

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Isabela Lorraine Braga da Paz

**ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES ASSOCIADOS AOS
SINTOMAS DE ANOSMIA E AGEUSIA EM PACIENTES COM
COVID-19.**

INCIPIT VITA NOVA

Belo Horizonte

2023

Isabela Lorraine Braga da Paz

**ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES ASSOCIADOS AOS SINTOMAS DE
ANOSMIA E AGEUSIA EM PACIENTES COM COVID-19.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Genética.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Diana Bahia

Coorientador: Prof^º. Dr. Renan Pedra de Souza

BELO HORIZONTE

2023

043

Paz, Isabela Lorraine Braga da.

Aspectos clínicos e moleculares associados aos sintomas de anosmia e ageusia em pacientes com Covid-19 [manuscrito] / Isabela Lorraine Braga da Paz. – 2023.

103 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Profa. Dra. Diana Bahia. Coorientador: Prof. Dr. Renan Pedra de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Coronavírus. 3. Epidemiologia. 4.SARS-CoV-2. 5. Sinais e Sintomas. 6. Expressão gênica. I. Diana Bahia. II. Souza, Renan Pedra de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
 Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	341/2023
	Entrada 2º/2020
Isabela Lorraine Braga da Paz	CPF: 127.425.256-37

Às treze horas do dia **02 de junho de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Aspectos clínicos e moleculares associados aos sintomas de anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Diana Bahia**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Diana Bahia	UFMG	533.282.806-34	Aprovada
Renan Pedra de Souza	UFMG	064.488.066-01	Aprovada
Guilherme Mattos Jardim Costa	UFMG	055.469.096-92	Aprovada
Lidia Maria de Andrade	UFMG	977.255.796-72	Aprovada

Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis	UFMG	060.508.396-70	Aprovada
--	------	----------------	----------

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 02 de junho de 2023.

Diana Bahia (UFMG)

Renan Pedra de Souza (UFMG)

Guilherme Mattos Jardim Costa (UFMG)

Lidia Maria de Andrade (UFMG)

Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (UFMG)

Belo Horizonte, 02 de junho de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Lidia Maria de Andrade, Usuário Externo**, em 02/06/2023, às 19:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renan Pedra de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 05/06/2023, às 10:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diana Bahia, Professora do Magistério Superior**, em 05/06/2023, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Membro de comitê**, em 05/06/2023, às 11:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Mattos Jardim Costa, Professor do Magistério Superior**, em 05/06/2023, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2358189** e o código CRC **50AE3DAF**.

Referência: Processo nº 23072.233964/2023-99

SEI nº 2358189



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Aspectos clínicos e moleculares associados aos sintomas de anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19"

Isabela Lorraine Braga da Paz

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Diana Bahia
UFMG

Renan Pedra de Souza
UFMG

Guilherme Mattos Jardim Costa
UFMG

Lidia Maria de Andrade
UFMG

Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis
UFMG

Belo Horizonte, 02 de junho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Lidia Maria de Andrade, Usuário Externo**, em 02/06/2023, às 19:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renan Pedra de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 05/06/2023, às 10:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diana Bahia, Professora do Magistério Superior**, em 05/06/2023, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Membro de comitê**, em 05/06/2023, às 11:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Mattos Jardim Costa, Professor do Magistério Superior**, em 05/06/2023, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2358237** e o código CRC **D6627DF6**.

Dedico este trabalho a todas as famílias e profissionais de saúde que perderam algum ente querido durante a pandemia de COVID-19.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente, me permitiu realizar este sonho e me amparou em todos os momentos. E à Nossa Senhora, que sempre esteve à frente do meu caminho e dos meus projetos.

A minha orientadora, a Professora Dra. Diana Bahia, quem proporcionou a oportunidade de realizar este mestrado e me aceitou em seu laboratório, além de me aconselhar e estar sempre disposta a ouvir, auxiliar e contribuir com este trabalho.

Ao meu coorientador Professor Dr. Renan, que me acolheu em seu laboratório onde pude desenvolver minhas atividades, aprender e aperfeiçoar as técnicas necessárias para a elaboração deste trabalho. Sempre disposto a ouvir, a auxiliar com suas precisas pontuações e que por diversos momentos também me aconselhou.

Ao professor Renato Santana, que também me acolheu durante todo o período em que estive no LBI e me incluía em diversos projetos.

Aos meus colegas de laboratório: Ana Clara, Carlos Nájera, Isabella Meneguelli, Marina Batista, Lídia, Diego Menezes, João Locke, Luíza Campos, Rillery Calixto, Daniel Queiroz, Paula Fonseca, Giovanna Sena, Carolina Senra, Luciene Miguita, Fernanda Souza, Fernanda Marim, Franciele, Hugo Alves, Victor, Aryel, João Victor Miranda e Anna Júlia Koelln, obrigada por todos os ensinamentos, momentos de descontração e por estarem sempre dispostos a ajudar. Durante este período, o apoio de vocês deixou tudo mais leve.

Agradeço aos meus pais Márcio e Rosângela, sempre ao meu lado torcendo pelo meu sucesso e me apoiando nos estudos. Eles que tentam me proporcionar o melhor, mesmo diante de tantas dificuldades. Nunca desistiram de mim e foram os primeiros a acreditar que um dia esse sonho poderia se realizar, eu amo vocês incondicionalmente.

Ao meu namorado Lucas, que sempre me incentivou e acreditou que um dia eu conseguiria chegar até aqui. Ele que sempre embarca nas minhas aventuras, me apoia, me aconselha, me permite sonhar e querer ser alguém melhor. Agradeço todos os dias a Deus pela oportunidade de ter te colocado em minha vida, eu te amo.

Agradeço a minha irmã Larissa, pelos momentos compartilhados e por toda a nossa história até aqui, obrigada por não me deixar desistir. Apesar de mais nova, sempre tão sábia, tenho muito orgulho de você, eu te amo.

Aos meus familiares e amigos, que sempre estiveram torcendo por mim e foram compreensivos com a ausência em muitos momentos devido aos estudos.

As professoras Fernanda Villani, Izinara Rosse e Mariza Castelluber, mulheres tão fortes e cientistas maravilhosas que me despertaram o interesse e amor pela pesquisa desde a faculdade. Vocês foram essenciais para a minha formação e para o desejo da realização desta carreira acadêmica.

À UFMG, às agências de fomento e a todas as outras pessoas, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta dissertação.

Todas as vitórias exigem uma abdicação (Simone de Beauvoir).

RESUMO

A infecção causada pelo vírus SARS-CoV-2, conhecida como doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), apresenta um espectro clínico diverso, desde casos assintomáticos e manifestações clínicas leves, até quadros moderados e críticos sugerindo que o envolvimento de fatores genéticos e ambientais podem estar associados tanto ao seu desfecho natural quanto aos aspectos associados ao próprio vírus. SARS-CoV-2 pertence ao gênero *Betacoronavirus*, e apresenta um genoma com RNA de fita positiva de, aproximadamente, 30.000 bases de comprimento. Sua estrutura genômica codifica as seguintes proteínas: as estruturais Spike (S), Membrana (M), Envelope (E) e Nucleocapsídeo (N) e outras não estruturais. A proteína S é responsável pela interação do vírus com o receptor *ACE2* da célula hospedeira e o processo de penetração do vírus. Mutações nessa região podem alterar a transmissibilidade do vírus, bem como levar a alterações dos sintomas e alterar a efetividade das vacinas. Entre os sintomas frequentemente relatados, estão aqueles de natureza quimiossensíveis, como perda de olfato (anosmia) e perda de paladar (ageusia). Nesta dissertação, objetivamos compreender a razão da variação de frequência de anosmia e ageusia ao longo da pandemia e caracterizar os componentes moleculares, explorando os níveis de expressão de genes (*ACE1*, *ACE2* e *TMPRSS2*) relacionados à interação do vírus com o hospedeiro, analisando os desfechos de anosmia e ageusia em indivíduos infectados por SARS-CoV-2. Através do banco SIVEP-Gripe, realizamos uma análise observacional envolvendo 14.450 pacientes na cidade de Betim/MG. A frequência de anosmia e ageusia apresentou flutuação ao longo da pandemia, com redução de aproximadamente 7% desses desfechos no segundo semestre de 2021. Foi observada co-ocorrência de todos os sintomas notificados (dor abdominal, fadiga, febre, tosse, dor de garganta, dispneia, desconforto respiratório, alteração de saturação, diarreia, vômito) com anosmia e ageusia. Foram observadas que cinco comorbidades (cardiopatia, doenças hematológicas, asma, diabetes e obesidade) pré-existentes estão associadas à chance dos dois desfechos e que doença neurológica esteve somente associada à anosmia e doença renal apenas associada à ageusia. Exploramos, posteriormente, os níveis de expressão de alguns genes e os desfechos de anosmia e ageusia. Avaliamos 102 pacientes hospitalizados com COVID-19, dos quais 17,60% apresentaram anosmia e 9,80% ageusia. Os níveis de expressão dos genes *ACE1*, *ACE2* e *TMPRSS2* no tecido nasofaríngeo foram obtidos por RT-qPCR e medidos usando análise Δ CT. A associação *ACE1* *Alu* 287bp também foi avaliada. Modelos de regressão logística foram gerados para estimar os efeitos das variáveis sobre a ageusia e a anosmia. A associação da diminuição dos níveis de expressão de *ACE2* com ageusia foram observados (OR: 1,35; IC 95%: 1,098-1,775). Os resultados sugerem uma possível ponte ligando esses sintomas iniciais, incluindo fatores moleculares, às consequências de longo prazo da COVID-19 para a saúde, como disfunções cognitivas. Estudos de expressão gênica explorando novos genes são importantes para elucidar os desfechos de anosmia e ageusia. Além disso, os dados observacionais são informativos e cheios de interações e vieses, apresentando evidências reais sobre as características clínicas da doença ao longo do tempo. Assim, tornam-se importantes para identificar potenciais efeitos e o impacto das variantes sobre aspectos clínicos e epidemiológicos da COVID-19.

Palavras-chave: Coronavírus. Epidemiologia. Manifestações Clínicas. Expressão gênica. SARS-CoV-2.

ABSTRACT

The infection caused by the SARS-CoV-2 virus, known as Coronavirus disease 2019 (COVID-19), presents a diverse clinical spectrum, from asymptomatic cases and mild clinical manifestations, to moderate and critical conditions, suggesting that the involvement of genetic and environmental factors may be associated with both its natural outcome and aspects associated with the virus itself. SARS-CoV-2 belongs to the genus *Betacoronavirus*, and has a positive-stranded RNA genome, approximately 30,000 bases long. Its genomic structure encodes the following proteins: structural Spike (S), Membrane (M), Envelope (E) and Nucleocapsid (N) and other non-structural ones. Protein S is responsible for the interaction of the virus with the host cell *ACE2* receptor and the process of virus penetration. Mutations in this region can alter the transmissibility of the virus, as well as lead to changes in symptoms and alter the effectiveness of vaccines. Among the frequently reported symptoms are those of a chemosensitive nature, such as loss of smell (anosmia) and loss of taste (ageusia). In this dissertation, we aimed to understand the reason for the frequency variation of anosmia and ageusia throughout the pandemic and to characterize the molecular components, exploring the expression levels of (*ACE1*, *ACE2* e *TMPRSS2*) genes related to the interaction of the virus with the host, analyzing the anosmia and ageusia outcomes in individuals infected with SARS-CoV-2. By using SIVEP-Gripe database, we performed an observational analysis involving 14,450 patients in the city of Betim/MG. The frequency of anosmia and ageusia fluctuated throughout the pandemic, with a approximately reduction of 7% of these outcomes in the second half of 2021. Co-occurrence of all reported symptoms (abdominal pain, fatigue, fever, cough, sore throat, dyspnea, respiratory distress, change in saturation, diarrhea, vomiting) with anosmia and ageusia was observed. It was observed that five pre-existing comorbidities (heart disease, hematological disease, asthma, diabetes and obesity) are associated with the chance of both outcomes and that neurological disease was only associated with anosmia and kidney disease only associated with ageusia. We further explored the expression levels of some genes and the outcomes of anosmia and ageusia. We evaluated 102 patients hospitalized with COVID-19, of which 17.60% had anosmia and 9.80% ageusia. Expression levels of *ACE1*, *ACE2* and *TMPRSS2* genes in nasopharyngeal tissue were obtained by RT-qPCR and measured using Δ CT analysis. The *ACE1* *Alu* 287bp association was also evaluated. Logistic regression models were generated to estimate the effects of variables on ageusia and anosmia. Association of *ACE2* expression levels with ageusia was observed (OR: 1.35; 95% CI: 1.098-1.775). The results suggest a possible bridge linking these early symptoms, including molecular factors, to the long-term health consequences of COVID-19, such as cognitive dysfunctions. Gene expression studies exploring new genes are important to elucidate the outcomes of anosmia and ageusia. Furthermore, the observational data are informative and full of interactions and biases, presenting real evidence about the clinical characteristics of the disease over time. Thus, they become important to identify potential effects and the impact of variants on clinical and epidemiological aspects of COVID-19.

Keywords: Coronavirus. Epidemiology. Clinical manifestations. Gene expression. SARS-CoV-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura genômica do SARS-CoV-2. Adaptado de Gordon, D. <i>et al.</i> , 2020.....	22
Figura 2. Estrutura da partícula viral do SARS-CoV-2 e mecanismo de penetração na célula hospedeira. Adaptado de LAMERS, M. & HAAGMANS, B., 2022.....	24
Figura 3. Manifestações multissistêmicas da COVID-19.....	26
Figura 4. Anatomia do sistema olfativo.....	30
Figura 5. Anatomia do sistema gustativo.....	32
Figura 6. Mapa dos sabores.....	33
Figura 7. Parâmetros estabelecidos para utilização do termociclador no procedimento de genotipagem do polimorfismo <i>Alu</i> 287pb (rs4646994).....	51
Figura 8. Aspectos clínico-epidemiológicos da COVID-19 no município de Betim/MG no período de março 2020 até julho de 2022.....	54
Figura 9. Frequência trimestral de (A) ageusia e (B) anosmia identificada pelas notificações do SIVEP-Gripe.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas dos sete coronavírus humanos identificados, capazes de infectar humanos.....	28
Tabela 2. As mutações comuns presentes em VOCs e VOIs.....	44
Tabela 3. Parâmetros estabelecidos para realizar a transcrição reversa no termociclador.....	50
Tabela 4. Parâmetros estabelecidos para utilização do equipamento de Real-Time PCR.....	51
Tabela 5. Co-ocorrência de sintomas com Anosmia e Ageusia em pacientes com COVID-19...	56
Tabela 6. Co-ocorrência de condições de saúde pré-existentes com Anosmia e Ageusia.....	57
Tabela 7. Características demográficas e clínicas da amostra do estudo (n=102) do Hospital Eduardo de Menezes.....	58
Tabela 8. Valores absolutos genotípicos e alélicos para o polimorfismo (rs4646994).....	59
Tabela 9. Modelo de regressão logística para os desfechos de anosmia e ageusia.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AC III	Adenilil ciclase III
<i>ACE1/ECA1</i>	Angiotensin converting enzyme 1
<i>ACE2/ECA2</i>	Angiotensin converting enzyme 2
BO	Bulbo Olfatório
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
cDNA	complementary DNA
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CoV	Coronavírus
CRGs	Células Receptoras Gustativas
CT	Cycle Threshold
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DOPV	Distúrbio Olfativo Pós-viral
E	Envelope
EO	Epitélio Olfativo
G _{olf}	Proteína G olfatória
GI	Trato Gastrointestinal
GnRH	Hormônio gonadotrofina
HCoV-229E	Human Coronavirus - 229E
HCoV-HKU1	Human Coronavirus - HKU1
HCoV-NL63	Human Coronavirus - NL63
ICTV	International Commite on Taxonomy of Viruses
M	Membrane
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome – Coronavirus MERS
N	Nucleocapsid
Na ⁺	Sódio
nm	Nanômetros
NGS	Next-Generation Sequencing
NOA	Núcleo Olfativo Anterior
NSOs	Neurônios Sensoriais Olfativos
NSP	Non structural protein
OMS	Organização Mundial de Saúde

OMP	Proteína Marcadora Olfatória
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
ORF	Open Reading Frame
Pb	Pares de bases
PTC	Feniltiocarbamida
RBD	Receptor Binding Domain
RdRP	RNA dependente RNA polimerase
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ribonucleic Acid
RNPs	Ribonucleoproteins
ROs	Receptores Olfativos
RPGs	Receptores acoplados à proteína G
RT-qPCR	Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction
S	Spike
S1	Spike protein subunit 1
S2	Spike protein subunit 2
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus – 2
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SIVEP-Gripe	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Gripe
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>TMPRSS2</i>	Transmembrane serine protease 2
TRPV1	Canal catiônico potencial do receptor transiente ou receptor de capsaicina
VOCs	Variant of Concern
VOIs	Variant of Interest
VUM	Variants under Monitoring

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Pandemia de COVID-19.....	19
2 – COVID-19: Aspectos Gerais.....	21
2.1 – Agente etiológico.....	21
2.2 – Transmissão.....	24
2.3 – Manifestações Clínicas.....	25
3 – Anatomia do Olfato e Paladar.....	29
3.1 – Fisiologia do Olfato.....	29
3.2 – Fisiologia do Paladar.....	31
4 – Etiologia de Anosmia e Ageusia.....	34
4.1.1 – Fatores genéticos.....	35
4.1.2 – Fatores externos e medicamentos.....	36
4.1.3 - Lesões pós-traumáticas.....	37
4.1.4 – Infecções virais.....	37
4.1.5 – Fatores biológicos.....	39
5 – Mecanismos propostos de Anosmia e Ageusia na COVID-19.....	39
6 - Variantes virais e Vigilância Genômica.....	42
3. OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo Geral.....	46
3.2 Objetivos Específicos.....	46
4. METODOLOGIA.....	47
4.1 Desenho e área de estudo.....	47
4.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	47
4.2.1 Obtenção de amostras.....	47
4.2.2 Extração de RNA.....	48
4.2.3 cDNA.....	49
4.2.4 Expressão Gênica.....	50
4.3 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO Alu 287bp (rs4646994).....	51
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5. RESULTADOS.....	53
5.1 Aspectos clínico-epidemiológicos associados à anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19.....	53
5.2 Aspectos moleculares associados à anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19	58
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pandemia de COVID-19

O coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2) é um betacoronavírus responsável pela doença do Coronavírus 2019 (COVID-19). Os primeiros casos da doença foram identificados em 08 de dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China (DU, R. *et al.*, 2020; HUANG, C. *et al.*, 2020). As apresentações clínicas desse novo Coronavírus eram semelhantes à de uma pneumonia viral. Diante do potencial de disseminação e transmissibilidade do vírus, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 30 de janeiro de 2020, declarou que a doença causada pelo novo SARS-CoV-2 se tratava de uma emergência de saúde pública de importância internacional (TAQUET, M. *et al.*, 2022; ZHU, N. *et al.*, 2020).

Outros Coronavírus de origem zoonótica e altamente patogênicos já haviam sido identificados anteriormente, conhecidos como o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), em 2002 e o Coronavírus da Síndrome do Oriente Médio (MERS-CoV), em 2012, causando preocupações de saúde pública. Não obstante, devido ao número de pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2 e sua rápida disseminação geográfica em um curto espaço de tempo, em 11 de março de 2020, a OMS declarou a COVID-19 como uma pandemia (ZHU, N. *et al.*, 2020; HU, B.; HUANG, S.; YIN, L., 2021).

No Brasil, a primeira infecção de um paciente que retornou da Itália foi confirmada em 26 de fevereiro de 2020, no Estado de São Paulo (SP); e em 17 de março, no mesmo estado, foi relatada a morte do primeiro paciente do sexo masculino. Em 13 de março o Ministério da Saúde (MS) anunciou recomendações para prevenção e disseminação da COVID-19 e declarou Estado de Emergência em Saúde. Até 21 de março de 2020, a doença já havia se espalhado para todas as unidades federativas do Brasil. Após março de 2021, atingimos o maior número de mortes diárias em abril de 2021. Em setembro de 2021, o Brasil apresentou mais de 21,2 milhões de casos e 591.000 óbitos notificados, tornando-se o epicentro da COVID-19 nas Américas (BRASIL, 2022; GIOVANETTI, M. *et al.*, 2022).

Atualmente, no Brasil, segundo o Painel Coronavírus do Ministério da Saúde (<https://covid.saude.gov.br/>), os números de casos de indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 até o dia quatro de abril de 2023 passavam de 37 milhões e o número de óbitos reportados

chegou a 700.556. O total de casos no mundo, até seis de abril de 2023, alcança mais de 762 milhões e o número de mortos chega a mais de 6 milhões, de acordo com o Painel da OMS sobre o Coronavírus (WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, <https://covid19.who.int/>). Segundo alguns estudos, a taxa de subnotificação em muitos países foi alta durante o início da pandemia, ou seja, estima-se que o número de infecções pode ser muito maior do que o relatado (FLAXMAN, S. *et al.*, 2020; LAU, H. *et al.*, 2020).

Além dos impactos econômicos e sociais causados pelo avanço da pandemia, entre 2019 e 2020 observou-se um declínio da expectativa de vida em vários países do mundo (KHAN, M. *et al.*, 2020; ABURTO, J. *et al.*, 2021). O Brasil foi um dos países mais atingidos e a redução da expectativa de vida no período de janeiro a abril de 2021 foi estimada em 1,8 anos, decorrente da acelerada dispersão viral e lento processo de vacinação da população (CASTRO, M. *et al.*, 2021).

A COVID-19 é uma doença infecciosa, embora a maioria das pessoas infectadas desenvolvem um quadro clínico leve a moderado com maior replicação viral nas vias áreas superiores, alguns indivíduos podem evoluir para uma pneumonia ou casos críticos que podem levar ao óbito (LAMERS, M. & HAAGMANS, B., 2022). Entre os sintomas frequentemente relatados em vários países do mundo, estão aqueles de natureza quimiossensíveis, como perda de olfato (anosmia) e perda de paladar (ageusia). Em alguns casos, esses sintomas ultrapassam o período de duração da doença e persistem mesmo após a recuperação da infecção (LECHIEN J. *et al.*, 2020).

Os casos de anosmia e ageusia decorrentes da contaminação por SARS-CoV-2 foram relatados a partir de fevereiro de 2020 (MAO, L. *et al.*, 2020). Desde então, disfunção olfativa ou gustativa de início recente, em conjunto com outros sintomas bem estabelecidos com a COVID-19 foram descritos e incluídos à lista de manifestações clínicas e que podem aparecer entre dois a 14 dias de exposição ao vírus (CDC, 2022; TONG, J. *et al.*, 2020). De acordo com uma meta-análise realizada em 2020 por Tong et al., acredita-se que a disfunção olfativa afete cerca de 52,73% dos pacientes infectados pelo vírus.

Os estímulos provenientes do ambiente podem ser detectados, codificados e transmitidos ao Sistema Nervoso Central (SNC), fornecendo dados para a percepção quimiossensorial através dos órgãos sensoriais ou dos sentidos. Os seres humanos são organismos capazes de ingerir e digerir uma vasta gama de compostos químicos. Esse

procedimento é mediado tanto pelo olfato como pelo paladar e juntos são capazes de identificar substâncias e responderem aos sinais químicos que foram estimulados (RISSO, D.; DRAYNA, D.; MORINI, G., 2020; MASTRANGELO; BONATO; CINQUE, 2021). Além do envelhecimento, alguns vírus (coronavírus, rinovírus, adenovírus, ortomixovírus, entre outros) são a principal causa de diminuição da percepção olfativa, ou de distúrbios duradouros, uma condição descrita como distúrbio olfativo pós viral (DOPV) (DEEMS, D. *et al.*, 1991; FORNAZIERI, M. *et al.*, 2014).

Determinados vírus como Influenza, Epstein-Barr, rinovírus e alguns outros coronavírus, bem como o SARS-CoV-2, podem levar a distúrbios do olfato e paladar (GIACOMELLI, A. *et al.*, 2020; LECHIEN, J. *et al.*, 2020). Em humanos, alguns vírus podem ter implicações neurológicas afetando o SNC e o Sistema Nervoso Periférico (SNP). As manifestações neurológicas podem estar relacionadas ao neurotropismo viral ou efeitos indiretos de disfunção endotelial com dano vascular e isquemia, hipercoagulação com trombose e hemorragias, resposta inflamatória sistêmica, reações autoimunes e outros danos (CAVALLIERI, F. *et al.*, 2022).

2 – COVID-19: Aspectos Gerais

2.1 – Agente etiológico

O agente etiológico da COVID-19, o SARS-CoV-2, pertence à família *Coronaviridae* (Subfamília *Orthocoronaviridae*; Gênero *Betacoronavirus*), é um vírus envelopado e não segmentado, de forma esférica e apresenta RNA de fita simples com sentido positivo (ssRNA+). O SARS-CoV-2 é um Coronavírus (CoV), altamente patogênico. Esse vírus possui um genoma de, aproximadamente, 30.000nt com diâmetro de 80 a 120 nanômetros (CHEN, N. *et al.*, 2020; V'KOVSKI, P. *et al.*, 2020).

Sua estrutura genômica é compartilhada com outros *Betacoronavirus* e codifica até 14 matrizes de leitura aberta (do inglês *Open Reading Frames* - ORFs). ORF1a e ORF1b cobrem cerca de dois terços do genoma 5' e codificam uma grande poliproteína clivada proteolicamente em 16 proteínas não estruturais (NPS 1-16). As proteínas não estruturais nsp7, nsp8 e nsp12 compõem o complexo da replicase (Figura 1). Na extremidade 3' do genoma viral, ORF3-10 codificam outras nove proteínas acessórias. Inclui-se também nesta região quatro genes que codificam proteínas estruturais: Spike (S), Envelope (E), Membrana

(M) e Nucleocapsídeo (N) (HARRISON, A.; LIN, T.; WANG, P., 2020; MACHHI, J. *et al.*, 2020; LIU, Y. *et al.*, 2021).

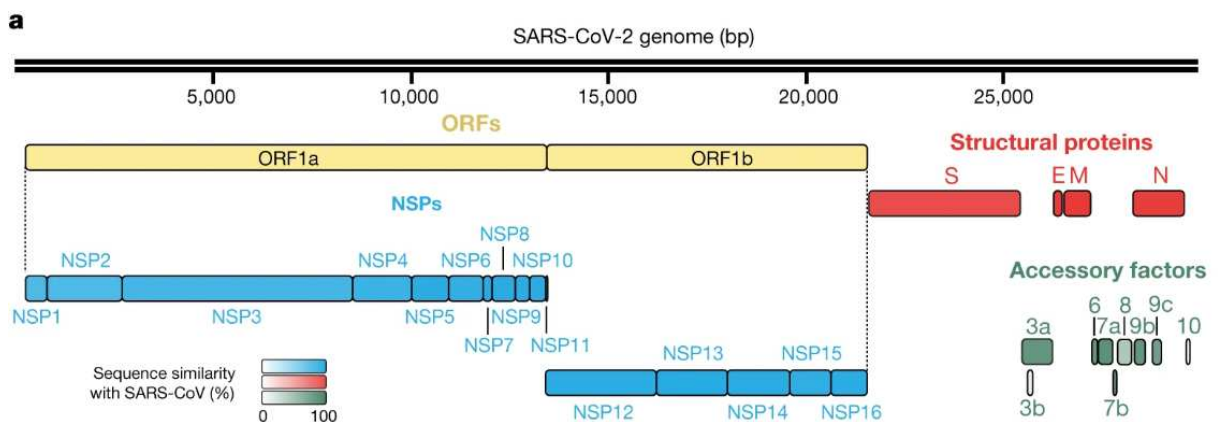


Figura 1. Estrutura genômica do SARS-CoV-2: proteínas estruturais S, E, M e N, as proteínas não estruturais (NPS1-16) e nove proteínas acessórias (GORDON, D. *et al.*, 2020).

Ao ser liberado no citosol, o RNA genômico é traduzido em polipoproteínas de replicase viral pp1a e pp1ab que são clivadas em pequenos produtos por proteinases virais para formar proteínas não estruturais funcionais (*do inglês*, NSPs) como uma helicase (Hel) e formando a RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) (BCHETNIA, M. *et al.*, 2020; HARRISON, A.; LIN, T.; WANG, P., 2020).

O genoma de RNA de sentido positivo do vírus sintetiza uma série de RNAs subgenômicos (sgmRNA) que são traduzidos em proteínas virais (S1, S2, E e M) por ribossomos ligados ao retículo endoplasmático (RE). A partir do RNA genômico, os nucleocapsídeos virais são estruturados, seguido de brotamento no lúmen do RE e no aparelho de Golgi. Então, os nucleocapsídeos se fundem com o precursor do virion e sofrem maturação. Os vírions são transportados através de pequenas vesículas e liberados para fora da célula por exocitose (BCHETNIA, M. *et al.*, 2020).

A proteína S é uma glicoproteína do envelope viral que auxilia a penetração do vírus na célula, possuindo um domínio de ligação ao receptor (RBD), que é dividido em duas subunidades S1 e S2 (HARRISON, A.; LIN, T.; WANG, P., 2020; GLEZER, I. *et al.*, 2021). O domínio S1 catalisa a ligação ao receptor celular, sendo o mais comum a Enzima Conversora de Angiotensina II (*ACE2*). Como os vírus estão sujeitos a mutações, isto pode interferir na especificidade ou afinidade deles a um receptor específico. O SARS-CoV-2 tem demonstrado uma afinidade semelhante à região RBD para *ACE2*, assim como à RBD de SARS-CoV (PHAN, T., 2020; TANG, X. *et al.*, 2020; WALLS, A. *et al.*, 2020).

O *ACE2*, é um importante receptor celular utilizado no processo de adsorção do SARS-CoV-2. Ele é amplamente expresso em células epiteliais alveolares tipo II, nas células ciliadas do pulmão, células sustentaculares e em menor quantidade em células e tecidos como o coração, vasos sanguíneos, rins, fígado, e trato GI. Isto contribui para as diferentes manifestações clínicas da COVID-19 (PILLAY, T., 2020; AHN, J. *et al.*, 2021).

Além da ligação ao receptor, a subunidade S2 é responsável pelo processo de fusão do envelope viral à membrana das células. A protease transmembrana serina 2 (*TMPRSS2*) expressa na superfície da célula alvo (Figura 2), possui um potencial de ativação em diversas infecções virais. Ao clivar proteoliticamente o sítio polibásico S2 do SARS-CoV-2, ela expõe o peptídeo de fusão, crucial para a penetração do vírus na célula hospedeira, permitindo uma aproximação entre as membranas virais e plasmáticas, seguido da liberação do material genético viral no citoplasma (KIM, D. *et al.*, 2020; JOHNSON, B. A. *et al.*, 2021; MEINHARDT, J. *et al.*, 2021).

Outras enzimas, como as cisteíno proteases catepsina B (CatB) e catepsina L (CatL), também podem auxiliar esse processo em células que *TMPRSS2* não são expressos (OU *et al.*, 2020; MUUS *et al.*, 2021). A proteína Spike do vírus também pode ser clivada pela Furina, favorecendo o aumento de ligações da proteína S ao receptor *ACE2* humano. A furina é uma serina protease úbiqua expressa em órgãos olfatórios e células como pulmão, fígado e intestino. Essa via mediada por Furina difere o SARS-CoV-2 de outros Coronavírus, como o SARS-CoV (GLEZER, I. *et al.*, 2021; JOHNSON, B. A. *et al.*, 2021; WROBEL, A. *et al.*, 2020).

A Furina está relacionada a infecções virais, clivando algumas proteínas do envelope viral e aumentando sua fusão com as membranas celulares do hospedeiro. Essa proteína é expressa em uma grande variedade de células e a patogenicidade do SARS-CoV-2 pode estar associada ao seu local de clivagem na proteína S do vírus. Isso poderia ocasionar o aparecimento de alguns sintomas ou o prolongamento dos mesmos e tornar o vírus mais patogênico (GOMES, C. *et al.*, 2020).

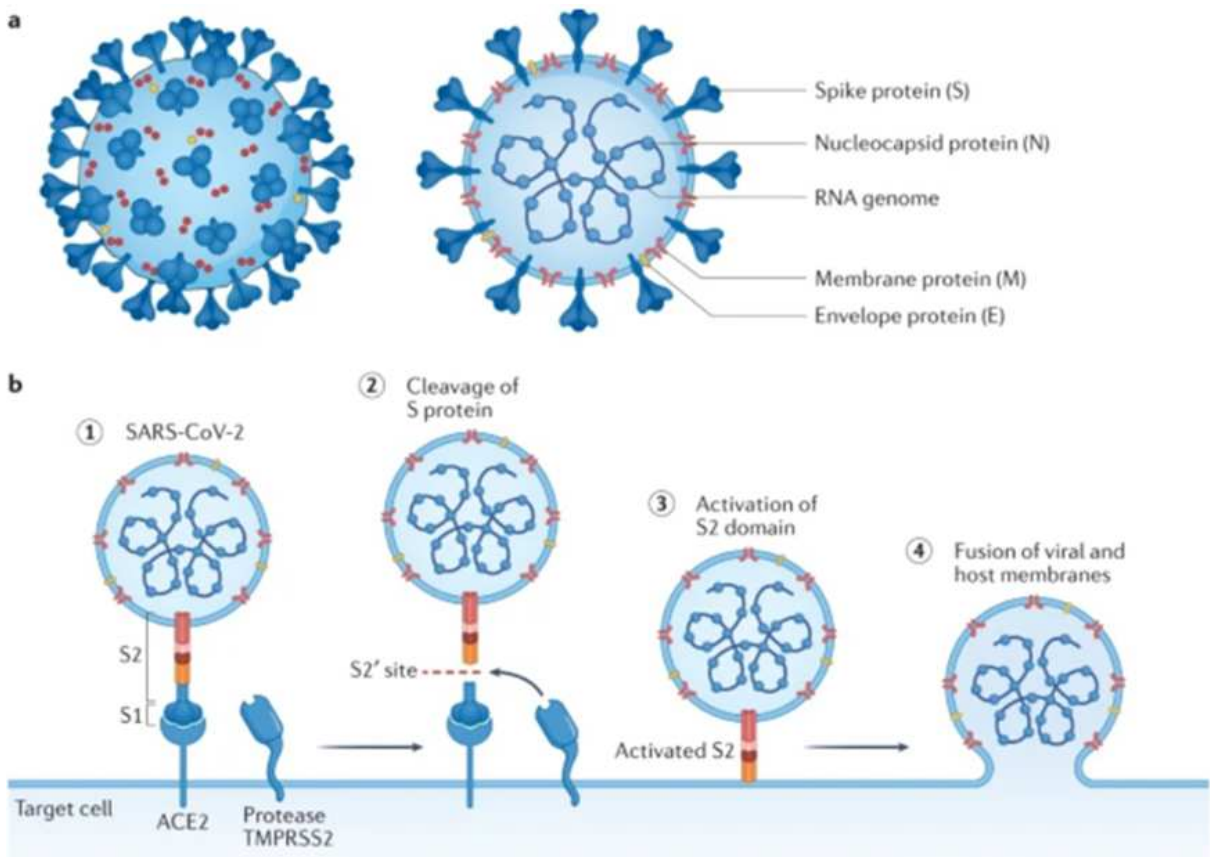


Figura 2. Estrutura da partícula viral do SARS-CoV-2 e mecanismo de penetração do vírus na célula hospedeira (LAMERS, M. & HAAGMANS, B., 2022).

A RdRP, codificada pelas *nsp7*, *nsp8* e *nsp12* da ORF1b, possui uma atividade revisora que reduz a taxa de erro da polimerase, possibilitando que o genoma do SARS-CoV seja longo e atuando nos processos de replicação e transcrição, levando a uma menor taxa de erro se comparado a outros vírus de RNA (HARRISON, A.; LIN, T.; WANG, P., 2020). No entanto, apesar da baixa taxa de erro, o SARS-CoV-2 ainda apresenta uma alta frequência de mutações em relação a outros vírus que não possuem atividade de revisão. Isso se deve a sua rápida disseminação e transmissão mundial, fatores que ofereceram oportunidades substanciais para sua diversificação, dando origem a novas variantes (MISTRY, P. *et al.*, 2022).

2.2 – Transmissão

A maioria das infecções pelo SARS-CoV-2 ocorre através do contato direto entre pessoas com as gotículas ou aerossóis de indivíduos infectados, expelidos pela tosse ou espirro. O contato com superfícies contaminadas (fômites) também pode levar à infecção, embora seja uma via menos comum. Algumas evidências têm apontado para a contaminação fecal-oral (HAN, D. *et al.*, 2020; TAY, M. *et al.*, 2020). Durante o período de incubação, em

torno de 48 horas antes do início dos primeiros sintomas, os pacientes infectados podem transmitir a doença e permanecerem contagiosos por até duas semanas. Há evidências que pode ocorrer a disseminação do vírus por indivíduos assintomáticos, ressaltando a importância de medidas sanitárias e um sistema de vigilância adequado para controlar a transmissão (GAO, Z. *et al.*, 2021; SHARMA, I.; FAROUK, I.; LAL, S., 2021).

2.3 – Manifestações Clínicas

O espectro clínico da infecção é muito diverso, os principais sinais e sintomas são: febre, tosse, fadiga, dispneia, mal-estar e mialgia, anosmia, ageusia e sintomas respiratórios do trato superior (BRASIL, 2022; GALINDO, F. & VALENCIA, F., 2021). Alguns sinais menos comuns também podem ocorrer, como dor de garganta, sintomas gastrointestinais, erupções cutâneas na pele ou descoloração dos dedos das mãos ou dos pés, olhos vermelhos ou irritados, dores nas articulações e vômitos (DOCHERT, A. *et al.*, 2020; CAROD-ARTAL, F., 2021; WHO, 2021).

Alguns indivíduos podem evoluir para quadros mais graves e críticos, apresentando pneumonia viral grave com insuficiência respiratória, disfunção de múltiplos órgãos, sepse e morte (CIOTTI, M. *et al.*, 2020; LAMERS, M. & HAAGMANS, B., 2022). Nos pacientes com COVID-19 grave, a falta de ar é um sintoma bem comum resultante da hipoxemia, após o aparecimento desses sintomas a insuficiência respiratória progressiva se desenvolve, e esses pacientes geralmente preenchem os critérios para a SDRA (Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo) (WANG, D. *et al.*, 2020; ZHOU, F. *et al.*, 2020).

Pacientes com insuficiência respiratória apresentam evidências de hiper-inflamação sistêmica (CHEN, N. *et al.*, 2020; DEL VALLE, D. *et al.*, 2020). A análise do sangue periférico de pacientes graves com COVID-19 revelou um aumento da expressão de várias citocinas pró-inflamatórias: Interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-1 β , Proteína de Quimioatração de Monócitos (MCP-1), Proteína Induzível 10 (IP-10), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), um interferon tipo I enfraquecido (IFN-I) e concentrações elevadas de marcadores inflamatórios, como D-dímero, ferritina e Proteína C-reativa (PCR) (HU, B.; HUANG, S.; YIN, L., 2021; LIU, Y. *et al.*, 2021).

Os níveis séricos de IL-6, IL-8 e TNF- α , no momento da internação, são preditores fortes e independentes de sobrevida do paciente. A gravidade da doença também pode levar a

doenças extrapulmonares, lesões cardíacas, renais e hepáticas agudas, arritmias cardíacas, rabdomiólise, coagulopatia e choque (LAMERS, M. & HAAGMANS, B., 2022). A relação desses sintomas pode ser observada na Figura 3.



Figura 3: Manifestações da COVID-19 em outros órgãos e sistemas, além dos pulmões. A COVID-19 apresenta um aspecto clínico diverso, podendo causar lesões ou afetar diversos órgãos. Fonte: Elaborado pela própria autora, criado com biorender.com.

Atualmente, muitas evidências apontam que o SARS-CoV-2 não afeta apenas o trato respiratório, mas também o SNC. Esse potencial neuroinvasivo também já foi relatado em outros coronavírus como o Coronavirus 229E (HCoV-229E), o Coronavirus NL63 (HCoV-NL63), o da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), e o da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (MEINHARDT, J. *et al.*, 2021).

A neuroinflamação pode levar a disfunção cognitiva ao comprometer a barreira hematoencefálica: dessa forma, as citocinas podem migrar para o SNC e levar a uma ativação microglial e ao estresse oxidativo, induzindo o comprometimento cognitivo sinérgico. Estas citocinas acabam comprometendo a permeabilidade da barreira hemato-encefálica através da regulação positiva de ciclooxigenase-2 (COX-2) e ativação da metaloproteinase da matriz (MMP). O resultado dessa neuroinflamação pode contribuir a longo prazo para déficits

cognitivos graves (ALNEFEESI, Y. *et al.*, 2021; BAKER, H.; SAFAVYNIA, S.; EVERED, L., 2021). A seguir, a Tabela 1 apresenta as principais características e diferenças entre os sete coronavírus capazes de provocar doenças em humanos:

Tabela 1. Descrição das características clínicas dos sete coronavírus identificados, capazes de infectar humanos.

VÍRUS	EVENTOS	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS
HCoV-229E	Identificado em 1966, em amostras de estudantes com resfriado comum (TYRRELL, D. & BYNOE, M. 1965).	Dor de cabeça, secreção nasal, espirros, dor de garganta, mal-estar, febre e tosse, características neuroinvasivas. Idosos, crianças e imunocomprometidos são mais vulneráveis a infecções do trato respiratório inferior e as formas graves da doença.
HCoV-OC43	Agentes infecciosos de uma amostra em 1967, causavam infecções semelhantes à bronquite no trato respiratório superior (HAMRE, D. & PROCKNOW, J., 1966; ALMEIDA, J. & TYRRELL, D., 1967; MCINTOSH, K. <i>et al.</i> , 1967).	Em geral, provoca infecções semelhantes ao HCoV-229E. Evidências apontam para uma possível infiltração neuronal, por causarem problemas digestivos e disfunções do olfato e paladar.
SARS-CoV	Em 2002, casos de uma doença febril que evoluiu para pneumonia atípica identificada em Hong Kong, Hanói e Cingapura (DROSTEN, C. <i>et al.</i> , 2003; ZHAO, Z. <i>et al.</i> , 2003).	Febre, mialgia, mal-estar, dor de cabeça, calafrios, tosse seca, dispneia e dificuldades respiratórias podem ocorrer. Além de, infecção do trato gastrointestinal, rim, fígado e cérebro, danos alveolares e linfopenia.
HCoV-NL63	Isolado em 2004 na Holanda, em amostra de uma menina de sete meses de idade. (ESPER, F. <i>et al.</i> , 2005).	Coriza, conjuntivite, febre e bronquiolite. Embora, esse vírus já tenha demonstrado propriedades neuroinvasivas, anosmia e ageusia.
HCoV-HKU1	Isolado de um adulto com doença pulmonar crônica na cidade de Hong Kong (VAN DER HOEK, L. <i>et al.</i> , 2004).	Rinorréia, tosse, congestão nasal, febre, escarro, dor de garganta, calafrios, secreção pós nasal, hipertrofia tonsilar e convulsões febris (raras).
MERS-CoV	Identificado em junho de 2012, através de um paciente internado na Arábia Saudita (MCINTOSH, K. & PERLMAN, S., 2015).	Pneumonia aguda progressiva que pode levar à insuficiência renal aguda, evoluindo para óbito, dificuldade respiratória, choque séptico, coagulopatia, pericardite, tosse, febre, calafrios, dor de garganta, mialgia, artralgia e dispneia.
SARS-CoV-2	Identificado em 2019, na cidade de Wuhan na China, casos de uma pneumonia viral grave (MACHHI, J. <i>et al.</i> , 2020).	Febre, tosse, anosmia, ageusia, fadiga, dificuldades respiratórias, alterações neurológicas. Idosos e pessoas com comorbidades podem desenvolver formas mais graves.

Em pacientes acometidos com COVID-19, têm sido relatados alguns sintomas persistentes após a doença. Essas sequelas são descritas utilizando-se o termo “COVID Longo” ou “Síndrome de COVID Longa”, por apresentarem sintomas de longa duração. Este termo tem sido utilizado por autores para descrever indivíduos que testaram positivo para o COVID-19 e apresentaram sintomas 28 dias após o diagnóstico ou podendo chegar até 12 ou mais meses após a infecção (DE PAULA, J. *et al.*, 2022; SUDRE, C. *et al.*, 2021; YONG, S., 2021).

Os sintomas duradouros de COVID-19 estão sendo observados tanto em pacientes que necessitaram de hospitalização, quanto em casos mais leves a moderados. Os sintomas incluem fadiga, cefaleia, comprometimento cognitivo, dispneia e anosmia. Entretanto, alguns dados sugerem que a COVID-19 leve esteja relacionada a sintomas de longa duração como: manifestações neurológicas e psiquiátricas, e sequelas persistentes em torno de 30% desses pacientes com prevalência em idosos (DE PAULA, J. *et al.*, 2022; LOGUE, J. *et al.*, 2021; SUDRE, C. *et al.*, 2021).

3 – Anatomia do Olfato e Paladar

3.1 – Fisiologia do Olfato

O olfato é um mecanismo versátil e sensível para detectar e discriminar milhares de odores voláteis. O reconhecimento olfativo é mediado pelos Receptores Olfativos (ROs), ativando uma cascata de transdução mediada pela proteína G (IHARA, S.; YOSHIKAWA, K.; TOUHARA, K., 2013). A percepção de diferentes odores envolve um complexo mecanismo entre o nariz e o cérebro. Inicialmente, o ar passa através das narinas e as moléculas de odor se ligam aos receptores dos nervos olfativos. Esses nervos estão presentes em uma cavidade revestida e muito especializada localizada na parte superior da cavidade nasal, denominada de Epitélio Olfatório (EO). Ao receber esses estímulos, os nervos olfativos enviam sinais ao cérebro, onde este odor é processado e pode ser reconhecido pelo indivíduo (HUYNH, P.; ISHII, L.; ISHII, M., 2020).

O EO é constituído por cinco elementos celulares: os neurônios sensoriais olfativos (NSOs) são células ciliares, as quais estão localizados os ROs; as células sustentaculares, ou células de suporte, protegem os neurônios sustentando sua atividade e metabolismo através da liberação de glicose no muco; as células microvilares desempenham um suposto papel na

modulação do sinal olfativo; as células basais são capazes de promover a regeneração no EO; e as Glândulas de Bowman, além de produzirem muco, auxiliam a ligação das moléculas odoríferas aos ROs (Figura 4) (HAYDEN, S. & TEELING, E., 2014; CIOFALO, A. *et al.*, 2022). Devido à localização do EO, é possível uma comunicação com a região da nasofaringe, o que anatomicamente propicia as moléculas odoríferas alcançarem o Bulbo Olfatório (BO) pela inspiração através das narinas ou via retronasal com a ingestão de alimentos (BUSHDID, C. *et al.*, 2014).

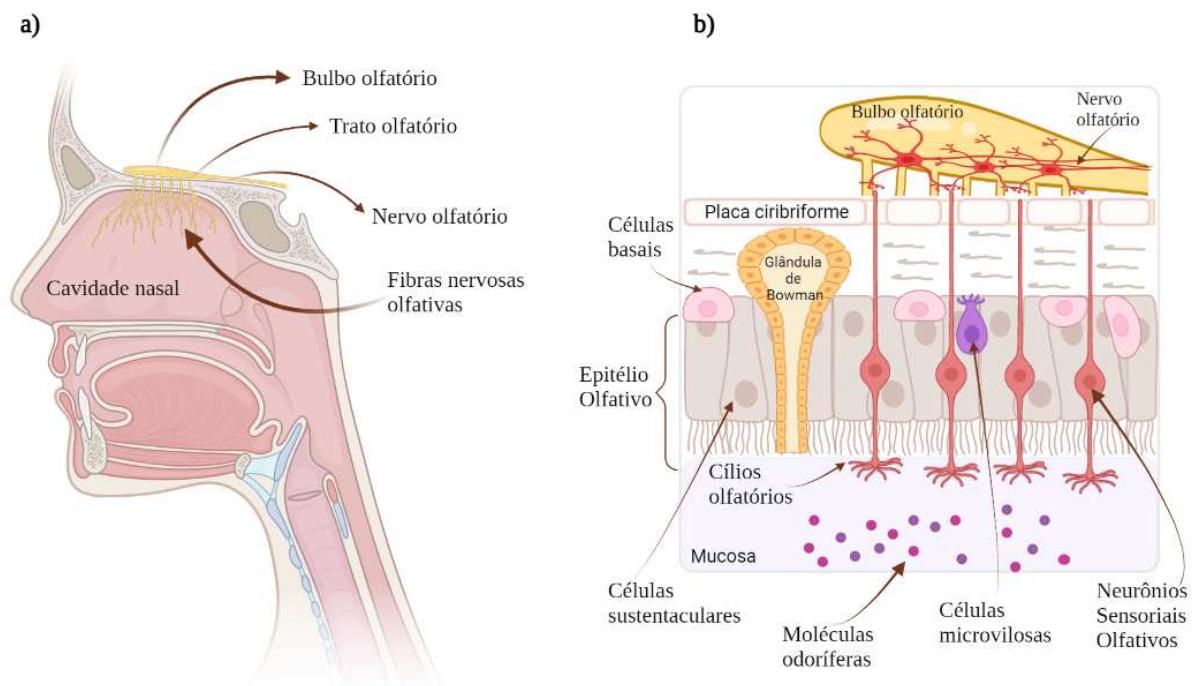


Figura 4: Anatomia do sistema olfatório. (a) O ar presente no ambiente penetra pelas narinas e os odores são detectados pelos Neurônios Sensoriais Olfativos (NSOs) presentes no Epitélio Olfatório (EO), localizado na parte superior da cavidade nasal. Os NSOs projetam um axônio não mielinizado para o Bulbo Olfatório (BO). Os axônios dos NSOs e suas células embaixadas associadas formam feixes que se projetam através de aberturas na placa ciribriforme para o BO, onde ocorrem sinapses transmitindo as informações sensoriais ao cérebro. (b) Representação dos diferentes tipos celulares que compõem o EO. As moléculas odoríferas são reconhecidas pelos receptores de odor localizados nos cílios dos NSOs. Fonte: Elaboração de autoria própria, via biorender.com.br.

Os ROs compreendem a maior família de genes no genoma dos mamíferos. A família de genes dos ROs humanos abrange cerca de 857 membros que podem ser acessados através de um recurso online e gratuito, chamado *The Human Olfactory Receptor Data Explorer* (HORDE, <https://genome.weizmann.ac.il/horde/>). Dentre esses genes, até 391 codificam receptores olfativos funcionais, enquanto 466 membros desta família de ROs são pseudogenes (OLENDER, T.; NATIV, N.; LANCET, D., 2013). Esta vasta quantidade de diferentes

receptores olfativos possibilita a discriminação de muitos odores distintos (BUSHDID *et al.*, 2014; NAGAYAMA, S.; HOMMA, R.; IMAMURA, F., 2014).

A estimulação da mucosa com um odorante leva à ativação de um conjunto de quimiorreceptores, podendo ser decompostos pela associação de ligantes odoríferos com receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que atuam como ROs (YOUNG *et al.*, 2003; IHARA, S.; YOSHIKAWA, K.; TOUHARA, K., 2013). Em função da concentração do odorante, frequências de potencial de ação são transmitidos para o BO. A proteína marcadora olfatória (*do inglês*, OMP) é uma pequena e abundante proteína citoplasmática com expressão restrita a neurônios quimiossensoriais maduros e associada a uma cascata de transdução de sinal. Os eventos associados aos ROs são mediados por componentes do EO, incluindo: proteína G olfatória (G_{olf}) e adenilil ciclase III (AC III). A AC III catalisa a formação da molécula de sinalização de Adenosina Monofosfato Cíclico (cAMP) em resposta à sinalização da proteína G e também a proteína OMP (KANG, N. *et al.*, 2015).

A partir disso, a informação segue para uma extensa área do córtex cerebral se projetando para diversas estruturas secundárias como o Núcleo Olfativo Anterior (NOA), responsável pelo estímulo do odor. O córtex piriforme apresenta um papel significativo no processamento de odores baseados na experiência e aprendizado, além dos estímulos diretos para o hipotálamo, como os estímulos comportamentais, viscerais e endócrinos (OLENDER, T. *et al.*, 2016).

3.2 – Fisiologia do Paladar

O órgão responsável pelo sabor é a língua. A presença de determinadas substâncias na boca permite que apreciemos através do paladar qualidades químicas desses produtos, propiciando discernimento sobre alimentos benéficos e possíveis substâncias venenosas, assegurando a sobrevivência humana (COLVIN, J.; PULLICIN, A.; LIM, J., 2018; HIGGINS, M. & HAYES, J., 2019). A detecção de sabores ocorre por receptores transmembrana específicos, localizados no ápice das Células Receptoras Gustativas (CRGs), capazes de reconhecer as moléculas presentes nos alimentos sem que a substância química entre na célula e residem em estruturas conhecidas como papilas gustativas, distribuídas na língua e no palato mole (Figura 5). Os humanos possuem cerca de mil papilas gustativas e elas podem ser encontradas em três tipos: fungiformes, foliadas e circunvaladas (HOON, M. *et al.*, 1999; FEENEY, E. & HAYES, J., 2014).

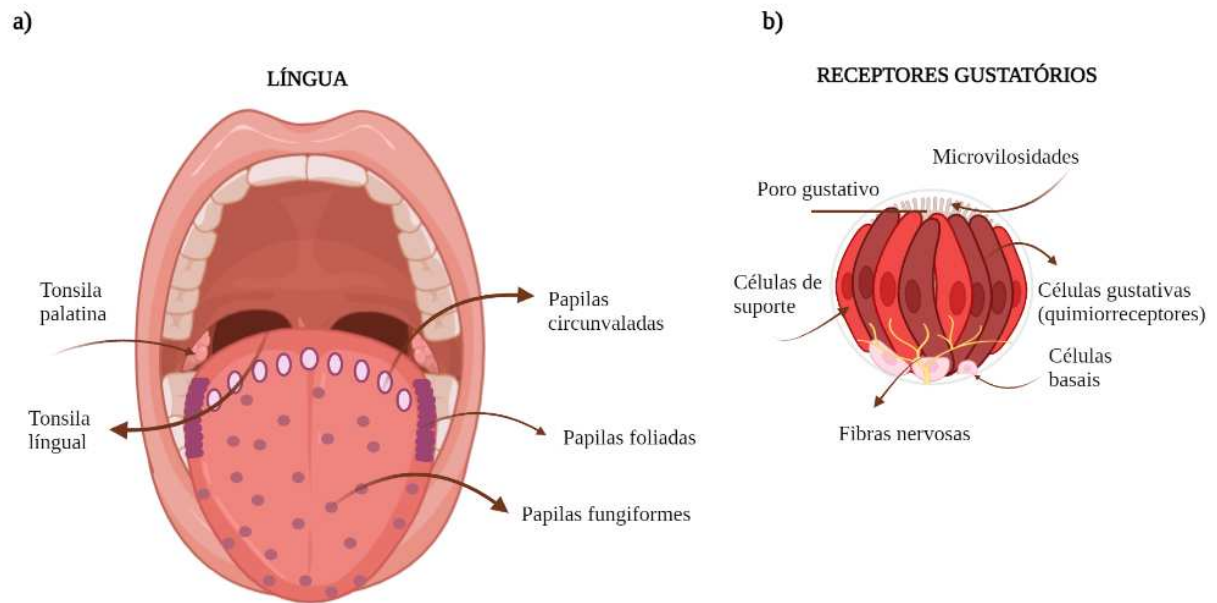


Figura 5: Anatomia do sistema gustativo. (a) A língua é o órgão fundamental responsável pelo paladar, onde algumas saliências nessa região podem ser perceptíveis a olho nu, denominadas de papilas gustativas. As papilas gustativas humanas exibem características circunvaladas, foliadas e fungiformes. Cada uma delas possui células especializadas conhecidas como receptores gustativos ou botões gustatórios, constituindo os elementos específicos para a percepção do paladar e relacionadas com as fibras nervosas (os nervos trigêmeos, facial e glossofaríngeo) levando os estímulos ao córtex cerebral, formando as percepções sensitivas do paladar. (b) Representação da estrutura dos receptores gustativos presentes nas papilas gustativas. Fonte: Elaboração de autoria própria, via biorender.com.br.

As papilas gustativas são agrupamentos de 50 a 100 células neuroepiteliais localizadas em toda cavidade oral, incluindo epiglote e faringe (WITT, M., 2019). As papilas circunvaladas estão localizadas na parte posterior da língua e se apresentam em maior quantidade se comparada às outras; as papilas foliadas estão presentes nas bordas laterais posteriores; e as papilas fungiformes encontradas principalmente na ponta, e em menor grau, no comprimento da língua (RISSO, D.; DRAYNA, D.; MORINI, G., 2020).

Os receptores gustativos são quimiorreceptores periféricos constituídos de células neuroepiteliais, fusiformes e possuem um curto prolongamento piloso em sua extremidade apical, inervadas por fibras nervosas dos nervos cranianos VII, IX e X (SIMON, S. *et al.*, 2006). Esses receptores geralmente apresentam várias células gustativas agrupadas cuja estrutura lembra um tonel (figura 5 (b)) associadas com outras células de suporte. Possuem uma pequena abertura projetada para a superfície da mucosa denominada de poro gustativo, este dá acesso ao interior do receptor olfatório. Ao serem estimulados devido às substâncias

químicas presentes nos alimentos, desencadeiam o impulso nervoso que será interpretado no SNC (WITT, M., 2019).

Os dois tipos de receptores transmembrana relevantes para o paladar são: os canais iônicos que medeiam os gostos azedo (H^+) e salgado (Na^+) e os receptores acoplados à proteína G (RPGs), que medeiam os sabores doce, umami e amargo (Figura 3) (BACHMANOV, A. *et al.*, 2014; ROPER, S. & CHAUDARI, N., 2017). Recentemente, identificou-se que o sabor ácido é mediado pelo canal iônico Otopetrina-1, um canal seletivo de prótons envolvido na sensação de gravidade no sistema vestibular (TU, Y. *et al.*, 2018). O sabor azedo é mediado pelo membro 1 da subfamília V do canal catiônico potencial do receptor transiente (TRPV1, também conhecido como receptor de capsaicina), envolvido na percepção de irritantes e outros estímulos potencialmente prejudiciais aos tecidos, incluindo os compostos exógenos, como a capsaicina em pimenta malagueta e compostos endógenos, como os produzidos durante a inflamação (LEFFLER, A. *et al.*, 2006). A inflamação e o dano tecidual produzem um aumento local significativo na concentração de prótons, capazes de excitar o TRPV1 (REEH, P. & STEEN, K., 1996).

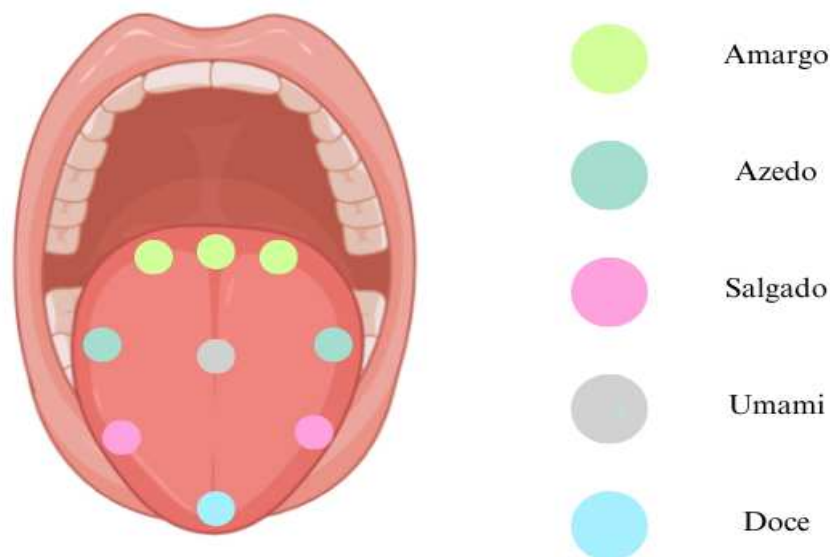


Figura 6: Mapa dos sabores. Esquema para demonstrar as regiões onde os receptores identificam com mais frequência os diferentes tipos de sabores. Na região posterior da língua, o sabor amargo representado pela cor verde claro é bastante reconhecido; Na região lateral da língua é possível identificar os sabores azedo (verde escuro) e salgado (rosa); Na parte central da língua, o sabor umami (cinza) pode ser reconhecido por toda essa superfície; E na porção final do corpo da língua o sabor doce (azul) é comumente identificado.

Os quimiorreceptores gustativos (especialmente os receptores doce, umami e amargo) também foram identificados no trato gastrointestinal (GI) e no sistema respiratório. Dessa forma, o paladar e os receptores gustativos devem ser considerados como um amplo sistema quimiossensorial reconhecendo agonistas exógenos (alimentos) e endógenos (metabólitos e outros compostos) intercedendo a resposta sistêmica (FINGER, T. & KINNAMON, S., 2011). A modulação e aguçamento desses receptores dentro do sistema GI pelos mesmos compostos que conferem o sabor dos alimentos podem ter diferentes funções, desde a absorção até a metabolização de nutrientes, liberação de hormônios da saciedade, modulação do transporte de glicose, esvaziamento gástrico e regulação da motilidade intestinal (RISSO, D.; DRAYNA, D.; MORINI, G., 2020).

4 – Etiologia de Anosmia e Ageusia

A diminuição da percepção olfativa é chamada de hiposmia e a perda completa da capacidade de sentir cheiros é denominada de anosmia (onde as moléculas odoríferas não alcançam o epitélio olfatório). No caso da diminuição da percepção do paladar, chamamos de hipogeusia, embora também possa ocorrer uma perda completa desse sentido, conhecida como ageusia. (DEEMS, D. *et al.*, 1991; REBHOLZ, H. *et al.*, 2020). Segundo SCHIFFMAN, S., 2018, outros termos comumente utilizados para caracterizar os distúrbios quimiossensoriais são:

- hiperosmia (sensibilidade aumentada do olfato);
- disosmia (sensação olfativa distorcida);
- fantosmia (alucinações olfativas, percepção de odores sem que haja estímulos);
- hipergeusia (sensibilidade aumentada do paladar);
- disgeusia (sensação do paladar distorcida);
- fantogeusia (sensação de sabor na ausência de estímulo na cavidade oral).

A etiologia das disfunções quimiossensoriais do olfato e paladar é multifatorial (SODAL, A. *et al.*, 2021). Entre os fatores mais encontrados na literatura estão: doença nasal e sinusal obstrutiva, causas congênitas (ex: arrinencefalia), desvio de septo nasal, fatores genéticos, neoplasias nasais e intracranianas, infecções das vias aéreas superiores e exposição à vírus, traumatismo cranioencefálico, deficiências nutricionais (vitaminas A, B6 e B12 e de zinco ou cobre), exposição a substâncias tóxicas, algumas medicações, tabagismo, anestesia geral, alterações psiquiátricas, doenças neurológicas, má higiene bucal, traumas dentários, envelhecimento, iatrogenia (efeitos ou complicações decorrentes de um tratamento médico) e

idiopáticas (sem causa definida) (RAWAL, S. *et al.*, 2015; BOESVELDT, S *et al.*, 2017; REBHOLZ, H. *et al.*, 2020).

4.1.1 – Fatores genéticos

Alguns fatores genéticos podem influenciar nos mecanismos de anosmia e ageusia. A anosmia congênita é a condição em que há ausência do olfato desde o nascimento, relacionado a algum tipo de distúrbio genético, degeneração ou atrofia do EO e/ou BO (FRASNELLI, J. *et al.*, 2013; MANAN, H. *et al.*, 2021; THAPLOO, D. *et al.*, 2022). A Síndrome de Kallmann é uma doença genética caracterizada por atraso da puberdade e que pode levar a uma alteração ou perda do olfato, decorrente da mutação em genes responsáveis pelo desenvolvimento neuronal, provocando alterações no desenvolvimento do BO e nos níveis do hormônio gonadotrofina (GnRH) (MACCOLL, G.; BOULOUX, P.; QUINTON, R., 2002; BARBER, T. *et al.*, 2021). Esta síndrome é uma das causas mais comuns de disfunção olfatória congênita; entretanto, anosmia familiar associada com calvície prematura, cefaleia vascular e diabetes também foram identificados e associados a causas genéticas (BARBER, T. *et al.*, 2021).

Polimorfismos nos genes dos receptores gustativos podem levar a diferentes fenótipos gustativos, diminuindo a capacidade de saborear ou aumentando-a (SMITH, A.; FARBMAN, A.; DANCIS, J., 1965). Um exemplo é a feniltiocarbamida (PTC), um composto orgânico não é encontrado na natureza e de acordo com o genoma do indivíduo pode ter um sabor amargo ou ser praticamente sem sabor, com sua frequência variando de acordo com a população estudada. A sensibilidade gustativa ao reconhecer PTC ou moléculas relacionadas é herdada de maneira autossômica recessiva e grande parte dessa variação é mediada por três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *TAS2R38* que codifica o receptor de gosto amargo (KIM, U. *et al.*, 2003; RISSO, D. *et al.*, 2016).

Vários outros polimorfismos de genes receptores gustativos foram identificados e relacionados sobre sua possível implicação nos comportamentos alimentares e na saúde (RISSO, D.; DRAYNA, D.; MORINI, G., 2020). Percepções de um sabor amargo em vários adoçantes amplamente utilizados também podem afetar algumas pessoas, devido a alguns polimorfismos em *TAS2R43* e *TAS2R44* afetarem o sabor amargo de sacarina e acessulfame (KUHN, C. *et al.*, 2004), e variantes em *TAS2R4* e *TAS2R14* alteram o sabor amargo de esteviosídeo (RISSO, D. *et al.*, 2014). A disautonomia familiar, que é a depleção completa ou

grave das papilas gustativas, também pode ser uma das causas de ageusia (SMITH, A.; FARBMAN, A.; DANCIS, J., 1965).

4.1.2 – Fatores externos e medicamentos

Embora a genética desempenhe um papel nas alterações no olfato e paladar, a maioria dessas alterações ocorre devido a fatores ambientais. Exposições a substâncias tóxicas como produtos químicos e agentes industriais (anfetaminas, antibióticos, cocaína, derivados de petróleo, dióxido sulfúrico, etanol, formaldeído, metais pesados, metanol, monóxido de carbono, nicotina, solventes orgânicos, sulfato de zinco e tetracloreto de carbono) podem levar à perda olfatória em questão de dias ou após anos (DEEMS, D. *et al.*, 1991; TEMMEL, A. *et al.*, 2002; SCHIFFMAN, S., 2018). O grau da lesão está relacionado com o tempo de exposição, concentração e toxicidade do agente (ex: tabaco), podendo ser reversível ou permanente (SCHNELLER, L. *et al.*, 2018).

A percepção do sabor também pode ser afetada por essas substâncias tóxicas, no entanto, insuficiência hepática e renal, uremia e diabetes também podem provocar alterações no paladar do indivíduo. Interferências podem ocorrer na composição ou quantidade da produção química da saliva, alterando as membranas mucosas orais e reduzindo o número, a ativação ou a capacidade regenerativa das células receptoras gustativas e a eficácia de transdução de sinal, afetando os nervos gustativos (GENTER, M. & DOTY, R., 2019).

Outro fator que pode levar ao comprometimento da percepção normal de sabores é o consumo de álcool. O uso dessa substância pode provocar alterações na sensibilidade dos receptores gustativos e interferir na absorção de micronutrientes, como as vitaminas A e B e o mineral zinco. Isto pode levar a modificações da morfologia das papilas gustativas e alterações funcionais da saliva, procedendo um aumento de apoptose nas glândulas salivares (SLOMIANY, B.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A., 1997; SILVA, C. *et al.*, 2015).

Os medicamentos costumam afetar mais o paladar do que o olfato. Neste caso, normalmente as alterações duram até a continuidade do uso do medicamento e estes sentidos são restituídos com a suspensão do tratamento. Os pacientes reportam uma perda progressiva e gradual da olfação, flutuante, devido a infecções agudas e exposição a alérgenos (DEEMS, D. *et al.*, 1991; TEMMEL, A. *et al.*, 2002). Os antimicóticos, antibióticos, anti-histamínicos e agentes antialérgicos, anti-inflamatórios, imunossupressores, medicamentos neurológicos e

psiquiátricos podem modificar a composição do muco e afetar os comportamentos alimentares e levar à diminuição da percepção olfativa (NOLDEN, A. *et al.*, 2019; VAN, S. *et al.*, 2018).

Nos Estados Unidos, pesquisas revelam que cinquenta por cento (50%) das drogas mais utilizadas no país no ano de 2017 induziram sintomas quimiossensoriais e efeitos colaterais (SCHIFFMAN, S., 2018). Pacientes oncológicos podem apresentar distúrbios de olfato e paladar como efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia, afetando a capacidade de resposta à intensidade, o reconhecimento dos sabores e limiares de detecção devido à atrofia provocada pela radiação nas papilas gustativas (DESHPANDE, T. *et al.*, 2018; REBHOLZ, H. *et al.*, 2020). Essas alterações podem ser solucionadas em cerca de dois a três meses após a conclusão do tratamento (McLAUGHLIN & MAHON, 2014).

As queixas quimiossensoriais relacionadas aos medicamentos incluem sensações adversas, como sabores amargos ou metálicos, acuidade reduzida e distorções perceptivas. Geralmente, reações adversas de medicamentos são mais comuns em pacientes geriátricos (ATKIN, P. & SHENFIELD, G., 1995; STRICKER, B. *et al.*, 1996). Indivíduos idosos estão mais suscetíveis a distúrbios quimiossensoriais decorrentes do uso desproporcional de medicamentos prescritos e não prescritos em relação aos pacientes mais jovens (ATKIN, P. *et al.*, 2012).

4.1.3 - Lesões pós-traumáticas

Anosmia e ageusia também podem ocorrer após traumatismo cranioencefálico, contusão cerebral e hemorragia ocasionando danos aos nervos olfativos na lâmina círibriiforme, lesões diretas na língua e nas papilas gustativas e danos ocasionados nos nervos cranianos podendo provocar de maneira imediata essas disfunções (SCHOFIELD, P. & DOTY, R., 2019). As causas exatas ainda não estão estabelecidas, alguns estudos abordam que a anosmia é cinco vezes mais frequente em lesões na região occipital do crânio (MUELLER, A. *et al.*, 2005).

4.1.4 – Infecções virais

As infecções virais agudas do trato respiratório superior são responsáveis por cerca de 11 a 40% dos distúrbios olfativos e também são causas importantes de perda de paladar (POTTER, M. *et al.*, 2020; SCHWARTZ, J.; TAJUDEEN, J.; KENNEDY, D., 2019). Os patógenos causadores, geralmente, são vírus que levam à gripe ou ao resfriado comum, como

alguns coronavírus, rinovírus, adenovírus, ortomixovírus, entre outros (BLAAS, D., 2016; SUGIURA, M. *et al.*, 1998).

As respostas inflamatórias de alguns vírus na cavidade oral desempenham papel na patogênese da disfunção gustativa e na renovação das papilas gustativas (WANG, H. *et al.*, 2009; COOPER, K. *et al.*, 2020). Na maioria dos casos, anosmia e ageusia são temporárias e retornam ao normal assim que os sintomas de resfriado ou da gripe desaparecem. Os vírus mencionados acima podem levar à DOPV, afetando mais as mulheres do que os homens, embora os fatores que determinem essa suscetibilidade ainda não estejam totalmente elucidados (BOESVELDT, S. *et al.*, 2017).

Estudos relatam que a recuperação do olfato é mais tardia nas mulheres. Algumas suposições indicam que a mulher possui o olfato e o paladar mais aguçados, e isso poderia ocasionar uma maior sensibilidade a mudanças e a um prejuízo subjetivo (TAN, B. *et al.*, 2022). Explicações biológicas também poderiam associar o estrogênio ao aumento da expressão de *ACE2*, dado que o gene dessa enzima está localizado no cromossomo X. Isso poderia indicar que o *ACE2* poderia ser mais expresso em mulheres ou expressar heterodímeros, alterando a ligação do vírus, aumentando sua infecção no sexo feminino. No entanto, em condições patológicas como diabetes e doença renal, muitos estudos pré-clínicos demonstram que *ACE2* é mais expresso em homens (GEBHARD, C. *et al.*, 2020; GEMMATI, D. *et al.*, 2020).

Existem dois mecanismos de ação pelos quais o vírus pode afetar o olfato:

1. Por meio de uma inflamação local ou uma obstrução das vias aéreas (AKERLUND, A.; BENDE, M.; MURPHY, C., 1995);
2. Através do envolvimento do vírus causando danos no EO, aos nervos periféricos e às células localizadas nesta região (WELGE-LÜSSEN, A. & WOLFENBERGER, M., 2006).

Além disso, causas de disfunções olfativas também estão ligadas à penetração do vírus no SNC, danificando regiões do cérebro como o bulbo olfatório, córtex piriforme, tubérculo olfativo, entre outros (BAIG, A. *et al.* 2020; REBHOLZ, H. *et al.*, 2020).

O primeiro mecanismo de ação é observado em resfriados comuns e em outras infecções por coronavírus. A inflamação local provoca um edema da mucosa nasal, impedindo que as moléculas odoríferas consigam se ligar aos seus receptores

correspondentes, resultando em uma capacidade olfativa reduzida. Devido a essa obstrução das vias aéreas, o fluxo de passagem de ar é significativamente reduzido e a quantidade de odores na cavidade podem ser insuficientes para disparar as vias de sinalização (WELGE-LÜSSEN, A. & WOLFENSBERGER, M., 2006; GLEZER, I. *et al.*, 2021).

Um estudo utilizou o Coronavírus 229E para induzir o resfriado comum em pacientes saudáveis, os quais apresentaram disfunções olfativas quatro dias após a inoculação. Nesse estudo, a disfunção olfatória na fase aguda da infecção, não pós-viral, pode resultar no edema da mucosa nasal ou obstrução do fluxo de ar quanto ao dano induzido pelo vírus no EO (AKERLUND, A.; BENDE, M.; MURPHY, C., 1995).

4.1.5 – Fatores biológicos

Os limiares olfativos e gustativos diminuem com o envelhecimento, aumentando entre a sétima e oitava década. Declínios relacionados à idade afetam a discriminação de alguns odores e a percepção de determinados alimentos incluindo o sabor azedo e amargo (VEENEMANN, M.; HUMMEL, T.; BERGER, K., 2008). Esses efeitos são menores nas mulheres em relação aos homens, apesar de ainda não serem bem compreendidos evidências indicam uma diminuição das papilas gustativas e redução da capacidade neural com o avanço da idade (LANDIS, B. *et al.*, 2010; OLESZKIEWICZ, A. *et al.*, 2019).

Estudos epidemiológicos, indicam que a prevalência e a gravidade de disfunção olfativa e gustativa aumentam em cerca de 10% de pessoas com mais de 65 anos. Esses indivíduos podem apresentar desde uma variação de perda leve a anosmia e ageusia, afetando pessoas com mais de 80 anos em até 80% dos casos (MURPHY, C. *et al.*, 2002; KONDO, K. *et al.*, 2020). Essas disfunções podem ser um sinal clínico ou pré-clínico de doenças neurológicas como a doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, demência por corpos de Lewy, demência vascular e distúrbio idiopático do sono de movimento rápido dos olhos (DOTY, R., 2017).

5 – Mecanismos propostos de Anosmia e Ageusia na COVID-19

A patogênese exata do SARS-CoV-2 que leva à anosmia e ageusia ainda é incerta. No interior da cavidade nasal, a mucosa nasal atua como receptor celular do vírus, portanto, obstruções nessa região e danos nas vias do SNC que incluem o EO podem levar à anosmia (REBHOLZ, H. *et al.*, 2020). Por outro lado, a ageusia, causada pelo envolvimento da membrana mucosa de toda a cavidade oral e principalmente das células epiteliais da língua,

causa perda da modulação da percepção do paladar (ZHONG, M. *et al.*, 2020; FARID, H. *et al.*, 2022).

O vírus SARS-CoV-2 pode levar a disfunções cerebrais por mecanismos diretos e indiretos, como dano de neurônios sensoriais olfativos, levar ao comprometimento do centro de percepção olfativa do cérebro e a uma anosmia pós viral. A infecção também pode levar a uma tempestade de citocinas, que pode danificar a barreira hematoencefálica e interromper o funcionamento normal do SNC. Relatos de estado pró-trombótico foram, também, associados à COVID-19, levando à obstrução de vasos cerebrais e ocasionando lesões (AGHAGOLI, G. *et al.*, 2020; YAZDANPANA, N.; SAGHAZADEH, A.; REZAEI, N., 2020).

As células sustentaculares e a glândula de Bowman na mucosa olfatória, eram alvo principal para a penetração do vírus na célula hospedeira por serem as células do EO que mais abundantemente expressam *ACE2* e *TMPRSS2* (BILINSKA, K. *et al.*, 2020; BRANN, D. *et al.*, 2020; KHAN, M. *et al.*, 2020; MEINHARDT, J. *et al.*, 2021). Algumas evidências sugerem que além dessas células no EO, as células epiteliais orais e as células das papilas gustativas, expressam o receptor da *ACE2*, o qual é o receptor de entrada para vírus da família *Coronaviridae*, incluindo o SARS-CoV-2 (ZHONG, M. *et al.*, 2020). Além disso, outros estudos sugerem que o vírus utilize múltiplos receptores de entrada, como os receptores de ácido siálico e os receptores *Toll Like* (TLR) para penetrar na célula hospedeira (VAIRA, L. *et al.*, 2020; GADANEC, L. *et al.*; 2021; HUANG, N. *et al.*, 2021).

O SARS-CoV-2, ao se ligar no receptor de ácido siálico salivar, pode interferir no transporte mediado por glicoproteínas de saborizantes e contribuir para a anosmia (MILANETTI, E. *et al.*, 2021; NGUYEN, L. *et al.*, 2022). As células gustativas se tornam susceptíveis à infecção devido à expressão de múltiplos receptores de entrada do vírus, sendo demonstrado que tanto a infecção como a replicação ocorrem em células das papilas gustativas humanas. Quando a infecção ocorre diretamente nessas células levando a uma inflamação local, pode desencadear alterações na percepção dos sabores (WANG, H. *et al.*, 2009; SRINIVASAN, M., 2021).

Evidências sugerem que o Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), composto pelas *ACE1* e *ACE2*, renina e aldosterona desempenham um papel na regulação da pressão arterial e na patogênese da COVID-19 (SAENGSIWARITT, W. *et al.*, 2022). A

predisposição genética foi considerada um dos contribuintes para a infecção pelo SARS-CoV-2, as variações nos genes relacionados ao SRAA foram implicadas na susceptibilidade e gravidade da COVID-19. O gene *ACE1* localiza-se nos braços longos do cromossomo e contém 26 éxons. A *ACE1* converte a Angiotensina-I (Ang-I) em Angiotensina-II (Ang-II). Já a *ACE2*, converte Ang-II em Angiotensina(1-7). A partir da ligação ao receptor AT1, a Ang-2 induziria inflamação, vasoconstrição, trombose e fibrose, enquanto Ang(1-7) se liga ao receptor AT2 e dificulta as reações envolvidas na inflamação, trombose e fibrose (GÓMEZ, J. *et al.*, 2020; SAENGSIWARITT, W. *et al.*, 2022).

Embora ainda não seja tão claro como a anosmia ocorre após uma infecção, a ligação do vírus aos receptores *ACE2* pode levar a uma degeneração das células epiteliais da mucosa nasal e, subsequentemente, a inflamação e dano aos receptores neurais responsáveis pelo olfato (BILINSKA, K. *et al.*, 2020; DOUAUD, G. *et al.*, 2022; PATEKAR, S. *et al.*, 2022). Essa inflamação poderia ser ocasionada pela liberação de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 e TNF- α e ativação de linfócitos e macrófagos, desencadeado pela “tempestade de citocinas” (TORABI, A. *et al.*, 2020).

Em particular, a IL-6 ativa a via responsável por apoptose do EO e evidências indicam que sua diminuição favorece a recuperação do olfato após anosmia induzida por COVID-19 (CAZZOLLA, A. *et al.*, 2020; CIOFALO, A. *et al.*, 2022). No entanto, há ocorrência de pacientes que apresentam taxas mais longas de recuperação do olfato e paladar que podem estar associadas ao efeito do vírus no SNC e devem ser investigadas (GLEZER, I. *et al.*, 2021; HOPKINS, C. *et al.*, 2020; LECHIEN, J. *et al.*, 2020).

Segundo alguns estudos, foi demonstrado que a língua apresenta uma alta expressão de *ACE2* em comparação a outras estruturas da mucosa oral, representando um alto risco de ligação viral e ageusia (WALLS, A. *et al.*, 2020; XU, H. *et al.*, 2020; ZHONG, M. *et al.*, 2020). A expressão de *TMPRSS2* também foi relatada em tecidos orais (CHEN, L. *et al.*, 2020). Observou-se, também, que as disfunções do paladar se correlacionam a níveis séricos elevados de IL-6, associados à infecção aguda e persistente para SARS-CoV-2 (CAZZOLLA, A. *et al.*, 2020).

6 - Variantes virais e Vigilância Genômica

Com o passar do tempo os vírus sofrem mudanças. Mutações surgem durante a replicação de ácidos nucleicos e quando selecionadas podem gerar novas linhagens ou variantes genéticas do SARS-CoV-2 com diferentes graus de importância para a saúde pública (LAURING, A. & HODCROFT, E., 2021; MISTRY, P. *et al.*, 2022). A maioria das mutações têm pouco ou nenhum efeito funcional, embora algumas possam influenciar a sua dispersão, alterações das características da doença, a sensibilidade à imunidade vacinal, a terapêutica e os métodos de diagnósticos (MISTRY, P. *et al.*, 2022; WHO, 2022).

A variabilidade viral pode contribuir para os diferentes desfechos da COVID-19. Diferentes fatores que afetam a relação entre as variantes de SARS-CoV-2 e a frequência dos sintomas de anosmia e ageusia podem flutuar ao longo do tempo, o que é importante considerar ao estudar variantes que não co-circulam com o tempo. Em média, a taxa de mutação de um vírus de RNA varia em torno de 10^{-3} e 10^{-5} substituições de nucleotídeos por ano. O SARS-CoV-2 possui um dos maiores genomas entre os vírus de RNA, e sofre mutações com uma taxa relativamente lenta em relação a outros vírus de RNA, de aproximadamente $10^{-6}/10^{-7}$ (HADFIELD, J. *et al.*, 2018; PAPANIKOLAU, V. *et al.*, 2022).

Alguns critérios são utilizados para estabelecer as variantes de SARS-CoV-2, sendo eles: ter uma ou mais diferenças de nucleotídeos compartilhadas com a linhagem ancestral; possuir cinco ou mais amostras com no mínimo 95% do genoma viral sequenciado; em relação a linhagem os genomas devem apresentar pelo menos uma mudança de nucleotídeo compartilhada; o valor de *bootstrap* deverá ser acima de 70% para o nó definidor de linhagem (RAMBAUT, A. *et al.*, 2020). Com base nos critérios acima, a OMS classifica as variantes do SARS-CoV-2 como variantes de preocupação (VOCs), variantes de interesse (VOIs) ou variantes sob monitoramento (VUMs) (RESENDE, P. *et al.*, 2021).

As VOIs apresentam alterações genéticas que modificam atributos epidemiológicos como transmissibilidade, severidade, escape imunológicos, entre outros; e são responsáveis por transmissões comunitárias ou aumento crescente de múltiplos casos. As VOCs além de atenderem às definições de VOIs estão associadas com alteração prejudicial na epidemiologia, alteração clínica da doença e diminuição das medidas de prevenção, vacinas e diagnósticos. As VUMs são suspeitas de apresentarem alterações genéticas capazes de afetar características

virais e possivelmente apresentar um risco futuro, exigindo grande monitoramento e avaliação das evidências (CHOI, J. & SMITH, D., 2021; ECDC, 2023).

Foram identificadas cinco VOCs desde o início da pandemia, nomeadas de acordo com o alfabeto grego (Alfa a Ômicron). Sendo a Alfa (B.1.1.7), identificada originalmente no Reino Unido em dezembro de 2020 e possuía cerca de 22 mutações, afetando vários países como os Estados Unidos e apresentando uma transmissibilidade de 1,3 a 1,5 vezes maior do que a cepa original. No Brasil, essa variante não levou a um aumento dos números de casos e foi rapidamente substituída por outra VOC (CLARO, I. *et al.*, 2021; VOLZ, E. *et al.*, 2021). A variante Beta (B.1.351) surgiu, também, em dezembro de 2020 na África do Sul, apresentando 12 mutações não sinônimas e uma deleção. A maioria das mutações está localizada na proteína S e as demais nas regiões ORF1a, proteína E e proteína N. O conjunto dessas modificações intensifica a afinidade do vírus pelo receptor, aumento da transmissibilidade e permite o escape de anticorpos neutralizantes gerados por resposta imune de infecção prévia por outras linhagens do vírus (MAKONI, M., 2021; TEGALLY, H. *et al.*, 2021; TIAN, D. *et al.*, 2021).

No Brasil, em meados de novembro de 2020, emergiu uma onda crescente de casos, principalmente no estado do Amazonas, onde foi notificada, pela primeira vez, a variante Gama (P.1) (ALVES, H. *et al.*, 2023). Essa variante apresentava mutações similares às da VOC Beta, porém, apresentava uma maior transmissibilidade, se espalhando por todo o território nacional levando a uma alta taxa de hospitalização, infectividade e gravidade da doença (FARIA, N. *et al.*, 2021; UMAIR, M. *et al.*, 2022); Já a variante Delta (B.1.617.2), emergiu em meados de maio de 2021 na Índia, modificando todo o cenário epidemiológico e se tornando predominante no Brasil e em outros países do mundo (SILVA, J. *et al.*, 2022). A última variante classificada como VOC, a Ômicron (B.1.1.529), surgiu em novembro de 2021 na África do Sul e se espalhou para vários países do mundo. Ela apresenta mais de 30 mutações na proteína S e no Brasil se tornou altamente transmissível. Em relação às demais variantes, a Ômicron emergiu em um cenário de alta imunização mediado pelas vacinas. Essa variante ainda apresenta sublinhagens que ocorrem desde o início de 2022, BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4 e BA.5 (Tabela 2) (ADAMOSKI, D. *et al.*, 2022; KIMURA, I., *et al.*, 2022; ASSATO, P. *et al.*, 2023).

Tabela 2: As mutações comuns presentes em VOCs. As duas primeiras colunas representam a classificação dada pela OMS e a linhagem PANGO. Os cabeçalhos das colunas numéricas indicam as posições da proteína Spike. O ‘WT’ significa selvagem e o ‘DEL’ corresponde a deleção desses SNPs.

OMS	Linhagem PANGO	417	452	484	501	614	681	701	1264	DEL 69/70
Alfa	B.1.1.7	WT	WT	WT	N501Y		P681H			
Beta	B.1.135	K417N	WT	E484K	N501Y		WT			
Gama	P.1	K417T	WT	E484K	N501Y		WT			
Delta	B.1.617.2	WT	L452R	WT	WT		P681R			
Ômicron	BA.1	K417N	WT	E484A	N501Y	D614G	P681H	WT	WT	DEL
Ômicron	BA.2	K417N	WT	E484A	N501Y	D614G	P681H	WT	WT	WT
Ômicron	BA.3	K417N	WT	E484A	N501Y	D614G	P681H	WT	WT	DEL
Ômicron	BA.4	K417N	L452R	E484A	N501Y	D614G	P681H	WT	WT	DEL
Ômicron	BA.5	K417N	L452R	E484A	N501Y	D614G	P681H	WT	WT	DEL

A Vigilância Genômica é o procedimento contínuo de monitoramento e análise de características genéticas de patógenos que podem causar doenças, através de técnicas como as de sequenciamento ou de genotipagem (BHOYAR, R. *et al.*, 2021; MEURISSE, M. *et al.*, 2022; OKPEKU, M. *et al.*, 2022). Essas análises genômicas podem auxiliar a Vigilância Epidemiológica, rastreando a dinâmica do surto no espaço e tempo, a inferência de eventos de introdução, ajudar a compreender a dispersão e os padrões evolutivos do SARS-CoV-2, sendo importante a detecção precoce das linhagens do vírus circulantes em todos os países, avaliando as mutações que podem afetar a saúde pública e a epidemiologia da COVID-19 (GARDY, J. & LOMAN, N., 2017; DOS SANTOS, C. *et al.*, 2021; SILVA, T. *et al.*, 2022).

Informações oportunas e precisas sobre o surgimento e a circulação das VOCs e VOIs requerem sistemas de vigilância robustos, incluindo o sequenciamento integrado do genoma com uma estratégia de amostragem e sequenciamento bem definidas garantindo a confiabilidade e a representatividade das evidências (ECDC, 2021). Uma vez caracterizada a circulação de variantes, torna-se importante identificar potenciais efeitos do impacto delas sobre aspectos clínicos e epidemiológicos que podem ser monitorados utilizando dados do ‘mundo real’ (do inglês, *real-world data*). Essas fontes de dados do mundo real geralmente resultam do uso secundário de dados de atendimento de rotina, como registros, pesquisas ou bancos de dados do governo (MEURISSE, M. *et al.*, 2022).

Segundo Straw & Witte (2020), geralmente os dados observacionais são cheios de interações e vieses, sendo que a confiabilidade das evidências do mundo real depende da qualidade dos dados, suposições sobre possíveis fatores de confusão e procedimentos estatísticos utilizados. A disseminação do SARS-CoV-2 em Minas Gerais (MG) tem sido um grande desafio para as políticas públicas de saúde em resposta à pandemia de COVID-19. O estado está localizado na região sudeste do Brasil. Além de muito populoso, possui um dos maiores territórios do país e costumava receber passageiros estrangeiros durante toda a pandemia, sendo o terceiro mais incidente durante a pandemia da COVID-19 (CANDIDO, D. *et al.*, 2020; PAULA- JÚNIOR, W. *et al.*, 2021). O município de Betim, alvo deste estudo, localiza-se na região sudeste do estado e faz parte da região metropolitana de Belo Horizonte. Segundo dados recentes Betim possui cerca de 450.024 habitantes, sendo a quinta cidade mais populosa do estado (IBGE, 2021).

A Vigilância Epidemiológica (SE) do município de Betim é realizada territorialmente pela REVISA (Referências Locais de Vigilância em Saúde) nas unidades públicas municipais de saúde, seja na Atenção Básica, Especializada ou Emergência através do serviço de Vigilância Epidemiológica SMS-Betim, em uma central nível ou no ambiente hospitalar do Hospital Público Regional de Betim Osvaldo Rezende Franco (HPRB), pelo NUVEH (Núcleo de Vigilância Epidemiológica Hospitalar) (SMS-Betim, 2020). O objetivo deste estudo é compreender a razão da variação de frequência de anosmia e ageusia em indivíduos infectados por SARS-CoV-2, através da análise de um banco de dados municipal brasileiro; e explorar, em nível molecular, a expressão dos genes *ACE1*, *ACE2* e *TMPRSS2* relacionados a esses desfechos na COVID-19.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Compreender a razão da variação de frequência de anosmia e ageusia ao longo da pandemia de COVID-19 e explorar os níveis de expressão de genes relacionados à interação do vírus com o hospedeiro, em indivíduos infectados por SARS-CoV-2.

3.2 Objetivos Específicos

- a)** Escrutinar um banco de dados brasileiro do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da gripe (SIVEP-gripe), gerido pelo Ministério da Saúde/Secretaria de Saúde do município de Betim – Minas Gerais;
- b)** Selecionar e avaliar aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes positivos para COVID-19, entre o período de 2020 a 2022, no Banco de Dados SIVEP-gripe;
- c)** Correlacionar a frequência de anosmia e ageusia e a chance desses desfechos com o surgimento de variantes de preocupação ao longo da pandemia;
- d)** Associar os níveis de expressão gênica de *ACE1*, *ACE2* e *TMPRSS2* em pacientes hospitalizados com COVID-19 aos desfechos de anosmia e ageusia.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho e área de estudo

Utilizamos um Banco de Dados Unificado do Sistema Único de Saúde (SUS) denominado Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Gripe (SIVEP-Gripe). Este sistema foi implantado no ano de 2000 para o monitoramento do vírus Influenza no país, baseado em uma rede de vigilância sentinela da Síndrome Gripal (SG). Em 2009, com a pandemia pelo vírus Influenza A(H1N1), notificações de casos de SARS passaram a ser realizados. Com a pandemia de COVID-19 a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) realizou adaptações neste sistema para incluir o monitoramento do novo coronavírus (https://sistemas.saude.rj.gov.br/tabnetbd/sivep_gripe/SIVEP_Gripe.pdf e https://docs.bvsalud.org/biblioref/2021/03/1147534/guia-rapido-sivep-gripe_agosto-2020.pdf).

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo, observacional transversal, utilizando a técnica de amostragem por conveniência, através dos dados disponíveis da Secretaria Municipal de Betim-MG. Dados demográficos e clínicos de 14.450 pacientes com diagnóstico positivo para COVID-19 no período de janeiro de 2020 a abril de 2022 foram registrados por meio de um formulário e inseridos no SIVEP-Gripe do município de Betim - MG. Os dados clínicos e informações obtidas incluíram o número de notificação, comorbidades, doenças de base, sinais e sintomas, vacinas COVID-19 administradas, indicadores socioeconômicos, entre outros.

Os dados foram encaminhados por meio de formulários padronizados para notificação e investigação de casos de doenças e agravos de interesse nacional. A Ficha de Notificação Individual (FN) é preenchida pelas unidades de atendimento a cada paciente, quando há suspeita da ocorrência de agravo de saúde de notificação compulsória ou de interesse nacional, estadual ou municipal, contendo os atributos comuns a todas as doenças (BRASIL, 2022).

4.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

4.2.1 Obtenção de amostras

Foram coletadas amostras de *swab* nasal de 102 pacientes positivos para COVID-19 confirmados por qPCR e internados no Hospital Eduardo de Menezes em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, entre abril e setembro de 2020, antes do aparecimento de variantes de preocupação do SARS-CoV-2. Foi construída uma tabela coletando dados a respeito de 12

variáveis concernentes aos pacientes. A maioria dos pacientes amostrados tinha 55 anos de idade, 18 deles apresentaram anosmia e 10 ageusia. Os critérios de exclusão utilizados para a realização desta pesquisa foram indivíduos que apresentavam câncer, doenças autoimunes e gravidez. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética (CAAE 32224420.3.0000.0008 e CAAE 31462820.3.0000.5149) com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) de todos os participantes. Quando os pacientes não puderam consentir devido à hospitalização, o consentimento informado foi obtido por meio de um responsável legal.

O diagnóstico de COVID-19 foi confirmado por RT-qPCR. Os dados clínicos dos pacientes utilizados no estudo foram obtidos dos prontuários hospitalares. As informações sobre comorbidades são baseadas no histórico médico de cada paciente internado. Amostras de *swab* nasofaríngeo foram coletadas em um meio de transporte viral (DMEM ou PBS) e armazenadas a -80°C até a extração. A coleta do material biológico foi realizada no primeiro dia de internação dos pacientes.

4.2.2 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada usando um kit Quick-RNA Viral (Zymo Research, CA, EUA). O Quick-RNA™ Viral Kit é uma purificação rápida de RNA viral e também possui um sistema tampão que facilita a lise completa das partículas virais para isolamento eficiente de ácidos nucleicos. DNAs e RNAs pequenos (> 50 nt) e grandes (> 200 kb) são ligados à coluna, lavados e eluídos. O RNA total isolado de alta qualidade está pronto para todas as aplicações downstream, como sequenciamento de última geração, detecção baseada em hibridação e RTqPCR.

Para a realização deste experimento, 102 amostras de *swab* nasal foram extraídas de acordo com o protocolo especificado que consiste em 5 etapas: 1. Lise celular; 2. Precipitação; 3. Ligação; 4. Lavagem e 5. Eluição. Segundo o protocolo, antes da realização das etapas acima é necessário a preparação de alguns reagentes. Desta forma, foram adicionados 60 mL de etanol 95-100% diretamente no frasco de reagente Viral Wash Buffer II, e 10 μL de beta-mercaptoetanol (para cada 1 mL) no Tampão de lise.

Todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Biologia Integrativa do Instituto de Ciências Biológicas localizado na Universidade Federal de Minas Gerais. O laboratório contém uma sala de extração e possui capelas com fluxo adequado para realização dos experimentos. Conforme descrito pelo fabricante, foram adicionados 100 μL de amostra, 100

μL de tampão de lise e 100 μL de etanol 95-100% em tubos de coleta de 1,5mL (Eppendorf). Durante estes procedimentos, as soluções foram devidamente homogeneizadas. Em seguida, todo o conteúdo foi transferido para um cartucho giratório com a coluna de sílica presente (Zymo-Spin™ IC Columns). O conteúdo presente neste foi centrifugado a 12.000 $\times g$ por dois minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação e o descarte do sobrenadante presente no tubo de coleta, foram adicionados 700 μL de Viral Wash Buffer I à coluna. Outra vez o material foi centrifugado a 12.000 $\times g$ por 30 segundos em temperatura ambiente.

Após este procedimento, a coluna foi inserida em um novo tubo de coleta e foram adicionados 500 μL de Viral Wash Buffer II com etanol. Novamente, a coluna foi centrifugada nas mesmas condições para remoção completa do tampão de lavagem. Esta etapa de adição do reagente Viral Wash Buffer II foi realizada duas vezes, segundo as orientações do fabricante. Ao realizar a segunda lavagem com Viral Wash Buffer II, o material foi centrifugado a 12.000 $\times g$ por um minuto em temperatura ambiente. Posteriormente, a coluna foi retirada do tubo coletor e inserida em um novo tubo de recuperação (identificado para cada amostra). Para realizar a etapa de eluição do RNA, foram adicionados 15 μL de água livre de RNase ao centro do cartucho giratório. Em seguida, o cartucho foi centrifugado a 12.000 $\times g$ por 30 segundos em temperatura ambiente. O RNA eluído e purificado foi armazenado em *ultrafreezer* a temperatura de -80°C . O RNA não foi quantificado, o gene endógeno (*B2M*) foi utilizado para normalização.

4.2.3 cDNA

O cDNA foi gerado usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Todas as reações acima foram conduzidas seguindo as instruções do fabricante. O procedimento consiste em três etapas: 1. Preparação do Mix; 2. Preparar as reações de cDNA; 3. Transcrição reversa. A mistura principal de 2x Reverse Transcription Master Mix foi preparada para 20 μL de reação e realizada para as 102 amostras. Em um tubo de coleta foram adicionados em temperatura ambiente 204 μL de 10x RT Buffer; 81,6 μL de 25x dNTP Mix (4 mM); 204 μL de 10x RT Random Primers; 102 μL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase.

Em seguida, foram acrescentados 10 μL de master mix 2x RT em cada poço de uma placa com capacidade de 96 reações. Posteriormente, 4,2 μL de amostra de RNA foram adicionadas em cada poço, pipetando para cima e para baixo duas vezes para homogeneizar o

conteúdo. Após este procedimento, a placa foi selada e centrifugada brevemente para girar o conteúdo e eliminar quaisquer bolhas de ar.

Para a etapa de transcrição reversa, o termociclador foi programado com o volume de reação para 20 μL e a placa foi inserida no mesmo. Os procedimentos para a execução da transcrição reversa seguiram os passos da Tabela 3:

Tabela 3: Parâmetros estabelecidos para realizar a transcrição reversa no termociclador. Os Passos de 1 a 4 indicam a variação de temperatura e tempo que devem ser inseridos corretamente no equipamento.

	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	37	85	4
Tempo	10 minutos	120 minutos	5 minutos	∞

Esse procedimento durou em torno de três horas e o cDNA foi armazenado em *ultrafreezer*, a uma temperatura de -80°C .

4.2.4 Expressão Gênica

Os níveis de expressão gênica de *ACE1*, *ACE2*, *TMPRSS2* e *B2M* (gene de referência) foram dosados usando o GoTaq Probe qPCR System (Promega, WI, EUA). As sondas específicas (Integrated DNA Technologies, NJ, EUA) usadas e projetadas para junções exon-exon foram: Hs.PT.58.19167084, Hs.PT.58.27645939, HS.PT.58.39738666 e Hs.PT.39a.22214847, respectivamente. O ΔCt foi calculado subtraindo o limiar do ciclo (Ct) do gene de interesse do gene de referência (B2M) Ct.

O procedimento para cada um dos genes acima envolve a preparação de uma reação para a quantidade de 102 amostras e cinco controles, sendo dois positivos e dois negativos e uma amostra. Em quatro tubos de coleta (um para cada respectivo gene) foram adicionados: 5 μL de GoTaq® Probe qPCR Master Mix (2X), 5 μL de Forward primer (20X), 0.5 μL de Reverse primer (20X), 0.5 μL Hydrolysis probe (20X) e 4 μL de água livre de nuclease. Após a adição dos reagentes, a solução de mix foi homogeneizada utilizando um vortex por cerca de 10 segundos. Utilizando duas placas ópticas de 96 poços, foram adicionados em cada poço 8 μL do mix. Após este procedimento, acrescentamos nos respectivos poços de amostra 2 μL de cDNA, nos controles adicionamos 2 μL de água.

As reações foram realizadas em um volume final de 10 μ L. As placas foram seladas e centrifugadas por cerca de um minuto para homogeneizar e evitar bolhas de ar. Após este procedimento as amostras estão preparadas para a etapa de ciclagem, em um sistema 7.500 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) utilizando os parâmetros a seguir na Tabela 4:

Tabela 4: Parâmetros estabelecidos para utilização do equipamento de Real-Time PCR. Durante a etapa de ciclagem são indicados a quantidade de ciclos, da temperatura e a variação de tempo a serem inseridas no equipamento.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tempo
Ativação da polimerase	1	95 °C	2 minutos
Desnaturação	40	95 °C	15 segundos
Anelamento e extensão		60 °C	1 minuto

4.3 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO *Alu* 287bp (rs4646994)

Para a genotipagem do polimorfismo rs4646994, utilizou-se o kit FastStart Universal SYBR Green Master (Promega, WI, EUA) obtendo-se um volume final de 20 μ L com três primers diferentes: 5'CATCCTTTCTCCCATTTCTC3' (Primer1, Forward); 5'TGGGATTACAGGCGTGATACAG3' (Primer 2, Forward, interno); e 5'ATTCAGAGCTGGAATAAAATT3' (Iniciador 3, Reverso). O estoque de primer foi ressuspensão e diluído para uma solução de trabalho de 10 μ M. A concentração dos primers 1 e 3 é de 20 pmol e a concentração do primer 2 é de 40 pmol. Para a reação são adicionados 10 μ L de Sybr green, 2 μ L do Primer 1, 4 μ L do Primer 2, 2 μ L do Primer 3 e 2 μ L de DNA. O volume total da reação é de 20 μ L. Após esta etapa, a ciclagem foi realizada no termociclador utilizando os seguintes parâmetros:

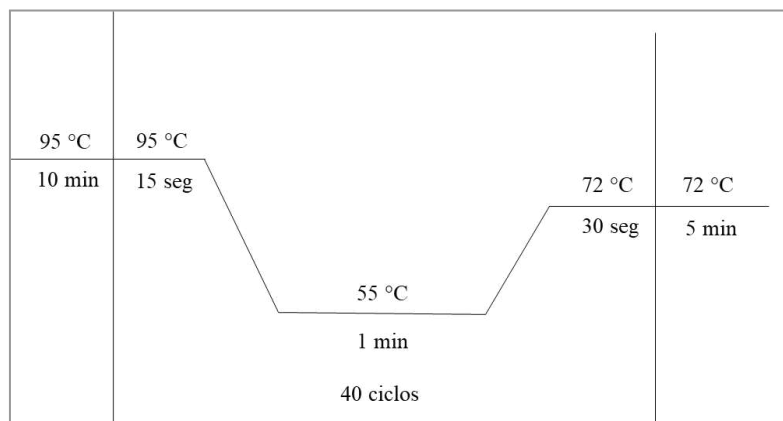


Figura 7: Parâmetros estabelecidos para utilização do termociclador no procedimento de genotipagem do polimorfismo *Alu* 287bp (rs4646994). Estão indicados a quantidade de ciclos, a variação de tempo e temperatura que devem ser inseridas corretamente no equipamento.

Posteriormente, realizamos uma eletroforese em gel pipetando 10 μL de amostra e 4 μL de tampão, homogeneizando bem com a pipeta. Foram aplicados 10 μL da mistura em um gel de agarose a 3% durante uma hora. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram 65bp (inserção) e 84bp (deleção) e visualizados em um gel de agarose a 3%. Dez por cento da amostra foi genotipada aleatoriamente duas vezes para atestar a qualidade da genotipagem. O nível de concordância foi de 100%.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises deste estudo foram realizadas no software R versão 4.0.2, considerando um nível de significância de 0,05. Para a análise da associação genética entre o polimorfismo *ALU287bp* e a presença/ausência de anosmia e ageusia foram utilizados os testes de qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, considerando os pré-requisitos de cada teste. Com base nos genótipos observados, foram realizados cálculos de frequência alélica e genotípica. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi verificado por teste exato de Fisher, utilizando o pacote *SNPassoc*. Modelos de regressão logística foram gerados para estimar os efeitos individuais das variáveis idade, sexo, polimorfismo *ALU287bp* e níveis de expressão gênica para os desfechos de Anosmia e Ageusia.

Utilizamos dados de Ct do gene N do SARS-CoV-2 para avaliar se havia diferença entre as cargas virais de pacientes com COVID-19 com anosmia e ageusia versus aqueles sem anosmia e ageusia. Os valores de Ct da RNase P (Ribonuclease P) foram usados para normalização. Os resultados foram relatados na Tabela 9 como média, desvio padrão (dp), odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC).

5. RESULTADOS

5.1 Aspectos clínico-epidemiológicos associados à anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19

O município de Betim apresentou quatro ondas de casos de COVID-19, até julho de 2022. A primeira onda durou até o mês de novembro de 2020, a segunda onda de dezembro de 2020 até agosto de 2021, a terceira onda de janeiro de 2022 até abril de 2022 e a quarta onda iniciou-se em junho de 2022 (Figura 8A).

A mortalidade observada em cada onda epidêmica difere substancialmente. Enquanto na primeira e segunda ondas, o incremento no número de casos foi acompanhado com aumento no número de mortes observadas no período, a terceira e quarta ondas não estiveram associadas com mortalidade na mesma proporção (Figura 8A). A distribuição de casos notificados no SIVEP-Gripe foi semelhante à curva de mortes ao longo do período (Figura 8B). A distribuição das notificações dos pacientes com dados completos relativos à anosmia e ageusia diferiu da distribuição do conjunto total de pacientes notificados, especialmente durante 2022 (Figura 8C).

A frequência trimestral de notificação de ageusia e anosmia apresentou flutuação ao longo da pandemia (Figura 9). Enquanto foi observado um incremento gradual entre o período da primeira e segunda ondas, uma substancial redução de aproximadamente 7% foi vista no segundo semestre de 2021, antecedendo a terceira onda.

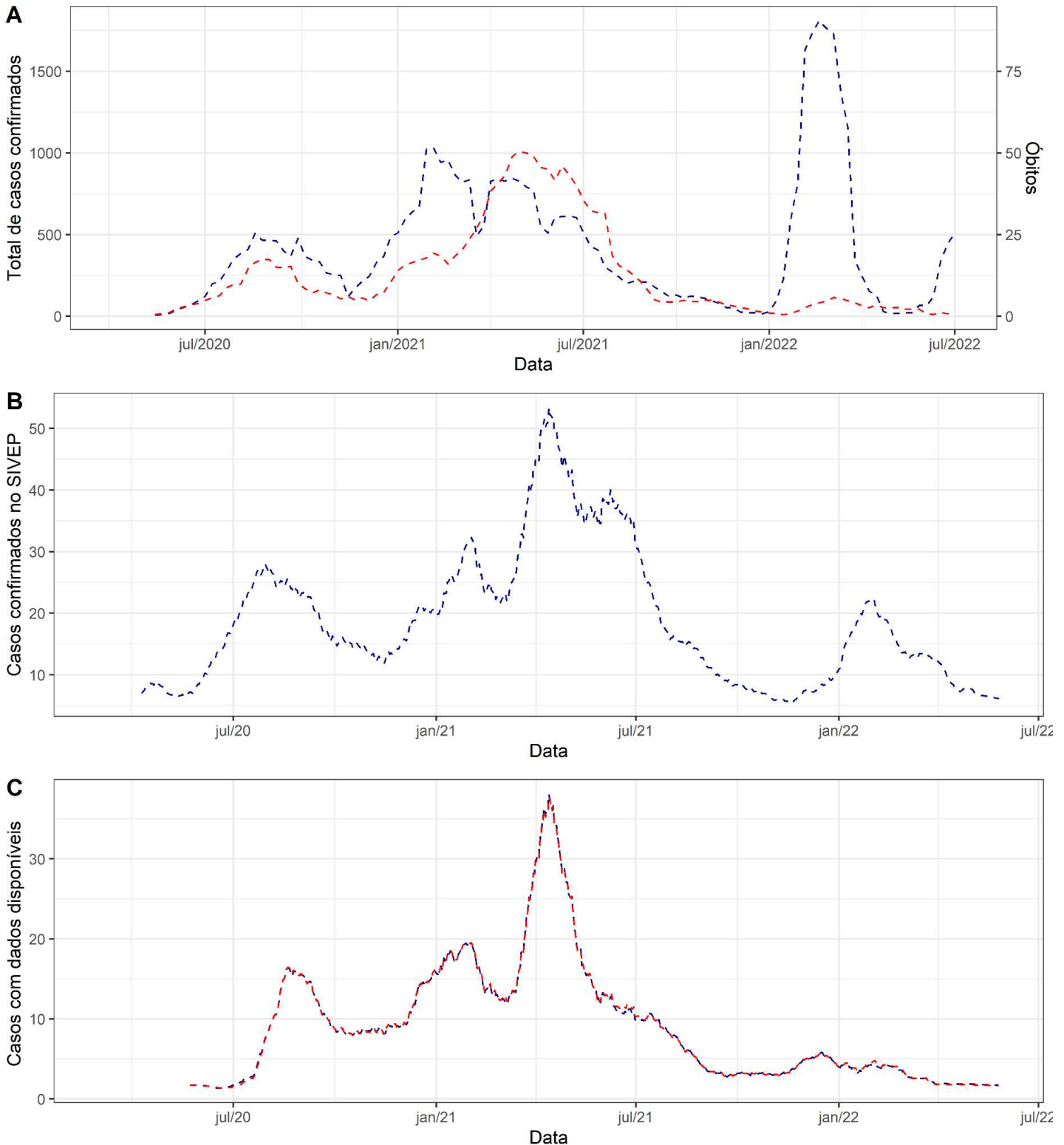


Figura 8: Aspectos epidemiológicos da COVID-19 no município de Betim no período de março de 2020 até agosto de 2022. (A) Média móvel de sete dias do total de casos notificados (linha pontilhada azul) e óbitos (linha pontilhada vermelha). (B) Média móvel de 30 dias do número de notificações no SIVEP-Gripe do município. (C) Média móvel de 30 dias do número de notificações no SIVEP-Gripe do município com dados relativos à anosmia (linha pontilhada azul) e ageusia (linha pontilhada vermelha) que estavam disponíveis (notificações sem dados faltantes).

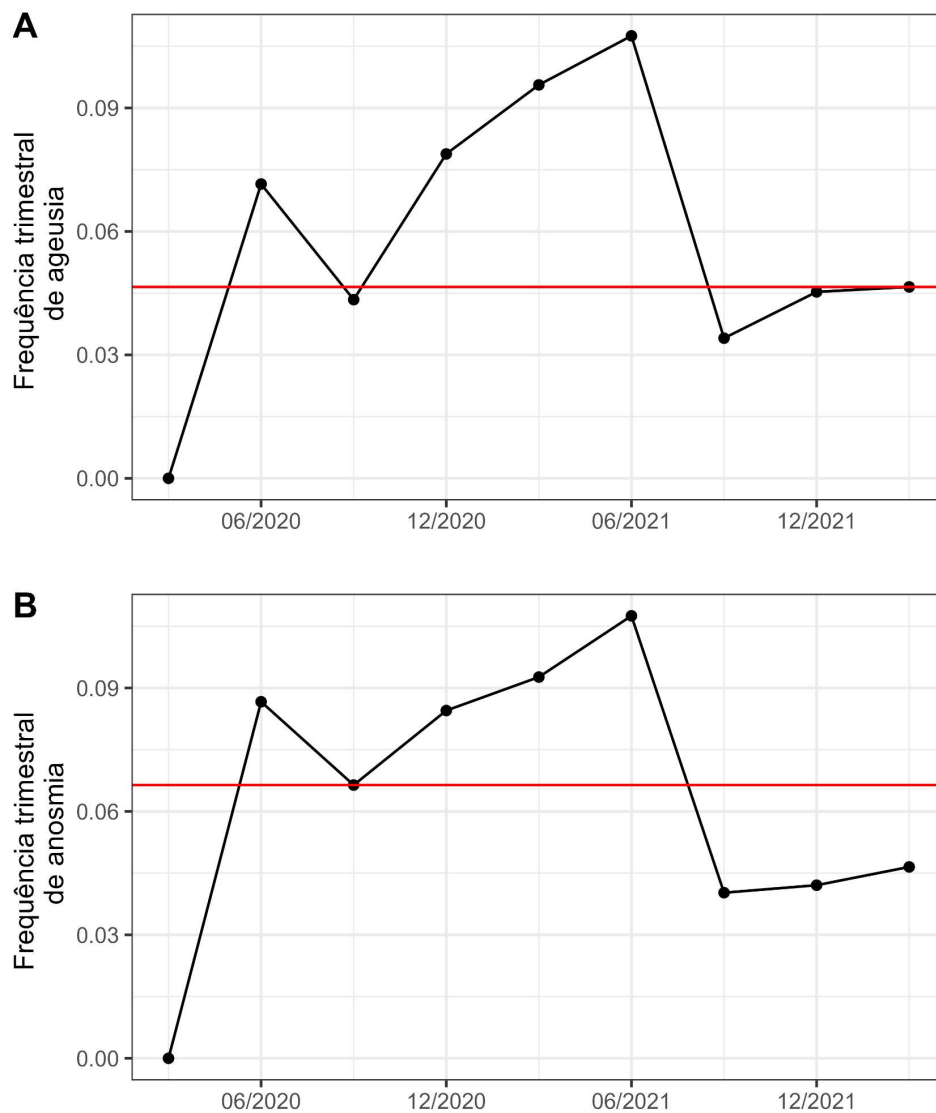


Figura 9. Frequência trimestral de (A) ageusia e (B) anosmia identificada pelas notificações do SIVEP-Gripe. A mediana da frequência em todo período é apresentada pela linha vermelha.

Foi observada co-ocorrência significativa de todos os sintomas notificados com anosmia e ageusia (Tabela 5). A co-ocorrência mais significativa foi a de anosmia e ageusia, atingindo razão de chances de 245,7 (intervalo de confiança de 95% entre 182,0 e 331,7) o que indica um processo quase determinístico entre a presença dos dois sintomas. Febre, fadiga e alteração da saturação parecem favorecer anosmia e ageusia, quando analisamos os números de pacientes que apresentaram esses sintomas. Em especial, observamos em nossos dados que os pacientes que apresentaram sintomas de vias aéreas superiores e região de cabeça e pescoço apresentaram com mais frequência anosmia e ageusia.

Tabela 5: Co-ocorrência de sintomas com anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19. Todos os sintomas foram associados com a manifestação de anosmia e ageusia apresentando o valor de ($p < 0.001$). Os dados representados por ‘Sim’ indicam a presença daquele sintoma e os dados representados por ‘Não’ representam a ausência deste desfecho; Os dados faltantes indicam que essas informações não estiveram disponíveis no banco de dados para todos os pacientes.

Sintomas		Ageusia			Anosmia		
		Total N = 6.481	Sim N = 632	Não N = 5.849	Total N = 6.478	Sim N = 627	Não N = 5.851
Dor abdominal	Sim	351 (5,7%)	80 (24%)	271 (4,7%)	344 (5,6%)	72 (20%)	272 (4,7%)
	Não	5.806 (94%)	251 (76%)	5.555 (95%)	5.839 (94%)	286 (80%)	5.553 (95%)
	Dados faltantes	324	301	23	295	269	26
Fadiga	Sim	1.626 (26%)	278 (67%)	1.348 (23%)	1.615 (26%)	254 (59%)	1.361 (23%)
	Não	4.627 (74%)	139 (33%)	4.488 (77%)	4.647 (74%)	177 (41%)	4.470 (77%)
	Dados faltantes	228	215	13	216	196	20
Febre	Sim	3.226 (51%)	371 (75%)	2.855 (49%)	3.233 (51%)	371 (71%)	2.862 (49%)
	Não	3.091 (49%)	125 (25%)	2.966 (51%)	3.112 (49%)	152 (29%)	2.960 (51%)
	Dados faltantes	164	136	28	133	104	29
Tosse	Sim	4.396 (69%)	497 (88%)	3.899 (67%)	4.398 (69%)	508 (88%)	3.890 (67%)
	Não	2.008 (31%)	68 (12%)	1.940 (33%)	2.018 (31%)	68 (12%)	1.950 (33%)
	Dados faltantes	77	67	10	62	51	11
Dor de garganta	Sim	716 (12%)	123 (32%)	593 (10%)	718 (12%)	128 (31%)	590 (10%)
	Não	5.472 (88%)	259 (68%)	5.213 (90%)	5.506 (88%)	291 (69%)	5.215 (90%)
	Dados faltantes	293	250	43	254	208	46
Dispneia	Sim	4.169 (66%)	423 (81%)	3.746 (64%)	4.174 (65%)	425 (78%)	3.749 (64%)
	Não	2.193 (34%)	101 (19%)	2.092 (36%)	2.205 (35%)	117 (22%)	2.088 (36%)
	Dados faltantes	119	108	11	99	85	14
Desconforto respiratório	Sim	3.138 (50%)	340 (71%)	2.798 (48%)	3.146 (50%)	340 (67%)	2.806 (48%)
	Não	3.170 (50%)	136 (29%)	3.034 (52%)	3.193 (50%)	166 (33%)	3.027 (52%)
	Dados faltantes	173	156	17	139	121	18
Alteração de saturação	Sim	3.856 (61%)	413 (81%)	3.443 (59%)	3.866 (61%)	401 (75%)	3.465 (59%)
	Não	2.492 (39%)	99 (19%)	2.393 (41%)	2.505 (39%)	135 (25%)	2.370 (41%)
	Dados faltantes	133	120	13	107	91	16
Diarreia	Sim	780 (13%)	137 (37%)	643 (11%)	778 (12%)	133 (32%)	645 (11%)
	Não	5.413 (87%)	236 (63%)	5.177 (89%)	5.455 (88%)	278 (68%)	5.177 (89%)
	Dados faltantes	288	259	29	245	216	29
Vômito	Sim	661 (11%)	90 (25%)	571 (9,8%)	659 (11%)	81 (20%)	578 (9,9%)
	Não	5.514 (89%)	267 (75%)	5.247 (90%)	5.556 (89%)	318 (80%)	5.238 (90%)
	Dados faltantes	306	275	31	263	228	35
Anosmia	Sim	520 (8,2%)	406 (83%)	114 (2,0%)			
	Não	5.810 (92%)	83 (17%)	5.727 (98%)			
	Dados faltantes	151	143	8			
Ageusia	Sim				489 (7,7%)	406 (78%)	83 (1,4%)
	Não				5.841 (92%)	114 (22%)	5.727 (99%)
	Dados faltantes				148	107	41

Padrões de co-ocorrência dos sintomas ageusia e anosmia com condições de saúde pré-existent também foram explorados (Tabela 6).

Tabela 6: Co-ocorrência de condições de saúde com anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19. As condições de saúde apresentadas pelos pacientes são representadas por ‘Sim’, indicando a presença da condição e ‘Não’ indica a ausência da condição; Algumas informações não estavam disponíveis para todos os pacientes e foram incluídas em dados faltantes; A segunda e terceira colunas mostram os dados de ageusia e anosmia, indicados pelo valor total dos pacientes que apresentaram estes desfechos, ‘Sim’ representa a quantidade de pacientes que relataram os sintomas e ‘Não’ a quantidade de pacientes que não relataram os mesmos. O valor de $p \leq 0,05$ é considerado significativo.

Condições de saúde	Ageusia			valor p	Anosmia			valor p
	Total, N = 6.481	Sim, N = 632	Não, N = 5.849		Total, N = 6.478	Sim, N = 627	Não, N = 5.851	
Puérperio				0,2				0,2
Sim	49 (1,5%)	4 (2,8%)	45 (1,4%)		51 (1,5%)	5 (2,7%)	46 (1,5%)	
Não	3.225 (99%)	141 (97%)	3.084 (99%)		3.245 (98%)	177 (97%)	3.068 (99%)	
Dados faltantes	3.207	487	2.720		3.182	445	2.737	
Cardiopatia				<0,001				<0,001
Sim	2.387 (62%)	234 (80%)	2.153 (60%)		2.390 (62%)	241 (76%)	2.149 (60%)	
Não	1.479 (38%)	58 (20%)	1.421 (40%)		1.492 (38%)	78 (24%)	1.414 (40%)	
Dados faltantes	2.615	340	2.275		2.596	308	2.288	
Doenças hematológicas				0,01				0,01
Sim	117 (3,6%)	11 (7,4%)	106 (3,4%)		118 (3,6%)	13 (7,0%)	105 (3,4%)	
Não	3.159 (96%)	137 (93%)	3.022 (97%)		3.178 (96%)	173 (93%)	3.005 (97%)	
Dados faltantes	3.205	484	2.721		3.182	441	2.741	
Doença hepática				0,13				0,7
Sim	61 (1,9%)	5 (3,5%)	56 (1,8%)		61 (1,9%)	4 (2,2%)	57 (1,8%)	
Não	3.192 (98%)	136 (96%)	3.056 (98%)		3.212 (98%)	175 (98%)	3.037 (98%)	
Dados faltantes	3.228	491	2.737		3.205	448	2.757	
Asma				<0,001				0,002
Sim	452 (13%)	44 (26%)	408 (13%)		448 (13%)	40 (20%)	408 (13%)	
Não	2.925 (87%)	124 (74%)	2.801 (87%)		2.942 (87%)	156 (80%)	2.786 (87%)	
Dados faltantes	3.104	464	2.640		3.088	431	2.657	
Diabetes				<0,001				<0,001
Sim	1.271 (36%)	129 (60%)	1.142 (34%)		1.262 (36%)	122 (51%)	1.140 (34%)	
Não	2.265 (64%)	85 (40%)	2.180 (66%)		2.284 (64%)	115 (49%)	2.169 (66%)	
Dados faltantes	2.945	418	2.527		2.932	390	2.542	
Doença neurológica				0,6				0,02
Sim	460 (14%)	24 (15%)	436 (14%)		455 (14%)	15 (8,0%)	440 (14%)	
Não	2.869 (86%)	135 (85%)	2.734 (86%)		2.886 (86%)	173 (92%)	2.713 (86%)	
Dados faltantes	3.152	473	2.679		3.137	439	2.698	
Pneumopatia				0,2				0,4
Sim	560 (17%)	32 (21%)	528 (17%)		563 (17%)	37 (19%)	526 (17%)	
Não	2.791 (83%)	123 (79%)	2.668 (83%)		2.810 (83%)	158 (81%)	2.652 (83%)	
Dados faltantes	3.130	477	2.653		3.105	432	2.673	
Doença renal				<0,001				0,4
Sim	286 (8,7%)	25 (16%)	261 (8,3%)		282 (8,5%)	19 (10%)	263 (8,4%)	
Não	3.008 (91%)	132 (84%)	2.876 (92%)		3.029 (91%)	169 (90%)	2.860 (92%)	
Dados faltantes	3.187	475	2.712		3.167	439	2.728	
Obesidade				<0,001				<0,001
Sim	627 (18%)	65 (36%)	562 (18%)		636 (19%)	78 (35%)	558 (17%)	
Não	2.766 (82%)	118 (64%)	2.648 (82%)		2.780 (81%)	148 (65%)	2.632 (83%)	
Dados faltantes	3.088	449	2.639		3.062	401	2.661	

A busca por fatores associados a manifestação de anosmia e ageusia indicou resultados similares. Entre as 10 condições de saúde avaliadas, três não se mostraram associadas (puerpério, doença hepática e pneumopatia), enquanto cinco condições foram significativas para o aumento da chance de apresentar os dois sintomas (cardiopatias, doenças hematológicas, asma, diabetes, obesidade). A presença de doença neurológica foi somente associada à presença de anosmia, enquanto a doença renal foi somente associada à ageusia.

5.2 Aspectos moleculares associados à anosmia e ageusia em pacientes com COVID-19

Neste estudo, avaliamos 102 pacientes hospitalizados no Hospital Eduardo de Menezes com diagnóstico positivo para COVID-19, entre abril e setembro de 2020, dos quais 17,60% apresentavam anosmia e 9,80% apresentavam ageusia. Dentre os 102 pacientes hospitalizados, apenas um não necessitou de suporte respiratório. Eram 54 mulheres e 48 homens, e o tempo médio de internação foi de $10,2 \pm 6,5$ dias. A taxa de mortalidade foi de 13,7% e a média de idade desses pacientes foi de $55,11 \pm 4,6$ anos. Cerca de 25% dos pacientes eram diabéticos, 55,9% hipertensos, 13,7% asmáticos e 20,6% tabagistas (Tabela 7).

Tabela 7: Características demográficas e clínicas da amostra do estudo (n=102). Idade, sexo, dias de internação, óbito e principais sintomas são reportados na tabela; dp, significa o desvio padrão; N, o número; Os dados clínicos e demográficos são de uma amostra de pacientes positivos para COVID-19 internados no hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, MG.

Características	Valor
Idade, média (dp)	55,1 (14,6)
Dias Hospitalização, média (dp)	10,2 (6,5)
Sexo Feminino, N (%)	54 (52,9%)
Óbito, N (%)	14 (13,7%)
Anosmia, N (%)	18 (17,6%)
Ageusia, N (%)	10 (9,8%)
Suporte Respiratório, N (%)	101 (99%)
Diabetes, N (%)	26 (25,5%)
Obesidade, N (%)	28 (27,7%)
Fumantes, N (%)	21 (20,6 %)
Hipertensão, N (%)	57 (55,9%)
Asma, N (%)	14 (13,7%)

A análise do equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE) foi realizada separadamente para os grupos caso e controle para a frequência do polimorfismo *Alu287bp*. Anosmia e Ageusia foram testados. Ambos os casos estavam em HWE para o desfecho anosmia e ageusia ($p=0,624$ e $p=0,219$, respectivamente). No entanto, os controles para anosmia e ageusia estavam fora do HWE ($p=0,021$ e $p=0,028$, respectivamente). Dois indivíduos não puderam ter seus genótipos avaliados (Tabela 8).

Tabela 8: Valores absolutos genotípicos e alélicos para o polimorfismo rs4646994. Esses valores se referem para os grupos caso (Sim) e controle (Não) em dois estudos: Chance de anosmia e ageusia. Equilíbrio de Hardy Weinberg realizado para caso e controle separadamente.

Amostra	n	Genótipo					valor p
		DD	DI	II	D	I	
Anosmia caso	18	5	11	2	21	15	0,624
Anosmia controle	82	35	29	18	99	65	0,021
Ageusia caso	10	3	7	0	13	7	0,219
Ageusia controle	90	37	33	20	107	73	0,028

Nenhuma diferença foi observada quando as variáveis idade e sexo foram testadas no modelo logístico para anosmia. Da mesma forma, não houve diferenças na expressão do gene *ACE1* na anosmia. Não foi observada associação entre a manifestação de anosmia e os níveis de expressão de *ACE2* e *TMPRSS2* ($p=0,063$ e $p=0,068$, respectivamente) (Tabela 9). Nenhuma associação foi observada para o polimorfismo *Alu287bp*, testando os modelos de codominância, dominância do alelo D e dominância do alelo I.

Tabela 9: Modelo de regressão logística para os desfechos de anosmia e ageusia. Explorando as variáveis idade e sexo para o polimorfismo rs4646994 e os níveis de expressão dos genes *ACE1*, *ACE2* e *TMPRSS2* para a presença (sim/caso) ou ausência (não/controle) de anosmia ou ageusia. A variável "DD+DI" corresponde à dominância do alelo D e a variável "DI+II" corresponde à dominância do alelo I. A sigla sd, corresponde ao desvio padrão; OR, razão de probabilidade; IC, intervalo de confiança; Δ CT taxa limiar de ciclo.

Resultado	Variável	Caso		Controle		valor p	OR IC (95%)
		N	média (dp) ou %	N	média (dp) ou %		
Anosmia	Idade	18	55,44 (10,33)	84	54,04 (15,43)	0,916	-
	<i>ACE1</i> Δ CT	7	11,17 (5,25)	75	10,77 (3,85)	0,835	-
	<i>ACE2</i> Δ CT	9	15,09 (5,82)	79	13,59 (4,75)	0,063	-
	<i>TMPRSS2</i> Δ CT	9	13,11 (4,99)	79	8,17 (4,59)	0,068	-
	Sexo (Masculino)	7	0,39	41	0,49	0,446	-
	rs4646994 Codominância DD	5	0,27	35	0,43	-	-
	rs4646994 Codominância DI	11	0,61	29	0,35	0,101	-
	rs4646994 Codominância II	2	0,12	18	0,22	0,777	-
	rs4646994 dominância do alelo I (DI + II)	13	0,73	47	0,57	0,248	-
rs4646994 dominância do alelo D (DD + DI)	16	0,88	64	0,78	0,308	-	
Ageusia	Idade	10	54,80 (9,41)	92	55,15 (15,11)	0,942	-
	<i>ACE1</i> Δ CT	7	11,14 (6,09)	75	10,81 (3,83)	0,788	-
	<i>ACE2</i> Δ CT	9	17,16 (4,41)	79	13,37 (4,93)	0,012	1,35 (1,098-1,775)
	<i>TMPRSS2</i> Δ CT	9	13,63 (5,63)	79	8,58 (4,67)	0,074	-
	Sexo (Masculino)	4	0,4	44	0,48	0,639	-
	rs4646994 Codominância DD	3	0,3	37	0,41	-	-
	rs4646994 Codominância DI	7	0,7	33	0,37	0,188	-
	rs4646994 Codominância II	0	0	20	0,22	0,994	-
	rs4646994 dominância do alelo I (DI + II)	7	0,7	53	0,59	0,5	-
rs4646994 dominância do alelo D (DD + DI)	10	1	70	0,78	0,991	-	

Idade e sexo também não foram significativos quando testados no modelo logístico para ageusia. Não foram observadas diferenças para a carga viral entre os pacientes com anosmia e ageusia e os respectivos controles ($p=0,395$ e $p=0,931$, respectivamente).

Não houve diferença na expressão do gene *ACE1* na ageusia. Observou-se associação entre diminuição da expressão da *ACE2* e ageusia (OR:1,35; IC95%: 1,09-1,77). Nenhuma associação para manifestação de ageusia foi detectada com baixos níveis de expressão do gene *TMPRSS2* ($p=0,074$) (Tabela 4). Nenhuma associação foi observada para o polimorfismo *Alu287bp*, testando os modelos de codominância, dominância do alelo D e dominância do alelo I (Tabela 4).

6. DISCUSSÃO

O impacto da pandemia de COVID-19 é evidente não somente no Brasil, mas também no mundo, tornando-se uma emergência em saúde pública. O subsequente aumento da diversidade viral e surgimento de novas variantes promoveu a necessidade de mudanças nas formas de métodos diagnósticos, tratamentos e vacinas com o objetivo de realizar o monitoramento preciso, a vigilância e o controle da doença. Objetivamos nesta dissertação identificar a frequência das características clínicas ao longo da pandemia e os níveis de expressão de alguns genes envolvidos na interação do vírus com a célula hospedeira e os desfechos de anosmia e ageusia.

Ao analisar o banco de dados do SIVEP, no município de Betim/MG, podemos observar quatro ondas epidêmicas diferentes. No período entre janeiro de 2020 a maio de 2021, foram registradas mudanças na frequência das linhagens dominantes. Inicialmente, as linhagens B.1.1.33 e B.1.1.28, consideradas não VOCs, impulsionaram a epidemia e foram mais prevalentes até meados de outubro de 2020, ocasionando a primeira onda (CANDIDO, S. *et al.*, 2020; XAVIER, J. *et al.*, 2020; SILVA, A. *et al.*, 2022). Após esse período, com a introdução da variante Gama (P.1), em janeiro de 2021 (FARIA, N. *et al.*, 2021), houve um aumento do número de casos, apesar das medidas de prevenção e distanciamento social para evitar a transmissão que foi empregada na cidade de Betim.

No Brasil, a variante Gama foi a responsável pelo aumento das infecções no final de 2020 e de hospitalizações em Manaus/AM, sendo demonstrado através de modelagem computacional que ela era 1,4 a 2,2 vezes mais transmissível do que a variante do tipo selvagem (FARIA, N. *et al.*, 2021; RESENDE, P. *et al.*, 2021). Os sintomas são muito semelhantes aos da variante Beta. A Gama atingiu um número maior de indivíduos jovens entre 20 e 39 anos, apresentando uma doença avançada e elevando a taxa de mortalidade (cerca de 2,7 vezes maior na segunda onda) (FREITAS, A. *et al.*; 2021; MISTRY, P. *et al.*, 2022). Apresenta 12 mutações na proteína S, compartilhando três mutações semelhantes a da variante Beta localizadas no RBD (TEGALLY, H. *et al.*, 2021).

Através do SIVEP-Gripe observamos que durante a primeira e segunda ondas o aumento do número de casos acompanhou o aumento do número de óbitos. Porém, essa relação divergiu entre a terceira e quarta onda. A variante Gama foi substituída pela Delta, em meados de junho de 2021 em todos os estados brasileiros, sendo mais transmissível que a

variante Gama e pode estar relacionado ao aumento da carga viral no trato respiratório superior, observado na maioria das capitais brasileiras (ELLIOT, P. *et al.*, 2021; ALCANTRA, L. *et al.*, 2022; SILVA, J. *et al.*, 2022). Durante esse período, nota-se uma redução do número de casos e óbitos no município de Betim, o que também pode ser observado em um estudo de vigilância genômica no estado de Minas Gerais, demonstrando que apesar da alta transmissibilidade a Delta não levou a um número substancial de novos casos e óbitos no estado. Além da introdução da VOC Delta no Brasil, esse período coincidiu com o avanço dos programas de vacinação, com mais de 82% da população brasileira apresentando o ciclo vacinal de SARS-CoV-2 completo (FONSECA, P. *et al.*, 2022; QUEIROZ, D. *et al.*, 2022).

A vacinação profilática de toda a população (KRAMMER, F., 2020) é, indubitavelmente, a estratégia mais promissora para superar a pandemia de COVID-19. O conhecimento substancial acumulado anteriormente sobre a estrutura e função dos coronavírus, na tentativa do desenvolvimento de vacinas contra o SARS-CoV e o MERS-CoV foram importantes, agilizando o desenvolvimento de vacinas contra a doença (DIAMOND, PIERSON, 2020). As vacinas de caráter emergencial administradas foram classificadas em quatro principais categorias e utilizam diferentes plataformas de tecnologia: (1) vacinas de vírus inativado ou atenuado, (2) vacinas à base de proteínas, (3) vacinas com vetores virais que expressam imunógenos, (4) vacinas de ácido nucleico (KUDLAY; SVISTUNOV, 2022; NAGY; ALHATLANI, 2021).

Os programas de vacinação demonstraram alta eficiência na prevenção à infecção e disseminação do SARS-CoV-2 (; SILVA, J. *et al.*, 2023). Essas circunstâncias contribuíram para o abrandamento das políticas de prevenção, medidas de distanciamento social flexibilizadas e abertura dos comércios, culminando com o período de festas de final de ano, gerando um ambiente favorável para a rápida disseminação da variante Ômicron (BA.1), em dezembro de 2021. A introdução dessa variante ocasionou a terceira onda epidêmica em Betim, como pode ser observado em nosso banco de dados. Um estudo de nosso grupo identificou a chegada da Ômicron na semana epidemiológica 49 em Belo Horizonte, através de uma amostra coletada em 10 de dezembro de 2021 (DE MENEZES, M. *et al.*, 2023; SILVA, J. *et al.*, 2023). Apesar do grande impacto e transmissibilidade ocasionados pela circulação da Ômicron, foi possível observar tanto em nossos dados como em outros estudos de vários países do mundo que a taxa de letalidade não esteve associada ao aumento substancial do número de novos casos (ADAMOSKI, D. *et al.*, 2022; ARAF, Y. *et al.*, 2022; SOBCZAK, M. & PAWLICZAK, R., 2022).

No início de 2022, mais de 70% da população já havia sido vacinada, porém os casos de infecções continuaram a acontecer devido ao surgimento de sublinhagens da variante Ômicron. As sublinhagens consistem em BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4 e BA.5 ocasionando diferentes ondas epidêmicas em alguns países (ALCANTRA, L. *et al.*, 2022; ARAF, Y. *et al.*, 2022; OU, J. *et al.*, 2022). Podemos observar nos dados do SIVEP-Gripe que uma quarta onda iniciou no município de Betim, em torno de junho de 2022, devido às subvariantes BA.2 e BA.4, ocasionando um aumento do número de casos (BRASIL, 2023). Segundo alguns estudos, em brônquios humanos a variante Ômicron apresenta uma infectividade e multiplicação viral mais rápida do que a variante Delta e a cepa selvagem. Análises de dados de neutralização mostraram uma redução de títulos de anticorpos neutralizantes de 20 vezes em não vacinados, indivíduos previamente infectados ou que receberam duas doses de vacina. Entretanto, o número de hospitalizações foi relativamente menor em relação à Delta, o que pode estar associado à vacinação (ABDULLAH, F. *et al.*, 2021; POPOVIC, M., 2022).

Diferentes fatores flutuantes podem afetar a relação entre as variantes de SARS-CoV-2 e os sintomas da doença com o decorrer do tempo. Ao analisar as características clínicas de acordo com as ondas epidêmicas, levando em conta a experiência médica, diretrizes para o tratamento e a disponibilidade de terapias clínicas, isso pode ser importante para eliminar alguns vieses. Ao restringir a análise de um período de tempo limitado, podemos aumentar a homogeneidade no conhecimento médico e na terapêutica disponível entre a população exposta e não exposta (MEURISSE, M. *et al.*, 2022).

No SIVEP-Gripe, observou-se que a distribuição das notificações dos pacientes com dados completos relativos à anosmia e ageusia diferiu da distribuição do conjunto total de pacientes notificados, especialmente durante o ano de 2022. Sugerimos que isso se deve ao fato de inicialmente o SIVEP-Gripe ser utilizado apenas para notificar casos graves de gripe ou resfriado comum e os sintomas de anosmia e ageusia não eram relatados nesses casos. Posteriormente, com a inclusão desses sintomas pela OMS, o nosso banco de dados foi adaptado e as notificações começaram a ser reportadas. Além disso, podemos observar que as notificações desses sintomas no banco apresentaram alterações. Ao longo da pandemia, notou-se uma variação da frequência dos sintomas de anosmia e ageusia e o surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2.

Um estudo realizado no Rio de Janeiro, em pacientes com COVID-19 observou que os sintomas de disfunção olfativa reduziram para 27,5% durante a Gama, 42,1% durante a Delta e 5,8% durante a Ômicron. Comparados ao período de linhagens originais, as chances de disfunção olfativa foram menores para aqueles infectados com Delta e Ômicron (CARDOSO, C. *et al.*, 2022). Esses resultados sugerem que as variantes de SARS-CoV-2 podem ser um fator de risco para a ocorrência de disfunção olfativa juntamente com a susceptibilidade genética do hospedeiro (CARDOSO, C. *et al.*, 2022; LAAMARTI, M. *et al.*, 2020).

Observamos em nossos dados a flutuação da frequência trimestral de notificações de anosmia e ageusia ao longo da pandemia. Durante o segundo semestre de 2021, uma redução de 7% foi percebida entre os dois desfechos, o que corrobora a nossa hipótese de que as variantes podem estar relacionadas com a frequência da chance de se apresentar o sintoma. Algumas razões que poderiam explicar esses fenômenos são que as mutações na proteína S tornam a Ômicron mais hidrofóbica (KUMAR, A. *et al.*, 2022), isso poderia reduzir a solubilidade do vírus no muco, o que diminuiria sua capacidade de atingir o EO (BUTOWT, R. *et al.*, 2022; BUTOWT, R.; BILINSKA, K.; BARTHELD, C., 2023). Outro fator que poderia influenciar nessa variação é que devido à redução da clivagem da furina, a Ômicron prefira uma rota endossomal, via cathepsina, para penetrar nas células hospedeiras, em vez de uma fusão da membrana de superfície com a protease *TMPRSS2* (JACKSON, J. *et al.*, 2022).

A avaliação clínica da doença causada por novas variantes emergentes é essencial para estimar seu impacto na saúde pública, com base na ligação com dados genômicos virais por sequenciamento do genoma viral completo, técnicas de genotipagem e apuração da exposição com base em períodos de tempo (TEGALLY, H. *et al.*, 2022; GARCIA-BELTRAM *et al.*, 2021). Alguns estudos relatam que o risco de COVID-19 grave em pacientes hospitalizados foi reduzido quando infectados com a variante Ômicron, em comparação a pacientes hospitalizados infectados com a variante Delta (MENNI, C. *et al.*, 2021). Como podemos observar também em nossos dados, a frequência trimestral de anosmia e ageusia foram semelhantes, indicando que elas estão correlacionadas e, por isso, a frequência de ageusia também diminuiu durante o segundo semestre de 2021.

Em 2020, a presença das variantes Alfa e Beta registraram sintomas comuns como febre, tosse, dispneia, produção de escarro, mialgia, artralgia, cefaleia, diarreia, rinorréia, dor de garganta, anosmia e ageusia (PRINTZA, A. *et al.*, 2020; MESQUITA, R. *et al.*, 2021). À medida que a COVID-19 se espalhava pelo mundo, casos de re-infecção com a mesma cepa

ou uma cepa diferente da infecção inicial pelo SARS-CoV-2 foram observados. Diante desses casos, foram registrados sintomas altamente heterogêneos (PEDRO, N. *et al.*, 2021; REN, X. *et al.*, 2022). Com a circulação da variante Delta, os sintomas eram semelhantes aos das outras variantes, embora em alguns casos restritos era possível observar deficiência auditiva, infecções no GI e problemas relacionados à coagulação sanguínea (SHIEHZADEGAN, S. *et al.*, 2021; BHATTACHARYA, M. *et al.*, 2022).

Ao comparar a variante Gama com a Beta, notou-se o aumento da transmissibilidade e de quadro clínico mais severo em pacientes jovens com necessidade de suporte ventilatório, culminando no crescente número de hospitalizações e ocupações de leitos de terapia intensiva apresentando altas taxas de mortalidade no Brasil (RANZANI, O. *et al.*; 2021; NAVECA, F. *et al.*, 2021). Um estudo de Menni, *et al.* (2022) avaliou o perfil de manifestações clínicas causadas pelas variantes Delta e Ômicron na COVID-19, incluindo uma lista com 32 sintomas. Dentre esses, revelou que 12 sintomas foram menos prevalentes em pacientes infectados durante a circulação da Ômicron (perda de olfato, olfato alterado, espirros, corrimento nasal, confusão mental, dor ocular, dor de cabeça, febre, queda de cabelo, bolhas nos pés, zumbido no ouvido e tontura ou vertigem).

Ao analisar nossos dados, foi observada co-ocorrência significativa de todos os sintomas notificados no SIVEP-Gripe (dor abdominal, fadiga, febre, tosse, dor de garganta, dispneia, desconforto respiratório, alteração de saturação, diarreia e vômito) com anosmia e ageusia. Ao cruzarmos os dados de anosmia e ageusia, esses desfechos atingiram razão de chance de 245,7 (IC 95% entre 182,0 e 331,7), indicando serem fatores patognomônicos da doença, principalmente entre o período de 2020 a 2021, quando circulavam as variantes Alfa, Beta e Gama e diminuía significativamente com a presença da variante Ômicron.

Idosos e indivíduos com comorbidades estão mais suscetíveis a desenvolver a forma mais grave da COVID-19 (ZHU, J. *et al.*, 2021; WHO, 2021). Os fatores genéticos do hospedeiro também contribuem com a suscetibilidade e a gravidade da COVID-19 (DE ARAUJO, J. *et al.*, 2022). A associação entre *ACE1* e *ACE2* tem sido implicada na patogênese das doenças respiratórias e a função dos polimorfismos nesses genes tem sido associadas a um aumento do risco de doenças pulmonares e cardiovasculares (CHOUDHARY, S. *et al.*, 2020; BRAGA-PAZ, I. *et al.*, 2022; MARTÍNEZ-GOMES, L. *et al.* 2022).

Ao explorarmos em nosso banco de dados condições de saúde pré-existentes com a manifestação de anosmia e ageusia obtivemos dados interessantes. As chances de desenvolver os dois desfechos foram significativas para cinco condições: cardiopatia, doenças hematológicas, asma, diabetes, obesidade. Alguns trabalhos sugerem que a interação entre *ACE1/ACE2* prediz o risco de doenças como hipertensão, doenças cardiovasculares e doenças pulmonares. Isso poderia influenciar os fatores de risco na COVID-19 e desempenhar um papel na susceptibilidade dos desfechos graves da doença (KEIKHA, M. & KARBALAEI, M., 2022). Um estudo que conciliou 13 trabalhos realizados em todo o mundo identificou que pacientes hospitalizados por COVID-19 tinham com mais frequência o grupo sanguíneo “A” do que o “O” (GOLINELLI, D. *et al.*, 2020). Entretanto, alguns dados sugerem que a COVID-19 leve esteja relacionada a sintomas de longa duração como: manifestações neurológicas e psiquiátricas e sequelas persistentes em torno de 30% dos pacientes, com prevalência em idosos (LOGUE, J. *et al.*, 2021; SUDRE, C. *et al.*, 2021).

Outro dado relevante que observamos no SIVEP é que dentre as condições pré-existentes, a presença de doença neurológica esteve relacionada somente à presença de anosmia, enquanto a doença renal estava relacionada apenas à presença de ageusia. A ocorrência de manifestações neurológicas não é surpreendente como já havíamos hipotetizado em nosso estudo (Anexo 2), já que dado o envolvimento do SNC e SNP, poderia existir uma ponte que liga sintomas iniciais, como anosmia e ageusia e modulação da expressão de fatores moleculares à COVID Longa. A infecção por SARS-CoV-2 tem variado de sintomas inespecíficos (cefaléia, mialgia, fadiga e tontura) a doença cerebrovascular, encefalite, distúrbios do movimento, distúrbios cranianos e periféricos e neuropatias (MORO, E. *et al.*, 2020; ROMOLI, M. *et al.*; 2020). Considerando revisões sistemáticas e meta-análise de dados de pacientes individuais, 7,8% das pessoas hospitalizadas com COVID-19 apresentavam doença neurológica pré-existente (SINGH, B. *et al.*, 2021). Estudos post mortem demonstraram a presença do vírus em neurônios corticais, fornecendo evidências para a capacidade neuroinvasiva de SARS-CoV-2 (SONG, E. *et al.*, 2021).

Sobre o dado que associa a doença renal à ageusia, alguns relatos na literatura indicam que pacientes com Doença Renal Crônica apresentam um menor número de papilas gustativas, o que diminuiria o número de receptores gustativos e, conseqüentemente, diminuiria sua capacidade de perceber os sabores (ASTBÄCK, J. *et al.*, 1999; ARMSTRONG, J. *et al.*, 2010; CORREA, M. *et al.*, 2015). Outra explicação poderia ser que o zinco é um micronutriente que atua em muitos processos celulares, regulando as respostas

imunes, síntese de proteínas, crescimento e diferenciação celular. Os níveis plasmáticos de zinco vão reduzindo ao longo da progressão dos estágios da Doença Renal Crônica, principalmente em indivíduos dependentes de diálise, levando a uma diminuição do paladar (LIN, C. *et al.*, 2018; FUKASAWA, H. *et al.*, 2023).

Em humanos, o zinco está envolvido no favorecimento das trocas de informações entre as papilas gustativas e as fibras nervosas gustativas. As alterações do paladar na COVID-19 relacionadas à deficiência de zinco, podem levar a uma redução dos níveis de receptores olfativos sem resposta à sinalização imune inata (JOACHIMIAK, M., 2021; SANTOS, H., 2021). Além disso, alguns estudos, como o de Pranata *et al.*, 2020, já discutiram que indivíduos com Doença Renal Crônica apresentam níveis elevados da proteína *ACE2* circulante, o receptor que facilita a entrada do SARS-CoV-2 e pode, subsequentemente, ser subregulado pelo vírus, levando à atividade desregulada da angiotensina II e falência de múltiplos órgãos (LIU, Y. *et al.*; 2020; GURWITZ, D., 2020; VADUGANATHAN, M. *et al.*, 2020; MOEINZADEH, F. *et al.*, 2022).

Este estudo apresentou limitações, vale ressaltar que fatores como o preenchimento incompleto das fichas de notificação dos pacientes, atraso na alimentação dos dados para o sistema por parte das unidades de saúde, dificuldade de acesso aos dados nacionais podem levar ao comprometimento das análises. Outros desfechos como dados de vacinação, raça e escolaridade não puderam ser explorados por falta de informações no SIVEP.

Além de analisarmos a frequência dos desfechos clínicos, buscamos averiguar também a influência dos níveis de expressão gênica de alguns receptores, considerando o mecanismo de penetração do vírus na célula hospedeira com a anosmia e ageusia. Analisamos 102 pacientes hospitalizados na cidade de Belo Horizonte-MG, dos quais 17,60% apresentavam anosmia e 9,80% apresentavam ageusia. Observamos que baixos níveis de expressão do gene *ACE2* se correlacionam com a presença de ageusia, um achado curioso em nosso estudo. Até o momento, não encontramos na literatura nenhum trabalho que apresentasse dados semelhantes sobre a diminuição de *ACE2* e a presença de ageusia e nem estudos que refutaram nosso achado.

Embora nossas amostras sejam de pacientes hospitalizados com quadro clínico grave e os relatos de anosmia e ageusia são mais comuns em pacientes com COVID-19 leve a moderada, *ACE2* é expresso na mucosa da cavidade oral e principalmente na língua (XU, H. *et al.*, 2020; LECHIEN, J. *et al.*, 2020). Um estudo recente, infere que o assim como

MERS-CoV se liga a receptores de ácido siálico, um componente da mucina salivar, o SARS-CoV-2 também se ligaria a estes receptores o que levaria a uma diminuição induzida pelo vírus neste local, acelerando a degradação das papilas gustativas ocasionando um aumento no limiar gustativo (MAZZATENTA, A. *et al.*, 2022).

Em nossas amostras, nenhuma associação foi observada entre a expressão de *ACE1* e *TMPRSS2* para o desfecho da ageusia. Além disso, não foram observadas associações para os três genes e a anosmia. Também não encontramos associação do polimorfismo *Alu287pb* com a presença de anosmia e/ou ageusia. Alguns estudos associaram esse polimorfismo e sua relação com complicações causadas pelo SARS-CoV-2, como insuficiência cardíaca, hipertensão, diabetes, insuficiência renal e pneumonia (KEIKHA, M. & KARBALAEI, M., 2022). Embora altos níveis de expressão de *ACE2* e *TMPRSS2*, estejam associados à gravidade da COVID-19, neste estudo, avaliamos sintomas clínicos específicos da doença. Nosso estudo apresenta limitações, pois, todas as amostras obtidas para as análises eram de abril a setembro de 2020, período anterior ao aparecimento de VOCs do SARS-CoV-2.

Anosmia e ageusia foram observados com mais frequência em pacientes com COVID-19 leve a moderada do que em pacientes com casos graves (LECHIEN, J. *et al.*, 2020; AGHAGOLI, G. *et al.*, 2020). Em modelos animais, o SARS-CoV-2 leva a diminuição da expressão de *ACE2*, levando a um desequilíbrio no controle cerebrovascular de *ACE1/ACE2*, resultando em incompatibilidade de sinal de *ACE1*, vasoconstrição excessiva ou distúrbios de autorregulação cerebral (BRAGA-PAZ, I. *et al.*, 2022). Indivíduos com genótipo DD apresentam níveis sanguíneos de *ACE1* elevados, podendo aumentar o risco de acidente vascular cerebral e nefropatia diabética (KHEIKA, M. & KARBALAEI, M., 2022).

Uma meta-análise publicada por colegas do nosso grupo de pesquisa mostrou que a deleção de 287pb no gene *ACE1* está associada ao prognóstico grave da COVID-19. No entanto, ainda não avaliaram distúrbios de saúde a longo prazo (DE ARAÚJO, J. *et al.*; 2022). Além disso, a alta frequência do genótipo DD esteve associada a uma elevada taxa de mortalidade de COVID-19 na população ocidental, quando comparada com a população asiática (KEIKHA, M. & KARBALAEI, M., 2022). Em nossos dados, não observamos diferenças na carga viral entre pacientes com anosmia e ageusia e os respectivos controles, sugerindo que outros mecanismos ou fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento da síndrome de COVID-19.

Um estudo de associação genômica identificou um *loci* significativo, na região dos genes *UGT2A1* e *UGT2A2*, ambos expressos no EO desempenhando papel na metabolização de odorantes. Estudos em animais demonstram que as enzimas Uridina difosfato-Glucuronosiltransferases (UGT) possuem a capacidade de biotransformar uma vasta quantidade de odores direcionados aos receptores olfativo (SCHWARTZ, M. *et al.*, 2020; NEIERS, F. *et al.*, 2021). Além disso, possuem função essencial na metabolização e desintoxicação envolvidos na eliminação dos odorantes, que entram na cavidade nasal e se ligam aos receptores. Embora ainda não seja claro como esses genes estão envolvidos neste processo, eles poderiam desencadear um papel na fisiologia das células infectadas, comprometendo funcionalmente a perda olfativa e, conseqüentemente, a perda do paladar (SHELTON, J. *et al.*, 2022).

Nosso grupo levantou a hipótese de que, além da entrada viral nas células do SNC, existem vias de sinalização ativadas durante a COVID-19 que interrompem a homeostase cerebral, levando assim a conseqüências neurocognitivas de longo prazo. A COVID Longa está associada a dificuldades de concentração, processamento de informações, memória, funcionamento executivo, ansiedade, depressão, síndrome do pânico, sono, desordem e fadiga. Há descrito na literatura que a COVID Longa pode durar de 6 até 12 meses, embora em alguns indivíduos possa durar indefinidamente (ORRÙ, G. *et al.*, 2021; TITZE-DE-ALMEIDA, R. *et al.*, 2022).

Entre as sequelas neurológicas duradouras, o comprometimento cognitivo persistente destaca-se por uma “névoa cerebral” da COVID-19, caracterizada por prejuízo nas funções de memória, atenção, concentração, velocidade do processamento de informações (MONJE, M. & IWASAKI, A. 2022). A neuroinflamação pode provocar desregulação das células gliais e neuronais e levar a uma disfunção no circuito neuronal afetando negativamente as funções cognitivas e neuropsiquiátricas. Além disso, o possível efeito de mecanismos adicionais de lesão neural, como isquemia, infecção do sistema nervoso ou reações imunes citotóxicas também podem ocasionar distúrbios cognitivos (HEEN, R. *et al.*, 2022; MONJE, M. & IWASAKI, A. 2022).

Uma meta-análise com mais de 10.000 pacientes extraídos de 18 estudos publicados, caracterizou a prevalência de sintomas neurológicos e neuropsiquiátricos (fadiga, disfunção cognitiva, nevoeiro cerebral, problemas de memória, distúrbio de atenção e do sono) em quase um terço dos pacientes por cerca de três meses pós-COVID-19 (PREMRAJ, L. *et al.*,

2022). Em um estudo (DE PAULA, J. *et al.*, 2022) realizado com 195 indivíduos com COVID-19 leve, 26% tinham uma deficiência visuoespacial, uma manifestação inicial típica da doença de Alzheimer. Houve também aumento da expressão de 11 biomarcadores plasmáticos, incluindo quimiocinas e fatores de crescimento. Esses biomarcadores mostraram uma forte correlação positiva com o grau de comprometimento cognitivo, persistindo por até um ano após o diagnóstico. Foram incluídas pessoas que tiveram COVID-19 leve e não foram hospitalizadas nos dois a dez meses anteriores à pesquisa e sem comorbidades. A maioria dos voluntários são profissionais de saúde que atuam na região hospitalar e conheceram o estudo por meio de chamadas públicas feitas pelas instituições. A média de idade da coorte foi de 38 anos (DE PAULA, J. *et al.*, 2022).

Um grupo da Inglaterra publicou um estudo robusto envolvendo 785 participantes (com idades entre 51 e 81 anos) com COVID (DOUAUD, G. *et al.*, 2022), incluindo pacientes com apenas sintomas leves de COVID-19. Imagens límbicas cerebrais foram obtidas duas vezes e comparadas a 384 controles não infectados. Eles identificaram um padrão espacial consistente de anomalias longitudinais em regiões límbicas cerebrais formando uma rede principalmente olfativa, incluindo uma maior redução no tamanho global do cérebro. Os autores levantaram a hipótese de que os resultados poderiam representar as características da disseminação degenerativa da doença por vias olfatórias, eventos neuroinflamatórios ou perda de entrada sensorial devido à anosmia e sugeriram períodos de acompanhamento mais longos para avaliar esses efeitos.

Incidências semelhantes de fadiga e medidas de qualidade de vida diminuídas também foram relatadas em epidemias anteriores provocadas por coronavírus, como o SARS-CoV e MERS-CoV (LAM, M. *et al.*, 2009; ROGERS, J. *et al.*, 2020; CEBAN, F. *et al.*, 2022). Uma melhor compreensão da anosmia e da ageusia poderia melhorar nosso conhecimento a respeito de distúrbios cognitivos duradouros, incluindo a COVID Longa. Estudos futuros deverão investigar a expressão relativa de genes chave de marcadores olfativos e de células sustentaculares em amostras coletadas de pacientes pós-COVID-19 (seis meses a um ano após contrair COVID-19) com ou sem anosmia e/ou ageusia, usando testes neuropsicológicos (DE PAULA, J. *et al.*, 2022).

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra que alterações no olfato e paladar podem implicar na saúde e qualidade de vida das pessoas. Embora a patogênese exata de anosmia e ageusia ocasionada pelo SARS-CoV-2 ainda permaneça incerta, há provavelmente um envolvimento de células localizadas no Epitélio Olfatório e na língua. Desde o início da pandemia, circulam diferentes VOCs (Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron) sendo demonstrado que elas são capazes de alterar o cenário pandêmico e apresentam um risco para a saúde pública. Ações de vigilância genômica e a busca por biomarcadores contribuem para mitigar os impactos, compreender o processo de dispersão viral, os padrões evolutivos, a diversidade genética do vírus, auxiliar no rastreamento de surtos e monitorando o surgimento de novas mutações e VOCs. Além dos métodos diretos de vigilância, como genotipagem e sequenciamento do genoma completo, o uso de dados do ‘mundo real’ pode ser utilizado para identificar potenciais variantes e o efeito delas sobre aspectos clínicos e epidemiológicos. Observamos que a frequência de anosmia e ageusia flutuou ao longo da pandemia e percebemos uma co-ocorrência de todos os sintomas notificados com os desfechos. Ao explorarmos condições pré-existentes dos pacientes deste estudo, nossos achados foram interessantes, demonstrando que de dez condições avaliadas, cinco delas têm associação com os dois sintomas, sendo que entre essas, a doença neurológica foi apenas associada à anosmia e doença renal à ageusia. Geralmente, esses dados observacionais são cheios de interações e vieses, e nossos resultados validam o quanto o SIVEP-gripe é um banco informativo. No entanto, utilizar dados observacionais é desafiador, por apresentar uma informação ainda limitada. As evidências do "mundo real" dependem da qualidade de seus dados, suposições sobre possíveis fatores de confusão e uso de procedimentos estatísticos. Além disso, mais estudos de expressão gênica são importantes para elucidar os desfechos de anosmia e ageusia desencadeados pela infecção de SARS-CoV-2. Ao observarmos uma correlação negativa entre os níveis de expressão de *ACE2* e ageusia, demonstra que mais estudos e outros genes devem ser explorados para compreender melhor esse mecanismo. Parte dos resultados deste trabalho foram compilados em um artigo publicado em setembro de 2022 na Revista *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Anexo 2).

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, F. *et al.* Decreased severity of disease during the first global omicron variant covid-19 outbreak in a large hospital in tshwane, south africa. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, mar. 2022. v. 116, p. 38.
- ABURTO, J. M. *et al.* Quantifying impacts of the COVID-19 pandemic through life-expectancy losses: a population-level study of 29 countries. **International journal of epidemiology**, 18 fev. 2022. v. 51, n. 1, p. 63–74.
- ADAMOSKI, D. *et al.* SARS-CoV-2 Delta and Omicron Variants Surge in Curitiba, Southern Brazil, and Its Impact on Overall COVID-19 Lethality. **Viruses**, 14 abr. 2022. v. 14, n. 4.
- AGHAGOLI, G. *et al.* Neurological Involvement in COVID-19 and Potential Mechanisms: A Review. **Neurocritical care**, 2021. v. 34, n. 3, p. 1062.
- AHN, J. H. *et al.* Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. **The Journal of clinical investigation**, 1 jul. 2021. v. 131, n. 13.
- AKERLUND, A.; BENDE, M.; MURPHY, C. Olfactory threshold and nasal mucosal changes in experimentally induced common cold. **Acta oto-laryngologica**, jan. 1995. v. 115, n. 1, p. 88–92.
- ALCANTARA, L. C. J. *et al.* SARS-CoV-2 epidemic in Brazil: how the displacement of variants has driven distinct epidemic waves. **Virus research**, 7 jul. 2022. v. 315, p. 198785.
- ALMEIDA, J. D.; TYRRELL, D. A. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. **The Journal of general virology**, abr. 1967. v. 1, n. 2, p. 175–178.
- ALNEFEESI, Y. *et al.* Impact of SARS-CoV-2 Infection on Cognitive Function: A Systematic Review. **Frontiers in psychiatry / Frontiers Research Foundation**, 2020. v. 11.
- ALVES, H. J. *et al.* Monitoring the Establishment of VOC Gamma in Minas Gerais, Brazil: A Retrospective Epidemiological and Genomic Surveillance Study. **Viruses**, dez. 2022. v. 14, n. 12.
- ARAF, Y. *et al.* Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. **Journal of medical virology**, 1 maio. 2022. v. 94, n. 5, p. 1825–1832.
- ARAÚJO, J. L. F. DE *et al.* Systematic review of host genetic association with Covid-19 prognosis and susceptibility: What have we learned in 2020? **Reviews in medical virology**, mar. 2022. v. 32, n. 2.

ARAVIN KUMAR, A. *et al.* Geographical Variations in Host Predisposition to COVID-19 Related Anosmia, Ageusia, and Neurological Syndromes. **Frontiers in Medicine**, 2021. v. 8.

ARMSTRONG, J. E. *et al.* Smell and taste function in children with chronic kidney disease. **Pediatric nephrology**, ago. 2010. v. 25, n. 8, p. 1497–1504.

ASTBÄCK, J. *et al.* Taste buds and neuronal markers in patients with chronic renal failure. **Peritoneal dialysis international: journal of the International Society for Peritoneal Dialysis**, 1999. v. 19 Suppl 2, p. S315–23.

ATKIN, P. A. *et al.* The Epidemiology of Serious Adverse Drug Reactions Among the Elderly. **Drugs & aging**, 11 set. 2012. v. 14, n. 2, p. 141–152.

ATKIN, P. A.; SHENFIELD, G. M. Medication-related adverse reactions and the elderly: a literature review. **Adverse drug reactions and toxicological reviews**, out. 1995. v. 14, n. 3, p. 175–191.

BACHMANOV, A. *et al.* Genetics of Taste Receptors. 2014. **Curr. Pharma Des**, 2014. 20(16):2669-83

BAIG, A. *et al.* Evidence of the COVID_19 Virus Targetin the CNS: Tissue Distribution, Host-virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. **ACS Chemical Neuroscience**. mar. 2020.

BAKER, H. A.; SAFAVYNIA, S. A.; EVERED, L. A. The “third wave”: impending cognitive and functional decline in COVID-19 survivors. **BJA: British Journal of Anaesthesia**, jan. 2021. v. 126, n. 1, p. 44.

BARBER, T. M. *et al.* Mechanisms of Central Hypogonadism. **International journal of molecular sciences**, 30 jul. 2021. v. 22, n. 15, p. 8217.

BCHETNIA, M. *et al.* The outbreak of the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A review of the current global status. **Journal of infection and public health**, nov. 2020. v. 13, n. 11, p. 1601.

BHATTACHARYA, M. *et al.* Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: current understanding of infection, transmission, immune escape, and mutational landscape. **Folia microbiologica**, 12 ago. 2022. v. 68, n. 1, p. 17–28

BHOYAR, R. *et al.* An optimized, amplicon-based approach for sequencing of SARS-CoV-2 from patient samples using COVIDSeq assay on Illumina MiSeq sequencing platforms. **STAR Protocols**, 17 set. 2021. v. 2, n. 3, p. 100755.

BILINSKA, K. *et al.* Expression of the SARS-CoV-2 Entry Proteins, ACE2 and TMPRSS2, in Cells of the Olfactory Epithelium: Identification of Cell Types and Trends with Age. **ACS chemical neuroscience**, jun, 2020. 3;11(11), p.1555-1562.

BLAAS, D. Viral entry pathways: the example of common cold viruses. **Wiener medizinische Wochenschrift**, 2016. v. 166, p. 211 8 maio 2023.

BOESVELDT, S. *et al.* Anosmia—A Clinical Review. **Chemical senses**, 22 maio. 2017. v. 42, n. 7, p. 513–523.

BRAGA-PAZ, I. *et al.* Negative correlation between ACE2 gene expression levels and loss of taste in a cohort of COVID-19 hospitalized patients: New clues to long-term cognitive disorders. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2022. v. 12.

BRANN, D. H. *et al.* Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. **Science advances**, 31 jul. 2020. v. 6, n. 31.

Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em saúde e ambiente. Departamento de imunização e doenças imunopreveníveis. Guia de vigilância genômica do sars-CoV-2: uma abordagem epidemiológica e laboratorial [recurso eletrônico] Brasília, 2023. 47 p. Disponível em: <https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_genomica_sarscov2.pdf> Acesso em: 1 de maio de 2023.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica : emergência de saúde pública de importância nacional pela doença pelo coronavírus 2019 – covid-19 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília, 2022. p. 131. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes-tecnicas/guias-e-planos/guia-de-vigilancia-epidemiologica-covid-19/@@download/file>>. Acesso em: 12 de jan. de 2023.

BUSHDID, C. *et al.* Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. **Science**. mar. 2014. v. 343, n. 6177, p. 1370–1372.

BUTOWT, R.; BILINSKA, K.; BARTHELD, C. S. VON. Olfactory dysfunction in COVID-19: new insights into the underlying mechanisms. **Trends in neurosciences**, 1 jan. 2023. v. 46, n. 1, p. 75–90.

BUTOWT, R.; BILÍNSKA, K.; BARTHELD, C. Why Does the Omicron Variant Largely Spare Olfactory Function? Implications for the Pathogenesis of Anosmia in Coronavirus Disease 2019. **The Journal of infectious diseases**. out. 2022. v. 226, n. 8, p. 1304.

CANDIDO, D. D. S. *et al.* Routes for COVID-19 importation in Brazil. **Journal of travel medicine**, mar. 2020. v. 27, n. 3, p. 42.

CANDIDO, D. S. *et al.* Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. **Science**, 4 set. 2020. <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abd2161>>

CARDOSO, C. C. *et al.* Olfactory Dysfunction in Patients With Mild COVID-19 During Gamma, Delta, and Omicron Waves in Rio de Janeiro, Brazil. **JAMA: the journal of the American Medical Association**. ago. 2022. v. 328, n. 6, p. 582.

CAROD-ARTAL, F. J. Post-COVID-19 syndrome: epidemiology, diagnostic criteria and pathogenic mechanisms involved. **Revista de neurologia**. jun. 2021. v. 72, n. 11, p. 384–396.

CASTRO, M. C. *et al.* Reduction in life expectancy in Brazil after COVID-19. **Nature medicine**. set. 2021. v. 27, n. 9, p. 1629–1635.

CAVALLIERI, F. *et al.* Neurologic complications of coronavirus and other respiratory viral infections. **Handbook of clinical neurology**, 2022. v. 189, p. 331 8 maio 2023.

CAZZOLLA, A. P. *et al.* Taste and Smell Disorders in COVID-19 Patients: Role of Interleukin-6. **ACS chemical neuroscience**, 2020. v.11. I.17. p. 2774-2781.

CDC. Symptoms of COVID-19. **Centers for Disease Control and Prevention**. dez. 2022. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>>. Acesso em: 12 de março de 2023.

CEBAN, F. *et al.* Fatigue and cognitive impairment in Post-COVID-19 Syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Brain, behavior, and immunity**, mar. 2022. v. 101, p. 93.

CHEN, L. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients. **Cell proliferation**, dez. 2020. v. 53, n. 12.

CHEN, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**, 2020. v. 395, n. 10223, p. 507.

CHOI, J. Y.; SMITH, D. M. SARS-CoV-2 Variants of Concern. **Yonsei medical journal**, nov. 2021. v. 62, n. 11, p. 961.

CHOUHDARY, S. *et al.* Role of Genetic Variants and Gene Expression in the Susceptibility and Severity of COVID-19. **Annals of laboratory medicine**, 3 mar. 2021. v. 41, n. 2, p. 129.

CIOFALO, A. *et al.* Long-Term Subjective and Objective Assessment of Smell and Taste in COVID-19. **Cells**, 24 fev. 2022. v. 11, n. 5.

CIOTTI, M. *et al.* The COVID-19 pandemic. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, set. 2020. v. 57, n. 6, p. 365–388.

CLARO, I. M. *et al.* Local Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7, Brazil, December 2020. **Emerging infectious diseases**, mar. 2021. v. 27, n. 3, p. 970.

- COLVIN, J. L.; PULLICIN, A. J.; LIM, J. Regional Differences in Taste Responsiveness: Effect of Stimulus and Tasting Mode. **Chemical senses**, 27 ago. 2018. v. 43, n. 8, p. 645–653.
- COOPER, K. W. *et al.* COVID-19 and the Chemical Senses: Supporting Players Take Center Stage. **Neuron**, 7 jul. 2020. v. 107, n. 2, p. 219.
- CORREA, M. *et al.* Reduced taste function and taste papillae density in children with chronic kidney disease. **Pediatric nephrology**. jun. 2015. v. 30, n. 11, p. 2003–2010.
- DEEMS, D. A. *et al.* Smell and taste disorders, a study of 750 patients from the University of Pennsylvania Smell and Taste Center. **Archives of otolaryngology--head & neck surgery**, maio. 1991. v. 117, n. 5, p. 519–528.
- DEL VALLE, D. M. *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature medicine**, out. 2020. v. 26, n. 10, p. 1636.
- DESHPANDE, T. S. *et al.* Radiation-Related Alterations of Taste Function in Patients With Head and Neck Cancer: a Systematic Review. **Current treatment options in oncology**, 9 nov. 2018. v. 19, n. 12, p. 1–16.
- DIAMOND, M; PIERSON, T. The Challenges of Vaccine Development against a New Virus during a Pandemic. **Cell Host & Microbe**, may. 2020. v. 27, n. 5, p. 699-703.
- DOCHERTY, A. B. *et al.* Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. **BMJ** , 2020. v. 369.
- DOTY, R. L. Olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases: is there a common pathological substrate? **Lancet neurology**, jun. 2017. v. 16, n. 6, p. 478–488.
- DOUAUD, G. *et al.* SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. **Nature**, 2022. v. 604, n. 7907, p. 697.
- DROSTEN, C. *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **The New England journal of medicine**, maio. 2003. v. 348, n. 20, p. 1967–1976.
- DU, R. H. *et al.* Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. **The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, 7 maio. 2020. v. 55, n. 5.
- ECDC. Guidance for representative and targeted genomic SARS-CoV-2 monitoring. **European Centre for Disease Prevention and Control**, Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/guidance-representative-and-targeted-genomic-sars-cov-2-monitoring>> Acesso em: 15 de março de 2023.

ELLIOTT, P. *et al.* Exponential growth, high prevalence of SARS-CoV-2, and vaccine effectiveness associated with the Delta variant. **Science**, 17 dez. 2021. v. 374, n. 6574, p. eabl9551.

ESPER, F. *et al.* Evidence of a Novel Human Coronavirus That Is Associated with Respiratory Tract Disease in Infants and Young Children. **The Journal of infectious diseases**. fev. 2005. v. 191, n. 4, p. 492.

FARIA, N. R. *et al.* Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. **Science**, 5 maio. 2021. v. 372, n. 6544, p. 815.

FARID, H. *et al.* Oral manifestations of Covid-19-A literature review. **Reviews in medical virology**, jan. 2022. v. 32, n. 1.

FEENEY, E. L.; HAYES, J. E. Regional Differences in Suprathreshold Intensity for Bitter and Umami Stimuli. **Chemosensory perception**, 13 maio. 2014. v. 7, n. 3, p. 147–157.

FINGER, T. E.; KINNAMON, S. C. Taste isn't just for taste buds anymore. **F1000 biology reports**, 2011. v. 3.

FLAXMAN, S. *et al.* Estimating the effects of non-pharmaceutical interventions on COVID-19 in Europe. **Nature**, 8 jun. 2020. v. 584, n. 7820, p. 257–261.

FONSECA, P. L. C. *et al.* Tracking the turnover of SARS-CoV-2 VOCs Gamma to Delta in a Brazilian state (Minas Gerais) with a high-vaccination status. **Virus Evolution**, 27 jul. 2022. v. 8, n. 2, p. 064.

FORNAZIERI, M. A. *et al.* Main causes and diagnostic evaluation in patients with primary complaint of olfactory disturbances. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, May-Jun. 2014. v. 80, n. 3, p. 202–207.

FRASNELLI, J. *et al.* Brain structure is changed in congenital anosmia. **NeuroImage**, dez. 2013. v. 83, p. 1074–1080.

FREITAS, A. R. R. *et al.* The emergence of novel SARS-CoV-2 variant P.1 in Amazonas (Brazil) was temporally associated with a change in the age and sex profile of COVID-19 mortality: A population based ecological study. **Lancet Regional Health - Americas**, set. 2021. v. 1.

FRICKE-GALINDO, I.; FALFÁN-VALENCIA, R. Genetics Insight for COVID-19 Susceptibility and Severity: A Review. **Frontiers in immunology**, 1 abr. 2021. v. 12.

FUKASAWA, H. *et al.* Clinical Significance of Trace Element Zinc in Patients with Chronic Kidney Disease. **Journal of clinical medicine research**, fev. 2023. v. 12, n. 4.

GADANEC, L. K. *et al.* Can SARS-CoV-2 Virus Use Multiple Receptors to Enter Host Cells? **International journal of molecular sciences**, fev. 2021. v. 22, n. 3.

GAO, Z. *et al.* A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, fev. 2021. v. 54, n. 1, p. 12.

GARCIA-BELTRAN, W. F. *et al.* COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. **Cell**, 1 jan. 2021. v. 184, n. 2, p. 476.

GARDY, J. L.; LOMAN, N. J. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. **Nature reviews. Genetics**, 2018. v. 19, n. 1, p. 9.

GEBHARD, C. *et al.* Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. **Biology of sex differences**, 25 maio. 2020. v. 11, n. 1, p. 1–13.

GEMMATI, D. *et al.* COVID-19 and Individual Genetic Susceptibility/Receptivity: Role of ACE1/ACE2 Genes, Immunity, Inflammation and Coagulation. Might the Double X-Chromosome in Females Be Protective against SARS-CoV-2 Compared to the Single X-Chromosome in Males?. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 21, n. 10

GENTER, M. & DOTY, R. Toxic exposures and the senses of taste and smell. **Handbook of Clinical Neurology**. Elsevier, 2019, V. 164, p. 389–408.

GENTER, M.; DOTY, R. Toxic exposures and the senses of taste and smell. **Handbook of Clinical Neurology**. 2019, p.389-408.

GIACOMELLI, A. *et al.* Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Study. **Clinical Infectious Diseases**. 2020.

GIOVANETTI, M. *et al.* Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. **Nature Microbiology**, 2022. v. 7, n. 9, p. 1490.

GLEZER, I. *et al.* Viral infection and smell loss: The case of COVID-19. **Journal of neurochemistry**, maio. 2021. v. 157, n. 4, p. 930.

GOLINELLI, D. *et al.* The association between ABO blood group and SARS-CoV-2 infection: A meta-analysis. **PloS one**, 18 set. 2020. v. 15, n. 9.

GOMES, C. P. *et al.* Cathepsin L in COVID-19: From Pharmacological Evidences to Genetics. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2020. v. 10.

GÓMEZ, J. *et al.* Angiotensin-converting enzymes (ACE, ACE2) gene variants and COVID-19 outcome. **Gene**, 12 dez. 2020. v. 762, p. 145102.

GORDON, D. E. *et al.* A SARS-CoV-2 Protein Interaction Map Reveals Targets for Drug-Repurposing. **Nature**, jul. 2020. v. 583, n. 7816, p. 459.

GURWITZ, D. Angiotensin receptor blockers as tentative SARS-CoV-2 therapeutics. **Drug development research**, ago. 2020. v. 81, n. 5, p. 537.

HADFIELD, J. *et al.* Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. **Bioinformatics**, dez. 2018. v. 34, n. 23, p. 4121.

HAMRE, D.; PROCKNOW, J. J. A new virus isolated from the human respiratory tract. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, jan. 1966. v. 121, n. 1, p. 190–193.

HAN, D. *et al.* COVID-19: Insight into the asymptomatic SARS-COV-2 infection and transmission. **International journal of biological sciences**, 2020. v. 16, n. 15, p. 2803.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in immunology**, dez. 2020. v. 41, n. 12, p. 1100.

HAYDEN, S.; TEELING, E. C. The molecular biology of vertebrate olfaction. **Anatomical record**, nov. 2014. v. 297, n. 11, p. 2216–2226.

HENN, R. *et al.* Glial-neuron crosstalk in health and disease: A focus on metabolism, obesity, and cognitive impairment. **Neurobiology of disease**, ago. 2022. v. 170, p. 105766.

HIGGINS, M. J.; HAYES, J. E. Regional Variation of Bitter Taste and Aftertaste in Humans. **Chemical senses**, 21 set. 2019. v. 44, n. 9, p. 721–732.

HOEK, L. VAN DER *et al.* Identification of a new human coronavirus. **Nature medicine**, 2004. v. 10, n. 4, p. 368.

HOPKINS, C. *et al.* Early recovery following new onset anosmia during the COVID-19 pandemic - an observational cohort study. **Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale**, 4 maio. 2020. v. 49, n. 1, p. 26.

HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of medical virology**, jan. 2021. v. 93, n. 1, p. 250.

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, 2020. v. 395, n. 10223, p. 497.

HUANG, N. *et al.* SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. **Nature medicine**, maio. 2021. v. 27, n. 5, p. 892.

HUYNH, P. P.; ISHII, L. E.; ISHII, M. What Is Anosmia? **JAMA: the journal of the American Medical Association**, 14 jul. 2020. v. 324, n. 2, p. 206–206 8 maio 2023.

IBGE. Betim (MG). 2021. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/betim.html>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2022.

IHARA, S.; YOSHIKAWA, K.; TOUHARA, K. Chemosensory signals and their receptors in the olfactory neural system. **Neuroscience**, 19 dez. 2013. v. 254, p. 45–60.

JACKSON, C. B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, 2022. v. 23, n. 1, p. 3.

JOACHIMIAK, M. P. Zinc against COVID-19? Symptom surveillance and deficiency risk groups. **PLoS neglected tropical diseases**, jan. 2021. v. 15, n. 1.

KANG, N. *et al.* Olfactory Marker Protein Expression Is an Indicator of Olfactory Receptor-Associated Events in Non-Olfactory Tissues. **PloS one**, 30 jan. 2015. v. 10, n. 1, p. e0116097.

KHAN, M. *et al.* COVID-19: A Global Challenge with Old History, Epidemiology and Progress So Far. **Molecules**, 23 dez. 2020. v. 26, n. 1.

KHEIKA, M. & KARBALAEI, M. Global distribution of *ACE1* (rs4646994) and *ACE2* (rs2285566) polymorphisms associated with COVID-19: A systematic review and meta-analysis, 2022. **Microbial Pathogenesis**, v. 172, p. 1057-1081.

KIM, D. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. **Cell**, 14 maio. 2020. v. 181, n. 4, p. 914–921.e10.

KIM, U. *et al.* Positional Cloning of the Human Quantitative Trait Locus Underlying Taste Sensitivity to Phenylthiocarbamide. **Science**, 21 fev. 2003. v. 299, i. 5610, p. 1221-1225.

KIM, U. *et al.* Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. **Science**. feb. 2003. v. 299, p. 1221-5.

KIMURA, I. *et al.* Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 subvariants, including BA.4 and BA.5. **Cell**, 10 out. 2022. v. 185, n. 21, p. 3992.

KONDO, K. *et al.* Age-Related Olfactory Dysfunction: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Management. **Frontiers in aging neuroscience**, 2020. v. 12.

KRAMMER, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. **Nature**, 23 set. 2020. v. 586, n. 7830, p. 516–527.

KUDLAY, D. & SVISTUNOV, A. COVID-19 Vaccines: An Overview of Different Platforms. **Bioengineering**, 2022. v. 9, n. 2, p. 72.

KUHN, C. *et al.* Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 10 nov. 2004. v. 24, n. 45, p. 10260–10265.

LAAMARTI, M. *et al.* Large scale genomic analysis of 3067 SARS-CoV-2 genomes reveals a clonal geo-distribution and a rich genetic variations of hotspots mutations. **PloS one**, 2020. v. 15, n. 11.

- LAM, M. H.-B. *et al.* Mental morbidities and chronic fatigue in severe acute respiratory syndrome survivors: long-term follow-up. **Archives of internal medicine**, 14 dez. 2009. v. 169, n. 22, p. 2142–2147.
- LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature reviews. Microbiology**, 30 mar. 2022. v. 20, n. 5, p. 270–284.
- LANDIS, B. N. *et al.* Chemosensory interaction: acquired olfactory impairment is associated with decreased taste function. **Journal of neurology**, 11 mar. 2010. v. 257, n. 8, p. 1303–1308= .
- LAU, H. *et al.* Internationally lost COVID-19 cases. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, jun. 2020. v. 53, n. 3, p. 454–458.
- LAURING, A. S.; HODCROFT, E. B. Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean? **JAMA: the journal of the American Medical Association**, 9 fev. 2021. v. 325, n. 6, p. 529–531.
- LECHIEN, J. R. *et al.* Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. **European archives of oto-rhino-laryngology - Head and Neck Surgery**, 2020. v. 277, n. 8, p. 2251.
- LEFFLER, A.; MÖNTER, B.; KOLTZENBURG, M. The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. **Neuroscience**, maio. 2006. v. 139, n. 2, p. 699–709.
- LIN, C.-C. *et al.* Changes in Trace Elements During Early Stages of Chronic Kidney Disease in Type 2 Diabetic Patients. **Biological trace element research**, dez. 2018. v. 186, n. 2, p. 330–336.
- LIU, Y. *et al.* Biomarkers and Immune Repertoire Metrics Identified by Peripheral Blood Transcriptomic Sequencing Reveal the Pathogenesis of COVID-19. **Frontiers in immunology**, 2021. v. 12. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8421539/>>
- LIU, Y. *et al.* Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. **Science China. Life sciences**, 2020. v. 63, n. 3, p. 364.
- LOGUE, J. K. *et al.* Sequelae in Adults at 6 Months After COVID-19 Infection. **JAMA Network Open**, fev. 2021. v. 4, n. 2.
- MACCOLL, G.; BOULOUX, P.; QUINTON, R. Kallmann Syndrome: Adhesion, Afferents, and Anosmia. **Neuron**, maio. 2002. v. 34, n. 5, p. 675–678.

- MACHHI, J. *et al.* The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. **Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, 2020. v. 15, n. 3, p. 359.
- MAKONI, M. South Africa responds to new SARS-CoV-2 variant. **Lancet**, 2021. v. 397, n. 10271, p. 267.
- MANAN, H. A. *et al.* A systematic review of olfactory-related brain structural changes in patients with congenital or acquired anosmia. **Brain structure & function**, out. 2021. v. 227, n. 1, p. 177–202 8 maio 2023.
- MAO, L. *et al.* Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. **JAMA neurology**, jun. 2020. v. 77, n. 6, p. 1 8 maio 2023..
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, L. E. *et al.* ACE and ACE2 Gene Variants Are Associated With Severe Outcomes of COVID-19 in Men. **Frontiers in immunology**, 2022. v. 13.
- MASTRANGELO, A.; BONATO, M.; CINQUE, P. Smell and taste disorders in COVID-19: From pathogenesis to clinical features and outcomes. **Neuroscience letters**, 3 mar. 2021. v. 748, p. 135694.
- MAZZATENTA, A. Physiological discrimination and correlation between olfactory and gustatory dysfunction in long-term COVID-19. **Physiological reports**, nov. 2022. v. 10, n. 22, p. e15486.
- MCINTOSH, K. *et al.* Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, abr. 1967. v. 57, n. 4, p. 933.
- MCINTOSH, K., PERLMAN, S. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Coronaviruses, including severe acute respiratory syndrome (SARS) and Middle East respiratory syndrome (MERS). 2015, pp. 1928–1936. e1922.
- MCLAUGHLIN, L. Taste dysfunction and eating behaviors in survivors of head and neck cancer treatment. **MedSurg nursing: official journal of the Academy of Medical-Surgical Nurses**, May-Jun. 2014. v. 23, n. 3, p. 165–70, 184.
- MEINHARDT, J. *et al.* Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. **Nature neuroscience**, 30 nov. 2020. v. 24, n. 2, p. 168–175.
- MENEZES, D. *et al.* SARS-CoV-2 Genomic Surveillance in Brazil: A Systematic Review with Scientometric Analysis. **Viruses**, 5 dez. 2022. v. 14, n. 12, p. 2715.
- MENEZES, M. T. DE *et al.* Dynamics of Early Establishment of SARS-CoV-2 VOC Omicron Lineages in Minas Gerais, Brazil. **Viruses**, fev. 2023. v. 15, n. 2. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9962645/>>

- MENNI, C. *et al.* Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: a prospective observational study from the ZOE COVID Study. **The Lancet**, 23 abr. 2022. v. 399, n. 10335, p. 1618–1624.
- MEURISSE, M. *et al.* Evaluating methodological approaches to assess the severity of infection with SARS-CoV-2 variants: scoping review and applications on Belgian COVID-19 data. **BMC infectious diseases**, 11 nov. 2022. v. 22, n. 1, p. 1–18.
- MILANETTI, E. *et al.* In-Silico Evidence for a Two Receptor Based Strategy of SARS-CoV-2. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 2021. v. 8.
- MISTRY, P. *et al.* SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. **Frontiers in immunology**, 2022. v. 12.
- MOEINZADEH, F. *et al.* Chronic Kidney Disease and COVID-19 Infection: A Case-Control Study. **Advanced biomedical research**, 26 dez. 2022. v. 11.
- MONJE, M. & IWASAKI, A. The neurobiology of long COVID. **Neuron**, 11 nov. 2022. v. 110, n. 21, p. 3484.
- MORO, E. *et al.* The international European Academy of Neurology survey on neurological symptoms in patients with COVID-19 infection. **European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies**, 1 set. 2020. v. 27, n. 9, p. 1727–1737.
- MUELLER, A. *et al.* Reduced olfactory bulb volume in post-traumatic and post-infectious olfactory dysfunction. **Neuroreport**, 4 abr. 2005. v. 16, n. 5, p. 475–478.
- MURPHY, C. *et al.* Prevalence of olfactory impairment in older adults. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, 13 nov. 2002. v. 288, n. 18, p. 2307–2312.
- NAGAYAMA, S.; HOMMA, R.; IMAMURA, F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. **Frontiers in neural circuits**, 2014. v. 8.
- NAVECA, F. G. *et al.* COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. **Nature medicine**, jul. 2021. v. 27, n. 7, p. 1230–1238.
- NEIERS, F. *et al.* The odorant metabolizing enzyme UGT2A1: Immunolocalization and impact of the modulation of its activity on the olfactory response. **PloS one**, 2021. v. 16, n. 3.
- NGUYEN, L. *et al.* Sialic acid-containing glycolipids mediate binding and viral entry of SARS-CoV-2. **Nature chemical biology**, jan. 2022. v. 18, n. 1, p. 81–90.
- NOLDEN, A. A. *et al.* Chemosensory Changes from Cancer Treatment and Their Effects on Patients' Food Behavior: A Scoping Review. **Nutrients**, 24 set. 2019. v. 11, n. 10, p. 2285.

OKPEKU, M. Possibility of COVID-19 eradication with evolution of a new omicron variant. **Infectious Diseases of Poverty**, 2022. v. 11.

OLENDER, T. *et al.* The human olfactory transcriptome. **BMC genomics**, 11 ago. 2016. v. 17, n. 1, p. 1–18 8 maio 2023.

OLENDER, T.; NATIV, N.; LANCET, D. HORDE: Comprehensive Resource for Olfactory Receptor Genomics. **Olfactory Receptors**, 2013. p. 23–38.

OLESZKIEWICZ, A. *et al.* Updated Sniffin' Sticks normative data based on an extended sample of 9139 subjects. **European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery**, 15 dez. 2018. v. 276, n. 3, p. 719–728.

OORT, S. VAN *et al.* Taste alterations and cancer treatment. **Current opinion in supportive and palliative care**, jun. 2018. v. 12, n. 2, p. 162–167.

ORRÙ, G. *et al.* Long-COVID Syndrome? A Study on the Persistence of Neurological, Psychological and Physiological Symptoms. **HealthcarePapers**, maio. 2021. v. 9, n. 5.

OU, J. *et al.* Tracking SARS-CoV-2 Omicron diverse spike gene mutations identifies multiple inter-variant recombination events. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2022. v. 7.

PALHETA NETO, F. X. *et al.* Anormalidades sensoriais: olfato e paladar. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, set. 2011. v. 15, n. 3, p. 350–358.

PAPANIKOLAOU, V. *et al.* From delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants. **Gene**, 3 mar. 2022. v. 814, p. 146134.

PATEKAR, S. *et al.* Olfactory and Taste Dysfunction in Indian Population with COVID-19: A Study on 300 Patients. **Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery: official publication of the Association of Otolaryngologists of India**, out. 2022. v. 74, n. Suppl 2.

PAULA, J. J. DE *et al.* Selective visuoconstructional impairment following mild COVID-19 with inflammatory and neuroimaging correlation findings. **Molecular psychiatry**, 2023. v. 28, n. 2, p. 553.

PAULA-JÚNIOR, W. De *et al.* COVID-19 in medium-sized municipalities in the 14 health macro-regions of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]**, 20 ago. 2021. v. 54, n. 11, p. e11191.

PEDRO, N. *et al.* Dynamics of a Dual SARS-CoV-2 Lineage Co-Infection on a Prolonged Viral Shedding COVID-19 Case: Insights into Clinical Severity and Disease Duration. **Microorganisms**, 2 fev. 2021. v. 9, n. 2, p. 300.

PHAN, T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, jul. 2020. v. 81, p. 104260.

PILLAY, T. S. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. **Journal of clinical pathology**, 2020. p. 366–369.

POPOVIC, M. Strain wars 3: Differences in infectivity and pathogenicity between Delta and Omicron strains of SARS-CoV-2 can be explained by thermodynamic and kinetic parameters of binding and growth. **Microbial Risk Analysis**, dez. 2022. v. 22, p. 100217.

POTTER, M. R. *et al.* Olfactory dysfunction from acute upper respiratory infections: relationship to season of onset. **International forum of allergy & rhinology**, jun. 2020. v. 10, n. 6, p. 706.

PRANATA, R. *et al.* Elevated N-terminal pro-brain natriuretic peptide is associated with increased mortality in patients with COVID-19: systematic review and meta-analysis. **Postgraduate medical journal**, maio. 2020.

PREMRAJ, L. *et al.* Mid and long-term neurological and neuropsychiatric manifestations of post-COVID-19 syndrome: A meta-analysis. **Journal of the neurological sciences**, 3 mar. 2022. v. 434, p. 120162.

PRINTZA, A. *et al.* The clinical course of smell and taste loss in COVID-19 hospitalized patients. **Hippokratia**, Apr-Jun. 2020. v. 24, n. 2, p. 66–71.

Putative Mammalian Taste Receptors: A Class of Taste-Specific GPCRs with Distinct Topographic Selectivity. **Cell**, 19 fev. 1999. v. 96, n. 4, p. 541–551.

QUEIROZ, D. C. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.2, and XAG identification during routine surveillance on a university campus in Belo Horizonte, Brazil, 2022. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 22 out. 2022. v. 53, n. 4, p. 2009–2014.

RAMBAUT, A. *et al.* A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature microbiology**, 11 nov. 2020. v. 5, n. 11, p. 1403.

RANZANI, O. T. *et al.* Effectiveness of the CoronaVac vaccine in older adults during a gamma variant associated epidemic of covid-19 in Brazil: test negative case-control study. **BMJ**, 20 ago. 2021. v. 374.

RAWAL, S. *et al.* Prevalence and Risk Factors of Self-Reported Smell and Taste Alterations: Results from the 2011–2012 US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). **Chemical senses**, 20 out. 2015. v. 41, n. 1, p. 69–76.

REBHOLZ, H. *et al.* Loss of Olfactory Function—Early Indicator for Covid-19, Other Viral Infections and Neurodegenerative Disorders. **Frontiers in neurology**, 26 out. 2020. v. 11.

REEH, P. & STEEN, K. Chapter 8. Tissue acidosis in nociception and pain. **Progress in Brain Research**. Elsevier, 1996, V. 113, p. 143–151.

REN, X. *et al.* Reinfection in patients with COVID-19: a systematic review. **Global Health Research and Policy**, 29 abr. 2022. v. 7, n. 1, p. 1–20.

RESENDE, P. C. *et al.* Evolutionary Dynamics and Dissemination Pattern of the SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.33 During the Early Pandemic Phase in Brazil. **Frontiers in microbiology**, 2020. v. 11.

RESENDE, P. *et al.* The ongoing evolution of variants of concern and interest of SARS-CoV-2 in Brazil revealed by convergent indels in the amino (N)-terminal domain of the spike protein. **Virus Evolution**, dez. 2021. v. 7, n. 2.

RISSEO, D. *et al.* Genetic signature of differential sensitivity to stevioside in the Italian population. **Genes & nutrition**, maio. 2014. v. 9, n. 3, p. 401.

RISSEO, D. S. *et al.* Corrigendum: Global diversity in the TAS2R38 bitter taste receptor: revisiting a classic evolutionary PROPosal. **Scientific reports**, 27 jun. 2016. v. 6, p. 28406.

RISSEO, D.; DRAYNA, D.; MORINI, G. Alteration, Reduction and Taste Loss: Main Causes and Potential Implications on Dietary Habits. **Nutrients**, nov. 2020. v. 12, n. 11.

ROGERS, J. P. *et al.* Psychiatric and neuropsychiatric presentations associated with severe coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis with comparison to the COVID-19 pandemic. **The Lancet. Psychiatry**, jul. 2020. v. 7, n. 7, p. 611.

ROMOLI, M. *et al.* A systematic review of neurological manifestations of SARS-CoV-2 infection: the devil is hidden in the details. **European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies**, set. 2020. v. 27, n. 9, p. 1712.

ROPER, S. D.; CHAUDHARI, N. Taste buds: cells, signals and synapses. **Nature reviews. Neuroscience**, 29 jun. 2017. v. 18, n. 8, p. 485–497.

ROSA MESQUITA, R. DA *et al.* Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review. **Wiener klinische Wochenschrift**, 2021. v. 133, n. 7-8, p. 377.

SAENGSIWARITT, W. *et al.* Genetic polymorphisms of ACE1, ACE2, and TMPSS2 associated with COVID-19 severity: A systematic review with meta-analysis. **Reviews in Medical Virology**, 2022, 32:e2323.

SANTOS, C. A. DOS *et al.* SARS-CoV-2 genomic surveillance in Northeast Brazil: timing of emergence of the Brazilian variant of concern P1. **Journal of travel medicine**, 2021.

SANTOS, H. O. Therapeutic supplementation with zinc in the management of COVID-19–related diarrhea and ageusia/dysgeusia: mechanisms and clues for a personalized dosage regimen. **Nutrition reviews**, 2021.

SARS-CoV-2 variants of concern as of 4 May 2023. **European Centre for Disease Prevention and Control**, abr. 2021.

SCHIFFMAN, S. Influence of medications on taste and smell. **World Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery**, 26 mar. 2018. 4, p. 84-91.

SCHIFFMAN, S. Influence of medications on taste of smell. **World Journal of Otorhinolaryngology – Head and Neck Surgery**. mar. 2018. v. 4, p. 84-91, I. 1.

SCHNELLER, L. M. *et al.* Tobacco use and chemosensory impairments among current adult tobacco users in the US: Data from NHANES 2013-2014. **Tobacco induced diseases**, 18 set. 2018. v. 16.

SCHWARTZ, J. S.; TAJUDEEN, B. A.; KENNEDY, D. W. Diseases of the nasal cavity. **Handbook of clinical neurology**, 2019. v. 164, p. 285.

SCHWARTZ, M. *et al.* Interactions Between Odorants and Glutathione Transferases in the Human Olfactory Cleft. **Chemical senses**, 7 nov. 2020. v. 45, n. 8, p. 645–654.

Secretaria Municipal de Saúde/ SMS BETIM, 2020. Perfil Epidemiológico do Município de Betim. Disponível em: <<https://www.betim.mg.gov.br/imgeditor/file/Saude/Betim%20Epidemiologico/Perfil%20Epidemiologico%20do%20Município%20de%20Betim%202020.pdf>>. Acesso em: 05 de novembro 2022.

SHARMA, A.; FAROUK, I. A.; LAL, S. K. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. **Viruses**, fev. 2021. v. 13, n. 2.

SHELTON, J. F. *et al.* The UGT2A1/UGT2A2 locus is associated with COVID-19-related loss of smell or taste. **Nature genetics**, fev. 2022. v. 54, n. 2, p. 121–124.

SHIEHZADEGAN, S. *et al.* Analysis of the Delta Variant B.1.617.2 COVID-19. **Clinics and Practice**, dez. 2021. v. 11, n. 4, p. 778.

SILVA, A. V. F. G. *et al.* Seroprevalence, Prevalence, and Genomic Surveillance: Monitoring the Initial Phases of the SARS-CoV-2 Pandemic in Betim, Brazil. **Frontiers in microbiology**, fev. 2022. v. 13.

SILVA, C. S. *et al.* Effect of Heavy Consumption of Alcoholic Beverages on the Perception of Sweet and Salty Taste. **Alcohol and alcoholism**, 13 out. 2015. v. 51, n. 3, p. 302–306.

- SILVA, J. Do P. *et al.* Epidemiological Surveillance Reveals the Rise and Establishment of the Omicron SARS-CoV-2 Variant in Brazil. **Viruses**, 20 abr. 2023. v. 15, n. 4, p. 1017.
- SILVA, J. P. *et al.* Delta Variant of SARS-CoV-2 Replacement in Brazil: A National Epidemiologic Surveillance Program. **Viruses**, maio. 2022. v. 14, n. 5.
- SILVA, T. De S. *et al.* Molecular characterization of a new SARS-CoV-2 recombinant cluster XAG identified in Brazil. **Frontiers of medicine**, 28 set. 2022. v. 9.
- SIMON, S. A. *et al.* The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. **Nature reviews. Neuroscience**, nov. 2006. v. 7, n. 11, p. 890–901.
- SINGH, B. *et al.* Prognostic indicators and outcomes of hospitalised COVID-19 patients with neurological disease: An individual patient data meta-analysis. **PloS one**, 2 jun. 2022. v. 17, n. 6, p. e0263595.
- SLOMIANY, B. L.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A. Chronic alcohol ingestion enhances tumor necrosis factor-alpha expression and salivary gland apoptosis. **Alcoholism, clinical and experimental research**, nov. 1997. v. 21, n. 8, p. 1530–1533.
- SØDAL, A. T. T. *et al.* Smell, taste and trigeminal disorders in a 65-year-old population. **BMC geriatrics**, 8 maio. 2021. v. 21, n. 1, p. 1–12.
- SONG, E. *et al.* Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. **The Journal of experimental medicine**, 3 mar. 2021. v. 218, n. 3.
- SRINIVASAN, M. Taste Dysfunction and Long COVID-19. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 14 jul. 2021. v. 11.
- STRICKER, B. H. *et al.* Taste loss to terbinafine: a case-control study of potential risk factors. **British journal of clinical pharmacology**, set. 1996. v. 42, n. 3, p. 313–318.
- SUDRE, C. H. *et al.* Attributes and predictors of long COVID. **Nature medicine**, 4 abr. 2021. v. 27, n. 4, p. 626.
- SUGIURA, M. *et al.* An Epidemiological Study of Postviral Olfactory Disorder. **Acta oto-laryngologica**, 8 jul. 2009.
- TANG, X. *et al.* On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. **National Science Review**, 3 mar. 2020. v. 7, n. 6, p. 1012–1023.
- TAQUET, M. *et al.* Neurological and psychiatric risk trajectories after SARS-CoV-2 infection: an analysis of 2-year retrospective cohort studies including 1 284 437 patients. **The lancet. Psychiatry**, out. 2022. v. 9, n. 10, p. 815–827.
- TAY, M. Z. *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature reviews. Immunology**, jun. 2020. v. 20, n. 6.

TEGALLY, H. *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. **Nature**, 9 mar. 2021. v. 592, n. 7854, p. 438–443.

TEGALLY, H. *et al.* The evolving SARS-CoV-2 epidemic in Africa: Insights from rapidly expanding genomic surveillance. **Science**, 2022;378(6615).

TEMMELE, A. F. P. *et al.* Characteristics of olfactory disorders in relation to major causes of olfactory loss. **Archives of otolaryngology--head & neck surgery**, jun. 2002. v. 128, n. 6, p. 635–641.

THAPLOO, D. *et al.* Subtle Differences in Brain Architecture in Patients with Congenital Anosmia. **Brain topography**, 24 mar. 2022. v. 35, n. 3, p. 337–340 8 maio 2023.

The influence of head injury on olfactory and gustatory function. **Handbook of Clinical Neurology**. [S.l.]: Elsevier, 2019, V. 164, p. 409–429.

TIAN, D. *et al.* The Global Epidemic of the SARS-CoV-2 Delta Variant, Key Spike Mutations and Immune Escape. **Frontiers in immunology**, 2021. v. 12.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. *et al.* Persistent, new-onset symptoms and mental health complaints in Long COVID in a Brazilian cohort of non-hospitalized patients. **BMC infectious diseases**, 2022. v. 22.

TONG, J. Y. *et al.* The Prevalence of Olfactory and Gustatory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. **Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, jul. 2020. v. 163, n. 1, p. 3–11.

TORABI, A. *et al.* Proinflammatory Cytokines in the Olfactory Mucosa Result in COVID-19 Induced Anosmia. **ACS chemical neuroscience**, 1 jul. 2020. v. 11, n. 13, p. 1909–1913.

TU, Y.-H. *et al.* An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. **Science**, 2 mar. 2018. v. 359, n. 6379, p. 1047–1050.

TYRRELL, D. A. J.; BYNOE, M. L. Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ Cultures. **British medical journal**, 5 jun. 1965. v. 1, n. 5448, p. 1467–1470.

UMAIR, M. *et al.* Genomic surveillance reveals the detection of SARS-CoV-2 delta, beta, and gamma VOCs during the third wave in Pakistan. **Journal of medical virology**, 1 mar. 2022. v. 94, n. 3, p. 1115–1129.

V'KOVSKI, P. *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature reviews. Microbiology**, 2021. v. 19, n. 3, p. 155.

VADUGANATHAN, M. *et al.* Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19. **The New England journal of medicine**, 23 abr. 2020. v. 382, n. 17, p. 1653–1659.

- VAIRA, L. A. *et al.* Potential pathogenesis of ageusia and anosmia in COVID-19 patients. **International forum of allergy & rhinology**, set. 2020. v. 10, n. 9, p. 1103.
- VENNEMANN, M. M.; HUMMEL, T.; BERGER, K. The association between smoking and smell and taste impairment in the general population. **Journal of neurology**, ago. 2008. v. 255, n. 8, p. 1121–1126.
- VOLZ, E. *et al.* Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. **Nature**, maio. 2021. v. 593, n. 7858, p. 266–269.
- WALLS, A. C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, 4 abr. 2020. v. 181, n. 2, p. 281.
- WANG, D. *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, 3 mar. 2020. v. 323, n. 11, p. 1061.
- WANG, H. *et al.* Inflammation and taste disorders: mechanisms in taste buds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, jul. 2009. v. 1170, p. 596.
- WELGE-LÜSSEN, A.; WOLFENSBERGER, M. Olfactory disorders following upper respiratory tract infections. **Advances in oto-rhino-laryngology**, 2006. v. 63.
- WITT, M. Anatomy and development of the human taste system. **Handbook of Clinical Neurology**. Elsevier, 2019, V. 164, p. 147–171.
- World Health Organization - WHO. Coronavirus disease (COVID-19). 2021. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1> Acesso em: 12 de fevereiro de 2023.
- World Health Organization - WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants. 2022.. Disponível em: <<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>> Acesso em: 10 de janeiro de 2023.
- WROBEL, A. G. *et al.* SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin cleavage effects. **Nature structural & molecular biology**, 8 ago. 2020. v. 27, n. 8, p. 763.
- XAVIER, J. *et al.* The ongoing COVID-19 epidemic in Minas Gerais, Brazil: insights from epidemiological data and SARS-CoV-2 whole genome sequencing. **Emerging microbes & infections**, 2020. v. 9, n. 1, p. 1824.
- XU, H. *et al.* High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International journal of oral science**, 24 fev. 2020. v. 12, n. 1, p. 1–5.

YAZDANPANA, N.; SAGHAZADEH, A.; REZAEI, N. Anosmia: a missing link in the neuroimmunology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Reviews in the neurosciences**, 25 out. 2020. v. 31, n. 7, p. 691–701.

YONG, S. J. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. **Infectious diseases**, 2021. p. 1.

YOUNG, J. M. *et al.* Odorant receptor expressed sequence tags demonstrate olfactory expression of over 400 genes, extensive alternate splicing and unequal expression levels. **Genome biology**, 7 out. 2003. v. 4, n. 11, p. 1–15.

ZHAO, Z. *et al.* Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. **Journal of medical microbiology**, ago. 2003. v. 52, n. Pt 8, p. 715–720.

ZHONG, M. *et al.* ACE2 and Furin Expressions in Oral Epithelial Cells Possibly Facilitate COVID-19 Infection via Respiratory and Fecal–Oral Routes. **Frontiers of medicine**, 10 dez. 2020. v. 7.

ZHOU, F. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet**, 2020. v. 395, n. 10229, p. 1054.

ZHU, J. *et al.* Coagulation dysfunction is associated with severity of COVID-19: A meta-analysis. **Journal of medical virology**, fev. 2021. v. 93, n. 2, p. 962.

ZHU, N. *et al.* Brief Report: A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England journal of medicine**, 2 fev. 2020. v. 382, n. 8, p. 727.

ANEXOS

Anexo A. Ficha de Registro Individual. Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Gripe (SIVEP-Gripe).

CASO DE SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE (SRAG-HOSPITALIZADO): Indivíduo com *SG que apresente: **dispneia/desconforto respiratório OU pressão persistente no tórax OU saturação de O₂ menor que 95% em ar ambiente OU coloração azulada dos lábios ou rosto.** (*SG: indivíduo com quadro respiratório agudo, caracterizado por pelo menos dois (2) dos seguintes sinais e sintomas: febre (mesmo que referida), calafrios, dor de garganta, dor de cabeça, tosse, coriza, distúrbios olfativos ou gustativos). Para efeito de notificação no SIVEP-Gripe, devem ser considerados os casos de SRAG hospitalizados ou os óbitos por SRAG independente de hospitalização.

1	Data do preenchimento da ficha de notificação:	2	Data de 1 ^{os} sintomas		
3	UF: __ __ __	4	Município: _____ Código (IBGE): __ __ __ __ __ __		
5	Unidade de Saúde: _____		Código (CNES): __ __ __ __ __ __		
6	Tem CPF? __ 1-Sim 2-Não	7	CPF: __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __		
8	Estrangeiro __ 1-Sim 2-Não				
9	Cartão Nacional de Saúde (CNS): __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __				
10	Nome: _____		11	Sexo: __ 1- Masc. 2- Fem. 9- Ign	
12	Data de nascimento: __ __ __ __ __ __	13	(Ou) Idade: __ __ __ 1-Dia 2-Mês 3-Ano __	14	Gestante: __ 1-1 ^o Trimestre 2-2 ^o Trimestre 3-3 ^o Trimestre 4-Idade Gestacional Ignorada 5-Não 6-Não se aplica 9-Ignorado
15	Raça/Cor: __ 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9-Ignorado				
16	Se indígena, qual etnia? _____				
17	É membro de povo ou comunidade tradicional? __ 1-Sim 2-Não		18	Se sim, qual? _____	
19	Escolaridade: __ 0-Sem escolaridade/Analfabeto 1-Fundamental 1 ^o ciclo (1 ^a a 5 ^a série) 2- Fundamental 2 ^o ciclo (6 ^a a 9 ^a série) 3-Médio (1 ^o ao 3 ^o ano) 4-Superior 5-Não se aplica 9-Ignorado				
20	Ocupação: _____	21	Nome da mãe: _____		
22	CEP: __ __ __ __ __ - __ __ __ __				
23	UF: __ __ __	24	Município: _____ Código (IBGE): __ __ __ __ __ __		
25	Bairro: _____	26	Logradouro (Rua, Avenida, etc.): _____	27	Nº: _____
28	Complemento (apto, casa, etc.): _____	29	(DDD) Telefone: __ __ - __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __		
30	Zona: __ 1-Urbana 2-Rural 3-Periurbana 9-Ignorado	31	País: (se residente fora do Brasil) _____		
32	Trata-se de caso nosocomial (infecção adquirida no hospital)? __ 1-Sim 2-Não 9-ignorado				
33	Paciente trabalha ou tem contato direto com aves, suínos, ou outro animal? __ 1-Sim 2-Não __ 3- Outro, qual _____ 9-ignorado				
34	Sinais e Sintomas: 1-Sim 2-Não 9-ignorado __ Febre __ Tosse __ Dor de Garganta __ Dispneia __ Desconforto Respiratório __ Saturação O ₂ < 95% __ Diarreia __ Vômito __ Dor abdominal __ Fadiga __ Perda do olfato __ Perda do paladar __ Outros _____				
35	Possui fatores de risco/comorbidades? __ 1-Sim 2-Não 9-Ignorado Se sim, qual(is)? (Marcar X) __ Puérpera (até 45 dias do parto) __ Doença Cardiovascular Crônica __ Doença Hematológica Crônica __ Síndrome de Down __ Doença Hepática Crônica __ Asma __ Diabetes mellitus __ Doença Neurológica Crônica __ Outra Pneumopatia Crônica __ Imunodeficiência/Imunodepressão __ Doença Renal Crônica __ Obesidade, IMC __ __ Outros _____				
36	Recebeu vacina COVID-19? __ 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	37	Se recebeu vacina COVID-19, informar: Data da 1 ^a dose: __ __ __ __ __ __ Data da 2 ^a dose: __ __ __ __ __ __		
38	Fabricante vacina COVID-19: _____	39	Lote da vacina COVID-19: Lote 1 ^a Dose _____ Lote 2 ^a Dose _____		
40	Recebeu vacina contra Gripe na última campanha? __ 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	41	Data da vacinação: __ __ __ __ __ __		
Se < 6 meses: a mãe recebeu a vacina? __ 1-Sim 2-Não 9-Ignorado Se sim, data: __ __ __ __ __ __ a mãe amamenta a criança? __ 1-Sim 2-Não 9-Ignorado					
Se >= 6 meses e <= 8 anos: Data da dose única 1/1: __ __ __ __ __ __ (dose única para crianças vacinadas em campanhas de anos anteriores) Data da 1 ^a dose: __ __ __ __ __ __ (1 ^a dose para crianças vacinadas pela primeira vez) Data da 2 ^a dose: __ __ __ __ __ __ (2 ^a dose para crianças vacinadas pela primeira vez)					

Dados de Atendimento	42	Usou antiviral para gripe? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	43	Qual antiviral? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Osetamivir 2-Zanamivir 3-Outro, especifique: _____	44	Data início do tratamento: _____	
	45	Houve internação? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	46	Data da internação por SRAG: _____	47	UF de internação: _____	
	48	Município de internação: _____ Código (IBGE): _____					
	49	Unidade de Saúde de internação: _____ Código (CNES): _____					
	50	Internado em UTI? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	51	Data da entrada na UTI: _____	52	Data da saída da UTI: _____	
	53	Uso de suporte ventilatório: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Sim, invasivo 2-Sim, não invasivo 3-Não 9-Ignorado	54	Raio X de Tórax: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Normal 2-Infiltrado intersticial 3-Consolidação 4-Misto 5-Outro: _____ 6-Não realizado 9-Ignorado	55	Data do Raio X: _____	
	56	Aspecto Tomografia <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Típico covid-19 2- Indeterminado covid-19 3- Atípico covid-19 4-Negativo para Pneumonia 5-Outro 6-Não realizado 9-Ignorado			57	Data da tomografia: _____	
	58	Coletou amostra <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	59	Data da coleta: _____	60	Tipo de amostra: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Secreção de Naso-orofaringe 2-Lavado Bronco-alveolar 3-Tecido <i>post-mortem</i> 4-Outra, qual? _____ 5-LCR 9-Ignorado	
Dados Laboratoriais	61	Nº Requisição do GAL: _____		62	Tipo do teste para pesquisa de antígenos virais: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1- Imunofluorescência (IF) 2- Teste rápido antigênico		
	63	Data do resultado da pesquisa de antígenos: _____		64	Resultado da Teste antigênico: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-positivo 2-Negativo 3- Inconclusivo 4-Não realizado 5-Aguardando resultado 9-Ignorado		
	65	Laboratório que realizou o Teste antigênico: _____				Código (CNES): _____	
	66	Agente Etiológico - Teste antigênico: Positivo para Influenza? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado Se sim, qual influenza? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1- Influenza A 2- Influenza B Positivo para outros vírus? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado Se outros vírus respiratórios qual(is)? (marcar X) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> SARS-CoV-2 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Vírus Sincial Respiratório <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Parainfluenza 1 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Parainfluenza 2 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Parainfluenza 3 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Adenovírus <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Outro vírus respiratório, especifique: _____					
	67	Resultado da RT-PCR/outro método por Biologia Molecular: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Detectável 2-Não Detectável 3-Inconclusivo 4-Não realizado 5-Aguardando resultado 9-Ignorado			68	Data do resultado RT-PCR/outro método por Biologia Molecular: _____	
	69	Agente Etiológico - RT-PCR/outro método por Biologia Molecular: Positivo para Influenza? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado Se sim, qual influenza? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1- Influenza A 2- Influenza B Influenza A, qual subtipo? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Influenza A(H1N1)pdm09 2-Influenza A/H3N2 3-Influenza A não subtipado 4-Influenza A não subtipável 5-Inconclusivo 6-Outro, especifique: _____ Influenza B, qual linhagem? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Victoria 2-Yamagatha 3-Não realizado 4-Inconclusivo 5-Outro, especifique: _____ Positivo para outros vírus? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado Se outros vírus respiratórios, qual(is)? (marcar X) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> SARS-CoV-2 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Vírus Sincial Respiratório <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Parainfluenza 1 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Parainfluenza 2 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Parainfluenza 3 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Parainfluenza 4 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Adenovírus <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Metapneumovírus <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Bocavírus <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Rinovírus <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Outro vírus respiratório, especifique: _____					
	70	Laboratório que realizou RT-PCR/outro método por Biologia Molecular: _____				Código (CNES): _____	
71	Tipo de amostra sorológica para SARS-Cov-2: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1- Sangue/plasma/soro 2-Outra, qual? _____ 9-Ignorado				72	Data da coleta: _____	
73	Tipo de Sorologia para SARS-Cov-2: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-Teste rápido 2-Elisa 3- Quimiluminescência 4- Outro, qual? _____ Resultado do Teste Sorológico para SARS-CoV-2: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> IgM <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> IgA 1-Positivo 2-Negativo 3- Inconclusivo 4-Não realizado 5-Aguarda resultado 9-Ignorado				74	Data do resultado: _____	
Conclusão	75	Classificação final do caso: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1-SRAG por influenza 2-SRAG por outro vírus respiratório 3-SRAG por outro agente etiológico, qual _____ 4-SRAG não especificado 5-SRAG por covid-19			76	Critério de Encerramento: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1- Laboratorial 2- Clínico Epidemiológico 3- Clínico 4- Clínico-Imagem	
	77	Evolução do Caso: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1- Cura 2-Óbito 3-Óbito por outras Causas 9-Ignorado		78	Data da alta ou óbito: _____	79	Data do Encerramento: _____
80 Número D.O: _____							
81 OBSERVAÇÕES:							
82 Profissional de Saúde Responsável: _____				83 Registro Conselho/Matrícula: _____			

Anexo B. Artigo ‘Negative correlation between ACE2 gene expression levels and loss of taste in a cohort of COVID-19 hospitalized patients: New clues to long-term cognitive disorders’. Publicado na Revista *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, em 29 de setembro de 2022.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Guiqing Peng,
Huazhong Agricultural University,
China

REVIEWED BY

Yongfen Xu,
Institut Pasteur of Shanghai, Chinese
Academy of Sciences (CAS), China
Julien Brechbühl,
Université de Lausanne,
Switzerland

*CORRESPONDENCE

Renan Pedra de Souza
renanrps@ufmg.br
Diana Bahia
dianabahia@hotmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

[‡]These authors have contributed
equally to this work and share
senior authorship

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Virus and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

RECEIVED 27 March 2022

ACCEPTED 17 August 2022

PUBLISHED 29 September 2022

CITATION

Braga-Paz I, Ferreira de Araújo JL,
Alves HJ, de Ávila RE, Resende GG,
Teixeira MM, de Aguiar RS, de
Souza RP and Bahia D (2022) Negative
correlation between ACE2 gene
expression levels and loss of taste in a
cohort of COVID-19 hospitalized
patients: New clues to long-term
cognitive disorders.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:905757.
doi: 10.3389/fcimb.2022.905757

Negative correlation between ACE2 gene expression levels and loss of taste in a cohort of COVID-19 hospitalized patients: New clues to long-term cognitive disorders

Isabela Braga-Paz^{1†}, João Locke Ferreira de Araújo^{1†},
Hugo José Alves¹, Renata Eliane de Ávila²,
Gustavo Gomes Resende³, Mauro Martins Teixeira⁴,
Renato Santana de Aguiar^{1,5}, Renan Pedra de Souza^{1*‡}
and Diana Bahia^{1*‡}

¹Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil,

²Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Brazil, ³Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG/EBSERH), Belo Horizonte, Brazil, ⁴Departamento de Bioquímica e imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, ⁵Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, Instituto D'OR (IDOR), Rio de Janeiro, Brazil

In early 2020, one of the most prevalent symptoms of SARS-CoV-2 infection was the loss of smell (anosmia), found in 60–70% of all cases. Anosmia used to occur early, concomitantly with other symptoms, and often persisted after recovery for an extended period, sometimes for months. In addition to smell disturbance, COVID-19 has also been associated with loss of taste (ageusia). The latest research suggests that SARS-CoV-2 could spread from the respiratory system to the brain through receptors in sustentacular cells localized to the olfactory epithelium. The virus invades human cells *via* the obligatory receptor, angiotensin-converting enzyme II (ACE2), and a priming protease, TMPRSS2, facilitating viral penetration. There is an abundant expression of both ACE2 and TMPRSS2 in sustentacular cells. In this study, we evaluated 102 COVID-19 hospitalized patients, of which 17.60% presented anosmia and 9.80% ageusia. ACE1, ACE2, and TMPRSS2 gene expression levels in nasopharyngeal tissue were obtained by RT-qPCR and measured using Δ CT analysis. ACE1 *Alu287bp* association was also evaluated. Logistic regression models were generated to estimate the effects of variables on ageusia and anosmia Association of ACE2 expression levels with ageusia. was observed (OR: 1.35; 95% CI: 1.098–1.775); however, no association was observed between TMPRSS2 and ACE1 expression levels and ageusia. No association was observed among the three genes and anosmia, and the *Alu287bp* polymorphism was not associated with any of the outcomes. Lastly, we discuss whether there is a bridge linking these initial symptoms, including

molecular factors, to long-term COVID-19 health consequences such as cognitive dysfunctions.

KEYWORDS

COVID-19, severe COVID-19, anosmia, ageusia, genetic association, quantitative trait, long-COVID syndrome, cognitive dysfunction

1 Introduction

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the virus responsible for causing coronavirus disease 2019 (COVID-19). Among the most common COVID-19 symptoms are fever, cough, fatigue, and anosmia (loss of smell) with or without ageusia (loss of taste) in mild to moderate cases (Huang et al., 2020; Aghagoli et al., 2021).

The SARS-CoV-2 virus can lead to neurologic dysfunction by both direct and indirect mechanisms, including damage to olfactory sensory neurons, impairing the brain's olfactory perception center, and post-viral anosmia. The infection can also lead to a cytokine storm that can damage the blood-brain barrier and disrupt the normal functioning of the Central Nervous System (CNS). Reports of prothrombotic status were also associated with COVID-19, leading to the obstruction of cerebral vessels and causing ischemic CNS lesions (Yazdanpanah et al., 2020; Aghagoli et al., 2021).

Complete or partial loss of smell – leading to a decreased sense of taste – may be related to olfactory disorders, head trauma, or viral infections. Although the mechanism of how viral infection causes anosmia is unclear, it is believed to involve the destruction of the olfactory neuroepithelium or transmission of pathogens directly through the olfactory nerve (Whitcroft and Hummel, 2020; Meng and Pan, 2021).

In patients affected by SARS-CoV-2 in 2020, reports of anosmia were observed in the acute phase of the disease even in the absence of other symptoms, thus becoming a hallmark symptom of COVID-19 (Hopkins et al., 2020; Lechien et al., 2020; Whitcroft and Hummel, 2020; Glezer et al., 2021; Meng and Pan, 2021). In most cases, the sense of smell recovered in about two weeks or after other symptoms improved. However, in some patients, the recovery of smell and taste took longer, a phenomenon that may be associated with the effect of the virus on the CNS and warranted further investigation (Hopkins et al., 2020; Lechien et al., 2020; Glezer et al., 2021). Many patients are now experiencing long-term health consequences called long-COVID syndrome. As the pandemic progressed, SARS-CoV-2 variants of concern (VOCs) emerged (Mistry et al., 2021; Zawilska et al., 2021). These variants have been linked to higher mortality rates, clinical complications, and increased viral transmission rates (Choi and Smith, 2021; Raman et al.,

2021). In addition, variability in COVID-19 symptomatology was observed with different variants (Pedro et al., 2021).

The Spike protein (S) of SARS-CoV-2 is a viral envelope glycoprotein responsible for binding to angiotensin-converter enzyme 2 (ACE2) after its cleavage at sites S1/S2 by type II transmembrane serine protease (TMPRSS2) (Johnson et al., 2021; Meinhardt et al., 2021). The SARS-CoV-2 virus invades human cells *via* the obligatory ACE2 receptor, and TMPRSS2 further facilitates viral uptake. Co-expression of *ACE2* and *TMPRSS2* was observed in ciliated epithelial cells, nasopharyngeal tissue, and on the surface of oligodendrocytes (Sardu et al., 2020; Martínez-Gómez et al., 2022). The ratio between *ACE1* and *ACE2* has been implicated in the pathogenesis of respiratory diseases, and the functional polymorphisms of these genes have been associated with an increased risk of lung and cardiovascular diseases. Therefore, these genes may contribute to COVID-19 outcomes (Choudhary et al., 2020; Galisa et al., 2021; Martínez-Gómez et al., 2022).

The *ACE1* gene modulates *ACE2* expression with increased levels of angiotensin II. Both are part of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) (D'ardes et al., 2020; Saad et al., 2021). A 287 bps *Alu* sequence rs4646994, repeated insertion/deletion (I/D) (indel) in intron 16, has been described in the *ACE1* gene, which leads to an expression modulation of this gene (Castellon and Hamdi, 2007; de Araújo et al., 2022). A recent study has shown that an *Alu* homozygous deletion (D/D) is associated with the progression of severe COVID-19 (de Araújo et al., 2022). However, studies are still required to evaluate the role of the genetic polymorphism in COVID-19 outcomes.

This study investigates the gene expression of potential viral targets in the olfactory epithelium in nasal swab samples obtained from 102 hospitalized patients with COVID-19 between April and September 2020. We explore *ACE1*, *ACE2*, and *TMPRSS2* expression in these patients and the relationship of these genes with the onset of symptoms such as anosmia and ageusia. Information on anosmia and ageusia was collected through the hospitalized patient's report. Moreover, we discuss whether the prevalence of these symptoms months after infection could lead to neurological problems or cognitive dysfunction such as short-term memory loss, difficulty concentrating, mental confusion, and imbalance.

2 Methods

2.1 Patients

Samples were collected from 102 COVID-19 positive patients confirmed by qPCR and were admitted to the Eduardo de Menezes hospital in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, between April and September 2020, before the appearance of SARS-CoV-2 variants of concern. Exclusion criteria were cancer, autoimmune diseases, and pregnancy. Smoking status was also reported. All participants gave informed consent (CAAE 32224420.3.0000.0008 and CAAE 31462820.3.0000.5149). When patients could not consent due to hospitalization, informed consent was obtained by a legal guardian. RT-qPCR confirmed COVID-19 diagnosis. The clinical data of the patients used in the study was obtained from hospital records. Patients self-reported anosmia and ageusia. Information about comorbidities is based on the medical history of each hospitalized patient. Nasopharyngeal swab samples were collected in a viral transport medium (DMEM or PBS) and stored at -80°C until extraction. The collection of biological material was performed on the first day of hospitalization of the patients.

2.2 Expression analysis

RNA extraction was performed using a Quick-RNA Viral kit (Zymo Research, CA, USA). Samples were treated with TURBO DNA-free kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) when GoTaq SYBR green qPCR assay was employed. cDNA was generated using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). All above reactions were conducted following the manufacturer's instructions. *ACE1*, *ACE2*, *TMPRSS2*, and *B2M* (reference gene) gene expression levels were evaluated using the GoTaq Probe qPCR System (Promega, WI, USA). The specific probes (Integrated DNA Technologies, NJ, USA) used and designed for exon-exon junctions were: Hs.PT.58.19167084, Hs.PT.58.27645939, HS.PT.58.39738666, and Hs.PT.39a.22214847, respectively. ΔCt was calculated by subtracting the cycle threshold (Ct) of the gene of interest from the reference gene (*B2M*) Ct.

2.3 *Alu287bp* polymorphism (rs4646994) genotyping

For the genotyping of the rs4646994 polymorphism, the FastStart Universal SYBR Green Master Kit (Promega, WI, USA) was used to yield a final volume of 20 μL using three different primers: 5'CATCCTTTCTCCCATTCTC3' (Primer1, Forward); 5'TGGGATTACAGGCGTGATACAG3' (Primer 2, Forward, internal); and 5'ATTTTCAGAGCTGGAATAAAA TT3' (Primer 3, Reverse). Primer stock was resuspended and diluted to a working solution of 10 μM . The concentration of

primers 1 and 3 is 20 pmol, and the concentration of primer 2 is 40 pmol. The generated fragment sizes were 65bp (Insertion) and 84bp (deletion) and visualized on a 3% agarose gel. Ten percent of the sample was randomly genotyped twice to attest to the genotyping quality. The agreement level was 100%.

2.4 Statistical analysis

All analyses of this study were performed in R version 4.0.2, considering a significance level of 0.05. The verification of the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was performed using the SNPassoc package. Allelic and genotypic frequency calculations were performed. Logistic regression models were generated to estimate the individual effects of the variables age, sex, RS4646994 polymorphism, and gene expression levels for the Anosmia and Ageusia outcomes.

A logistic regression model was generated to investigate association between clinical and molecular data. We used Ct data of the N gene of SARS-CoV-2 to evaluate whether there was a difference between the viral loads of patients with COVID-19 experiencing anosmia and ageusia vs. those without anosmia and ageusia. Ct values from RNase P (Ribonuclease P) were used for normalization. The results were reported in Table 2 as mean, standard deviation (sd), odds ratio (OR), and confidence interval (CI).

3 Results

Only one patient did not require respiratory support. There were 54 women and 48 men, and the mean duration of hospitalization was 10.2 ± 6.5 days. The death rate was 13.7%, and the mean age of these patients was 55.11 ± 4.6 years. About 25% of patients had diabetes, 55.9% were hypertensive, 13.7% had asthma, and 20.6% were smokers (Table 1).

Hardy Weinberg equilibrium (HWE) analysis was performed separately for case and control groups for the frequency of the *Alu287bp* polymorphism. Anosmia and Ageusia were tested. Both cases were in HWE for the outcome of anosmia and ageusia ($p=0.624$ and $p=0.219$, respectively). However, controls for anosmia and ageusia were out of HWE ($p=0.021$ and $p=0.028$, respectively). Two individuals could not have their genotypes evaluated (Table 2).

No difference was observed when the variables age and sex were tested in the logistic model for anosmia. Similarly, there were no differences in *ACE1* gene expression in the anosmia. No association was observed between the manifestation of anosmia and the *ACE2* and *TMPRSS2* expression levels ($p=0.063$ and $p=0.068$, respectively) (Table 3). No association was observed for the *Alu287bp* polymorphism, testing the codominance, D allele dominance, and I allele dominance models (Table 3).

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of the study sample (n = 102).

Characteristics	Value
Age, mean (sd)	55.1 (14.6)
Hospitalization days, mean (sd)	10.2 (6.5)
Female Sex, N (%)	54 (52.9%)
Death, N (%)	14 (13.7%)
Anosmia, N (%)	18 (17.6%)
Ageusia, N (%)	10 (9.8%)
Respiratory support, N (%)	101 (99%)
Diabetes, N (%)	26 (25.5%)
Obesity N (%)	28 (27.7%)
Smoking N (%)	21 (20.6%)
Hypertension N (%)	57 (55.9%)
Asthma N (%)	14 (13.7%)

sd, standard deviation; No, number; clinical and demographic data from a sample of Covid-19 positive patients admitted to the Eduardo de Menezes hospital, Belo Horizonte, MG. Age, sex, hospitalization days, death and main symptoms.

Age and sex were also not significant when tested in the logistic model for ageusia. There was no difference in *ACE1* gene expression in the ageusia. An association was observed between decreased *ACE2* expression levels and ageusia (OR:1.35; 95%CI: 1.09-1.77). No association for manifestation of ageusia was detected with low *TMPRSS2* gene expression levels ($p=0.074$) (Table 3). No association was observed for the *Alu287bp* polymorphism, testing the codominance, D allele dominance, and I allele dominance models (Table 3).

No differences were observed for viral load between patients with anosmia and ageusia and the respective controls ($p=0.395$ and $p=0.931$, respectively).

4 Discussion

Herein, we evaluated the association of *ACE1*, *ACE2*, and *TMPRSS2* expression with the presence of anosmia and/or ageusia. There was a negative correlation between *ACE2* and

ageusia in a sample of hospitalized COVID-19 positive patients. Furthermore, no association was observed between expression of *ACE1* and *TMPRSS2* and the manifestation of ageusia. No association was observed for the three genes and anosmia. In addition, no association was found for the *ALU287pb* polymorphism with the presence of anosmia and/or ageusia,

ACE2 and *TMPRSS2* actively participate in the SARS-Cov-2 infectious process. Some studies have already demonstrated the association of differentiated levels of expression of these genes in the prognosis of COVID-19 (Sardu et al., 2020). For example, the *ACE2/TMPRSS2* ratio was associated with the need for respiratory support (Rossi et al., 2021). Although high *ACE2* and *TMPRSS2* expression levels are associated with a severe prognosis of COVID-19, in this study, we evaluated specific clinical symptoms of the disease. Anosmia and ageusia have been observed more frequently in patients with a mild outcome and lower frequency in those with severe disease (Lechien et al., 2020; Aghagoli et al., 2021). The sample used in this study was obtained from patients hospitalized with severe clinical symptoms. In these samples, we found that low *ACE2* gene expression levels correlated with ageusia.

In addition, both genes are highly expressed on the surface of oligodendrocytes, which could explain the proliferation of the virus in nerve tissue cells and subsequent neurological damage and sequelae. *ACE2* is abundantly expressed in the respiratory epithelium and in cells of the oral mucosa tissue, mainly in epithelial cells of the oral mucosa, lips, and tongue, these sites being more susceptible to SARS-CoV-2 invasion compared to other oral anatomical sites, and direct damage to the oral epithelium and the neuroinvasive nature of the virus can lead to taste disturbances (Zhong et al., 2020; Farid et al., 2022). Thus, *ACE2* and *TMPRSS2* expression may be key factors in unveiling neurocognitive consequences of long-COVID-19 syndrome (Huang et al., 2020; Aghagoli et al., 2021).

In animal models, the SARS-CoV-2 virus down-regulates *ACE2* expression leading to an imbalance in the *ACE1/ACE2* cerebrovascular control, resulting in an *ACE1* signal mismatch, excessive vasoconstriction, or brain autoregulation disorders

TABLE 2 Genotypic and allelic absolute values for the rs4646994 polymorphism.

Sample	n	Genotype					p value
		DD	DI	II	D	I	
Anosmia case	18	5	11	2	21	15	0.624
Anosmia control	82	35	29	18	99	65	0.021
Ageusia case	10	3	7	0	13	7	0.219
Ageusia control	90	37	33	20	107	73	0.028

Genotypic and allelic absolute values for the rs4646994 polymorphism for case and control groups in two studies: Chance of anosmia and ageusia. Hardy Weinberg equilibrium performed for case and control separately. Yes: case; No: control.

TABLE 3 Logistic regression model for anosmia and ageusia outcomes.

Outcome	Variable	Case		Control		p value	OR CI (95%)
		N	mean (sd) or %	N	mean (sd) or %		
Anosmia	Age	18	55.44 (10.33)	84	54.04 (15.43)	0.916	–
	ACE1 ΔCT	7	11.17 (5.25)	75	10.77 (3.85)	0.835	–
	ACE2 ΔCT	9	15.09 (5.82)	79	13.59 (4.75)	0.063	–
	TMPRSS2 ΔCT	9	13.11 (4.99)	79	8.17 (4.59)	0.068	–
	Sex (Male)	7	0.39	41	0.49	0.446	–
	rs4646994 Codominance DD	5	0.27	35	0.43	–	–
	rs4646994 Codominance DI	11	0.61	29	0.35	0.101	–
	rs4646994 Codominance II	2	0.12	18	0.22	0.777	–
	rs4646994 I allele dominance (DI + II)	13	0.73	47	0.57	0.248	–
rs4646994 D allele dominance (DD + DI)	16	0.88	64	0.78	0.308	–	
Ageusia	Age	10	54.80 (9.41)	92	55.15 (15.11)	0.942	–
	ACE1 ΔCT	7	11.14 (6.09)	75	10.81 (3.83)	0.788	–
	ACE2 ΔCT	9	17.16 (4.41)	79	13.37 (4.93)	0.012	1.35 (1.098-1.775)
	TMPRSS2 ΔCT	9	13.63 (5.63)	79	8.58 (4.67)	0.074	–
	Sex (Male)	4	0.4	44	0.48	0.639	–
	rs4646994 Codominance DD	3	0.3	37	0.41	–	–
	rs4646994 Codominance DI	7	0.7	33	0.37	0.188	–
	rs4646994 Codominance II	0	0	20	0.22	0.994	–
	rs4646994 I allele dominance (DI + II)	7	0.7	53	0.59	0.5	–
	rs4646994 D allele dominance (DD + DI)	10	1	70	0.78	0.991	–

sd, standard deviation; OR, Odds ratio; CI, confidence interval; ΔCT, cycle threshold rate; exploring the variables age, sex rs4646994 polymorphism and ACE1, ACE2 and TMPRSS2 genes expression levels for the presence (yes/case) or absence (no/control) of anosmia or ageusia. The variable “DD +DI” corresponds to the dominance of the D allele and the variable “DI +II” corresponds to the dominance of the I allele.

(Aghagoli et al., 2021). A recent meta-analysis showed that the 287bp deletion in the *ACE1* gene is associated with the prognosis of severe COVID-19 (de Araújo et al., 2022). Nonetheless, the authors have not evaluated long-term health disorders yet. In this study, age and sex did not correlate with onset of anosmia and ageusia. However, age and sex remain important variables in the prognosis of COVID-19. Several studies have shown higher frequencies of disease severity and death in elderly individuals (Izcovich et al., 2020; Izurieta et al., 2020). Sex has also been a factor in COVID-19 prognosis and mortality, mainly affecting male individuals (Ghamrawi and Gunaratne, 2020; Izurieta et al., 2020). A prospective observational cohort study of COVID-19 analyzed 4,182 individuals who self-reported their symptoms in the “COVID Symptom Study app”- a mobile health app developed by Zoe Global (Sudre et al., 2021). In the study, those with long-term COVID were mostly individuals over 70 and more likely to be female.

Currently, evidence indicates that SARS-CoV-2 does not affect only the respiratory tract but also the CNS, which has resulted in symptoms such as anosmia, ageusia, headache, fatigue, nausea, vomiting, acute cerebrovascular disease, and altered consciousness (Conde Cardona et al., 2020; Huang et al., 2020; Meinhardt et al., 2021). Anosmia rates are lower among patients infected by the Gamma and Omicron strains

than the original strain. Besides that, no differences were observed between the original strain and the Delta variant (Cardoso et al., 2022).

Here we started to raise the hypothesis and discuss whether there is a bridge linking initial symptoms, such as anosmia and ageusia, modulation of molecular factors expression, to long-COVID, which is the long-term COVID-19 health consequences experienced by an increasing number of patients. There are five types of specialized cells in the olfactory epithelium, namely the sustentacular cells, basal cells, microvillar cells, the olfactory sensory neurons (OSNs), and the ductal cells of Bowman’s glands (Riel et al., 2015; Ahmed et al., 2022). The expression of the input factors of SARS-CoV-2 in the olfactory epithelium, resulting in loss of OSNs, may lead to anosmia. Smell and taste disorders are related to our general and mental health and can be early indicators of CNS compromises (Brechtbühl et al., 2021; Glezer et al., 2021).

A study investigating viral entry sites and sensory symptoms in mice found that the virus can target chemosensory cells of the gustatory and olfactory systems (Brechtbühl et al., 2021). Although the direct action of the virus on these cells is not fully elucidated, mechanisms of cytopathic destruction impact sense of smell and taste, and this impairment could directly contribute to anosmia and ageusia in the long term (Cazzolla

et al., 2020; Brechbühl et al., 2021; Muus et al., 2021). Herein, we have not observed differences in viral load between patients with anosmia and ageusia and the respective controls, suggesting that other mechanisms or factors may be involved in developing long-COVID syndrome.

There are several symptoms related to COVID-associated cognitive impairment, which are persistent and worsen the quality of life of COVID-19 survivors (Becker, 2021; Nasserie et al., 2021). Long-COVID syndrome is associated with impaired concentration, information processing, memory, executive functioning, anxiety, depression, panic syndrome, sleep disorder, and fatigue. COVID-dependent cognitive impairments contribute substantially to reduced global functioning. Long-COVID syndrome has been described to typically last up to 6 to 12 months but can last indefinitely in some individuals (Orrù et al., 2021; Titze-de-Almeida et al., 2022).

In a study (de Paula et al., 2022) performed with 195 individuals with mild COVID-19, 26% had a visuoconstructive deficiency, a typical early manifestation of Alzheimer's disease. There was also increased expression of 11 plasma biomarkers, including chemokines and growth factors. These biomarkers showed a strong positive correlation with the degree of cognitive impairment. The disability has persisted for up to a year after diagnosis. People who had mild COVID-19 and were not hospitalized in the two to ten months before enrollment, and without comorbidities were included. Most of the volunteers are health professionals who work in the hospital region and learned about the study through advertisements made by the institutions. The mean age of the cohort was 38 years (de Paula et al., 2022).

A group from England recently published a robust study involving 785 participants (aged 51–81) with COVID (Douaud et al., 2022), including patients with only mild COVID-19 symptoms. Limbic brain imaging was obtained twice and compared to 384 non-infected controls. They identified a consistent spatial pattern of longitudinal anomalies in limbic brain regions forming a mainly olfactory network, including a greater reduction in global brain size.

The authors hypothesized that the results could represent the hallmarks of the degenerative spread of the disease *via* olfactory pathways, neuroinflammatory events, or loss of sensory input due to anosmia and suggested longer follow-up periods to evaluate these effects. Brain atrophy (due to the loss of input received from the nose) is the only plausible explanation for linking anosmia symptoms in COVID-19 to brain/cognitive symptoms seen in long-COVID Syndrome (Marshall, 2022).

Our group hypothesized that, in addition to viral entry into cells in the CNS, there are signaling pathways activated during the COVID-19 that disrupt the brain homeostasis, thereby leading to long term neurocognitive consequences. As such,

anosmia and ageusia could be the early events heralding the neurocognitive changes of long-COVID-19 syndrome. A better understanding of anosmia and ageusia may improve our knowledge of long-lasting cognitive disorders, including long-COVID-19. Future studies will investigate the relative expression of key olfactory and sustentacular cell marker genes in samples collected from post-COVID-19 patients (six months to one year after contracting COVID-19) with or without anosmia and/or ageusia, using neuropsychological tests (de Paula et al., 2022).

To the best of our knowledge, this is the first study utilizing gene expression in nasopharyngeal swab samples of COVID-19 patients to identify expression differences associated with anosmia and ageusia. Future directions include testing a higher number of putative target genes with longer symptom follow-up to obtain better associations between expression differences and long-COVID-19 symptoms and duration. A better understanding of the genes modulated in association with initial anosmia and ageusia may bright light on the signaling pathway alterations that are associated with neurologic symptoms of COVID-19 and the development of long-COVID-19 syndrome and lay the groundwork for pharmacologic therapies that interfere with pathologic signaling changes.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Certificado de Apresentação de Apreciação Ética: CAAE 32224420.3.0000.0008 and CAAE 31462820.3.0000.5149. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

DB and RS conceived the study. IB-P, JA, REA, RS, and DB designed the experiments. IB-P, JA, HA, and RS performed the experiments. IB-P, JA, RSA, RS, and DB interpreted the results and analyzed the data. RSA, RS, and DB contributed with material and analysis tools. REA, GR and MT were responsible for subject's recruitment and clinical follow-up. IB-P, JA, and DB wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The authors wish to thank the following funding sources: Rede Corona-ômica BR MCTI/FINEP affiliated to RedeVirus/ MCTI (FINEP 01.20.0029.000462/20, CNPq 404096/2020-4), MEC/CAPES (14/2020-23072.211119/2020-10), FINEP (0494/20 01.20.0026.00 and UFMG-NB3 1139/20), FAPEMIG (RPS:APQ-00475-20), FAPERJ (RSA 202.922/2018) and CAPES(88881.506612/2020-0). RPS, RSA, and DB are recipients of CNPq Fellowships.

Acknowledgments

The authors also thank BioMed Proofreading LLC for the English language editing of this manuscript.

References

- Aghagholi, G., Gallo Marin, B., Katchur, N. J., Chaves-Sell, F., Asaad, W. F., and Murphy, S. A. (2021). Neurological involvement in COVID-19 and potential mechanisms: A review. *Neurocrit. Care* 34, 1062–1071. doi: 10.1007/s12028-020-01049-4
- Ahmed, A. K., Sayad, R., Mahmoud, I. A., EL-Monem, A. M. A., Badry, S. H., Ibrahim, I. H., et al. (2022). “Anosmia” the mysterious collateral damage of COVID-19. *J. Neurovirol.* 28(2), 189–200. doi: 10.1007/s13365-022-01060-9
- Becker, R. C. (2021). COVID-19 and its sequelae: A platform for optimal patient care, discovery and training. *J. Thromb. Thrombolysis* 51, 587–594. doi: 10.1007/s11239-021-02375-w
- Brechbühl, J., Lopes, A. C., Wood, D., Bouteiller, S., de Vallière, A., Verdumo, C., et al. (2021). Age-dependent appearance of SARS-CoV-2 entry sites in mouse chemosensory systems reflects COVID-19 anosmia-ageusia symptoms. *Commun. Biol.* 4, 1–12. doi: 10.1038/s42003-021-02410-9
- Cardoso, C. C., Rossi, Á. D., Galliez, R. M., Faffe, D. S., Tanuri, A., and Castiñeiras, T. M. P. P. (2022). Olfactory dysfunction in patients with mild COVID-19 during gamma, delta, and omicron waves in Rio de Janeiro, Brazil. *JAMA* 328(6), 582–583. doi: 10.1001/jama.2022.11006
- Castellon, R., and Hamdi, H. (2007). Demystifying the ACE polymorphism: From genetics to biology. *Curr. Pharm. Des.* 13, 1191–1198. doi: 10.2174/138161207780618902
- Cazzolla, A. P., Lovero, R., Lo Muzio, L., Testa, N. F., Schirinzi, A., Palmieri, G., et al. (2020). Taste and smell disorders in COVID-19 patients: Role of interleukin-6. *ACS Chem. Neurosci.* 11, 2774–2781. doi: 10.1021/acschemneuro.0c00447
- Choi, J. Y., and Smith, D. M. (2021). SARS-CoV-2 variants of concern. *Yonsei Med. J.* 62, 961–968. doi: 10.3349/ymj.2021.62.11.961
- Choudhary, S., Sreenivasulu, K., Mitra, P., Misra, S., and Sharma, P. (2020). Role of genetic variants and gene expression in the susceptibility and severity of COVID-19. *Ann. Lab. Med.* 41, 129–138. doi: 10.3343/alm.2021.41.2.129
- Conde Cardona, G., Quintana Pájaro, L. D., Quintero Marzola, I. D., Ramos Villegas, Y., and Moscote Salazar, L. R. (2020). Neurotropism of SARS-CoV 2: Mechanisms and manifestations. *J. Neurol. Sci.* 412, 116824. doi: 10.1016/j.jns.2020.116824
- D’ardès, D., Boccatonda, A., Rossi, I., Guagnano, M. T., Santilli, F., Cipollone, F., et al. (2020). COVID-19 and RAS: Unravelling an unclear relationship. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–8. doi: 10.3390/ijms21083003
- de Araújo, J. L. F., Menezes, D., de Aguiar, R. S., and de Souza, R. P. (2022). IFITM3, FURIN, ACE1, and TNF- α genetic association with COVID-19 outcomes: Systematic review and meta-analysis. *Front. Genet.* 13. doi: 10.3389/fgene.2022.775246
- de Paula, J. J., Paiva, R. E. R. P., Souza-Silva, N. G., Rosa, D. V., Duran, F. L., de, S., et al. (2022). Selective visuoconstruction impairment following mild COVID-19 with inflammatory and neuroimaging correlation findings. *Mol. Psychiatry.* doi: 10.1038/s41380-022-01632-5
- Douaou, G., Lee, S., Alfaro-Almagro, F., Arthofer, C., Wang, C., McCarthy, P., et al. (2022). SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK biobank. *Nature* 604, 697–707. doi: 10.1038/s41586-022-04569-5

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- Farid, H., Khan, M., Jamal, S., and Ghafoor, R. (2022). Oral manifestations of covid-19-A literature review. *Rev. Med. Virol.* 32, 1–12. doi: 10.1002/rmv.2248
- Galisa, S. L. G., Almeida, R. M., de, S., Soares, A. R. A. P., Ribeiro, R. R. A., Pereira, F. R. A., et al. (2021). Influência da suscetibilidade genética na incidência e mortalidade de COVID-19 (SARS-CoV-2). *Res. Soc. Dev.* 10, e31810111812. doi: 10.33448/rsd-v10i1.11812
- Ghamrawi, R., and Gunaratne, M. (2020). COVID-19 and sex differences. *Mayo Clin. Proc.* 95, 2189–2203. doi: 10.1016/j.mayocp.2020.07.024
- Glezer, I., Bruni-Cardoso, A., Schechtman, D., and Malmic, B. (2021). Viral infection and smell loss: The case of COVID-19. *J. Neurochem.* 157, 930–943. doi: 10.1111/jnc.15197
- Hopkins, C., Surda, P., Whitehead, E., and Kumar, B. N. (2020). Early recovery following new onset anosmia during the COVID-19 pandemic - an observational cohort study. *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 49, 1–6. doi: 10.1186/s40463-020-00423-8
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in wuhan, China. *Lancet* 395, 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- Izcovich, A., Ragusa, M. A., Tortosa, F., Lavena Marzio, M. A., Agnoletti, C., Bengolea, A., et al. (2020). Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. *PLoS One* 223(6), 945–956. doi: 10.1371/journal.pone.0241955
- Izurieta, H. S., Graham, D. J., Jiao, Y., Hu, M., Lu, Y., Wu, Y., et al. (2020). Natural history of coronavirus disease 2019: Risk factors for hospitalizations and deaths among <26 million US Medicare beneficiaries. *J. Infect. Dis.* doi: 10.1093/infdis/jiaa767
- Johnson, B. A., Xie, X., Bailey, A. L., Kalveram, B., Lokugamage, K. G., Muruato, A., et al. (2021). Loss of furin cleavage site attenuates SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature* 591, 293–299. doi: 10.1038/s41586-021-03237-4
- Lechien, J. R., Chiesa-Estomba, C. M., De Siaty, D. R., Horoi, M., Le Bon, S. D., Rodriguez, A., et al. (2020). Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): A multicenter European study. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 277, 2251–2261. doi: 10.1007/s00405-020-05965-1
- Marshall, M. (2022). COVID and smell loss: Answers begin to emerge. *Nature.* 606(7915), 631–632. doi: 10.1038/d41586-022-01589-z
- Martínez-Gómez, L. E., Herrera-López, B., Martínez-Armenta, C., Ortega-Peña, S., Camacho-Rea, M., del, C., et al. (2022). ACE and ACE2 gene variants are associated with severe outcomes of COVID-19 in men. *Front. Immunol.* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.812940
- Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C., Franz, J., Thomas, C., Mothes, R., et al. (2021). Olfactory transmembrane SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat. Neurosci.* 24, 168–175. doi: 10.1038/s41593-020-00758-5
- Meng, X., and Pan, Y. (2021). COVID-19 and anosmia: The story so far. *Ear Nose Throat J.* 0, 1–9. doi: 10.1177/01455613211048998

- Mistry, P., Barmania, F., Mellet, J., Peta, K., Strydom, A., Viljoen, I. M., et al. (2021). SARS-CoV-2 variants, vaccines, and host immunity. *Front. Immunol.* 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.809244
- Muus, C., Luecken, M. D., Eraslan, G., Sikkema, L., Waghay, A., Heimberg, G., et al. (2021). Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nature Medicine*. 27, 546–559. doi: 10.1038/s41591-020-01227-z
- Nasserie, T., Hittle, M., and Goodman, S. N. (2021). Assessment of the frequency and variety of persistent symptoms among patients with COVID-19: A systematic review. *JAMA Netw. Open* 4, 1–19. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.11417
- Orrù, G., Bertelloni, D., Diolaiuti, F., Mucci, F., Di Giuseppe, M., Biella, M., et al. (2021). Long-covid syndrome? A study on the persistence of neurological, psychological and physiological symptoms. *Healthc* 9, 1–15. doi: 10.3390/healthcare9050575
- Pedro, N., Silva, C. N., Magalhães, A. C., Cavadas, B., Rocha, A. M., Moreira, A. C., et al. (2021). Dynamics of a dual SARS-CoV-2 lineage Co-infection on a prolonged viral shedding COVID-19 case: Insights into clinical severity and disease duration. *Microorganisms* 9(2), 300. doi: 10.3390/microorganisms9020300
- Raman, R., Patel, K. J., and Ranjan, K. (2021). COVID-19: Unmasking emerging SARS-CoV-2 variants, vaccines and therapeutic strategies. *Biomolecules* 11(7), 993. doi: 10.3390/biom11070993
- Riel, D., Verdijk, R., and Kuiken, T. (2015). The olfactory nerve: A shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *J. Pathol.* 235, 277–287. doi: 10.1002/path.4461
- Rossi, Á. D., de Araújo, J. L. F., de Almeida, T. B., Ribeiro-Alves, M., de Almeida Velozo, C., Almeida, J. M., et al. (2021). Association between ACE2 and TMPRSS2 nasopharyngeal expression and COVID-19 respiratory distress. *Sci. Rep.* 11(1), 9658. doi: 10.1038/s41598-021-88944-8
- Saad, H., Jabotian, K., Sakr, C., Mahfouz, R., Akl, I. B., and Zgheib, N. K. (2021). The role of angiotensin converting enzyme 1 Insertion/Deletion genetic polymorphism in the risk and severity of COVID-19 infection. *Front. Med.* 8. doi: 10.3389/fmed.2021.798571
- Sardu, C., Gambardella, J., Morelli, M. B., Wang, X., Marfella, R., and Santulli, G. (2020). Hypertension, thrombosis, kidney failure, and diabetes: Is COVID-19 an endothelial disease? A comprehensive evaluation of clinical and basic evidence. *J. Clin. Med.* 9(5), 1417. doi: 10.3390/jcm9051417
- Sudre, C. H., Murray, B., Varsavsky, T., Graham, M. S., Penfold, R. S., Bowyer, R. C., et al. (2021). Attributes and predictors of long-COVID. *Nat. Med.* 27, 626–631. doi: 10.1038/s41591-021-01292-y
- Titze-de-Almeida, R., da Cunha, T. R., dos Santos Silva, L. D., Ferreira, C. S., Silva, C. P., Ribeiro, A. P., et al. (2022). Persistent, new-onset symptoms and mental health complaints in long-COVID in a Brazilian cohort of non-hospitalized patients. *BMC Infect. Dis.* 22, 1–11. doi: 10.1186/s12879-022-07065-3
- Whitcroft, K. L., and Hummel, T. (2020). Olfactory dysfunction in COVID-19: Diagnosis and management. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 323, 2512–2514. doi: 10.1001/jama.2020.8391
- Yazdanpanah, N., Saghadzadeh, A., and Rezaei, N. (2020). Anosmia: A missing link in the neuroimmunology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Rev. Neurosci.* 31, 691–701. doi: 10.1515/revneuro-2020-0039
- Zawilska, J. B., Lagodzinski, A., and Berezinska, M. (2021). COVID-19: from the structure and replication cycle of SARS-CoV-2 to its disease symptoms and treatment. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Polish Physiol. Soc* 72(4), 479–501. doi: 10.26402/jpp.2021.4.01
- Zhong, M., Lin, B., Pathak, J. L., Gao, H., Young, A. J., Wang, X., et al. (2020). ACE2 and furin expressions in oral epithelial cells possibly facilitate COVID-19 infection via respiratory and fecal–oral routes. *Front. Med.* 7. doi: 10.3389/fmed.2020.580796

COPYRIGHT

© 2022 Braga-Paz, Ferreira de Araújo, Alves, de Ávila, Resende, Teixeira, de Aguiar, de Souza and Bahia. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.