

TÓPICOS SOBRE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA NOVA ESPÉCIE DE CORONAVÍRUS SARS-CoV-2

Bruna Letícia Domingues Molinari^{1*}

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Centro Universitário Ingá/UNINGÁ, Maringá, Brasil.

* Autor para correspondência:

Endereço: Rod. PR 317, 6114 Parque Industrial 200, Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87035-510.

E-mail: bruna_molinari@hotmail.com.

DOI: 10.4025/rcvsp.v7i1.55497

RESUMO

Desde dezembro de 2019, uma nova espécie de coronavírus denominada SARS-CoV-2 foi relacionada a milhares de casos de doença respiratória grave em todo o mundo, sendo considerada um problema de saúde pública. Comparações moleculares realizadas entre isolados de SARS-CoV-2 e outras espécies de coronavírus mostraram níveis de identidade em torno de 79% com a cepa humana SARS-CoV. No entanto, a análise de homologia das sequências genômicas mostrou que dentre os vírus conhecidos, duas espécies de coronavírus de morcegos (SL-CoVs) apresentam-se mais intimamente relacionados com SARS-CoV-2 (~ 89%), revelando relações evolutivas semelhantes e evidências de que os morcegos podem atuar como reservatórios de SARS-CoV-2. Apesar disso, o RNA viral foi detectado em dois cães e dois gatos pertencentes a proprietários infectados com SARS-CoV-2, em Hong Kong e na Bélgica, e em um tigre mantido no Zoológico do Bronx em Nova York. Adicionalmente, furrões e gatos mostraram-se altamente suscetíveis ao SARS-CoV-2 em um experimento realizado em um ambiente controlado. No entanto, não há evidências de que esses animais atuem como reservatórios do vírus. Apesar da alta identidade genética encontrada entre as cepas de SARS-CoV-2, mutações já foram identificadas, principalmente no gene que codifica a proteína estrutural S, porém ainda não existem evidências suficientes para relacionar mutações específicas no genoma viral a um número maior de pacientes infectados ou mortes.

Palavras-chave: Análise molecular; Cães; Gatos; Morcegos; SARS-CoV-2.

INTRODUÇÃO

Os coronavírus (CoVs) são vírus envelopados, com genoma formado por uma fita simples de RNA que pertencem à família *Coronaviridae* e são comumente associados a doenças respiratórias e entéricas leves em diversas espécies de aves e mamíferos em todo o mundo (WOO et al., 2009).

Durante dezembro de 2019, cinco pacientes com mais de quarenta anos foram internados em hospitais com diagnóstico inicial de pneumonia de etiologia desconhecida em Wuhan, província de Hubei, China (LU et al., 2020a). Por meio de técnicas de diagnóstico molecular foi possível identificar uma nova cepa de Coronavírus (novo coronavírus 2019 ou SARS-CoV-2) relacionada à etiologia da doença denominada COVID-19 (REN et al., 2020).

Devido ao seu potencial de rápida disseminação horizontal, o SARS-CoV-2 surgiu e infectou milhares de humanos em diversos países, causando um cenário de pandemia e muitas

mortes (BENVENUTO et al., 2020; HAIDER et al., 2020). No momento da preparação deste manuscrito, a doença havia resultado em mais de 16.114.449 casos confirmados e mais de 646.641 mortes em todo o mundo (OPAS / OMS).

Em função da gravidade da doença e a fim de fornecer subsídios para o desenvolvimento de vacinas e outras formas de controle e prevenção viral, muitos estudos estão sendo desenvolvidos para possibilitar o entendimento da origem evolutiva, características moleculares e antigênicas desse vírus.

DESENVOLVIMENTO

As cepas de coronavírus são classificadas em quatro gêneros com base em suas propriedades genéticas: Alphacoronavírus (α), Betacoronavírus (β), Gammacoronavírus (γ) e Deltacoronavírus (δ) (WOO et al., 2009). Antes da emergência do SARS-CoV-2, haviam seis CoVs conhecidos por infectar humanos, dois α -CoVs (229E e NL63) e quatro β -CoVs (OC43, HKU1, Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) -CoV e Médio Síndrome Respiratória Leste (MERS) -CoV), todos com potencial confirmado de transmissão zoonótica (PERLMAN e NETLAND, 2009; ZAKI et al., 2012).

O SARS-CoV e o MERS-CoV surgiram na China em 2002 e na Arábia Saudita em 2012, respectivamente (ZHONG et al., 2003; ZAKI et al., 2012). Ambas as espécies foram associadas à síndrome respiratória aguda grave em humanos e foram detectadas em cerca de 27 países (WHOa; WHOb). Vários estudos mostraram que os morcegos são o reservatório de uma ampla variedade de coronavírus, incluindo cepas de SARS-CoV e MERS-CoV (DREXLER et al., 2014). Porém, há evidências de que outros animais também podem atuar como reservatórios ou hospedeiros acidentais desses vírus, contribuindo para a sua manutenção no ambiente (GUAN et al., 2003; WANG et al., 2006; REUSKEN et al., 2013).

Para determinar a origem, evolução e relações antigênicas do SARS-CoV-2, estudos moleculares considerando sequências de nucleotídeos e proteínas do vírus têm sido realizados desde sua descoberta. As comparações entre isolados do novo coronavírus e cepas de SARS-CoV mostraram níveis de identidade em torno de 79%. Quando comparado com as sequências genômicas de MERS-CoV, a porcentagem de identidade foi de cerca de 50 (LU et al., 2020b; REN et al., 2020). Apesar da semelhança com o SARS-CoV, análises filogenéticas revelaram que embora o SARS-CoV-2 se enquadre no gênero *Betacoronavirus*, o mesmo se agrupa em um ramo diferente do SARS-CoV, sendo considerado uma nova espécie de betacoronavírus com capacidade para infectar humanos (LU et al., 2020b; REN et al., 2020).

Além disso, análises filogenéticas foram realizadas considerando sequências genômicas de betacoronavirus identificadas em ratos, bovinos e morcegos (LU et al., 2020b; REN et al., 2020). A análise de homologia das sequências mostrou que dentre os vírus conhecidos, duas espécies de coronavírus de morcegos (bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21) identificados em 2005 em Zhoushan, Zhejiang, China, apresentam-se mais intimamente relacionados com SARS-CoV-2, com 73-89% de identidade de nucleotídeos (WONG et al., 2019; LU et al., 2020b; REN et al., 2020). Na análise filogenética, ambas as espécies de morcegos se agruparam no mesmo ramo que o SARS-CoV-2, revelando relações evolutivas semelhantes e evidências de que os morcegos podem atuar como reservatórios dessa espécie viral (LU et al., 2020b).

Para esclarecer mais detalhes sobre os possíveis hospedeiros e reservatórios do SARS-CoV-2, Ji et al. (2020) realizou a análise filogenética usando 271 sequências de genoma de SARS-CoV-2 disponíveis em bancos de dados GenBank e a avaliação do uso de códons relativos (RSCU) utilizando sequências de códons do genoma de SARS-Cov-2, (1CDS's, 9672 códons), da espécie de morcego bat-SL-CoVZC45 e de espécies selvagens como cobras, ouriços, marmotas, pangolins e genomas de pássaros disponíveis em bancos de dados. A análise filogenética revelou a alta identidade com SL-CoVs de morcego, como mencionado

anteriormente. Por sua vez, a análise dos códons mostrou que SARS-CoV-2, bat-SL-CoVZC45 e cobras da China possuem um viés de uso de códon sinônimo semelhante, no entanto, SARS-CoV-2 e cobras têm a maior similaridade, sugerindo que cobras e morcegos podem agir como os hospedeiros ou reservatórios do vírus. Como não houve contato entre os primeiros humanos positivos para SARS-CoV-2 com morcegos e a maioria deles tinha histórico de exposição ao vírus no Mercado Atacadista de Frutos do Mar de Huanan, onde aves, cobras, marmotas, pássaros, sapos e ouriços são vendidos, a existência de outros hospedeiros ou reservatórios não pode ser descartada (LU et al., 2020a; JI et al., 2020).

A transmissão zoonótica viral é a hipótese mais aceita para os primeiros casos positivos de SARS-CoV-2. Embora o SARS-CoV-2 compartilhe alta identidade de nucleotídeos com o coronavírus de morcego, ele não foi detectado nesses ou em outros animais antes da pandemia. No entanto, nos últimos meses, o RNA viral foi detectado em dois cães e dois gatos pertencentes a proprietários infectados com SARS-CoV-2, em Hong Kong e Bélgica (PRO / AH / EDR). Nestes quatro casos foi possível observar que todos os animais apresentaram-se assintomáticos, baixo título viral foi detectado, não houve transmissão de um animal para outro e as sequências virais obtidas de um dos cães e de seu dono eram idênticas, sugerindo que a transmissão ocorreu do dono para o animal (PRO / AH / EDR; LEROY et al., 2020). Todos esses achados contribuem para a afirmação de que não há evidências de desenvolvimento de infecção produtiva e infecciosa em cães e gatos.

Além da infecção em cães e gatos, o RNA genômico do SARS-CoV-2 também foi encontrado em um tigre de quatro anos mantido no zoológico do Bronx, em Nova York, chamado Nadia, apresentando tosse seca e diminuição do apetite. A irmã de Nadia, Azul, dois tigres Amur e três leões africanos também desenvolveram os mesmos sinais clínicos, porém não foram testados. De acordo com os funcionários do zoológico, os felinos provavelmente foram infectados por uma pessoa que cuidava deles e que testou positivo para o vírus (JAMES, 2020).

Além do mencionado acima, Shi et al. (2020) desenvolveram um experimento em um ambiente controlado e descobriram que furões e gatos são altamente suscetíveis ao SARS-CoV-2, cães têm baixa suscetibilidade e porcos, galinhas e patos não são suscetíveis. Essa suscetibilidade está relacionada com as características moleculares da proteína estrutural viral S, uma glicoproteína do envelope que está envolvida na ligação do vírus à célula hospedeira que pode sofrer recombinação genética e aumentar o número de hospedeiros do vírus (LI et al., 2016). Além disso, embora em seu estudo tenha sido possível detectar a transmissão viral entre gatos, uma vez que as condições não eram naturais, mais estudos são necessários para elucidar o risco de infecção de animais domésticos e seres humanos, bem como o papel de gatos infectados como fontes de infecção para outros animais domésticos e seres humanos.

Os coronavírus possuem o maior genoma formado por RNA fita única de sentido positivo dentre os vírus (Su et al., 2016). Mutações genéticas e recombinações são comuns entre esta família viral e geralmente ocorrem durante seu ciclo de replicação (Su et al., 2016). Embora a análise genética tenha mostrado que as primeiras cepas de SARS-CoV-2 detectadas na China foram quase idênticas (99,9%), sugerindo que se originaram de uma mesma fonte, muitas novas sequências de genoma já foram obtidas de cepas de diferentes países, e apesar da alta identidade genética encontrada entre eles, mutações foram identificadas, principalmente no gene da proteína estrutural S (LU et al., 2020b; ZEHENDER et al., 2020; Castillo et al., 2020). Recentemente, com base nessas diferenças genéticas entre as cepas de SARS-Cov-2, Tang et al. (2020) e a base de dados GISAID (www.gisaid.org/CoV2020) propuseram sua classificação em linhagens / subtipos.

A alta taxa de disseminação viral e a pressão ambiental podem contribuir para a mutação do genoma e o surgimento de novos subtipos de SARS-CoV-2. Até o momento, não há evidências suficientes para relacionar mutações específicas no genoma viral a um maior

número de pacientes infectados ou número de mortes (Castillo et al., 2020). No entanto, é necessária vigilância constante com relação ao surgimento de novas mutações.

CONCLUSÃO

Dada a gravidade da pandemia de COVID-19, apesar de todas essas descobertas recentes e dos avanços nos programas de controle e profilaxia, muitas questões relacionadas à origem evolutiva, características moleculares e antigênicas do SARS-CoV-2 permanecem obscuras e mais estudos são necessários para melhor compreensão e adoção de medidas preventivas eficazes.

REFERÊNCIAS

- BENVENUTO, D.; GIOVANETTI, M.; SALEMI, M.; PROSPERI, M.; FLORA, C.; ALCANTARA, J.C.J.; ANGELETTI, S.; CICCOCCHI, M. The global spread of 2019-nCoV: a molecular evolutionary analysis. **Pathogens and Global Health**, v.114, p.64-67, 2020. <DOI:10.1080/20477724.2020.1725339>.
- CASTILLO, A.E.; PARRA, B.; TAPIA, P.; ACEVEDO, A.; LAGOS, J.; ANDRADE, W.; ARATA, L.; LEAL, G.; BARRA, G.; TAMBLEY, C.; TOGNARELLI, J.; BUSTOS, P.; ULLOA, S.; FASCE, R.; FERNÁNDEZ, J. Phylogenetic analysis of the first four SARS-CoV-2 cases in Chile. **Journal of Medical Virology**, 2020. <DOI: 10.1002/jmv.25797>.
- DREXLER, J.F.; CORMAN, V.M.; DROSTEN, C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. **Antiviral Research**, v.101, p.45–56, 2014. <DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104902>.
- GUAN, Y.; ZHENG, B.J.; HE, Y.Q.; LIU, X.L.; ZHUANG, Z.X.; CHEUNG, C.L.; LUO, S.W.; LI, P.H.; ZHANG, L.J.; GUAN, Y.J.; BUTT, K.M.; WONG, L.K.; CHAN, K.W.; LIM, W.; SHORTRIDGE, K.F.; YUEN, K.Y.; PEIRIS, J.S.M.; POON, L.L.M. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. **Science**, v.302, p.276–278, 2003. <DOI: 10.1126/science.1087139>.
- HAIDER, N.; YAVLINSKY, A.; SIMONS, D.; OSMAN, A.Y.; NTOUMI, F.; ZUMLA, A.; KOCK, R. Passengers' destinations from China: Low risk of Novel Coronavirus (2019-nCoV) transmission into Africa and South America. **Epidemiology and Infection**, v.148, p.e41, 2020. <10.1017/S0950268820000424>.
- JAMES, A. A Tiger at Bronx Zoo Tests Positive for COVID-19. **ABC News**. Disponível em: <https://wpde.com/news/coronavirus/a-tiger-at-bronx-zoo-tests-positive-for-covid-19>. Acesso em: 29 jul. 2020.
- JI, W.; WANG, W.; ZHAO, X.; ZAI, J. LI, X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. **Journal of Medical Virology**, v.92(4), p.433-440, 2020. <DOI: 10.1002/jmv.25682>.
- LEROY, E.M.; GOUILH, M.A.; PICOUX, J.B. The risk of SARS-CoV-2 transmission to pets and other wild and domestic animals strongly mandates a one-health strategy to control the COVID-19 pandemic. **One Health**. v.13;100133, 2020. <DOI: 10.1016/j.onehlt.2020.100133>.
- LI, F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual Review of Virology*, v.3(1), p.237–261, 2016. <DOI: 10.1146/annurev-virology-110615-042301>.
- LU, H.; STRATTON, C.W.; TANG, Y. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. **Journal of Medical Virology**, v.92, p.401-402, 2020a. <DOI: 10.1002/jmv.25678>.
- LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P.; YANG, B.; WU, H. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel

- coronavirus: implications for virus origins and receptor binding, **Lancet**, v.395 (10224), p.565–574, 2020b. <DOI:10.1016/S0140-6736(20)30251-8>.
- OPAS/OMS. Organização Pan Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde. Folha informativa – **COVID-19 (doença causada pelo novo coronavírus)**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875>. Acesso em: 27 jul. 2020.
- PERLMAN, S. and NETLAND, J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.439–450, 2009. <10.1038/nrmicro2147>.
- PRO/AH/EDR. **COVID-19 update (30): China (Hong Kong), Dog, Suspected, Serology Pending**. Disponível em: <http://promedmail.org/post/20200306.7057595>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- PRO/AH/EDR. **COVID-19 update (56): China (Hong Kong) Animal, Dog, Final Serology Positive**. Disponível em: <http://promedmail.org/post/20200326.7146438>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- PRO/AH/EDR. **COVID-19 update (45): China (Hong Kong) animal, dog, 2nd case PCR Positive**. Disponível em: <http://promedmail.org/post/20200319.7112693>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- PRO/AH/EDR. **COVID-19 update (58): Belgium, Cat, Clinical Case, Request For Information**. Disponível em: <http://promedmail.org/post/20200326.7151215>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- PRO/AH/EDR. **COVID-19 update (70): China (Hong Kong) Cat, Pets And Stock**. Disponível em: <http://promedmail.org/post/20200326.7173286>. Acesso em: 24 jul. 2020.
- REN, L.L.; Wang, Y.; WU, Z.; XIANG, Z., GUO, L.; XU, T.; JIANG, Y.; XIONG, Y.; LI, Y.; LI, X.; LI, H.; FAN, G.; GU, X.; XIAO, Y.; GAO, H.; XU, J.; YANG, F.; WANG, X.; WU, C.; CHEN, L.; LIU, Y.; LIU, B.; YANG, J.; WANG, X.; DONG, J.; LI, L.; HUANG, C.; ZHAO, J.; HU, Y.; CHENG, Z.; LIU, L.; QIAN, Z.; QIN, C.; JIN, Q.; CAO, B.; WANG, J. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. **Chinese Medical Journey**, v.133, p.1015-1024, 2020. <DOI:10.1097/CM9.0000000000000722>.
- REUSKEN, C.B.; HAAGMANS, B.L.; MULLER, M.A.; GUTIERREZ, C.; GODEKE, G.J.; MEYER, B.; MUTH, D.; RAJ, V.S.; VRIES, L.S.; CORMAN, V.M.; DREXLER, J.F.; SMITS, S.L.; TAHIR, Y.E.E.; SOUSA, R.; BEEK, J.; NOWOTNY, N.; MAANEN, K.; HERMOSO, E.H.; BOSCH, B.J.; ROTTIER, P.; OSTERHAUS, A.; SCHMIDT, C.G.; DROSTEN, C.; KOOPMANS, M.P.G. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralizing serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. **Lancet Infectious Disease**, v.13, p.859–866, 2013. <DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70164-6>.
- SHI, J.; WEN, Z.; ZHONG, G.; YANG, H.; WANG, C.; HUANG, B.; LIU, R.; HE, X.; SHUAI, L.; SUN, Z.; ZHAO, Y.; LIU, P.; LIANG, L.; CUI, P.; WANG, J.; ZHANG, X.; GUAN, Y.; TAN, W.; WU, G.; CHEN, H.; BU, Z. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus2. **Science**, v.368, p.1016-1020, 2020. <DOI: [10.1126/science.abb7015](https://doi.org/10.1126/science.abb7015)>.
- SU, S.; WONG, G.; SHI, W.; LIU, J.; LAI, A.C.K.; ZHOU, J.; LIU, W.; BI, Y.; GAO, G.F. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. **Trends in Microbiology**, v.24, p.490-502, 2016. <DOI: 10.1016/j.tim.2016.03.003>.
- TANG, X.; WU, C.; LI, X.; SONG, Y.; YAO, X.; WU, X.; DUAN, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; QIAN, Z.; CUI, J.; LU, J. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. **Microbiology**, v.7, p.1012-1023, 2020. <DOI: 10.1093/nsr/nwaa036>.
- WANG, L.F.; SHI, Z.; ZHANG, S.; FIELD, H.; DASZAK, P.; EATON, B.T. Review of bats and SARS. **Emerging Infectious**

- Disease**, v.12, p.1834–1840, 2006. <DOI: 10.3201/eid1212.060401>.
- WHOa. World Health Organization. **Summary of probably SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003**. Disponível em: https://www.who.int/csr/sars/country/table_2004_04_21/en/. Acesso em: 31 jul. 2020.
- WHOb. World Health Organization. Coronavirus infections: disease outbreak news. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/26-april-2016-mers-saudi-arabia/en/>. Acesso em: 31 jul. 2020.
- WONG, A.C.P.; LI, X.; LAU, S.K.P.; WOO, P.C.Y. Global epidemiology of bat coronaviruses. **Viruses** v.11, pii: E174, 2019. <DOI:10.3390/v11020174>.
- WOO, P.C.; LAU, S.K.; HUANG, Y.; YUEN, K.Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. **Experimental biology and medicine (Maywood)**, v.234, p.1117–1127, 2009. <DOI:10.3181/0903-MR-94>.
- ZAKI, A.M.; VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T.M.; OSTERHAUS, A.D.; FOUCHIER, R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **The New England Journal of Medicine**, v.367, p.1814–1820, 2012. <DOI: 10.1056/NEJMoa1211721>.
- ZEHENDER, G.; LAI, A.; BERGNA, A.; MERONI, L.; RIVA, A.; BALOTTA, C.; TARKOWSKI, M.; GABRIELI, A.; BERNACCHIA, D.; RUSCONI, S.; RIZZARDINI, G.; ANTINORI, S.; GALLI, M. Genomic characterization and phylogenetic analysis of SARS-COV-2 in Italy. **Journal of Medical Virology**, 2020. <DOI: 10.1002/jmv.25794>.
- ZHONG, N.S.; ZHENG, B.J.; LI, Y.M.; POON; XIE, Z.H.; CHAN, K.H.; LI, P.H.; TAN, S.Y.; CHANG, Q.; XIE, J.P.; LIU, X.Q.; XU, J.; LI, D.X.; YUEN, K.Y.; PEIRIS, GUAN, Y. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. **Lancet**, v.362, p.1353–1358, 2003. <DOI: 10.1016/s0140-6736(03)14630-2>.