

SARS-CoV2 e Covid-19: aspectos fisiopatológicos e imunológicos, estratégias de diagnóstico e desenvolvimento de vacinas

SARS-CoV2 and Covid-19: pathophysiological and immunological aspects, diagnostic strategies and vaccine development

Catarina Bárbara Chiocca do Nascimento¹, Marcelo Fiori Marchiori², Vanessa Leiria Campo¹, Monica Magalhães Costa Zini¹

Resumo: O vírus SARS-CoV-2, de provável origem morcegal, foi inicialmente detectado na China e é o agente etiológico da doença denominada COVID-19. Em 11 de março de 2020 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a pandemia. A emergência do vírus deveu-se à recombinação gênica originada, provavelmente, em hospedeiro não humano, rompeu a barreira interespecies e afetou a população humana apresentando maior morbidade e mortalidade em idosos, especialmente portadores de fatores de risco. Há muitos estudos em progresso visando a elucidar aspectos do vírus e da imunopatogênese, cujos resultados permitirão o desenvolvimento de antivirais, métodos diagnósticos cada vez mais sensíveis, específicos e precisos e, sobretudo, o desenvolvimento de vacinas cujo cenário atual é exposto, didaticamente, aqui. O artigo traz aspectos envolvidos na interação parasita hospedeiro e fundamentos da resposta imune objetivando fornecer bases para a compreensão do que se conhece sobre o embate entre o SARS-CoV-2 e o homem. A experiência resultante do conhecimento crescente e acumulado muito contribuirá para futuras intervenções em agravos determinados pela emergência inexorável de novos patógenos virais.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. COVID-19. Imunopatogênese. Diagnóstico. Vacinas.

Abstract: The SARS-CoV-2 virus, from probable bat origin, was initially detected in China and is the etiological agent of the disease called COVID-19. On March 11, 2020, the World Health Organization (WHO) declared the pandemic. The emergence of the virus was due to gene recombination originated, probably, in non-human host, broke the interspecies barrier and affected the human population, presenting greater morbidity and mortality in elderly, especially those with risk factors. There are many studies in progress aiming to elucidate aspects of the virus and immunopathogenesis, whose results will allow the development of antivirals, increasingly sensitive, specific and precise diagnostic methods and, above all, the development of vaccines whose current scenario is exposed, didactically, here. The article presents aspects involved in the host parasite

¹ Docente do Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP. Contato: catarinachiocca@gmail.com, vanessa.campo@baraodemaua.br, monicamczini@baraodemaua.br

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP. Contato: marcelo_dico@hotmail.com

interaction and fundamentals of the immune response, in order to provide basis for the comprehension of what is known about the clash between SARS-CoV-2 and man. The experience resulting from the growing and accumulated knowledge will greatly contribute to future interventions in grievances determined by the inexorable emergence of new viral pathogens.

Keywords: SARS-CoV-2. COVID-19. Immunopathogenesis. Diagnosis. Vaccines.

Recebimento: 27/11/2020

Aprovação: 14/12/2020

INTRODUÇÃO

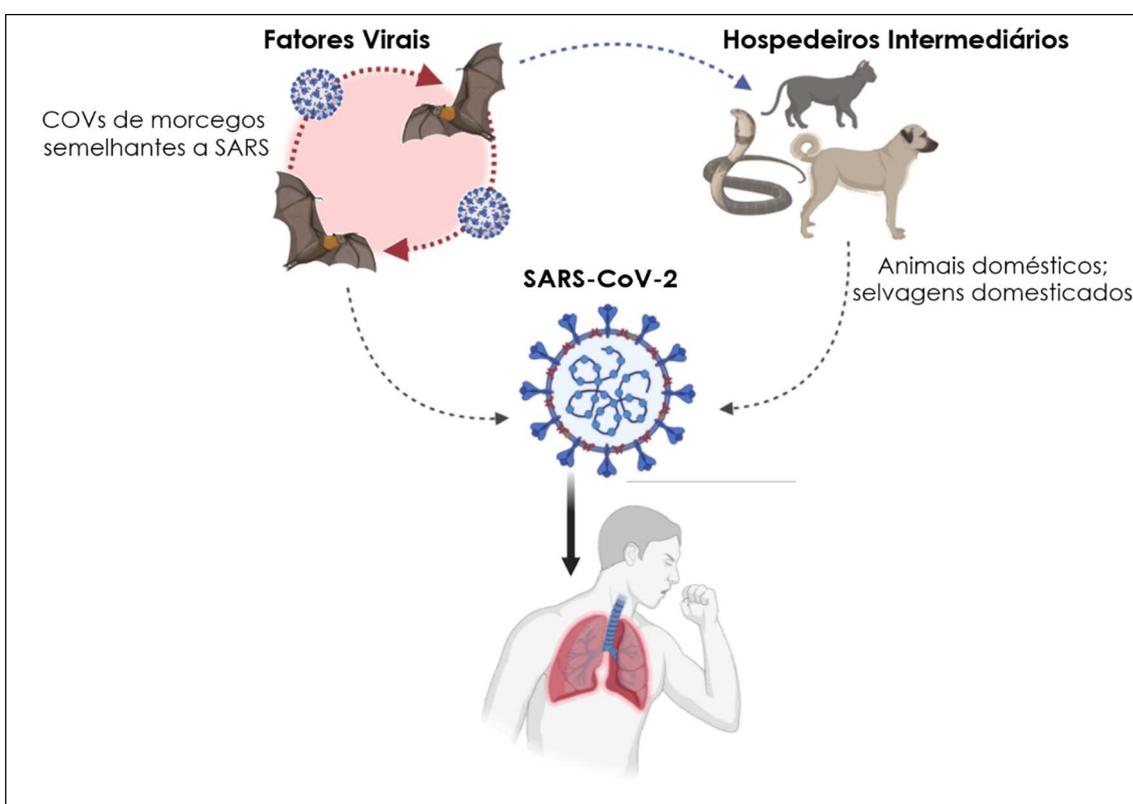
O novo Coronavírus, ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae* foi denominado coronavírus-2 da síndrome respiratória aguda grave – (SARS-CoV-2) pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus [*International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*] e a Organização Mundial da Saúde (OMS – WHO, 2020a) declarou a COVID-19 (doença de coronavírus) como o nome dessa nova doença, em fevereiro de 2020.

Os primeiros casos humanos de COVID-19 (do inglês *coronavirus disease 2019*), a doença causada pelo “novo coronavírus”, subsequentemente denominado SARS-CoV-2, foram relatados na cidade de Wuhan em dezembro de 2019, inicialmente associados a um mercado que vendia animais vivos na cidade, onde a maioria dos pacientes trabalhava ou visitava regularmente e que foi posteriormente fechado para desinfecção e teve suas atividades cessadas em janeiro de 2020 (ZHU, 2020).

O SARS-CoV-2, associado à Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SRAG) (SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*) foi identificado e sequenciado em janeiro de 2020 e tem uma origem zoonótica natural (não manipulada) e a semelhança das sequências genéticas isoladas de casos humanos de COVID-19 sugere que o início do surto resultou de um único ponto de inserção do vírus na população humana. A origem zoonótica presumida foi associada a morcegos pela análise do DNA e pelo histórico de hospedagem de coronavírus nesses animais, inclusive o SARS-CoV-1. No entanto, como, em geral, o contato dos humanos com morcegos é normalmente limitado, é mais

provável que a transmissão do vírus aos humanos tenha acontecido por intermédio de outra espécie (animal doméstico, selvagem ou selvagem domesticado), não sendo descartada a transmissão direta, dada a cultura alimentar da população presente no local que representa o epicentro da pandemia (MCINTOSH, 2020) (Figura 1).

Figura 1 - Origem do SARS-CoV-2



Fonte: os autores, adaptada de GUO, Y-R. *et al.*, 2020.

Desta forma, o objetivo desse artigo é trazer informações atualizadas sobre as características do vírus causador da pandemia que acometeu o mundo em 2020. A Síndrome Respiratória Aguda Grave é decorrência da falta de oxigênio e desregulação dos mecanismos de controle da inflamação. Estão incluídos dados epidemiológicos, patogênese, quadros clínicos, aspectos imunológicos, diagnóstico e desenvolvimento de vacinas.

ESTRUTURA DO VÍRUS SARS-CoV-2 E FISIPATOLOGIA DA DOENÇA

O SARS-CoV-2 é um vírus da linhagem B do gênero betacoronavirus da subfamília Orthocoronavirinae pertencente à família dos Coronaviridae, portanto, compartilhando de diversas características morfológicas desse grupo. Os coronavírus foram assim batizados em virtude de sua aparência semelhante a coroa solar (*corona solaris*), que reflete suas glicoproteínas de superfície quando observadas à microscopia eletrônica (Figura 2). Apresentam-se como vírus envelopados, de RNA de cadeia simples longa (27.000 a 32.000 pares de bases), sentido positivo e conformada em estrutura helicoidal flexível estabilizada pela proteína N (nucleocapsídeo) e medindo entre 80 e 160nm (Figura 2).

O SARS-CoV-2, assim como o SARS-CoV-1, causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SDRA) parece deter 4 proteínas básicas em sua composição, que são:

Proteína S: Proteína que se projeta através do envelope viral e forma a “coroa” característica dessa família de vírus, sendo vastamente glicosilada e formando um homotrímero que atua no processo de ligação com os receptores do hospedeiro (TMPRSS2 e ECA2) e no processo de fusão com a membrana da célula infectada. Representa também o principal antígeno contra o qual se foca a resposta imune, sendo alvo de linfócitos citotóxicos e de anticorpos neutralizantes e opsonizantes.

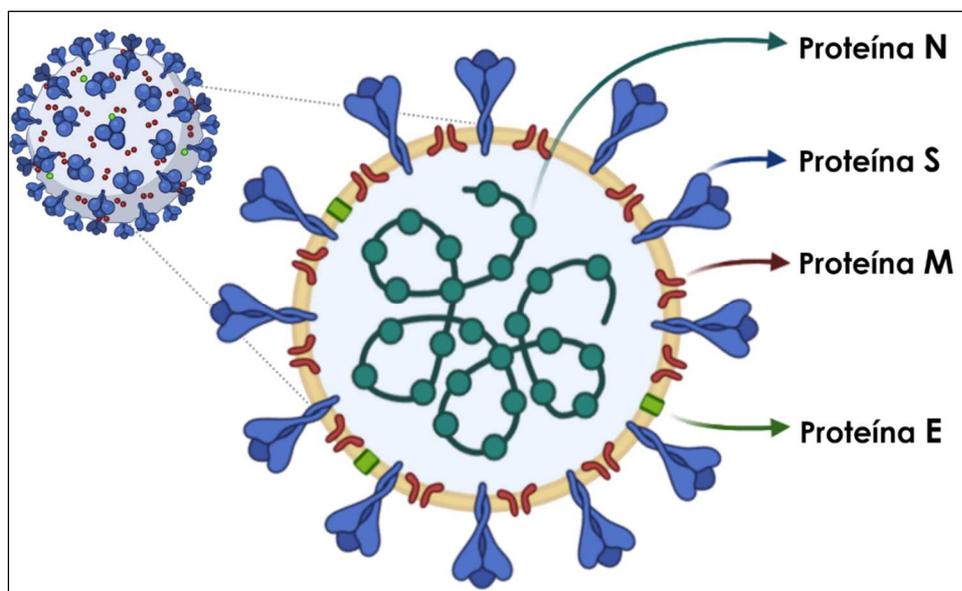
Proteína M: Proteína que se projeta através do envelope (porção C-terminal longa projetada à porção citosólica e porção N-terminal projetada à face externa) e desempenha importante papel durante a montagem e liberação viral sendo, portanto, de vital importância no ciclo reprodutivo viral.

Proteína N: Associa-se ao RNA viral para formar o nucleocapsídeo e está provavelmente envolvida na regulação de sua síntese, sendo também um alvo potencial para o reconhecimento por linfócitos T citotóxicos.

Proteína E: Proteína de envelope, projeta sua porção N-terminal citosolicamente e mantém sua porção C por dentro do envelope viral. Sua função específica ainda não é conhecida, no entanto, foi demonstrado que junto às

proteínas M e N, é necessária à montagem e liberação do vírus (SIU *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2020).

Figura 2 – Estrutura do vírus SARS-Cov-2



Fonte: os autores, adaptada de KUMAR *et al.*, 2020.

A transmissão do SARS-CoV-2, segundo dados epidemiológicos, ocorre de forma horizontal, de pessoa a pessoa, pelo contato direto ou indireto com secreções contaminadas. Tais secreções são geradas ao falar, tossir ou espirrar, atos que geram uma nuvem gasosa contendo patógenos, composta de gotículas de vários tamanhos que atingem diferentes distâncias e têm sido classificadas como grandes gotículas respiratórias ou perdigotos e pequenas gotículas ou aerossóis (WHO, 2020b). Esse material pode ser inalado por outro indivíduo que esteja em distância suficiente para receber um inóculo e iniciar o processo infeccioso (BOROUHIBA, 2020). O contato indireto, por fômites, deve-se à presença do vírus em superfícies contaminadas, inclusive pela deposição de gotículas mais pesadas contendo vírus e posterior toque em mucosas do nariz e boca. Harrison, Lin e Wang (2020) aventam a possibilidade da rota fecal-oral. A transmissão do vírus por indivíduos assintomáticos e pré-sintomáticos, ocorre durante o período de incubação, 1 a 3 dias antes do estabelecimento da sintomatologia (BAI *et al.*, 2020).

O período de incubação médio tem sido estimado em 5 a 6 dias podendo variar de 2 a 14 dias (LAUER *et al.*, 2020).

As considerações a respeito da patogênese de um agente infeccioso e resposta imune do hospedeiro devem ser feitas à luz dos fatores de virulência do parasita e fatores de defesa do hospedeiro cujo balanço determina o resultado que pode ser: a eliminação do vírus, o desfecho fatal ou quadros intermediários com diferentes níveis de gravidade e complicações e suas respectivas sintomatologias. Dentre os fatores do hospedeiro podem ser destacados idade, sexo, gestação, fatores hormonais, genéticos e nutricionais, imunocompetência, doenças pregressas, uso de medicamentos, atividade profissional, estresse, estilo de vida e situação socioeconômica. Com relação aos fatores do parasita, eles dependem do tipo de patógeno. Em todos os casos essa interação é extremamente complexa, porém, no caso dos vírus a dificuldade é ampliada por duas razões: primeiro, pela extrema dependência que os vírus apresentam em relação às células e, segundo, pela falta de fatores de virulência diretos observados em outros parasitas, como as toxinas bacterianas. Ainda que os efeitos diretos da replicação na célula sejam óbvios e seja possível destacar diferença de virulência entre cepas, organotropismo, replicação em temperaturas de febre, indução deficiente de interferons antivirais, transferência placentária, interferência na divisão celular, na síntese de macromoléculas e, principalmente, a interferência com a resposta imune imposta pelo hospedeiro, nem sempre o panorama permite justificar um decurso grave.

No caso do SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, muito esforço tem sido dedicado no sentido de se entender a interação entre parasita e hospedeiro. O vírus, constituído de um cápside helicoidal que envolve o RNA, é envelopado e apresenta espículas, projeções de glicoproteínas que atuam como estruturas de adesão. Assim, ocorre a interação da proteína S, da espícula viral, com o receptor da célula-alvo do hospedeiro, a enzima-conversora de angiotensina 2 (ECA2). A protease serina transmembrana tipo 2 (TMPRSS2) cliva a ECA2, ativa a proteína S viral e promove a entrada do vírus na célula (HOFFMANN *et al.*, 2020). O vírus se replica, coloniza o epitélio do trato respiratório (ZOU *et al.*, 2020) e estabelece a infecção (Figura 3A).

A distribuição do receptor determina os tipos celulares que podem ser infectados e, no caso do SARS-CoV-2, tem sido mostrado que as duas proteínas são expressas concomitantemente em vários tipos celulares (SUNGNAK *et al.*, 2020). Um fator de virulência do SARS-CoV-2 já identificado são as alterações citopáticas em células epiteliais brônquicas e alveolares tipo II em que são evidenciadas partículas virais por microscopia eletrônica (HU; HUANG; YIN, 2020).

O incremento da replicação nas células epiteliais do trato respiratório que ocorre durante a progressão da infecção e a distribuição das proteínas receptoras em vários tipos celulares amplificam o organotropismo do vírus, determinam o acometimento de inúmeros órgãos e contribuem com a gravidade do quadro (SUNGNAK *et al.*, 2020). No trato respiratório outros tipos celulares são afetados, como as células endoteliais capilares pulmonares, o que acentua a reação inflamatória e desencadeia um influxo de neutrófilos e monócitos. Com a infiltração dessas células no interstício, ocorre edema pulmonar (opacidades em vidro fosco em imagens de tomografia computadorizada) e formação de membrana hialina responsáveis pela síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) de fase inicial e o comprometimento da barreira endotelial, da transmissão de oxigênio alveolar-capilar e da capacidade de difusão de oxigênio, características típicas de COVID-19. O quadro pode se agravar com coagulação intravascular difusa, trombose venosa e arterial e embolia pulmonar até o desenvolvimento de sepse resultante de resposta desregulada do hospedeiro à infecção e falência múltipla de órgãos (WIERSINGA *et al.*, 2020).

Crunfli *et al.* (2020), demonstraram que o SARS-CoV-2 atinge ainda o cérebro, infecta os astrócitos e determina alterações neuropatológicas que contribuem para as alterações estruturais e funcionais no cérebro de pacientes com COVID. O vírus foi também encontrado em monócitos e linfócitos B e em linfócitos TCD4⁺, o que pode contribuir para a patogênese, distúrbio imunológico e disseminação do vírus no hospedeiro (PONTELLI *et al.*, 2020).

Decurso complicado pode ser resultante do envolvimento de inúmeros órgãos que o vírus pode acometer como coração, cérebro, pulmão, fígado, rim e sistema de coagulação na vigência de hospedeiro com idade avançada,

hipertensão, doenças crônicas do coração, doença pulmonar obstrutiva crônica, obesidade, diabetes e tabagismo, bem como imunodeficiências (RICHARDSON *et al.*, 2020).

A COVID-19 pode se apresentar desde a forma assintomática até uma pneumonia de gravidade variável. Segundo Azkur *et al.* (2020), exposição à baixa carga viral com resposta imune adequada são responsáveis pelo *clearance* viral e forma assintomática ou leve, ao passo que a exposição a altas doses infectantes podem levar à infecção grave. Há poucos dados que demonstrem uma clara porcentagem de casos assintomáticos (DONG *et al.*, 2019). Um inóculo pesado na primeira infecção e repetidas exposições ao SARS-CoV-2, especialmente na população da área de saúde, pode ser um fator de agravamento da doença.

A maior parte dos casos decorre de forma benigna e inicia-se com sintomas gerais de resfriado como mal estar, coriza, febre, tosse seca, falta de ar, fadiga e mialgia. Também têm sido relatados náuseas, vômitos ou diarreia, dor de cabeça e garganta, fraqueza, confusão mental, incapacidade de sentir odores ou anosmia e perda do sentido do paladar ou ageusia (LIMA, 2020). A idade é um fator importante relacionado ao risco de infecção sintomática, assim jovens e crianças tendem a ser portadores assintomáticos (XAVIER *et al.*, 2020).

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA COVID-19

A interferência com mecanismos da imunidade do hospedeiro tem sido uma constante nos relatos de estudos de pacientes com COVID (AZKUR *et al.*, 2020) e uma visão geral da imunidade facilita o entendimento dessa ação viral. Em um processo infeccioso, após o patógeno ultrapassar as barreiras naturais, como pele e mucosas, mecanismos da imunidade inata e inflamação serão ativados rapidamente para destruir e eliminar o agente e restaurar a homeostase. Ocorre a ativação do sistema complemento, um sistema de proteínas que forma poros em membranas de patógenos e facilita a fagocitose. A fagocitose elimina patógenos microscópicos. O sistema complemento e a fagocitose também participam da reação inflamatória que

se estabelece para promover o reparo tecidual. Outros mecanismos serão acionados de acordo com a natureza do agressor. No caso de infecções virais um mecanismo é a secreção de interferons (IFN) antivirais pela célula infectada. Os interferons induzem, em células vizinhas, um estado antiviral, ou seja, ainda que venham a ser infectadas, não permitem a replicação viral, o que impede a progressão da infecção. Pela natureza intracelular dos vírus e dificuldade de atuar contra eles, mais um mecanismo é acionado, a ativação de células natural *killer* (NK), um linfócito que atua na imunidade inata, não possui receptores específicos como os outros e mata células infectadas por vírus. Esses mecanismos são inespecíficos, já se encontram prontos por ocasião do nascimento e não dependem do contato prévio com o patógeno para que possam ser rapidamente ativados. Atuam de forma seletiva, por meio da identificação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e assim, preservam as estruturas próprias do hospedeiro de seu potencial lesivo. Controlam o processo infeccioso até que a imunidade adaptativa seja estabelecida e, mediante produção de citocinas apropriadas e anticorpos, promova um incremento na eficiência dos mecanismos destrutivos, além de estabelecer uma proteção específica e duradoura frente ao agente infeccioso.

Para que a imunidade adaptativa seja estimulada, monócitos, macrófagos e células dendríticas internalizam e degradam agentes infecciosos, associando peptídeos deles a moléculas proteicas cuja função é apresentar antígenos aos linfócitos T auxiliares CD4⁺ (LTCD4⁺), as moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Esse processo é denominado via exógena de processamento e apresentação do antígeno. O linfócito T auxiliar, detentor do receptor específico para aquele peptídeo o reconhece, mas a resposta não pode se estabelecer com um pequeno número de células, então o linfócito T prolifera e se diferencia: uma parte em células efetoras e uma parte em células de memória. As células efetoras produzem citocinas, pequenos peptídeos que fazem a comunicação entre as células para organizar a ação estratégica de proteção e defesa. Enquanto as células efetoras morrem após efetuarem sua

função para restabelecer a homeostase do sistema, as células de memória, de vida longa, permanecem para a proteção em um próximo encontro com o patógeno.

O linfócito B, outra população, também reconhece o agente infeccioso, porém, sem a necessidade do processamento, ele deve reconhecer o agente em sua estrutura tridimensional para produzir anticorpos que se liguem aos patógenos e neutralizem seu poder infeccioso, entre outras funções. Ao reconhecer o agente e receber as citocinas apropriadas do linfócito TCD4⁺, prolifera e se diferencia em células efetoras (denominadas plasmócitos) e de memória, sendo que a célula efetora irá produzir anticorpos específicos para o antígeno.

Para agentes infecciosos extracelulares, a imunidade específica ou adaptativa é estabelecida por esses dois tipos de linfócitos. Anticorpos neutralizam o poder infeccioso do patógeno impedindo a progressão da infecção e promovem um aumento na eficiência nos mecanismos da imunidade inata, que agora fortalecida pelas citocinas, elimina com mais facilidade o patógeno.

No caso de infecções virais também há a participação do linfócito T citotóxico CD8⁺. Essa célula reconhecerá os peptídeos do vírus associados às moléculas do MHC de classe I. As células nucleadas do organismo expressam essas moléculas e, na vigência de infecção viral, apresentam o complexo peptídeo-MHC ao linfócito T citotóxico. É a via endógena de processamento e apresentação que torna essa célula, alvo da destruição pelo linfócito TCD8⁺. Esse linfócito atua exatamente como a célula NK, pelo “beijo da morte”. Ao aproximar-se da célula-alvo secreta citotoxinas que promovem a morte da célula por apoptose. Dessa forma o vírus não continua a se replicar. O linfócito TCD8⁺ também recebe citocinas do linfócito TCD4⁺ para efetuar essa função. Com o estabelecimento da imunidade específica ao vírus ocorrerá um reforço nos mecanismos da imunidade inata que agora podem se tornar mais eficientes, pois o agente está “marcado” pelos anticorpos, evitando que o aumento na intensidade possa lesar estruturas próprias. A ação das citocinas estende-se às células NK, tornando-as mais

eficientes em seu processo citotóxico. A presença de anticorpos recobrimo as células-alvo que expressam os peptídeos do vírus na membrana facilita a ação da célula NK, agora designada *lymphokine-activated killer* (LAK).

Em resumo, após o reconhecimento do antígeno pelos linfócitos, as citocinas do LTCD4⁺ ativam os linfócitos B e TCD8⁺. A neutralização do poder infeccioso do patógeno pelos anticorpos e a morte de células infectadas pelos LTCD8⁺ impedem a progressão da infecção. Os complexos antígeno-anticorpo ativam o sistema complemento ampliando sua ação sobre os patógenos. As citocinas do LTCD4⁺ atuam nos macrófagos que, por sua vez, também produzem citocinas para incrementar a inflamação, bem como ficam mais eficientes no processo de fagocitose e apresentação de antígeno. É importante enfatizar que o LTCD4⁺ produz diferentes perfis de citocinas, pertinentes à resposta mais adequada para cada tipo de infecção. Dessa forma, a imunidade adaptativa, ao se estabelecer, aumenta a eficiência dos mecanismos da imunidade inata e ainda estabelece uma proteção específica, por meio dos anticorpos que ficarão realizando a proteção sistêmica. A longa duração dessa proteção deve-se à presença dos linfócitos de memória. Em um segundo contato com o agente infeccioso, esses mecanismos atuarão com o máximo de rapidez e eficiência, não dando chance ao patógeno de progredir com o processo infeccioso e causar doença.

A resposta imune realizada pelos linfócitos B, por sua natureza de moléculas nos líquidos biológicos, foi designada humoral (humor, antigamente, relacionava-se aos líquidos biológicos) e a realizada pelos linfócitos T foi designada celular.

A resposta imune ao SARS-CoV-2 cursa de forma semelhante à resposta aos clássicos vírus respiratórios em mais de 80% dos pacientes, com um decurso leve a moderado e autolimitante. E envolve todos os aspectos até agora conhecidos da resposta imune inata e da adaptativa nos ramos humoral e celular.

Como já abordado, os vírus, por sua natureza acelular, não apresentam mecanismos de virulência óbvios como outros agentes infecciosos, mas desenvolveram muitas formas de subverter a resposta imune em seus diversos compartimentos.

Essa resposta imune tem que ser efetiva para eliminar agentes infecciosos, com mecanismos potencialmente lesivos para as estruturas do hospedeiro, principalmente na imunidade inata, porque são seletivos e não específicos portanto não podem ser muito intensos para evitar danos às próprias células. Com o estabelecimento da imunidade adaptativa, a especificidade é garantida pelos anticorpos e, então, pode haver o aumento de eficiência, uma vez que o patógeno se torna o foco da resposta. Nas duas fases da resposta imune é necessário um controle fino e rígido permeando as etapas dos processos que envolvem sensores para identificar o agente infeccioso, vias de sinalização para ativar fatores de transcrição, ativação da expressão gênica e produção de uma miríade de moléculas solúveis e expressas em membranas, envolvidas na ativação dos mecanismos para aquisição do efeito biológico.

Considerando-se que os vírus são agentes intracelulares que têm acesso ao núcleo da célula e usam o maquinário celular para sua própria reprodução, a possibilidade de promover alterações em processos celulares é real e já foram descritas formas de interferência na imunidade inata e na adaptativa, tanto no ramo celular como humoral.

Os mecanismos da imunidade inata, fundamentais para proteção e defesa, são ativados por vários receptores que funcionam como sensores da presença de agentes infecciosos, como os receptores *Toll-like* (TLR), entre outros. Em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), alguns receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) reúnem um complexo multiproteico denominado inflamassoma. Este, uma vez reunido induz a formação de poros em membranas, a produção de citocinas pró-inflamatórias e um tipo de morte celular conhecido como piroptose, uma forma de suicídio celular em que a célula se rompe e libera moléculas

inflamatórias (LEE; CHANNAPPANAVAR; KANNEGANTI, 2020). O reconhecimento de patógenos, então, inicia vias de sinalização que ativarão fatores de transcrição para a produção de diversas proteínas, por exemplo, com a finalidade de promover um estado antiviral na vizinhança de células infectadas, vias em que são geradas várias citocinas inflamatórias. Esses mecanismos são controlados de forma rígida para prevenir efeitos adversos resultantes da estimulação exagerada (de WILDE *et al.*, 2018).

De acordo com Hussman (2020), o SARS-CoV-2, após a entrada nas células epiteliais respiratórias, induz uma resposta imune com produção de citocinas inflamatórias e uma fraca resposta de interferon tipo I. Há evidências de que, assim como demonstrado para outros coronavírus, proteínas do SARS-CoV-2 seriam responsáveis por essa ação (SIU *et al.*, 2009). A resposta pró-inflamatória de células Th1 e monócitos CD14⁺ CD16⁺, mediada por receptores de membrana e vias de sinalização é seguida por infiltração de neutrófilos e macrófagos no tecido pulmonar, o que resulta em um estado imune, potencialmente fatal, denominado hipercitonemia ou tempestade de citocinas. Essa condição é considerada a principal razão de progressão para SDRA, portanto de gravidade e morte em pacientes com COVID-19 e, além dos altos níveis de citocinas circulantes, linfopenia grave, trombose e infiltração maciça de células mononucleares em múltiplos órgãos. Alterações patológicas incluem edema pulmonar, injúria alveolar difusa com a formação de membrana hialina, presença de hiperplasia de pneumócitos tipo II, agregados proteicos, exsudato fibrinoso, monócitos e macrófagos nos espaços alveolares e infiltração intersticial de células mononucleares. Assim, a lesão pulmonar grave em COVID-19 é atribuída à infiltração de células inflamatórias, alterações citopáticas em nível celular e às alterações patológicas e manifestações clínicas decorrentes da liberação local excessiva de citocinas sendo, portanto, resultado tanto de infecção viral direta quanto de hiperativação imunológica (HU; HUANG; YIN, 2020). As citocinas aumentadas referem-se às interleucinas (IL) 2, 6 e 7, fator

estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), proteína 10 induzida pelo interferon- γ (IFN γ -IP-10), proteína 1 quimiotática para monócito (MCP-1), proteína inflamatória de macrófago 1- α (MIP-1 α) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (MEHTA *et al.*, 2020) (Figura 3B). Os desbalanços nas proporções de IL-6 e IL-10, durante a infecção, possibilitaram a criação de uma escala denominada Dublin-Boston, que permite prever com precisão o prognóstico da COVID-19 em pacientes em tal condição (McELVANEY *et al.*, 2020). Um receptor, denominado *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1* (TREM-1), expresso em células mieloides, codificado por um *cluster* de genes ligados ao MHC, bem como sua versão solúvel circulante, sTREM-1, desempenha papel importante na amplificação da inflamação. Sua ativação estimula sinais intracelulares resultando na ativação de fagocitose, degranulação de neutrófilos e amplificação da produção de citocinas induzidas por receptores *Toll-like* (TLR) em neutrófilos e macrófagos (NETEA *et al.*, 2020). Essa molécula mostrou forte correlação com a gravidade da COVID-19 e foi aventado que possa prognosticar a evolução da doença (SILVA NETO *et al.*, 2020).

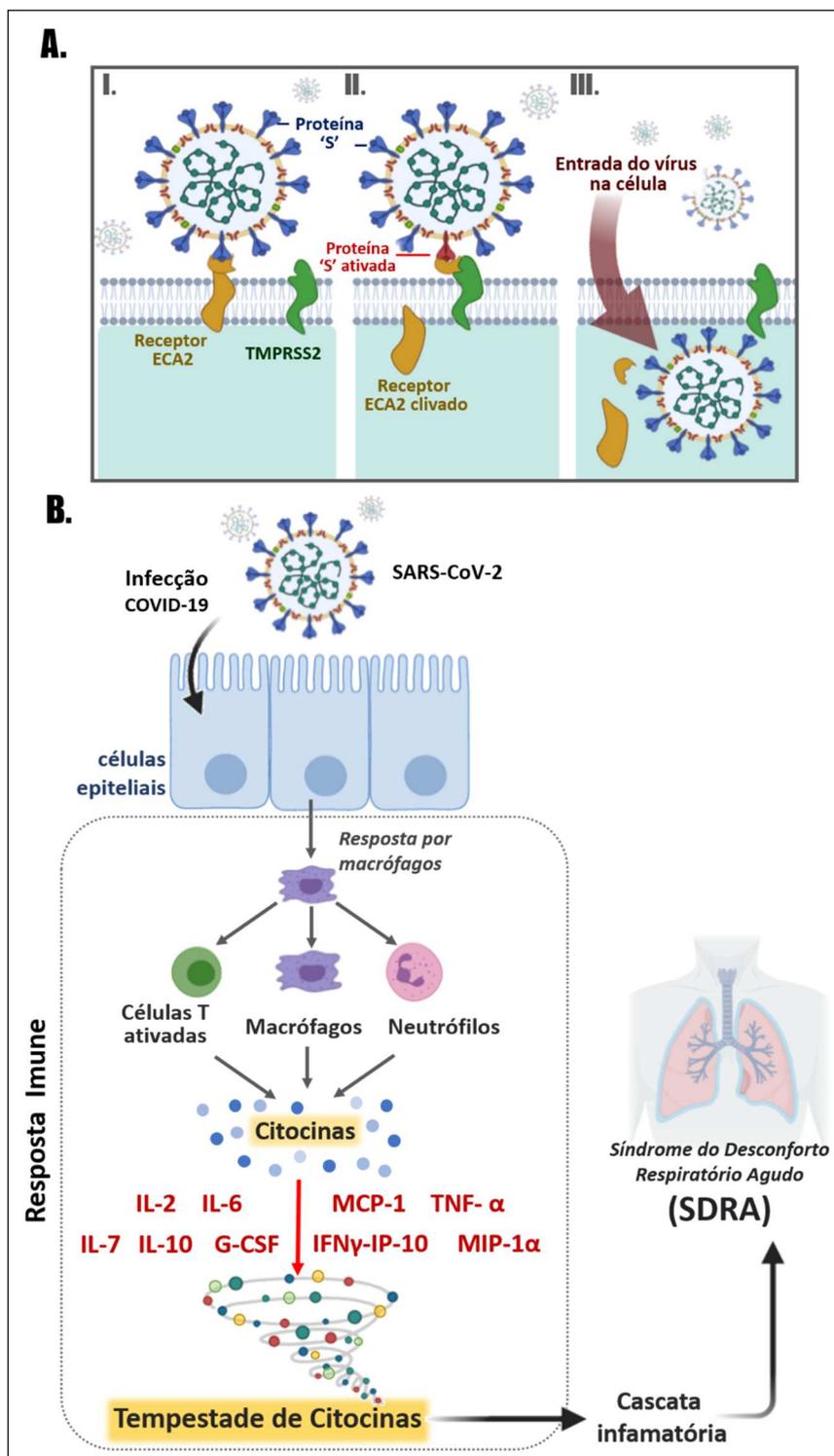
No ramo celular, o SARS-CoV-2 atua promovendo uma grave linfopenia que interfere na imunidade regulatória e antiviral. É um mecanismo-chave na patogênese e um importante critério de gravidade, já descrito para outras infecções (HERBINGER *et al.*, 2016). Assim, várias células linfoides se encontram diminuídas na COVID-19, os LTCD4⁺, LTCD8⁺, linfócitos B e células NK, sendo as células T as mais afetadas pelo SARS-CoV-2. Adicionalmente, LTregs, uma subpopulação fundamental para suprimir respostas excessivas a patógenos, tumores, transplantes, controle e prevenção de doenças autoimunes e alergias também se encontram diminuídos (QIN *et al.*, 2020).

A resposta imune humoral é determinada pelos anticorpos ou imunoglobulinas produzidos pelos linfócitos B, específicos para o antígeno. A molécula de anticorpo é formada por duas cadeias polipeptídicas leves e duas pesadas. Há 5 tipos de cadeias pesadas, que determinam a classe ou isotipo do anticorpo, quais sejam, IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Cada classe

possui propriedades determinadas pela cadeia pesada que a compõe e que está relacionada com a função biológica realizada. A resposta imune humoral é caracterizada pela produção inicial de IgM, seguida pelo *switch* de classe para IgG, responsável pela imunidade duradoura.

Em COVID-19 a gravidade dos sintomas apresentou forte correlação com a magnitude de anticorpos específicos produzidos para o vírus e IgG apresenta queda substancial em grande parte de indivíduos acompanhados, porém a dinâmica de duração dos anticorpos apresenta ampla heterogeneidade (CHEN *et al.*, 2020). A diminuição significativa nos níveis de IgG, ao longo do tempo após a infecção, é influenciada por fatores como a gravidade da doença inicial, idade e comorbidades (WARD *et al.*, 2020). Achado importante em estudos com seguimento de pacientes foi a associação entre respostas humorais às proteínas da espícula em convalescentes e respostas às proteínas do nucleocapsídeo mais elevadas em indivíduos que evoluíram para o óbito. A resposta imune humoral, assim, pode auxiliar tanto no que se refere ao cuidado com o paciente quanto ao desenvolvimento de vacinas (ATYEO *et al.*, 2020). Outro aspecto a ser considerado foi a observação de reatividade cruzada de linfócitos TCD4⁺ de memória ao SARS-CoV-2, oriundos de indivíduos não expostos, provavelmente decorrente de reconhecimento de epítomos compartilhados com coronavírus causadores de resfriado comum (MATEUS *et al.*, 2020).

Figura 3 – (A) Mecanismo de invasão do vírus SARS-CoV-2 para estabelecimento de infecção na célula do hospedeiro. (B) Resposta imune decorrente da infecção pelo vírus SARS-CoV-2 com evolução para a “tempestade de citocinas”.



Fonte: os autores, adaptada de Rabi *et al.*, 2020 (A) e Bhaskar *et al.*, 2020 (B)

ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO

Os testes de diagnóstico estão entre as principais recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para controlar a disseminação do vírus SARS-Cov2, além do isolamento social. Atualmente, os dois tipos de exames mais utilizados para a detecção da Covid-19 são representados pelo RT-PCR e pelos testes sorológicos, os quais são normalmente aplicados em fases distintas da doença.

O exame RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) é considerado o “padrão ouro” ou “padrão de referência” para a identificação do vírus e confirmação da Covid-19, e deve ser realizado quando o indivíduo possui grande quantidade do vírus, especialmente na primeira semana. Este exame é baseado na reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa e reação de amplificação em tempo real, o que possibilita a identificação do RNA viral. Os genes considerados para a identificação do vírus incluem N, E, S e RdRP, sendo que o gene E tem sido utilizado como marcador genético de escolha pela sua maior sensibilidade (FLORIANO *et al.*, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, abril/2020).

Previamente à realização do exame de RT-PCR é realizada a coleta de secreções (*swab*) do trato respiratório superior (nasofaringe ou orofaringe) ou do trato respiratório inferior (escarro, aspirado traqueal ou lavado broncoalveolar), e a partir das secreções coletadas é realizada a detecção de ácido nucleico viral específico. Uma vez que o SARS-Cov2 é um vírus de RNA, é necessário gerar uma fita de DNA complementar (cDNA) para sua identificação, o que é possível pela ação da enzima transcriptase reversa seguida da inserção de dois *primers*, capazes de promover a amplificação de dois alvos genéticos. Subsequentemente, com uma sonda complementar, é possível observar o conteúdo molecular correspondente ao do vírus-alvo (Figura 4) (YE *et al.*, 2020).

Embora seja bastante específico, a sensibilidade do exame laboratorial de RT-PCR pode variar em decorrência de algumas variáveis, tais como: a) *Fase da infecção e carga viral* nas secreções e excreções, principalmente amostras de trato respiratório superior coletadas com menos de 3 e mais de 10 dias desde

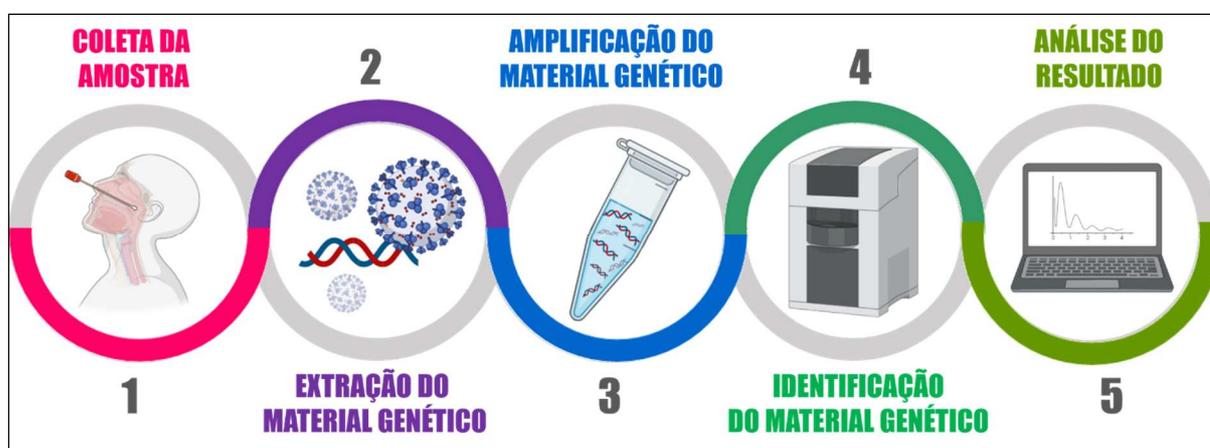
o início da contaminação; b) *Local da coleta*, pois sabe-se que os materiais do trato respiratório inferior tendem a apresentar maior positividade em relação àqueles do trato respiratório superior; c) *Técnica de coleta, transporte e armazenamento da amostra* até a sua análise, de forma a evitar a degradação do RNA contido no espécime. Tendo em vista que o exame de *RT-PCR* detecta diretamente a presença de componentes específicos do genoma do vírus, ele deve ser utilizado para diagnóstico da doença nas fases assintomática, pré-sintomática ou sintomática, nos 12 primeiros dias desde o início dos sintomas, sendo que o tempo médio para o resultado do exame varia de 6 a 24 horas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, abril/ 2020).

As maiores limitações para a aplicação generalizada do exame de *RT-PCR* são representadas pela complexidade da técnica, que exige equipamentos existentes em número limitado de laboratórios no Brasil, além da limitação de reagentes para a execução dos exames, os quais são importados em sua maioria.

Neste sentido, pesquisadores do Centro de Estudos do Genoma Humano e de Células-Tronco (CEGH-CEL-USP) estão desenvolvendo um teste alternativo de diagnóstico do vírus SARS-Cov2 pela saliva, o qual, assim como o exame de *RT-PCR*, será usado para detectar o vírus durante a infecção. Este teste alternativo deverá ser mais rápido e poderá custar um quarto do valor do exame de *RT-PCR*. A base para este novo teste da saliva é a técnica molecular denominada *RT-LAMP* (sigla em inglês de transcrição reversa seguida por amplificação isotérmica mediada por alça), a qual tem algumas semelhanças com o método *RT-PCR*. Em ambas as técnicas são induzidas reações para a realização de uma fase de transcrição reversa (*RT*), na qual o RNA do vírus é transformado em DNA, e uma fase de amplificação, em que regiões específicas do vírus são replicadas milhões de vezes para que o patógeno possa ser identificado (Figura 4). Porém, o *RT-LAMP* não requer a extração do RNA do vírus para ser detectado, o que é feito no *RT-PCR* por meio de reagentes importados, que são caros e frequentemente escassos no mercado, dependendo da demanda. Além do mais, o *RT-LAMP* dispensa o uso de aparelhos laboratoriais complexos, como o termociclador em tempo real, utilizado para

amplificar e detectar o RNA por meio da exposição do material a diferentes temperaturas. Desta forma, as vantagens do RT-LAMP, envolvendo o uso da saliva autocoletada pelo paciente como material para o exame, a eliminação da etapa de extração do RNA, e a possibilidade de realização de amplificação do material viral em temperatura fixa (65°C), contribuiu para a simplificação do processo, conduzindo à redução do custo do teste e do tempo para o resultado (30 a 40 min.) (FAPESP, 2020).

Figura 4 – Etapas do exame de RT-PCR para identificação do vírus SARS-Cov2

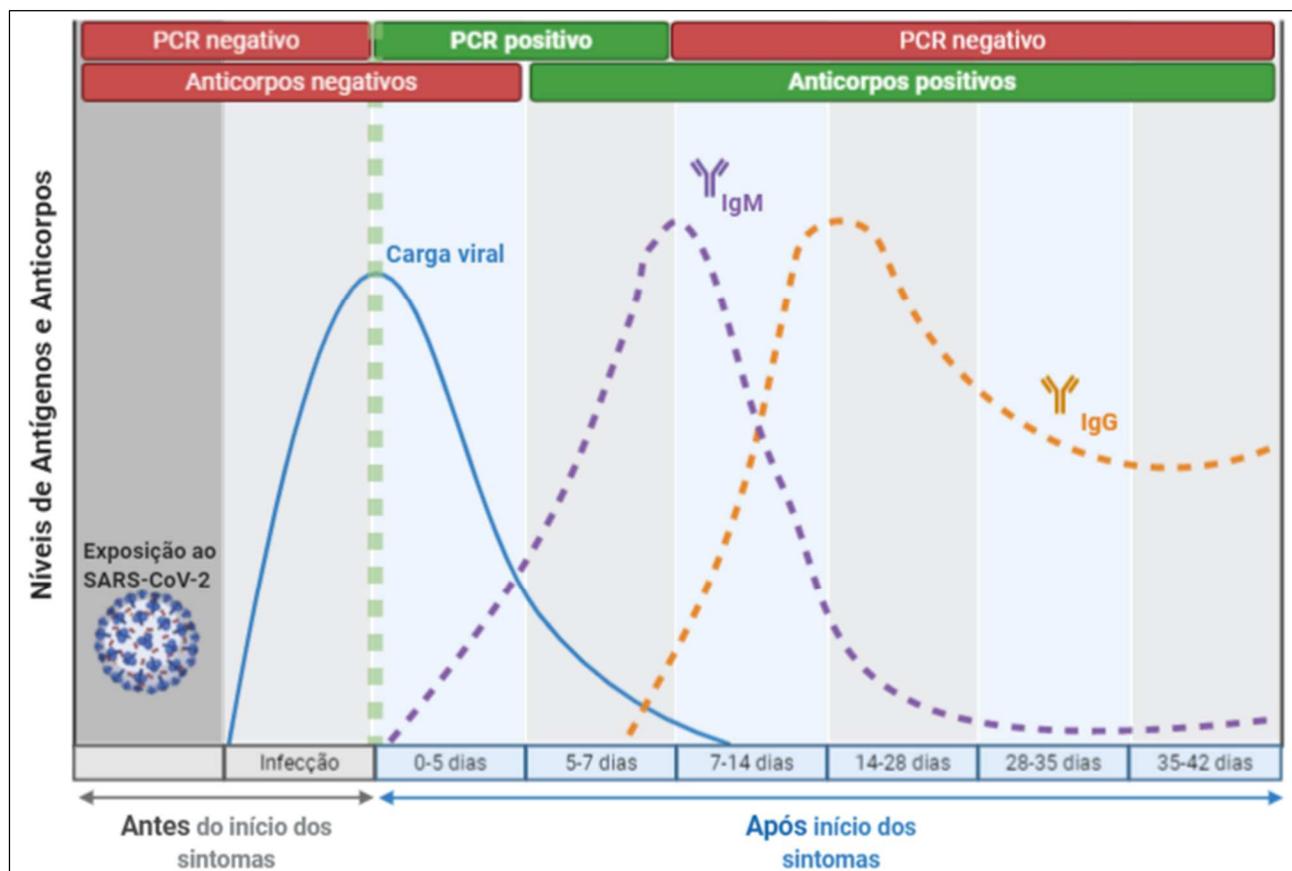


Fonte: Os autores, adaptada de FLORIANO *et al.*, 2020.

Os testes sorológicos são baseados na pesquisa de anticorpos e antígenos relacionados ao vírus SARS-Cov2, sendo aplicados como testes rápidos ou processados em laboratório. Como todas as demais infecções virais, o organismo reage à presença do vírus produzindo anticorpos (Acs), inicialmente os Acs da classe de imunoglobulinas M (IgM) e, na sequência, os Acs da classe de imunoglobulinas G (IgG). O período para a produção de anticorpos IgM é de 5 a 7 dias, em média, após a infecção, com pico de detecção após o sétimo dia. Com o decorrer da infecção, os níveis de IgM diminuem e, em contrapartida, os níveis de IgG aumentam rapidamente, com pico de detecção após o 14º dia de contágio. Assim, o período inicial da doença, caracterizado pela ausência de Acs IgM e IgG, é definido como janela imunológica, o período em que ocorre a produção de Acs IgM compreende a fase inicial (aguda) da doença, e o período onde ocorre a prevalência de Acs IgG caracteriza a fase tardia ou recorrente da

infecção. Ainda, em determinada fase ativa da doença é possível a detecção de ambos os anticorpos IgM e IgG, que poderá estar associada ou não ao teste positivo de RT-PCR, a depender da carga viral remanescente (Figura 5) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, maio/2020; VIEIRA; EMERY; ANDRIOLO, 2020).

Figura 5 – Perfil imunológico de infecção pelo vírus SARS-Cov2 com variações dos níveis de carga viral, e de anticorpos IgM e IgG nas diferentes fases da doença



Fonte: Os autores, adaptada de VIEIRA; EMERY; ANDRIOLO, 2020.

Diferentemente da pesquisa de partículas virais, que é realizada principalmente nas secreções e lavados, a pesquisa e quantificação de anticorpos pode ser feita em sangue capilar, sangue total, soro ou plasma, exigindo, portanto, a coleta de sangue, ou da ponta do dedo, para o teste rápido, ou de uma veia, para a obtenção de sangue total. Há vários testes imunológicos já disponíveis no mercado para a pesquisa de anticorpos IgM, IgA e IgG, e antígeno viral, os quais são representados por:

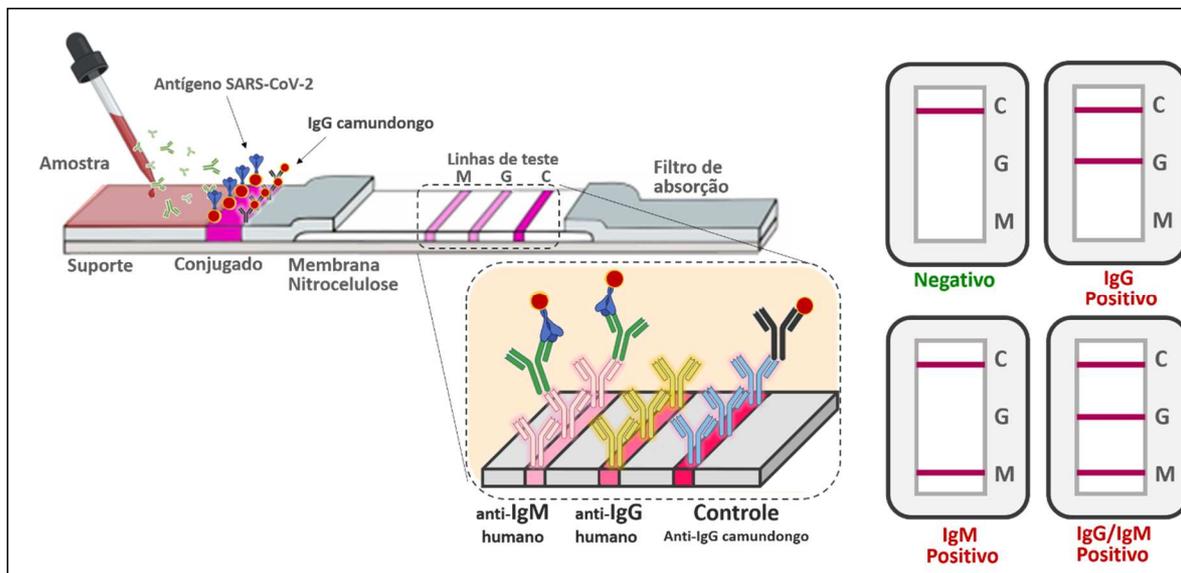
a) **Testes rápidos:** também denominados “testes laboratoriais remotos” ou “*point of care testing*”, nos quais a pesquisa de anticorpos em sangue total, soro ou plasma é realizada de forma rápida, fornecendo resultados em tempos que variam de 10 a 20 minutos. O teste sorológico rápido é baseado no princípio da reação antígeno-anticorpo, utilizando a técnica de imunocromatografia. Desta forma, o dispositivo de teste consiste em uma membrana de nitrocelulose que contém uma proteína recombinante SARS-Cov2 (antígeno) marcada com ouro coloidal, anticorpo anti-IgM humano imobilizado na área de teste M, anticorpo anti-IgG humano imobilizado na área de teste G, e o anticorpo anti-IgG camundongo na área de controle de qualidade (C) (VIEIRA; EMERY; ANDRIOLO, 2020; DIAS *et al.*, 2020). Durante o teste, quando o nível de anticorpos IgM na amostra está igual ou acima do limite de detecção do teste, ocorre a ligação dos Acs IgM da amostra ao antígeno de SARS-Cov-2 marcado com ouro coloidal. Assim, os conjugados (antígeno-anticorpo) migram para cima através do efeito capilar e são capturados pelo anticorpo anti-IgM humano imobilizado na área de teste M, produzindo uma banda vermelho-púrpura na área de teste M. Da mesma forma, quando o nível de anticorpos IgG na amostra está no limite de detecção do teste ou acima dele, há a ligação destes Acs IgG ao antígeno de SARS-Cov-2, com resultante migração dos conjugados e captura pelo anticorpo anti-IgG humano imobilizado na área de teste G, produzindo uma banda vermelho-púrpura na área de teste G. Por outro lado, se for uma amostra negativa, não aparece uma faixa vermelho-púrpura na área de teste M e G; porém, independentemente da presença ou ausência de anticorpos IgM ou IgG na amostra, uma faixa vermelho-púrpura aparecerá na área de controle de qualidade (C). A faixa vermelho-púrpura na área de controle de qualidade (C) é um critério para validar o processo de imunocromatografia e para verificar se há amostra suficiente (Figura 6) (VIEIRA; EMERY; ANDRIOLO, 2020; DIAS *et al.*, 2020).

Embora os testes rápidos apresentem boa acurácia diagnóstica em pacientes com tempo de evolução do quadro superior a oito dias, o tempo de janela imunológica reduz a sensibilidade destes testes quando aplicados em

fases mais precoces, o que justifica o uso concomitante de outros testes de diagnóstico, como o RT-PCR, nas fases iniciais da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, maio/2020).

b) **Testes automatizados:** Os testes automatizados são realizados em ambiente laboratorial, utilizando-se equipamentos analíticos para a detecção e quantificação de antígenos e anticorpos em sangue total, soro ou plasma. Dentre os principais métodos utilizados estão ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), Quimioluminescência e Eletroquimioluminescência. O teste de ELISA é um dos mais utilizados e baseia-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas (teste imunoenzimático), sendo a enzima peroxidase a mais utilizada neste teste (ROITT; DELVES, 2019). O ensaio de ELISA possibilita a detecção sensível e específica de anticorpos anti-SARS-Cov-2 IgA, IgM e IgG, através da utilização da proteína estrutural recombinante S1 do SARS-Cov-2 utilizada como antígeno. Assim, ao antígeno do SARS-Cov-2 imobilizado em placa (fase sólida) é adicionado o soro do paciente e, caso a amostra seja positiva, anticorpos específicos se ligam aos antígenos da placa. A seguir, é adicionado o anticorpo secundário contra as imunoglobulinas do soro do paciente, o qual está conjugado à enzima peroxidase, e a partir da adição do substrato para a enzima (H_2O_2) ocorre uma reação colorimétrica. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos na amostra do soro, sendo medida a partir de leitura em espectrofotômetro. Ao final, com base nos dados de absorvância obtidos é possível então se determinar o título de anticorpos anti-SARS-Cov-2 presentes no soro do paciente (EUROIMMUN, 2020; DIAS *et al.*, 2020).

Figura 6 – Representação do método de diagnóstico rápido para Covid-19, com perfis de identificação de anticorpos IgM (IgM positivo), IgG (IgG positivo) ou ausência de anticorpos (negativo)



Fonte: os autores, adaptada de DIAS *et al.*, 2020.

DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

Previamente à descrição das vacinas em desenvolvimento contra o vírus SARS-Cov2, é importante a compreensão dos conceitos gerais sobre vacinas. Assim, uma vacina pode ser constituída por um agente patogênico vivo atenuado ou inativado (morto), ou ainda, por fragmentos ou componentes antigênicos deste patógeno, e tem a capacidade de estimular as respostas imunológicas protetoras do hospedeiro para combater o patógeno invasor, porém, sem causar a doença (ABBAS; LICHTMAN, 2017) A maioria das vacinas existentes são constituídas por patógenos atenuados ou inativados, como por exemplo, as vacinas contra febre amarela, sarampo, caxumba, tuberculose, poliomielite, gripe, entre outras, sendo designadas “vacinas celulares” e classificadas como geração 1 de vacinas. No entanto, as pesquisas atuais têm sido direcionadas ao desenvolvimento de vacinas utilizando-se outras tecnologias, tais como as vacinas de subunidades (recombinantes) e conjugadas, classificadas como geração 2 e representadas pelas vacinas contra hepatite B, meningite, pneumonia e HPV. Já a geração 3 compreende as vacinas gênicas de DNA e

mRNA, e de vetores virais recombinantes, baseadas na utilização do material genético que irá codificar o antígeno de interesse, bem como a introdução do gene que codifica o antígeno em um vírus recombinante não citopático (ROITT; DELVES, 2019). Embora nenhuma vacina gênica e de vetor viral tenha sido aprovada para uso clínico em humanos até o momento, estas tecnologias têm sido consideradas bastante promissoras, tal como será descrito para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus SARS-Cov-2 (KRAMMER, 2020).

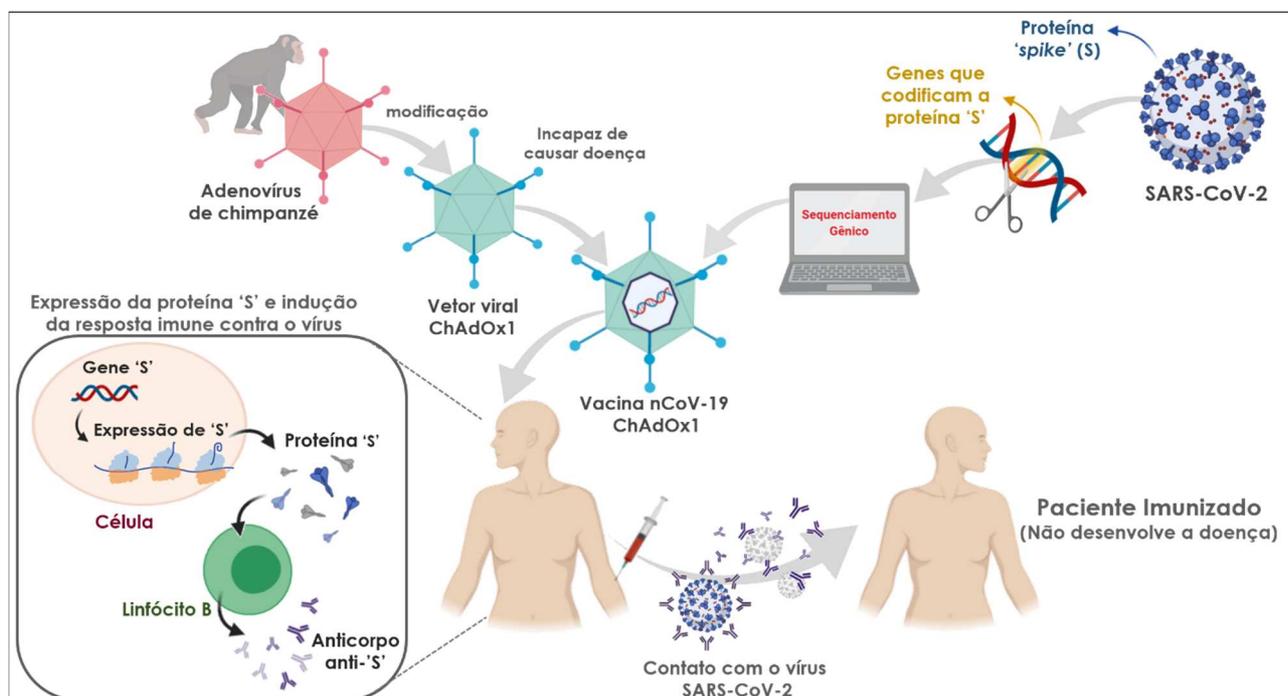
O desenvolvimento de uma vacina é um processo longo, podendo levar até dez anos, e envolve várias fases, compreendendo a fase exploratória e laboratorial, a fase de estudos pré-clínicos em animais, as fases 1 a 3 de ensaios clínicos em humanos, e a fase 4 de aprovação e registro da vacina. Desta forma, na fase exploratória é realizada a prova de conceito da vacina, envolvendo a identificação e validação do antígeno vacinal e a realização de testes *in vitro* em laboratório. Na fase pré-clínica são realizados testes da vacina em animais, como por exemplo, ratos, coelhos e macacos. A seguir, são realizados os estudos clínicos de fases-1 a 3 para a avaliação da segurança, imunogenicidade, eficácia e tolerabilidade da vacina em humanos. Assim, na fase 1 é avaliada a segurança e a eficácia da vacina em gerar a resposta imunológica, sendo testados poucos voluntários saudáveis (20 a 80); na fase 2 é realizada uma análise mais detalhada da segurança e eficácia da vacina, além de estudos de dosagem, podendo ser testadas até centenas de pessoas; na fase 3 são realizados testes com milhares de indivíduos em locais de alta prevalência da doença em estudo, com o objetivo de se avaliar definitivamente a segurança e a eficácia da vacina, bem como os possíveis efeitos colaterais decorrentes do seu uso. Finalmente, na fase 4 a vacina deve ser submetida à aprovação e registro pelas agências regulatórias para então ser disponibilizada para a população (INSTITUTO BUTANTAN, 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), há cerca de 190 candidatas a vacinas em estudos contra o vírus SARS-Cov-2 em todo o mundo, dentre elas 46 já entraram em fases de testes clínicos, porém somente 9 estão na fase 3 final de ensaios clínicos (OMS, 2020), conforme apresentado na Tabela 1. Neste trabalho serão apresentadas as descrições acerca de quatro vacinas

promissoras que se encontram em fase 3 de testes clínicos no mundo, a saber: *ChAdOx1nCoV-19* (Universidade de Oxford/ AstraZeneca, Reino Unido), *mRNA-1273* (Moderna, Niaid, Estados Unidos), *CoronaVac* (Sinovac, China) e *Sputnik V* (Inst. Nacional de Pesquisa *Gamaleya*, Rússia) (Tabela 1). Ademais, serão também abordadas algumas vacinas em desenvolvimento no Brasil frente à Covid-19.

A vacina *ChAdOx1nCoV-19*, também conhecida como “vacina de Oxford” desenvolvida pelo Instituto *Jenner* da Universidade de Oxford (Reino Unido), em associação com a empresa farmacêutica AstraZeneca (Anglo-sueca), é uma vacina de vetor de adenovírus de chimpanzé, ao qual foi adicionado o material genético que irá expressar a glicoproteína *Spike* (S) no organismo do hospedeiro, induzindo as respostas imunes contra o vírus (Figura 7). Neste caso, por meio do sequenciamento do genoma viral foi possível identificar os genes que codificam a glicoproteína S, considerada um dos principais fatores de virulência do SARS-Cov2, e selecionada como o antígeno alvo para o desenvolvimento desta vacina e de outras a serem descritas. A eficácia da vacina *ChAdOx1nCoV-19* foi inicialmente verificada em ensaios pré-clínicos realizados em camundongos e em macacos *Rhesus*, sendo que os animais submetidos à vacinação previamente à infecção com o vírus não apresentaram sintomas respiratórios da doença, nem tampouco foi observada replicação viral nos pulmões, diferentemente dos animais que não foram vacinados (van DOREMALEN *et al.*, 2020). Esta vacina encontra-se em ensaios clínicos de fase 3, sendo o Brasil um dos países selecionados para os testes, além do Reino Unido. Os ensaios no Brasil estão sendo conduzidos principalmente pelo Centro de Referência para Imunológicos Especiais (CRIE) da Unifesp-SP, pela Rede D’Or São Luiz-RJ e pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), com expectativa de se alcançar 10.000 voluntários para os testes. Mediante acordo de transferência de tecnologia entre a Fiocruz/ Ministério da Saúde e a empresa AstraZeneca, o Brasil poderá produzir milhões de doses desta vacina, caso seja comprovada sua eficácia e segurança (O GLOBO, 2020).

Figura 7 – Representação da tecnologia e mecanismo de ação da vacina de vetor viral *ChAdOx1nCoV-19* contra o vírus SARS-CoV-2



Fonte: os autores, adaptada de: <https://pfarma.com.br/coronavirus/5437-vacina-jenner.html>

A vacina *mRNA-1273*, desenvolvida pela empresa Moderna e com o apoio do Instituto Nacional de Alergias e Doenças Infecciosas (Niaid), Estados Unidos, é uma vacina de mRNA, obtida a partir da clonagem do gene que expressa um fragmento da glicoproteína S, seguida da sua inserção em nanopartícula lipídica (*lipid nanoparticle-LNP*), capaz de propiciar uma melhor veiculação e absorção da vacina nos tecidos. Desta forma, uma vez injetada no tecido muscular, o mRNA contido no interior da nanopartícula lipídica será liberado no citoplasma para translação em glicoproteínas S, as quais serão secretadas para ativação das respostas imunes humoral e celular (WANG; KREAM; STEFANO, 2020). Em testes com camundongos, a vacina mRNA-1273 forneceu proteção total contra a replicação viral nos pulmões, e nos ensaios clínicos de fases 1 e 2 apresentou ser segura e bem tolerada, além de provocar níveis de título de anticorpos neutralizantes comparáveis a soros convalescentes. Atualmente, esta vacina encontra-se em estudos clínicos de fase 3, com cerca de 30.000 voluntários nos Estados Unidos (DW BRASIL/ NOTÍCIAS, 2020)

A vacina *CoronaVac* desenvolvida pela empresa *Sinovac Biotech*, China, é uma vacina de vírus inativado (morto), obtida a partir da multiplicação do vírus SARS-Cov2 em células *vero* (rim de macaco) seguida de sua inativação com o produto químico betapropiolactone e adição de hidróxido de alumínio como adjuvante. Embora esta vacina não utilize tecnologias mais recentes de engenharia genética, exemplos de outras vacinas obtidas a partir de vírus inativados demonstram a eficácia desta técnica para a estimulação de respostas imunes completas, envolvendo produção de anticorpos e ativação de linfócitos T. Em testes com macacos *Rhesus*, os grupos vacinados com a *CoronaVac* apresentaram proteção parcial ou total contra a doença, sendo verificada produção de anticorpos neutralizantes bem como ativação de linfócitos T, além de reduzida carga viral se comparada aos animais não vacinados (KRAMMER, 2020). Nos ensaios clínicos de fases 1 e 2, realizados com cerca de 1000 voluntários, esta vacina mostrou-se segura e eficaz, e houve produção de anticorpos neutralizantes em mais de 90% dos voluntários que receberam a vacina. Atualmente, esta vacina encontra-se em estudos clínicos de fase 3, sendo estabelecida uma parceria com o Instituto Butantan-SP para a realização de testes no Brasil com cerca de 15.000 voluntários. Caso a vacina seja aprovada, Sinovac e Butantan irão firmar acordo de transferência de tecnologia para produção em escala industrial e fornecimento gratuito à população por meio do SUS (AGENCIABRASIL, 2020).

A vacina *Sputnik V*, desenvolvida pelo Instituto Nacional de Pesquisa *Gamaleya*, Rússia, é uma vacina de vetor viral recombinante, sendo constituída por uma combinação de vetores de adenovírus representados por rAd5 e rAd26, ambos os quais carregam o gene da glicoproteína S (antígeno) (LOGUNOV *et al.*, 2020). Esta vacina foi elaborada em duas formulações distintas, congelada e liofilizada, e submetida aos ensaios de fases 1 e 2 em voluntários adultos saudáveis (cerca de 76). De acordo com os resultados obtidos, todos os participantes produziram anticorpos neutralizantes frente à glicoproteína S do SARS-Cov2, sendo também observada resposta efetiva de linfócitos T. Além de apresentar imunogenicidade satisfatória, a vacina *Sputnik V* também se mostrou segura e tolerável, com ausência de relatos de efeitos colaterais graves. Esta

vacina já foi registrada oficialmente na Rússia para uso clínico, embora os estudos de fase 3 com cerca de 30.000 voluntários russos estejam em fase inicial (JORNAL DO BRASIL, 2020).

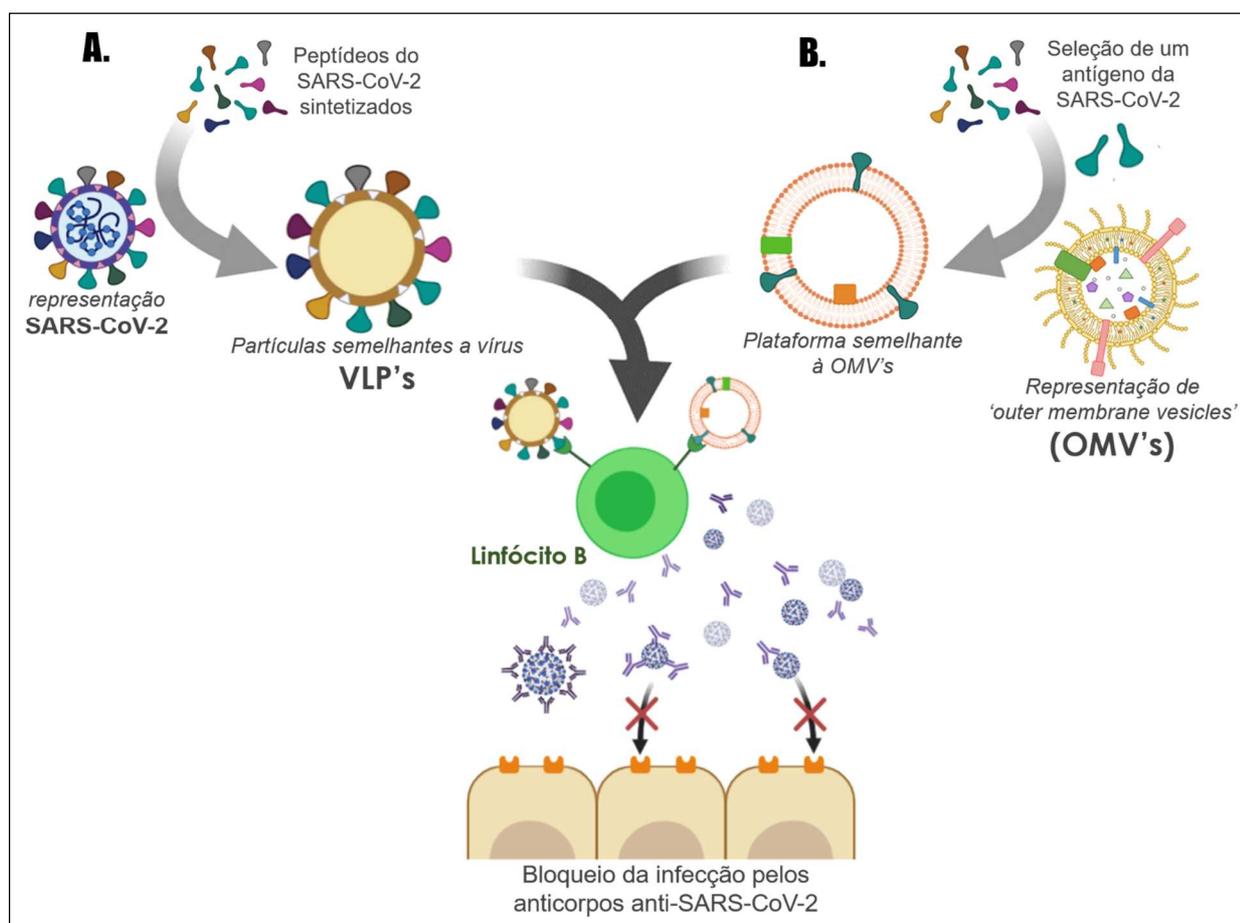
Tabela 1 – Vacinas contra Covid 19 que se encontram em Fase 3 de ensaios clínicos no mundo

| Candidata a Vacina | Tecnologia/ Plataforma | Organização | País |
|---------------------------|-------------------------------|--|--------------------------|
| <i>ChAdOx1nCoV-19,</i> | Vetor viral não replicante | Universidade de Oxford e AstraZeneca | Reino Unido/ Suécia |
| <i>mRNA-1273</i> | mRNA/ nanopartícula lipídica | Moderna e Inst. Nacional de Alergias e Doenças Infecciosas (Niaid) | Estados Unidos |
| <i>CoronaVac</i> | Vírus inativado | Sinovac <i>Biotech</i> | China |
| <i>Sputnik V</i> | Vetor viral não replicante | Inst. Nacional de Pesquisa <i>Gamaleya</i> | Rússia |
| <i>Wuhan</i> | Vírus inativado | Inst. Produtos Biológicos de Wuhan e Sinopharm | China |
| <i>Sinopharm</i> | Vírus inativado | Inst. Produtos Biológicos de Pequim e Sinopharm | China |
| <i>BNT162</i> | mRNA | BioNTech (Alemanha), Pfizer (Estados Unidos), Fosun Pharma | Alemanha/ Estados Unidos |
| <i>Ad5-nCoV</i> | Vetor viral não replicante | CanSino <i>Biologics</i> e Inst. Biológico de Beijing | China |
| <i>Ad26.COV2.S</i> | Vetor viral não replicante | <i>Janssen Pharmaceutical Companies</i> | Bélgica |

No Brasil, diversas vacinas estão sendo desenvolvidas por grupos consolidados e com tradição de pesquisa em vacinas, por meio da aplicação de diferentes tecnologias. Desta forma, uma vacina constituída por partículas semelhantes aos vírus (VPLs) e carregando fragmentos proteicos antigênicos do vírus, relacionados à glicoproteína S (Figura 8A), vem sendo desenvolvida pela Faculdade de Medicina da USP e Instituto do Coração (Incor). Segundo os pesquisadores envolvidos, este tipo de vacina deve desencadear uma forte resposta do sistema imunológico, induzindo a formação de anticorpos neutralizantes, capazes de impedir o vírus de penetrar nas células, e tende a ser mais eficiente do que as vacinas de mRNA (JORNAL DA USP, 2020; KRAMMER, 2020). Outro tipo de vacina em desenvolvimento é a que está sendo elaborada pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas- INCT-V (Fiocruz Minas) em parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), a qual se baseia em uma plataforma que utiliza um vírus recombinante de *influenza* como vetor vacinal, no qual será introduzido o gene da glicoproteína S. Assim, como se trata de um vírus defeituoso para a multiplicação, ele não causa a doença, mas induz a produção de anticorpos, e ainda há a possibilidade de obtenção de uma vacina bivalente, com dupla aplicação contra o novo coronavírus e contra ao vírus *influenza* (FIOCRUZ, 2020). O Instituto Butantan-SP, por sua vez, está desenvolvendo uma estratégia baseada no acoplamento de vesículas de membrana denominadas *outer membrane vesicles-OMVs*, criadas em laboratório, a proteínas recombinantes de antígenos de superfície do SARS-CoV-2. Estas *OMVs* mimetizam um mecanismo utilizado por algumas bactérias para “despistar” nosso sistema imune, por meio do qual elas liberam pequenas esferas feitas com o material de suas membranas como iscas para desviar a defesa do organismo. Assim, esta nova técnica permite que as formulações contenham uma grande quantidade de um ou mais antígenos do vírus em uma plataforma fortemente adjuvante, induzindo uma resposta imune mais pronunciada (Figura 8B) (INSTITUTO BUTANTAN, 2020). Finalmente, uma vacina de *spray* nasal está sendo desenvolvida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP), a qual se baseia na inserção de uma proteína do novo coronavírus dentro de uma nanopartícula, criada a partir de um

substrato natural, sendo a substância resultante aplicada em forma de *spray* nas narinas do paciente. Este tipo de vacina possui algumas vantagens em relação às vacinas injetáveis, como por exemplo, a indução da imunidade no local de aplicação (trato respiratório), a formação adicional de IgA secretora, o que pode tornar a imunização mais duradoura, reduzido custo de produção e maior facilidade de administração. As vacinas citadas em desenvolvimento no Brasil estão em fase de ensaios pré-clínicos em animais, e há expectativa de que avancem para os testes clínicos de fase 1 até 2021 (UOL, 2020, KRAMMER, 2020).

Figura 8 – Representação de algumas tecnologias vacinais em desenvolvimento no Brasil contra o vírus SARS-CoV-2. (A) Vacina constituída por partículas semelhantes aos vírus (VPLs) como carreadoras de fragmentos antigênicos relacionados à glicoproteína S. (B) Vacina constituída por *outer membrane vesicles-OMVs* conjugadas a proteínas recombinantes de antígenos de superfície do SARS-CoV-2



Fonte: Os autores, adaptada de:
<https://www.sanarmed.com/tipos-de-vacinas-em-estudo-contracovid-19-resumo>

CONCLUSÃO

Diante do cenário atual de pandemia pelo vírus SARS-CoV-2/ COVID-19, diversos grupos de pesquisa no Brasil e no mundo têm atuado de forma veemente e incessante para a elucidação dos mecanismos de infecção pelo vírus e dos processos fisiopatológicos e imunológicos intrínsecos à doença, o que é fundamental para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, e estratégias terapêuticas e vacinais frente à COVID-19. Desta forma, neste trabalho foram apresentados os aspectos estruturais do vírus SARS-CoV-2 associados aos mecanismos envolvidos na imunopatogênese da doença. A seguir, foram descritos os principais métodos de diagnóstico para COVID-19, envolvendo o exame de RT-PCR e os testes sorológicos, e foi apresentado o panorama atual do desenvolvimento de vacinas, compreendendo os diferentes tipos de tecnologia inerentes às principais vacinas que se encontram em fase 3 de ensaios clínicos, bem como às vacinas em desenvolvimento no Brasil. Assim, este trabalho traduz-se como uma importante ferramenta didático-científica para todos os interessados na compreensão de conteúdos essenciais acerca do vírus SARS-CoV2/ COVID-19 aqui explicitados.

Conflitos de interesse: Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Agradecimentos: Agradecemos à bibliotecária Iandra Marcela Honorato Fernandes pelo auxílio com as referências.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica**: funções e distúrbios do sistema imunológico. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

ATYEO, C. *et al.* Distinct early serological signatures track with SARS-CoV-2 survival. **Immunity**, v. 53, p. 524–532, Sep. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.020>.

AZKUR, A. K. *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1564-1581, Jul. 2020. <https://doi.org/10.1111/all.14364>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/all.14364>.

BAI, Y. *et al.* Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19. **JAMA**, v. 323, n. 14, p. 1406-1407, Apr. 2020. doi:10.1001/jama.2020.2565. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762028>>.

BHASKAR, S. *et al.* Cytokine storm in COVID-19-immunopathological mechanisms, clinical considerations, and therapeutic approaches: the reprogram consortium position paper. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1-16, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7365905/>>.

CHEN *et al.* Quick COVID-19 healers sustain anti-SARS-CoV-2 antibody production, **Cell**, v. 183, p. 1-12, Dec. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.051>. Disponível em: <<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2820%2931458-6>>.

CRUNFLI, F. *et al.* SARS-CoV-2 infects brain astrocytes of COVID-19 patients and impairs neuronal viability. <https://doi.org/10.1101/2020.10.09.20207464>. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.09.20207464v2.full.pdf>>.

WILDE A. H. *et al.* Host factors in coronavirus replication. In: TRIPP R.; TOMPKINS S. (eds). Roles of host gene and non-coding RNA expression in virus infection (part of the *Current Topics in Microbiology and Immunology* book series, v. 419). Londres: Springer, 2017. https://doi.org/10.1007/82_2017_25. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2017_25.

DIAS, V. M. C. H. *et al.* Testes sorológicos para COVID-19: Interpretação e aplicações práticas. **J. Infect. Control**, v. 9, p. 90-101, 2020.

DONG, X. *et al.* Eleven faces of coronavirus disease. **Allergy**, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7228397/pdf/ALL-9999-na.pdf>>.

World Health Organization (WHO). **Draft Landscape of COVID-19**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>>. Acesso em: 20 out. 2020.

FLORIANO, I. *et al.* Accuracy of the Polymerase Chain Reaction (PCR) test in the diagnosis of acute respiratory syndrome due to coronavirus: a systematic review and meta-analysis. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 66, n. 7, p. 880-888, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.66.7.880>. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/ramb/v66n7/1806-9282-ramb-66-7-0880.pdf>>.

GUO, Y-R. *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. **Military Med Res**, v. 7, n. 11, p.1-10, 2020. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>. Disponível em: <<https://rdcu.be/cbgrU>>.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. **Trends in Immunology**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>. Disponível em: <[https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906\(20\)30233-7](https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906(20)30233-7)>.

HERBINGER, K. H. *et al.* Lymphocytosis and lymphopenia induced by imported infectious diseases: a controlled cross-sectional study of 17,229 diseased German travelers returning from the tropics and subtropics. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n. 6, p. 1385-1391, 2016. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/94/6/1385.pdf?expires=1606402676&id=id&accname=guest&checksum=AFCF18725C4C775AA94A0E607A13511D>>.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, p. 271-280, Apr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(20\)30229-4](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(20)30229-4)>.

<http://www.butantan.gov.br/noticias/fapesp>

<http://www.cpqrr.fiocruz.br/>

<https://agenciabrasil.ebc.com.br/>

<https://butantan.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos>

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)

<https://jornal.usp.br/atualidades/>

<https://oglobo.globo.com/>

<https://pesquisaparinovacao.fapesp.br/>

<https://pfarma.com.br>

<https://www.dw.com/>

<https://www.euroimmun.com.br/>

<https://www.jb.com.br/>

<https://www.uol.com.br/vivabem/noticias/>

HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **J Med Virol**, p. 1-7, Jun. 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.26232>. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7361342/pdf/JMV-9999-na.pdf>>.

HUSSMAN, J. P. Cellular and molecular pathways of COVID-19 and potential points of therapeutic intervention. **Front. Pharmacol.**, v. 11, p. 1-17, Jul. 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01169>. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.01169/full>>.

KRAMMER, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. **Nature**, v. 586, p. 516–527, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2798-3>>.

KUMAR *et al.* Morphology, genome organization, replication, and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). In: SAXENA, S. K. (ed). **Coronavirus disease 2019 (COVID-19): epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and therapeutics**. Singapura: Springer Nature Singapore, 2020. p. 23-31. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7>. Disponível em: <http://www.eneo.unam.mx/novedades/2020_Book_CoronavirusDisease2019COVID-19.pdf>.

LAUER, S. A. *et al.* The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. **Ann Intern Med**, v. 172, n. 9, p. 577-582, May 2020. doi: 10.7326/M20-0504. Disponível em: <<https://www.acpjournals.org/doi/full/10.7326/M20-0504>>.

LEE, S.; CHANNAPPANAVAR, R.; KANNEGANTI, T.-D. Coronaviruses: innate immunity, inflammasome activation, inflammatory cell death, and cytokines. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1083-1099, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.005>. Disponível em: <[https://www.cell.com/trends/immunology/pdf/S1471-4906\(20\)30234-9.pdf](https://www.cell.com/trends/immunology/pdf/S1471-4906(20)30234-9.pdf)>

LIMA, C. M. A. O. Informações sobre o novo coronavírus (COVID-19). **Radiol Bras.** São Paulo, v. 53, n. 2, p. V-VI, abr. 2020. <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2020.53.2e1>. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/rb/v53n2/pt_0100-3984-rb-53-02-000V.pdf.

LOGUNOV, D. *et al.* Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. **The Lancet**, v. 396, p. 887-897, maio 2020. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/article/S0140-6736\(20\)31866-3/fulltext](https://www.thelancet.com/article/S0140-6736(20)31866-3/fulltext)>.

MATEUS *et al.* Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. **Science**, v. 370, p. 89-94, 2020. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/370/6512/89.full>>.

McELVANEY, O. *et al.* A linear prognostic score based on the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts outcomes in COVID-19. **EBioMedicine**, v. 61, p. 1-8, Nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103026> 2. Disponível em: <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S2352-3964%2820%2930402-3>.

MCINTOSH, K. **Doença de coronavírus 2019 (COVID-19)**. Disponível em: <http://www2.ebserh.gov.br/documents/1688403/5111980/4.pdf/49227786-d768-470e-9ea2-7e021aa96cc9>.

MEHTA, P.; McAULEY, D. F.; BROWN, M. *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The Lancet**, v. 395, p. 1033-1034, mar./abr. 2020. Disponível em: <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S0140-6736%2820%2930628-0>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acurácia dos testes diagnósticos registrados na ANVISA para a COVID-19. In: **Diretrizes para Diagnóstico e Tratamento da Covid-19**. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde – DGITIS/SCTIE, maio 2020, Brasil.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes para Diagnóstico e Tratamento da Covid-19**. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde –SCTIE, abr. 2020. Brasil.

NETEA, M. G. *et al.* Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, p. 1454-1461, Dec. 2006. Disponível em: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1189/jlb.1205758>.

PONTELLI, M. C. *et al.* Infection of human lymphomononuclear cells by SARS-CoV-2. Jul. 2020. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.07.28.225912v1.full.pdf>.

QIN, C.; ZHOU, L.; HU, Z. *et al.* Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. **Clin Infect Dis**, v. 71, n. 15, p. 762-768, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7108125/pdf/ciaa248.pdf>.

RABI, F. A. *et al.* SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 231, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32245083/>.

RICHARDSON, S. *et al.* Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. **JAMA**, v. 323, n. 20, p. 2052-2059, 2020. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2765184>.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Fundamentos de imunologia**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

SILVA NETO, P. V. *et al.* Prognostic value of sTREM-1 in COVID-19 patients: a biomarker for disease severity and mortality. **MedRxiv (Yale University)**, 23 set. 2020. Disponível em:
<<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.09.22.20199703v2.full.pdf>>.

SIU, K. L. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3.TANK.TBK1/IKKepsilon complex. **J Biol Chem**, v. 284, n. 24, p-16202-16209, Jun. 2009. Disponível em:
<<https://www.jbc.org/content/284/24/16202.full.pdf>>.

SUNGNAK, W. *et al.* SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature Medicine**, v. 26, p.681-687, maio 2020.

VAN DOREMALEN, N. *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. **Nature**, v. 586, p. 578-582, out. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2608-y>>.

VIEIRA, L. M. F.; EMERY, E.; ANDRIOLO, A. COVID-19 - Diagnóstico laboratorial para clínicos. <https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.411>, 2020.

WANG, F.; KREAM, R. M.; STEFANO, G. B. An evidence based perspective on mRNA-SARS-CoV-2 vaccine development. **Med Sci Monit.**, v. 26, 2020, e924700-1-e924700-8. doi: 10.12659/MSM.924700. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7218962/>>.

WARD, H. *et al.* Declining prevalence of antibody positivity to SARS-CoV-2: a community study of 365,000 adults. **Clin Infect Dis**, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.10.26.20219725>. Disponível em:
<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.10.26.20219725v1.full.pdf>.

WIERSINGA, W. J. *et al.* Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): a review. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782-793, Aug. 2020. doi:10.1001/jama.2020.12839. Disponível em:
<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/10.1001/jama.2020.12839>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance. Reference: WHO/COVID-19/laboratory/2020.5, 19 Mar. 2020b. Disponível em:
<https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. Mar. 2020a. Disponível em:

<<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>>.

XAVIER, A. L. *et al.* COVID-19: Manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 56, p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://cdn.publisher.gn1.link/jbpml.org.br/pdf/pt_v56a0049.pdf>.

YE, G. *et al.* Experience of different upper respiratory tract sampling strategies for detection of COVID-19. **J Hosp Infect.**, v. 105, n. 1, p. 1-2, maio 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32173458/>>.

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**, v. 382, p. 727-733, Feb. 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31978945/>>.

ZOU, L. *et al.* SARS-Cov-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. **N. Engl. J. Med**, v. 328, n. 12, Mar. 2020. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMc2001737>>.