQ.1 foi detectada no Rio Grande do Sul e elevou o número de casos confirmados. O primeiro óbito pela BQ.1 no Brasil foi registado em São Paulo (Yamasoba *et al.*, 2022; Brasil, 2022a).

As variantes Alfa, Beta, Gamma e Delta, que foram previamente classificadas como VOC, apresentaram um declínio significativo em sua circulação e passaram a ser classificadas pela OMS como variantes de preocupação previamente circulantes. Já a variante Ômicron e suas subvariantes são consideradas “variantes de preocupação atualmente circulantes” (WHO, 2022; Brasil, 2022a).

No Brasil, as derivadas de Ômicron XBB.x (incluindo a XBB.1.5) e a FE.1, foram as principais cepas sequenciadas no Brasil em setembro. Observa-se também uma redução significativa de sequenciamentos realizados no país. No dia 5 de maio de 2023, a OMS decretou o fim da ESPII da COVID-19, justificado pela redução das hospitalizações e internações em unidades de terapia intensiva relacionadas à doença, bem como os altos níveis de imunidade da população (Brasil, 2023; Genomacov, 2023).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a introdução e circulação das variantes emergentes do SARS-CoV-2 em cinco cidades do Brasil, por meio de um estudo de vigilância genômica.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever o perfil demográfico de indivíduos positivos pela infecção do SARS-CoV-2 em cinco cidades do Brasil;
- Obter genomas completos do SARS-CoV-2 a partir de amostras positivas pela infecção do patógeno viral;
- Realizar análises filogenéticas de alta verossimilhança em genomas de SARS-CoV-2, a fim de compreender os padrões geográficos e temporais das variantes emergentes ao nível local e regional;
- Discutir o impacto das Variantes de Preocupação (VOC) em relação a outras linhagens do SARS-CoV-2 em termos de transmissão, sintomas clínicos e evasão imunológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

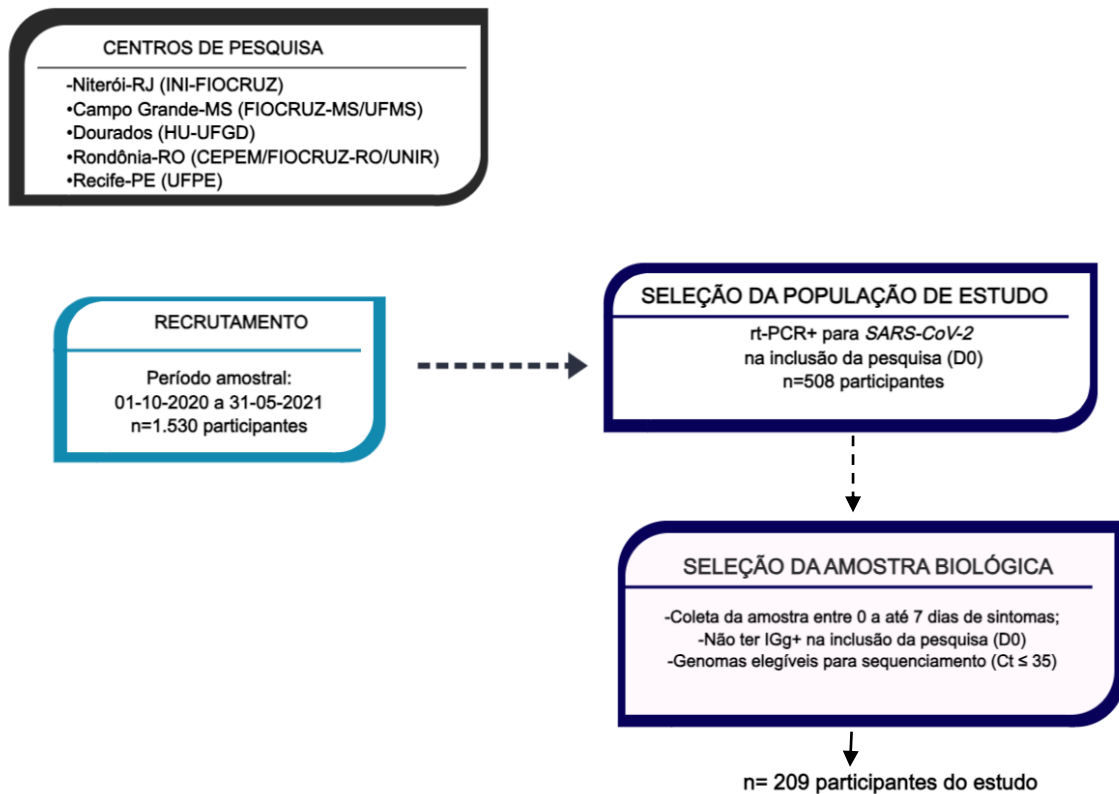
Esta pesquisa é descritiva, analítica, observacional, de corte transversal, com dados primários submetidos a técnicas laboratoriais. A presente investigação faz parte do “Estudo Multicêntrico da História Natural do novo Coronavírus SARS-CoV-2 no Brasil” (REBRACOVID).

4.1 População e amostra

O estudo ocorreu em Centros de Pesquisa, integrados a Rede de Pesquisa Clínica e Aplicada de Chikungunya (REPLICK), que abrangem as 5 regiões geográficas do Brasil. Nesta pesquisa, a infraestrutura de recursos físicos e humanos do REBRACOVID de cinco cidades brasileiras foi utilizada. A pesquisadora responsável conduziu uma série de etapas, que incluíram a abordagem e recrutamento de participantes, coleta e registro de dados em documento fonte, gerenciamento de fluxo de participantes, coleta, identificação, gerenciamento e processamento de amostras biológicas.

Foram recrutados indivíduos com síndrome gripal (caracterizada pela presença de febre e sintomas respiratórios) juntamente com seus contatos domiciliares. Todos os participantes que concordaram e consentiram em participar da pesquisa foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial. Após o diagnóstico de SARS-CoV-2, os participantes foram acompanhados pelos centros recrutadores, conforme o protocolo estabelecido no REBRACOVID (ANEXO A). A seleção da população do estudo foi realizada por meio de uma amostragem não probabilística, por conveniência, a partir dos critérios de seleção descritos na “Figura 6”.

Figura 6 - Fluxograma de seleção da população de estudo.



4.2 Aspectos Éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob parecer nº4.383.724, CAAE 32874720.8.2001.0021.

4.3 Recrutamento e Coleta de dados

Os participantes foram recrutados através de testagens drive-Tru, mídias sociais e lista dos casos suspeitos de SARS-CoV-2, disponibilizados pela vigilância epidemiológica do município. A inclusão e seguimento dos participantes ocorreram em âmbito domiciliar. Foram registrados dados sociodemográficos e história clínica, e coleta de amostras biológicas que foram transportadas para os laboratórios de referência de cada centro recrutador.

Os participantes foram submetidos a coleta de amostras biológicas, que

envolveu a obtenção de uma amostra bilateral com swab nasofaríngeo, posteriormente alicotadas, transferidas para criotubos de poliestireno (identificados com o nome do participante, número do registro, data da coleta e identificação do profissional que realizou o procedimento), e armazenadas em freezer - 80° C, com o propósito de realizar os testes moleculares.

Foram coletados 42 mL de sangue venoso após procedimento de assepsia, por punção em veia periférica, e centrifugadas em temperatura ambiente a 3000 rpm, por 5 -10 minutos, conforme o protocolo clínico. Após centrifugação o soro foi transferido para criotubos de poliestireno (identificados com as iniciais do participante, número do registro e data da coleta), que foram armazenados em freezer a -20° C, para a realização dos ensaios sorológicos.

4.2.1 Critérios de elegibilidade

Foram incluídos indivíduos com 18 anos ou mais, com infecção de SARS-CoV-2 confirmada laboratorialmente. Os indivíduos que não tinham disponibilidade para receber visitas programadas, com transtornos mentais graves, dificuldade de comunicação ou que não permitiam a coleta de informações, não foram incluídos na pesquisa.

4.4 Análise laboratorial

4.4.1 Ensaio Sorológico

A análise dos anticorpos totais presentes no soro foi realizada na Unidade de Apoio e Diagnóstico de COVID-19 (UNADIG-RJ), utilizado o ensaio SARS-CoV-2 IgG II Quant, imunoenensaio de micropartículas quimioluminescente (CMIA). Este ensaio foi utilizado para determinar qualitativamente e quantitativamente a imunoglobulina G (IgG) do SARS-CoV-2, medindo quantitativamente anticorpos IgG contra o domínio de ligação do receptor da proteína spike (RBD) do SARS-CoV-2 pelos sistemas Alinity e ARCHITECT i, conforme as instruções do fabricante.

4.4.2 Biologia Molecular

As amostras foram submetidas a extração de RNA total utilizando kits comerciais (ReliaPrep Viral TNA Miniprep AX4820, Promega e/ou QIAamp Viral RNA Mini Kit 52906, Qiagen), segundo as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram submetidas a detecção qualitativa do RNA viral (SARS-CoV-2) por meio da amplificação por RT-qPCR

(PCR em tempo real/one step) da região do genoma viral conhecida como nucleocapsídeo (N), padronizada pelo CDC, seguindo as instruções do protocolo 2019-nCoV EUA-01. Para isso o RNA extraído e purificado, foi transcrito em cDNA e subsequentemente amplificado por RT-qPCR utilizando o mix GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR Systems, Promega, e primers e sondas específicas (IDT). As reações de RT-qPCR foram realizadas no termociclador QuantStudio 6 Pro (Applied Biosystems).

As amostras foram cedidas para análise dos marcadores de replicação viral com base no valor do ciclo limiar (*Cycle Threshold* - Ct), para avaliar se níveis elevados de carga viral estão associados a maior transmissibilidade (considerando a relação inversa utilizada na prática clínica, Ct baixo = carga viral elevada) (Brasil, 2021a).

4.2.3 Análise filogenética

As amostras de RNA total positivas para SARS-CoV-2 foram cedidas ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ-RJ), para o sequenciamento dos genomas completos. A análise da linhagem foi conduzida utilizando o software Pangolin lineage classification (Rambaut *et al.*, 2020a). Neste estudo, foram avaliados 209 isolados recém-identificados, comparando-os com um conjunto diversificado de sequências genômicas (n=3.326) coletadas de diversas regiões do mundo até 15 de dezembro de 2021. Para garantir a qualidade das sequências genômicas utilizadas, somente foram considerados genomas com tamanho superior a 29.000 pares de bases (pb) e com menos de 1% de ambiguidades. Essa seleção assegura uma maior precisão filogenética nos resultados obtidos.

O alinhamento das sequências foi realizado utilizando a ferramenta ViralMSA (Moshiri, 2021; Minh *et al.*, 2020), enquanto análise filogenética foi conduzida com o IQ-TREE2 versão 12, utilizando a abordagem de máxima verossimilhança (Minh *et al.*,

2020). Posteriormente, a topologia da árvore de máxima verossimilhança foi transformada em uma árvore datada utilizando o software TreeTime (Sagulenko, 2018). Para esse processo, utilizou-se uma taxa média constante de $8,0 \times 10^{-4}$ substituições de nucleotídeos por ano. Além disso, sequências atípicas foram excluídas do conjunto de dados para garantir resultados mais confiáveis.

4.3 Processamento e análise dos dados

Os dados foram coletados e armazenados na plataforma de gerenciamento de dados REDCap® (*Research Electronic Data Capture*). Foram consideradas as variáveis dependentes (cidade, sexo, faixa etária, raça/cor da pele, sinais e sintomas) e independentes (Ct valor e IgG). O processamento e análise dos dados foram realizados em programas estatísticos R 4.1.2 e R Studio 2021.09.1-372, por meio de estatísticas descritivas simples, estratificadas pela mediana.

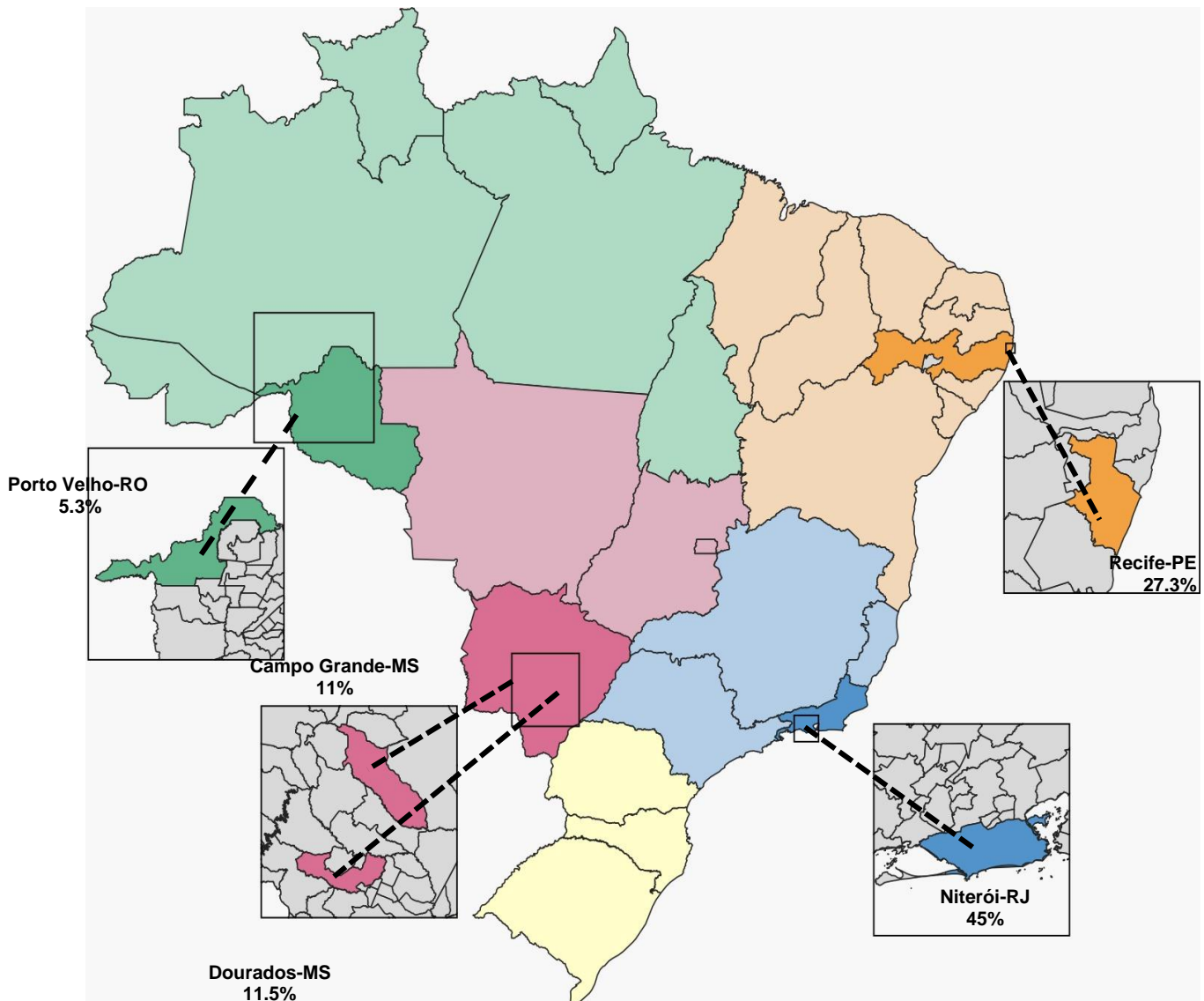
As prevalências das variáveis foram calculadas com intervalo de confiança de 95%. Para testar as hipóteses, foi utilizado o teste qui-quadrado de Person, para comparar as variáveis categóricas, e se eram divergentes entre si; e o teste de Wilcoxon, para comparações entre os dois agrupamentos. O coeficiente de correlação linear de Pearson, foi utilizado para verificar o grau de correlação entre duas variáveis da escala métrica (-1 e 1). O sinal indica a direção da correlação, negativa ou positiva, e a relação com seu valor de magnitude (quanto mais próximo de 1, maior a associação linear entre as variáveis; quanto mais perto de 0, menor o nível de adesão) (Paranhos *et al.*, 2014).

5 RESULTADOS

5.1 Características da população estudada

Foram obtidas 209 sequências de genomas completos de amostras positivas de SARS-CoV-2 para esta pesquisa, que abrangeu o período de outubro de 2020 a maio de 2021. Essas amostras foram provenientes de 5 cidades brasileiras (Niterói-RJ, n=94; Recife-PE, n=57; Dourados-MS, n=24; Campo Grande-MS, n=23; Porto Velho-RO, n=11), correspondendo a quatro das cinco regiões do país (Figura 7).

Figura 7 – Localização geográfica da população de estudo de cinco Centros de Pesquisa vinculados a REPLICK, Brasil 2021-2022.



Foram sequenciadas amostras de indivíduos do sexo feminino (n=117) e do sexo masculino (n=92), com idade média de $39,8 \pm 13,5$ anos (variação: 18 a 77 anos). A tabela 1 apresenta as características sociodemográficas, estratificadas por VOC e outras linhagens. A maioria da população era do sexo feminino (56%), e da raça branca (52%). As cidades de Niterói e Recife, corresponderam a maioria das amostras deste estudo, 45% e 27,3% respectivamente.

Tabela 1 Dados sociodemográficos de indivíduos positivos para SARS-COV-2, Brasil. Dados originais seguidos pelo p-valor; medidas da mesma coluna que não se diferem entre si estatisticamente pelo teste qui-quadrado Person.

VARIÁVEL	Participantes do estudo	VOC (Delta + Gamma)	Outras linhagens	p-valor
	n (%)	n (%)	n (%)	
Sexo				
Masculino	92(44)	19 (41,3)	73 (44)	0,80
Feminino	117(56)	27 (58,7)	90 (55,2)	
Raça/Cor da pele				
Branca	109 (52,2)	21 (45,7)	88 (54)	0,41
Parda	72(34,4)	18(39,1)	54(33,1)	
Preta	19(9,1)	3(6,5)	18(9,8)	
Asiático	7(3,3)	3(6,5)	4(2,5)	
Indígena	2(1)	1(2,2)	1(0,6)	

Tabela 1- Continuação

Idade (anos)				
18-29	57 (27,3)	14 (30,4)	43 (26,4)	
30-39	57 (27,3)	11 (23,9)	46 (28,2)	
40-49	43 (20,6)	10 (21,7)	33 (20,2)	0,96
Cidade	209 (100)	46 (22)	163 (78)	
Niterói	94 (45)	9 (19,6)	85 (52,1)	
Recife	57 (27,3)	18(39,1)	39 (23,9)	<0,001
Dourados	24 (11,5)	0 (0)	24 (14,7)	
Campo Grande	23 (11)	18 (39,1)	5 (3,1)	
Porto Velho	11 (5,3)	1 (2,2)	10 (6,1)	

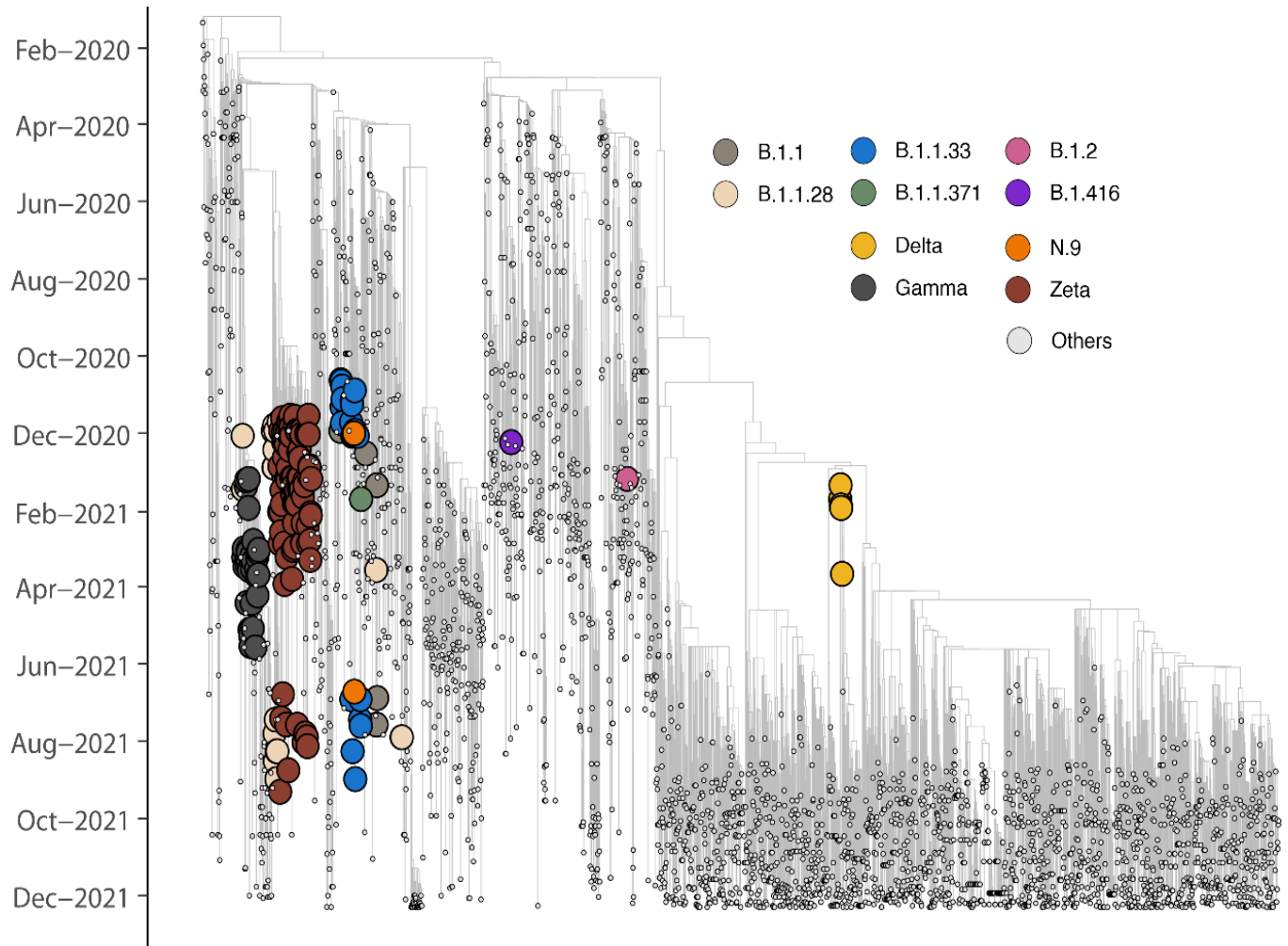
5.2 Linhagens do SARS-CoV-2 identificadas na população do estudo

Para compreender a dinâmica de disseminação das linhagens de SARS-CoV-2 através da análise filodinâmica, combinamos dados que abrangem isolados recém-identificados (n=209) do presente estudo, mais 3.326 genomas representativos de SARS-CoV-2, coletados em todo mundo até 15 de dezembro de 2021 para representar a frequência das variantes, por meio de uma árvore datada. Os novos genomas obtidos estão representados de acordo com sua classificação e linhagem.

A árvore de máxima verossimilhança mostrou uma diversidade evolutiva de sequências do SARS-CoV-2. Foram detectadas 13 variantes do SARS-CoV-2, que foram distribuídas de acordo com sua atribuição e linhagem. As linhagens sequenciadas foram introduzidas de outros países, sobretudo do continente europeu, e cepas que evoluíram de uma ancestral comum no Brasil, mas de forma independente foram disseminadas durante o período amostral. A filogenia datada indica múltiplos eventos de introdução, e reintrodução de variantes emergentes nas

diferentes cidades estudadas durante o período amostral (Figura 8).

Figura 8 - Reconstrução Filogenética. Árvore filogenética incluindo os novos isolados SARS-CoV-2 (n=209) obtidos neste estudo e 3326 genomas representativos até 15 de dezembro de 2021. Árvore filogenética datada, e a legenda da cor está à esquerda da árvore.



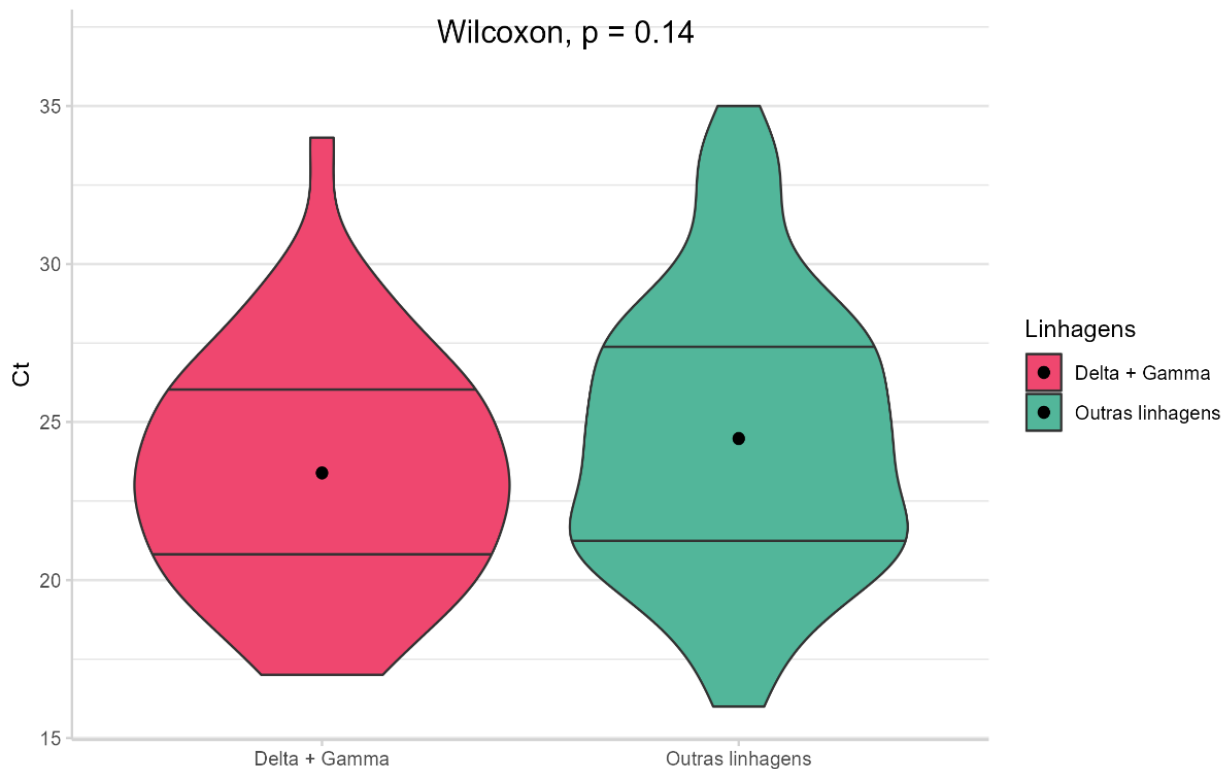
A variante Zeta ou P.2, foi a cepa prevalente (n= 97; 46,4%) entre a população do estudo, seguida pela variante Gamma/P.1 (n=46;22%), e B.1.1.33 (n=24;11,4%). A árvore filogenética indica que inicialmente, as amostras foram determinadas pela circulação das linhagens B.1.1.33 e B.1.1.28, e posteriormente, substituídas pelas variantes Zeta e Gamma, que evoluíram de sua linhagem ancestral (B.1.1.28). A variante Zeta foi a cepa predominante entre as amostras sequenciadas, enquanto a variante Gamma foi detectada posteriormente e apresentou maior circulação nos meses subsequentes, de acordo com o relógio molecular. Outras linhagens foram detectadas, mas com menor frequência na população de estudo.

5.3 Infecção pelo SARS-CoV-2

Neste estudo, foram coletados dados das manifestações clínicas, valores de Ct e sorologia para comparar a frequência dessas variáveis em indivíduos acometidos pelas VOC em relação a outras linhagens do SARS-CoV-2, em termos de transmissibilidade, sintomas clínicos e escape imunológico.

Os valores de Ct variaram de 16 a 35, com uma média de 24. Para fins de análise paramétrica, analisamos se indivíduos afetados pelas VOC apresentaram uma carga viral mais elevada em comparação com outras linhagem circulante. As medidas não se diferiram estatisticamente pelo teste de Wilcoxon entre os grupos avaliados (VOC-mediana 23; variação interquartil (IQR) 20,25-26) (outras linhagens - mediana 24; IQR 21-27) ($p = 0,14$), conforme representado pela “Figura 9”.

Figura 9 – Valor de Ct de indivíduos com SARS-CoV-2, coletados na D0 com <7 dias de sintomas, entre outubro de 2020 a maio de 2021

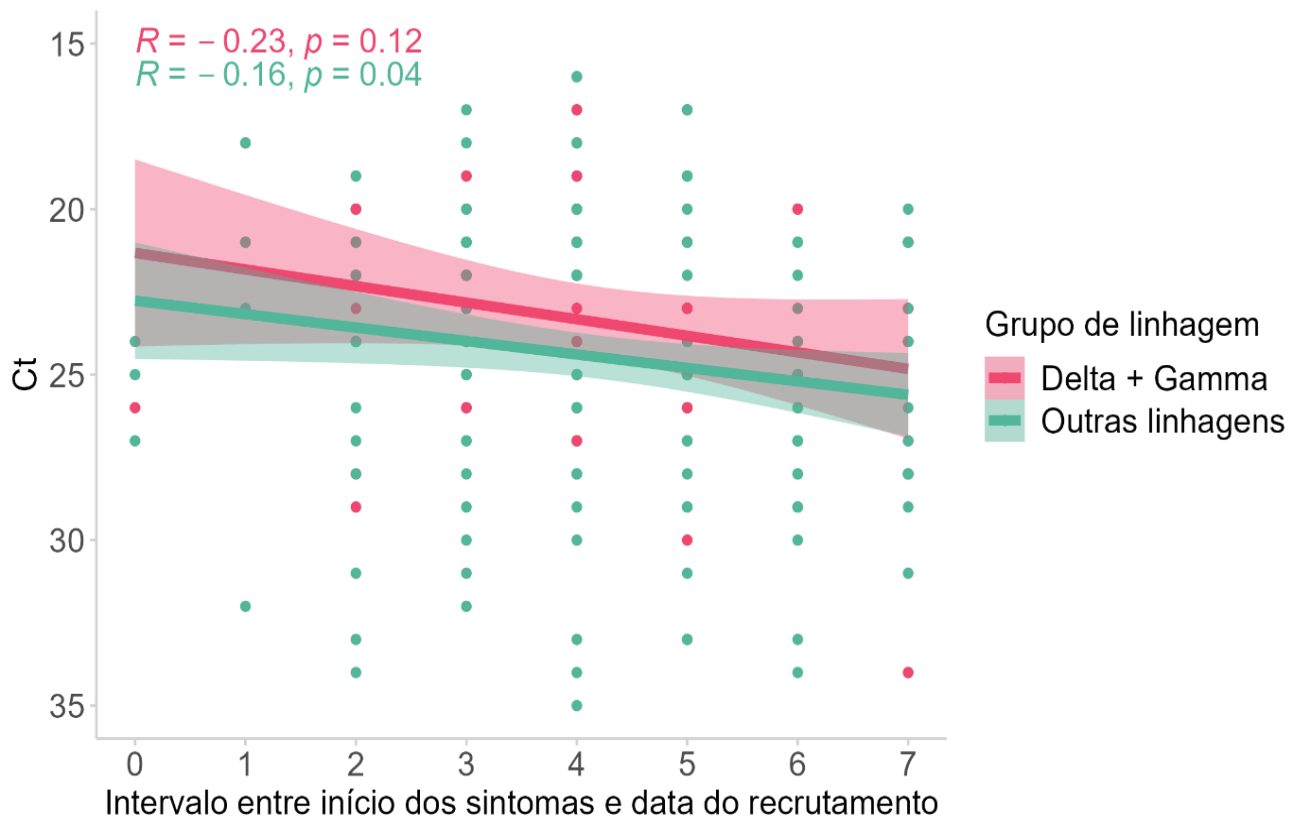


Ct: threshold cycle.

O modelo de regressão linear na figura 10, foi utilizado para uma análise aprofundada dos valores de Ct, tendo em vista o início das manifestações clínicas relatadas e o dia de coleta do material biológico. Os resultados mostraram um aumento significativo do valor de Ct entre o primeiro e sétimo dia de sintomas.

A escala métrica entre os grupos foi baixa, e as medidas se diferiram estatisticamente (VOC $R=-0,34$; outras linhagens $R=-0,19$) e ($p=0,04$), sugerindo que indivíduos afetados pelas VOC apresentaram valores de Ct menores do que outras linhagens, o que resulta numa maior carga e disseminação de vírus.

Figura 10 - Intervalo entre sintomas até a data de inclusão (D0), onde foi coletada a amostra biológica de indivíduos com SARS-CoV-2 entre outubro de 2020 a maio de 2021. Dados originais e p-valor.



A maioria dos participantes relatou cefaleia (80,9%) e tosse (70,3%). A fadiga, mialgia e artralgia ($p=0,03$, $p=0,01$ e $p=0,01$, respectivamente) são distintas entre os grupos amostrais, sendo esses sintomas mais frequentes em indivíduos infectados por outras linhagens do SARS-CoV-2 (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição de sintomas clínicos relatados por indivíduos acometidos pelo SARS-COV-2 de acordo com os grupos Brasil. Dados originais seguidos pelo p-valor.

Sinais e sintomas	VOC (Delta + Gamma)	Outras linhagens	Participantes do estudo	p-value
	n (%)	n (%)	n (%)	
Cefaleia	169 (80,9)	35 (76,1)	134 (82,2)	0,47
Tosse	147 (70,3)	28 (60,9)	119 (73)	0,15
Fadiga	139 (66,5)	24 (52,2)	115 (70,6)	0,03
Mialgia	133 (63,6)	21 (45,7)	112 (68,7)	0,01
Congestão nasal	131 (62,7)	24 (52,2)	107 (65,6)	0,13
Anosmia	121 (57,9)	26 (56,5)	95 (58,3)	0,96
Febre	120 (57,4)	27 (58,7)	93(57,1)	0,97
Amigdalite	114 (54,5)	27 (58,7)	87 (53,4)	0,63
Disgeusia	107 (51,2)	22 (47,8)	85 (52,1)	0,72
Sonolência	103 (49,3)	19 (41,3)	84 (51,5)	0,29
Anorexia	78 (37,3)	16 (34,8)	62 (38)	0,81
Diarreia	72 (34,4)	14 (22,6)	58 (35,6)	0,63
Artralgia	57 (27,3)	5(10,9)	52 (31,9)	0,01
Dispneia	51 (24,4)	9 (19,6)	42 (25,8)	0,50
Vômito/Náusea	51 (24,4)	11 (23,9)	40 (24,5)	1
Dor torácica	39 (18,7)	7 (15,2)	32 (19,6)	0,64
Sibilos	18 (8,6)	1 (2,2)	17 (10,4)	0,14

A soroconversão foi examinada por meio da pesquisa de IgG (figura 11), utilizando amostras da segunda visita de acompanhamento (D14) do protocolo clínico, que ocorre em média 15 dias após o início das manifestações clínicas. Os dados demonstraram que houve soroconversão em 36% (n=75) das amostras. Os indivíduos infectados pelas VOCs, soroconverteram em menor proporção (IgG Delta + Gamma = 313,8; IQR 133,7-518,3) (Outras linhagens = 579,2; IQR 188,6-1121,1), mas sem diferença significativa (p= 0,11).

Figura 11 – Sorologia de indivíduos com SARS-CoV-2 entre outubro de 2020 a maio de 2021. Dados originais e p-valor.



6 DISCUSSÃO

O estudo teve como objetivo conduzir uma investigação sobre a vigilância genômica do vírus SARS-CoV-2, durante a primeira e segunda onda pandêmica em cinco cidades brasileiras.

Foram sequenciados novos genomas do SARS-CoV-2, que foram classificados posteriormente em 13 linhagens. As análises filogenéticas revelaram múltiplos eventos de introdução e reintrodução das cepas circulantes. As amostras sequenciadas eram provenientes de indivíduos que residiam em quatro regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste). De acordo com Nicoletti *et al.* (2021), a disseminação do vírus no país ocorreu de forma multifatorial, por diferentes rotas de transmissão ao longo do território. No início da pandemia, as rodovias e os centros urbanos, especialmente aqueles conectados com a região Sudeste, foram citados como as principais fontes de disseminação inter-regional do vírus, uma vez que são altamente conectados aos fluxos globais (Candido *et al.*, 2020; DIRUR, 2020).

Até a Semana Epidemiológica 21 de 2021, período que compreende o fim do recrutamento, a região Sudeste obteve um dos maiores índices de casos confirmados, e o estado do Rio de Janeiro apresentou um dos maiores índices de óbitos pela doença. O Rio de Janeiro, foi a cidade com maior quantidade de genomas sequenciados (45%) (Brasil, 2022a).

A região Centro-Oeste, considerada uma das regiões menos populosas do território brasileiro apresentou taxas de incidência elevadas, e o estado de Mato Grosso do Sul obteve a maior taxa de incidência e mortalidade pela doença. A região Norte apresentou taxas de morbimortalidade significativas, decorrente da detecção da variante emergente (P.1 ou Gamma) que culminou em impactos significativos na saúde pública. As regiões Norte, Sudeste e Nordeste foram responsáveis por disseminar a circulação da variante Gamma para outras regiões do país em janeiro de 2021 (Brasil, 2022a; Giovanetti *et al.*, 2022a).

Os resultados revelaram que as VOC não foram prevalentes no recrutamento (22%), dado divergente com boletins epidemiológicos, onde foi observado aumento nas taxas de incidência, internação e óbitos pelo SARS-CoV-2 em regiões que englobam as cidades desta pesquisa. Esses achados reforçam o impacto das variantes circulavam no Brasil durante o período amostral (Brasil, 2021b; FIOCRUZ,

2022; PAHO, 2020).

A árvore filogenética reflete uma mudança no perfil genômico das linhagens do SARS-CoV-2, o que corrobora com outros genomas identificados no país (GENOMAHCOV, 2022; Giovanetti *et al.*, 2022a; Paiva *et al.*, 2020). Os resultados indicam a ocorrência de múltiplos eventos de introdução e reintrodução dessas linhagens entre as diferentes cidades, associados às características fenotípicas do SARS-CoV-2, que aumentou sua transmissão e disseminação (Lan *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

Este período foi demarcado pelo término do primeiro e início do segundo pico pandêmico, com a introdução variantes emergentes do SARS-CoV-2 recém identificadas, que evoluíram da mesma linhagem ancestral, mas de forma independente e abrigou mutações (L452R, E484K, N501Y, P681H/R) selecionadas positivamente. Dessa forma, podem proporcionar vantagens adaptativas que levam à evolução convergente em diferentes linhagens, se espalhando pelo território brasileiro e outros países, o que teve um grande impacto na morbidade e mortalidade (Faria *et al.*, 2021; Martin *et al.*, 2021; Rambaut *et al.*, 2020b; Tegally *et al.*, 2021).

As variantes Gamma e Zeta foram as cepas prevalentes na população do estudo, corroborando com os dados da Fiocruz (2021). Em fevereiro de 2021, com o aumento do sequenciamento genômico no país, essas variantes representaram cerca de 75% dos genomas sequenciados. A variante Zeta foi detectada pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro, e classificada como VOI devido à sua capacidade de causar reinfecção, e abrigar mutações na proteína Spike que reduzem a neutralização por tratamentos com anticorpos e soros vacinais (Giovanetti *et al.*, 2022a; GISAID, 2022). A prevalência da variante Zeta foi superada pela introdução da Gamma/P.1 no país em novembro de 2020, na cidade de Manaus, região norte. Essa variante se espalhou para as demais regiões e foi responsável por 96% dos casos notificados no primeiro semestre do ano em curso (FIOCRUZ, 2022).

A variante Gamma possui mutações relevantes fenotipicamente adquiridas independentemente de outras cepas circulantes (K417T, E484K, N501Y), o que aumentou sua transmissão em 50% (Faria *et al.*, 2021). A mutação E484K aumentou a afinidade da proteína Spike com a ECA-2, alterando a carga na região de loop flexível do RBD e sugerindo um potencial de aumento na transmissão e reinfecção em pacientes convalescentes (Nelson *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2021).

A Rede Genômica da Fiocruz (2022) revela que a variante Delta foi detectada circulando no país em abril de 2021, mas começou a apresentar maior incidência nos meses seguintes. Essa variante abriga mutações singulares (P681R e L452R), e foram associadas a uma maior infecciosidade do patógeno. A proteína Spike é associada à capacidade de entrada do patógeno em células hospedeiras com baixos níveis do receptor (Callaway, 2021; Liu *et al.*, 2022).

A maioria dos participantes apresentou a forma leve da doença, possivelmente associada ao local e ao recrutamento precoce realizado em ambientes designados para atendimento de indivíduos com quadros iniciais de sintomas respiratórios. As VOC apresentaram um valor de Ct menor em comparação com outras linhagens, indicando uma carga viral elevada, embora sem significância estatística entre os grupos. Resultados semelhantes foram encontrados em uma triagem das variantes do SARS-CoV-2, embora com alguma variabilidade nessas descobertas (Antoneli *et al.*, 2021; Barek *et al.*, 2020). Um estudo adicional relata que o valor de Ct da variante Delta foi significativamente inferior quando comparado a outras VOC circulantes (Alfa e Gamma) para os três marcadores do SARS-CoV-2 avaliados (Hubler, 2022).

As evidências que avaliam os fatores associados a uma maior transmissão viral das VOC ainda estão em estudo pela comunidade científica. Faria *et al.* (2021), utilizaram um modelo dinâmico que integra dados de genotipagem e mortalidade e estimaram que a variante Gamma pode ser de 1,7 a 2,4 vezes mais transmissível do que outras linhagens. Com relação à variante Delta, dados epidemiológicos estimam que ela é pelo menos 40% mais transmissível do que a variante Alfa (Callaway, 2021).

As mutações que alteraram as características fenotípicas do genoma viral foram associadas a um aumento na propagação viral e a infecção em um curto período de incubação, além de cargas virais elevadas (Callaway, 2021; Liu *et al.*, 2022). Outras pesquisas também revelaram um valor de Ct baixo entre indivíduos infectados com a variante Delta e outras VOC, com diferença significativa no valor de Ct da Delta em comparação com outros clados (Kim *et al.*, 2021).

Neste estudo, três sintomas (fadiga, mialgia e artralgia) foram significativamente prevalentes em indivíduos afetados por outras linhagens, em consonância com a literatura. Os sintomas mais relatados correspondem aos sintomas associados à COVID-19, de acordo com a OMS (WHO, 2021b). Resultados semelhantes foram observados em uma coorte realizada por Antoneli *et al.* (2021), na

qual dor de cabeça e fadiga foram os sintomas mais relatados. Em uma meta-análise realizada por Barek *et al.* (2020), os sintomas corroboraram com os do presente estudo, embora com uma diversidade na proporção em que foram relatados. Esses achados reforçam que a circulação das variantes emergentes do SARS-CoV-2 causou impactos relevantes na clínica e na epidemiologia ao longo da pandemia.

As análises revelaram que os participantes afetados pelas VOC não soroconverteram significativamente, comparado com outras linhagens. O conjunto de mutações presentes no genoma da variante Gamma foi associado à redução da neutralização de anticorpos no soro de camundongos imunizados com o RBD da cepa original do SARS-CoV-2, e em pacientes em tratamento com plasma convalescente (Vogel *et al.*, 2021).

A mutação E484K reduziu a afinidade dos anticorpos neutralizantes em relação ao RBD viral, e a presença de deleções na região NTD alterou a ligação dos anticorpos neutralizantes nessa região, sugerindo um possível mecanismo de escape imunológico (Wang *et al.* (2021; Wu *et al.*, 2021). A variante Delta também apresentou duas mutações novas, previamente descritas, que foram relacionadas a uma redução no potencial de neutralização pelos anticorpos (Callaway, 2021; Kumar *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022).

A complexidade das variantes do SARS-CoV-2, evidenciam os desafios em reforçar a capacidade de detecção oportuna, com ampliação e fortalecimento da vigilância genômica, epidemiológica, vigilância laboratorial e comunicação rápida, com desenvolvimento de pesquisas em saúde que possam apoiar as medidas de prevenção e controle da COVID-19 (Sallas *et al.*, 2021).

6.1 Limitações do estudo

Alguns fatores, como seleção da população do estudo, podem implicar em viés ao estimar a frequência de variantes em uma determinada população. A metodologia empregada para avaliar a soroconversão, não foi capaz de determinar se um indivíduo recebeu ao menos uma dose da vacina, considerando que a vacinação foi introduzida no país em janeiro de 2021.

Outra limitação encontrada foi que as VOC não foram prevalentes na população do estudo, possivelmente associado ao critério de seleção da amostra

biológica. A ausência de produções científicas de análises filogenéticas do SARS-CoV-2 associadas a metadados clínicos e laboratoriais, comparando VOC com outras linhagens foi um fator limitante, que impossibilitou uma discussão robusta dos resultados da pesquisa, com outros achados científicos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho teve como objetivo compreender a distribuição das variantes emergentes do SARS-CoV-2, bem como compreender os padrões de espalhamento geográfico entre o final da primeira e início da segunda onda pandêmica, e o impacto dessas variantes, sobretudo, as VOC em comparação com outras linhagens circulantes. A partir de isolados identificados, e de um conjunto representativo da diversidade viral depositadas no banco de dados GISAID, foi possível contextualizar os genomas sequenciados e analisar o espalhamento geográfico e dinâmica das cepas circulantes.

Durante a ESPII, o sequenciamento genômico evidenciou a relevância desta ferramenta para análises filodinâmica e filogenética das variantes do SARS-CoV-2. Embora a utilização de métodos para compreender a evolução e a propagação da COVID-19 seja relevante, seus resultados devem ser interpretados com cautela (Morel et al., 2021).

A extinção da ESPII não significa que a infecção pelo SARS-CoV-2 tenha sido eliminada, especialmente para os grupos vulneráveis. Dado que o vírus continua em circulação no planeta, a OMS determinou que atualmente, a COVID-19 é um problema de saúde estabelecido. Sendo importante que estratégias de vigilância instituídas e preconizadas no Brasil para a doença continuem sendo desenvolvidas e fortalecidas, justificado pela possibilidade de emergência ou reemergência de VOC e/ou VOI. O término da ESPII não significa que a pandemia tenha sido encerrada, uma vez que o termo pandemia está relacionado à distribuição geográfica da doença e não à sua gravidade (Brasil, 2023; PAHO, 2020).

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula. Como os genes evoluem?* 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 453-455 p.

AL-OSAIL, A. M. *et al.* The history and epidemiology of Middle East respiratory syndrome coronavirus. **Multidiscip Respir Med**, [S. l.], v. 12, n. 11, p.1-6, ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40248-017-0101-8>.

ANTONELI, M. *et al.* Optimal symptom combinations to aid COVID-19 case identification: Analysis from a community-based, prospective, observational cohort. **Journal of Infection**, [S. l.], v. 82, n. 3, p.384-390, mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.02.015>.

BAREK, M. A. *et al.* Impact of age, sex, comorbidities and clinical symptoms on the severity of COVID-19 cases: A meta-analysis with 55 studies and 10014 cases. **Heliyon**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 1-24, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05684>.

BERMINGHAM, E.; MORITZ, C. Comparative phylogeography: concepts and applications. **Molecular Ecology**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 367–369, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1134/S002689330905015X>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância genômica do vírus SARS-CoV-2 no âmbito da SVS/MS** [recurso eletrônico]. Brasília-DF : Ministério da Saúde, 2021a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes-tecnicas/guias-e-planos/vigilancia-genomica-do-virus-sars-cov-2> Acesso em: 14 jan.2023

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. **Informe Semanal nº 24 de evidências sobre variantes de atenção de SARS-CoV-2** [recurso eletrônico]. Departamento de Ciência e Tecnologia. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2021b. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/informes-tecnicos/informes-de-variantes/informe_s24_fc.pdf/view. Acesso em: 02 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico especial** [recurso eletrônico]. Doença pelo novo coronavírus – COVID-19. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos> Acesso em: 18 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica: Emergência de Saúde Pública de importância internacional pela doença causada pelo novo Coronavírus 2019** [recurso eletrônico]. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes-tecnicas/guias-e-planos/guia-de-vigilancia-epidemiologica-covid-19/view>. Acesso em:14 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico especial 153**. Doença pelo novo coronavírus – COVID-19. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2023. https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid19/2023/boletim_covid_153_julho_11set23.pdf/view. Acesso em: 27 set. 2023.

CALLAWAY, E. The mutation that helps Delta spread like wildfire. **Nature**, [S. l.], v. 596, p. 472-473, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02275-2>.

CANDIDO, D. S. et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. **Science**, [S. l.], v. 369, n. 6508, p. 1255-1260, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abd2161>.

CASCELLA, M. *et al.* **Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island: StatPearls Publishing, Jan. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/> Acesso em: 18 mar. 2023.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Variants of the Vírus**. [Internet]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/index.html> Acesso em: 13 abr. 2023.

CORMAN, V. M. *et al.* Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. **Adv Virus Res.**, [S. l.], n. 100, p. 163-188, Fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.01.001>.

CRODA, J. H. R.; GARCIA, L. P. Resposta imediata da Vigilância em Saúde à epidemia da COVID-19. **Epidemiol. Ser. Saúde**, [S. l.], Brasília, v. 29, n. 1, p. 5-7, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742020000100021>.

CSG. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nat. Microbiol.**, [S. l.], n. 5, p. 536–544, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z#citeas>. Acesso em: 23 nov. 2022.

CUI, J. *et al.* Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nat Rev Microbiol**, [S. l.], v. 17, p. 181–192, Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.jinf.2021.02.015>.

DEARLOVE, B. *et al.* A SARS-CoV-2 vaccine candidate would likely match all currently circulating variants. **PNAS**, [S. l.], v. 117, n. 38, p. 23652–23662, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2008281117>.

DENG, X.; DEN BAKKER, H. C.; HENDRIKSEN, R. S. Genomic Epidemiology: WholeGenome-Sequencing–Powered Surveillance and Outbreak Investigation of Foodborne Bacterial Pathogens. **Annu Rev Food Sci Technol**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 353–374, Jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033259>.

DE WIT, E. *et al.* SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nat Rev Microbiol.**, v. 14, n. 8, p. 523-534, Aug. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>.

DIRUR. Diretoria de estudos e políticas regionais, urbanas e ambientais. **Pandemia e fronteiras brasileiras: análise da evolução da covid-19 e preposições. Instituto de pesquisa econômica aplicada.** Diretoria de estudos e políticas regionais, urbanas e ambientais. Brasília-DF: DIRUR, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/10039> Acesso em: 21 ago.2022.

DOLIN, R. Common viral respiratory infections and severe acute respiratory syndrome (sars). *In:* FAUCI, A. S. *et al.* **Harrison's Principles of Internal Medicine.** 17. th ed. Philadelphia: MacGraw-Hill, 2007.

DOMINGO, E; PERALES, C. Viral quasispecies. **PLoS Genet.**, [S./], v.15, n.10, p.1-20, Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008271>.

DOS SANTOS, C. A. *et al.* SARS-CoV-2 Genomic Surveillance in Northeast Brazil: Timing of Emergence of the Brazilian Variant of Concern P1. **J Travel Med.**, [S./], v. 28, n. 7, p.1-3, Oct. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1126%2Fscience.abh2644>.

FARIA, N. R. *et al.* Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. **Rev. Science**, [S. /], v. 372, n. 6544, p. 815-821, May. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abh2644>.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. **Methods Mol Biol.**, [Clifton-NJ], v. 1282, p. 1–23, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Variantes P1e P2 alertam autoridades de saúde brasileira.** Vigilância genômica COVID-19. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2021. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/variantes-p1-e-p2-alertam-autoridades-de-saude-brasileiras> Acesso em: 28 jan. 2022.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Monitora COVID-19.** Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2022. Disponível em: <https://bigdata-covid19.icict.fiocruz.br/>. Acesso em: 03 mar. 2022.

FREITAS, A. R.; GIOVANETTI, M.; ALCANTARA, L. C. Emerging variants of SARS-CoV-2 and its public health implications. **Inter. Journ. Med. Health**, [S. /], v. 4., n. 2, p. 1-8, mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.31005/iajmh.v4i.181>.

GENOMAHCOV. Rede Genômica Fiocruz. **Vigilância genômica do SARS-CoV-2 no Brasil** [Internet]. Disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/> Acesso em: 28 jun. 2023.

GIOVANETTI, M. *et al.* Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. **Nat Microbiol.**, [S. l.], v.7, n.9, p.1490-1500, Sep. 2022a.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01191-z>.

GIOVANETTI, M. *et al.* Replacement of the Gamma by the Delta variant in Brazil: Impact of lineage displacement on the ongoing pandemic. **Virus Evolution**, [S. l.], v. 8, n. 1, p.1-6, Mar. 2022b.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ve/veac024>

GISAID. Global Initiative on Sharing All Influenza Data. **hCov19 Variants**. [Internet]. Disponível em: <https://www.gisaid.org/hcov19-variants> Acesso em: 12 mai 2023.

HARTENIAN, E. *et al.* The molecular virology of coronaviruses. **JBC Reviews.**, [S. l.], v. 295, n. 37, p. 12910-12934, Sep. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.REV120.013930>.

HU, T. *et al.* Bioinformatics resources for SARS-CoV-2 discovery and surveillance. **Brief Bioinform.**, [S.l.], v.22., n.22, p.631-641, mar. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.1093%2Fbib%2Fbbaa386>.

HUBLER, Z. *et al.* High-Throughput Adaptable SARS-CoV-2 Screening for Rapid Identification of Dominant and Emerging Regional Variants. **Am J of Clin Pathol.**, [S. l.], v. 7, n. 157, p. 927-935, Jun. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqab212>.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Code: the International Code of Virus Classification and Nomenclature 2022**. Disponível em: <https://ictv.global/about/code> Acesso em: 10 out. 2022.

KIM, D. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 **Transcriptome**. **Cell.**, [S.l.], v.181, n.4, p.914-921, May. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>.

KIM, S. *et al.* Differential Interactions Between Human ACE2 and Spike RBD of SARS-CoV-2 Variants of Concern. **bioRxiv.**, [S.l.], Jul. 2021. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.07.23.453598v1.full> Acesso em: 13 set. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.07.23.453598>.

KNOWLES, L. L. Statistical Phylogeography. **Annual Review**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 593–612, Dec. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01637.x>.

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. **Int. J. Mol. Sci.**, [S. l.], v. 22, n. 17, p.1-12, Aug. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fijms22179131>.

LAM, T. T.; HON, C.C.; TANG, J. W. Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections. **Crit Rev Clin Lab Sci.**, [S.l.], v. 47, n. 1, p. 5–49, Feb. 2010.

DOI: <https://doi.org/10.3109/10408361003633318>.

LAN, J. *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, [S.l.], v. 581, n. 7807, p. 215-220, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>.

LAUER *et al.* The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. **Ann Intern Med.**, [S.l.], v.172, n.9, p.557-582, May. 2020. DOI: <https://doi.org/10.7326%2FM20-0504>.

LI, X. *et al.* Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **J Pharma Anal.**, [S. l.], v.10, n.2, p.102-108, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.7326%2FM20-0504>.

LIMA, M.L. *et al.* A química dos saneantes em tempos de COVID-19 Você sabe como isso funciona? **Quím. Nova**, [S.l.], v.43, n.5, p. 668-678, mai. 2020. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170552>.

LIU, C. *et al.* Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.617 by vaccine and convalescent serum. **Cell**, [S.l.], v. 184, n. 16, p. 4220- 4236.e13, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.020>.

LIU, Y. *et al.* Delta Spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant. **Cell Report.**, [S.l.], v.39, n.7, p.1-12, May 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0273430>.

MARDIS, E.R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. Annual Review of Genomics and Human Genetics. **Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.**, [S.l.], vol.9, p.387-402, 2008. DOI: https://doi.org/10.1007%2F978-981-13-8844-6_15.

MILLER, W. *et al.* Comparative Genomics. **Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 15–56, Apr. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.5.061903.180057>.

MINH, B. Q. *et al.* IQ-TREE 2: IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the Genomic Era. **Mol Biol Evol**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 1530-1534, May. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.

MOSHIRI, N. Viral MSA: massively scalable reference-guided multiple sequence alignment of viral genomes. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 714-716, Mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa743>.

NARASIMHAN, M. *et al.* Clinical Evaluation of the Abbott Alinity SARS-CoV-2 Spike-Specific Quantitative IgG and IgM Assays among Infected, Recovered, and Vaccinated Groups. **JCM**, [S.l.], v.59, n.7, Jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.00388-21>.

NELSON, G. *et al.* Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances

spike RBDACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant. **bioRxiv**, [S. l.], Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.01.13.426558>.

NICOLELIS, M. A. *et al.* The impact of super-spreader cities, highways, and intensive care availability in the early stages of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Sci Rep.** [S. l.], v. 11, n.1, Jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92263-3>.

OGANDO, N.S. *et al.* The Enzymatic Activity of the nsp14 Exoribonuclease Is Critical for Replication of MERS-CoV and SARS-CoV-2. **J. Virol.**, [S. l.], v.94, n.23, p.1-24, Dec. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01246-20>.

OPAS. Organização Panamericana da Saúde. **Situação Epidemiológica da COVID-19 no Brasil.** [S. l.]: OPAS, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/node/64540> Acesso em: 7 ago. 2022.

PAHO. Pan American Health Organization. **SARS-CoV-2 in the Americas.** [S. l.]: PAHO, 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/influenza-and-other-respiratory-viruses/covid-19-genomic-surveillance-regional-network> Acesso em: 10 mar. 2023.

PAIVA, M. H. *et al.* Multiple Introductions Followed by Ongoing Community Spread of SARS-CoV-2 at One of the Largest Metropolitan Areas of Northeast Brazil. **Viruses.**, [S. l.], v. 9, n. 12, p.1414, Dec. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12121414>.

PARANHOS, R. *et al.* Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson: O retorno. **Leviathan**, [São Paulo], n. 8, p. 66-95, 2014. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.2237-4485.lev.2014.132346>.

PEREIRA, V. H. *et al.* Identificação das rotas iniciais de importação e disseminação da COVID-19 no Brasil. **Geosaberes**, [Fortaleza], v. 11, p. 423-463, jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.26895/geosaberes.v11i0.1043>.

PEVSNER, J. **Bioinformatics and functional genomics.** 3rd ed. Hoboken: WileyBlackwell, 2015.

RAMBAUT, A. *et al.* A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nat Microbiol.**, [S. l.], v. 5, n.11, p. 1403-1407, Jul. 2020a. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>.

RAMBAUT, A. *et al.* Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations-SARS-CoV-2 coronavírus/nCoV-2019. **Genomic Epidemiology**, [S. l.], Dec. 2020b. Disponível em: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>. Acesso em: 15 mar. 2022.

RESENDE, P. C. *et al.* The ongoing evolution of variants of concern and interest of SARS-CoV-2 in Brazil revealed by convergent indels in the amino (N)-terminal domain of the Spike protein. **Virus Evolution**, [S. I.], v. 7, n. 2, p.1-11, Dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/veab069>.

ROTA, P. A. *et al.* Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. **Science**, [S.I.], v. 300, n. 5624, p. 1394–1399, May. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1085952>.

RUAN, Y. *et al.* Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. **The Lancet**, [S.I.], v. 361, n. 9371, p. 1779–1785, May 2003. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1085952>.

SALLAS, J. *et al.* A vigilância genômica do SARS-CoV-2 no Brasil na resposta à pandemia da COVID-19. *Rev Panam Salud Publica*, [S.I.], v.45, Jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2021.75>

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [S.I.], v.74, n.12, p.5463–5466, Dec.1977. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.

SAGULENKO, P. *et al.* TreeTime: Maximum-likelihood phylodynamic analysis. **Virus Evol.**, [S. I.], v. 4, n.1, p.1-9, Jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/vex042>.

SHANG, J. *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, [S. I.], v. 581, p. 221-224, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>.

SINTCHENKO, V.; IREDELL, J.R.; GILBERT, G.L. Pathogen profiling for disease management and surveillance. **Nat Rev Microbiol.**, [S.I.], v.5, n.6, p.464-470, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1656>.

SILVA, J. P. *et al.* Delta variant of SARS-CoV-2 replacement in Brazil: A national epidemiologic surveillance program. **Viruses**, [S. I.], v. 14, n. 5, p. 847, Apr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14050847>.

SUDHARSANAN, N. *et al.* The contribution of the age distribution of cases to COVID-19 case fatality across countries. **Ann Intern Med.**, [s. I.], v. 173, n. 9, p. 714-720, Nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.7326/m20-2973>.

TEGALLY, H. *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. **Nature**, [S.I.], v. 592, p. 438–443, Mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>.

VASHIST, S. K. In vitro diagnostic assays for COVID-19: recent advances and emerging trends. **Diagnostics**, [S. I.], v. 10, n. 4, p. 202, Apr. 2020.

DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040202>.

VELLINGIRI, B. *et al.* **COVID-19: A promising cure for the global panic. Science of The Total Environment**, [S.l.], v.725, p.1-18, Jul. 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1016%2Fj.scitotenv.2020.138277>.

VOGEL, M. *et al.* SARS-CoV-2 variant with higher affinity to ACE2 shows reduced sera neutralization susceptibility. **Cold Spring Harbor Laboratory**, [S.l.], Mar. 2021.

DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.03.04.433887>.

VOLZ, E. M.; KOELLE, K.; BEDFORD, T. Viral Phylodynamics. **PLoS Comput Biol.**, [S.l.], v. 9, n. 3, Mar. 2013.

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002947>.

YAMASOBA, D. *et al.* **Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 spike. Cell Press.**, [S.l.], v.185, n.12, p.2103-2105, Jun. 2022.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.035>.

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nat. Rev. Genet.**, [S.l.], v. 13, n. 5, p. 303–314, May. 2012.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.035>.

WALLS, A.C. *et al.* **Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. Cell Press.**, [S.l.], v.81, n.2, p.281-292, Apr. 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.

WANG, P. *et al.* Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P.1 to antibody neutralization. **Cell Host & Microbe**, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 747-751, May, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.007>.

WANG, Y. *et al.* Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. **J Med Virol.**, [S. l.], v. 92, n. 6, p. 568-76, Mar. 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.25748>.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Microbiol Mol Biol Ver.**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 635-664, Dec. 2005.

DOI: <https://doi.org/10.1128%2FMMBR.69.4.635-664.2005>.

WHO. World Health Organization. **Novel coronavirus (2019-nCoV)**. Situation Report. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m>. Acesso em: 28 jan. 2022.

WHO. World Health Organization. WHO announces simple, easy-to-say labels for SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern. Geneva: WHO, 2021a. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/31-05-2021-who-announces-simple-easy-to-say-labels-for-sars-cov-2-variants-of-interest-and-concern> Acesso em: 25.jun.2022

WHO. World Health Organization. **COVID-19 Clinical management**. Geneva: WHO, 2021b. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/338882/WHO-2019-nCoV-clinical-2021.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 13 jan. 2022.

WHO. World Health Organization. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. Geneva: WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso em: 08 Fev. 2022

WHO. World Health Organization. **Coronavirus disease (COVID-19) pandemic**. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Acesso em: 19 mai. 2023

WU, H. *et al.* Nucleocapsid mutation R203K/G204R increases the infectivity, fitness and virulence of SARS-CoV-2. **Cell Host Microbe**, [S. l.], v. 29, n. 12, p.1788-1801, Dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.11.005>.

ZHANG, W. *et al.* Emergence of a Novel SARS-CoV-2 Variant in Southern California. **JAMA**, [S. l.], v. 325, n.13, p.1324–1326, Apr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2021.1612>.

ZHOU, N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med.**, [S. l.], v. 382, n.8, p. 727-733, Feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>.

