



ACESSO ABERTO

Data de Recebimento:
29/09/2023

Data de Aceite:
16/03/2023

Data de Publicação:
06/04/2023

Revisor por:
Wilma Caitano dos Santos

***Autor correspondente:**
Tatiana Xavier de Castro,
txcastro@id.uff.br

Citação:
RAMOS, Y. A. H; GARCIA,
R. C. N. C; CASTRO, T. X.
Aplicação de ferramentas
de bioinformática no estudo
evolutivo do sars-cov-2
associado à infecção em cães
e gatos domésticos. **Revista
Multidisciplinar em Saúde**,
v. 4, n. 2, 2023. <https://doi.org/10.51161/integrar/rem/3686>

APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA NO ESTUDO EVOLUTIVO DO SARS-COV-2 ASSOCIADO À INFECÇÃO EM CÃES E GATOS DOMÉSTICOS

Yasmim Akemi Hirose Ramos¹, Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia¹, Tatiana Xavier de Castro^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia e Parasitologia- Universidade Federal Fluminense. Rua Hernani de Mello 101, terceiro andar - Ingá, Niterói, Rio de Janeiro

RESUMO

Introdução: A estreita associação entre humanos e animais de companhia (cães e gatos domésticos) e a suscetibilidade dessas espécies ao SARS-CoV-2 vem trazendo questionamentos sobre o potencial zoonótico desse agente. Nesse contexto, a bioinformática é uma ferramenta útil pois, a partir das sequências genéticas de SARS-CoV-2, permite inferir sobre a origem desse vírus nas diferentes espécies e sobre seu o impacto no homem e nos animais.

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi realizar o estudo filogenético do SARS-Cov-2 associado à infecção em cães e gatos domésticos a partir de sequências completas do gene que codifica a proteína S disponíveis no banco de dados do *GenBank*, buscando, através de ferramentas de bioinformática, trazer mais informações sobre a origem e potencial zoonótico desses agentes.

Material: Um total de 29 sequências de gatos e 13 de cães de diferentes países foram obtidas no site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e o gene que codifica a proteína S do SARS-CoV-2 analisados. Foram também incluídas oito sequências de SARS-CoV-2 em humanos e uma sequência de BatCoV (utilizadas como referência na análise filogenética).

Resultados: Foram observados valores de homologia bastante elevados entre as amostras humanas e as amostras caninas e felinas, variando entre 100% e 98,5%. Valores mais baixos foram observados entre as sequências caninas e felinas e a variante mais recentemente descrita Ômicron. A sequência de coronavírus de morcego MZ9370 (2021) apresentou uma homologia de 87 a 87,2% em comparação com as sequências humanas, felinas e caninas. A árvore filogenética evidenciou a formação de um grande clado englobando amostras felinas, caninas e humanas reunidas e um clado menor com a sequência de coronavírus de morcego do estudo. **Conclusão:** Os resultados da análise evolutiva sugeriram o aparecimento simultâneo das amostras de SARS-CoV-2 em cães, gatos e humanos e um agrupamento filogenético das sequências, em sua maioria, por países. Essas análises sugerem que as sequências de SARS-CoV-2 descritas em cães, gatos e humanos possuem uma origem filogenética comum, o que, somado ao conhecimento sobre as características do vírus, contribui para a hipótese de transmissão interespecie.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; análise filogenética; potencial zoonótico; estudo evolutivo

ABSTRACT

Introduction: The close association between humans and companion animals (domestic dogs and cats) and the susceptibility of these species to SARS-CoV-2 has raised questions about the zoonotic potential of this agent. In this context, bioinformatics is a useful tool because, based on the genetic sequences of SARS-CoV-2, it allows inferences about the origin of this virus in different species and its impact on humans and animals. **Objective:** The objective of this work was to carry out a phylogenetic study of SARS-Cov-2 associated with infection in domestic dogs and cats from complete sequences of the gene that encodes protein S available in the GenBank database, searching, through tools of bioinformatics, bring more information about the origin and zoonotic potential of these agents. **Material:** A total of 29 sequences from cats and 13 from dogs from different countries were obtained from the NCBI website (National Center for Biotechnology Information) and the gene encoding the SARS-CoV-2 S protein was analyzed. Eight human SARS-CoV-2 sequences and one BatCoV sequence (used as a reference in the phylogenetic analysis) were also included. **Results:** Very high homology values were observed between human samples and canine and feline samples, ranging from 100% to 98.5%. Lower values were observed between the canine and feline sequences and the most recently described variant Omicron. The bat coronavirus MZ9370 (2021) sequence showed 87 to 87.2% homology compared to the human, feline, and canine sequences. The phylogenetic tree showed the formation of a large clade encompassing feline, canine and human samples pooled and a smaller clade with the bat coronavirus sequence of the study. **Conclusion:** The results of the evolutionary analysis suggested the simultaneous appearance of SARS-CoV-2 samples in dogs, cats and humans and a phylogenetic grouping of sequences, mostly by countries. These analyzes suggest that the SARS-CoV-2 sequences described in dogs, cats and humans have a common phylogenetic origin, which, in addition to knowledge about the virus's characteristics, contributes to the hypothesis of interspecies transmission.

Keywords: SARS-CoV-2; phylogenetic analysis; zoonotic potential; evolutionary study

1 INTRODUÇÃO

Os coronavírus (CoVs) são vírus de RNA de fita simples, de polaridade positiva, que pertencem à família *Coronaviridae*. Devido a frequentes eventos de recombinação e alta plasticidade genômica, os CoVs são propensos a transmissão cruzada de espécies e são capazes de se adaptar a novos hospedeiros (SIMON-LORIERE, HOLMES, 2011). O novo CoV humano, SARS-CoV-2 classificado no gênero *Betacoronavirus*, foi identificado pela primeira vez na província de Wuhan, China, em dezembro de 2019 e, em apenas quatro meses já havia se disseminado globalmente. A estreita associação entre humanos e animais como animais de companhia (cães e gatos domésticos) levanta a discussão sobre os riscos potenciais de transmissão de SARS-CoV-2 de pacientes humanos com COVID-19 para animais (“zoonose reversa”) e a importância destes animais atuarem como reservatórios do vírus propiciando o aparecimento de novas variantes, como também na manutenção do vírus no ambiente (GRAUDREAU et al., 2020).

Ressalta-se que a glicoproteína “S” (do inglês, spike) presente no envelope viral, possui uma região denominada de domínio de ligação ao receptor (do inglês receptor binding domain - RBD), responsável pela ligação do vírus à enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2), molécula expressa na superfície da célula a qual o vírus utiliza como receptor para entrada na célula hospedeira (KIROS et al., 2020). Essa região (RDB) também é o alvo principal para a resposta imune e mutações nesse sítio contribuem para a emergência de novas variantes que podem influenciar a transmissibilidade e antigenicidade do vírus (HOSIE et al., 2020).

Neste sentido, destaca-se que os vírus são microorganismos ideais para estudos de filogenia e filodinâmica por sofrerem mutações e se adaptarem ao seu ambiente em um período mais rápido

especialmente os de genoma RNA, que apresentam uma alta taxa de mutação em um período relativamente curto (SIMON-LORIERE, HOLMES, 2011). Através destas análises é possível correlacionar os processos históricos e geográficos com migrações, guerras, e catástrofes, entendendo melhor a migração do vírus entre populações e prever possíveis rotas de vírus, contribuindo assim para a prevenção e controle de doenças virais.

O objetivo desse trabalho foi realizar o estudo filogenético dos SARS-CoV-2 associados à infecção em cães e gatos domésticos a partir de sequências completas do gene que codifica a proteína S disponíveis no banco de sequências *GenBank*, buscando, através de ferramentas de bioinformática, trazer mais informações sobre a origem e potencial zoonótico desses agentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As sequências protótipos representantes de SARS-CoV-2 associadas à infecção em cães e gatos domésticos, descritas em diferentes países nos anos de 2020 e 2021, foram obtidas no site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), através dos seus números de acesso.

As análises foram direcionadas para o gene que codifica a proteína S (com aproximadamente 1273 aminoácidos e 3800 pares de base), que participa do processo de ligação ao receptor celular e onde estão as principais mutações relacionadas ao surgimento de novas variantes do vírus (HUANG *et al.*, 2020). Foram incluídas no *dataset* somente sequências completas do gene que codifica a proteína S, que possuam dados completos referentes ao ano e local de origem relacionadas às infecções em cães e gatos domésticos. As sequências desse estudo estão disponibilizadas ao público na referida plataforma (acesso aberto), e já passaram por análise dos respectivos comitês de ética e banco de material genético para publicação dos artigos científicos. As sequências foram então renomeadas com o número de acesso no *GenBank* seguido da espécie (DOG/ CAT/BAT/HUMAN), sigla do país de origem e ano de coleta da amostra.

Foram utilizados programas e sites de acesso livre utilizados nas análises filogenéticas e filogeográficas. Para o acesso e seleção das sequências foi utilizada a plataforma *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>); para edição e alinhamento das sequências, o programa BioEdit 7.5.2 (<https://bioedit.software.informer.com/>); para escolha do melhor modelo filogenético, Modeltest (<http://evomics.org/resources/software/molecular-evolution-software/modeltest/>); para a análise filogenética, MEGA 10.0.5 (<https://www.megasoftware.net/>).

As árvores filogenéticas foram construídas através do programa MEGA 10.0.5, com o método quantitativo (método baseado em distância). Por meio de ferramentas do programa, foi definido o modelo evolutivo Hasegawa-Kishino-Yano G+I (G = shape parameter of the gamma distribution e I = proportion of invariable sites) aplicado com método estatístico Maximum Likelihood e 1000 réplicas de Bootstrap.

3 RESULTADOS

Inicialmente, foram selecionadas todas as sequências relativas à proteína “S” ou genoma completo oriundas de infecções descritas em cães (n=13) e gatos domésticos (n=33) disponíveis na plataforma *GenBank*. Ao longo do processo de edição, 17 sequências com baixa qualidade ou dados incompletos foram excluídas, finalizando 29 sequências de gatos e 13 de cães (Tabela 1). Além disso, foram selecionadas 8 sequências referentes a cinco das principais variantes de SARS-CoV-2 circulantes e oriundas de humanos e, ainda, uma sequência de coronavírus de morcego (BatCoV) que foram utilizadas como sequências de

referência na construção da árvore.

A análise da matriz de identidade dessas sequências (Tabela 1) revelou valores de homologia bastante elevados entre as amostras humanas e as amostras caninas e felinas, com valores variando entre 100% e 98,5%. Valores mais baixos foram observados entre as sequências caninas e felinas e a variante Ômicron. A sequência BatCoV MZ9370 (2021) apresentou uma homologia de 87 a 87,2% em comparação com as sequências humanas, felinas e caninas (Tabela 1).

Ferramentas moleculares de sequenciamento e análise filogenética foram usadas desde o aparecimento dos primeiros casos de COVID-19 (ZHU *et al.*, 2020) e vem permitindo em tempo recorde compreender a origem desse agente e seu comportamento nas diferentes espécies de animais de companhia e produção que convivem diretamente com a população humana. Desde então um grande número de sequências genéticas completas ou parciais dos diferentes *Alfa* e *Betacoronavírus*, principalmente o SARS-CoV-2 foram disponibilizadas nos principais bancos de dados de material genético, com acesso livre. Essas sequências são oriundas dos diferentes estudos que envolvem sequenciamento do genoma viral obtido a partir de amostras de diferentes espécies animais, incluindo o homem (DECARO *et al.*, 2021; GHORBANI *et al.*, 2021; SAILLEAU *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2022) e constituem um banco extremamente rico de informação para estudos de bioinformática.

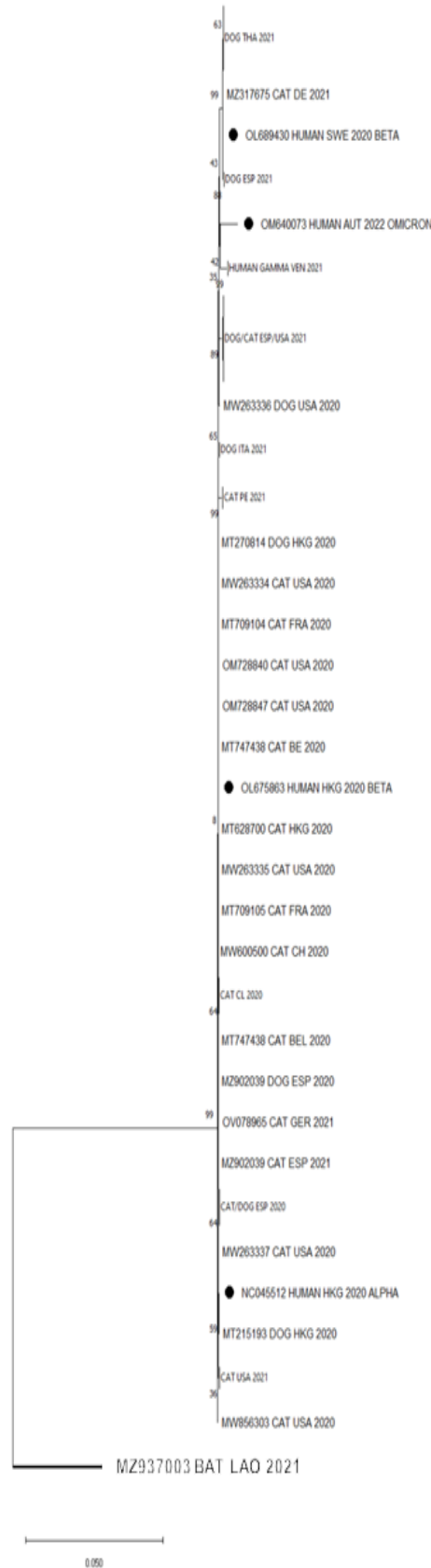
Tabela 1: Matriz de homologia das sequências do gene que codifica a proteína S do SARS-CoV-2 descrito em 13 cães e 29 gatos incluídos nesse estudo. Foram também incluídos para comparação oito sequências protótipos de origem humana e um coronavírus de morcego. A matriz foi gerada no programa BioEdit 7.5.2.

Sequências de SARS-CoV-2 de cães e gatos	Sequências de SARS-CoV-2 de humanos e Betaoronavírus de morcego									
	NC045512 HUMAN ALPHA	OL689430 HUMAN BETA	OL675863 HUMAN BETA	MZ611957 HUMAN GAMMA	MZ611956 HUMAN GAMMA	OL442185 HUMAN DELTA	OL442186 HUMAN DELTA	OM640073 HUMANOMICRON	MZ937003 BAT	
OK539641DOG_THA	0,996	0,993	0,996	0,993	0,993	0,999	0,999	0,988	0,872	
MZ396818DOG_THA	0,995	0,999	0,995	0,993	0,993	0,992	0,992	0,987	0,874	
MZ414173DOG_THA	0,995	0,999	0,995	0,993	0,993	0,992	0,992	0,987	0,874	
MZ401455DOG_THA	0,995	0,999	0,995	0,993	0,993	0,992	0,992	0,987	0,874	
MW397523DOG_ITA	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,99	0,874	
MW263336DOG_USA	0,998	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,99	0,874	
OK174326DOG_USA	0,996	0,992	0,996	0,993	0,993	0,999	0,998	0,988	0,872	
MZ914594DOG_ESP	0,995	0,999	0,995	0,993	0,993	0,992	0,991	0,987	0,873	
MZ902039DOG_ESP	0,995	0,991	0,995	0,992	0,992	0,992	0,991	0,986	0,87	
MZ902042DOG_ESP	0,995	0,991	0,995	0,992	0,992	0,992	0,991	0,986	0,87	
ON248600DOG_IND	0,996	0,992	0,996	0,993	0,993	0,998	0,998	0,988	0,872	
MT215193DOG_HKG	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,99	0,874	
MT270814DOG_HKG	0,999	0,996	1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,99	0,874	
MW263335CAT_USA	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,996	0,995	0,99	0,874	
MW263337CAT_USA	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,99	0,874	
MW856303CAT_USA	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,99	0,874	
MW263334CAT_USA	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,996	0,995	0,99	0,874	
OM728840CAT_USA	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,996	0,995	0,99	0,874	
OM728847CAT_USA	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,99	0,874	
MT628700CAT_HKG	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,996	0,995	0,99	0,874	
MT747438CAT_BEL	0,999	0,996	1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,99	0,874	
MW064264CAT_CHI	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,996	0,995	0,99	0,874	
OV078965CAT_GER	0,996	0,995	0,996	0,993	0,993	0,992	0,992	0,987	0,874	

Continuando Tabela 1

MZ317675CAT_GER	0,995	0,999	0,995	0,992	0,992	0,992	0,991	0,987	0,874
MZ902033CAT_ESP	0,995	0,991	0,995	0,992	0,992	0,991	0,991	0,986	0,87
MZ901915CAT_ESP	0,996	0,993	0,997	0,994	0,993	0,993	0,993	0,987	0,872
MZ902033CAT_ESP	0,994	0,991	0,995	0,992	0,991	0,991	0,991	0,985	0,87
OL336792CAT_ESP	0,995	0,991	0,995	0,992	0,992	0,997	0,997	0,987	0,872
MZ902039CAT_ESP	0,995	0,991	0,995	0,992	0,992	0,992	0,991	0,986	0,87
MW064260CAT_CL	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,99	0,874
MW064264CAT_CL	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,99	0,874
MW064259CAT_CL	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,99	0,874
MW064263CAT_CL	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,99	0,874
MT747438CAT_BE	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,996	0,995	0,99	0,874
MT709104CAT_FRA	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,996	0,995	0,99	0,874
MT709105CAT_FRA	0,999	0,995	0,999	0,996	0,996	0,996	0,995	0,99	0,874
MW600500CAT_CHI	0,998	0,995	0,999	0,996	0,996	0,995	0,995	0,989	0,874
MZ496613CAT_PE	0,992	0,988	0,992	0,989	0,989	0,989	0,989	0,983	0,87
MZ496614CAT_PE	0,992	0,988	0,992	0,989	0,989	0,989	0,989	0,983	0,87
MZ496616CAT_PE	0,992	0,988	0,992	0,989	0,989	0,989	0,989	0,983	0,87
MZ401455CAT_THA	0,995	0,999	0,995	0,992	0,992	0,992	0,991	0,987	0,874
OK55092CAT_THA	0,997	0,994	0,998	0,995	0,995	0,996	0,996	0,989	0,873

Figura 1: Árvore filogenética do gene que codifica a proteína S de 48 sequencias de SARS-CoV-2 oriundas de cães e gatos domésticos. Sequências protótipos de coronavírus de morcego e coronavírus humano (variantes alfa, beta, gamma, delta e ômicron) usando o modelo Hasegawa-Kishino-Yano+G e 1000 réplicas de bootstrap no programa MEGA 10.0.5. Sequências idênticas foram agrupadas para melhor visualização. As sequências protótipos humanas aparecem assinaladas em preto e a de coronavirus de morcego como grupo externo.



A árvore filogenética evidenciou a formação de um grande clado englobando amostras felinas, caninas e humanas reunidas (sem a formação de subclados significativos) e um clado menor (grupo externo) apenas com a sequência de BatCoV do estudo (Figura 1).

O primeiro estudo publicado envolvendo infecções experimentais em gatos domésticos mostrou que essa espécie pode ser infectada pelo SARS-CoV-2 e potencialmente transmitir o vírus a outros gatos por meio de aerossóis em um mesmo ambiente (HOSIE *et al.*, 2020). Posteriormente, o sequenciamento genético de uma amostra de SARS-CoV-2 de um gato doméstico com sinais respiratórios e digestivos leves revelou que o amostra de SARS-CoV-2 detectada no animal pertencia ao mesmo clado filogenético observado em humanos. Nesse estudo foi sugerido, porém, que o vírus foi transmitido dos tutores para os animais da residência (SAULEAU *et al.*, 2020). Em junho de 2022, uma equipe na Tailândia relatou a primeira evidência consistente de um gato domiciliado infectando uma médica veterinária com SARS-CoV-2. O gato era proveniente de responsáveis com COVID-19 e testou positivo para o vírus (SILA *et al.*, 2022).

Em relação aos cães domésticos, os primeiros casos foram descritos no início de 2020 quando um Spitz Alemão idoso com sinais sistêmicos testou positivo para o genoma do SARS-CoV-2, e um Pastor Alemão jovem com sinais respiratórios também apresentou um resultado positivo. Nesse segundo caso o cão entrou em contato com outros cães da residência que não se infectaram (SIT *et al.*, 2020). Semelhanças na sequência genética do SARS-CoV-2 dos tutores e dos animais de estimação nesses casos também sugeriram a transmissão do homem para o animal (KIROS *et al.*, 2020). Nas duas situações os tutores apresentaram sinais respiratórios de COVID-19, testando positivo.

As análises de homologia e de filogenia corroboram esses estudos uma vez que demonstram grande similaridade filogenética do gene que codifica a glicoproteína S oriundo de sequências de cães, gatos e humanos. Tais similaridades sugerem uma origem genética comum entre esses agentes, com características temporais, uma vez que a variante Ômicron, que apresenta circulação mais recente, foi a que apresentou menor homologia em comparação com as demais variantes humanas e animais. Tais dados sugerem que a circulação das variantes em humanos é seguida pela posterior contaminação e detecção em pets, conforme descrito por SAULEAU *et al.*, 2020.

Até o momento da realização desse estudo, o número de casos de COVID-19 no Brasil se encontra em decréscimo, com o aumento das taxas de imunização da população de uma forma geral. Entretanto, pelas características de adaptação e circulação do vírus observadas até o momento e pela interação homem-animais de estimação (principalmente cães e gatos) continua sendo importante a adoção de medidas preventivas pelos tutores que testarem positivos para COVID-19 tais como, evitar o contato direto com os animais durante o período de excreção do vírus. Para médicos veterinários que lidam diretamente com *pets* (principalmente felinos) apresentando sinais respiratórios segue também a recomendação do uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) durante o atendimento.

4 CONCLUSÕES

Nesse estudo, utilizando as ferramentas de bioinformática foi possível evidenciar a alta similaridade genômica e o agrupamento das sequências de SARS-CoV-2 de cães, gatos e humanos em um único clado. Tais achados corroboram com a ideia de uma origem única dos SARS-CoV-2 relacionados à infecção em humanos e animais de companhia e ressalta a necessidade de monitoramento desse agente nessas espécies.

Uma das limitações desse estudo foi o reduzido número de sequências completas que codificam a proteína S oriundas das espécies estudadas. Com a continuidade dos estudos de sequenciamento e análise filogenética e a subsequente inclusão de novas sequências no banco de dados, novas informações sobre as variantes de SARS-CoV-2 em cães e gatos serão geradas de forma a ampliar o conhecimento sobre estes eventos de transmissão interespecie.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao programa institucional de bolsas de iniciação científica Pró Reitoria de pesquisa, pós-graduação e Inovação, Universidade Federal Fluminense (PIBIC- PROPPI UFF)

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse na pesquisa

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DECARO, N. *et al.* Mutation analysis of the spike protein in Italian feline infectious peritonitis virus and feline enteric coronavirus sequences. **Research in Veterinary Science** v.135, p.15–19, 2021.

GHORBANI, A. *et al.* Comparative phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 spike protein—possibility effect on virus spillover. **Briefings in Bioinformatics**, v.22, n.05, p.1–9, 2021.

GRAUDREAU, N.N. *et al.* SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. **Emerging Microbes & Infection** v.9, n.1, p.2322-2332, 2020.

HOSIE, M.J. *et al.* Anthropogenic Infection of Cats during the 2020 COVID-19 Pandemic. **Viruses**, v.13, n.185, p.1-13, 2020

HUANG Y. *et al.* Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica** v.41, p.1141–1149, 2020.

KIROS, M. *et al.* COVID-19 pandemic: Current knowledge about the role of pets and other animals in disease transmission. **Virology Journal** v.17, p.143, 2020.

SAILLEAU, C. *et al.* First detection and genome sequencing of SARS-CoV-2 in an infected cat in France. **Transboundary and Emerging Diseases** v.67, n.6, p.2324-2328, 2020.

SILA T. *et al.* Suspected Cat-to-Human Transmission of SARS-CoV-2, Thailand July-September 2021. **Emerging Infectious Disease** v.28, n.7, p.1485-1488, 2022.

SIMON-LORIERE, E.; HOLMES, E. C. Why do RNA viruses recombine? **Nature Review Microbiology** v. 9, p. 617-626, 2011.

SIT, T.H.C. *et al.* Canine SARS-CoV-2 infection. **Nature**, v.586, n.7831, p.776–778, 2020.

YANG, H. *et al.* Phylogeny, Evolution, and Transmission Dynamics of Canine and Feline Coronaviruses: A Retro-Pro prospective Study. **Frontiers of Microbiology** v.13, article 850516, 2022.

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England Journal of Medicine**, v.382, p.727-33. 2020.