

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Yan Cardoso Pimenta

INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE SARS-COV-2 EM FEZES E SWAB-SALIVAR DE CRIANÇAS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM DIARREIA AGUDA OU INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA E CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMOS NOS GENES *ACE* e *ACE2*.

Rio de Janeiro

2022

Yan Cardoso Pimenta

INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE SARS-COV-2
EM FEZES E SWAB-SALIVAR DE CRIANÇAS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM
DIARREIA AGUDA OU INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA E CORRELAÇÃO COM
POLIMORFISMOS NOS GENES *ACE* E *ACE2*.

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Isabella Fernandes Delgado
Marcia Terezinha Baroni de
Moraes e Souza.

Rio de Janeiro

2022

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Pimenta, Yan Cardoso

Inquérito epidemiológico molecular para detecção de SARS-CoV-2 em fezes e swab-salivar de crianças da região amazônica com diarreia aguda ou infecção respiratória aguda e correlação com polimorfismos dos genes *ACE* e *ACE2*. / Yan Cardoso Pimenta. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.
75f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado.

Co-orientadora: Marcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza.

1. SARS-CoV-2. 2. Doença diarreica aguda. 3. Infecção respiratória aguda. 4. SNP. 5. Susceptibilidade. I. Título.

Molecular epidemiological survey for detection of SARS-CoV-2 in feces and saliva swab of children from the Amazon region with acute diarrhea or acute respiratory infection and correlation with *ACE* and *ACE2* gene polymorphisms.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Yan Cardoso Pimenta

INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE SARS-COV-2 EM FEZES E SWAB-SALIVAR DE CRIANÇAS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM DIARREIA AGUDA OU INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA E CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMOS NOS GENES *ACE* E *ACE2*.

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em 30 de junho de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Ana Cristina Martins de A. Nogueira (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marco André Loureiro Tonini (Doutor)
Universidade Federal do Espírito Santo

Vinicius de Frias Carvalho (Doutor)
Instituto Oswaldo Cruz

Isabella Fernandes Delgado (Doutora) - Orientadora
Vice-presidência de Educação, Informação e Comunicação / FIOCRUZ

Marcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza (Doutora) – Co-Orientadora
Instituto Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a meus pais,
meu irmão, minha avó Aurora e a
Isabele, amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder saúde e discernimento para que fosse possível realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da minha bolsa de mestrado.

Ao Instituto Oswaldo Cruz por disponibilizar o espaço e infraestrutura para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais, meu irmão e minha namorada por sempre me apoiarem.

À minha orientadora Dra. Marcia Terezinha Baroni por toda paciência, incentivo, suporte, confiança e todos os ensinamentos desde o período da iniciação científica até aqui.

À minha orientadora Isabella Fernandes Delgado por ter aceitado participar deste projeto, por toda ajuda, dedicação e conhecimento passados durante o período do mestrado.

Ào programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), corpo docente e funcionários da pós-graduação por todos os ensinamentos e suporte em tudo que precisei durante esse tempo.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, membros do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental por todo o apoio e ensinamentos;

A Banca Examinadora composta pelos profissionais: Dra. Ana Cristina Martins de A. Nogueira, Dr. Marco André Loureiro Tonini e Dr. Vinicius de Frias Carvalho.

À constância não consiste sempre
em fazer as mesmas coisas, mas
aquelas que tendem para o mesmo
fim.

Luís XIV.

RESUMO

A COVID-19 é uma doença que causa o comprometimento de vários órgãos do corpo humano. A maioria dos pacientes infectados apresentam sintomas respiratórios, mas diarreia tem sido relatada. Algumas crianças de 0 a 5 anos quando em contato com o SARS-CoV-2 apresentam sintomas gastrointestinais, outras por sua vez, estão sendo internadas com quadros de doença diarreica aguda (DDA) e pneumonia. No entanto, ainda não está claro o papel das crianças como reservatório do SARS-CoV-2. O intestino é um local ativo para a replicação do SARS-CoV-2, isto reforça a importância de se detectar o vírus em amostras fecais assim como em amostras de swab-salivar. O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (*rs4646994*) no gene *ACE* pode causar o aumento da suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2 e à taxa de mortalidade da COVID-19. Além disso, a combinação dos SNP (*rs2285666*) e (*rs4646994*) revela susceptibilidade à hipertensão arterial (HAS). Realizamos um inquérito epidemiológico molecular para detecção de SARS-CoV-2 em crianças de 0 a 3 anos (com DDA e IRA) que vivem na região Amazônica, com associação clínica de diarreia aguda e susceptibilidade à infecção dependente dos SNP (*rs4646994*) e (*rs2285666*) presentes respectivamente nos genes *ACE* e *ACE2* humano. Realizamos a coleta, processamento e extração de ácidos nucleicos totais de 404 amostras de fezes e swab-salivar em paralelo, sendo 202 de crianças com (DDA) e 202 com infecção respiratória aguda (IRA); Detecção molecular do SARS-CoV-2 por qRT-PCR por meio dos genes *E*, *N* e *RdRp* do vírus em todas as amostras, sendo elas, fezes e swab-salivar; Genotipagens por qPCR seguida de análise da curva de fusão da região codificante da *ACE* para a detecção do SNP (*rs4646994*); e detecção do SNP da *ACE2* utilizando DNA cromossomal e perfil de digestão por enzima de restrição. Detectamos 6 amostras de fezes positivas para o gene *E* do SARS-CoV-2, sendo 4 do grupo com DDA e 2 do grupo com IRA. Dos grupos DDA e IRA de swab-salivar, 5 amostras de DDA e 1 de IRA demonstraram positividade para o gene *E* do SARS-CoV-2. Quanto ao SNP no *ACE* (*rs4646994*), detectamos uma maior frequência dos alelos *I/I* em comparação aos alelos *I/D* e *D/D*. Quanto ao SNP no *ACE2*, detectamos uma predominância dos genótipos *GG* e *G*. Concluímos que crianças de 0 a 3 anos da região amazônica não são um reservatório da infecção por SARS-CoV-2. Também concluímos que o *genótipo I/I* do SNP *I/D* (*rs4646994*) na *ACE* é predominante neste grupo estudado e que há uma predominância do *genótipo G* do SNP na *ACE2* que está sendo constantemente associado a susceptibilidade aumentada a HAS.

PALAVRAS-CHAVE: SARS-CoV-2; doença diarreica aguda; infecção respiratória aguda; SNP; susceptibilidade.

ABSTRACT

COVID-19 is a disease that causes the involvement of several organs in the human body. Most infected patients have respiratory symptoms, but diarrhea has been reported. Some children aged 0 to 5 years, when in contact with SARS-CoV-2, have gastrointestinal symptoms, others, in turn, are being hospitalized with acute diarrheal disease (ADD) and pneumonia. However, the role of children as a reservoir of SARS-CoV-2 remains unclear. The intestine is an active site for SARS-CoV-2 replication, which reinforces the importance of detecting the virus in fecal samples as well as salivary swab samples. Single nucleotide polymorphism (SNP) (rs4646994) in the ACE gene may cause increased susceptibility to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 mortality rate. Furthermore, the combination of SNPs (rs2285666) and (rs4646994) reveals susceptibility to arterial hypertension (SAH). We carried out a molecular epidemiological survey for the detection of SARS-CoV-2 in children aged 0 to 3 years (with ADD and ARI) living in the Amazon region, with a clinical association of acute diarrhea and SNP-dependent susceptibility to infection (rs4646994) and (rs2285666) present respectively in the human ACE and ACE2 genes. We performed the collection, processing and extraction of total nucleic acids from 404 stool and salivary swab samples in parallel, 202 from children with ADD and 202 with acute respiratory infection (ARI); Molecular detection of SARS-CoV-2 by qRT-PCR through the E, N and RdRp genes of the virus in all samples, namely, feces and saliva-swab; qPCR genotyping followed by melting curve analysis of the ACE coding region for the detection of the SNP (rs4646994); and detection of ACE2 SNP using chromosomal DNA and restriction enzyme digestion profile. We detected 6 positive stool samples for the SARS-CoV-2 E gene, 4 from the ADD group and 2 from the ARI group. Of the salivary swab ADD and ARI groups, 5 ADD and 1 ARI samples were positive for the SARS-CoV-2 E gene. As for the SNP in ACE (rs4646994), we detected a higher frequency of the I/I alleles compared to the I/D and D/D alleles. As for the SNP in ACE2, we detected a predominance of the GG and G genotypes. We concluded that children aged 0 to 3 years in the Amazon region are not a reservoir of SARS-CoV-2 infection. We also concluded that the I/I SNP genotype I/D (rs4646994) in ACE is predominant in this studied group and that there is a predominance of the SNP genotype G in ACE2 that is constantly being associated with increased susceptibility to SAH.

KEYWORDS: SARS-CoV-2; acute diarrheal disease; acute respiratory infection; SNP; susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da partícula dos coronavírus indicando as principais estruturas morfológicas.....	19
Figura 2: Demonstração das possíveis maneiras de transmissão do SARS-CoV-2 entre humano	22
Figura 3: Desenho esquemático do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	24
Figura 4: Demonstração da relação patógeno (SARS-CoV-2) e o Sistema Renina Angiotensina-Aldosterona.....	25
Figura 5: Perfil de mortalidade causado por doença diarreica aguda em crianças de até 4 anos de idade segundo a distribuição mundial.....	32
Figura 6: Mapa apresentando os estados da região norte do Brasil e a Amazônia.....	34
Figura 7: Mapa que demonstra algumas terras indígenas demarcadas no estado de Roraima .	35
Figura 8: Mapa mostrando a localização do Hospital da Criança Santo Antônio de Boa Vista, Roraima	42
Figura 9: Demonstração de curvas de fusão típicas para os alelos I/I, D/D e I/D.....	46
Figura 10: Mapa mostrando a localização das amostras positivas para SARS-CoV-2.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição dos vírus respiratórios de casos de síndrome gripal atendidos no Hospital da Criança Santo Antônio, 2020	30
Gráfico 2: Distribuição dos vírus respiratórios de casos de síndrome gripal atendidos no Hospital Geral de Roraima, 2020	30
Gráfico 3: Distribuição de vírus respiratório por faixa etária em Roraima, 2020	31
Gráfico 4: Casos notificados de doenças diarreicas agudas em Roraima no período de 2014 a 2020	37
Gráfico 5: Distribuição de casos notificados segundo faixa etária no estado de Roraima entre o período de 2014 e 2020.	38
Gráfico 6: Distribuição dos alelos da ACE SNP I/D (rs4646994) com o sexo das crianças do grupo com doença diarreica aguda	52
Gráfico 7: Distribuição dos alelos da ACE SNP I/D (rs4646994) com o sexo das crianças do grupo com infecção respiratória aguda.....	52
Gráfico 8: Prevalência dos alelos da ACE SNP I/D (rs4646994) em crianças do grupo com doença diarreica aguda em relação ao município que residem	53
Gráfico 9: Prevalência dos alelos da ACE SNP I/D (rs4646994) em crianças do grupo com infecção respiratória aguda em relação ao município que residem	53
Gráfico 10: Prevalência dos alelos no gene ACE2, SNP G8790A (rs2285666) em crianças do sexo feminino em relação ao município que residem.....	56
Gráfico 11: Prevalência dos alelos no gene ACE2, SNP G8790A (rs2285666) em crianças do sexo masculino em relação ao município que residem.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Casos notificados de doenças diarreicas agudas em Roraima no período de 2014 a 2020	37
Tabela 2: Frequência de SARS-CoV-2 nos dois diferentes grupos de crianças com doença diarreica aguda DDA e ou com infecção respiratória aguda IRA a partir de suspensão fecal.	49
Tabela 3: Frequência de SARS-CoV-2 nos dois diferentes grupos de crianças com doença diarreica aguda DDA e com infecção respiratória aguda IRA a partir de swab-salivar.....	49
Tabela 4: Frequência dos alelos no gene ACE2, SNP G8790A (rs2285666) detectados nos grupos com doença diarreica aguda e com infecção respiratória aguda em crianças do sexo feminino.....	55
Tabela 5: Frequência dos alelos no gene ACE2, SNP G8790A (rs2285666) detectados nos grupos com doença diarreica aguda e com infecção respiratória aguda em crianças do sexo masculino.....	55
Tabela 6: Combinação dos genótipos da ACE e ACE2 quanto aos polimorfismos de nucleotídeo único I/D (rs4646994) e G8790A (rs2285666), respetivamente, em crianças do sexo feminino com doença diarreica aguda e com infecção respiratória aguda	57
Tabela 7: Combinação dos genótipos da ACE e ACE2 quanto aos polimorfismos I/D (rs4646994) e G8790A (rs2285666), respetivamente, em crianças do sexo masculino com doença diarreica aguda e com infecção respiratória aguda	58
Tabela 8: Combinação dos genótipos da ACE/ACE2 com a positividade para SARS-CoV-2	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Informações gerais sobre Roraima	35
Quadro 2: Distribuição dos casos notificados de doença diarreica aguda nos municípios do estado de Roraima no período de 2014 a 2020.....	36
Quadro 3: Distribuição de casos notificados segundo faixa etária no estado de Roraima entre o período de 2014 e 2020	38
Quadro 4: Oligonucleotídeos e sondas utilizados para detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real	45
Quadro 5: Ocorrência de sintomas clínicos em todas as amostras SARS-CoV-2 positivas.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIPC	Assentimento Informado para Pesquisa em Crianças
Ang	Angiotensina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARN	Autoridades Reguladoras Nacionais
AT1	Receptor da Angiotensina II tipo 1
AT2	Receptor da Angiotensina II tipo 2
COVID-19	“Coronavirus disease” Doença provocada pelo SARS-CoV-2
Ct	<i>Threshold cycle</i>
D/D	<i>Deleção/Deleção</i>
DCV	Doenças Cardiovasculares
DDA	Doença Diarreica Aguda
DOU	Diário Oficial da União
<i>E</i>	<i>Envelope</i>
ACE	Enzima Conversora de Angiotensina I
ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina II
<i>ACE</i>	Gene da Enzima Conversora de Angiotensina I
<i>ACE2</i>	Gene da Enzima Conversora de Angiotensina II
ESPIN	Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HBGA	Antígenos do Grupo Histo-Sanguíneo
HCSA	Hospital da Criança Santo Antônio
HGR	Hospital Geral de Roraima
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HuNoV	Norovírus Humanos
<i>I/D</i>	<i>Inserção e/ou Deleção</i>
<i>I/I</i>	<i>Inserção/Inserção</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
IRA	Infecção Respiratória Aguda
LVCA	Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental
MDDA	Monitorização das DDA
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MS	Ministério da Saúde

<i>N</i>	<i>Nucleocapsídeo</i>
NIEVS	Núcleo de Informação Estratégica de Vigilância em Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de Base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIB	Produto Interno Bruto
qPCR	PCR Quantitativo
RFLP	Perfil de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
<i>RdRp</i>	<i>RNA-dependent RNA polimerase</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAfd	RNA Fita Dupla
RR	Roraima
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa
RV	Rotavírus
RVA	Rotavírus A
SARS-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2
SESAU	Secretaria de Estado da Saúde
Sivep-DDA	Sistema informatizado de Vigilância Epidemiológica das DDA
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Coronavírus e a doença COVID-19	18
1.2 Sintomas gastrointestinais em pacientes com COVID-19.....	21
1.3 O sistema renina-angiotensina-aldosterona, a enzima conversora de angiotensina I e a enzima conversora de angiotensina II e o SARS-CoV-2	23
1.4 Polimorfismos e sua relação com os genes <i>ACE</i> e <i>ACE2</i>	25
1.5 Panorama geral da COVID-19 no Brasil e no estado de Roraima	27
1.5.1 Dados atuais da COVID-19 no Brasil	27
1.5.2 Legislações pré-vacinação.....	27
1.5.3 Vacinas COVID-19	28
1.5.4 Legislações pós-vacinação	29
1.5.5 Dados atuais da COVID-19 em Roraima	29
1.6 A doença diarreica aguda	31
1.6.1 Informações gerais.....	31
1.6.2 Transmissão.....	32
1.6.3 Principais agentes causadores.....	32
1.6.4 Cenário atual da doença diarreica aguda no Brasil.....	33
1.6.5 Cenário atual da doença diarreica aguda na região norte do Brasil e no estado de Roraima	33
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 Geral	41
3.2 Específicos.....	41
4 METODOLOGIA.....	42
4.1 Declaração Ética.....	42
4.2 Inquérito epidemiológico de detecção de SARS-CoV-2 incluindo informações da coleta	42
4.3 Armazenamento e processamento das amostras.....	43
4.4 Extração de ácidos nucleicos.....	43
4.5 Detecção molecular de SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) em tempo real em amostras de fezes e swab-salivar de crianças com DDA ou IRA	44
4.6 Genotipagem do gene <i>ACE</i> para identificação do SNP <i>I/D</i> (rs4646994).....	45
4.7 Genotipagem do gene <i>ACE2</i> SNP <i>G8790A</i> (rs2285666) por PCR convencional.....	46
4.8 Digestão por endonuclease de restrição <i>AluI</i>	47

5 RESULTADOS	48
5.1. Características das crianças/amostras deste inquérito epidemiológico	48
5.2 Detecção molecular de SARS-CoV-2 em fezes e swab salivar de crianças com doença diarreica aguda ou infecção respiratória aguda	48
5.3 Ocorrência de sintomas clínicos em amostras positivas para SARS-CoV-2.....	50
5.4 Frequência dos alelos <i>I/D</i> , <i>I/I</i> e <i>D/D</i> do gene <i>ACE</i> SNP <i>I/D</i> (<i>rs4646994</i>), em swab salivar de crianças com doença diarreica aguda ou infecção respiratória aguda e correlação com fatores clínicos e populacionais.....	51
5.5 Ocorrência do SNP <i>G8790A</i> (<i>rs2285666</i>) da enzima ACE2 (gene <i>ACE2</i>) em swab salivar de crianças com doença diarreica aguda ou infecção respiratória aguda	54
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO A	73
ANEXO B	74

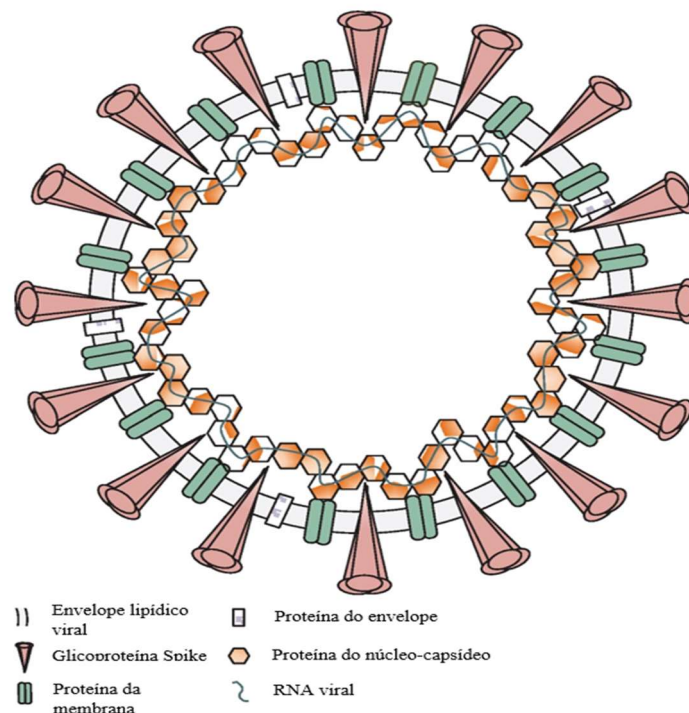
1 INTRODUÇÃO

1.1 Coronavírus e a doença COVID-19

Os coronavírus são um grupo de vírus altamente diverso da família *Coronaviridae*, divididos em quatro gêneros: alfa, beta, gama e delta que infectam mamíferos e pássaros. Em humanos, causam doenças que variam de leve a grave (AZHAR *et al.*, 2019; DROSTEN *et al.*, 2003; HUI e ZUMLA, 2019). Existem coronavírus endêmicos como os alfa-coronavírus 229E e NL63 e os betacoronavírus OC43 e HKU1 que podem causar doenças semelhantes à influenza ou pneumonia em humanos (AZHAR *et al.*, 2019; HUI e ZUMLA, 2019). O vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) responsável por aproximadamente 8000 infecções humanas e 774 mortes em 37 países durante 2002-2003 e o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) que foi primeiramente identificado na Arábia Saudita em 2012 e causador de 2494 casos confirmados de infecção e 858 mortes desde 2012, são coronavírus zoonóticos que causam doenças graves em humanos (LU *et al.*, 2020).

Os coronavírus são envelopados e tem 60 a 140 nm de diâmetro, genoma de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e polaridade positiva de 27 a 32 kilobases (kb) sendo 27,8 kb no caso do SARS-CoV. São os vírus de maior genoma RNA identificado até o momento e com uma taxa média de mutação pequena (1 mutação, valor médio de 0-3) porém que é maior do que normalmente é para a enzima viral transcriptase *RNA-dependent RNA-polimerase (RdRp)*, de 3 mutações (valor médio de 2-5) (PACHETTI *et al.*, 2020). As quatro fases de leitura aberta (*Open reading frame*) do genoma do SARS-CoV dão origem a pelo menos 28 diferentes proteínas. Há espículas glicoprotéicas que se projetam na superfície dos vírus ligando-se ao receptor celular seguindo-se a fusão de membranas (RICHMAN *et al.*, 2016). A Figura 1 mostra uma representação esquemática da estrutura da partícula dos coronavírus indicando as principais estruturas morfológicas.

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da partícula dos coronavírus indicando as principais estruturas morfológicas.



Fonte: (adaptado de POLAND, OVSYANNIKOVA e KENNEDY, 2020).

No final de 2019, detectou-se um surto de pneumonia viral na cidade de Wuhan, província de Hubei na China sem origem conhecida, posteriormente, por meio da técnica de sequenciamento genômico, identificou-se um novo vírus que infecta humanos. A princípio ele foi chamado de 2019 *Novel Coronavirus* (2019-nCoV) que subsequentemente, após análise por sequenciamento do RNA, foi reconhecido como um betacoronavírus SARS-CoV, e em seguida, ele foi denominado de Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2020; ANDERSEN *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2020; SINGHAL, 2020; WHO, 2020). Daí em diante, a quantidade de casos de infecção subiu consideravelmente, chegando a vários países em todo o mundo.

Em 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a doença COVID-19, provocada pelo SARS-CoV-2, uma emergência de saúde pública internacional. Logo em 11 de março de 2020, a OMS decretou estado de pandemia COVID 19 (SOHRABI *et al.*, 2020). Desde então, variantes de SARS-CoV-2 vêm sendo descobertas ao redor do mundo, originadas como um subproduto natural da replicação viral (LAURING e HODCROFT, 2021) e algumas destas vêm sendo apontadas como variantes de preocupação mundial, pois cooperam

para o aumento da transmissibilidade e complicação do contexto epidemiológico nos locais onde foram descobertas (KARIM e OLIVEIRA, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Atualmente 5 variantes de preocupação mundial foram descobertas. São elas: VOC B.1.1.7 (Alpha), Reino Unido; VOC B.1.351 (Beta) África do Sul; VOC B.1.1.28.1 ou P.1 (Gamma), Brasil e VOC B.1.617.2 (Delta), Índia e a mais recente B.1.1.529 (Ômicron), África do Sul (KARIM e OLIVEIRA, 2021; OMS, 2021).

A transmissão deste vírus é realizada face a face. Estudos mostram que espirro, tosse e gotículas excretadas por meio da fala são a maneira mais comum de transmissão viral. Por essas gotículas serem partículas grandes e densas (>5 microns), elas alcançam um metro de distância e a seguir caem no chão (CHU *et al.*, 2020). A transmissão também pode ocorrer por meio de exposição via contato direto (quando há o toque a um indivíduo contaminado em uma região onde se encontra partículas virais); contato indireto (objetos ou superfícies) e aerossóis (gotículas <5nm que se mantém no ar por mais tempo e que são excretadas pela fala, espirro, tosse etc.) (UMAKANTHAN *et al.*, 2020; WIERSINGA *et al.*, 2020).

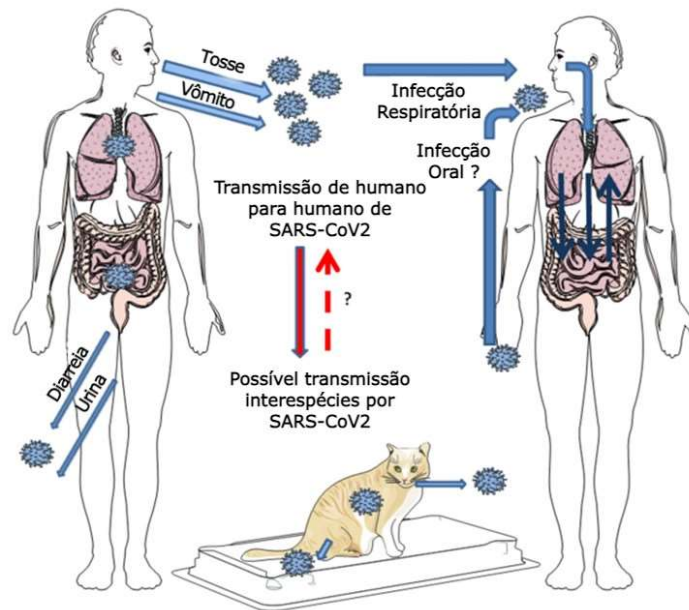
Pessoas infectadas com a COVID-19 podem ter quadros clínicos diferenciados, sendo eles: assintomáticos; com sintomas leves; e com sintomas graves onde há a presença de um quadro de pneumonia, insuficiência respiratória e podendo levar ao óbito (JOLY *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2020). A maioria dos pacientes está na faixa etária acima de 50 anos, embora crianças também sejam afetadas. Dos casos desagregados por idade relatados à OMS de 30 de dezembro de 2019 a 13 de setembro de 2021, crianças menores de 5 anos representaram 1,8% dos casos globais e 0,1% das mortes globais (WHO, 2021). Nesse grupo de pacientes, os sintomas e consequências da infecção parecem ser mais brandos (CASCELLA *et al.*, 2020). Estes indivíduos que apresentam sintomas mais graves podem ter a necessidade de uma internação prolongada e um tratamento mais intensivo (ZHAO *et al.*, 2020). O indivíduo infectado pelo SARS-CoV-2 tem um período de incubação de 2 a 3 ou 5 a 6 dias dependendo da variante (WHO, 2020; LI *et al.*, 2020; CDC, 2021), sendo que a detecção viral no trato respiratório pode ser realizada até 3 dias antes do aparecimento dos sintomas, permitindo que pessoas assintomáticas atestem positividade para o vírus (WHO, 2020). O teste de “Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR)” é normalmente utilizado para diagnóstico da COVID-19 (WIERSINGA *et al.*, 2020), sendo o mesmo, realizado através da detecção dos genes do *Envelope (E)*, *Nucleocapsídeo (N)* ou *RdRp* do SARS-CoV-2 (WHO, 2020).

1.2 Sintomas gastrointestinais em pacientes com COVID-19

Desde o começo da pandemia provocada pelo SARS-CoV-2, diversos estudos relatam a existência de sintomas gastrointestinais, como diarreia, em pacientes com COVID-19 (CHEUNG *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020; PAN *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020). Como por exemplo o estudo de PAN *et al.*, (2020) realizado com 204 pacientes adultos com COVID-19 diagnosticados por RT-PCR em tempo real. Neste estudo, 50,5% dos pacientes relataram sintomas digestivos, sendo 34% diarreia. No trabalho de WALKER *et al.*, (2020) realizado com 318 adultos com COVID-19 em Massachusetts, EUA, 61,3% (n=195) dos pacientes relataram pelo menos um sintoma gastrointestinal. Em outro estudo na Califórnia, EUA envolvendo 116 adultos com SARS-CoV-2, 31,9% (n=37) se queixaram de sintomas gastrointestinais, sendo 10,3% (n=12) com diarreia (CHOLANKERIL *et al.*, 2020). A maioria das crianças novas, quando em contato com o SARS-CoV-2, desenvolvem o quadro da doença de forma assintomática ou leve, com presença de sintomas gastrointestinais (WHO, 2021). Um estudo envolvendo 628 crianças com SARS-CoV-2 revelou que 40,9% (n=257) das crianças apresentaram sintomas gastrointestinais durante o curso da doença. 74,7% (n=192) estavam com gastroenterite leve a moderada, sendo que a diarreia ocorreu em 55,7% (n=107) dos casos (LO VECCHIO *et al.*, 2021).

Já se sabe que o SARS-CoV-2 é excretado por pessoas infectadas via tosse, vômito, fezes e urina, sendo as vias aéreas o principal modo de transmissão de humano para humano (DEVAUX, LAGIER e RAOULT, 2021), havendo estudos que sugerem que outras vias de transmissão, além da respiratória, podem ser possíveis (TIAN *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020). Há a teoria de que após infectar o trato respiratório, o SARS-CoV-2 pode deixar os pulmões via circulação para induzir focos secundários em outros órgãos do corpo humano, incluindo o trato gastrointestinal (Figura 2) (DEVAUX, LAGIER e RAOULT, 2021).

Figura 2: Demonstração das possíveis maneiras de transmissão do SARS-CoV-2 entre humanos.



Fonte: (Adaptado de DEVAUX, LAGIER e RAOULT, 2021).

Não se sabe exatamente como o vírus infecta o intestino. Tal mecanismo de infecção pode ocorrer tanto pela corrente sanguínea (com ou sem estágio hepático) quanto pela via oral-intestinal (da traqueia ao esôfago e intestino) (DEVAUX, LAGIER e RAOULT, 2021). O trabalho de Leung *et al.*, (2003) revela um tropismo do SARS-CoV pelo trato gastrointestinal por meio da detecção do mesmo em amostras de fezes e biópsia intestinal. O aparecimento de RNA de SARS-CoV-2 nas fezes desperta uma atenção para a possibilidade de transmissão do SARS-CoV-2 pela via fecal-oral e sugere também a expectativa de se empregar essa amostra biológica para realizar diagnósticos. Esta possibilidade se apoia no fato de pesquisadores terem observado que a positividade em amostras de fezes pode preceder a detecção em amostras respiratórias (TAN *et al.*, 2020) e permanecer positiva após diminuição dos sintomas (LING *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). Trabalhos relatam que o SARS-CoV-2 pode alternar entre humanos e animais, como por exemplo, um estudo realizado com martas na Holanda (ORESHKOVA *et al.*, 2020) e relatos de transmissão do vírus de homem para gato e de gato para gato (está sendo via transmissão respiratória) (GARIGLIANY *et al.*, 2020; BARRS *et al.*, 2020; NEWMAN *et al.*, 2020; SAILLEAU *et al.*, 2020; RUIZ-ARRONDO *et al.*, 2020; SEGALÉS *et al.*, 2020; HOSIE *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 apresenta como proteína de superfície uma glicoproteína (proteína S) responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira, permitindo sua entrada (CHEN *et al.*,

2020). O vírus tem como principal alvo as células epiteliais nasais e brônquicas e pneumócitos, onde há a presença, nessas células, da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) expressa pelo gene *ACE2*. Para entrar na célula, o vírus utiliza o receptor da ACE2 como porta de entrada, gerando assim uma resposta inflamatória viral. (HOFFMANN *et al.*, 2020; WIERSINGA *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2020; BÉRANGÈRE *et al.*, 2020). Estudos relatam a expressão de ACE2 em uma série de órgãos como pulmão, coração, esôfago, rins, bexiga e intestino, inclusive estes, demonstrando ser os órgãos mais vulneráveis à infecção pelo SARS-CoV-2 (TIAN *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020; BOURGONJE *et al.*, 2020), e por este motivo, atualmente a COVID-19 pode ser considerada uma doença sistêmica (que causa comprometimento de vários órgãos do corpo humano) embora vinculada inicialmente à uma infecção do trato respiratório inferior (CASCELLA *et al.*, 2020).

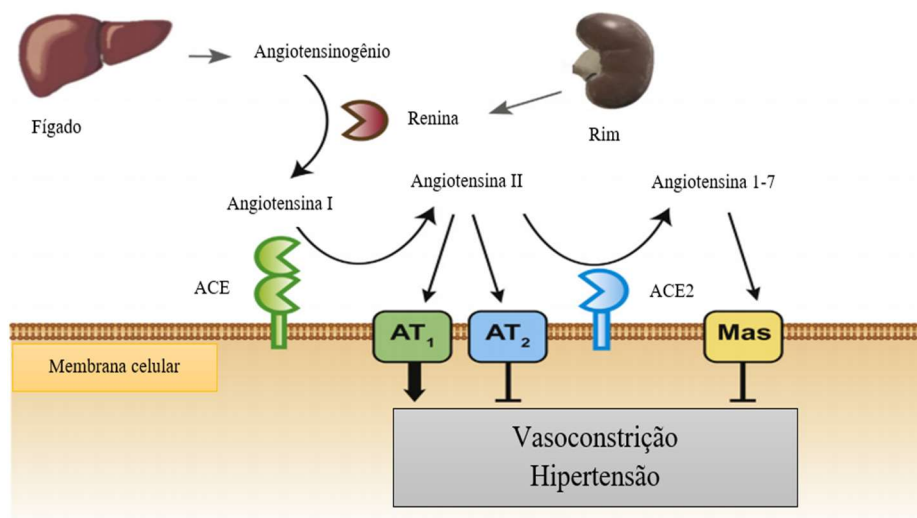
1.3 O sistema renina-angiotensina-aldosterona, a enzima conversora de angiotensina I e a enzima conversora de angiotensina II e o SARS COV 2

A Enzima conversora de angiotensina I (ACE) e seu homólogo recentemente encontrado, Enzima conversora de angiotensina II (ACE2) (TIPNIS *et al.*, 2000; DONOGHUE *et al.*, 2000), são as enzimas chave do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA). Ambas se contrabalançam na regulação da pressão arterial (BURRELL *et al.*, 2004). O SRAA regula diversas funções do corpo em nível sistêmico ou localmente em uma série de órgãos (LAMBERT, CLARKE e TURNER, 2010). Dentro do SRAA, a regulação é realizada por meio de uma cascata de proteases que geram diversos peptídeos bioativos. Uma glicoproteína chamada angiotensinogênio é produzida e secretada pelo fígado e clivada pela renina, que é gerada pelo aparelho justaglomerular presente no rim, dando origem ao peptídeo angiotensina I (Ang I) (Figura 3) (KUBA, IMAI e PENNINGER, 2013).

A Ang I pode ser convertida em angiotensina II (Ang II) pela ACE (Figura 3). A ACE é expressa em células endoteliais da vasculatura e localmente em uma série de tecidos, como pulmão, coração, rim e cérebro (IMAI *et al.*, 2010). A Ang II é o principal elemento bioativo no SRAA e sinaliza por meio dos receptores acoplados à proteína G, o receptor da angiotensina II tipo 1 (AT1) e o receptor da angiotensina II tipo 2 (AT2) (IMAI *et al.*, 2010). A sinalização por AT1 tem função mediadora dos efeitos vasoconstritores e de hipertensão, enquanto a ativação do receptor AT2 ativa uma cascata vasodilatadora (Figura 3) (CAREY e PADIA, 2008). A Ang II também pode ser processada pela ACE2 para formar o peptídeo Angiotensina

1-7 (Ang 1-7), a qual tem ação de controlar a pressão arterial sanguínea (BURRELL *et al.*, 2004). A Ang 1-7, por sua vez, se liga ao receptor Mas (SANTOS *et al.*, 2003) para neutralizar a atividade da ligação da Ang II ao AT1. Portanto, o eixo ACE2/Ang 1-7/Mas é considerado um contra-regulador do SRAA, se opondo à atividade do eixo ACE/Ang II/AT1 (SANTOS *et al.*, 2013). Além de sinalizar através do receptor Mas, A Ang 1-7 também pode atuar como um antagonista do receptor AT1, portanto, neutralizando ainda mais o eixo ACE/Ang II/AT1 (GIRONACCI, COBA e PENA, 1999; ROWE *et al.*, 1995).

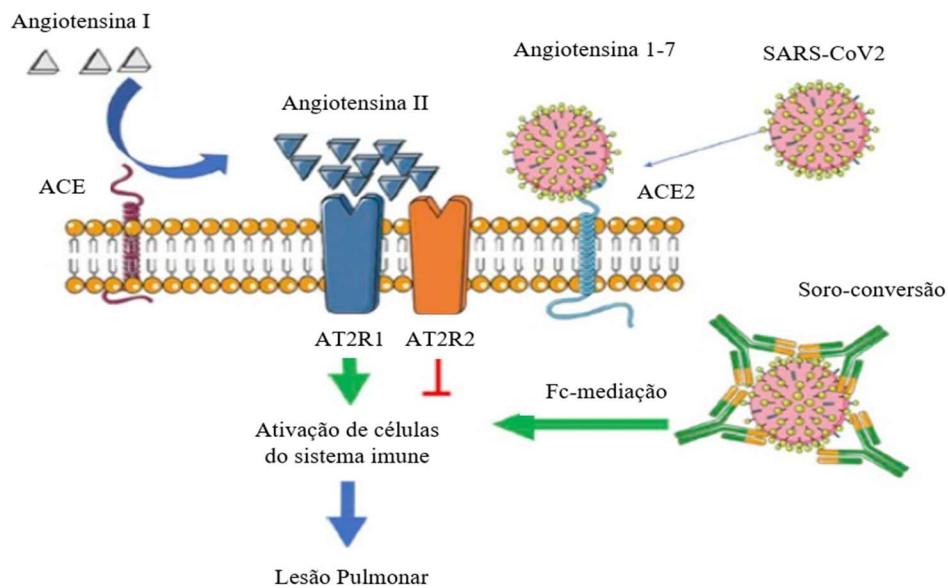
Figura 3: Desenho esquemático do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.



Fonte: (Adaptado de PERLOT e PENNINGER, 2013).

O SARS-CoV utiliza a ACE2 como receptor para ligação à espícula (ZOU *et al.*, 2020) e ao entrar na célula alvo através deste receptor, causa a desregulação (*downregulation*) da expressão dos receptores AT2, por consequência, há uma ativação exacerbada de Ang II, devido à falta do eixo contra regulatório ACE2/Ang 1-7/Mas (Figura 4) (ZOU *et al.*, 2020). A ligação de Ang II aos receptores AT2 está associada à ativação de células do sistema imune e a produção de citocinas inflamatórias (Figura 4) (BERNSTEIN *et al.*, 2018).

Figura 4: Demonstração da relação patógeno (SARS-CoV-2) e o Sistema Renina Angiotensina-Aldosterona.



Fonte: (Adaptado de RIVELLESE e PREDILETTO, 2020).

1.4 Polimorfismos e sua relação com os genes *ACE* e *ACE2*

Polimorfismo de um gene é definido quando uma mutação atinge numa determinada população uma frequência superior a 1%. Existem vários tipos de polimorfismos. A mudança de um único nucleotídeo por outro (originando diferentes alelos), é chamada de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*) (DHAFER *et al.*, 2019). Há o surgimento de novos estudos com foco em estudar SNP que acometem os integrantes do SRAA, especificamente os genes *ACE* e *ACE2*. Um dos motivos para estes estudos, é o surgimento de evidências acerca da influência de SNP nos genes *ACE* e *ACE2* no aumento da susceptibilidade de indivíduos de diferentes idades e populações para o agravamento da infecção por SARS-CoV-2, concomitante com a susceptibilidade aumentada à hipertensão arterial sistêmica (HAS) (YAMAMOTO *et al.*, 2020; PINHEIRO *et al.*, 2019; VERMA *et al.*, 2021). A HAS é uma das principais causas de doenças cardiovasculares (DCV), chegando a atingir uma prevalência de 30% na população mundial (MILLS, 2015). Não há um consenso na literatura, porém a HAS é alvo de diversos estudos que investigam a relação da mesma com infecção por SARS-CoV-2 e casos graves de COVID-19 (WHO, 2021).

Dentre os diversos SNP que acometem os genes *ACE* e *ACE2*, o SNP de *inserção e/ou deleção (I/D)* (*rs4646994*) no gene *ACE* é um dos mais estudados (RIGAT *et al.*, 1990;

PINHEIRO *et al.*, 2019; YAMAMOTO *et al.*, 2020). O gene *ACE* se encontra no cromossomo 17q23.3 e o polimorfismo *I/D* está relacionado à presença/ausência de uma sequência *Alu* de 287 pares de base (pb) no íntron 16 do gene (RIGAT *et al.*, 1990). Pessoas com o *perfil Deleção/Deleção (D/D)* para o *ACE SNP (rs4646994)* exibiram os mais elevados níveis de ACE no sangue, e esse aumento da expressão explicaria o maior risco de doenças cardiovasculares e respiratórias entre homocigotos para deleção. Este polimorfismo é constantemente associado ao risco de incidência, morbidade e mortalidade em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) por alguns autores, e também com a progressão da pneumonia na SARS-CoV (MARSHALL *et al.*, 2002, MATSUDA *et al.*, 2012, VILLAR *et al.*, 2008, ITOYAMA *et al.*, 2004). A maioria das evidências presentes na literatura apoiam a hipótese de que o *perfil D/D* causa o agravamento dos sintomas da COVID-19, enquanto o *perfil Inserção/Inserção (I/I)* demonstra um papel protetor frente a infecção pela COVID-19 (YAMAMOTO *et al.*, 2020). Um estudo epidemiológico na população de 26 países asiáticos mostrou que o alelo *D* está associado à suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2 e à taxa de mortalidade (PATI *et al.*, 2020) e novos estudos publicados em 2022 continuam relatando a associação do *perfil ACE D/D* com a gravidade da COVID-19 (ALSAYED e MIR, 2022; PATEL *et al.*, 2022).

Além de estudos realizados com o SNP *I/D (rs4646994)* no gene *ACE*, há estudos mais recentes como por exemplo o de Sabater *et al.*, (2022) realizado com 318 pacientes adultos do sexo masculino com COVID-19 que indica a associação do SNP *G8790A (rs2285666)* presente na enzima ACE2, gene *ACE2*, a um risco aumentado de hospitalização e um curso de gravidade da COVID-19. Também há estudos como o de Pinheiro *et al.*, (2019) que mostram que a combinação do genótipo *ACE (D/D)* e alelo *G do SNP G8790A (rs2285666)* ACE2, demonstra uma importante susceptibilidade à HAS no sexo feminino. O alelo *D* e o *perfil D/D* do SNP *rs4646994* no gene *ACE*, também é constantemente associado com o aumento da pressão arterial e/ou hipertensão (LI, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2020).

O gene *ACE2* está presente no cromossomo X e diversos SNP são constantemente estudados como fatores de risco para hipertensão e insuficiência cardíaca (VAN DER MERWE *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2018; LU *et al.*, 2012; CHIU *et al.*, 2004). O fato da ACE2 estar presente no cromossomo X tem sido associado à um prejuízo para portadores do sexo masculino e poderia explicar a maior prevalência de COVID-19 grave no sexo masculino (OUDIT *et al.*, 2009).

Diversos estudos evidenciam que polimorfismos presentes no gene *ACE2* podem aumentar a expressão dos receptores ACE2 ocasionando um maior risco de hospitalização de pacientes com COVID-19. Alguns autores também sugerem que SNP presentes no gene *ACE2* podem influenciar na susceptibilidade de desenvolver lesão pulmonar grave e estar relacionado à sintomas neurológicos em pacientes com COVID-19, além de elevar o risco de hospitalização por meio da maior quantidade de expressão dos receptores ACE2 nestes mesmos pacientes com a doença (ZHENG e CAO, 2020; STRAFELA *et al.*, 2020; ABOBAKER, NAGIB e ALSOUFI, 2021). Outras publicações sugerem que a hipertensão, obesidade, sexo masculino, tabagismo e origem/etnia podem causar um grande impacto na expressão do gene *ACE2* e conseqüentemente contribuir para um quadro mais grave da COVID-19 (HAMET *et al.*, 2021; PAIM *et al.*, 2021).

1.5 Panorama geral da COVID-19 no Brasil e no estado de Roraima

1.5.1 Dados atuais da COVID-19 no Brasil

Dados atualizados em 20/05/2022 em todo o mundo para a COVID-19 são de 524.048.160 casos com 6.273,518 mortes e 11.755.083.904 doses de vacinas aplicadas. 4.706.044.430 (60,5% da população) estão totalmente vacinadas. O Brasil é o terceiro país com maior número de casos notificados correspondendo a 30.701.900 (em 20/05/2022) e segundo país com maior número de mortes, com 665.216 vítimas até a data mencionada. No Brasil já foram aplicadas 436.936.651 doses das vacinas e 165.448.319 (78,3% da população) estão totalmente vacinadas (WHO, 2022).

1.5.2 Legislações pré-vacinação

No dia 4 de fevereiro de 2020, foi publicado no Diário Oficial da União (DOU) do Brasil, a portaria nº 188 que declarou o estado de Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) que foi um ato normativo que providenciou a criação de diversas medidas de prevenção, controle e contenção adotadas para o enfrentamento da pandemia e que tem como uma das considerações, a necessidade da investigação local e demanda por uma resposta coordenada das ações de saúde de competência da vigilância e atenção à saúde, entre as três esferas de gestão do Sistema Único de Saúde (SUS) em decorrência da infecção humana pelo SARS-CoV-2.

Em 6 de fevereiro de 2020, a Lei de nº 13.979 publicada no DOU, declarou que para enfrentamento da emergência de saúde pública provocada pelo SARS-CoV-2, as autoridades podem adotar medidas como: isolamento; quarentena; determinação de realização compulsória de exames médicos, testes laboratoriais, coleta de amostras clínicas, vacinação e outras medidas profiláticas, tratamento médicos específicos, uso obrigatório de máscaras de proteção individual, estudos/investigações epidemiológica dentre outras medidas (BRASIL, 2020). Em 25 de fevereiro de 2020 detectou-se o primeiro caso de infecção por SARS-CoV-2 no Brasil (JESUS *et al.*, 2020).

1.5.3 Vacinas COVID-19

Até fevereiro de 2022, a OMS concedeu autorização às vacinas da Pfizer/BioNTech, AstraZeneca/Oxford, Janssen, Moderna, Sinopharm, Sinovac (CoronaVac), Bharat e Novavax. Outras vacinas ainda estão passando pelo processo de avaliação (OPAS, 2022).

Atualmente temos 4 vacinas para COVID-19 sendo ministradas no Brasil via calendário nacional de imunização. São elas: AstraZeneca/Oxford (ChAdOx1) de 2 doses, Pfizer/BioNTech (BNT162b2) de 2 doses, Janssen (Ad26.COV2.S) de 1 dose e CoronaVac de 2 doses, sendo a CoronaVac, a única que só tem aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apenas para uso emergencial, podendo deixar de ser aplicada no país, visto que a ANVISA está revisando as normativas sanitárias em resposta à pandemia, incluindo as resoluções que tratam do uso emergencial de vacinas e de medicamentos específicos para a COVID-19 (G1, 2022). De acordo com o Calendário Nacional de Imunização (2022), crianças de 0 a 5 anos ainda não estão sendo vacinadas enquanto crianças e adolescentes (de 5 a 17 anos) e em gestantes, são aplicadas apenas as vacinas de 2 doses (AstraZeneca, Pfizer e CoronaVac), já em adultos e idosos a partir de 18 anos, são aplicadas tanto as vacinas de 2 doses (AstraZeneca, Pfizer e CoronaVac) quanto a vacina de 1 dose (Janssen). Uma dose está sendo aplicada em adolescentes de 12 a 17 anos e jovens acima de 18 anos enquanto adultos e idosos acima de 50 anos e imunossuprimidos acima de 18 anos já estão recebendo uma quarta dose (MS 2022; CNN, 2022).

1.5.4 Legislações pós-vacinação

Tendo em vista a diminuição do número de casos e mortes de COVID-19 no Brasil, algumas leis, decretos, portarias e resoluções com o objetivo de diminuir/flexibilizar as medidas de combate à COVID-19 vem sendo publicadas no DOU. Como por exemplo, a portaria interministerial 17/2022 assinada pelo Ministério do Trabalho e Previdência e o Ministro da Saúde no dia 1 de abril de 2022 que revogou a portaria 14/2022, que ainda previa a obrigatoriedade de uso de máscara no ambiente do trabalho. Dentre as principais medidas deste documento, está a flexibilização do uso de máscaras em ambientes de trabalho sendo dispensado o uso e fornecimento de máscaras cirúrgicas ou de tecido em estados ou municípios que deixaram de exigir o uso em ambientes fechados. A portaria estabelece ainda que, se houver a elevação no número de casos da COVID-19 localmente, essa medida deve ser reavaliada e o equipamento terá que ser fornecido para os trabalhadores (BRASIL, 2022).

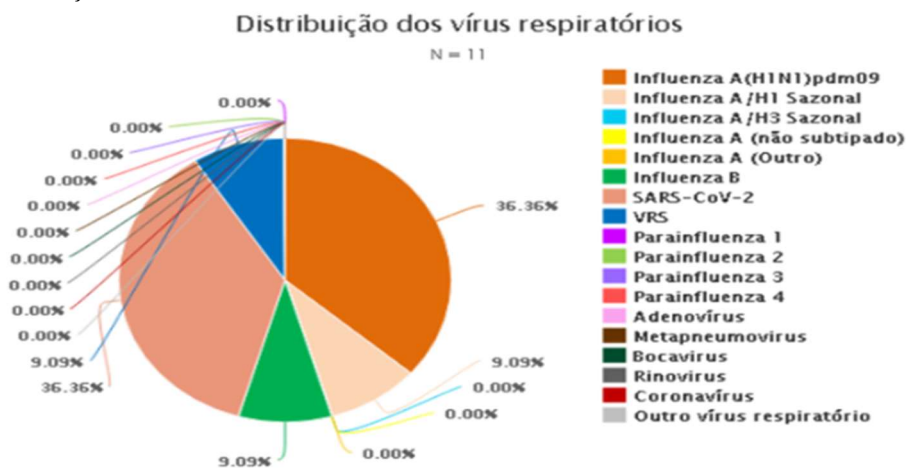
Por meio de uma portaria assinada pelo ministro de saúde no dia 22 de abril de 2022, o MS declarou o fim da ESPIN provocada pela COVID-19. Esta portaria revoga a portaria que estava em vigor desde fevereiro de 2020. Como justificativa para tal ação, o MS mencionou a capacidade de resposta do SUS, a melhora no cenário epidemiológico no país e o avanço da campanha de vacinação (BRASIL, 2022). De acordo com o MS, o Brasil tem uma diminuição de mais de 80% na média móvel de casos e óbitos pela COVID-19, se comparado ao pico de casos provocados pela variante Ômicron no começo do ano de 2022. Cerca de 81% da população brasileira já tomaram a primeira dose, 74% estão com o esquema vacinal primário completo e 74 milhões de indivíduos já tomaram a dose de reforço. O MS também relata que a alta cobertura vacinal dos brasileiros foi fundamental para a diminuição da transmissão da COVID-19 e prioridade no combate à pandemia (BRASIL, 2022).

1.5.5 Dados atuais da COVID-19 em Roraima

A vigilância da COVID-19 em Roraima (RR) é realizada pelo Núcleo de Informação Estratégica de Vigilância em Saúde (NIEVS). Pelo SARS-CoV-2 ser um vírus que causa Infecção Respiratória Aguda (IRA), a doença COVID-19 foi incluída no sistema de vigilância epidemiológica da influenza. De acordo com a Secretaria de Estado da Saúde (SESAU) através do Relatório Epidemiológico Anual de Roraima (2020), há duas unidades sentinelas para influenza no estado de RR, o Hospital Geral de Roraima (HGR) e o Hospital da Criança Santo

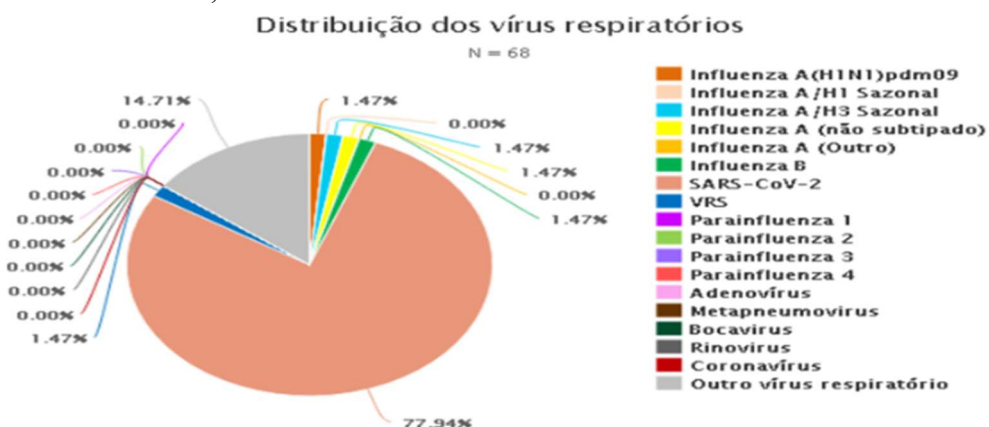
Antônio (HCSA) que são responsáveis por fazer as coletas de amostras de pacientes com síndrome gripal por semana epidemiológica. Em 2020, por conta da pandemia do SARS-CoV-2, as vigilâncias dos vírus respiratórios foram lesadas. Os Gráficos 1 e 2 mostram a distribuição dos vírus respiratórios de casos de síndrome gripal atendidos no HCSA e no HGR respectivamente, ambos no ano de 2020 enquanto o Gráfico 3 mostra a distribuição de vírus respiratório por faixa etária em RR neste mesmo ano. Até o presente momento, não houve a publicação do Relatório Epidemiológico Anual de RR referente ao ano de 2021.

Gráfico 1: Distribuição dos vírus respiratórios de casos de síndrome gripal atendidos no Hospital da Criança Santo Antônio, 2020.



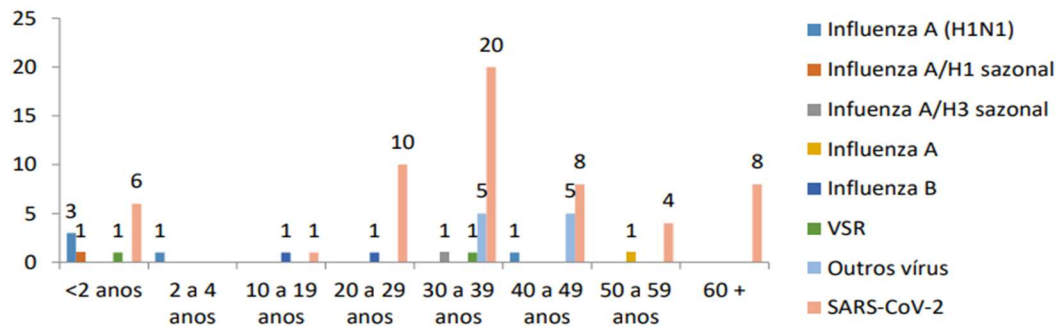
Fonte: (SESAU, 2020).

Gráfico 2: Distribuição dos vírus respiratórios de casos de síndrome gripal atendidos no Hospital Geral de Roraima, 2020.



Fonte: (SESAU, 2020).

Gráfico 3: Distribuição de vírus respiratório por faixa etária em Roraima, 2020.



Fonte: (SESAU, 2020).

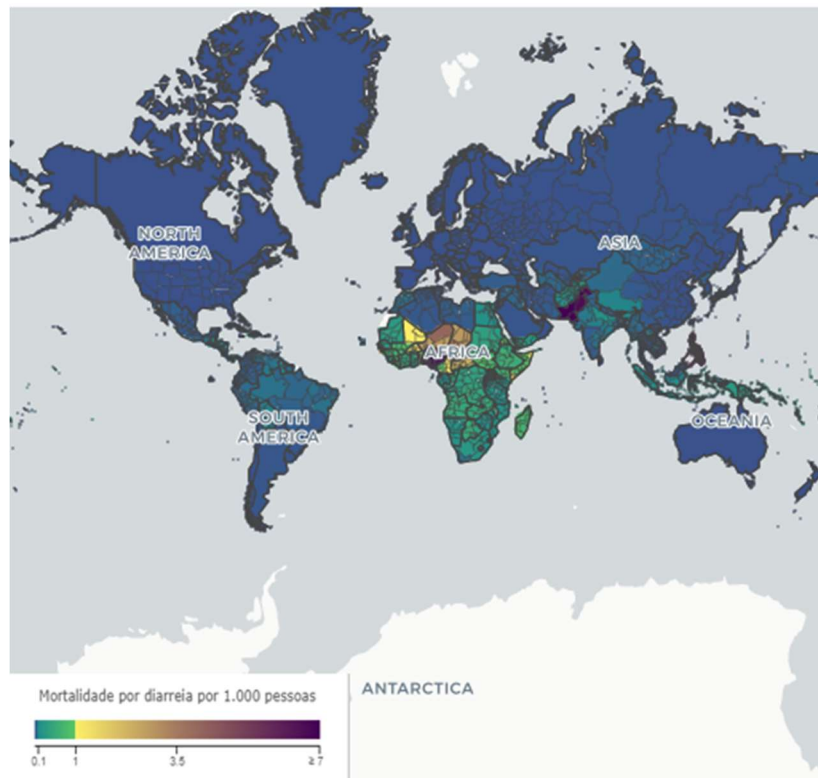
1.6 A doença diarreica aguda

1.6.1 Informações gerais

A doença diarreica aguda (DDA) ou gastroenterite aguda (GA) é uma infecção no trato gastrointestinal causada por diferentes agentes etiológicos. A DDA ou GA, tem como característica o aumento da quantidade de evacuações, com fezes aquosas e de baixa consistência (CHEN *et al.*, 2015). Apesar dos avanços nas estratégias de saneamento e prevenção terem provocado uma redução significativa na taxa de mortalidade por DDA de 15% em 2008 para cerca de 9% em 2015, a DDA ainda mata aproximadamente 500 mil crianças de 0 a 5 anos por ano no mundo (ALCALÁ *et al.*, 2018). Supõe-se que a cada ano 2,5 bilhões de casos de diarreia ocorrem em crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 2018). De acordo com dados do MS, no período de 1995 a 2005, ocorreram 39.421 mortes por diarreia e 1.505.800 internações associadas a esta doença em crianças com menos de um ano de idade no Brasil (OLIVEIRA e LATORRE, 2010).

A DDA é mais frequente em crianças de regiões do mundo com baixa e média renda que vivem sem saneamento básico, sem condições nutricionais apropriadas e sob condições de má qualidade da água potável (KOSEC, BERN e GUERRANT, 2003). A Figura 5 mostra o perfil de mortalidade causado por DDA segundo a distribuição global.

Figura 5 - Perfil de mortalidade causado por doença diarreica aguda em crianças de até 4 anos de idade segundo a distribuição mundial.



Fonte: (Adaptado de INSTITUTO DE MÉTRICA E AVALIAÇÃO DA SAÚDE, 2019).

1.6.2 Transmissão

A DDA pode ser transmitida por via fecal-oral de forma direta, quando é por contato entre humanos ou de animais para humanos, ou de forma indireta, quando se ingere água/alimentos contaminados ou se tem contato com objetos contaminados. De acordo com GRYTDAL *et al.*, (2017), há um maior risco de transmissão em locais de uso comum como hospitais, creches, penitenciárias e escolas. A DDA provoca desidratação intensa o que a leva a ser uma das principais causas de morte infantil em todo o mundo, com uma taxa de mortalidade em crianças superior ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), malária e sarampo juntos (TROEGER *et al.*, 2018).

1.6.3 Principais agentes causadores

A DDA em crianças pode ser provocada por diversos tipos de enteropatógenos; porém a DDA é mais frequentemente relacionada aos Rotavírus A (RVA) e Norovírus Humanos

(HuNoV). Estes patógenos virais foram identificados como os principais responsáveis pela mortalidade e morbidade relacionada à diarreia em crianças (KANG, 2006).

1.6.4 Cenário atual da doença diarreica aguda no Brasil

No ano de 1990 a DDA ocupava a posição de 8º maior causa de morte no Brasil (BRASIL, 2017). Tendo em vista esse cenário, em 1992 se fez necessária a implementação de um programa de vigilância sentinela denominado de Monitorização das DDA (MDDA), posteriormente designada como vigilância epidemiológica das DDA e regulamentada pela Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017. A MDDA foi implementada com o intuito de acompanhar o perfil epidemiológico dos casos de DDA para identificar de forma prévia surtos referentes ao acometimento entre crianças com menos de cinco anos a patógenos virulentos e epidêmicos e a casos de vulnerabilidade social, como nos casos de secas, inundações e desastres naturais. A partir de 2006, os casos atendidos nas unidades de saúde sentinelas são registrados no Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica das Doenças Diarreicas Agudas (BRASIL, 2017).

Tendo em vista a atuação da MDDA em conjunto com o sistema nacional de saúde, em 2010 a DDA deslocou-se de 8ª para 30ª causa de morte, expondo uma diminuição em torno de 82%, o que demonstra a importância do acompanhamento dos casos de DDA (BRASIL, 2017). Mesmo com essa considerável diminuição dos casos, a DDA continua sendo responsável por causas alarmante de óbitos, especialmente em locais do país com saneamento básico inapropriado, falta de atendimento clínico-hospitalar e um sistema de notificação precário. No cenário nacional, isso são características que afetam principalmente a região norte do país (BRASIL, 2017).

1.6.5 Cenário atual da doença diarreica aguda na região norte do Brasil e no estado de Roraima

Com um território de 3.853.322,2 quilômetros quadrados, a região norte é a maior parte do território brasileiro constituindo 45% da área total do país. Ela é formada pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins e se encontra entre o maciço das Guianas, Planalto Central, a Cordilheira dos Andes, e o Oceano Atlântico. Embora a grande área territorial, o Norte é a região menos habitada do país, sua densidade demográfica é

de 4,1 habitantes por metro quadrado, sendo a menor do Brasil (IBGE, 2011). A região norte está situada dentro da região amazônica e a Amazônia Brasileira corresponde a todos os estados citados anteriormente além dos estados do Maranhão e Mato Grosso como demonstra a Figura 6.

Figura 6: Mapa apresentando os estados da região norte do Brasil e a Amazônia.



Fonte: (adaptado de: CROPLIFE, 2020).

Na região norte do Brasil há alguns problemas sociais, tais como falta de saneamento básico, grande taxa de analfabetismo (por volta de 10% dos habitantes) e mortalidade infantil (cerca de 23,5 mortes a cada mil nascidos vivos) (IBGE, 2015). Além disso, há diversas dificuldades de logística para a realização do atendimento e tratamento da população. Na região norte, há um grande número de cidades menores afastadas dos grandes centros urbanos e povos indígenas em regiões remotas, onde não se tem boa infraestrutura hospitalar e é de difícil acesso. Esses são fatores limitantes para o transporte de pacientes para o recebimento de atendimento médico e também para a distribuição de vacinas e medicamentos, por precisarem de refrigeração ou condições apropriadas para manter a integridade e eficácia do produto, até esta população. Dados do Sivep – DDA (Sistema informatizado de Vigilância Epidemiológica das DDA) apontam que os casos de DDA notificados na região Norte representam 13% do total de casos notificados no país, levando em consideração o período de 2007 a 2015, ocorrendo especialmente nos meses de janeiro a maio (BRASIL, 2017).

O estado de RR conta com 652.713 habitantes e produto interno bruto (PIB) de R\$ 9,027 bilhões, segundo estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE). É o estado com menor número de habitantes e tem o menor PIB não só da região Norte como do país. O quadro 1 mostra algumas informações gerais de RR.

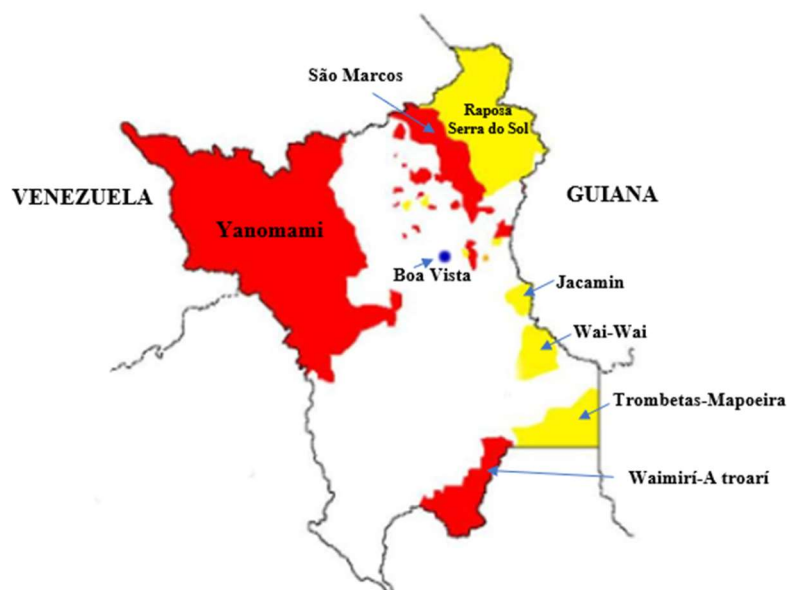
Quadro 1: Informações gerais sobre Roraima.

Capital	Boa Vista
Área Territorial	223.644,530 km ² [2021]
População estimada	652.713 pessoas [2021]
Densidade demográfica	2,01 hab/km ² [2010]
IDH Índice de desenvolvimento humano	0,707 [2010]
Rendimento mensal domiciliar per capita	R\$1.046 [2021]

Fonte: (Adaptado de IBGE, 2022).

RR se encontra em uma região periférica da Amazônia Brasileira, no noroeste da região Norte do Brasil, e faz fronteira com a Venezuela ao norte e noroeste e com a República Cooperativa da Guiana ao leste. Em meio a diversidade étnica de brasileiros e estrangeiros, de ambos os países vizinhos que habitam em RR, ele abrange uma grande população indígena, composta por cerca de 46.106 pessoas, sendo o estado do Brasil no qual há a maior população indígena residindo em terras demarcadas, com 83,2%, dividindo-se entre as tribos conhecidas como Yanomami, Inaricó, Macuxi, Patamona, Taurepang, Waimiri-Atroari, Wai-Wai e Wapixana. A Figura 7 apresenta um mapa com as terras indígenas demarcadas no estado de RR (dados do IBGE).

Figura 7: Mapa que demonstra algumas terras indígenas demarcadas no estado de Roraima.



Fonte: (Adaptado de: IBGE, 2016).

Em sua maioria, as terras indígenas demarcadas ficam localizadas distante dos centros urbanos, e por consequência, de hospitais. As crianças que habitam as comunidades indígenas são constantemente afetadas por infecções respiratórias, em razão das ações de queimadas provocadas por garimpeiros e contaminação por patógenos, e por DDA, visto que há falta de hábitos higiênicos e saneamento básico facilitando a propagação dos patógenos responsáveis por esse adoecimento (KOSEC, BERN e GUERRANT, 2003; ABCONSINDCON, 2020; SOUZA *et al.*, 2010). Com o intuito de atender as necessidades das crianças indígenas do estado de RR, Venezuela e República Cooperativa da Guiana, no ano 2000 foi inaugurado o HCSA em Boa Vista, capital de RR, sendo o único hospital infantil da rede pública de RR e referência do SUS.

No período de 2014 a 2020 houve a notificação de 166.507 casos de DDA em RR por meio do preenchimento das planilhas da área técnica e do Sivep-DDA. 2019 foi o ano com maior predominância, totalizando 31.980 casos enquanto 2020 apresentou o menor número de casos (n=15.212) como mostra o Quadro 2 (SESAU, 2020).

Quadro 2: Distribuição dos casos notificados de doença diarreica aguda nos municípios do estado de Roraima no período de 2014 a 2020.

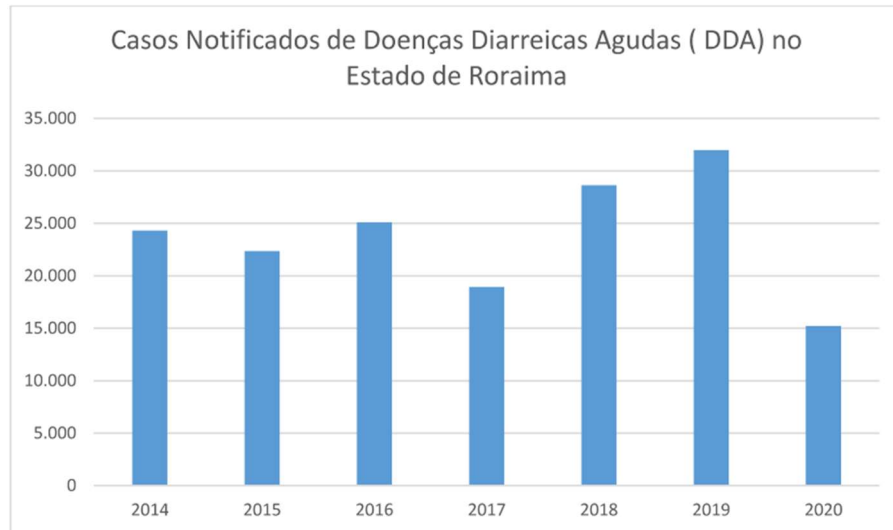
Município	ANO							Total
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	
Alto Alegre	413	436	429	480	591	465	398	3.212
Amajari	204	298	322	317	415	451	253	2.261
Boa Vista	16.926	16.269	17.486	12.794	20.475	21.536	9.364	114.850
Bonfim	295	358	359	467	720	800	263	3.781
Cantá	222	296	260	260	190	303	94	1.725
Caracarái	1134	713	1181	602	590	720	510	5.450
Caroebe	203	205	184	192	306	404	246	1.740
Iracema	252	223	341	291	682	305	211	2.305
Mucajai	516	644	801	525	856	1174	617	5.133
Normandia	460	481	404	252	321	507	174	2.599
Pacaraima	694	606	717	633	989	943	535	5.117
Rorainópolis	1934	1090	1887	1202	1210	2514	1358	11.152
São João Baliza	314	128	259	411	379	762	377	2.629
São Luiz	323	188	195	192	327	281	317	1823
Uiramutã	423	322	296	318	580	815	495	3.249
Total	24.313	22.357	25.106	18.936	28.631	31.980	15.212	166.507

Fonte: (SESAU, 2020).

Por conta da pandemia da COVID-19, no ano de 2020 não houve tanta procura aos postos de saúde. Durante esse ano as famílias ficaram isoladas e os agentes de saúde não puderam visitar as residências. Este foi um fator limitante no registro da maioria dos casos. Já a elevação dos casos no ano de 2019, pode estar ligada ao grande aumento de imigrantes que adentraram ao estado de RR, provenientes da Venezuela, que colabora com o aumento da população e uma maior demanda na procura pelos serviços oferecidos nos postos de saúde dos

municípios. O Gráfico 4 e a Tabela 1 mostra os casos notificados de DDA no estado de RR no período de 2014 a 2020 (SESAU, 2020).

Gráfico 4: Casos notificados de doenças diarreicas agudas em Roraima no período de 2014 a 2020.



Fonte: (SESAU, 2020).

Tabela 1: Casos notificados de doenças diarreicas agudas em Roraima no período de 2014 a 2020.

Ano	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Nº de casos	24.313	22.357	25.106	18.936	28.631	31.980	15.212

Fonte: (SESAU, 2020).

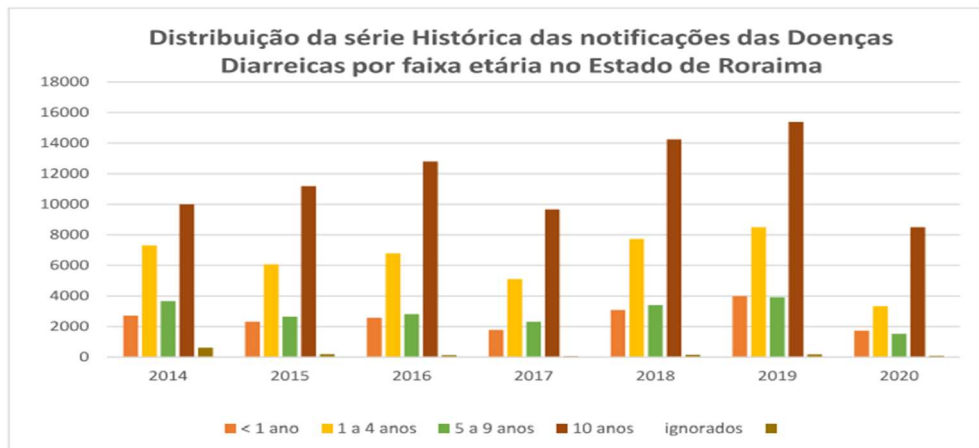
O Quadro 3 e o Gráfico 5 mostram a prevalência das doenças diarreicas por faixa etária no estado de RR. Podemos observar que a faixa etária que obtém mais casos de DDA notificados é a de 10 anos ou mais. O motivo é a elevação do número de pessoas que compõe essas idades.

Quadro 3: Distribuição de casos notificados segundo faixa etária no estado de Roraima entre o período de 2014 e 2020.

Ano	<1 ano	1 a 4 anos	5 a 9 anos	10 anos e mais	Ignorados
2014	2 717	7 316	3 661	10 003	616
2015	2 324	6 068	2 646	11 183	195
2016	2 580	6 790	2 812	12 803	127
2017	1 786	5 115	2 316	9 663	56
2018	3 086	7 733	3 402	14 251	159
2019	3 996	8 504	3 915	15 389	176
2020	1 733	3 334	1 522	8 505	90

Fonte: (SESAU, 2020).

Gráfico 5: Distribuição de casos notificados segundo faixa etária no estado de Roraima entre o período de 2014 e 2020.



Fonte: (SESAU, 2020).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O Brasil é o terceiro país com maior número de casos notificados de infecção por SARS-CoV-2. Por mais que a maioria das crianças quando em contato com o SARS-CoV-2 desenvolvam o quadro da doença de forma leve, geralmente com sintomas gastrointestinais, ou de forma assintomática, os números de infecção por SARS-CoV-2 em crianças ainda são preocupantes em todo o mundo quando comparados aos casos adultos e idosos (WHO, 2021). De acordo com dados nacionais do SIVEP-Gripe de dezembro de 2021, também publicados pela Câmara Técnica de Assessoramento em Imunização da Covid-19 - CTAI-COVID, (2021), em 2020 10.356 crianças entre 0-11 anos foram notificadas com diagnóstico de síndrome respiratória aguda grave por COVID-19, das quais 722 evoluíram para óbito. Em 2021, as notificações se elevaram para 12.921 ocorrências na mesma população, com 727 mortes, totalizando 23.277 casos de síndrome respiratória aguda grave por COVID-19 e 1.449 mortes desde o início da pandemia. Estes dados reforçam a importância da constante vigilância epidemiológica neste grupo e sustenta a hipótese de que crianças de 0 a 3 anos, por ainda não estarem no calendário de imunização, possam ser um reservatório da infecção por SARS-CoV-2. Além disso, deve-se levar em consideração que quanto maior o número de indivíduos infectados numa população, maior a pressão seletiva e evolução viral, dificultando a eficácia das vacinas.

No Brasil, crianças estão sendo internadas com quadros de DDA, desidratação e pneumonia, principalmente as menores de dois anos (INSTITUTO BUTANTAN, 2022), indicando que o trato gastrointestinal pode ser um local ativo de replicação do SARS-CoV-2 (DEVAUX, LAGIER e RAOULT, 2021) e reforçando a importância de estudos que analisem amostras fecais em conjunto com amostras de swab-salivar e/ou nasofaringe afim de um melhor diagnóstico da COVID-19 neste grupo (TAN *et al.*, 2020).

Mutações em genes receptores de ligantes virais direcionam a mudanças virais. De acordo com experimentos *in vitro*, SARS-CoV e SARS-CoV-2 compartilham o mesmo receptor ACE2 para iniciar a infecção. No entanto, o domínio de ligação nestes dois vírus tem 72% de identidade, o que significa que houve uma pressão evolutiva que pode ter sido consequência do grande número de indivíduos infectados acelerando o relógio evolutivo viral. Há a hipótese que possa ter havido uma pressão seletiva viral em resposta aos SNP presentes no gene humano ACE2 (GURWITZ, 2020; HOU *et al.*, 2020). Como citado anteriormente, estudos evidenciam que SNP presentes no gene ACE e ACE2 (como por exemplo o alelo D ou genótipo D/D

presente no ACE e a combinação do alelo *D* SNP (*rs4646994*) presente no gene *ACE* e o alelo *G* SNP (*rs2285666*) no gene *ACE2*) revelam suscetibilidade à HAS, que pode ser um fator de risco para a COVID-19 (LI *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2019; MILLS, 2015; WHO, 2021). Ainda é uma dúvida para a comunidade científica se crianças de 0 a 3 anos com comorbidades, como por exemplo HAS, deveriam serem vacinadas, sendo importante a investigação destes e outros SNP presentes nos genes *ACE* e *ACE2*.

3 OBJETIVOS:

3.1 Geral:

Realizar um inquérito epidemiológico molecular para detecção de SARS-CoV-2 em crianças de 0 a 3 anos que vivem na região Amazônica, com associação a clínica da DDA e susceptibilidade à infecção dependente dos SNP (*rs4646994*) e (*rs2285666*) correspondendo respectivamente aos genes *ACE* e *ACE2* humano.

3.2 Específicos:

1. Verificar a frequência de detecção do SARS-CoV-2 em fezes e swab salivar de crianças com DDA ou IRA.
2. Investigar a incidência do SNP (*rs4646994*) de *inserção/deleção (I/D)* do gene humano *ACE* em swab salivar de crianças com DDA ou IRA.
3. Detectar a ocorrência do SNP *G8790A (rs2285666)* da enzima ACE2 (gene *ACE2*) em swab salivar de crianças com DDA ou IRA.
4. Realizar uma análise comparativa levando em consideração aspectos clínicos de DDA e IRA frente aos resultados obtidos nos itens mencionados acima.

4 METODOLOGIA

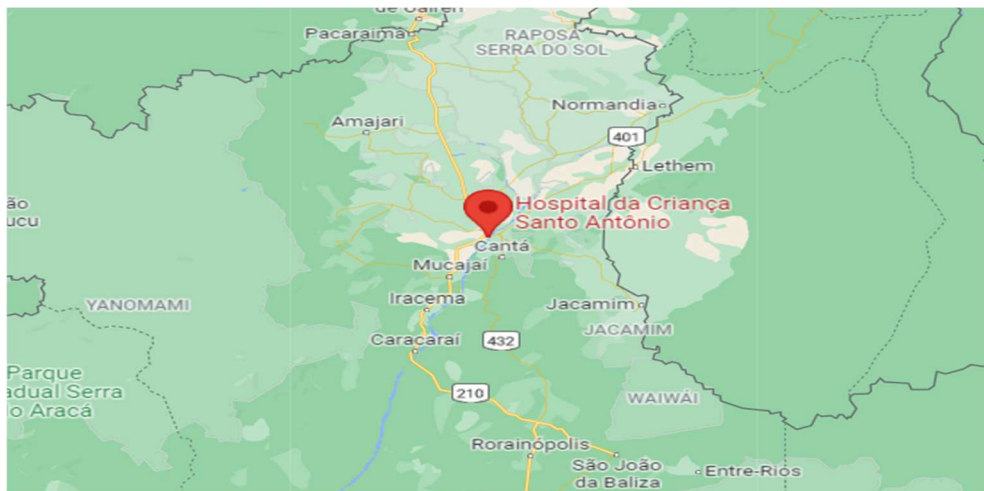
4.1 Declaração Ética

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Criança de Boa Vista/Plataforma Brasil sob o número 133480 de 23/11/2015.

4.2 Inquérito epidemiológico de detecção de SARS-CoV-2 incluindo informações da coleta

O inquérito epidemiológico foi realizado nos meses de junho e julho de 2021 (período anterior ao aparecimento da variante Ômicron) com crianças de 0 a 3 anos de idade atendidas na emergência do Hospital da Criança de Santo Antonio (HCSA) localizado na cidade de Boa Vista, estado de RR (Figura 8), que possui 30 leitos de observação na Emergência e 80 leitos para Internação.

Figura 8: Mapa mostrando a localização do Hospital da Criança Santo Antônio de Boa Vista, Roraima.



Fonte: (Adaptado de GOOGLE, 2022).

O número amostral é de 101 crianças (faixa etária: 0-3 anos) com DDA e 101 crianças com IRA. Foram coletadas em paralelo swab-salivar e fezes de cada uma das crianças (n= 202; 101 grupo DDA e 101 grupo IRA) perfazendo um total de 404 amostras (202 amostras de fezes e 202 de saliva). Como evidenciado por Moraes *et al.*, (2019), todas as crianças selecionadas para este estudo apresentam características físicas da etnia indígena e residem com suas famílias

no estado de RR ou de países da fronteira com o Brasil (Venezuela e Guiana Inglesa), em diferentes regiões, incluindo áreas demarcadas indígenas. A avaliação clínica foi realizada por um médico pediatra colaborador, sendo o responsável pelo convite ao responsável da criança para participar da pesquisa após a explicação do projeto e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e Assentimento Informado para Pesquisa em Crianças (AIPC). Os dados clínicos observados durante a coleta foram anotados na ficha/prontuário de cada criança o qual foi disponibilizado para este estudo, considerando todos os aspectos éticos.

A coleta da saliva foi realizada com o auxílio de um swab, coletando-se a saliva misturada a células da mucosa bucal e transferindo-se o swab após a coleta para um tubo contendo 400µL de tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline – PBS) 1X (8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44g de Na₂HPO₄ e 0.24g de KH₂PO₄ dissolvidos em 800ml de água destilada.). As fezes foram coletadas diretamente das fraldas, com auxílio de gaze e/ou palheta presente na parte de baixo da tampa do pote de fezes.

4.3 Armazenamento e processamento das amostras

As amostras foram temporariamente armazenadas a -20°C no HCSA e enviadas ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA), IOC/Fiocruz-RJ. A partir das amostras de swab-salivar, foram adicionados 1200µL de PBS 1x no tubo com a amostra, o qual foi homogeneizado em vórtex (modelo LM-MX-S, cat.02074) durante 30 segundos. A mistura foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5mL do qual foi retirada uma alíquota de 350 µL para utilizar na etapa de extração.

A partir das amostras de fezes, foram preparadas suspensões fecais de acordo com o protocolo padrão do LVCA previamente descrito por Ferreira *et al.*, (2010). Todas as suspensões foram conservadas a -20°C.

4.4 Extração de ácidos nucleicos

Para a extração de RNA (fezes e swab-salivar) e DNA cromossômico celular humano de células secretoras no swab-salivar foram utilizados, respectivamente os kits *RNeasy* Mini Kit (Qiagen, USA) e o QIAcube® (Qiagen, USA) seguindo as instruções dos fabricantes, em

sistema automatizado, de acordo com as instruções do fabricante a partir de 350µL das suspensões previamente preparadas. Os ácidos nucleicos extraídos foram conservados a -70°C.

4.5 Detecção molecular de SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) em tempo real em amostras de fezes e swab-salivar de crianças com DDA ou IRA

Para detecção molecular de SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real em fezes e swab-salivar, utilizamos o kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR System da Invitrogen. Os oligonucleotídeos e sondas estão descritos no Quadro 4, utilizando o protocolo descrito por Corman *et al.*, (2020) para detecção dos genes *E*, *N* e *RdRp* do SARS-CoV-2. Foi preparada uma mistura para uma reação final de 25µL (sendo 20µL reagentes do kit e 5µL do RNA extraído). A mistura para uma amostra conteve: 12,5µL de 2X Reaction Mix; 0,5µL de ROX Reference Dye (1:10); 0,5µL da Enzima Super Script III RT/ Platinum *Taq* Mix; 0,5µL do oligonucleotídeo senso (*forward*) (10µM); 0,5µL do oligonucleotídeo antisense (*reverse*) (10µM); 0,25µL da Probe (10µM); H₂O (quantidade suficiente para 20µL) e 5µL do RNA extraído de amostras e controles previamente processados. A mistura foi adicionada em microplacas de 96 poços e lidas no aparelho *7500 Real Time PCR System*® (Applied Biosystems, USA) para detecção considerando o valor do *threshold cycle* (Ct). O seguinte programa de ciclagem foi utilizado: Transcrição reversa à 50°C por 15 minutos; ativação da enzima à 95°C por 2 minutos; 40 ciclos de denaturação à 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão final de 60°C por 30 segundos. Ao final da reação, foi realizada a interpretação dos resultados a partir da análise dos valores de Ct para os genes *E*, *N* e *RdRp* do SARS-CoV-2.

Quadro 4: Oligonucleotídeos e sondas utilizados para detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real.

Ensaio/ Uso	Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')	Comentário
Gene <i>RdRp</i>	RdRP_SARSr-F2	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Usar 600 nM por reação
	RdRP_SARSr-R1	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Usar 800 nM por reação
	RdRP_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Específico para Wuhan-CoV, não detectará SARS-CoV. Usar reação de 100 nM e mistura com P1
	RdRP_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe, detectará vírus Wuhan, SARS-CoV e CoVs relacionados a morcegos SARS. Use 100 nM por reação e misture com P2
Gene <i>E</i>	E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Usar 400 nM por reação
	E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Usar 400 nM por reação
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Usar 200 nM por reação
Gene <i>N</i>	N_Sarbeco_F1	CACATTGGCACCCGCAATC	Usar 600 nM por reação
	N_Sarbeco_R1	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Usar 800 nM por reação
	N_Sarbeco_P1	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Usar 200 nM por reação

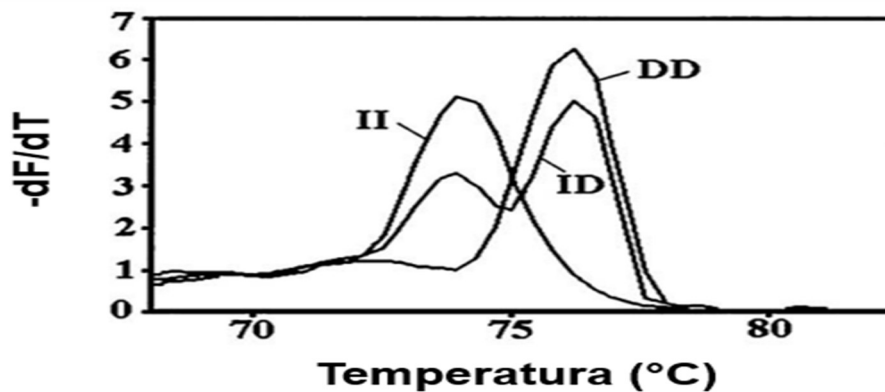
Fonte: (Adaptado de Corman *et al.*, 2020).

4.6 Genotipagem do gene *ACE* para identificação do SNP *I/D* (rs4646994)

Para identificação do SNP *I/D* (*rs4646994*) presente no gene *ACE*, realizamos a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) na presença de SYBR GREEN PCR Master Mix cat no. 4309155 (*Applied Biosystems*) como fluorocromo utilizando o protocolo de Lin *et al.*, 2001 adaptado no LVCA. Uma mistura de reação contendo para uma amostra: 12,5µL de SYBR Green PCR Master Mix (2X); 2,5µL de oligonucleotídeo ACE1 10pmol/µL (final 25pmoles); 5µL de oligonucleotídeo ACE2 10pmol/µL (final 50pmoles); 2,5µL de oligonucleotídeo ACE3 10pmol/ µL (final 25pmoles) e em seguida foram adicionados 2,5 µL de DNA para uma reação com volume final de 25µL. Os oligonucleotídeos utilizados foram: pACE1-F (5' CATCCTTTCTCCCATTCTC-3'), pACE2-F (5'-TGCGATTACAGGCGTGATACAG-3') e pACE3-R (5'-ATTTCAGAGCTGG AATAAAATT-3') descritos por Lin *et al.*, 2001. Amostras controles previamente definidas coletadas de amostras da referência do LVCA, cujo perfil dos alelos eram *I/I* (*Inserção/Inserção*), *D/D* (*Deleção/Deleção*) e *I/D* (*Inserção/Deleção*) foram utilizadas. A mistura foi aplicada em microplacas de 96 poços que foram submetidas a temperaturas de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 55°C por 1 minuto; 60°C por 15 segundos e 95°C por 15 segundos. Para a realização da PCR e análise da curva de fusão (*melting curve*) para encontrar os alelos *I* e *D* pelos diferentes picos de fusão gerados com base no comprimento

e composição dos nucleotídeos dos *amplicons* (Figura 9), utilizamos o equipamento 7500 Real Time PCR System® (Applied Biosystems, USA) e o 7500 Software v2.3. A análise das curvas de fusão foi realizada tendo como referência o trabalho de Lin *et al.*, 2001.

Figura 9: Demonstração de curvas de fusão típicas para os alelos *I/I*, *D/D* e *I/D*.



Fonte: (adaptado de: Lin *et al.*, 2001).

4.7 Genotipagem do gene *ACE2* SNP *G8790A* (*rs2285666*) por PCR convencional

Para genotipagem do SNP *G8790A* (*rs2285666*) do gene *ACE2*, utilizamos o protocolo de Benjafield *et al.*, (2004) adaptado. Foi inicialmente gerado um *amplicon*/uma amostra, por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes oligonucleotídeos: *senso* (*Foward*) (5' -CAT GTG GTC AAA AGG ATA TCT-3') e *antisenso* (*Reverse*) (5' -AAA GTA AGG TTG GCA GAC AT-3') também estabelecidos por Benjafield *et al.*, (2004). Realizamos a PCR utilizando o kit *iTaq*™ DNA Polymerase cat. 1708870 para uma reação final de 25µL por amostra. Em tubos eppendorf de 0,2mL previamente identificados adicionamos uma mistura de 2,5µL de Buffer 10X; 1,25µL oligonucleotídeo *ACE2* *Foward*; 1,25µL oligonucleotídeo *ACE2* *Reverse*; 0,5µL dNTPmix 10Mm; 0,75µL MgCl₂ 50Mm; 0,125µL *iTaq* Enzyme Polymerase e H₂O (quantidade suficiente para 22µL). Em seguida foram adicionados 3µL do DNA cromossomal extraído a partir de suspensões salivares. Utilizamos o termociclador Proflex PCR system cat no. 4484073 com o seguinte programa: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma última etapa de 72°C por 10 minutos.

A seguir este *amplicon* foi submetido eletroforese em gel de agarose (100mL TBE 0,5X + 2,5g agarose + 5µL de Brometo de Etídio de uma solução contendo 10mg/mL) no qual foi aplicado 7µL do *amplicon*, 4µL de marcador de peso e massa (*LowMass* cat. 10068013 da

Invitrogen) e 3 μ L de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) cat 10816015 da *Invitrogen*. A foto-documentação foi realizada no processador de imagem digital Kodak Gel Logic 212.

4.8 Digestão por endonuclease de restrição *AluI*

Inicialmente visando validação, para verificação do perfil de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP*) foi realizado o teste de digestão pela endonuclease de restrição *AluI* (*Invitrogen* REF:R6281) utilizando diferentes concentrações de DNA/ μ L (amostras controles do LVCA) em um gel de agarose a 2,5% (100mL TBE 0,5X + 2,5g agarose + 5 μ L de Brometo de Etídio de uma solução contendo 10mg/mL) e concluímos que a concentração ideal para que ocorresse uma boa digestão seria de aproximadamente 34 ng/ μ L à 40 ng/ μ L. Para digerir os *amplicons* com a enzima de restrição *AluI* a fim de encontrar os alelos *A* e *G*, realizamos a mistura de reação de digestão da seguinte maneira para uma amostra: 0,5 μ L de enzima *AluI*; 3 μ L de Buffer B 10X NEB; DNA (quantidade suficiente para 34 à 40 ng) e H₂O (quantidade suficiente para 30 μ L de reação final). Incubamos a 37°C por 1 hora e 15 minutos e em seguida toda a digestão foi aplicada em um gel de agarose a 2,5% (100mL TBE 0,5X + 2,5g Agarose + 5 μ L de Brometo de Etídio) utilizando 4 μ L de marcador de peso e massa (*LowMass* cat. 10068013 da *Invitrogen*) e 3 μ L de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) cat. 10816015 da *Invitrogen*.

Em seguida, foi realizada a eletroforese horizontal e a foto-documentação no processador de imagem digital (Kodak Gel Logic 212). Após a digestão, as bandas com peso molecular de aproximadamente 466pb identificam o alelo *G* enquanto bandas de 281 e 185pb identificam o alelo *A*.

5 RESULTADOS

5.1. Características das crianças/amostras deste inquérito epidemiológico

Este estudo contou com um total de 81 crianças do sexo feminino e 121 crianças do sexo masculino. Quanto às crianças do sexo feminino, 38 (46.9%) foram do grupo DDA e 43 (53%) do grupo IRA. Das crianças do sexo masculino, 63 (52%) foram do grupo DDA e 58 (47.9%) do grupo IRA. As crianças deste estudo vivem no Brasil, em 14 dos 15 municípios do estado de Roraima, sendo Alto Alegre, Amajari, Boa Vista, Bonfim, Cantá, Caracaraí, Caroebe, Iracema, Mucajaí, Normandia, Pacaraima, Rorainópolis, São Luiz do Anauá e Uiramutã. Foram incluídas também crianças atendidas no HCSA e que vivem no estado do Amazonas/Brasil (Aldeia indígena Hemarepiwei), Aldeia Xihopi na Guiana e Aldeia Ceara-Yano na Venezuela. A maioria das crianças vivem em comunidades indígenas localizadas no município de Boa Vista (146/202; 72.3%). As etnias indígenas que vivem nestas comunidades indígenas são Yanomami, Macuxi e Ingaricó.

5.2 Detecção molecular de SARS-CoV-2 em fezes e swab salivar de crianças com doença diarreica aguda ou infecção respiratória aguda

A detecção molecular de SARS-CoV-2 por meio de RT-PCR em tempo real, apresentou para amostras controles inicialmente testados valores de Ct que se mostraram satisfatórios, variando de 19 a 37. Todas as amostras controles deste estudo foram previamente identificadas como positivas, pertencentes ao banco de amostras de fezes do LVCA. Os genes *E*, *N* e *RdRp* do SARS-CoV-2 foram detectados separadamente como um monoplex e em placas diferentes para evitar interferências entre fluorescências da sonda.

A Tabela 2 mostra a frequência de SARS-CoV-2 em crianças com DDA e IRA cujo RNA viral foi extraído da suspensão fecal, enquanto a Tabela 3 mostra a frequência de SARS-CoV-2 em crianças com DDA e IRA cujo RNA viral foi extraído de swab-salivar. A RT-PCR em tempo real detectou 6 amostras positivas para o gene *E* do SARS-CoV-2, sendo 4 do grupo com DDA (4/101; 3.96%) e 2 do grupo com IRA (2/101; 1.98%). Não houve amostras positivas para os genes *N* e *RdRp* (Tabela 2). Com relação ao grupo DDA e IRA de swab-salivar, 5 crianças com DDA (5/101; 4.95% e 1 com IRA (1/101; 0.99%) foram positivos para o gene *E* do SARS-CoV-2, não havendo amostras de IRA positivas para os genes *N* e *RdRp* (Tabela 3).

Tabela 2 - Frequência de SARS-CoV-2 nos dois diferentes grupos de crianças com doença diarreica aguda DDA e ou com infecção respiratória aguda IRA a partir de suspensão fecal.

	DDA (fezes) n=101	IRA (fezes) n=101
Gene <i>E</i>	4 (3.96%)	2 (1.98%)
Gene <i>N</i>	0	0
Gene <i>RdRp</i>	0	0

Tabela 3 - Frequência de SARS-CoV-2 nos dois diferentes grupos de crianças com doença diarreica aguda DDA e com infecção respiratória aguda IRA a partir de swab-salivar.

	DDA (swab-salivar) n=101	IRA (swab-salivar) n=101
Gene <i>E</i>	5 (4.95%)	1 (0.99%)
Gene <i>N</i>	0	0
Gene <i>RdRp</i>	0	0

Os resultados apresentaram níveis de Ct variando de 29,6 a 37,7 com uma média de 33,3 para DDA/IRA de fezes e 34,0 para DDA/IRA de swab-salivar. Das 4 amostras de DDA positivas para SARS-CoV-2 cujo RNA viral foi extraído das fezes, 75% (3/4) são do sexo masculino e 25% (1/4) do sexo feminino. Das 5 amostras de IRA positivas para SARS-CoV-2 cujo RNA viral foi extraído de swab-salivar, 60% (3/5) são pertencentes ao sexo feminino, enquanto 40% (2/5) ao sexo masculino.

Duas crianças foram positivas para SARS-CoV-2 do grupo IRA cujo RNA viral foi extraído das fezes sendo uma do sexo feminino e outra do sexo masculino. O mapa de RR abaixo (Figura 10) indica onde as crianças correspondentes as amostras positivas DDA[A] ou IRA[C] vivem.

Figura 10: Mapa mostrando a localização das amostras positivas para SARS-CoV-2.



Legenda: * - A letra [A] corresponde as amostras de DDA e a letra [C] corresponde as amostras de IRA.

5.3 Ocorrência de sintomas clínicos em amostras positivas para SARS-CoV-2

A ocorrência de sintomas clínicos também foi avaliada de forma tentar caracterizar comparativamente as duas manifestações clínicas. No Quadro 5 foram compilados os dados obtidos para a ocorrência de sintomas clínicos nas amostras de DDA e de IRA.

Quadro 5: Ocorrência de sintomas clínicos em todas as amostras SARS-CoV-2 positivas.

Identificação da amostra SARS-CoV-2 positiva	DDA[A] ou IRA[C]	Sintomas clínicos									
		Muco	Sangue	Febre	Vômito	Dor abdominal	Inapetência	Coriza	Tosse	Exantema cutâneo	Desidratação
32198	[C]								X		
32200	[A]			X	X	X					
32229	[A]			X	X	X					
32344	[A]	X		X		X					
32414	[C]	X				X					
32416	[A]	X		X		X					
32477	[A]	X		X		X			X		
32489	[A]	X		X		X					X
32512	[A]	X		X	X	X					X
32517	[A]	X		X	X	X			X		
32529	[A]	X		X		X					X
32531	[C]			X		X			X		

Todas as crianças relativas as 9 amostras positivas para SARS-CoV-2, aqui designadas DDA que apresentaram positividade nas fezes (4/9; 44,44%) ou swab salivar (5/9; 55,56%) apresentaram febre e dor abdominal (Quadro 5). Foram observados em crianças para as amostras de fezes, com uma frequência de 75% (3/4), 50% (2/4) e 25% (1/4), respectivamente presença de muco, ocorrência de vômito e desidratação; para amostras de swab salivar as frequências para estes sintomas foram respectivamente de 80% (4/5), 40% (2/5) e 40% (2/5). Tosse foi observada somente nas crianças para as amostras positivas de swab salivar, correspondendo a 40% (2/5) destas.

Com relação as 2 amostras de IRA os sintomas clínicos observados quando a positividade foi detectada nas fezes foram muco (1/2; 50%) e dor abdominal (1/2; 50%). Para a criança com IRA onde houve positividade na amostra swab salivar os sintomas clínicos foram febre, dor abdominal e tosse. Sintomas clínicos verificados neste estudo como sangue nas fezes, inapetência, coriza e exantema cutâneo não foram observados nas crianças deste inquérito epidemiológico.

5.4 Frequência dos alelos *I/D*, *I/I* e *D/D* do gene *ACE* SNP *I/D* (*rs4646994*), em swab salivar de crianças com doença diarreica aguda ou infecção respiratória aguda e correlação com fatores clínicos e populacionais

Das 101 crianças do grupo com DDA, 89.1% (90/101) apresentaram os alelos *I/I* sendo 61.1% (55/101) do sexo masculino e 38.8% (35/101) do sexo feminino; 4.9% (5/101) crianças apresentaram os alelos *I/D*, sendo 80% (4/5) do sexo masculino e 20% (1/5) do sexo feminino. As crianças do grupo com DDA que apresentaram os alelos *D/D* foram 5.94% (6/101), sendo 66.6% (4/6) do sexo masculino e 33.3% (2/6) do sexo feminino (Gráfico 6). Das 101 crianças do grupo com IRA, 85.14% (86/101) apresentaram os alelos *I/I*, sendo 56,98% (49/86) do sexo masculino e 43,02% (37/86) do sexo feminino. Crianças apresentando os alelos *I/D* foram 9.90% (10/101), sendo 40% (4/10) do sexo masculino e 60% (6/10) do sexo feminino; crianças apresentando os alelos *D/D* foram 4.95% (5/101), sendo todas do sexo masculino (Gráfico 7). Levando em consideração crianças de ambos os grupos estudados, DDA e IRA, a frequência dos alelos *I/I* detectados foi de 87,12% (176/202), seguida pela frequência de 7.42% (15/202) para os alelos *I/D* e de 5.44% (11/202) para os alelos *D/D*.

Gráfico 6: Distribuição dos alelos da ACE SNP *I/D* (*rs4646994*) com o sexo das crianças do grupo com doença diarreica aguda.

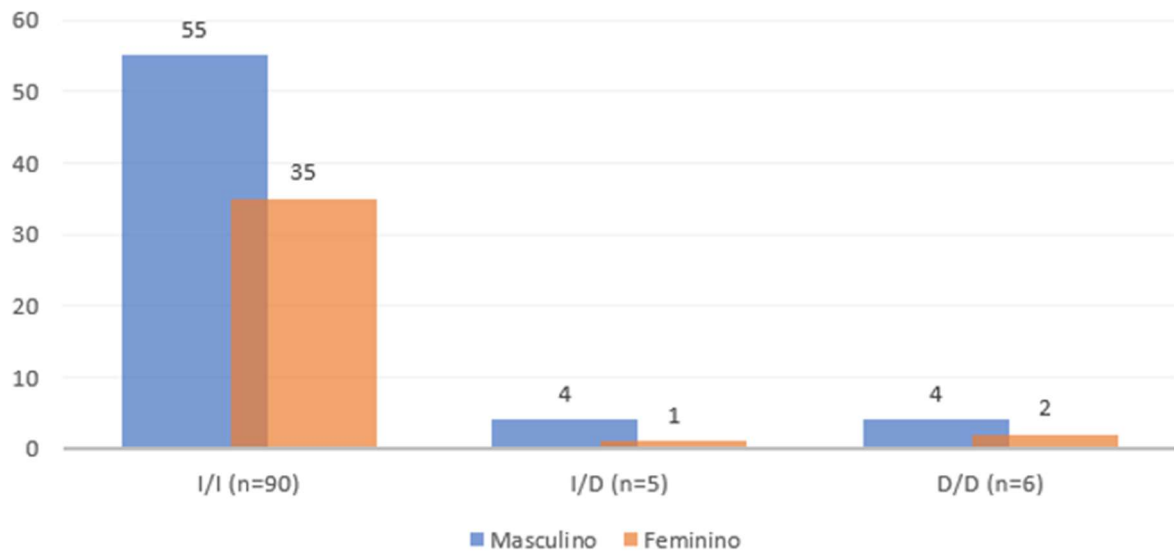
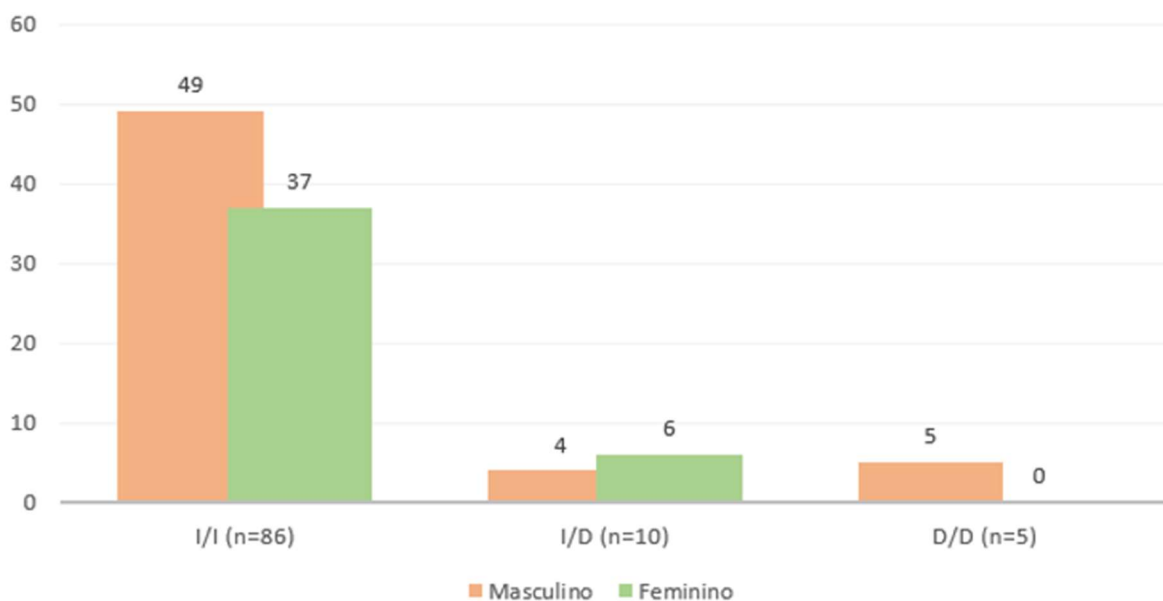


Gráfico 7: Distribuição dos alelos da ACE SNP *I/D* (*rs4646994*) com o sexo das crianças do grupo com infecção respiratória aguda.



Os Gráficos 8 e 9 mostram o perfil para os alelos da ACE SNP *I/D* (*rs4646994*) correlacionando com crianças apresentando DDA ou IRA respectivamente, e as localidades em que residem. Destaca-se em crianças do grupo com DDA residentes no município de Boa Vista, capital de RR, a frequência dos alelos *I/I*, *D/D* e *I/D* tiveram respectivamente uma prevalência de 68,8% (62/90), 100% (6/6) e 60% (3/5). No grupo com IRA também houve uma maior

prevalência dos alelos *I/I*, *D/D* e *I/D* no município de Boa Vista, com os alelos *I/I* apresentando respectivamente uma prevalência de 72% (62/86), 100% (5/5) e 80% (8/10).

Gráfico 8: Prevalência dos alelos da ACE SNP *I/D* (*rs4646994*) em crianças do grupo com doença diarreica aguda em relação ao município que residem.

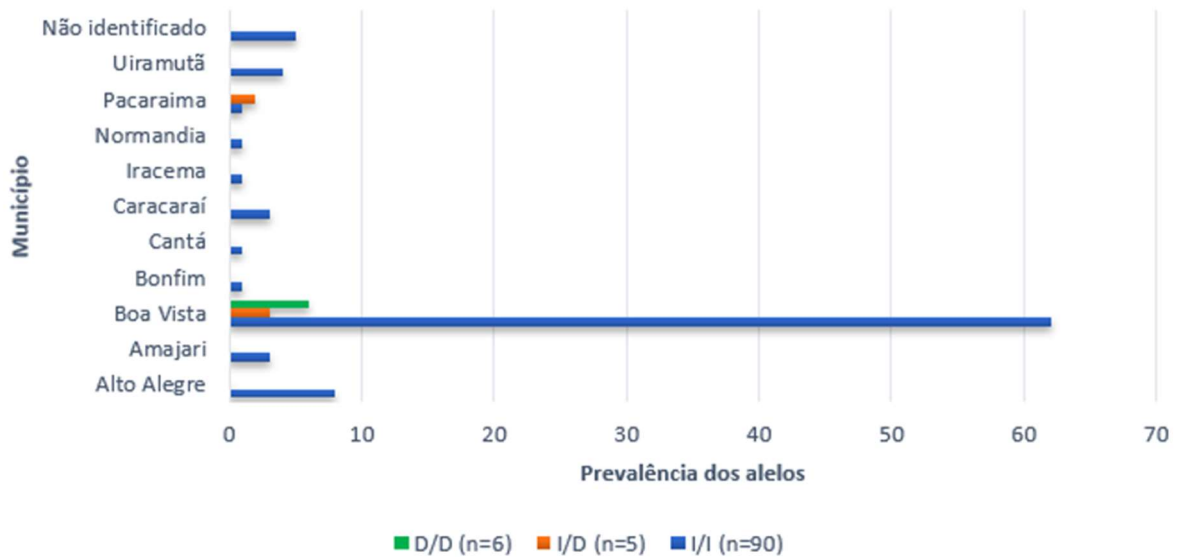
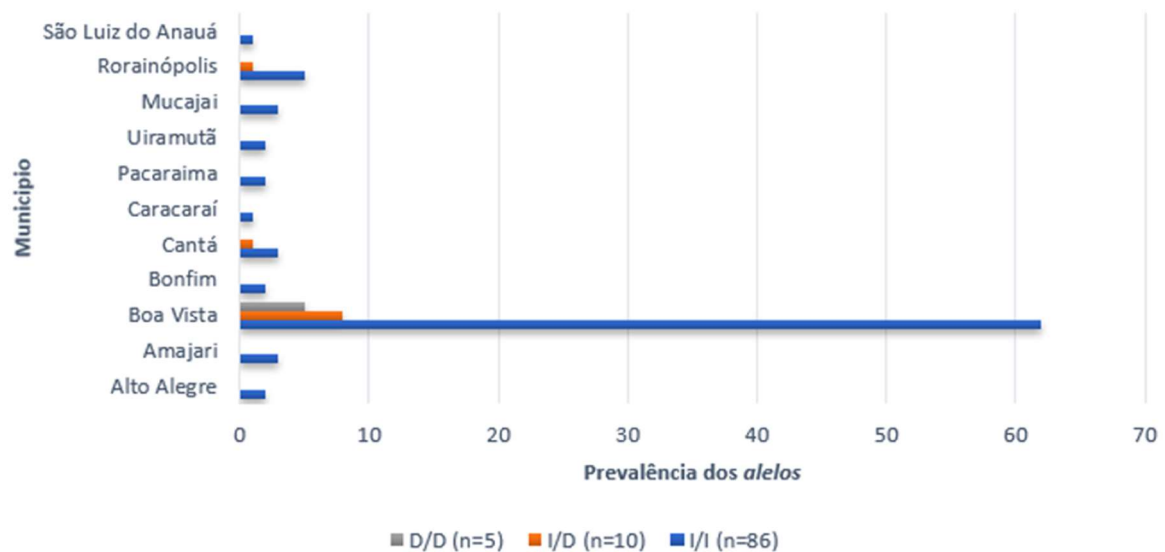


Gráfico 9: Prevalência dos alelos da ACE SNP *I/D* (*rs4646994*) em crianças do grupo com infecção respiratória aguda em relação ao município que residem.



5.5 Ocorrência do SNP *G8790A (rs2285666)* da enzima *ACE2* (gene *ACE2*) em swab salivar de crianças com doença diarreica aguda ou infecção respiratória aguda

O gene *ACE2* está ligado ao cromossomo X, permitindo que os indivíduos do sexo feminino sejam heterozigotos, ou seja, indivíduos que possuem pares de alelos distintos em contraste com os do sexo masculino que são definitivamente hemizigóticos, ou seja, indivíduos diplóide portadores de apenas um alelo de determinado gene. Estes manifestam o único alelo que está localizado no cromossomo X.

Das 81 crianças do sexo feminino presentes neste estudo, para 83,95% (68/81) foi possível ser obtido por PCR o fragmento do gene *ACE2* e uma boa digestão pela endonuclease de restrição *AluI*; sendo: 47% (32/68) do grupo de crianças com DDA e 53% (36/68) do grupo de crianças com IRA (Tabela 4). Das 121 crianças do sexo masculino, para 80,16% (97/121) foi possível a amplificação por PCR/digestão enzimática descrita acima; sendo 56,7% (55/97) do grupo de crianças com DDA e 43,2% (42/97) do grupo de crianças com IRA (Tabela 5). No grupo de crianças com DDA do sexo feminino a frequência dos alelos *GG* foi 46,8% (15/32), para os alelos *AG* foi de 34,3% (11/32) e para os alelos *AA* foi 18,7% (6/32). No grupo de crianças com IRA do sexo feminino a frequência dos alelos *GG* foi 58,3% (21/36), dos alelos *AA* foi 22,2% (8/36) e dos alelos *AG* foi 19,4% (7/36) (Tabela 4). No grupo de crianças do sexo masculino com DDA, a frequência detectada para o alelo *G* foi de 67,2% (37/55) e para o alelo *A* foi de 32,7% (18/55). Para o grupo de crianças com IRA, a frequência do alelo *A* foi de 52,3% (22/42) e para o alelo *G* foi de 47,6% (20/42) (Tabela 5).

Para o grupo de crianças com DDA e IRA do sexo feminino, as frequências dos alelos *GG* foram respectivamente de 46,8% (15/32) e 58,3% (21/36). Os alelos *AG* apresentaram uma frequência de 34,3% (11/23) para crianças com DDA e 19,4% (7/36) para crianças com IRA. Para os alelos *AA* as frequências de 18,7% (6/32) e 22,2% (8/36) foram detectadas respectivamente para as crianças com DDA e IRA (Tabela 4).

Crianças do sexo masculino com DDA apresentaram frequências de 67,2% (27/55) para o alelo *G* e com IRA frequência de 47,6% (20/42). Para o mesmo grupo masculino as frequências do alelo *A* foram de 32,7% (18/55) e 52,3% (22/42), respectivamente para aquelas com DDA e IRA. (Tabela 5).

Tabela 4: Frequência dos alelos no gene *ACE2*, SNP *G8790A* (*rs2285666*) detectados nos grupos com doença diarreica aguda e com infecção respiratória aguda em crianças do sexo feminino.

Alelos <i>ACE2</i> (<i>rs2285666</i>) sexo feminino	<i>ACE2</i> (DDA) n=32	<i>ACE2</i> (IRA) n=36	Total n=68
<i>GG</i>	15 (46.87%)	21 (58.33%)	36 (52.94%)
<i>AG</i>	11 (34.37%)	7 (19.44%)	18 (26.47%)
<i>AA</i>	6 (18.75%)	8 (22.22%)	14 (20.58%)

Tabela 5: Frequência dos alelos no gene *ACE2*, SNP *G8790A* (*rs2285666*) detectados nos grupos com doença diarreica aguda e com infecção respiratória aguda em crianças do sexo masculino.

Alelos <i>ACE2</i> (<i>rs2285666</i>) sexo masculino	<i>ACE2</i> (DDA) n=55	<i>ACE2</i> (IRA) n=42	Total (n=97)
<i>Alelo G</i>	37 (67.27%)	20 (47.61%)	57 (58.76%)
<i>Alelo A</i>	18 (32.72%)	22 (52.38%)	40 (41.23%)

Das 165 amostras, 68 do sexo feminino e 97 do sexo masculino, analisadas para o SNP *G8790A* (*rs2285666*) da enzima *ACE2*, 70.90% (117/165) foram detectadas em crianças residentes no município de Boa Vista. A frequência deste SNP, considerando o número amostral das crianças que residem em Boa Vista, correspondeu a 80.1% (117/146). O Gráfico 10 e 11 apresenta a distribuição deste SNP nas populações de crianças de outras municipalidades. Das 68 crianças do sexo feminino analisadas quanto ao SNP *G8790A* (*rs2285666*) do gene *ACE2*, 73,53% (50/68) residem no município Boa Vista; sendo que 52% (26/50) apresentaram os alelos *GG*, 28% (14/50) alelos *GA* e 20% (10/50) alelos foram *AA* (Gráfico 10). Das 97 crianças do sexo masculino, 69% (67/97) residem no município de Boa Vista, sendo 35,82% (24/67) apresentando o *alelo A* e 64.18% (43/67) com o *alelo G*, com relação ao SNP *G8790A* (*rs2285666*) do gene *ACE2* (Gráfico 11).

Gráfico 10: Prevalência dos alelos no gene *ACE2*, SNP *G8790A* (*rs2285666*) em crianças do sexo feminino em relação ao município que residem.

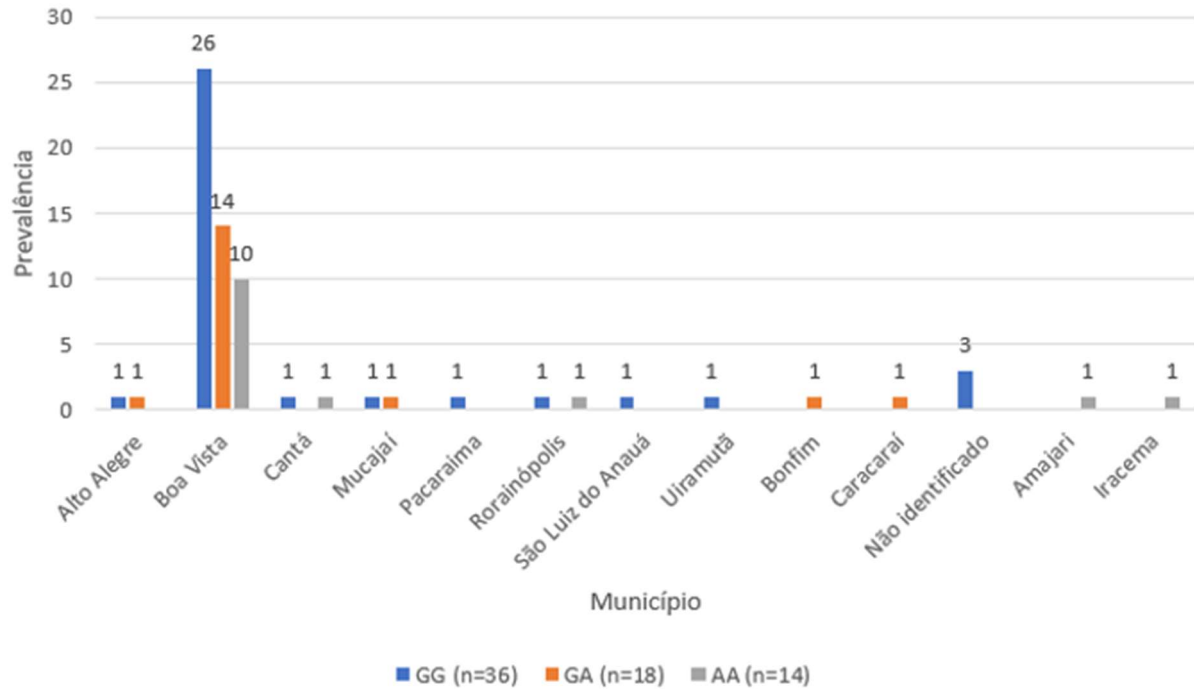
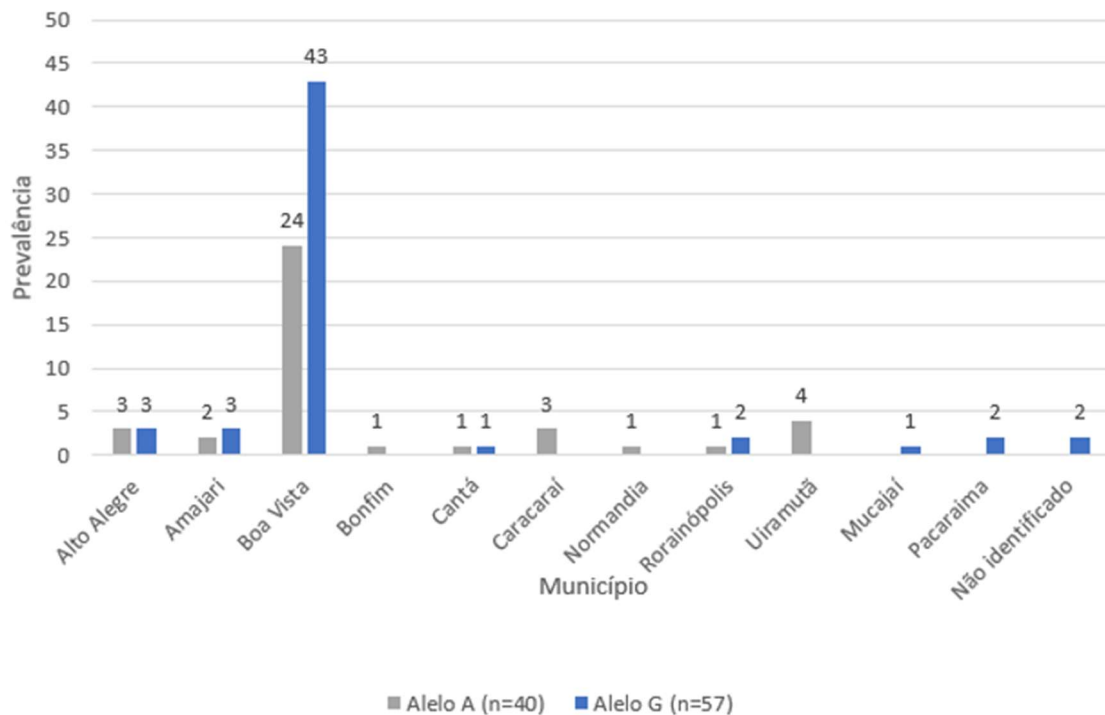


Gráfico 11: Prevalência dos alelos no gene *ACE2*, SNP *G8790A* (*rs2285666*) em crianças do sexo masculino em relação ao município que residem.



A Tabela 6 mostra a combinação dos genótipos da *ACE* e *ACE2* quanto aos SNP *I/D* (*rs4646994*) e *G8790A* (*rs2285666*), respectivamente, em crianças do sexo feminino com DDA e com IRA, onde detectamos uma predominância dos genótipos *II/GG* com 48,52% (33/68) de frequência seguido dos genótipos *II/GA* com 22.05% (15/68), *II/AA* com 17.64% (12/68), *ID/GG* com 4.41% (3/68), *ID/GA* com 1.47% (1/68), *ID/AA* com 2.94% (2/68) e *DD/GA* com 2.94% (2/68). Os genótipos *DD/GG* e *DD/AA* não foram detectados.

A Tabela 7 mostra a combinação dos genótipos da *ACE* e *ACE2* quanto aos SNP *I/D* (*rs4646994*) e *G8790A* (*rs2285666*), respectivamente, em crianças do sexo masculino com DDA e com IRA. Neste grupo, também podemos observar a predominância do genótipo *II/Alelo G* com frequência de 49.48% (48/97), seguido dos genótipos *II/Alelo A* com 38.14% (37/97), *ID/Alelo G* com 4.12% (4/97), *ID/Alelo A* com 1.03% (1/97), *DD/Alelo G* com 5.15% (5/97) e *DD/Alelo A* com 2.06% (2/97). A Tabela 8 mostra a combinação dos genótipos *ACE* e *ACE2* em amostras positivas para SARS-CoV-2.

Tabela 6: Combinação dos genótipos da *ACE* e *ACE2* quanto aos polimorfismos de nucleotídeo único *I/D* (*rs4646994*) e *G8790A* (*rs2285666*), respectivamente, em crianças do sexo feminino com doença diarreica aguda e com infecção respiratória aguda.

Perfil ACE/ACE2 Sexo Feminino	DDA (n=32)	IRA (n=36)	Total (n=68)
<i>II/GG</i>	15	18	33 (48.52%)
<i>II/GA</i>	8	7	15 (22.05%)
<i>II/AA</i>	6	6	12 (17.64%)
<i>ID/GG</i>	0	3	3 (4.41%)
<i>ID/GA</i>	1	0	1 (1.47%)
<i>ID/AA</i>	0	2	2 (2.94%)
<i>DD/GG</i>	0	0	0
<i>DD/GA</i>	2	0	2 (2.94%)
<i>DD/AA</i>	0	0	0

Tabela 7: Combinação dos genótipos da ACE e ACE2 quanto aos polimorfismos *I/D* (*rs4646994*) e *G8790A* (*rs2285666*), respetivamente, em crianças do sexo masculino com doença diarreica aguda e com infecção respiratória aguda.

Perfil ACE/ACE2 Sexo Masculino	DDA (n=55)	IRA (n=42)	Total (n=97)
<i>II/Alelo G</i>	32	16	48 (49.48%)
<i>II/Alelo A</i>	18	19	37 (38.14%)
<i>ID/Alelo G</i>	2	2	4 (4.12%)
<i>ID/Alelo A</i>	0	1	1 (1.03%)
<i>DD/Alelo G</i>	3	2	5 (5.15%)
<i>DD/Alelo A</i>	0	2	2 (2.06%)

Tabela 8: Combinação dos genótipos da ACE/ACE2 com a positividade para SARS-CoV-2.

Identificação da amostra positiva para SARS-CoV-2	Perfil ACE/ACE2	Valor ct
32198 (fezes)	<i>II/A</i>	34,3
32200(fezes)	<i>II/G</i>	32,9
32229	<i>II/GA</i>	32,1
32344 (fezes)	<i>ID/GA</i>	29,6
32414 (fezes)	<i>II/GA</i>	32,9
32416 (fezes)	<i>II/A</i>	37,7
32477	<i>II/GA</i>	34,0
32489	<i>II/Alelo A</i>	34,1
32512 (fezes)	<i>II/G</i>	31,9
32517	<i>II/GG</i>	34,5
32529	<i>II/negativo</i>	34,5
32531	<i>II/AA</i>	33,8

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo seccional baseado em um inquérito epidemiológico envolvendo crianças que vivem no estado de RR (Brasil) e na Guiana e Venezuela, países com os quais o Brasil faz fronteira. Todas as crianças deste estudo, embora tenham características físicas da etnia indígena, a saber Yanomami, Macuxi e Ingaricó. Moraes *et al.*, (2019), têm evidenciado, através de estudos envolvendo o gene *FUT2* responsável pelo perfil secretor quanto aos antígenos do grupo histo sanguíneo, o quanto a população desta região norte do Brasil e países vizinhos é particular quanto a sua genética, provavelmente devido a aspectos genéticos ligados a etnia indígena, assim como hábitos alimentares e culturas que interferem na ação dos genes e suas funções (YINGYING *et al.*, 2022). Neste estudo, detectamos SARS-CoV-2 em crianças de 0 a 3 anos com DDA e com IRA utilizando amostras de fezes e swab-salivar utilizando como alvo os 3 genes do SARS-CoV-2 (*E*, *N* e *RdRp*) para um diagnóstico mais completo da COVID-19 neste grupo estudado.

Este estudo foi baseado na hipótese principal de que crianças abaixo da faixa etária para qual as atuais vacinas são recomendadas, poderiam ser reservatórios da infecção pelo SARS-CoV-2. Também pensamos que a vacinação para SARS-CoV-2 deveria ser recomendada se estas crianças tiverem fatores de susceptibilidade, por apresentarem genes que são considerados como característicos de um perfil de comorbidade para a COVID-19 (JONE *et al.*, 2022). Além das questões elencadas acima, nosso objetivo foi verificar o *shedding* viral SARS-CoV-2 que as crianças eliminam nas fezes e verificar correlação com a DDA.

A baixa frequência na detecção de SARS-CoV-2 observada neste estudo em todos os grupos estudados, DDA e IRA - fezes e swab-salivar, poderia ser explicada pelo fato de crianças quando em contato com o vírus não apresentarem um quadro grave da doença, sendo em sua maioria, assintomáticas ou com sintomas leves, pois quanto menor a quantidade de partículas virais no indivíduo, mais difícil realizar a detecção (WHO, 2021; CASCELLA *et al.*, 2020). No entanto, foi observada uma menor frequência de SARS-CoV-2 no grupo de crianças com IRA em comparação com o grupo de crianças com DDA, tanto em amostras de fezes quanto em swab-salivar. Estes resultados poderiam ser explicados por trabalhos como o de Lo vecchio *et al.*, (2021) e Who, (2021) que evidenciam que crianças em contato com o SARS-CoV-2, apresentam mais sintomas gastrointestinais incluindo DDA, em comparação com os adultos. De fato, o intestino é um local ativo de replicação do SARS-CoV-2, como foi demonstrado pelo estudo de DEVAUX, LAGIER e RAOULT, 2021. Possivelmente a baixa frequência de

detecção possa estar associada a maturidade do sistema imunológico dessas crianças que, em contato com o agente viral SARS-CoV-2 “resolvem” a infecção tão rápido, diminuindo a produção de partículas virais produzidas (TRIGGLE *et al.*, 2021). Isso poderia explicar o porquê de, em nosso estudo, somente ter sido detectado o gene *E* em todas as amostras positivas e nenhuma amostra foi positiva para o principal marcador de replicação *RdRp*.

Este estudo também mostrou uma maior frequência de SARS-CoV-2 em amostras de fezes em crianças com IRA em comparação com amostras de swab-salivar em crianças deste mesmo grupo. Um possível motivo para este resultado pode ser as evidências de que a positividade em amostras de fezes pode preceder a detecção em amostras respiratórias e permanecer positiva após diminuição dos sintomas (TAN *et al.*, 2020; LING *et al.*, 2020 e WANG *et al.*, 2020). Por outro lado, houve uma maior frequência de SARS-CoV-2 em swab-salivar de amostras com DDA do que nas fezes, cooperando com estudos que indicam que amostras do trato respiratório como swab-salivar e/ou de swab-nasofaringe são o tipo de amostra biológica mais confiáveis para diagnóstico de COVID-19 por RT-PCR em tempo real (PAHO, 2020).

Não houve casos da mesma amostra de DDA ou IRA atestarem positividade para SARS-CoV-2 tanto nas fezes quanto na saliva em simultâneo, este resultado pode contribuir para a necessidade de se utilizar as fezes como amostra biológica para um diagnóstico mais completo da COVID-19 em crianças menores de 3 anos, visto que o que foi detectado nas fezes não foi detectado na saliva e vice-versa, junto com o fato de crianças terem uma maior quantidade de casos de diarreia quando em contato com o SARS-CoV-2 em comparação com os adultos, indicando o intestino como um local ativo de infecção viral (TAN *et al.*, 2020 e WHO, 2021).

Através deste estudo, também realizamos a genotipagem dos SNP *I/D* (*rs4646994*) e *G8790A* (*rs2285666*), respectivamente das enzimas ACE e ACE2, que estão sendo relacionados à suscetibilidade aumentada à HAS e a gravidade aumentada da COVID-19 (PINHEIRO *et al.*, 2019; PATI *et al.*, 2020; PABALAN *et al.*, 2021). Este estudo também nos dá um panorama geral acerca do perfil destes SNP nessa população.

Quanto ao ACE SNP *I/D* (*rs4646994*), observamos uma maior frequência dos alelos *I/I* na população da região amazônica, chegando a uma frequência de 87.12% (176/202) seguido do perfil *I/D* com uma frequência de 7.42% (15/202) e por último o perfil *D/D* com 5.44% (11/202). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Verma, (2021) realizado com indianos de ≥ 46 anos (n=149) cujo perfil *I/I* representou 49.7% dos casos, *I/D* 38.9% e *D/D* 11.4% dos casos. Gunal *et al.*, (2021) em seu estudo, analisaram a relação entre os

genótipos *ACE* e a gravidade clínica da COVID-19, e concluíram que há uma maior predominância do *perfil I/I* (50%) entre os pacientes assintomáticos, enquanto o *perfil D/D* foi mais frequente entre os pacientes com sintomas graves (63,3%). Os autores apontam que o genótipo *ACE I/I* é protetor contra a forma grave da doença COVID-19. Esta hipótese poderia explicar os resultados do nosso estudo onde a maior predominância observada em crianças foi deste perfil (WHO, 2021). No entanto há controvérsias. Yamamoto *et al.*, (2020), em seu estudo de revisão sobre o SNP *ACE I/D*, relatou que apenas Hubacek *et al.*, (2021) em seu estudo com 408 sobreviventes da COVID-19 positivos para SARS-CoV-2 (163 assintomáticos e 245 sintomáticos) usando amostras de pacientes da República Checa, mostraram resultados de que indivíduos homocigotos *I/I*, em vez de *ACE D/D*, podem estar associados a um risco aumentado de COVID-19 sintomático. Pati *et al.*, (2020) em seu estudo na população asiática mostrou que o *alelo D* está associado à suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2 e à taxa de mortalidade, enquanto Pabalan *et al.*, (2021) evidenciaram que o *perfil D/D* pode ser um importante marcador prognóstico para mortalidade em pacientes asiáticos com COVID-19 com lesão pulmonar aguda, mostrando a importância de mais estudos relacionados a esse SNP.

Quanto ao SNP *G8790A (rs2285666) ACE2*, detectamos uma predominância do genótipo *GG* em crianças do sexo feminino com uma frequência de 52.94% seguido do genótipo *AG* com 26.47% e *AA* com 20.58%. Em crianças do sexo masculino, houve uma maior frequência do genótipo *G* com 58.76% seguido do genótipo *A* com 41.23%. Nossos resultados foram semelhantes ao de Pinheiro *et al.*, (2019) realizado com brasileiros não brancos e não negros da região do Brasil Central e que obteve 55.6% de frequência do genótipo *GG*, 35.8% do genótipo *AG* e 8.6% do genótipo *AA*; 76.2% do genótipo *G* e 23.8% do genótipo *A*. Porém, é interessante notar que em nosso estudo detectamos uma maior frequência dos genótipos *AA* e *A*, que como já relatado anteriormente, estão sendo relacionados à susceptibilidade de desenvolver lesão pulmonar grave e estar relacionado à sintomas neurológicos em pacientes com COVID-19 (ZHENG e CAO, 2020; STRAFELA *et al.*, 2020; ABOBAKER, NAGIB e ALSOUFI, 2021). Nosso estudo também obteve uma frequência de 5.15% (n=5) de indivíduos com a combinação dos genótipos *D/D ACE* e *alelo G ACE2*. Segundo Pinheiro *et al.*, 2019, a combinação do genótipo *D/D (ACE)* em conjunto com o *alelo G (ACE2)* apresentam susceptibilidade aumentada a HAS.

7 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou resultados que nos levam a concluir que crianças de 0 a 3 anos da região amazônica podem não ser um reservatório da infecção por SARS-CoV-2, visto que houve uma baixa frequência na detecção do gene *E* e ausência da detecção dos genes *N* e *RdRp* do vírus nesta população estudada. Também concluímos que o genótipo *G* do SNP G8790A (*rs2285666*) na ACE2 que está sendo constantemente associado a susceptibilidade aumentada a HAS (quando em conjunto com o genótipo *D/D* do SNP *rs4646994* na ACE) e o genótipo *I/I* do SNP *I/D* (*rs4646994*) na ACE que está sendo constantemente associado a um papel genético protetor a gravidade da COVID-19 em crianças é predominante neste grupo estudado. Este estudo pode ajudar no debate sobre a necessidade da implementação da vacinação em crianças de 0 a 3 anos. Além disso, estudos futuros com maior *n* amostral se fazem necessários para a confirmação destes resultados, assim como estudos que investiguem outros genes relacionados a susceptibilidade aumentada a doenças relacionadas ao agravamento da infecção por SARS-CoV-2.

REFERÊNCIAS

- ABCONSINDCON. Saneamento Roraima - <https://www.abconsindcon.com.br/wp-content/uploads/2020/06/Saneamento-RR.pdf>. 2020.
- ABOBAKER, A.; NAGIB, T.; ALSOUFI, A. The impact of certain genetic variants (single nucleotide polymorphisms) on incidence and severity of COVID-19. **J Gene Med**. 2021.
- ALCALÁ, A. *et al.* Molecular detection of human enteric viruses circulating among children with acute gastroenteritis in Valencia, Venezuela, before rotavirus vaccine implementation. **Gut pathogens**. 2018.
- ALSAYED, B. A, MIR, R. Severe COVID-19 Pneumonia and Genetic Susceptibility: A Case Report and Literature Review. **Cureus**. 2022.
- ANDERSEN, K. G. *et al.* The proximal origin of SARS-CoV2. **Nature Medicine**. 2020.
- AZHAR E. I. *et al.* The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). **Infect Dis Clin North Am**. 2019.
- BARRS VR *et al.* SARS-CoV-2 in Quarantined Domestic Cats from COVID-19 Households or Close Contacts, Hong Kong, China. **Emerg Infect Dis**. 2020.
- BENJAFIELD A. V *et al.* No association of angiotensin-converting enzyme 2 gene (ACE2) polymorphisms with essential hypertension. **Am J Hypertens**. 2004.
- BÉRANGÈRE, S. J; SIGURET, V; VEVRADIER, A. Understanding pathophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19. **Intensive Care Medicine**. 2020.
- BERNSTEIN, K. E *et al.* Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. **Nat Rev Nephrol**. 2018.
- BOURGONJE, A. R *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **The Journal of Pathology**. 2020.
- BRASIL. Diário Oficial da União. **República Federativa do Brasil**. Portaria n° 188, de 3 de fevereiro de 2020. Brasília 2020.
- BRASIL. Diário Oficial da União. **República Federativa do Brasil**. Lei de n° 13.979, de 6 de fevereiro de 2020. Brasília 2020.
- BRASIL. Diário Oficial da União. **República Federativa do Brasil**. Portaria interministerial MTP/MS N° 17, de 22 de março de 2022, publicado em 1° de abril de 2022. Brasília 2022.
- BRASIL. Governo Federal. **Ministério de Saúde**. Portaria assinada em 22 de fevereiro de 2022.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Saúde Brasil 2017**. Brasília, DF. 2018.

BURRELL L. M *et al.* ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. **Trends Endocrinol Metab.** 2004.

CÂMARA TÉCNICA DE ASSESSORAMENTO EM IMUNIZAÇÃO DA COVID-19 (CTAI-COVID) - https://www.conass.org.br/wp-content/uploads/2021/12/Nota_vacinacao-de-criancas_2021-12-23_assinado.pdf. 2021.

CAREY, R.M; PADIA, S.H. Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. **Trends Endocrinol. Metab.** 2008.

CASCELLA, M. *et al.* Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). **Stat Pearls.** 2020.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. CDC Updates and Shortens Recommended Isolation and Quarantine Period for General Population. **CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People.** 2021.

CHEN, Y. *et al.* Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. **Biochem Biophys Res Commun.** 2020.

CHEN, Y. High incidence of hospitalisation due to infectious gastroenteritis in older people associated with poor self-rated health. **BMJ Open.** 2015.

CHEUNG, K. S. *et al.* Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta analysis. **Gastroenterology.** 2020.

CHIU, R.W.K *et al.* ACE2 gene polymorphisms do not affect outcome of severe acute respiratory syndrome. **Clin. Chem.** 2004.

CHOLANKERIL *et al.* High Prevalence of Concurrent Gastrointestinal Manifestations in Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Early Experience From California. **Gastroenterology.** 2020.

CHU, D. K. *et al.* COVID-19 Systematic Urgent Review Group Effort (SURGE) study authors. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and metaanalysis. **Lancet.** 2020.

CORMAN, V *et al.* Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR. Protocol and preliminary evaluation as of Jan 13. 2020.

CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. The species Severe acute respiratory syndrome related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology.** 2020.

CNN. Saude recomenda quarta dose contra a COVID-19 para imunossuprimidos - <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/saude-recomenda-quarta-dose-contra-a-covid-19-para-imunossuprimidos-de-12-a-17-anos/>. 2022.

CNN. Tudo sobre dose de reforço COVID-19. <https://www.cnnbrasil.com.br/tudo-sobre/dose-de-reforco/>. 2022.

CROPLIFE - <https://croplifebrasil.org/noticias/a-agricultura-na-amazonia-e-produtiva-e-auxilia-as-comunidades-locais/>. 2020.

DHAFFER A.F *et al.* Genetic Polymorphisms. **IntechOpen**. 2019.

DIARRHOEAL DISEASES COLLABORATORS. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet Infect Dis**. 2017.

DONOGHUE, M *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. **Circ Res. American Heart Association, Inc.** 2000.

DROSTEN C *et al.* Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. **Trends Mol Med**. 2003.

FERREIRA, M. *et al.* Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005–2008. **Journal of medical virology**. 2010.

G1, GLOBO. <https://g1.globo.com/sp/sao-paulo/noticia/2022/04/19/com-fim-da-emergencia-contra-covid-no-brasil-coronavac-pode-deixar-de-ser-aplicada.ghtml>. 2022.

GARIGLIANY, M. *et al.* SARS-CoV-2 Natural Transmission from Human to Cat, Belgium, March 2020. **Emerg Infect Dis**. 2020.

GIRONACCI, M. M; COBA, M. P; PENA, C. Angiotensin-(1-7) binds at the type 1 angiotensin II receptors in rat renal cortex. **Regul. Pept**. 1999.

GRYTDAL, S. *et al.* Sustained Decline in Acute Gastroenteritis-Associated Hospitalizations and Outpatient Visits Among American Indian/Alaska Native Children After Rotavirus Vaccine Introduction, 2001–2014. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**. 2017.

GUNAL, O *et al.* Angiotensin-converting enzyme-1 gene insertion/deletion polymorphism may be associated with COVID-19 clinical severity: A prospective cohort study. **Ann. Saudi Med**. 2021.

GURWITZ, D. Angiotensin receptor blockers as tentative SARS-CoV-2 therapeutics. **Drug Dev Res**. 2020.

HAMET, P *et al.* SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Gene Is Associated with Hypertension and Severity of COVID 19: Interaction with Sex, Obesity, and Smoking. **Am J Hypertens**. 2021.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**. 2020.

HOSIE, MJ. *et al.* SARS-Coronavirus (CoV)-2 and cats. **European Advisory Board on Cat Diseases**. 2020.

HOU, L *et al.* Correlation between gene polymorphism in angiotensin II type 1 receptor and type 2 diabetes mellitus complicated by hypertension in a population of Inner Mongolia. **BMC Medical Genetics**. 2020.

HU, Y. *et al.* Prevalence and severity of corona virus disease 2019 (COVID19): A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Virology**. 2020.

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**. 2020.

HUBACEK, J.Á *et al.* ACE I/D polymorphism in Czech first-wave SARS-CoV-2 positive survivors. **Clin. Chim. Acta**. 2021.

HUI D. S. C; ZUMLA A. Severe Acute Respiratory Syndrome: Historical, Epidemiologic, and Clinical Features. **Infect Dis Clin North Am**. 2019.

IBGE - <https://folhabv.com.br/noticia/CIDADES/Capital/83-2--dos-indigenas-vivem-em-Roraima--diz-IBGE/17782>. 2016.

IBGE - <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rr.html>. 2022.

IBGE. Censo Demográfico 2010: área territorial brasileira. Rio de Janeiro. 2011.

IBGE. Pesquisa nacional de saúde 2013: ciclos de vida: Brasil e grandes cidades. Rio de Janeiro: Brasília. 2011.

IMAI, Y *et al.* Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis, **Circ. J**. 2010.

INSTITUTO BUTANTAN - <https://butantan.gov.br/noticias/criancas-desenvolvem-sintomas-diferentes-da-omicron--irritacao-na-pele-esta-entre-eles>. 2022.

INSTITUTO DE MÉTRICA E AVALIAÇÃO DA SAÚDE. Diarrhoea Prevalence <https://vizhub.healthdata.org/lbd/diarrhoea>. 2019.

ITOYAMA, S *et al.* ACE1 polymorphism and progression of SARS. **Biochem Biophys Res Commun**. 2004.

JESUS, J *et al.* Importation and early local transmission of COVID-19 in Brazil, 2020. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. 2020.

JOLY, B. S; SIGURET, V; VEYRADIER, A. Understanding pathophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19. **Intensive Care Medicine**. 2020.

- JONE, P *et al.* SARS-CoV-2 Infection and Associated Cardiovascular Manifestations and Complications in Children and Young Adults: A Scientific Statement From the American Heart Association. **American Heart Association**, Inc. 2022.
- KANG G. Rotavirus vaccines. **Indian J. Med Microbiol.** 2006.
- KARIM, S. S. A; OLIVEIRA, T. New SARS-CoV-2 Variants — Clinical, Public Health, and Vaccine Implications. **The New England Journal of Medicine.** 2013.
- KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ.** 2003.
- KUBA, K; IMAI, Y; PENNINGER, J. M. Multiple functions of angiotensin converting enzyme 2 and its relevance in cardiovascular diseases. **Circ. J.** 2013.
- LAMBERT, D.W; CLARKE, N.E; TURNER, A.J. Not just angiotensinases: new roles for the angiotensin-converting enzymes, **Cell Mol. Life Sci.** 2010.
- LAURING, S. A; HODCROFT, E. B. Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? **JAMA.** 2021.
- LEUNG, WK. *et al.* Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome associated coronavirus infection. **Gastroenterology.** 2003.
- LI, Q. *et al.* Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus infected pneumonia. **The New England Journal of Medicine.** 2020.
- LI, Y. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and essential hypertension in the Chinese population: a meta-analysis including 21,058 participants. **Intern Med J.** 2012.
- LIN M. H *et al.* Real-time PCR for rapid genotyping of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. **Clin Biochem.** 2001.
- LING, Y. *et al.* Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients. **Chin Med J.** 2020.
- LO VECCHIO *et al.* Factors Associated With Severe Gastrointestinal Diagnoses in Children With SARS-CoV-2 Infection or Multisystem Inflammatory Syndrome. **JAMA.** 2021.
- LU, N *et al.* ACE2 gene polymorphism and essential hypertension: an updated meta analysis involving 11,051 subjects. **Mol. Biol. Rep.** 2012.
- LU, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet.** 2020.
- MARSHALL, R.P.; WEBB, S.; BELLINGAN, G.J. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with susceptibility and outcome in acute respiratory distress syndrome. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2002.

MATSUDA, A.; KISHI T.; JACOB A. Association between insertion/deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis. **BMC Med. Genet.** 2012.

MILLS, K.T *et al.* Global Burden of Hypertension. **J Hypertens.** 2015.

MILLS, KT *et al.* Global Burden of Hypertension. **J Hypertens.** 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico Especial. Semana Epidemiológica 21. **Secretaria de Vigilância em Saúde.** 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde amplia dose de reforço contra a Covid-19 para adolescentes - <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/maio/ministerio-da-saude-amplia-dose-de-reforco-contr-a-covid-19-para-adolescentes>. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Painel coronavírus - covid.saude.gov.br. 2022.

MORAES *et al.* Phenotyping of Lewis and secretor HBGA from saliva and detection of new FUT2 gene SNPs from young children from the Amazon presenting acute gastroenteritis and respiratory infection. **Infection, Genetics and Evolution.** 2019.

NEWMAN, A. *et al.* First Reported Cases of SARS-CoV-2 Infection in Companion Animals - New York, March-April 2020. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** 2020.

OLIVEIRA, T. C. R.; LATORRE, M. R. D. O. Trends in hospital admission and infant mortality from diarrhea: Brazil, 1995-2005. **Rev. Saúde Pública, São Paulo.** 2010.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde, paho.org/pt/vacinas-contr-a-covid-19/perguntas-frequentes-vacinas-contr-a-covid-19. 2022.

ORESHKOVA, N. *et al.* SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. **Euro Surveill.** 2020.

OUDIT, G.Y *et al.* SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS. **Eur. J. Clin. Invest.** 2009.

PABALAN, N *et al.* Ethnic and age-specific acute lung injury/acute respiratory distress syndrome risk associated with angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphisms, implications for COVID-19: A meta-analysis. **Infect. Genet. Evol.** 2021.

PACHETTI, M. *et al.* Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. **J Transl Med.** 2020.

PAHO, PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION

<https://www.paho.org/en/documents/laboratory-guidelines-detection-and-diagnosis-covid-19-virus-infection>. Laboratory Guidelines for the Detection and Diagnosis of COVID-19 Virus Infection. 2020.

PAIM, A. *et al.* Will a little change do you good? A putative role of polymorphisms in COVID-19. **Immunol Lett.** 2021.

- PAN, L. *et al.* Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study. **Official Journal of the American College of Gastroenterology**. 2020.
- PATEL, DD *et al.* Analysis of the Pattern, Alliance and Risk of rs1799752 (ACE I/D Polymorphism) with Essential Hypertension. **Indian J Clin Biochem**. 2022.
- PATI, A *et al.* ACE deletion allele is associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and mortality rate: An epidemiological study in the Asian population. **Clin. Chim. Acta**. 2020.
- PERLOT, T; PENNINGER, J. M. ACE2 – From the renin–angiotensin system to gut microbiota and malnutrition. **Microbes Infect**. 2013.
- PINHEIRO, D. S *et al.* The combination of *ACE I/D* and *ACE2* G8790A polymorphisms reveals susceptibility to hypertension: A genetic association study in Brazilian patients. **PLoS ONE**. 2019.
- POLAND G. A; OVSYANNIKOVA I. G.; KENNEDY R. B. SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. **The Lancet**. 2020.
- RICHMAN D. D *et al.* Clinical Virology, 4th ed. Washington: **ASM Press**. 2016.
- RIGAT, B *et al.* An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **J Clin Invest. American Society for Clinical Investigation**. 1990.
- RIVELLESE, F; PREDILETTO, E. ACE2 at the centre of COVID-19 from paucisymptomatic infections to severe pneumonia. **Autoimmun Ver**. 2020.
- ROWE, B. P *et al.* Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain, **Regul. Pept**. 1995.
- RUIZ-ARRONDO, I. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in pets living with COVID-19 owners diagnosed during the COVID-19 lockdown in Spain: A case of an asymptomatic cat with SARS-CoV-2 in Europe. **Transbound Emerg Dis**. 2020.
- SABATER, M. *et al.* Polymorphisms in ACE, ACE2, AGTR1 genes and severity of COVID-19 disease. **PloS One**. 2022.
- SAILLEAU, C. *et al.* First detection and genome sequencing of SARS-CoV-2 in na infected cat in France. **Transbound Emerg Dis**. 2020.
- SANTOS, R. A *et al.* Angiotensin-(1e7) is an endogenous ligand for the G protein coupled receptor Mas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 2003.
- SANTOS, R. A *et al.* Angiotensin converting enzyme 2, angiotensin-(1e7) and Mas: new players of the renineangiotensin system. **J. Endocrinol**. 2013.

SEGALÉS J. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in a cat owned by a COVID-19-affected patient in Spain. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2020.

SESAU. Calendário Nacional de Imunização 2022. **saude.es.gov.br**. 2022.

SINGHAL, T. A review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). **The Indian Journal of Pediatrics**. 2020.

SOUZA, R. S. *et al.* Saneamento básico no estado de Roraima: Situação atual e perspectivas. **Revista Análise**. 2010.

SOHRABI, C. *et al.* World Health Organization declares global emergency: a review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). **Internatinal Journal of Surgery**. 2020.

STRAFELA, C *et al.* Analysis of ACE2 Genetic Variability among Populations Highlights a Possible Link with COVID-19-Related Neurological Complications. **Genes (Basel)**. 2020.

TAN, Y. *et al.* Epidemiologic and clinical characteristics of 10 children with coronavirus disease 2019 in Changsha, China. **J Clin Virol**. 2020.

TIAN, Y. *et al.* Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. **Aliment Pharmacol Ther**. 2020.

TIPNIS S. R *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology**. 2000.

TRIGGLE, C. R. *et al.* A Comprehensive Review of Viral Characteristics, Transmission, Pathophysiology, Immune Response, and Management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a Basis for Controlling the Pandemic. **Frontiers in Immunology**. 2021.

TROEGER, C *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious Diseases**. 2018.

UMAKANTHAN, S. *et al.* Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Postgraduate Medical Journal**. 2020.

VAN DER MERWE, L *et al.* Genetic variation in angiotensin-converting enzyme 2 gene is associated with extent of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. **Hum. Genet**. 2008.

VERMA, S *et al.* Impact of I/D polymorphism of angiotensin-converting enzyme 1 (ACE1) gene on the severity of COVID-19 patients. **Infection, genetics and evolution :journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**. 2021.

VILLAR, J *et al.* Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is not associated with susceptibility and outcome in sepsis and acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med**. 2008.

- WALKER, D. *et al.* Prevalence and Characteristics of Gastrointestinal Symptoms in Patients with SARS-CoV-2 Infection in the United States: A Multicenter Cohort Study. **Gastroenterology**. 2020.
- WANG, X. *et al.* Persistence of intestinal SARS-CoV-2 infection in patients with COVID-19 leads to re-admission after pneumonia resolved. **Int J Infect Dis**. 2020.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern. 2021.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) situations reports: Weekly epidemiological and operational updates - 29 December 2020.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. COVID-19 disease in children and adolescents: Scientific brief, 29 September 2021.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dados atuais sobre a COVID-19 <https://covid19.who.int>. 2022.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. 2020.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Episode #22 - Children & COVID-19. 2021.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hipertensão e COVID-19, Informe científico. 2021.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Geneva: WHO. 2020.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Origin of the SARS-CoV-2 virus. 2020.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working Group on the Clinical Characterisation and Management of COVID-19 infection. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. **Lancet Infectious Disease**. 2020.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Statistics. Monitoring Health For The Sdgs. 2018.
- WIERSINGA, W. J; RHODES, A; CHENG, A. C. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**. 2020.
- XU, Z. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respiratory Medicine**. 2020.
- YAMAMOTO, N *et al.* SARS-CoV-2 infections and COVID-19 mortalities strongly correlate with ACE1 I/D genotype. **Gene**. 2020.
- YINGYING, L. *et al.* Role of Histone Post-Translational Modifications in Inflammatory Diseases. **Frontiers in Immunology**. 2022.

ZHANG, Q *et al.* Association of angiotensin-converting enzyme 2 gene polymorphism and enzymatic activity with essential hypertension in different gender: a case–control study. **Medicine (Baltimore)**. 2018.

ZHAO, W. *et al.* Clinical characteristics and durations of hospitalized patients with COVID-19 in Beijing: a retrospective cohort study. **medRxiv**. 2020.

ZHENG, H.; CAO, J. J. Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism and Severe Lung Injury in Patients with Coronavirus Disease 2019. **Am J Pathol**. 2020.

ZHOU, Z. *et al.* Effect of Gastrointestinal Symptoms in Patients With COVID-19. **Gastroenterology**. 2020.

ZOU, X *et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. **Front Med**. 2020.

ANEXO A – “Artigos publicados durante a realização do mestrado”

BRAZ J INFECT DIS 2020;24(6):575-579

Sociedade
Brasileira de
InfectologiaThe Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Brief communication

**First report of human astrovirus MLB2 in Brazil
detected in feces of children with acute
gastroenteritis living in the state of Roraima,
Northern Brazil**Alberto Ignacio Olivares Olivares^{a,b,1}, Marcia Terezinha Baroni de Moraes¹,
Herika Caroline Fernandes de Queiroz^a, Yan Cardoso Pimenta^{a,c},
José Paulo Gagliardi Leite^a^a Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^b Oswaldo Cruz Foundation, Oswaldo Cruz Institute, Post-Graduate Program in Parasite Biology, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^c Oswaldo Cruz Foundation, National Institute for Quality Control in Health, Post-Graduate Program in Sanitary Surveillance, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

International Journal of Infectious Diseases 95 (2020) 32–37



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid**Human Bocavirus genotypes 1 and 2 detected in younger
Amazonian children with acute gastroenteritis or respiratory
infections, respectively**Gabriel Azevedo Alves Leitão^{a,b,1}, Alberto Ignácio Olivares Olivares^{c,1},
Yan Cardoso Pimenta^a, Isabella Fernandes Delgado^{b,*}, Marize Pereira Miagostovich^a,
José Paulo Gagliardi Leite^a, Marcia Terezinha Baroni de Moraes^{a,*}^a Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenida Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^b Post-Graduate Program in Sanitary Surveillance, National Institute for Quality Control in Health, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenida Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^c Post-Graduate Program in Parasite Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenida Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

International Journal of Infectious Diseases 108 (2021) 494–502



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid**Epidemiology of enteric virus infections in children living in the
Amazon region**Alberto Ignacio Olivares Olivares^{a,b}, Gabriel Azevedo Alves Leitão^{a,c},
Yan Cardoso Pimenta^{a,c}, Carina Pacheco Cantelli^a, Tulio Machado Fumian^a,
Alexandre Madi Fialho^a, Sergio da Silva e Mouta Junior^a, Isabella Fernandes Delgado^c,
Johan Nordgren^d, Lennart Svensson^d, Marize Pereira Miagostovich^a,
José Paulo Gagliardi Leite^{a,1}, Marcia Terezinha Baroni de Moraes^{a,1,*}^a Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, Avenida Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^b Post-Graduate Program in Parasite Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, Avenida Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^c Post-Graduate Program in Sanitary Surveillance, National Institute for Quality Control in Health, Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, Avenida Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^d Division of Molecular Virology, Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, Linköping, Sweden

ANEXO B – “Artigo submetido para publicação”

Title page_artigo submetido a revista journal.pediatrics@cchmc.org

Title: Epidemiological surveillance of SARS-CoV-2 in children under 5-year-old living in the Northwest Amazon region: hypertension and HBGA host genetic susceptibility association

Yan Cardoso Pimenta ^a, Gabriel Azevedo Alves ^{a, b} M.Sc., Alexandre Madi Fialho ^a, Diego Archanjo Oliveira Rodrigues ^a, Carlos Eduardo da Silva Figueiredo ^{a, c, d} MD M.Sc., Mauro França Silva ^{a, c, e}, M.Sc., Alberto Ignácio Olivares Olivares ^f MD M.Sc., Isabella Fernandes Delgado ^g, Johan Nordgren ^h, José Paulo Gagliardi Leite ^a PhD, Marcia Terezinha Baroni de Moraes ^{a*} PhD

^a Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, 21040-360, RJ, Brazil

^b Unit for Supporting the Diagnostic of Covid 19, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, 21040-360, RJ, Brazil

^c Post-Graduate Program in Tropical Medicine, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, 21040-360, RJ, Brazil

^d National Institute of Women, Children and Adolescents' Health Fernandes Figueira, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Rui Barbosa, 716-Flamengo, Rio de Janeiro, 22250-020, RJ, Brazil

^e Technological coordination, tetraviral vaccine, Immunobiological Technology Institute (Biomanguinhos), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, 21040-360, RJ, Brazil.

^f Secretaria Estadual de Saúde de Roraima (SESAU/RR), Rua Madrid, 180-Aeroporto, Boa Vista 69310-043, RR, Brazil

^g Universidade Estadual de Roraima (UFRR), Rua 7 de setembro, 231-Canarinho, Boa Vista, 69306-530, RR, Brazil.

^h Division of Molecular Virology, Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, 58185, Linköping, Sweden

* - Corresponding author: baroni@ioc.fiocruz.br Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Brasil, 4365-Manguinhos, Rio de Janeiro, 21040-360, RJ, Brazil. Telephone: +55 21 2562 1851.