

ONCOVID / ONCOBANK: RASTREAMENTO GENÔMICO JUNTO AO PROGRAMA DE PESQUISA PARA O SUS (PPSUS)

ISABELA SANTIAGO ROSA PIZANI¹; LAURA DE AZEVEDO GRACIANO²; WILLIAM BORGES DOMINGUES³; THAÍS LARRÉ OLIVEIRA⁴; FABIANA KÖMMLING SEIXAS⁵; TIAGO VEIRAS COLLARES⁶

¹Graduação em Medicina, UDM COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – isapi-zani1@gmail.com

²Graduação em Medicina, UDM COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – lauraagraci-ano@hotmail.com

³Unidade de Diagnóstico Molecular COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – williamwww@yahoo.com.br

⁴Unidade de Diagnóstico Molecular COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com

⁵Unidade de Diagnóstico Molecular COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – seixas.fk@gmail.com

⁶UPPGBiotec UFPEL e HE UFPEL/EBSERH, UDM COVID-19, Universidade Federal de Pelotas – collares.t@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A COVID-19, doença respiratória causada pelo vírus SARS-CoV-2, foi declarada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020 e a rápida disseminação da doença surpreendeu a comunidade científica e médica (ORTIZ-PRADO et al. 2020). Diversas comorbidades, como diabetes, doenças cardiovasculares e obesidade estão relacionadas a um aumento no risco de desenvolver sintomas graves da doença, e, dentre elas, o câncer merece destaque pelo fato das neoplasias apresentarem alta mortalidade e constante aumento do número de casos.

De acordo com o centro de controle e prevenção de doenças (CDC, 2020), pacientes oncológicos também apresentam risco aumentado de desencadear síndrome respiratória aguda decorrente da infecção pelo vírus. Estudos analisando populações de pacientes oncológicos relatam que indivíduos em recente tratamento quimioterápico ou cirúrgico prévios à infecção de SARS-CoV-2 têm maior taxa de mortalidade do que aqueles que não tenham recebido intervenções terapêuticas (LIANG et al. 2020), embora esta associação ainda não esteja bem estabelecida. Por outro lado, também se faz relevante considerar a COVID-19 dentre os profissionais de saúde, uma classe que costuma estar mais exposta ao vírus em comparação à população geral, considerando maior carga viral a qual é submetida e maior tempo de exposição aos doentes.

Pensando no amplo espectro de manifestação clínica e as bases genéticas que possam determinar maior ou menor suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2, estudos anteriores demonstraram associação de polimorfismos nos genes *ace1* e *ace2*, que codificam para as enzimas conversoras de angiotensina 1 e 2, com o agravamento da COVID-19 (HOU et al. 2020).

Partindo da hipótese que variantes genéticas em *ace1* e *ace2* podem estar associadas a diferenças na expressão gênica e função proteica, junto do maior risco de infecção e manifestação de sinais clínicos da COVID-19 em pacientes on-

cológicos e profissionais da saúde atuantes na linha de frente em instituições hospitalares, torna-se fundamental a investigação da diversidade genética da população alvo e a diversidade genética de SARS-CoV-2.

Alinhado com os objetivos e metas do projeto geral “Oncobank e Oncovid: rastreamento genômico de SARS-CoV-2 e perfil genético de pacientes oncológicos e de profissionais de saúde na pandemia da COVID-19”, aprovado junto ao edital Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS) do Ministério da Saúde, o presente projeto teve por objetivo o estabelecimento de biorrepositórios de amostras de RNA viral e de DNA humano para posterior utilização no desenvolvimento e validação de uma plataforma genômica para análise de variantes genéticas relacionadas a COVID-19.

2. METODOLOGIA

Recrutamento dos participantes e aplicação do questionário

Em agosto de 2021 foi iniciado o recrutamento dos profissionais de saúde e dos pacientes oncológicos no Bloco 3 do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas. O projeto do qual o presente estudo se origina é aprovado junto ao CEP FAMED, por meio da Plataforma Brasil, sob CAAE 39096620.7.0000.5317. Após o aceite de participação pelo público alvo, era solicitada a leitura, preenchimento e assinatura do TCLE, que precedia a aplicação de um questionário com perguntas de identificação, quanto ao grupo sanguíneo, data de vacinação, fabricantes e doses, diagnóstico prévio de COVID-19, reinfecção, sintomas gripais atuais do indivíduo, hábito do uso de EPIs e comorbidades prévias. No caso de pacientes oncológicos ainda era questionado quanto ao tipo de câncer e tratamento realizado, data do diagnóstico e presença de metástases, enquanto no grupo dos profissionais da saúde eram solicitadas informações quanto à categoria profissional, grau de exposição e EPIs utilizados durante as atividades de trabalho. Após a realização do questionário, os indivíduos eram dirigidos à coleta de material.

Extração de RNA total a partir de amostras de swab nasofaríngeo

A extração de RNA total foi realizada a partir de amostras do trato respiratório superior e inferior obtidas com o auxílio de *swab* estéril. O processamento foi realizado na Unidade de Diagnóstico Molecular UFPel COVID-19 do Hospital Escola da UFPel. Foi utilizado o kit comercial Biociclin DNA/RNA viral, seguindo as instruções do fabricante.

Diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR

Para a detecção molecular de SARS-CoV-2 nas amostras do presente estudo, foi utilizada a técnica de RT-qPCR. Para amplificação dos fragmentos N1 e N2 do gene que codifica a nucleoproteína de SARS-CoV-2, foram usados primers e sondas moleculares (Integrated DNA Technologies, EUA) de acordo com as sequências propostas pelo CDC. Um *mix* contendo primers e sondas para amplificação do gene da RNase P humana também foi utilizado, a fim de ser usado como controle da qualidade da amostra e da extração de RNA, conforme recomendado pelo CDC. As reações de RT-qPCR foram preparadas utilizando o kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante, e realizadas no equipamento AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, EUA). Como controle positivo dos alvos N1 e N2, foi utilizado o plasmídeo 2019-nCoV_N (Integrated DNA Technologies, EUA);

Extração de DNA genômico a partir de amostras de swab

Para a extração de DNA humano a partir das amostras de swab, foi utilizado o kit QIAamp DNA Mini (Qiagen®, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, as amostras foram submetidas a digestão e purificação do DNA seguido de lavagem e eluição. O kit foi suplementado com RNase a fim de obter DNA genômico livre de contaminação por RNA. A qualidade e concentração do DNA foram avaliados utilizando o NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, EUA) para confirmar o valor de A260/A280 entre 1,8 e 2,0 e concentração maior de 50 ng/μl.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira parte de recrutamento de participantes iniciou em agosto de 2021 e terminou em setembro de 2021, tendo sido recrutados 73 indivíduos, sendo 39 pacientes oncológicos e 34 profissionais de saúde, sendo 62 deles residentes do município de Pelotas. A idade média dos recrutados foi de 48,8 anos, sendo o de menor idade 24 anos e o de maior idade, 78 anos. Cerca de 73% de todos participantes eram do sexo feminino; a maioria, 83,5% se autorreferiu como cor branca, e o restante como pretos ou pardos.

Conforme mostrado na figura 1, considerando o grupo dos pacientes oncológicos, 15 indivíduos apresentavam câncer de mama e 14 apresentavam metástase para outros órgãos. Além disso, o tratamento preponderante foi a quimioterapia, em 19 pacientes dos 39 recrutados até então.

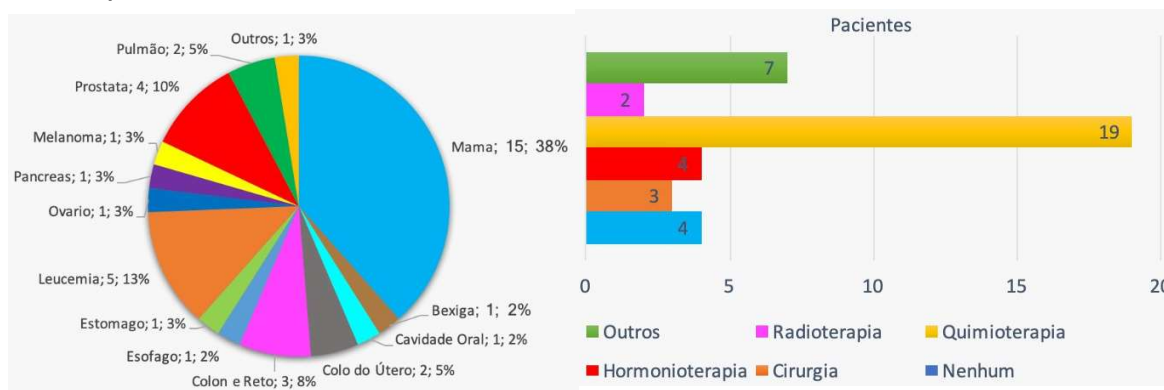


Figura 1. Gráficos demonstrando os tipos de câncer e tratamento realizado pelos pacientes oncológicos participantes do estudo recrutados durante o primeiro período do projeto Oncovid/Oncobank.

Em relação aos profissionais da saúde, 15 indivíduos eram técnicos de enfermagem e 55,8% deste grupo possuíam moderado grau de exposição, ou seja, contato indireto com setor COVID-19, e 32,3% possuíam alto grau de exposição, ou seja, contato direto com setor ou pacientes positivos COVID-19. Apenas 12,2% possuía baixo grau de exposição (sem contato com pacientes ou setor COVID-19). É interessante analisar que dos 11 profissionais da saúde que declararam ter alto grau de exposição ao SARS-CoV-2 apenas 3 já tiveram o diagnóstico de COVID-19 embora o alto risco de todos integrantes desse grupo; nesse sentido, embora outras variáveis possam estar atreladas como hábitos de higiene e uso de EPIs, este achado denota a importância de investigar a relação de suscetibilidade de desenvolver a doença a partir de marcadores no genoma dos indivíduos.

Dos 73 participantes recrutados, apenas 12 relataram terem realizado teste reagente para SARS-CoV-2. Destes, 8 eram profissionais da saúde e 4 pacientes

oncológicos. Apenas 1 precisou ser hospitalizado durante 10 dias por conta disso; esse indivíduo, era um paciente oncológico com diagnóstico de Leucemia e sem outras comorbidades. Além disso, apenas 1 indivíduo apresentou um segundo teste reagente para SARS-CoV-2, cerca de 3 meses após a primeira infecção; esse indivíduo era profissional de saúde e como comorbidade relatou apenas sobrepeso.

Esses dados, obtidos através da aplicação de formulários aos indivíduos recrutados, esboçam o perfil social e clínico dos participantes. Após essa etapa, foram realizadas rotinas de extração de RNA total a partir de amostras do trato respiratório superior dos participantes e a subsequente testagem através do método RT-qPCR para detectar a presença do SARS-CoV-2 nas amostras dos recrutados no momento da abordagem. Em nenhuma das 73 amostras foi detectada a presença do vírus. Ainda, a partir da mesma amostra de swab coletada, foi possível a realização da extração de DNA genômico dos participantes, todas as amostras alcançando uma quantidade maior que 50 ng/μl e grau de pureza A260/A280 na faixa de 1,8 e 2,0, ideais para serem utilizadas em técnicas de biologia molecular (BENEVIDES LIMA, 2022) Tanto as amostras de RNA quanto de DNA estão registradas em banco de dados da Unidade de Diagnóstico Molecular COVID-19 da UFPEl, e estocadas em ultra freezer para posterior utilização.

4. CONCLUSÕES

O projeto Oncovid/Oncobank segue em desenvolvimento com novos recrutamentos e, visando contemplar um novo cenário da pandemia, foram adicionadas novas variáveis que não haviam sido previstas inicialmente, como o aumento do número de doses de vacina disponíveis, novas variantes do vírus, novos quadros sintomatológicos apresentados pelos infectados e maior número de reinfecções, para melhor correlação com os dados obtidos.

Mediante comprovação da relação dos marcadores moleculares e a COVID-19, torna-se possível o desenvolvimento de uma plataforma genômica capaz de definir antecipadamente o diagnóstico de suscetibilidade de indivíduos de desenvolverem sintomas da doença, bem como as tendências prognósticas que apresentam, levando ao desenvolvimento de uma medicina individualizada com possível implementação junto ao Sistema Único de Saúde, visando tratamentos adequados às particularidades genômicas individuais e consequente redução dos gastos em saúde.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENEVIDES LIMA, Luina et al. True or false: what are the factors that influence COVID-19 diagnosis by RT-qPCR? **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 22, n. 2, p. 157–167, 2022.
- Centers for disease control and prevention (CDC), 2020. Disponível em <https://www.cdc.gov/>. Acesso em 17 de setembro de 2020
- HOU, Yuan et al. New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis. **BMC medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2020.
- LIANG, Wenhua et al. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 3, p. 335-337, 2020.
- ORTIZ-PRADO, Esteban et al. Clinical, molecular and epidemiological characterization of the SARS-CoV2 virus and the Coronavirus disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 115094, 2020.