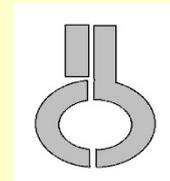


CORONAVIRUS

Microbiologia Básica para Farmácia – BMM160

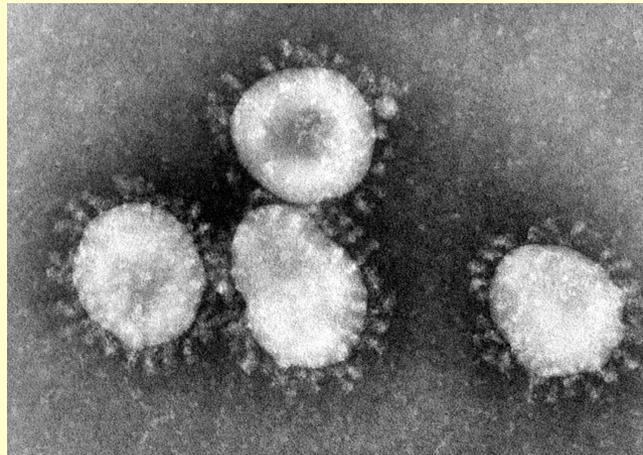
Prof. Armando Ventura

As figuras desta apresentação que têm direitos autorais, são aqui utilizadas para ensino sem fins lucrativos.



Os coronavírus são envelopados e possuem genoma RNA fita simples de polaridade positiva variando de 26 a 32 kb, e estão entre os maiores de vírus RNA.

Inicialmente foram agrupados devido à característica marcante, lembrando coroa, à microscopia eletrônica.



Os coronavírus causam doenças em mamíferos e aves.

O primeiro a ser caracterizado foi o IBV (infectious bronchitis vírus) em 1933, que afeta criações de galinhas.

Nos anos 1961 e 62 foram isolados de humanos, como causa de resfriado comum.

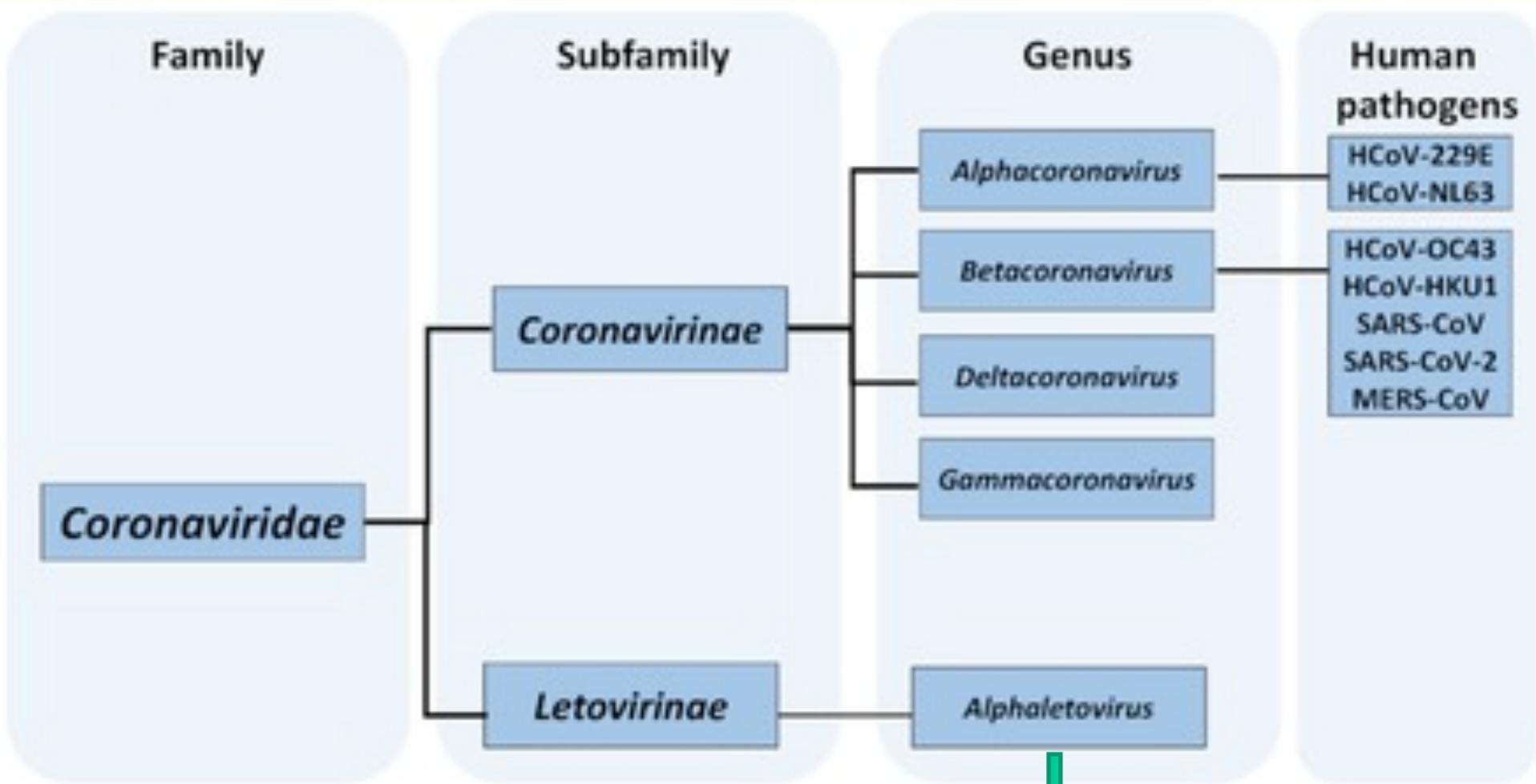
Em humanos também causam síndromes respiratórias graves.

Em aves doenças respiratórias diversas.

Em suínos e bovinos diarreia.

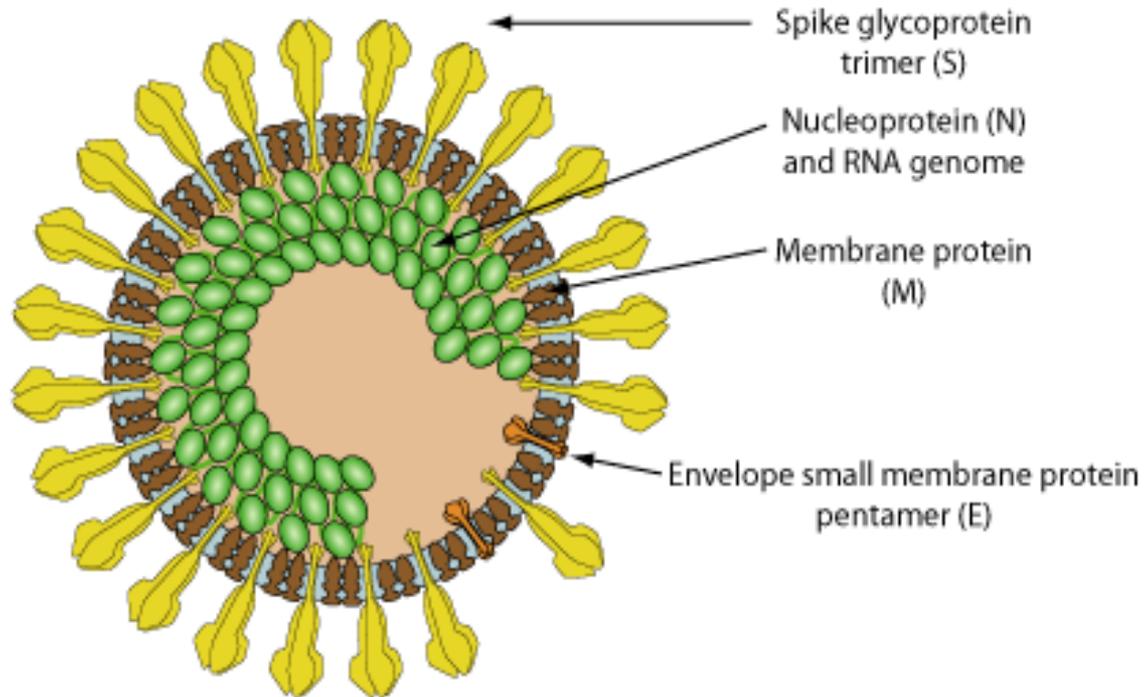
Em camundongos hepatite.

Morcegos também são infectados, até agora não há caracterização de patologias, e atuam como reservatório.



Anfibios

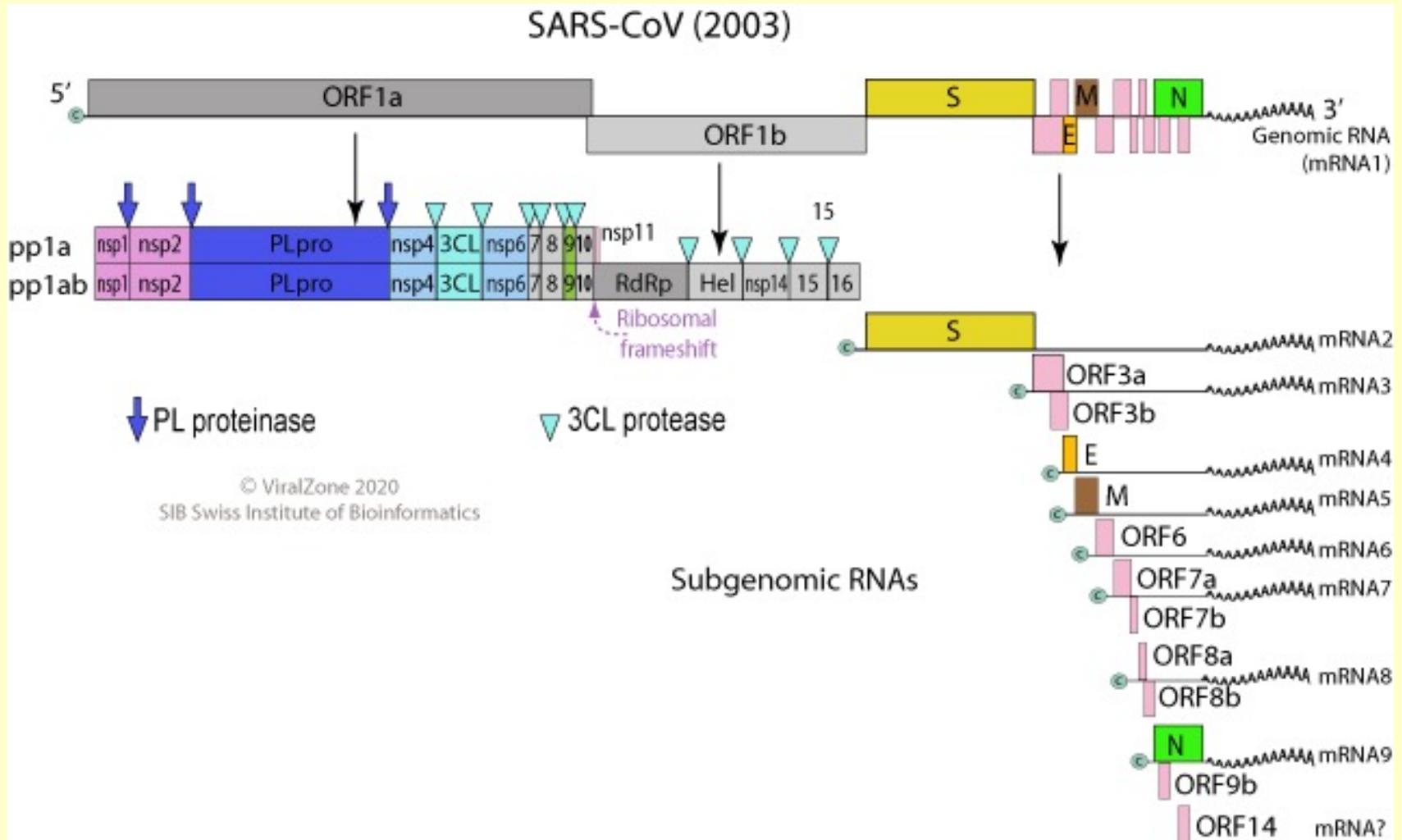
ESTRUTURA



© ViralZone 2020

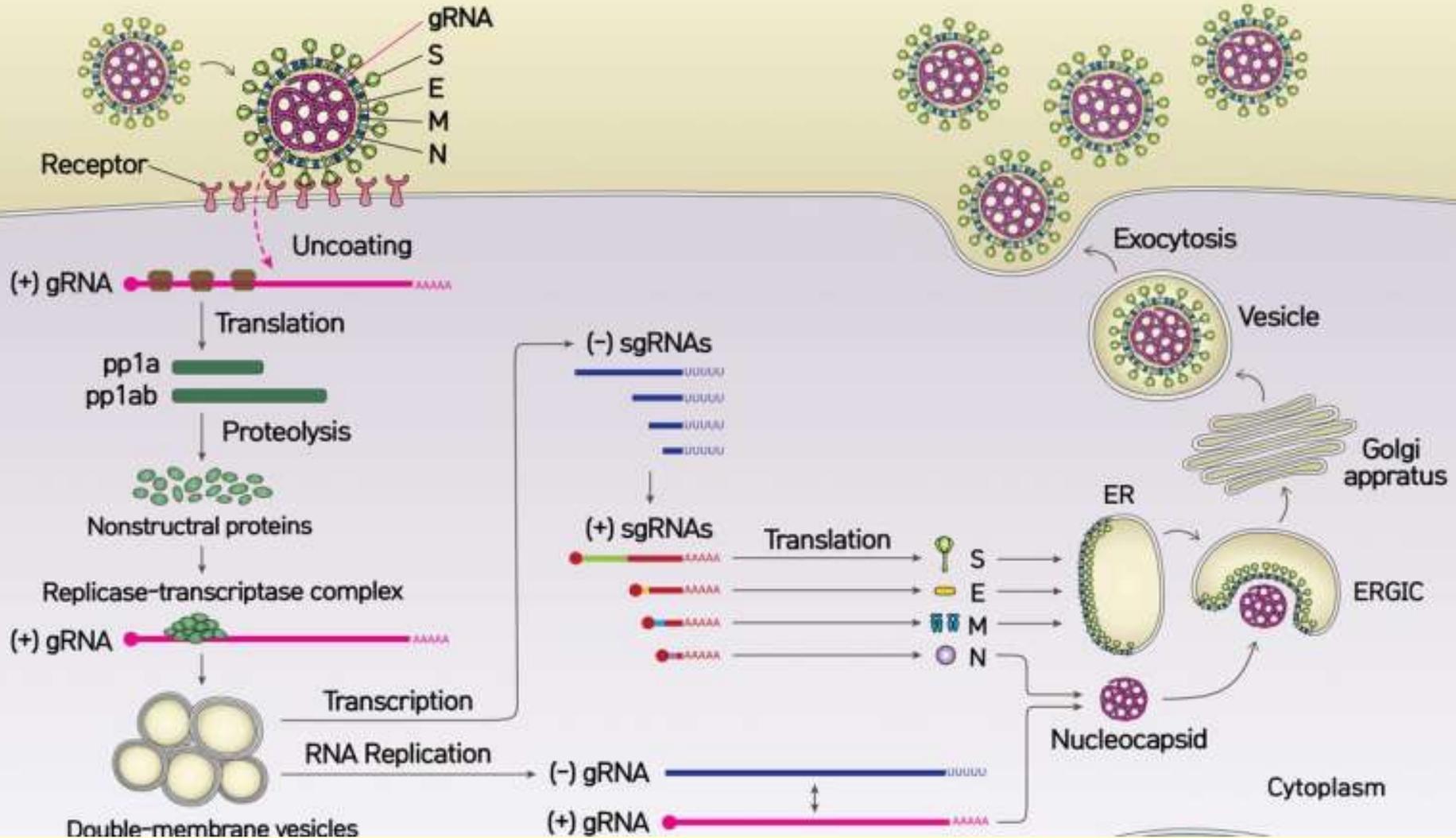
SIB Swiss Institute of Bioinformatics

GENOMA



REPLICAÇÃO

Endocitose ou fusão



PODE OCORRER CO-INFEÇÃO LEVANDO À RECOMBINAÇÃO

SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*)

2003, Guangdong China, 8.098 casos e 774 mortes
taxa de mortalidade de cerca de 9% (até 2014)

MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*)

2012, 855 casos e 333 mortes
taxa de mortalidade de cerca de 40% (até 2014)

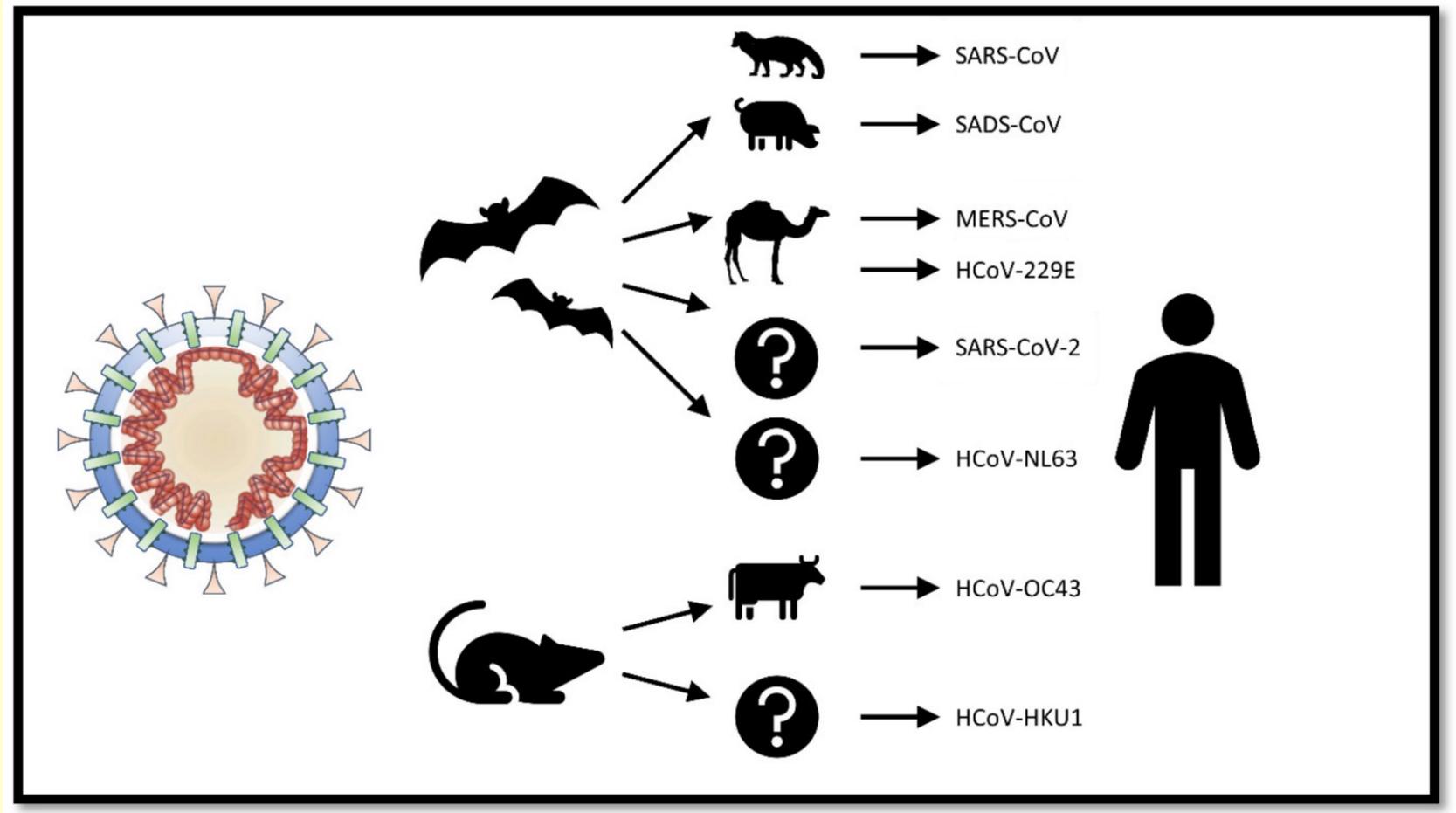
Antes desses dois surtos, acreditava-se que os
coronavírus causavam apenas infecções brandas do trato
respiratório e auto limitantes em humanos.

Em seguida surgiu a

Covid-19 provocada pelo SARS-Cov-2
Dezembro de 2019, Wuhan, Hubei, China

EVOLUÇÃO RÁPIDA

Saltos interespécies



HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1
causam sintomas leves. Resfriados sazonais.
SADS-Cov (Swine acute diarrhea syndrome coronavirus).

RECEPTORES DE DIFERENTES CORONAVÍRUS

A maioria dos α coronavirus (como HCoV-229E e TGEV) empregam aminopeptidase N (APN) como receptor.

TGEV (gastroenterite transmissível de porcos), usa aminopeptidase-N (pAPN) de porcos, verificou-se não usar a humana.

IBV (bronquite infecciosa de aves), usa ácido siálico, receptor genérico. Outras restrições impedem a quebra de barreira interespecies?

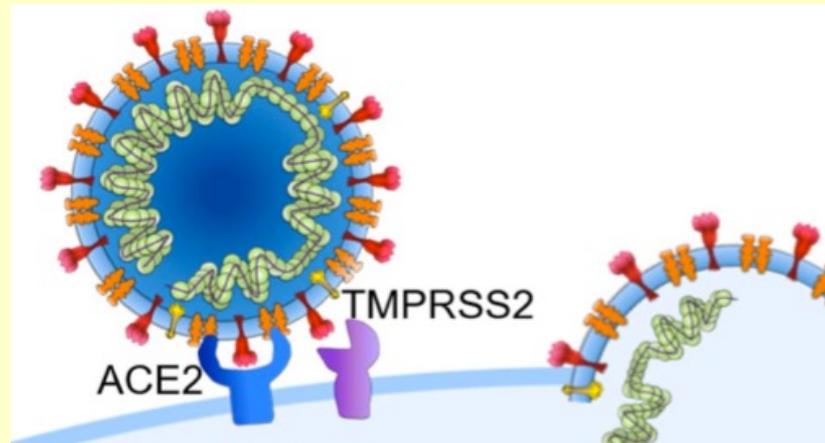
MERS-CoV liga à dipeptidil-peptidase 4 (DPP4).

HCoV-NL63, SARS-CoV, e SARS-CoV-2 utilizam enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor.

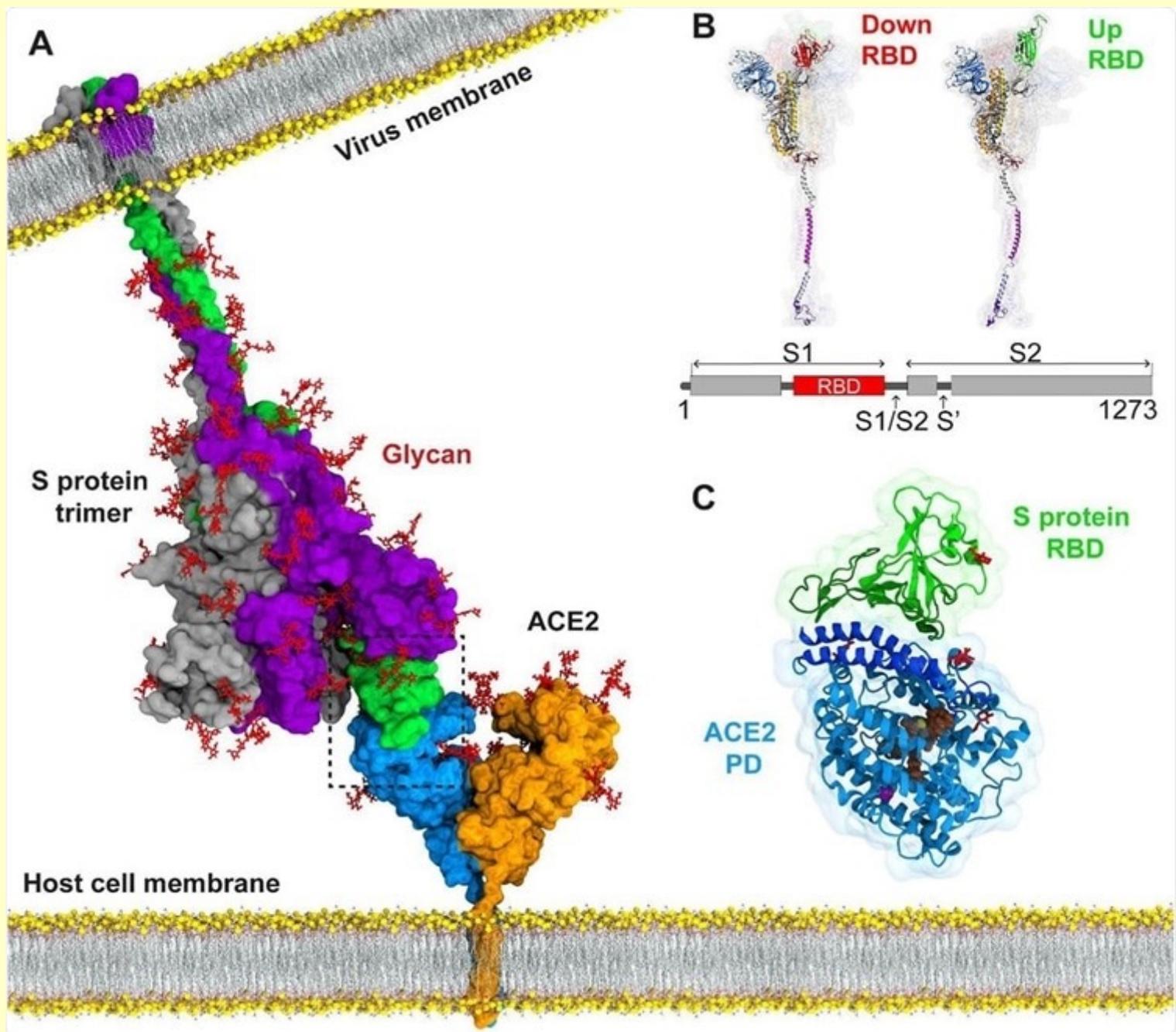
Receptores de coronavírus de morcegos são pouco caracterizados, mas há proximidade filogenética, de alguns deles com estes coronavírus humanos. Provável adaptação aos hospedeiros intermediários melhorou o “fitness”.

Enfocando um aspecto importante para os SARS-CoV:

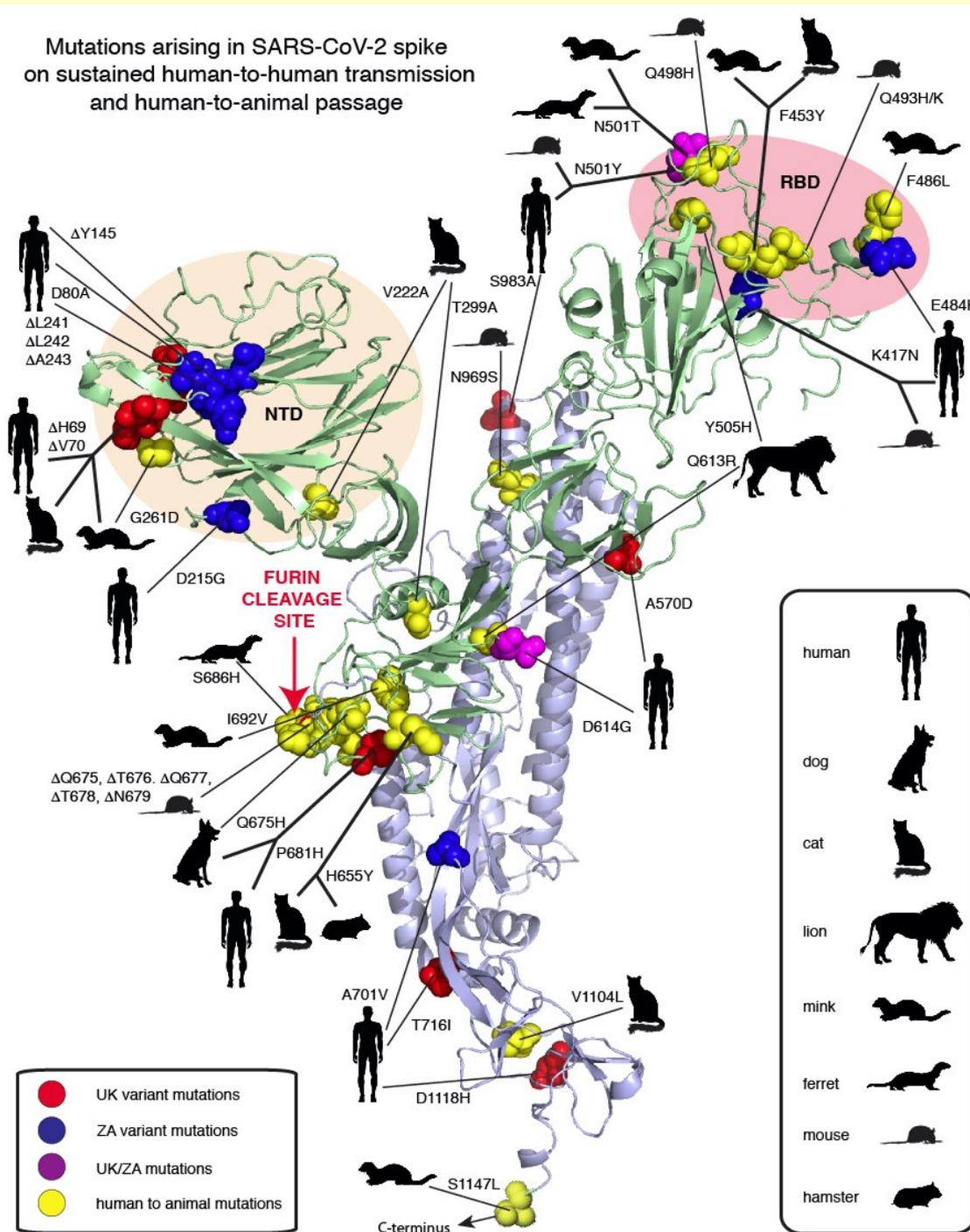
Depois da ligação ao receptor, o vírus precisa penetrar no citoplasma, o que é disparado pela clivagem proteolítica da proteína S por uma protease, TMPRSS2, ou outra protease para outros coronavírus, levando à fusão das membranas viral e celular.



Depfenhart, et al 2020



Mutations arising in SARS-CoV-2 spike on sustained human-to-human transmission and human-to-animal passage



Compilation of SARS-CoV-2 spike mutations occurring in humans and animals. Red spheres: United Kingdom (UK) variant, Blue spheres: South African (ZA) variant, Magenta: both UK/ZA variants, Yellow spheres: animals as indicated in the inset. NTD: Amino-terminal domain. RBD: Receptor binding domain. Mutations arising in SARS-CoV-2 spike on sustained human-to-human transmission and human-to-animal passage. Robert F. Garry 2021

Variante P1, mutações: K417T, E484K, N501Y no RBD

WHO: Home/Activities/Tracking SARS-CoV-2 variants

Currently designated Variants of Concern:

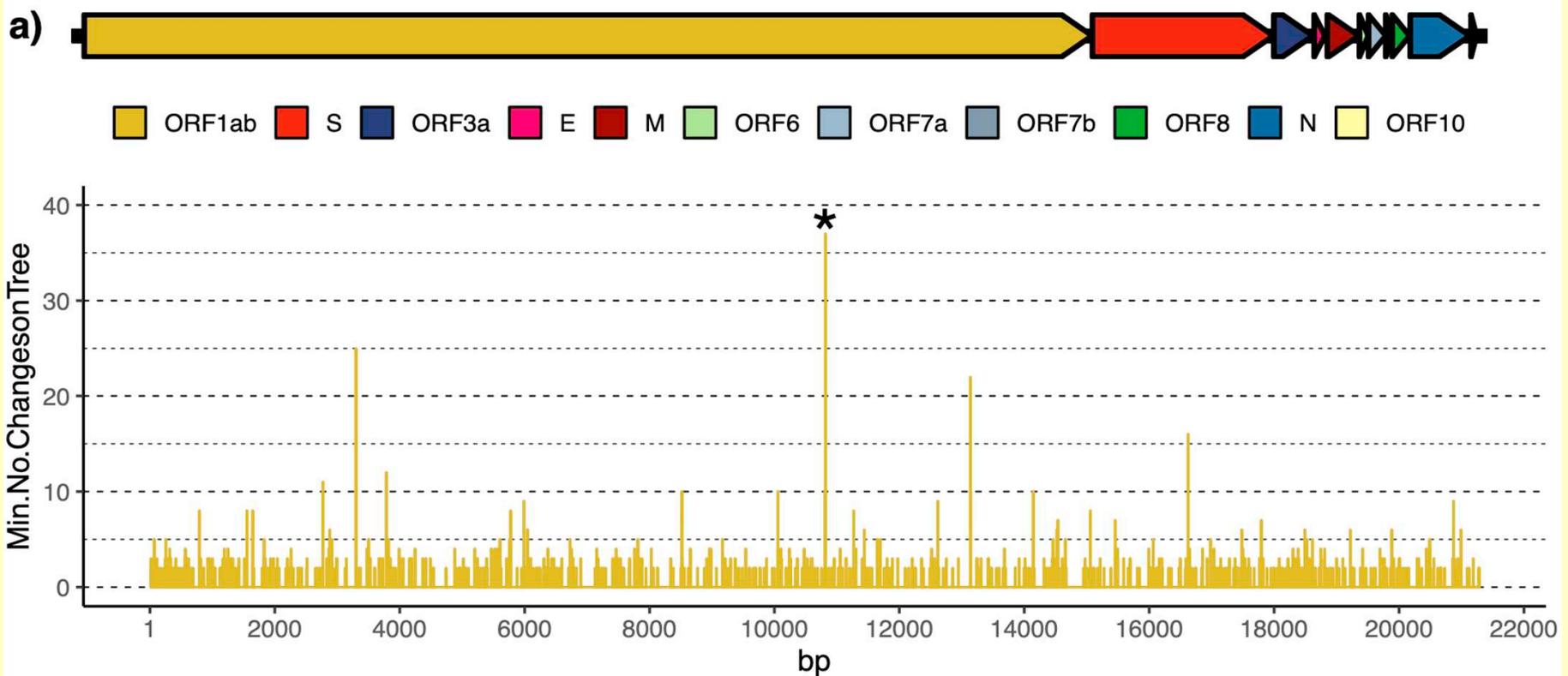
WHO label	Pango lineage*	GISAID clade	Nextstrain clade	Additional amino acid changes monitored*	Earliest documented samples	Date of designation
Alpha	B.1.1.7 #	GRY	20I (V1)	+S:484K +S:452R	United Kingdom, Sep-2020	18-Dec-2020
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	+S:L18F	South Africa, May-2020	18-Dec-2020
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	+S:681H	Brazil, Nov-2020	11-Jan-2021
Delta	B.1.617.2§	G/478K.V1	21A	+S:417N	India, Oct-2020	VOI: 4-Apr-2021 VOC: 11-May-2021

Currently designated Variants of Interest:

WHO label	Pango lineage*	GISAID clade	Nextstrain clade	Earliest documented samples	Date of designation
Eta	B.1.525	G/484K.V3	21D	Multiple countries, Dec-2020	17-Mar-2021
Iota	B.1.526	GH/253G.V1	21F	United States of America, Nov-2020	24-Mar-2021
Kappa	B.1.617.1	G/452R.V3	21B	India, Oct-2020	4-Apr-2021
Lambda	C.37	GR/452Q.V1	21G	Peru, Dec-2020	14-Jun-2021

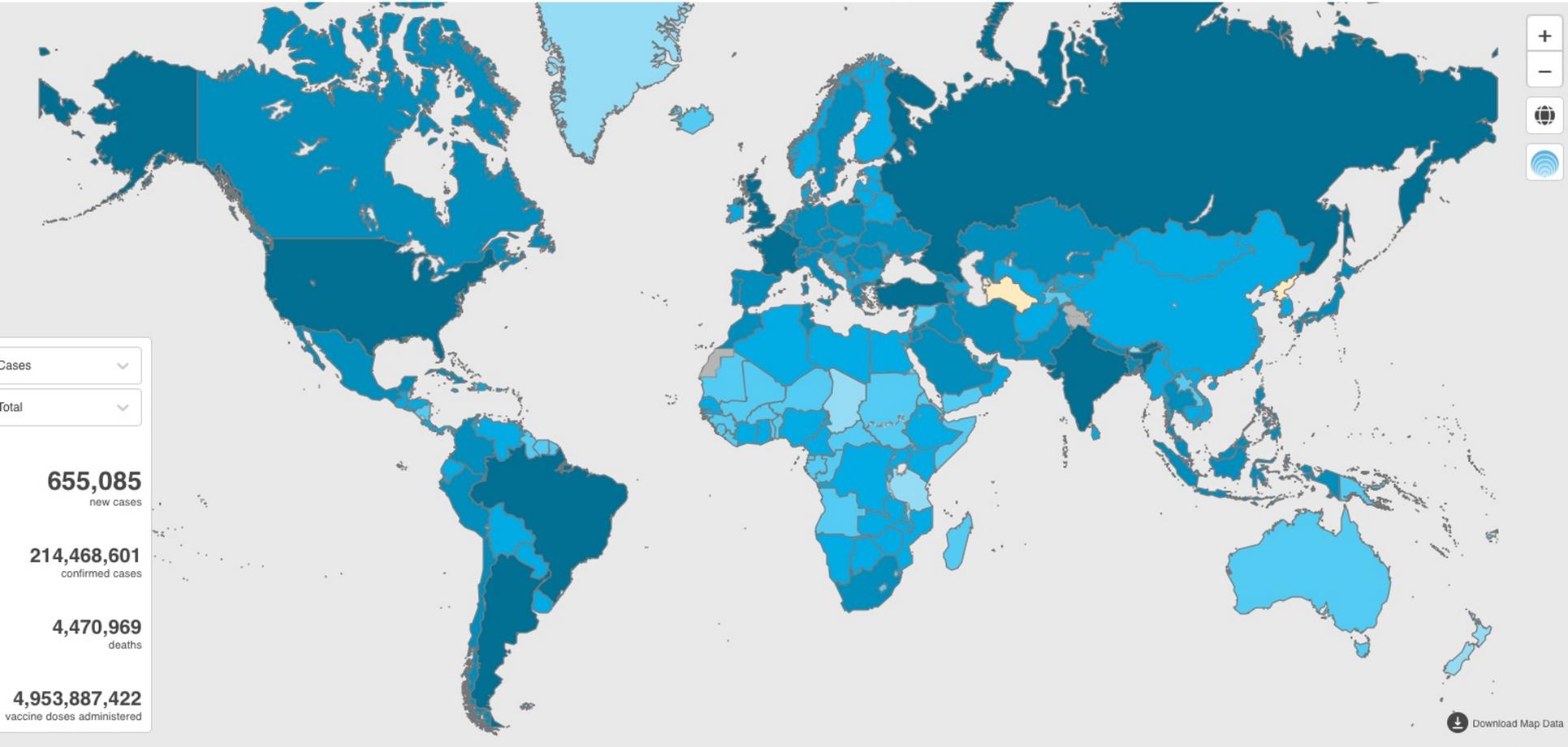
*includes all descendent lineages. The full list of Pango lineages can be found here: https://cov-lineages.org/lineage_list.html; for FAQ, visit: <https://www.pango.network/faqs/>

VARIAÇÕES EM OUTROS GENES?



Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2
van Dorp et al 2020 *Infection, Genetics and Evolution* 83 (2020) 104351

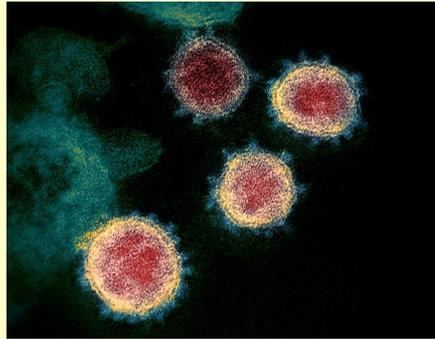
By focusing on mutations which have emerged independently multiple times (homoplasies), we identify 198 filtered recurrent mutations in the SARS-CoV-2 genome. Nearly 80% of the recurrent mutations produced non-synonymous changes at the protein level, suggesting possible ongoing adaptation of SARS-CoV-2. Three sites in Orf1ab in the regions encoding Nsp6, Nsp11, Nsp13, and one in the Spike protein are characterised by a particularly **large number of recurrent mutations (>15 events)** which may signpost convergent evolution and are of particular interest in the context of **adaptation of SARS-CoV-2 to the human host**.



Globally, as of 5:33pm CEST, 27 August 2021, there have been 214.468.601 confirmed cases of COVID-19, including 4.470.969 deaths, reported to WHO. As of 25 August 2021, a total of 4.953.887.422 vaccine doses have been administered.



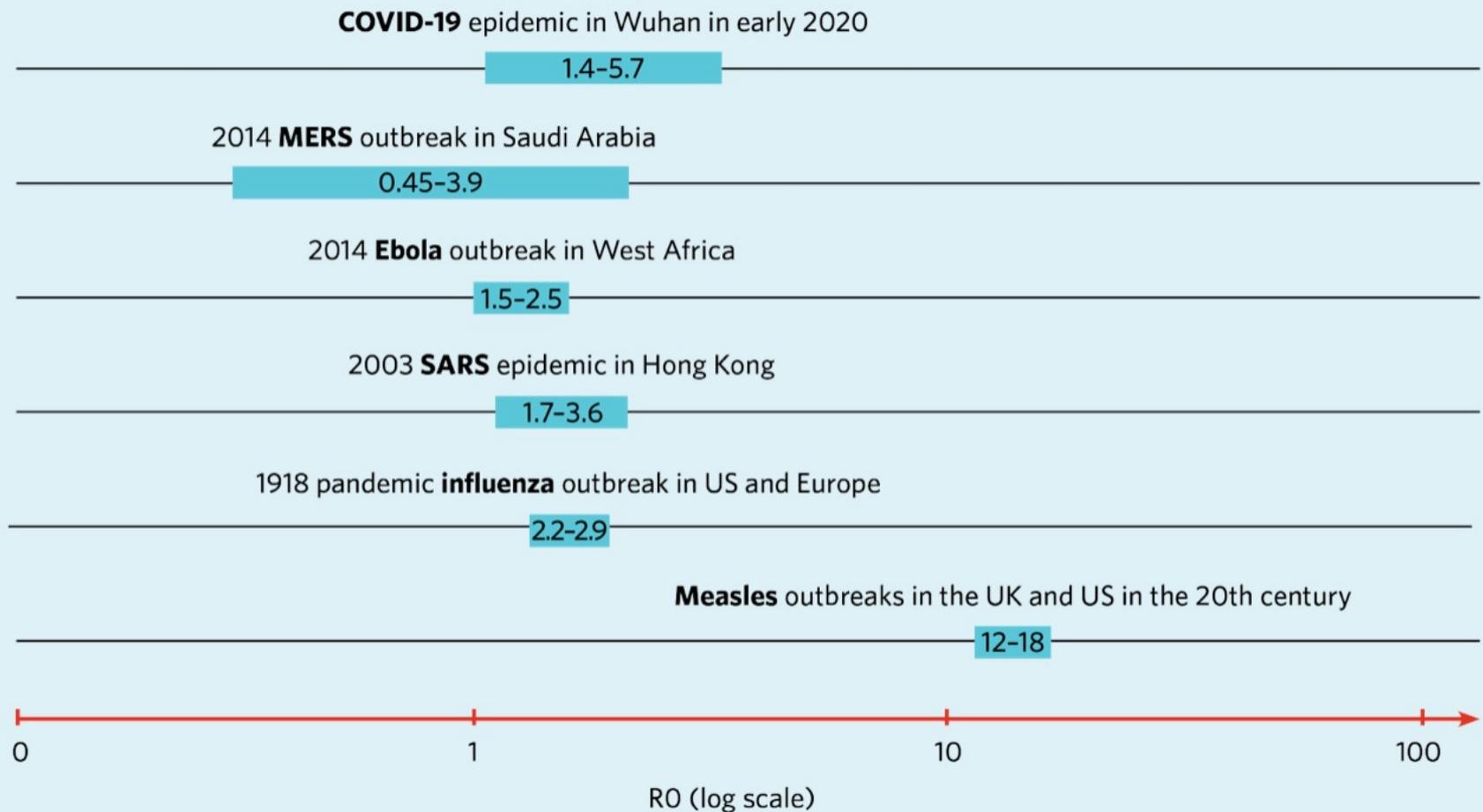
Name	Cases - cumulative total ⇅	Cases - newly reported in last 24 hours	Deaths - cumulative total	Deaths - newly reported in last 24 hours
Global	214.468.601	655.085	4.470.969	8.987
Americas	82.868.668 	255.667	2.088.341	3.813
Europe	64.512.867 	170.596	1.263.692	1.784
South-East Asia	40.918.552 	63.360	637.288	769
Eastern Mediterranean	14.373.395 	58.029	262.066	976
Western Pacific	6.227.848 	82.998	86.372	1.054
Africa	5.566.507 	24.435	133.197	591
 United States of Amer...	38.158.495 	169.512	628.456	1.231
 India	32.603.188 	44.658	436.861	496
 Brazil	20.645.537 	30.671	576.645	903



A transmissão acontece de uma pessoa doente para outra ou por contato próximo por meio de:

- Gotículas de saliva;
- Espirro;
- Tosse;
- Catarro;
- Toque do aperto de mão contaminadas;
- Objetos ou superfícies contaminadas, como celulares, mesas, talheres, maçanetas, brinquedos, teclados de computador etc.

TAXA DE TRANSMISSÃO



THE SCIENTIST STAFF

Varia ao longo do tempo, dependendo de vários fatores, como adesão ao isolamento social e outras medidas de prevenção.

O **período** médio de incubação é de 5 dias, com intervalos que chegam a 12 dias, **período** que os primeiros sintomas levam para aparecer desde a infecção.

Doença sistêmica, atinge vários tipos celulares.

Sintomas mais comuns:

- Tosse
- Febre
- Coriza
- Dor de garganta
- Dificuldade para respirar
- Perda de olfato (anosmia)
- Alteração do paladar (ageusia)
- Distúrbios gastrintestinais (náuseas/vômitos/diarreia)
- Cansaço (astenia)
- Diminuição do apetite (hiporexia)
- Dispnéia (falta de ar)

O desfecho pode ser a **Síndrome Respiratória Aguda Grave**, letal em parte dos casos, mesmo com internação.

Quanto ao percentual de **assintomáticos** há dados indicando 80% dos infectados. Porém, não há consenso sobre esse percentual.

DIAGNÓSTICO

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL SINTOMÁTICOS

- De biologia molecular para detecção do genoma **até o oitavo dia** de início dos sintomas.
RT-PCR, amostra de Swab nasal.
RT-PCR-LAMP, teste rápido (amplificação + sonda marcada), saliva.
- Imunológicos para detectar a presença de anticorpos em amostras coletadas **a partir do oitavo dia** de início dos sintomas.
ELISA - Ensaio imunoenzimático.
Imunocromatografia para detecção de anticorpos (teste rápido).
Imunocromatografia para detecção de antígenos virais (teste rápido).

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL ASSINTOMÁTICOS

Podem ser usados os mesmos métodos

Tratamento

Muitas drogas têm sido testadas *in vitro* e *in vivo*, quanto à capacidade de inibir o SARS-Cov-2, tanto já aprovadas para outras doenças (reposicionamento), quanto recém desenvolvidas.

Sistemas de “screening” em larga escala, em culturas celulares infectadas pelo SARS-Cov-2, têm sido utilizados para verificar se em painéis de drogas são identificadas potenciais candidatas a testes clínicos.

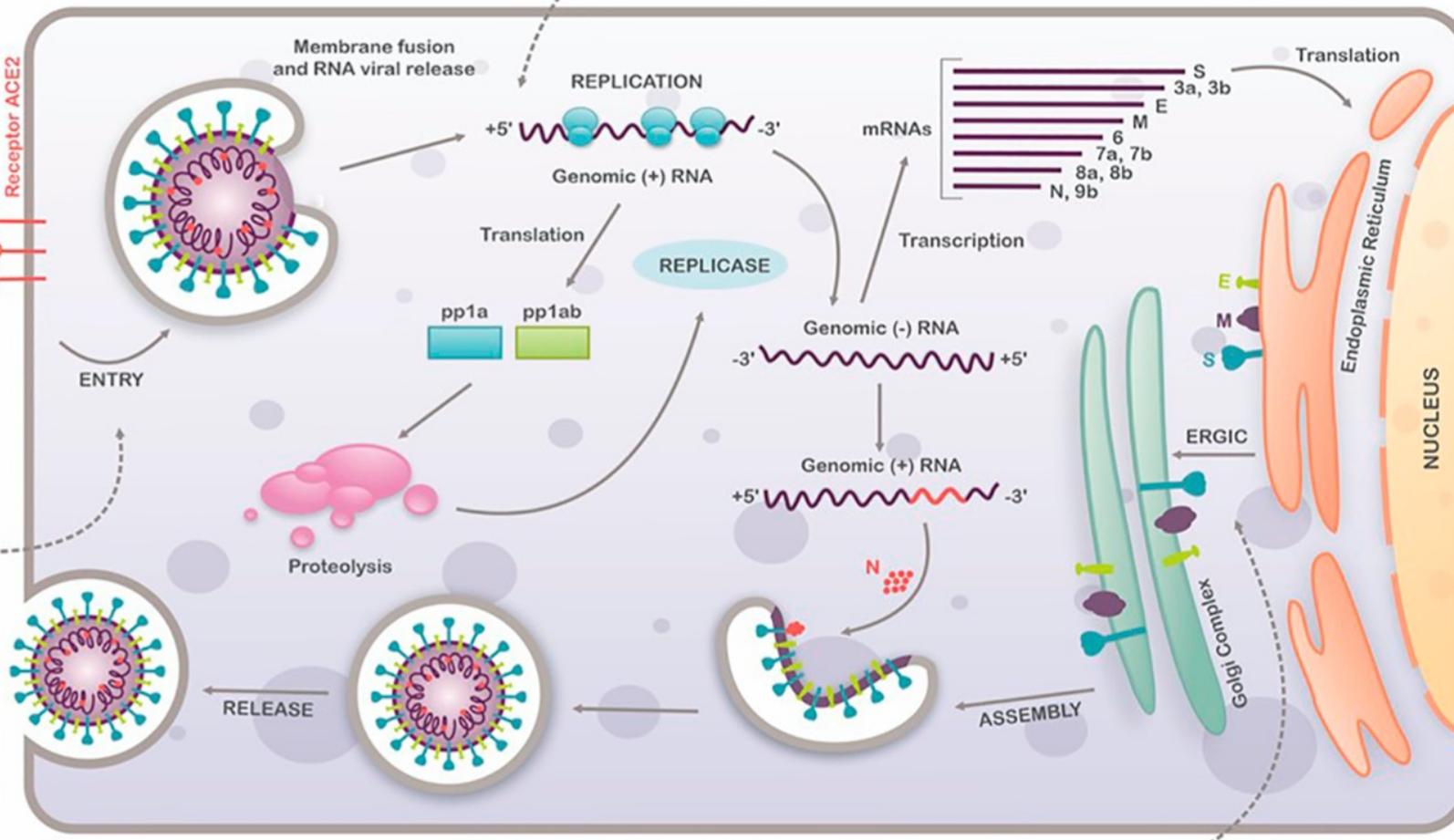
Sistemas “*in silico*” para buscar moléculas que se encaixem em sítios ativos de enzimas virais ou que interfiram na ligação receptor-anti receptor, têm sido adotados para orientar a síntese de potenciais novos antivirais.

Tratamento

REPLICATION
 AVLQSGFR; Phe-Phe dipeptide inhibitor C (JM1521); Dipeptidyl EP128533; GC373; GC376; β -D-N4-hydroxycytidine; 6-azauridine; 2-(benzylthio)-6-oxo-4-phenyl-1,6-dihydropyrimidine; Ribavirin; Acyclic sugar scaffold of acyclovir; Niclosamide; Mycophenolic acid (MPA); TP29 peptide; Bananins; Ivermectin, Remdesivir, Lopinavir/Ritonavir.

ENTRY
 NAAE; Glycyrrhizin; 2-acetamido- α -D-Glucopyranosylamine derivative; Tetrahydroquinoline oxocarbazate; SSAA09E1; SSAA09E2; SSAA09E3; Emodin; Griffithsin (GRFT); Eremomycin derivate 27; Eremomycin derivate 39; Mucroporin-M1; Tyr-Lys-Tyr-Arg-Tyr-Leu; TAPI-2; Monoclonal antibody 47D11; Chloroquine; Hydroxychloroquine; Convalescent Plasm.

HOST OR VIRAL ENZYMES
 Nitazoxanide; Tizoxanide; Saracatinib; Cyclosporin A (CsA); Alisporivir; Interference RNA (iRNAs); IFN- β ; Corticosteroids (dexamethasone); Tocilizumab.



Tratamento

Medicamentos com inibição in vitro verificada

Com resultados em testes clínicos

- Ligação

Plasma de convalescentes.

Soro anti SARS-Cov-2 produzido em animais.

Monoclonais produzidos em laboratório.

Induzem imunidade passiva, anticorpos ligam a Spike, promissores em teste/uso

- Entrada

Cloroquina/Hidroxicloroquina, interferem com a acidificação do lisossomo, muitos ensaios feitos, sem efeito clínico demonstrado, não recomendado

- Replicação

Remdesivir, inibe a RNAPol viral (desenvolvido como inibidor de transcriptase reversa), promissor em teste/uso

Lopinavir/Ritonavir, inibem a protease viral 3CL, promissor em teste/uso

Tratamento

- Fatores celulares

Ivermectina, bloqueia transporte de proteínas para o núcleo inibindo resposta antiviral, sem efeito clínico demonstrado, não recomendado

Dexametasona, inibe resposta inflamatória, promissor em teste/uso

Tocilizumab, inibe IL6 bloqueando a tempestade de citocinas e resposta inflamatória, promissor em teste/uso

Devido à gravidade da pandemia de Covid-19, tem havido constantes mudanças nos protocolos clínicos, e testando drogas conhecidas para reverter os sintomas de pacientes internados, ao nível ambulatorial / UTIs, complementando oxigênio e ventilação mecânica.

Heparina, reverte coagulopatia em capilares dos alvéolos, aparentemente também interage com ACE2, bloqueando a ligação da Spike, promissor em teste/uso

CO-MORBIDADES AFETAM A RESPOSTA À INFECÇÃO

Cardiopatía

Diabetes

Pneumopatía

Doença renal

Imunodepressão

Obesidade

Asma

PREVENÇÃO

Além do **isolamento social**, as recomendações de prevenção à COVID-19 são as seguintes:

- **Lave com frequência as mãos** até a altura dos punhos, com água e sabão, ou então higienize com álcool em gel 70%. Essa frequência deve ser ampliada quando estiver em algum ambiente público (ambientes de trabalho, prédios e instalações comerciais, etc), quando utilizar estrutura de transporte público ou tocar superfícies e objetos de uso compartilhado.
- **Ao tossir ou espirrar, cubra nariz e boca** com lenço ou com a parte interna do cotovelo. Não tocar olhos, nariz, boca ou a máscara de proteção fácil com as mãos não higienizadas. Se tocar olhos, nariz, boca ou a máscara, higienize sempre as mãos como já indicado.
- **Mantenha distância** mínima de 1 (um) metro entre pessoas em lugares públicos e de convívio social. Evite abraços, beijos e apertos de mãos.
- **Higienize** com frequência o celular, brinquedos das crianças e outro **objetos** que são utilizados com frequência.
- **Não compartilhe objetos** de uso pessoal como talheres, toalhas, pratos e copos.
- Mantenha os **ambientes limpos e bem ventilados**.
- **Evite circulação desnecessária** nas ruas, estádios, teatros, shoppings, shows, cinemas, etc.
- **Se estiver doente, evite contato** próximo com outras pessoas, principalmente idosos e doentes crônicos, busque orientação pelos canais on-line disponibilizados pelo SUS ou atendimento nos serviços de saúde e siga as recomendações do profissional de saúde.
- Durma bem e tenha uma alimentação saudável.
- Recomenda-se a **utilização de máscaras** em todos os ambientes. As máscaras funcionam como uma barreira física, em especial contra a saída de gotículas potencialmente contaminadas.

Sendo aplicadas
no Brasil

Covid-19 vaccines, to January 6th 2021

Approved by: ● Stringent regulators ● Other regulators

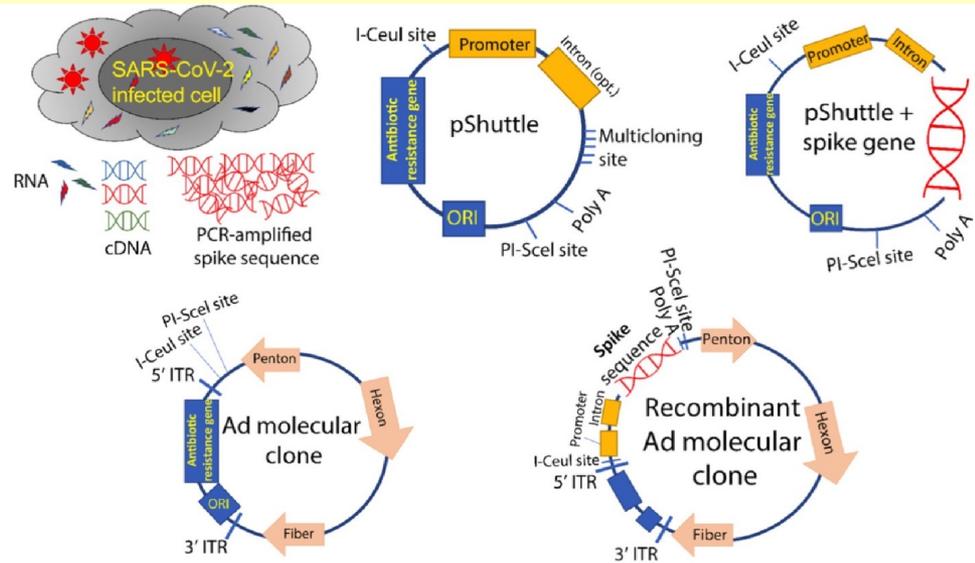
Producer	Name	Type
● AstraZeneca-Oxford Uni.	AZD1222 [†]	Viral vector
Novavax	NVX-CoV2373	Protein subunit
● Pfizer-BioNTech	tozinameran	mRNA
● Sinopharm	BBIBP-CorV	Inactivated
● Gamaleya Centre	Sputnik V	Viral vector
● Johnson & Johnson	JNJ-78436735	Viral vector
● Sinovac Biotech	CoronaVac	Inactivated
● Moderna	mRNA-1273	mRNA
● Bharat Biotech-ICMR	Covaxin	Inactivated
CureVac	CVnCoV	mRNA

Sources: Regulatory Affairs Professionals Society; The Economist Intelligence
Morgan Stanley; press reports; government websites; company websites

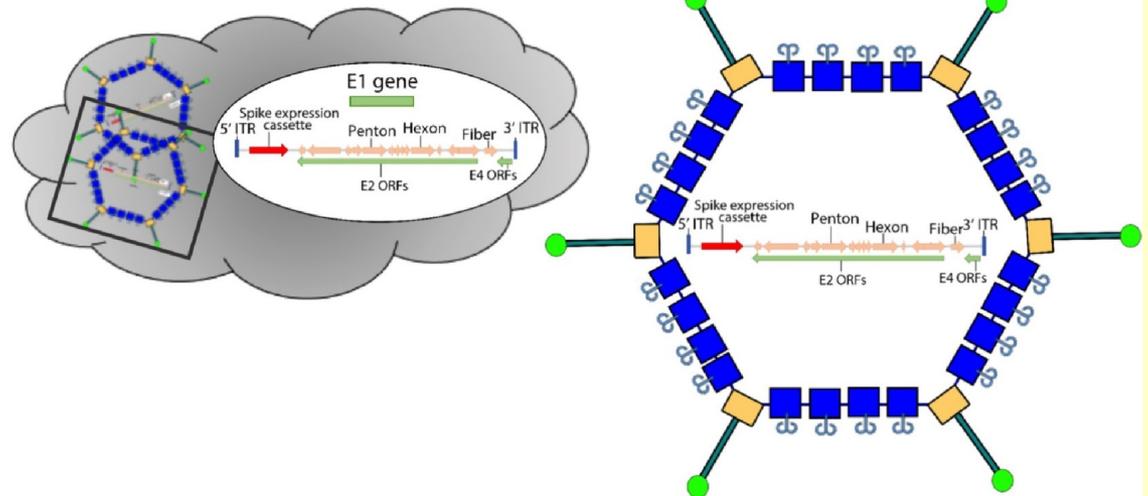
The Economist

Ordenadas pela capacidade de produção

Step 1: Isolate RNA from SARS-CoV-2 infected cells, clone amplified spike sequence into pShuttle vector, clone expression cassette from pShuttle into the Ad molecular clone.



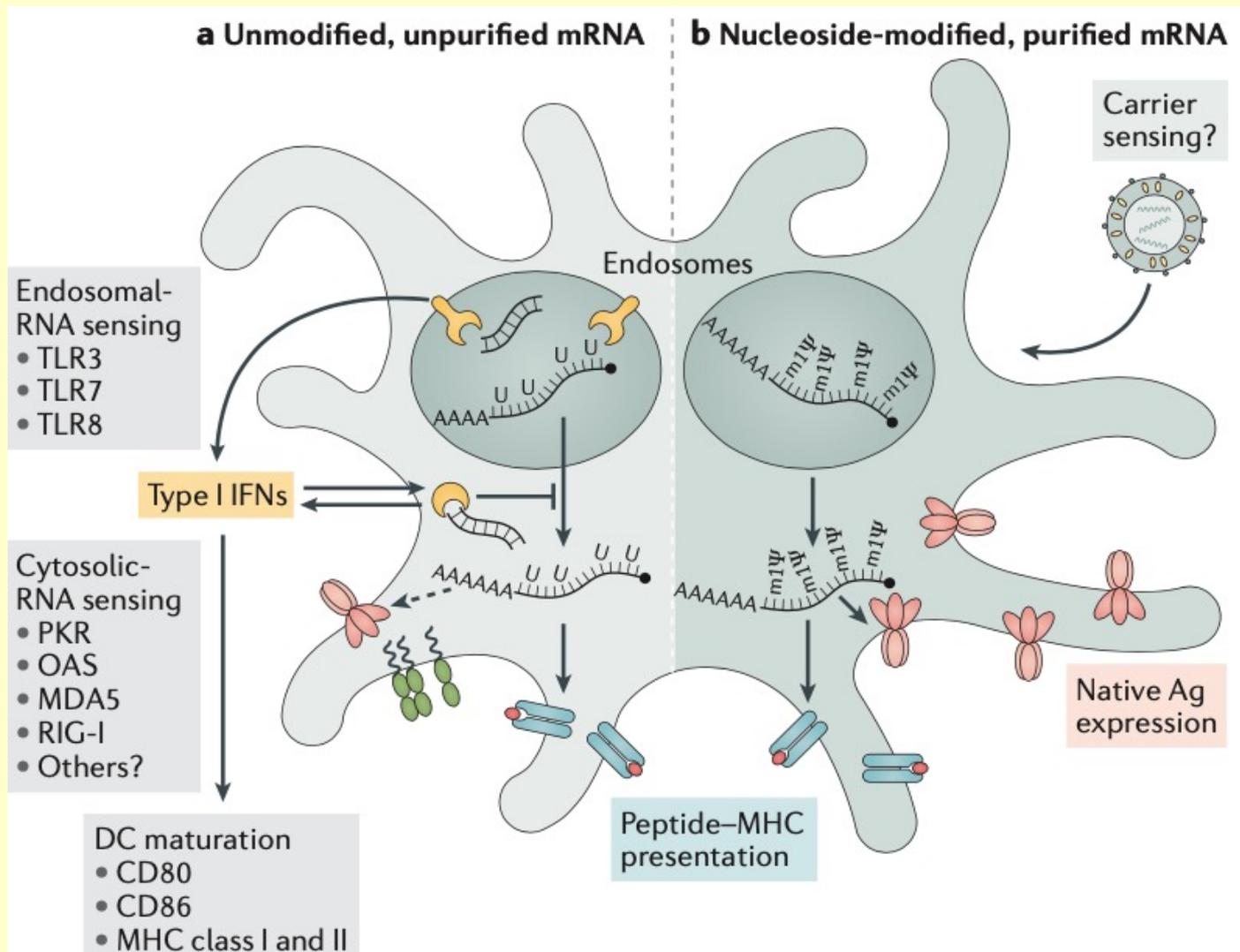
Step 2: Transfect E1 helper cell line with linearized Ad molecular clone. Amplify, purify, and quality control rescued Ad vector.



Step 3: Conduct preclinical animal experiments.

Step 4: Conduct clinical trials.

Step 5: Gain regulatory approval for use in humans.



Summary Information on Vaccine Products in Clinical Development

1. - Number of vaccines in clinical development

112

2. - Number of vaccines in pre-clinical development

184

3. - Candidates in clinical phase

Filter

All

Select phase of development (default is all)

Platform		Candidate vaccines (no. and %)	
PS	Protein subunit	38	34%
VVnr	Viral Vector (non-replicating)	17	15%
DNA	DNA	11	10%
IV	Inactivated Virus	16	14%
RNA	RNA	18	16%
VVr	Viral Vector (replicating)	2	2%
VLP	Virus Like Particle	5	4%
VVr + APC	VVr + Antigen Presenting Cell	2	2%
LAV	Live Attenuated Virus	2	2%
VVnr + APC	VVnr + Antigen Presenting Cell	1	1%

112

VARIANTES DO VÍRUS X EFICIÊNCIA DAS VACINAS

Há escape (ex.: a vacina da AstraZeneca tem eficácia diminuída contra a variante sul africana).

Ação: incorporar variantes (principalmente no RBD da spike), o que já está sendo feito.

INCORPORAÇÃO DE EPITOPOS DE CÉLULAS **B** E **T** NAS FORMULAÇÕES X EFICIÊNCIA DAS VACINAS

- Como vimos na aula de vacinas, tanto a resposta humoral (linfócitos B produtores de anticorpos) quanto a celular (linfócitos T efetores) são importantes contra os vírus.
- As células apresentadoras (ex.: macrófagos) mostram peptídeos do antígeno, contendo epítopos de células B ou T, para os linfócitos imaturos através das moléculas de MHC.
- Os genes para MHCs variam na população, daí a importância de testes de fase 3 para as vacinas em diferentes populações, para demonstrar sua eficácia.
- Hoje temos dados dessa variabilidade e como prever *in silico* a presença desses epítopos num antígeno e sua abrangência populacional.

Lee et al 2021. Identification of SARS-CoV-2 **Nucleocapsid and Spike** T-Cell Epitopes for Assessing T-Cell Immunity. J Virol 95:e02002-20

VARIAÇÃO GENÉTICA DO HOSPEDEIRO X EFICIÊNCIA DA RESPOSTA À INFECÇÃO

- Independente de comorbidades a resposta imune é variável determinando a gravidade da doença.
 - Uma parte dos pacientes apresenta resposta inflamatória aguda (tempestade de citocinas).
 - Além disso, outros fatores determinados geneticamente influem na interação do vírus com o hospedeiro, e na evolução da doença.

Secolin et al. 2021. Genetic variability in COVID-19-related genes in the Brazilian population.
Human Genome Variation 8:15

Guia de estudos

Quais características da estrutura da partícula viral e do genoma dos coronavírus são marcantes?

Que características diferenciam a replicação dos coronavírus dos demais vírus com genoma RNA fita simples de polaridade positiva?

O que na evolução e patogenia dos coronavírus passou a chamar mais a atenção dos virologistas e das autoridades de saúde mundiais no começo deste século?

Como pode ocorrer variabilidade genética nos coronavírus, e que impactos isso pode ter na dinâmica da pandemia de Covid-19?

Comente sobre hipóteses que explicam a ocorrência da pandemia de Covid-19.

Que etapas da replicação do SARS-Cov-2 são alvo de drogas antivirais? Descreva brevemente o mecanismo de ação das drogas promissoras.

Quais co-morbidades impactam o desenvolvimento da covid-19? Variações genéticas da população também podem influenciar (e como)?

A obtenção de vacinas eficazes contra SARS-Cov-2 foi rápida, tendo sido utilizadas várias estratégias de desenvolvimento, tanto as já em uso quanto as em fase experimental. Escolha duas delas que ache mais interessantes, pesquise sobre elas e descreva como funcionam.