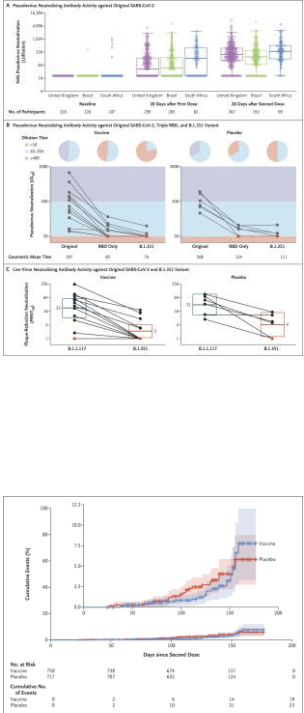


Revista e data	Título	Autores e links	Pergunta Principal	Aspectos-chaves
<p>N Engl J Med 16MAR2021</p>	<p>Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant</p>	<p>Madhi SA et al. South Africa & UK. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33725432/</p> 	<p>Eficácia da Vacina ChAdOx1 contra a variante B.1.351</p>	<p>- Prévio: A avaliação da segurança e eficácia das vacinas contra a síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) em diferentes populações é essencial, assim como a investigação da eficácia das vacinas contra variantes emergentes de SARS-CoV-2 preocupantes, incluindo a variante B.1.351 (501Y.V2) identificada pela primeira vez na África do Sul.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Ensaio multicêntrico fase 1b-2, duplo-cego, randomizado e controlado para avaliar a segurança e eficácia da vacina ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) em pessoas não infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) na África do Sul.</p> <p>-> Participantes de 18 a menos de 65 anos de idade foram designados em uma proporção de 1:1 para receber duas doses de vacina contendo 5×10^{10} partículas virais ou placebo (NaCl a 0,9%).</p> <p>-> A média entre as doses foi de 28 dias, e a duração mediana do acompanhamento desde a inscrição e de 14 dias após a segunda dose da vacina ou placebo foi 156 e 121 dias, respectivamente (em 15 de janeiro de 2021).</p> <p>-> As amostras de soro obtidas de 25 participantes após a 2ª segunda dose foram testadas através de ensaios de neutralização com pseudovírus e vírus vivo contra o vírus D614G original e a variante B.1.351.</p> <p>-> Desfechos primários: segurança e eficácia da vacina contra doença coronavírus sintomática confirmada em laboratório (Covid-19) mais de 14 dias após a segunda dose de pacientes que eram soronegativos na época da randomização.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> Entre 24 de junho e 9 de novembro de 2020, foram incluídos 2.026 adultos HIV-negativos (média de idade, 30 anos; 56,5% homens; 70,5% negros; 19% obesos, 42% tabagistas, 2,8% HAS, 3,1% doença crônica pulmonar); 1.010 e 1.011 participantes receberam pelo menos uma dose de placebo ou vacina, respectivamente.</p> <p>-> Imunogenicidade: A resposta humoral à vacina ChAdOx1 nCoV-19 induziu anticorpos neutralizantes 28 dias após a primeira dose (título médio geométrico, 132; IQR, 20 a 404), que aumentou ainda mais após uma segunda dose (título médio geométrico, 277; IQR, 124 a 526)</p> <p>-> Havia 25 participantes no grupo 1 (o grupo de 70 participantes que também tiveram medidas laboratoriais avaliadas como parte de sua análise de segurança) que eram soronegativos para SARS-CoV-2 na randomização e tinham atividade de anticorpos</p>

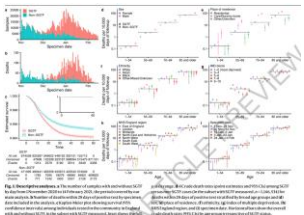
neutralizantes contra o vírus D614G original na neutralização de pseudovírus ensaio aos 14 dias após a segunda dose: as amostras de soro desses participantes, obtidas 14 dias após a segunda dose, foram posteriormente testadas com ensaios de pseudovírus e vírus vivo para atividade neutralizante contra a variante B.1.351. Após revelar os dados, 6/25 amostras de soro foram identificadas como tendo sido obtidas de receptores do grupo placebo, provavelmente infectados com o SARS-CoV-2 original (que antecedeu o surgimento da variante B.1.351 na África do Sul) durante o período de acompanhamento. Além disso, o teste de RNA mostrou que 6 dos receptores da vacina também estavam infectados com SARS-CoV-2 14 dias após a segunda dose. Seis dos 13 recipientes da vacina (46%) sem evidência de infecção anterior pelo SARS-CoV-2 não mostraram atividade de neutralização contra um pseudovírus mutante triplo RBD (contendo variantes K417N, E484K e N501Y), e 11/13 (85%) não teve atividade de neutralização contra o pseudovírus B.1.351.

-> Os títulos médios geométricos caíram de 297 contra o vírus original para 85 contra o mutante somente do RBD e para 74 contra a variante B.1.351. Receptores de vacina com doença confirmada pelo teste de RNA (antes do surgimento da variante B.1.351) mostraram resultados semelhantes aos dos participantes sem doença confirmada. Amostras de receptores do grupo placebo infectados com SARS-CoV-2 mostraram atividade neutralizante similarmente baixa, com títulos residuais de menos de 100 (ou indetectáveis) contra o pseudovírus mutante triplo RBD e a variante B.1.351.

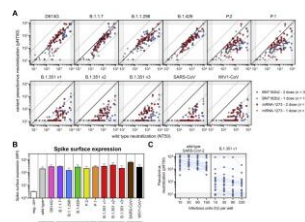
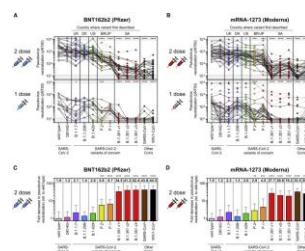
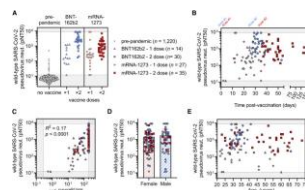
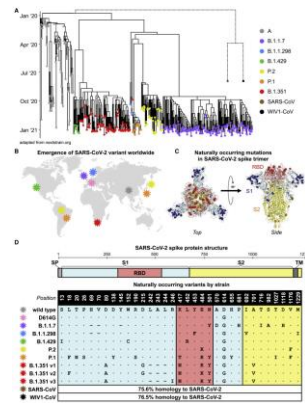
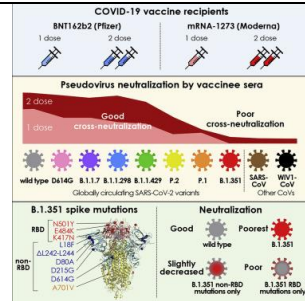
-> O ensaio de vírus vivo mostrou neutralização geral inferior, em relação ao ensaio de pseudovírus. Dos 13 recipientes da vacina sem evidência de infecção prévia pelo SARS-CoV-2 antes ou durante o acompanhamento, um apresentou atividade de neutralização indetectável contra B.1.1 e B.1.351; 7/12 participantes (58%) com atividade de neutralização contra B.1.1 tiveram atividade de neutralização indetectável contra a variante B.1.351, e os 5 restantes mostraram neutralização que foi menor por um fator de 4,1 a 31,5.

-> Desfecho primário: desenvolvimento da Covid-19 leve a moderada em 23/717 receptores do grupo placebo (3,2%) e em 19/750 receptores da vacina (2,5%), para uma eficácia de 21,9% (IC95%, -49,9 a 59,8).

-> Todos os 42 casos de Covid-19 foram classificados como leves (15 recipientes da vacina e 17 recipientes do placebo) ou moderado (4 recipientes da vacina e 6

			<p>recipientes do placebo); não houve casos de doença grave ou hospitalização em nenhum dos grupos. A incidência confirmada de Covid-19 leve a moderada mais de 14 dias após a segunda dose entre os participantes previamente soronegativos foi de 93,6 por 1000 pessoas-ano no grupo de placebo e 73,1 por 1000 pessoas-ano no grupo da vacina; a eficácia da vacina foi de 21,9% (IC95%, -49,9 a 59,8)</p> <p><u>-> Entre os 42 participantes com Covid-19, 39 casos (92,9%) foram causados pela variante B.1.351; a eficácia da vacina contra esta variante, analisada como um desfecho secundário, foi 10,4% (IC 95%, -76,8 a 54,8).</u></p> <p>-> A incidência de eventos adversos graves foi equilibrada entre os grupos da vacina e o placebo.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Um regime de duas doses da vacina ChAdOx1 nCoV-19 não mostrou proteção contra a Covid-19 leve a moderada devido à variante B.1.351.</p>
<p>Nature 15MAR2021</p>	<p>Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7</p>	<p>Davies NG et al. UK https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33723411/</p> 	<p>Aumento d amortalidade pela linhagem B.1.1.7</p> <p>- Prévio: A linhagem B.1.1.7 do SARS-CoV-2, uma variante detectada pela primeira vez no Reino Unido em setembro de 2020, se espalhou para vários países em todo o mundo.</p> <p>-> Vários estudos estabeleceram que B.1.1.7 é mais transmissível do que as variantes preexistentes, mas não identificaram se leva a alguma mudança na gravidade da doença.</p> <p>- Objetivo: Analisar um conjunto de dados ligando 2.245.263 testes comunitários para SARS-CoV-2 positivos e 17.452 mortes de COVID-19 na Inglaterra de 1 de setembro de 2020 a 14 de fevereiro de 2021.</p> <p>- Métodos:</p> <p>- Vinculados três conjuntos de dados fornecidos pelo programa <i>Public Health England</i>: uma lista de todos os testes positivos no teste "Pilar 2" (comunidade) da Inglaterra para SARSCoV-2, contendo a data da amostra e informações demográficas; uma lista de linha de valores de limite de ciclo (Ct) para o ORF1ab, N (nucleocapsídeo) e genes S (<i>spike</i>) para testes positivos que foram processados num dos três laboratórios nacionais (Alderley Park, Glasgow, ou Milton Keynes) utilizando o ensaio Thermo Fisher TaqPath COVID-19; e uma lista de todas as mortes devido à COVID-19 na Inglaterra, que combina e desduplica mortes relatadas em hospitais na Inglaterra, pelo <i>Office for National Statistics</i>, por</p>

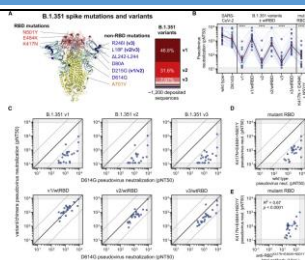
			<p>meio de relatórios diretos da <i>Public Health England and Health Protection</i>.</p> <p>-> Por fim, vinculados esses conjuntos de dados usando um sistema numérico identificador para testes do Pilar 2 ('FINALID') comum a todos os três conjuntos de dados.</p> <p>-> A falha do gene <i>spike</i> (SGTF; S gene target failure) foi definida como qualquer teste com Ct <30 para ORF1ab e N, mas sem detecção do gene <i>spike</i> e amostras não-SGTF como qualquer teste com Ct <30 para ORF1ab, N e S.</p> <p>- Resultado:</p> <p>-> Para 1.146.534 (51%) desses testes, a presença ou ausência de B.1.1.7 pode ser identificada por causa de mutações nesta linhagem que impedem a amplificação pelo teste PCR do gene <i>spike</i> (falha do alvo do gene S, SGTF1/ <i>S gene target failure</i>).</p> <p>-> Com base em 4.945 mortes com status SGTF conhecido, estimado que o risco de morte associado a SGTF foi 55% (IC 95% 39-72%) maior, mesmo após ajuste para idade, sexo, etnia, privação, residência em lar, autoridade local de residência e data do teste.</p> <p>-> Isso corresponde ao risco absoluto de morte para um homem de 55-69 anos aumentando de 0,6% para 0,9% (IC95% 0,8-1,0%) em 28 dias após um teste positivo na comunidade.</p> <p>-> Corrigindo a classificação incorreta de SGTF e falta no status de SGTF, foi estimado um risco 61% (42-82%) maior de morte associado a B.1.1.7.</p> <p>- Conclusão:</p> <p>-> A análise sugere que B.1.1.7 não é apenas mais transmissível do que as variantes pré-existentes do SARS-CoV-2, mas também pode causar doenças mais graves.</p>
<p>Cell 12MAR2021</p>	<p>Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity</p>	<p>Garcia-Beltran WF et al. USA, Germany 7 South Africa. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33743213/</p>	<p>Várias variantes do SARS-CoV-2 escapam da neutralização viral desencadeada pela imunidade humoral obtida pela vacinação (mRNA-1273 e BNT162b2)</p> <p>- Prévio: A vacinação elicia respostas imunes capazes de neutralizar potentemente o SARS-CoV-2. No entanto, a vigilância contínua revelou o surgimento de variantes que abrigam mutações na proteína <i>spike</i>, o principal alvo dos anticorpos neutralizantes.</p> <p>-Objetivo: Para compreender o impacto dessas variantes, foi avaliada a potência da neutralização em 99 indivíduos que receberam uma ou duas doses das vacinas BNT162b2 ou mRNA-1273 contra pseudovírus representando 10 cepas circulantes globalmente de SARS-CoV-2.</p> <p>-Métodos:</p>



-> As células 293T-ACE2 foram um presente de Michael Farzan (Scripps Florida) e Nir Hacohen (Broad Institute). A confirmação da expressão da ACE2 nas células 293T-ACE2 foi realizada por citometria de fluxo.

-> Construção de plasmídeos com expressão das spikes variantes: Para criar plasmídeos de expressão de spikes variantes, realizadas múltiplas ampliações de fragmentos da PCR utilizando oligonucleotídeos contendo cada mutação desejada (Tecnologia de DNA Integrada) e utilizada montagem de fragmentos sobrepostos para gerar o complemento total de mutações para cada cepa. É importante ressaltar que essas mutações foram geradas utilizando o plasmídeo com expressão da spike do SARS-CoV-2 com códon otimizado anteriormente descrito pelos autores, contendo uma deleção dos 18 aminoácidos do terminal C, o que resulta em títulos de pseudovírus mais elevados. Os fragmentos montados foram inseridos no vetor pTwist-CMV-BetaGlobin-WPRE-Neo digerido com NotI / XbaI utilizando o In-Fusion HD Cloning Kit (Takara). Todo o DNA de plasmídeo resultante utilizado no estudo foi verificado por sequencição profunda de plasmídeo total (Illumina) para confirmar a presença de apenas as mutações pretendidas.

-> Teste de neutralização do pseudovírus SARS-CoV-2: Resumidamente, os pseudovírus foram produzidos nas células 293T através da transfeção com PEI e com a estrutura lentiviral que codifica CMV-Luciferase-IRES-ZsGreen, bem como plasmídeos auxiliares lentivirais e cada plasmídeo de expressão de variante de pico. Após a coleta e filtragem, a produção foi quantificada por titulação via citometria de fluxo nas células 293T-ACE2. Os ensaios de neutralização e leitura foram realizados em um manipulador de líquidos Fluent Automated Workstation (Tecan) usando placas de 384 poços (Grenier). Diluições em série de três vezes variando de 1:12 a 1: 8.748 foram realizadas para cada amostra de soro antes de adicionar 50–250 unidades infecciosas de pseudovírus por 1h. Subsequentemente, as células 293T-ACE2 contendo polibreno foram adicionadas a cada poço e incubadas a 37°C/5% CO2 durante 60-72 h. Após a transdução, as células foram lisadas usando um tampão contendo luciferina (Siebring-van Olst et al., 2013) e agitadas por 5 min antes da quantificação da expressão da luciferase dentro de 1h da adição do tampão usando um luminômetro Spectramax L. A neutralização percentual foi determinada subtraindo a luminescência de fundo medida nos poços de controle de células (apenas células) dos poços de amostra e dividindo por poços do controle



com vírus (apenas vírus e células). Os dados foram analisados usando Graphpad Prism e os valores de pNT₅₀ foram calculados tomando o inverso do valor da concentração inibitória de 50% para todas as amostras com um valor de neutralização de pseudovírus de 80% ou superior na concentração mais alta de soro.

-> Titulação do pseudovírus: Para determinar as unidades infecciosas dos vetores lentivirais pseudotipados, foram plaqueadas 400.000 células 293T-ACE2 por poço de uma placa de 12 poços. 24 h mais tarde, três diluições em série de dez vezes do sobrenadante do pseudovírus puro foram feitas em 100 µL, que foi então usado para substituir 100 µL do meio nas células plaqueadas. As células foram incubadas durante 48h a 37°C/5% CO₂ para permitir a expressão do gene repórter ZsGreen e colhidas com Tripsina-EDTA (Corning). As células foram ressuspensas em PBS suplementado com 2% de FBS (PBS +) e analisadas em um Citômetro de Fluxo Stratedigm S1300Exi para determinar a porcentagem de células que expressam ZsGreen. As unidades infecciosas foram calculadas determinando a porcentagem de células infectadas em poços exibindo diminuições lineares na transdução e multiplicando pelo número médio de células por poço determinado no início do ensaio. Num MOI baixo, cada célula ZsGreen transduzida foi assumida como representando uma única unidade infecciosa.

-> ELISA para o anticorpo total do domínio de ligação ao receptor (RBD) do SARS-CoV-2: A detecção quantitativa de anticorpos totais para o domínio de ligação do receptor SARS-CoV-2 (RBD) foi realizada como descrito anteriormente (Garcia-Beltran et al., 2021). Resumidamente, utilizado o ELISA indireto com um padrão consistindo de anticorpo monoclonal anti-SARS-CoV e -CoV-2 (CR3022) (isotipo IgG1). Placas de ELISA de 96 poços foram revestidas com SARS-CoV-2 RBD do tipo selvagem purificado. As placas foram bloqueadas com BSA e lavadas. Uma curva padrão de sete pontos foi criada usando CR3022-IgG1 começando em 2 µg/mL, realizando diluições em série 1:3 com tampão de diluição, e as amostras de soro foram diluídas 1:100 com tampão de diluição. Amostras diluídas e padrões foram adicionados aos poços correspondentes e incubados por 1h a 37 ° C, seguido da lavagem. Os anticorpos totais foram detectados com IgG + IgA + IgM (H + L) -HRP (Betil) diluído 1:25.000 para uma incubação de 30 min à temperatura ambiente. Após a lavagem, o substrato TMB (Inova) foi adicionado a cada poço e incubado por 5-15 min antes de interromper a reação com 1 M

H₂SO₄. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 450 nm com subtração da D.O. a 570 nm como comprimento de onda de referência em um leitor de microplaca SpectraMax ABS. Os níveis de anticorpos anti-RBD foram calculados por interpolação na curva padrão e correção da diluição da amostra; uma unidade por mL (U/ml) foi definida como a reatividade equivalente observada por 1 µg/ml de CR3022. Em ensaios em que RBD mutado abrigando mutações K417N, E484K e N501Y foi usado, o mesmo protocolo de ELISA foi realizado após a confirmação de que o padrão (CR3022-IgG1) se ligou ao RBD mutante versus RBD do tipo selvagem quase idêntico.

- Resultados:

-> Um subconjunto de variantes do SARS-CoV-2 foi identificado como variantes de preocupação pela OMS devido à presença de mutações com potencial para aumentar a transmissibilidade, virulência ou evitar respostas imunológicas. O estudo avaliou as variantes de preocupação descritas pela primeira vez no Reino Unido (B.1.1.7), Dinamarca (B.1.1.298), Estados Unidos (B.1.429), Brasil e Japão (P.2 e P.1), e África do Sul (B.1.351), a maioria dos quais surgiu no final de 2020. Embora as mutações que surgem naturalmente nessas variantes abranjam toda a proteína spike, elas ocorrem principalmente em S1 e RBD, o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. Depois de analisar as sequências da spike do SARS-CoV-2 depositadas para cada linhagem no GISAID, identificado que as mutações da sequência de consenso que representam a cepa circulante dominante para cada linhagem. No caso da linhagem B.1.351, foram estudadas três das variantes dominantes que compreendem a maioria das sequências depositadas, as quais denominamos v1, v2 e v3. As três principais mutações RBD de preocupação são: (1) N501Y, presente nas variantes B.1.1.7, P.1 e B.1.351; (2) E484K, presente nas variantes P.2, P.1 e B.1.351; e (3) K417T para a variante P.1 e K417N para as variantes B.1.351. Separadamente, a variante B.1.1.298 encontrada em visons dinamarqueses continha uma mutação Y453F em RBD, e a variante Califórnia B.1.429 continha uma mutação L452R. Embora distantemente relacionado, o SARS-CoV do surto de coronavírus de Hong Kong em 2002 e o WIV1-CoV pré-emergente derivado de morcego compartilham ~76% de homologia na spike com o SARS-CoV-2 e foram avaliados para fornecer comparação com coronavírus sorologicamente distintos.

-> Avaliada uma coorte de 99 indivíduos que receberam uma ou duas doses completas das vacinas BNT162b2 ou mRNA-1273: a

neutralização das variantes do SARS-CoV: mediana de idade 33 anos (IQR, 22-73 anos), 62,6% (62/99) do sexo feminino e 37,4% (37/99) do sexo masculino.

-> A análise das características de operação do receptor (ROC) mostrou que o ensaio de neutralização do pseudovírus foi capaz de discriminar com precisão entre indivíduos não vacinados e vacinados ≥ 7 dias após a segunda dose de BNT162b2 ou mRNA-1273 (AUC=0,9998), com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 99% usando o limite de detecção do ensaio (pNT₅₀ de 12) como ponto de corte.

-> Para os indivíduos que receberam uma dose da vacina (ou < 7 dias após a segunda dose), a sensibilidade foi reduzida para 93%. Os soros obtidos de indivíduos que receberam duas doses completas da vacina exibiram neutralização robusta do pseudovírus SARS-CoV-2 do tipo selvagem, com receptores BNT162b2 atingindo um título médio de 2.016 e receptores de mRNA-1273 atingindo um título médio de 762 (esta diferença não foi estatisticamente significativa). Os indivíduos que receberam apenas uma dose da vacina (ou < 7 dias após a segunda dose) tiveram neutralização significativamente mais baixa, mas prontamente detectável, com títulos medianos de 167 para BNT162b2 e 208 para mRNA-1273. Ao comparar o título de neutralização do pseudovírus em função do tempo pós-vacinação, observado um aumento esperado no título após a segunda dose. A magnitude da neutralização se correlacionou com os níveis totais de anticorpos anti-RBD; no entanto, esta correlação foi fraca, dado que a maioria dos vacinados atingiu o limite superior de detecção do ELISA. Nem o sexo nem a idade pareceram influenciar significativamente os títulos de neutralização.

-> A neutralização do pseudovírus D614G foi semelhante a do tipo selvagem em indivíduos que receberam duas doses da vacina (redução de 1,2 vezes para ambas as vacinas de duas doses), o que estava em contraste com estudos anteriores em soros convalescentes que os próprios autores e outros autores (demonstração dum ligeiro aumento da neutralização da variante D614G contra o tipo selvagem; Garcia-Beltran et al., 2021) após a infecção natural. O efeito foi mais pronunciado nos indivíduos que receberam uma dose da vacina, alguns dos quais tinham neutralização indetectável do D614G apesar da neutralização detectável de SARS-CoV-2 do tipo selvagem. Essa diferença pode ser uma consequência da vacina que codifica a sequência da *spike* do tipo selvagem, enquanto muitos indivíduos convalescentes em estudos anteriores

provavelmente foram infectados com a variante D614G do SARS-CoV-2, uma vez que já havia se tornado a cepa globalmente dominante no verão de 2020.

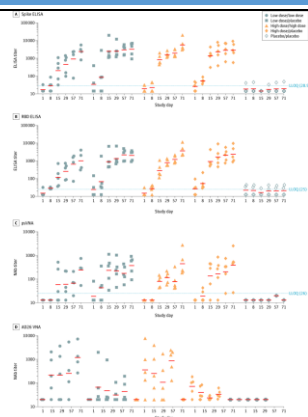
-> Ao avaliar variantes contendo uma mutação RBD, a variante do Reino Unido B.1.1.7 (N501Y), a variante dinamarquesa do vison B.1.1.298 (Y453F) e a variante da Califórnia B.1.429 (L452R) exibiram neutralização que foi geralmente semelhante ao do tipo selvagem e à variante D614G parental.

-> **No entanto, a neutralização da variante P.2 brasileira/japonesa, cujo RBD contém uma mutação E484K, foi significativamente reduzida (5,8 vezes para BNT162b2, $p < 0,001$; 2,9 vezes para mRNA-1273, $p < 0,01$).** Isso está de acordo com estudos anteriores que sugerem que a mutação E484K pode evitar respostas de anticorpos policlonais (Greaney et al., 2021a; Jangra et al., 2021) e foi encontrada em casos de reinfecção do SARS-CoV-2 (Paiva et al., 2020; Faria et al., 2021; Resende et al., 2021; Naveca et al., 2021; Vasques Nonaka et al., 2021). **Da mesma forma, as respostas de anticorpos neutralizantes também diminuíram significativamente para a cepa P.1 brasileira/japonesa (6,7 vezes para BNT162b2, $p < 0,0001$; 4,5 vezes para mRNA-1273, $p < 0,001$), que contém três mutações em RBD (K417T, E484K e N501Y) e também foi encontrado em casos de reinfecção** (Paiva et al., 2020).

-> **Surpreendentemente, a neutralização de todas as três cepas sul-africanas B.1.351 foi substancialmente diminuída para ambas as vacinas com duas doses (v1: 34,5 vezes para BNT162b2 e 27,7 vezes para mRNA-1273; v2: 41,2 vezes para BNT162b2 e 20,8 vezes para mRNA-1273; v3: 42,4 vezes para BNT162b2 e 19,2 vezes para mRNA-1273; $p < 0,0001$ para todas as comparações). Estas cepas contêm as mesmas três mutações RBD que P.1, exceto por uma substituição asparagina versus treonina em K417 (K417N) e várias mutações adicionais em regiões não RBD.**

-> Para melhor caracterizar o contexto mutacional responsável pela resistência de neutralização B.1.351, foi explorada a contribuição das mutações localizadas dentro e fora da região RBD da spike. Digno de nota, muitas das substituições e deleções encontradas na linhagem B.1.351 estão em estreita proximidade estrutural no domínio S1. No entanto, 86,2% das sequências GISAID disponíveis desta linhagem abrigam essas mutações em três padrões distintos representados por B.1.351 v1 (46,6%), v2 (31,6%) e v3 (8,0%). Os autores criaram pseudovírus nos quais as regiões RBD do B.1.351 v1, v2 e v3 foram revertidas para sua

				<p>sequência de Wuhan de tipo selvagem original (v1/wtRBD, v2/wtRBD e v3/wtRBD), mantendo todos os outros B.1.351 v1, mutações v2 ou v3. Notavelmente, os ensaios de neutralização realizados com soros de 24 indivíduos que receberam a vacina de duas doses BNT162b2 revelaram que a neutralização de B.1.351 v1, v2 e v3 na ausência de mutações RBD foi comparável à de D614G. Um pseudovírus contendo apenas as três mutações RBD (K417N, E484K e N501Y) em grande parte, mas não inteiramente, recapitulou o fenótipo de escape. Apesar desse escape, os anticorpos apresentaram ligação reduzida, mas detectável, à proteína RBD mutante que abriga mutações B.1.351 (K417N, E484K e N501Y) pelo teste de ELISA, o que se correlacionou com a neutralização do pseudovírus K417N + E484K + N501Y ($R^2=0,67$, $p<0,0001$). Isto sugere que os anticorpos induzidos pela vacina capazes de se ligar ao RBD mutante podem reter a capacidade de neutralizar pseudovírus mutantes do RBD.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> 5/10 pseudovírus, com mutações no domínio de ligação ao receptor (RBD), incluindo K417N/T, E484K e N501Y, foram altamente resistentes à neutralização.</p> <p>-> A neutralização cruzada de variantes B.1.351 foi comparável ao SARS-CoV e ao WIV1-CoV derivado do morcego, sugerindo que um número relativamente pequeno de mutações pode mediar o escape potente das respostas à vacina.</p> <p>-> Embora o impacto clínico da resistência à neutralização permaneça incerto, esses resultados destacam o potencial para as variantes escaparem da imunidade humoral neutralizante e enfatizam a necessidade de desenvolver intervenções para a proteção ampla contra a pandemia em evolução.</p>
<p>JAMA 11MAR2021</p>	<p>Immunogenicity of the Ad26.COV2.S Vaccine for COVID-19</p>	<p>Stephenson KR et al. USA, the Netherlands, Belgium. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33704352/</p>	<p>Eficácia da vacina vetorizada com a proteína spike (Ad26.COV2.S): estudo fase 1</p>	<p>- Importância: O controle da pandemia global COVID-19 exigirá o desenvolvimento e implantação de vacinas seguras e eficazes.</p> <p>-> Estudos anteriores demonstraram que um vetor de adenovírus sorotipo 26 (Ad26) expressando a proteína <i>spike</i> do SARS-CoV-2 (S), denominada Ad26.COV2.S, protegeu efetivamente macacos rhesus contra infecção e hamsters contra doenças graves após desafio com o SARS-CoV-2.</p> <p>- Objetivo: Avaliar a imunogenicidade da vacina Ad26.COV2.S (Janssen/Johnson & Johnson) em humanos, incluindo a cinética, a magnitude e o fenótipo das respostas imunológicas humorais e celulares específicas da proteína spike do</p>



SARS-CoV-2.

- Métodos:

-> N=25 participantes foram inscritos de 29 de julho a 7 de agosto de 2020, e o acompanhamento para esta análise provisória do dia 71 foi concluído em 3 de outubro de 2020.

-> O acompanhamento para avaliar a durabilidade continuará por 2 anos.

-> Centro único em Boston, Massachusetts, EUA como parte de um ensaio clínico de fase 1 randomizado, duplo-cego, controlado por placebo de Ad26.COV2.S.

-> Intervenções: Os participantes foram randomizados para receber 1 ou 2 injeções intramusculares com 5×10^{10} partículas virais ou 1×10^{11} partículas virais da vacina Ad26.COV2.S ou placebo administrado no dia 1 e no dia 57 (5 participantes em cada grupo).

-> As respostas imunes humorais incluíram respostas de anticorpos neutralizantes e de ligação em vários pontos de tempo após a imunização.

-> As respostas imunes celulares incluíram ensaios de coloração de citocinas intracelulares e baseados em immunospot para medir as respostas dos linfócitos T.

- Resultados:

-> N=25 participantes foram randomizados (mediana de idade, 42; faixa etária, 22-52 anos; 52% mulheres) e todos completaram o ensaio até o ponto final intermediário do dia 71.

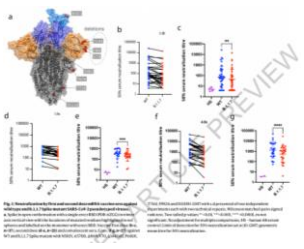
-> Os anticorpos ligantes e neutralizantes surgiram rapidamente no dia 8 após a imunização inicial em 90% e 25% dos receptores da vacina, respectivamente.

-> No dia 57, os anticorpos de ligação e neutralizantes foram detectados em 100% dos receptores da vacina após uma única imunização.

-> No dia 71, os títulos médios geométricos de anticorpos de ligação específica ao pico foram 2.432 a 5.729 e os títulos médios geométricos de anticorpos neutralizantes foram 242 a 449 nos grupos vacinados.

-> Uma variedade de subclasses de anticorpos, propriedades de ligação ao receptor Fc e funções antivirais foram induzidas, bem como as respostas dos linfócitos T CD4 + e CD8 +.

-> As respostas ELISPOT de IFN- γ foram observadas em 65% (13/20) dos receptores da vacina no dia 15 e em 84% (16/19) dos

			<p>receptores da vacina no dia 71, sem diferenças claras entre os grupos. Nenhuma resposta de IL-4 foi observada, indicando uma resposta imune celular influenciada por TH1. Os ensaios de ICS multiparâmetros confirmaram a indução de respostas de linfócitos T CD27+/CD45RA-/CD4+ e CD8+ de memória central em todos, exceto em 1 indivíduo.</p> <p>-> As respostas ELISPOT de IFN-γ correlacionaram-se com títulos de anticorpos de ligação específicos da <i>spike</i> (R=0,55, p=0,005), títulos de anticorpos de ligação específicos de RBD (R=0,54, p=0,006) e títulos de anticorpos neutralizantes (R=0,57, p=0,003) no dia 29.</p> <p>- Conclusão:</p> <p>-> Neste estudo de fase 1, uma única imunização com Ad26.COVS.2 induziu respostas rápidas de anticorpos de ligação e neutralização, bem como respostas imunes celulares.</p> <p>-> Dois ensaios clínicos de fase 3 estão em andamento para determinar a eficácia da vacina Ad26.COVS.2</p>
<p>Nature 11MAR2021</p>	<p>Sensitivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 to mRNA vaccine-elicited antibodies</p>	<p>Collier DA et al. UK, USA, Mexico, South Africa. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33706364/</p> 	<p>Mutação E484K da variante B.1.1.7 do SARS-CoV-2: potencial escape das vacinas e anticorpos monoclonais</p> <p>- Prévio: A transmissão do SARS-CoV-2 não é controlada em muitas partes do mundo, agravada em algumas áreas pelo maior potencial de transmissão da variante 1 B.1.1.7, agora relatado em 94 países.</p> <p>-> Não está claro se as respostas às vacinas SARS-CoV-2 baseadas na cepa prototípica serão afetadas por mutações encontradas em B.1.1.7.</p> <p>-> Objetivo: Avaliar as respostas imunes após a vacinação com a vacina de mRNA BNT162b2.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Avaliação das respostas de anticorpos neutralizantes após a primeira e segunda imunizações usando pseudovírus que expressam a proteína <i>spike</i> do tipo selvagem ou as mutações de 8 aminoácidos encontradas na proteína <i>spike</i> B.1.1.7.</p> <p>-> Títulos de IgG no soro para proteína Nucleocapsídeo (N), S e o RBD foram testados também.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> N=37 participantes receberam a primeira dose da vacina de mRNA BNT162b2 três semanas antes da coleta de sangue para coleta de células mononucleares do sangue (PBMC).</p> <p>-> Mediana de idade: 62 anos (IQR 47-84) e 35% eram mulheres.</p> <p>-> N=21 desses participantes também tiveram uma coleta de sangue 3 semanas após receber a</p>

segunda dose da BNT162b2.

-> Usando a pseudotipagem lentiviral, foi estudado o SARS-CoV-2 WT (rolamento de tipo selvagem D614G) e proteínas *spike* B.1.1.7 mutantes para medir a atividade de neutralização de soros induzidos pela vacina: os soros da vacina exibiram uma gama de diluições inibitórias (50% de neutralização - ID₅₀).

-> Os títulos médio geométricos (GMT) contra o tipo selvagem (WT) após a segunda dose da vacina foi substancialmente maior do que após a primeira dose (318 *versus* 77).

-> Houve correlação entre os títulos totais da IgG-*spike* e os títulos de neutralização do soro.

-> Uma ampla gama de respostas de linfócitos T foi medida por IFN gama FluoroSpot contra peptídeos do SARS-CoV-2 em vacinados após a primeira dose: essas respostas celulares não se correlacionaram com títulos de neutralização sérica ou títulos de anticorpos IgG-*spike*.

-> Em seguida, foram gerados pseudovírus mutados carregando a proteína S com as mutações N501Y, A570D e a deleção H69/V70. Observado um pequeno aumento na capacidade do soro de vacinados e indivíduos convalescentes de inibir esse vírus mutante triplo.

-> Em seguida, completado o conjunto completo de oito mutações na proteína S presente na variante B.1.1.7: 20/29 daqueles participantes com atividade de neutralização após a primeira dose mostraram evidências de redução nos títulos de neutralização B.1.1.7, com média de variação de 3,2±5,7. Após a segunda dose, o GMT foi acentuadamente aumentado em comparação com os títulos da primeira dose, com média da variação 1,9±0,9.

-> Entre os 27 indivíduos recuperados, o GMT de 50% de neutralização foi de 1334 para WT, significativamente maior do que a vacinação após a segunda dose. O *fold change* da ID₅₀ para a neutralização de B.1.1.7 *versus* tipo selvagem (D614G) foi 4,5.

-> A substituição E484K foi relatada como uma mutação de escape para vários anticorpos monoclonais e está presente nas linhagens B.1.351 (501Y.V2) e P.1 (501Y.V3). Em 11 de fevereiro de 2021, trinta sequências B.1.1.7 também tinham a substituição E484K. A análise filogenética sugere que houve várias aquisições independentes, com uma variante parecendo se expandir ao longo do tempo, indicando transmissão ativa. Dessa forma, a *Public Health England* identificou essa variante como uma variante de preocupação (VOC 202102/02).

-> Portanto, foi gerado um pseudovírus com mutações B.1.1.7 com ou sem E484K adicional e realizado o teste contra soros obtidos após a primeira e segunda dose vacina de mRNA, bem

como contra soros convalescentes: após a segunda dose, observada uma perda significativa de atividade neutralizante para o pseudovírus com mutações da *spike* B.1.1.7 e E484K; a média do *fold change* para a *spike* E484K B.1.1.7 foi 6,7 em comparação com 1,9 para B.1.1.7, em relação ao WT.

-> Da mesma forma, quando testado um painel de soros convalescentes com uma faixa de títulos de neutralização, observada uma perda adicional da atividade contra a *spike* B.1.1.7 mutante com E484K, com *fold change* de 11,4 em relação ao WT.

-> Sensibilidade da B.1.1.7 aos anticorpo monoclonais (mAbs): foram testados 60 mAbs isolados de 15 indivíduos que se recuperaram da infecção pelo SARS-CoV-2 no início de 2020 com um ensaio de neutralização pseudotipado *in vitro* contra a *spike* B.1.1.7; 20/60 (33,3%) mAbs mostraram uma perda maior do que 2 vezes da atividade neutralizante da variante B.1.1.7 em comparação com WT SARS-CoV-2.

-> O vírus mutante B.1.1.7 escapou totalmente da neutralização em 8/10 (80%) dos mAbs com direcionamento a NTD; dos 31 mAbs de direcionamento a RBM, 5 (16,1%) mostraram uma diminuição de mais de 100 vezes na neutralização de B.1.1.7, e 6 mAbs adicionais (19,4%) tiveram uma redução parcial de 2 a 10 vezes.

-> Finalmente, todos os mAbs específicos do RBD não direcionados ao RBM testados retiveram totalmente a atividade de neutralização de B.1.1.7.

-> Para abordar o papel da mutação B.1.1.7 N501Y no escape de neutralização de anticorpos específicos do RBM, foi testada a ligação de 50 mAbs específicos para o RBD do WT e RBD mutante N501Y por interferometria de biolayer: os 5 mAbs específicos para o RBM que não conseguiram neutralizar a variante B.1.1.7 mostraram uma perda completa de ligação ao mutante N501Y RBD, demonstrando um papel para esta mutação como um mecanismo de escape para certos mAbs de segmentação RBM.

-> Para avaliar o efeito de E484K neste painel de mAbs, gerado um pseudótipo SARS-CoV-2 com as mutações K417N, E484K e N501Y (TM). A inclusão da substituição K417N foi induzida pela observação de que substituições nesta posição foram encontradas em 5 sequências de isolados virais recentes dentro da variante B.1.1.7 (K417 para N, E ou R). Isso está de acordo com a evolução convergente do vírus para um RBD com N501Y, E484K e K417N/T, como evidenciado pelas linhagens B.1.351 e P.1.

-> É importante ressaltar que mutações em

K417 foram associadas ao escape da neutralização dos mAbs, incluindo o mAb LY-CoV016,6 recentemente aprovado.

-> Dos 60 mAbs testados, 20 (33,3%) mostraram perda > 10 vezes da atividade neutralizante do mutante TM em comparação com WT SARS-CoV-2 e destes 19 são mAbs específicos do RBM.

-> Posteriormente, foi abordado o papel da mutação E484K no escape de anticorpos específicos do RBM, testando a ligação de 50 mAbs específicos para o RBD do WT e RBD mutante E484K por interferometria de biolayer: dos 19 mAbs específicos para o RBM que mostraram redução ou perda de neutralização do mutante TM, 16 mostraram uma perda completa ou parcial de ligação ao mutante E484K RBD, consistente com as descobertas de que E484K é uma importante mutação de escape viral. Três desses 16 mAbs também perderam a ligação a um RBD carregando N501Y, indicando que uma fração de anticorpos RBM é sensível a ambas as mutações N501Y e E484K. Da mesma forma, 3 dos 19 mAbs que perderam a neutralização do mutante TM (S2D8, S2H7 e S2X128) mostraram anteriormente que perdem a ligação e a neutralização para o mutante K417V, e aqui mostraram ser sensíveis às mutações N501Y ou E484K

- Discussão:

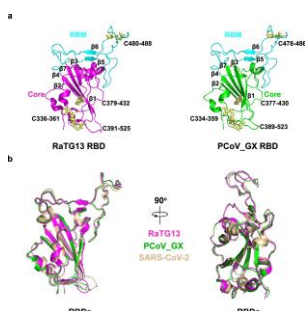
-> A introdução da mutação E484K em um contexto B.1.1.7 para refletir uma Variante de Preocupação recentemente emergente (VOC 202102/02) levou a uma perda mais substancial da atividade neutralizante por anticorpos e mAbs desencadeados pela vacina (19/31) durante aquele conferido pelas mutações isoladas da variante B.1.1.7.

-> A emergência de E484K no fundo B.1.1.7 representa uma ameaça à vacina BNT162b.

Nat Commun
11MAR2021

Bat and pangolin coronavirus spike glycoprotein structures provide insights into SARS-CoV-2 evolution

Zhang S et al. China.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33707453/>

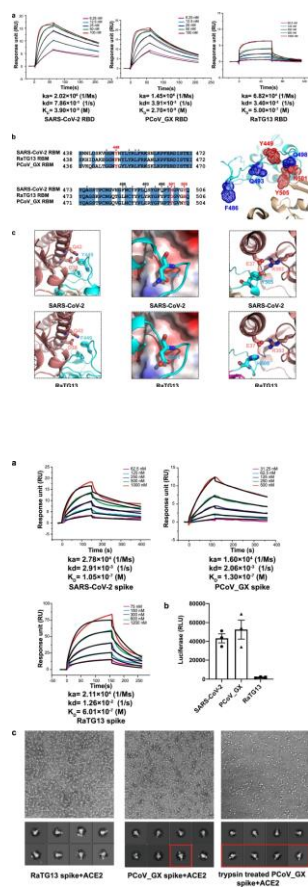


Evolução do SARS-CoV-2 a partir de mudanças no RBD da proteína spike

- Prévio: Ao reconhecer o receptor celular do hospedeiro e mediar a fusão do vírus e das membranas celulares, a glicoproteína *spike* (S) dos coronavírus é a proteína viral mais crítica para a transmissão cruzada de espécies e infecção.

-> O coronavírus RaTG13, detectado no morcego ferradura *Rhinolophus affinis* na província chinesa de Yunnan, foi identificado como o parente mais próximo do SARS-CoV-2. Ele compartilha 96,2% de identidade de sequência com o genoma SARS-CoV-2, refletindo a provável origem do SARS-CoV-2 em morcegos.

-> Coronavírus do pangolin (PCoV), intimamente relacionados ao SARS-CoV-2, também foram identificados em pangolins malaios contrabandeados (*Manis javanica*) nas províncias chinesas de Guangxi (GX) e



Guangdong (GD). As análises de seis sequências do genoma PCoV_GX e quatro PCoV_GD indicaram um alto nível de similaridade com SARS-CoV-2 (85,5% a 92,4% de identidade de sequência).

-> No entanto, os reservatórios naturais e hospedeiros intermediários do SARS-CoV-2 permanecem um tópico de debate, e ainda não está claro como o SARS-CoV-2 evoluiu para infectar humanos.

- Objetivo: Determinar as estruturas crio-EM das pontas dos coronavírus de morcego (RaTG13) e pangolim (PCoV_GX), que estão intimamente relacionadas ao SARS-CoV-2.

- Resultados:

-> A glicoproteína *spike* homotrímérica (S) dos coronavírus forma um trímero, que desempenha um papel crítico na ligação e entrada da célula hospedeira, reconhecendo os receptores celulares e mediando a fusão da membrana

-> Todos os três domínios de ligação ao receptor (RBDs) dos dois trímeros da proteína *spike* (S) dos coronavírus de morcego (RaTG13) e pangolim (PCoV_GX) estão na conformação "para baixo" ("down"), indicando que são mais propensos a adotar o estado inativo de ligação ao receptor.

-> No entanto, a proteína *spike* do PCoV_GX, mas não o RaTG13, é comparável à proteína *spike* do SARS-CoV-2 na ligação ao receptor ECA2 humano e no suporte à entrada nas células do pseudovírus.

-> Identificados também resíduos críticos no RBD subjacentes às diferentes atividades das proteínas *spike* do RaTG13 e PCoV_GX/SARS-CoV-2.

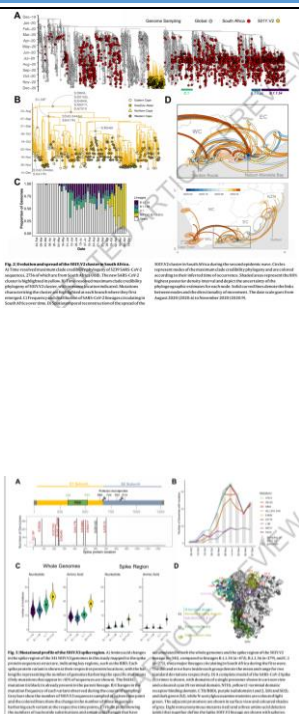
-> Assim, a ligação da hECA2 (ECA2 humana) com os RBDs: as afinidades de ligação de hECA2 com os RBDs de RaTG13, PCoV_GX e SARS-CoV-2 foram medida através da ressonância plasmônica de superfície (SPR):

-> Os RBDs PCoV_GX e SARS-CoV-2 ligaram-se a hECA2 com afinidades comparáveis de 2,7 nM e 3,9 nM, respectivamente. No entanto, o RBD RaTG13 ligou-se a hACE2 com uma afinidade muito mais fraca de 500 nM.

-> As comparações de sequências mostraram que ambos os RBMs RaTG13 e PCoV_GX compartilham 75,3% de identidade de sequência de aminoácidos com o RBM de SARS-CoV-2. Dos 16 resíduos no RBM SARS-CoV-2 envolvidos com a ligação à ECA2, dez são conservados no RaTG13, PCoV_GX e SARS-CoV-2. Os outros seis resíduos SARS-CoV-2 que não são conservados no RaTG13 e PCoV_GX são Y449, F486, Q493, Q498, N501 e Y505. Exceto para F486, que é substituído por uma leucina no RaTG13 e PCoV_GX, Y449, Q493,

			<p>Q498, N501 e Y505 no SARS-CoV-2 RBM formam um patch que tem interações hidrofílicas significativas com a hECA2.</p> <p>-> A fim de investigar experimentalmente locais importantes para diferentes forças de ligação da hECA2 com os RBDs RaTG13 e SARS-CoV-2, foram gerados seis mutantes de local único do RBD RaTG13 (F449Y, L486F, Y493Q, Y498Q, D501N e H505Y) alterando os resíduos nestes locais aos resíduos correspondentes do SARS-CoV-2: os experimentos de SPR mostraram que a mutação D501N resultou no aumento mais significativo (~ 9 vezes) da força de ligação com a hECA2 (KD = 57,4 nM) entre todas as seis mutações. As mutações F449Y e H505Y também aumentaram modestamente a ligação com a hECA2 em ~ 2 e ~ 3 vezes, respectivamente.</p> <p>-> Também gerados dois mutantes de sítio duplo RaTG13 RBD (F449Y/D501N e D501N/H505Y), que se ligam à hECA2 mais fortemente do que RBD do tipo selvagem com uma afinidade de 23,9 nM e 8,1 nM, respectivamente: Esses resultados suportam coletivamente que 449, 501 e 505 são locais importantes responsáveis por diferentes forças de ligação à hECA2 com os RBDs RaTG13 e SARS-CoV-2.</p> <p>-> Foram avaliadas também as afinidades de ligação da hECA2 com as spikes do RaTG13, PCoV_GX e SARS-CoV-2 utilizando-se pseudovírus: foi observado que, apesar de exibir a conformação inativa de ligação ao receptor nas imagens crio-EM, a spike do PCoV_GX ligou-se à hECA2 com uma afinidade de 130 nM, comparável à afinidade de 105 nM da spike do SARS-CoV-2. A ligação da spike do RaTG13 à hECA2 foi mais fraca, com uma afinidade de 601 nM.</p> <p>-> Avaliação da entrada dos pseudovírus RaTG13, PCoV_GX e SARS-CoV-2 em células T HEK 293 que expressam hECA2: consistentemente, os pseudovírus PCoV_GX e SARS-CoV-2 tiveram eficiência de entrada comparável, enquanto o pseudovírus RaTG13 exibiu pouca ou nenhuma entrada</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Esses resultados indicam coletivamente que a ligação forte do RBD-ECA2 e a amostragem conformacional do RBD eficiente são necessárias para a evolução do SARS-CoV-2 e para obter uma infecção altamente eficiente (mudança conformacional “down” para “up”).</p>
<p>Nature 09MAR2021</p>	<p>Emergence of a SARS-CoV-2 variant of concern with mutations in spike</p>	<p>Tegally H et al. South Africa, Brazil, Germany, USA, UK. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33690265/</p>	<p>Identificação e evolução da variante 501Y.V2 na África do Sul</p> <p>- Prévio: A transmissão não controlada contínua do SARS-CoV-2 em muitas partes do mundo está criando as condições para a evolução significativa do vírus.</p> <p>- Resultados e Métodos:</p> <p>-> Descrição da nova variante do SARS-CoV-2 (501Y.V2) caracterizada por oito mutações</p>

glycoprotein



definidoras da variante na proteína *spike*, incluindo três em resíduos importantes no domínio de ligação ao receptor (K417N, E484K e N501Y) que podem ter significância funcional.

-> Foi identificado um novo cluster monofilético (501Y.V2) contendo 341 sequências de amostras coletadas entre 8 de outubro e 10 de dezembro em diferentes províncias da África do Sul (KZN, CE, WC e NC). Sete sequências sul-africanas são basais ao cluster 501Y.V2 (nas províncias CE, WC, Gauteng e KZN) entre o final de junho e o início de setembro. Enquanto estes não têm nenhuma das mutações definidoras da variante 501Y.V2, eles são basais à linhagem B.1.351 e indica que o precursor da nova variante provavelmente já circulou por todo o país antes do surgimento do 501Y.V2.

-> O cluster 501Y.V2 foi filogeneticamente distinto das três variantes principais (B.1.1.54, B.1.1.56 e C.1) circulando amplamente no Sul África (> 42% das amostras sequenciadas antes de outubro de 2020) durante a primeira onda de infecções. Estas três variantes circularam nas províncias de KZN, WC, Gauteng, Estado Livre, Limpopo e Noroeste).

-> Em meados de novembro, a variante 501Y.V2 havia substituído as variantes B.1.1.54, B.1.1.56 e C.1, e rapidamente se tornou a variante dominante (amostras das províncias EC, KZN e WC). A análise filogeográfica têmporo-espacial sugere que a variante 501Y.V2 surgiu no início de agosto (meados de julho - final de agosto de 2020, 95% maior densidade posterior) na Baía de Nelson Mandela.

-> No ponto da primeira amostragem em 15 de outubro, a variante 501Y.V2 tinha, além de D614G, cinco outras mutações não sinônimas na proteína *spike*, a saber, D80A, D215G, E484K, N501Y e A701V. Três outras mutações da *spike* surgiram no final de novembro de 2020: L18F, R246I e K417N. Também observada a exclusão de três aminoácidos em 242-244, vistos em amostras extraídas e geradas em diferentes laboratórios.

-> Enquanto as variantes apareceram numa proporção variável dos genomas amostrados e mostraram mudanças nos níveis de frequência com o tempo, as mutações RBD parecem ficar fixas nas amostras analisadas e consistentemente alta em frequência ao longo do tempo.

-> Em comparação com as três maiores variantes que circulavam na África do Sul previamente, a variante 501Y.V2 mostra hipermutação marcada em todos os genomas e as regiões da *spike*, incluindo mutações não sinônimas que levam a alterações de

aminoácidos. As principais linhagens sul-africanas da primeira onda (B.1.1.54, B.1.1.56 e C.1) continham apenas uma única mutação na spike não sinônima (D614G) e não mostraram rápida acumulação de mutações conforme observado na variante 501Y.V2.

-> Uma estimativa das taxas evolutivas indicam que as substituições na variante 501Y.V2 estão acontecendo em 1.917E-3 alterações de nucleotídeos/local/ano, em comparação com 5.344E-4, 4.251E-4 e 9.781E-4 respectivamente para B.1.1.54, B.1.1.56 e C.1.

-> A modelagem estrutural do trímero da spike com essas mutações revela que três das mutações da *spike* estão em resíduos-chave no RBD (N501Y, E484K e K417N), três estão no Domínio N-terminal (L18F, D80A e D215G) e um está no loop 2 (A701V). A deleção de 3 aminoácidos (242-244) também está no NTD. Dois dos locais RBD em particular (417 e 484) são regiões-chave para a ligação de anticorpos neutralizantes.

- Discussão:

-> A variante 501Y.V2 foi identificada na África do Sul após a primeira onda epidêmica numa área metropolitana gravemente afetada, Nelson Mandela Bay, localizada na costa da Província do Cabo Oriental.

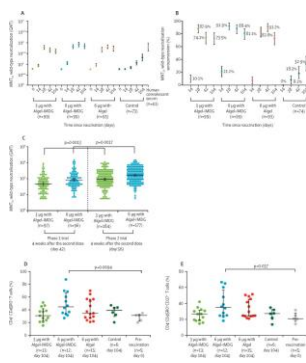
-> Essa variante se espalhou rapidamente, tornando-se dominante nas províncias de Eastern Cape, Western Cape e KwaZulu-Natal em poucas semanas

-> Embora o significado total das mutações ainda esteja para ser determinado, os dados genômicos, mostrando a rápida expansão e deslocamento de outras variantes em várias regiões, sugerem que esta variante está associada a uma vantagem de seleção, mais plausivelmente como resultado de maior transmissibilidade ou escape imune.

Lancet Infect Dis
08MAR2021

Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: interim results from a double-blind, randomised, multicentre, phase 2 trial, and 3-month follow-up of a double-blind, randomised phase 1 trial

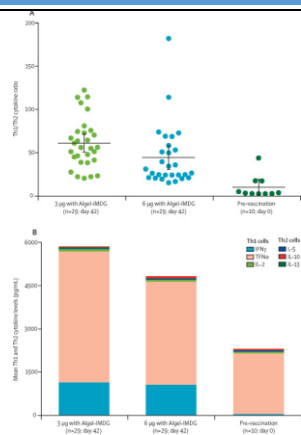
Ella R et al. India.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33705727/>



Segurança e eficácia da vacina BBV152 (vírus SARS-Cov-2 inativado)

- Prévios: BBV152 é uma vacina SARS-CoV-2 inativada com vírus total (3 µg ou 6 µg) formulada com uma molécula agonista de receptor semelhante a toll 7/8 (IMDG) adsorvida a alúmen (Algel).

-> Previamente foram relatados do ensaio clínico duplo-cego, multicêntrico, randomizado e controlado de fase 1 sobre a segurança e imunogenicidade de três formulações diferentes de BBV152 (3 µg com Algel-IMDG, 6 µg com Algel-IMDG ou 6 µg com Algel) e um controle apenas de Algel (sem antígeno), com a primeira dose administrada no dia 0 e a segunda dose no dia 14. As formulações de 3 µg e 6 µg com Algel-IMDG foram selecionadas para este estudo de fase 2.



- Objetivo: Relatar os resultados provisórios do ensaio de fase 2 sobre a imunogenicidade e segurança do BBV152, com a primeira dose administrada no dia 0 e a segunda dose no dia 28.

- Métodos:

-> Ensaio clínico duplo-cego, randomizado, multicêntrico, de fase 2 para avaliar a imunogenicidade e segurança do BBV152 em adultos e adolescentes saudáveis (12-65 anos) em 9 hospitais na Índia.

-> Os participantes com ácido nucleico SARS-CoV-2 positivo e testes sorológicos foram excluídos.

-> Os participantes foram designados aleatoriamente (1:1) para receber 3 µg com Algel-IMDG ou 6 µg com Algel-IMDG. A randomização de blocos foi feita por meio de um sistema de resposta web interativo.

-> Os participantes, investigadores, coordenadores do estudo, pessoal relacionado ao estudo e o patrocinador foram mascarados para a alocação do grupo de tratamento.

-> Duas doses intramusculares da vacina foram administradas no dia 0 e no dia 28.

-> Desfecho primário: títulos de anticorpos neutralizantes do tipo selvagem do SARS-CoV-2 e as taxas de seroconversão (definidas como um título pós-vacinação que foi pelo menos quatro vezes maior do que o título inicial) 4 semanas após a segunda dose (dia 56), medido pelo teste de neutralização por redução de placa (PRNT₅₀) e o teste de microneutralização (MNT₅₀).

-> O desfecho primário foi avaliado em todos os participantes que receberam ambas as doses da vacina.

-> As respostas mediadas por células foram um resultado secundário e foram avaliadas pelo perfil T-helper-1 (Th1)/Th2 2 semanas após a segunda dose (dia 42).

-> A segurança foi avaliada em todos os participantes que receberam pelo menos uma dose da vacina.

-> Além disso, avaliada a imunogenicidade dos participantes do ensaio de fase 1 com 3 meses após terem recebido a 2ª dose (dia 104).

- Resultados:

-> Entre 5 e 12 de setembro de 2020, 921 participantes foram selecionados, dos quais 380 foram incluídos aleatoriamente no

grupo de 3 µg com Algel-IMDG (n=190) ou 6 µg no grupo Algel-IMDG (n=190).

-> Os títulos médios geométricos (GMTs; PRNT₅₀) no dia 56 foram significativamente maiores no grupo de 6 µg com Algel-IMDG (197,0 [IC95% 155,6-249,4]) do que no grupo de 3 µg com Algel-IMDG (100,9 [74,1-137,4]; p=0,0041).

-> A soroconversão com base em PRNT₅₀ no dia 56 foi relatada em 171 (92,9% [IC 95% 88,2-96,2]) dos 184 participantes no grupo de 3 µg com Algel-IMDG e 174 (98,3% [95,1-99,6]) dos 177 participantes no grupo de 6 µg com Algel-IMDG.

-> Os GMTs (MNT₅₀) no dia 56 foram 92,5 (IC95%, 77,7-110,2) no grupo 3 µg com Algel- Grupo IMDG e 160,1 (135,8-188,8) no grupo de 6 µg com Algel-IMDG.

-> A soroconversão com base no MNT₅₀ no dia 56 foi relatada em 162 (88,0% [IC95%, 82,4-92,3]) dos 184 participantes no grupo de 3 µg com Algel-IMDG e 171 (96,6% [92,8-98,8]) dos 177 participantes no grupo de 6 µg com Algel-IMDG.

-> Algel-IMDG de 3 µg e 6 µg produziram respostas de linfócitos T tendenciosas para um fenótipo Th1 no dia 42.

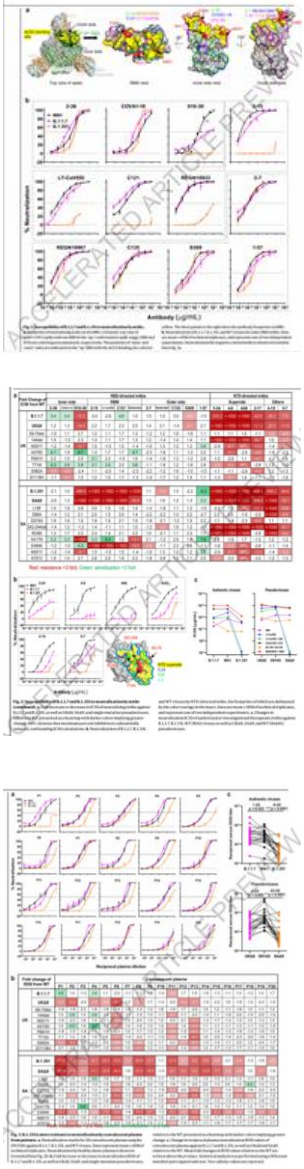
-> Nenhuma diferença significativa na proporção de participantes que tiveram reação adversa local ou sistêmica nos grupos 3 µg com Algel-IMDG (38 [20,0%; IC 95% 14,7-26,5] de 190) e 6 µg com Algel-IMDG (40 [21,1%; 15,5-27,5] de 190) foi observada nos dias 0-7 e dias 28-35; nenhum evento adverso sério foi relatado no estudo.

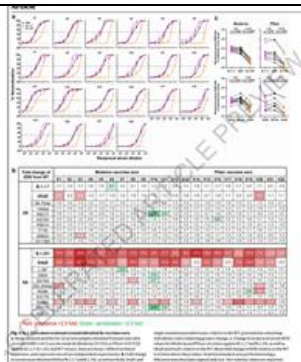
-> A partir do ensaio de fase 1, os GMTs pós-segunda dose de 3 meses (MNT₅₀) foram 39,9 (IC95% 32,0-49,9) no grupo de 3µg com Algel-IMDG, 69,5 (IC95%, 53,7 - 89,9) no grupo de 6 µg com Algel-IMDG, 53,3 (40,1-71,0) no grupo de 6 µg com Algel, e 20,7 (14,5-29,5) no Grupo Algel sozinho.

- Conclusões:

-> No ensaio de fase 1, a vacina BBV152 induziu altas respostas de anticorpos neutralizantes que permaneceram elevadas em todos os participantes 3 meses após a segunda vacinação.

-> No ensaio de fase 2, o BBV152 mostrou melhores resultados de reatogenicidade e segurança, e respostas imunes humorais e mediadas por células aprimoradas em

				<p>comparação com o ensaio de fase 1. -> A formulação de 6 µg com Algel-IMDG foi selecionada para o ensaio de eficácia de fase 3.</p>
<p>Nature 08MAR2021</p>	<p>Antibody Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7</p>	<p>Wang P et al. USA. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33684923/</p> 	<p>Resistência das variants B.1.1.7 e B.1.351 aos anticorpos monoclonais: preocupação quanto ao impacto na eficácia das vacinas</p>	<p>- Prévio: A pandemia da COVID-19 devastou o globo e seu agente causador, a SARS-CoV-2, continua a se manifestar. -> As perspectivas de acabar com esta pandemia dependem do desenvolvimento de intervenções eficazes. As terapêuticas de anticorpos monoclonais (mAb) simples e combinados receberam autorização de uso de emergência, com mais anticorpos em desenvolvimento. -> Além disso, vários construtos de vacina mostraram-se promissores, incluindo dois com ~ 95% de eficácia protetora contra COVID-19. -> No entanto, essas intervenções foram direcionadas para o SARS-CoV-2 inicial que surgiu em 2019. -> O recente surgimento de novas variantes B.1.1.7 do SARS-CoV-2 no Reino Unido e B.1.351 na África do Sul é preocupante devido a sua suposta facilidade de transmissão e extensas mutações na proteína <i>spike</i>. -> Esta variante agora se espalhou para mais de 50 países, e há indícios de que pode ser mais virulenta. -> B.1.1.7 contém 8 mutações na proteína spike, além da D614G, incluindo duas deleções (69-70del e 144del) na região do domínio N-terminal (NTD), uma mutação (N501Y) no RBD e uma mutação (P681H) perto da clivagem da furina. -> A variante SARS-CoV-2 B.1.351, também conhecido como 501Y.V2 no clado GH, surgiu no final de 2020 na África do Sul. Desde então, essa variante se tornou dominante localmente, levantando o espectro de que também aumentou a transmissibilidade. -> B.1.351 contém 9 mutações na proteína spike, além de D614G, incluindo um grupo de mutações (por exemplo, 242-244del & R246I) na NTD, três mutações (K417N, E484K e N501Y) no RBD e uma mutação (A701V) próximo ao local de clivagem da furina. -> Há uma preocupação crescente de que essas novas variantes possam prejudicar a eficácia das terapias com anticorpos monoclonais (mAbs) ou vacinas, porque muitas das mutações residem no supersítio</p>



antigênico NTD ou no sítio de ligação à ECA2 (também conhecido como o motif de ligação ao receptor - RBM) que é o principal alvo de potentes anticorpos neutralizantes de vírus.

- Métodos:

-> Avaliação da suscetibilidade dos vírus B.1.1.7 e B.1.351 autênticos à neutralização por 30 mAbs, 20 plasmas convalescentes e 22 soros de indivíduos vacinados (Pfizer e Moderna)

-> Além disso, criado pseudovírus SARS-CoV-2 baseados em VSV que contêm cada uma das mutações individuais, bem como um com todas as 8 mutações da variante B.1.1.7 (UKΔ8) e outra com todas as 9 mutações da variante B.1.351 (SAΔ9).

-> Um total de 18 pseudovírus mutantes foram contruídos conforme descrito anteriormente e cada um foi padronizado para obtenção dum título robusto adequado para estudos de neutralização.

- Resultados:

-> A variante B.1.1.7 é refratária à neutralização pela maioria dos mAbs ao domínio N-terminal (NTD) da proteína *spike* relativamente resistente a alguns mAbs ao domínio de ligação ao receptor (RBD), mas não foi mais resistente ao plasma convalescente ou aos soros de indivíduos vacinados.

-> As descobertas em B.1.351 são mais preocupantes porque esta variante não é apenas refratária à neutralização pela maioria dos mAbs NTD, mas também por vários mAbs individuais ao *motif* de ligação ao receptor em RBD (RBM), em grande parte devido à mutação E484K.

-> Os anticorpos LY-Cov555 e REGN10933 não neutralizam a variante B.1.351, mas o REGN10987 neutraliza, embora com menor eficácia.

-> Além disso, a variante B.1.351 foi marcadamente mais resistente à neutralização por plasma convalescente (9,4 vezes) e soros de indivíduos vacinados (10,3-12,4 vezes).

- Conclusões:

-> A variante B.1.351 e variantes emergentes com mutações da *spike* semelhantes apresentam novos desafios para a terapia com mAb e ameaçam a eficácia protetora das vacinas atuais.

Nat Genet
08MAR2021

**Genome-wide
CRISPR**

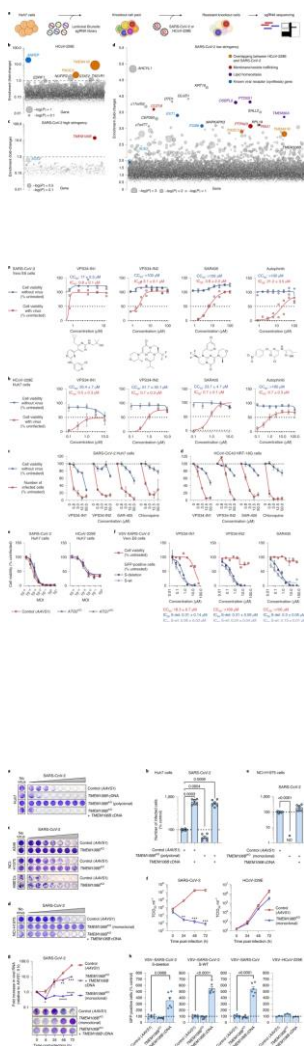
Baggen J et al. Belgium.
<https://pubmed.ncbi.nlm.>

Proteína
transmembrana

- Prévio: A atual pandemia ds COVID-19 causou uma crise econômica e de saúde

screening identifies TMEM106B as a proviral host factor for SARS-CoV-2

nih.gov/33686287/



108B (TMEM106B) como alvo terapêutico na COVID-19

global.

- Objetivo: Identificar os fatores essenciais do hospedeiro para a infecção por coronavírus através da realização de triagens genéticas funcionais em todo o genoma do SARS-CoV-2 e coronavírus humano 229E.

- Métodos:

-> Realizada uma série de triagens genéticas baseadas em CRISPR (repetições palíndromicas curtas regularmente espaçadas regularmente) para identificar os fatores do hospedeiro necessários para a infecção pelo SARS-CoV-2 e HCoV-229E.

-> Realizada investigação do tipo *CRISPR-based genome-wide knockout screen* (nocaute genômica baseada em CRISPR) utilizando a linhagem celular Huh7 humana, sem a introdução do receptor exógeno, porque a cepa do SARS-CoV-2 utilizada induziu um efeito citopático claro nessas células. Realizadas, portanto, triagens com o SARS-CoV-2 e o menos patogênico HCoV-229E. Isso permitiu a identificação de (1) fatores do hospedeiro de coronavírus de amplo espectro e (2) fatores específicos do hospedeiro para SARS-CoV-2 e HCoV-229E.

-> As células Huh7 transduzidas com a biblioteca do genoma de Brunello foram selecionadas para a sobrevivência durante a infecção com qualquer um dos coronavírus.

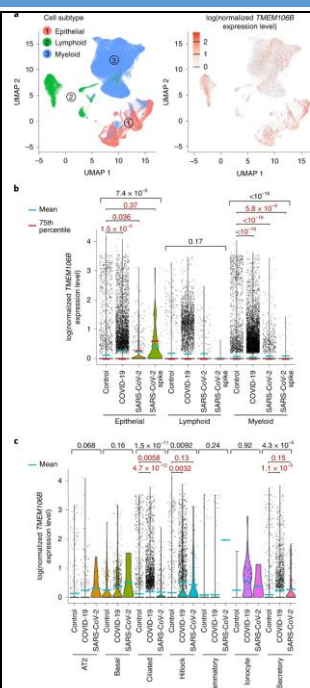
-> Os RNAs de guia único (sg) presentes na população de células resistentes foram identificados por sequenciamento profundo. Realizadas triagens de alto rigor para HCoV-229E e SARS-CoV-2, expondo as células ao vírus até que quase todas as células tivessem morrido.

-> Para o SARS-CoV-2, também foi realizada uma triagem de menor rigor para identificar genes com um efeito mais sutil na infecção pelo vírus.

- Resultados:

-> As triagens revelaram fatores específicos para vírus e também fatores dos hospedeiros compartilhados, incluindo TMEM41B (*Transmembrane protein 106B*; autofagia; envolvido na função lisossomal e com implicações nos distúrbios neurodegenerativos) e PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*; autofagia e tráfego endocítico) tipo 3.

-> PI3K tipo 3 é um alvo anti-coronavírus comum “drogável”: A PIK3C3 codifica



PI3K tipo 3, a subunidade catalítica do complexo PI3K que medeia a formação de fosfatidilinositol 3-fosfato e desempenha um papel em muitos processos, incluindo o tráfego endocítico e a iniciação e maturação de autofagossomos. Como inibidores direcionados diretamente a esta proteína estão disponíveis, foram testadas as atividades dos inibidores estruturalmente distintos VPS34-IN1, VPS34-IN2, SAR405 e autophinibe contra diferentes coronavírus. Como esperado, todos os inibidores PI3K tipo 3 inibiram a formação de autofagossomos positivos para LC3 e induziram vacúolos grandes em células tratadas. Os inibidores de PI3K tipo 3 mostraram atividade antiviral contra SARS-CoV-2 e também foram ativos contra HCoV-229E e HCoV-OC43. Como a PI3K tipo 3 está envolvida na formação de autofagossomos, foi investigado se a macroautofagia é necessária para infecção pelo SARS-CoV-2 e HCoV-229E. A inibição de ATG5 e ATG7, necessária para a expansão do fagóforo, não afetou a indução dos efeitos citopáticos pelo SARS-CoV-2 ou HCoV-229E, enquanto as células foram incapazes de formar autofagossomos LC3-positivos, confirmando a interrupção da via da macroautofagia. Estes resultados mostram que o SARS-CoV-2 e outros coronavírus empregam PI3K tipo 3 para infecção, mas não dependem de uma via de macroautofagia funcional.

-> O SARS-CoV-2 requer ainda proteína lisossomal TMEM106B para infectar linhagens de células humanas e células pulmonares primárias.

-> A superexpressão de TMEM106B aumentou a infecção pelo SARS-CoV-2, bem como infecção pelo pseudovírus, sugerindo um papel na entrada viral.

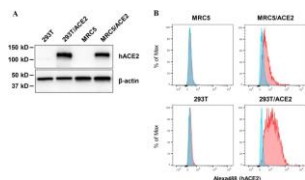
-> O knockout da TMEM106B em células Huh7 e Hep3B preveniu os efeitos citopáticos induzidos pelo SARS-CoV-2 e reduziu a replicação do vírus, conforme medido por coloração de intermediários de replicação de RNA de fita dupla (ds). A complementação com cDNA de TMEM106B resistente a sgRNA restaurou os efeitos citopáticos e a infectividade, confirmando a especificidade de knockout TMEM106B. Knockout e complementação de TMEM106B foram verificados por

imunocoloração.
 -> É interessante que a superexpressão de TMEM106B nas células Huh7 acelerou o início das alterações citopáticas e aumentou a infecção pelo SARS-CoV-2. Tal aumento da infecção também foi observado para outra cepa SARS-CoV-2 BavPat-1 (dados da literatura), que não possui deleções na proteína spike, bem como para o SARS-CoV relacionado, o agente causador de surtos de SARS em 2003
 -> Além disso, o sequenciamento de RNA de célula única de células das vias aéreas de pacientes com COVID-19 demonstrou que a expressão de TMEM106B se correlaciona com a infecção pelo SARS-CoV-2.
 - Conclusões:
 -> O presente estudo descobriu uma coleção de fatores do hospedeiro coronavírus que podem ser explorados para desenvolver drogas contra a infecção pelo SARS-CoV-2 ou futuros surtos de coronavírus zoonóticos.

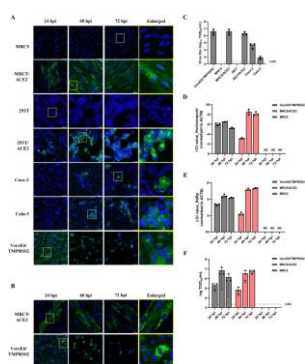
Sci Rep
08MAR2021

MRC5 cells engineered to express ACE2 serve as a model system for the discovery of antivirals targeting SARS-CoV-2

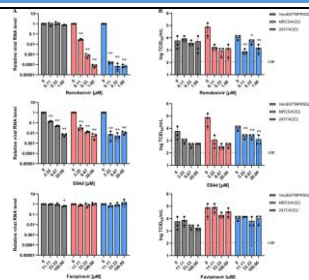
Uemura K et al. Japan.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33686154/>



Células MRC5 do epitélio pulmonar humano modificadas com a expressão da ECA2: plataforma para testar drogas anti-SARS-CoV-2



- Prévio: Embora a disseminação do SARS-CoV-2 tenha resultado numa pandemia mundial, atualmente não há drogas específicas anti-virais que sejam totalmente eficazes contra o SARS-CoV-2.
 -> Apenas um número limitado de células derivadas de humanos são capazes de suportar a replicação do SARS-CoV-2, de modo que a infecciosidade do SARS-CoV-2 nessas células permanece baixa.
 -> Em contraste, as células Vero derivadas de macaco são altamente suscetíveis à infecção com SARS-CoV-2, embora não sejam adequadas para o estudo de efeitos antivirais por moléculas pequenas devido à sua capacidade limitada de metabolizar drogas em comparação com células derivadas de humanos.
 -> As células MRC5 derivadas do pulmão humano são altamente suscetíveis à infecção de vários coronavírus humanos, incluindo HCoV-OC43, HCoV-229E e coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV)
 - Objetivo: Gerar uma linhagem celular humana suscetível ao vírus SARS-CoV-2 que seria útil para a identificação e teste de drogas candidatas.
 - Métodos:
 -> Transfecção de forma estável células



MRC5 derivadas de pulmão humano com um vetor lentiviral que codifica a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), o receptor celular para SARS-CoV-2, gerando células MRC5/ECA2 e 293/ECA2. -> Transdução com lentivírus: pLVSI-CMV-ACE2-Pur and puromycin-based selection.

-> A cepa do SARS-CoV-2 JPN/TY/ WK-521, um isolado clínico de um paciente COVID-1924 foi gentilmente cedido pelo Dr. Masayuki Shimojima (Instituto Nacional de Doenças Infecciosas, Tóquio, Japão). O vírus foi amplificado nas células VeroE6/TMPRSS2 com o reagente de eliminação de micoplasma Mynox (Minerva Biolabs, Berlin, Germany). Os títulos virais foram medidos inoculando células VeroE6/TMPRSS2 com diluições em série de cinco vezes de vírus; os efeitos citopáticos claros (CPE) foi pontuado para calcular o TCID₅₀/ml.

- Resultados:

-> O SARS-CoV-2 se replica eficientemente nas células MRC5/ECA2.

-> Além disso, a replicação do RNA viral e a produção do vírus da progênie foram significativamente reduzidas em resposta à administração do inibidor de replicação, remdesivir (0.11, 0.33 e 1 µM), nas células MRC5/ECA2 em comparação com as células Vero.

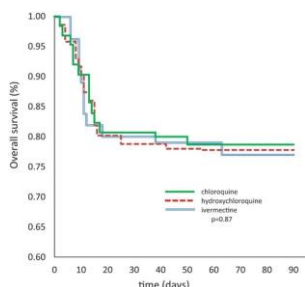
- Conclusão:

-> As células MRC5/ECA2 serão importantes no desenvolvimento de terapêuticas antivirais específicas e auxiliarão no desenvolvimento de vacinas para combater a infecção pelo SARS-CoV-2.

Pathog Glob Health 08MAR2021

Phase 2 randomized study on chloroquine, hydroxychloroquine or ivermectin in hospitalized patients with severe manifestations of SARS-CoV-2 infection

Galan LEB et al. Brazil. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33682640/>

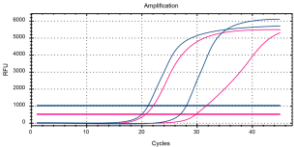


Ausência de eficácia da hidroxicloroquina, cloroquina e ivermectina na COVID-19

Objetivo: Dada a necessidade urgente de estratégias para minimizar os danos causados pela pandemia, este estudo realizou um estudo randomizado duplo-cego de fase 2 para avaliar a segurança da eficácia da cloroquina (CQ), hidroxicloroquina (HCQ) ou ivermectina em casos graves formas de COVID-19, além de identificar preditores de mortalidade nesse grupo de pacientes.

- Métodos:

-> Estudo de fase 2, duplo-cego, randomizado para avaliar a segurança e eficácia de CQ, HCQ ou ivermectina enteral em pacientes hospitalizados com infecção pelo SARS-CoV-2, num Hospital

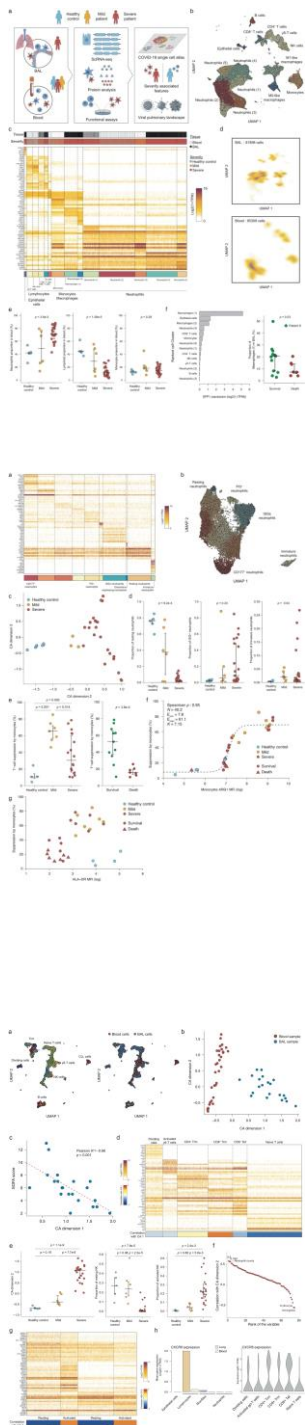
				<p>de Referência em Roraima (Brasil) em maio de 2020.</p> <p>-> Os pacientes foram randomizados na proporção de 1: 1: 1 (cloroquina 450 mg 2x no dia 0 e depois 450 mg/dia do dia 1-4, dose total 2,7g; hidroxicloroquina 400 mg 2x no dia 0 e depois 400 mg/dia dia 1-4, dose total 2,4g; ivermectina 14 mg 1x no dia 0, dose total 42 mg).</p> <p>-> Desfechos primários: necessidade de O2 suplementar, ventilação invasiva, admissão em UTI e óbito.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> N=168 pacientes foram randomizados.</p> <p>-> Média de idade: 53,4 ± 15,6 anos, a maioria dos participantes era do sexo masculino (n = 95; 58,2%).</p> <p>-> IMC > 30kg/m² em 37,5%, HAS 43,4%, DM 28,1%.</p> <p>-> A terapia com corticosteroide, anticoagulante ou antibióticos foi uma decisão dos médicos assistentes, não havendo diferença entre os grupos.</p> <p>-> A mortalidade foi semelhante em três grupos (22,2%; 21,3% e 23,0%) sugerindo inefetividade dos medicamentos.</p> <p>-> Nenhuma diferença na incidência de eventos adversos graves foi observada.</p> <p>-> Ter mais de 60 anos de idade (37% vs 15%, HR=2,44, IC95% 1,4-4,3) obesidade (32,5% vs 18,5%, HR=1,95, IC95% 1,07-3,09), diabetes (32,8%, HR=1,87, IC95% 1,02-2,59) extenso envolvimento pulmonar e baixa SatO₂ na admissão hospitalar foram fatores de risco independentes para mortalidade.</p> <p>- Conclusão:</p> <p>-> Embora CQ, HCQ ou ivermectina revelem um perfil de segurança favorável, os medicamentos testados não reduzem a necessidade de oxigênio suplementar, admissão em UTI, ventilação invasiva ou óbito, em pacientes hospitalizados com uma forma grave de COVID-19.</p>
<p>J Infect Dev Ctries 07MAR2021</p>	<p>A straightforward molecular strategy to retrospectively investigate the spread of SARS-CoV-2 VOC202012/01</p>	<p>Ibba G et al. Italy. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33690207/</p> 	<p>Estratégia para detecção da variante B.1.1.7 do SARS-CoV-2 pela RT-PCR</p>	<p>- Prévio: A disseminação de novas variantes do SARS-CoV-2 representa uma séria ameaça em todo o mundo, portanto, métodos rápidos e econômicos são necessários para sua identificação.</p> <p>-> Desde novembro de 2020, o ensaio TaqPath COVID-19 (Thermo Fisher Scientific) tem sido usado para identificar cepas virais da nova variante B.1.1.7 - Variant of Concern (VOC) 202012/01-, uma vez que falha em detectar o gene S</p>

	<p>B.1.1.7 variant</p>			<p>com a deleção $\Delta 69/70$.</p> <p>- Objetivo: Propor a triagem de mutações no gene S com o ensaio Allplex SARS-CoV-2 (Seegene, Seoul, Korea), outro teste RT-PCR amplamente utilizado que tem como alvo os genes Sarbecovirus E, SARS-CoV-2 N e RdRp/S.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Avaliação do padrão da curva de amplificação do gene S em comparação com os dos outros genes.</p> <p>-> Explorando um conjunto de dados gerado pelo ensaio Allplex, foram examinados 663 registros digitais de RT-PCR, incluindo todas as amostras respiratórias SARS-CoV-2 testadas em no laboratório com o ensaio Allplex entre 1º de janeiro e 25 de fevereiro de 2021.</p> <p>-> A RT-PCR foi realizada com o CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD (Bio-Rad Laboratories Inc, CA, EUA)</p> <p>-> Preparação de bibliotecas de sequenciamento de última geração: implementado o protocolo CleanPlex SARS-CoV-2 Research and Surveillance Panels (Paragon Genomics, Inc, Hayward, CA, EUA) para enriquecimento e preparação de biblioteca.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> Esta abordagem permitiu detectar 64 amostras com curvas de amplificação não sigmoidais peculiares.</p> <p>-> Curiosamente, as cepas B.1.1.7 positivas para o gene TaqPath S apresentaram valores de limite de ciclo (Ct) para o gene S > 5 unidades maiores do que o valor Ct máximo obtido para os outros dois alvos (N e ORF1ab). Este perfil, chamado "Amplificação tardia do alvo do gene Spike", também foi consistentemente associado ao VOC 202012/01.</p> <p>-> O sequenciamento de um grupo selecionado de 4 genomas virais de RNA demonstrou que essas curvas estavam associadas a cepas variantes B.1.1.7.</p> <p>- Discussão e conclusão:</p> <p>- > Os resultados sugerem fortemente que a propagação da variante B.1.1.7 começou no norte da Sardênia, Itália, pelo menos desde janeiro e implicam no potencial desses métodos analíticos para rastrear e caracterizar a propagação das cepas B.1.1.7 nas áreas onde a detecção do SARS-CoV-2 foi realizada pelo Allplex previamente.</p>
<p>Nat Commun</p>	<p>Deciphering the</p>	<p>Bost P et al. Israel,</p>	<p>Dinâmica das</p>	<p>- Prévio: Desde o início da pandemia pelo</p>

05MAR2021

**state of immune
silence in fatal
COVID-19
patients**

France, Italy.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674591/>



alterações das
células mielóides
e linfóides no
curso da COVID-
19

SARS-CoV-2, a COVID-19 apareceu como uma doença única, não convencional e com características imunológicas sistêmicas.

-> A contribuição do sistema imunológico do hospedeiro no estabelecimento de um pior prognóstico já foi confirmada em vários estudos sobre o SARS-CoV-2 e outras doenças dependentes da SARS.

-> Na verdade, a linfopenia e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como CXCL10 (IP-10), interleucina (IL) -6, IL-8, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF) e ligante de quimiocina CC (CCL) 2 são listada como marca registrada de infecção grave por SARS-CoV2 e se correlaciona com resultados clínicos adversos.

-> Assim, a análise multicêntrica em pacientes internados com COVID-19 estabeleceu uma associação entre os parâmetros clínicos e o resultado crítico não apenas a idade, comorbidades e doenças pré-existentes, mas também alterações imunológicas, como um aumento da proporção de neutrófilos/linfócitos, sugerindo que as características da doença patogênica são agravadas em pacientes imunologicamente disfuncionais.

- Objetivo: Documentar a assinatura imune da COVID-19 associada à gravidade, integrando a análise de RNA-seq de célula única de amostras de sangue e fluidos de lavagem bronco-alveolar com dados clínicos, imunológicos e funcionais ex vivo.

- Métodos:

-> Análise de scRNA-seq no lavado bronco-alveolar (BAL) e amostras do sangue periférico correspondentes obtidas de 21 pacientes graves internados na UTI e no sangue periférico de seis pacientes positivos para SARS-CoV-2 com COVID-19 leve e cinco doadores saudáveis.

-> As características imunológicas foram avaliadas nas mesmas coortes, integrando mais quatro pacientes com COVID-19 leve, por ensaio imunoenzimático multiplex (ELISA), citometria de fluxo multiparamétrica e ensaio funcional.

-> Todos os pacientes foram hospitalizados no University Hospital Integrated Trust of Verona, Itália.

- Resultados:

-> Controles (n=5), COVID-19 leve (n=10) e COVID-19 grave (n=21): mediana de idade 66 (44-73), 69 (56-80) e 67 (58-70) anos; sexo masculino 80%, 60% e 81%, HAS 40%, 100% e 52%, obesidade 0%, 22% e 14%, DM 0%, 30% e 33%, doença cardiovasculat 0%, 50% e 14%, DPOC 0%, 20% e 5%, doença renal crônica 0%, 50% e 14%

-> A assinatura foi caracterizada pelo acúmulo pulmonar de células linfóides *naive*, associado a expansão sistêmica e ativação de células mielóides.

-> O conjunto de dados evidenciou 42.238 neutrófilos de sangue de alta qualidade, permitindo, portanto, uma análise aprofundada da associação da atividade dos neutrófilos e da patogênese da SARS-Cov2: realizado um agrupamento refinado de neutrófilos, que identificou 10 grupos diferentes, incluindo um subtipo distinto e raro que expressa os genes CEACAM8, LTF e DEFA3 correspondentes a neutrófilos imaturos; entre os outros aglomerados, observado um estado de neutrófilos em repouso (ICAM1, CXCL8) e uma matriz de aglomerados de neutrófilos ativadas; entre eles, identificados genes estimulados por interferon (ISGs: RSAD2, OAS2, IFIT1), um inibidor de serina protease (PI3 e SLPI) e uma quimiocina (CCL4, CCL3L3) expressando clusters, sugerindo uma forte heterogeneidade da polarização de neutrófilos nos pacientes.

-> Observado que os pacientes graves e, em menor grau, leves, foram associados a uma substituição de neutrófilos em repouso por vários grupos, incluindo os ISGs, CD177 e neutrófilos que expressam PI3. Curiosamente, os neutrófilos imaturos foram detectados apenas em pacientes leves e graves, embora num nível baixo (<5% dos neutrófilos) - exceto em quatro pacientes graves.

-> Através do cálculo da correlação de Pearson para cada variável biológica e clínica, foi identificada a concentração de IL-6 e IL-1RA como as variáveis mais positivamente correlacionadas, com hemácias e concentração parcial de CO₂ (pCO₂) correlacionando-se negativamente.

-> Desta forma, a análise refinada de neutrófilos do sangue revelou que os neutrófilos em repouso são substituídos por vários grupos de neutrófilos dotados de assinaturas inflamatórias e imaturas em pacientes leves e graves.

-> A imunossupressão induzida pelas células mieloides foi também uma marca registrada da evolução da COVID-19, destacando a expressão da arginase-1 com características de regulação imunológica dos monócitos.

-> As células mieloides suprimem a ativação dos linfócitos T por meio de múltiplas estratégias, incluindo secreção de citocinas antiinflamatórias, depleção de nutrientes ou engajamento de ponto de controle imunológico (dados da literatura). Para obter mais informações sobre a imunossupressão induzida pela COVID-19, foi traçado o perfil da expressão de monócitos PD-L1 (CD274), ARG1 e HLA-DR por citometria de fluxo; observada uma relação clara entre a média da expressão da ARG1 por monócitos e a função imunossupressora de monócitos (Spearman

$\rho=0,95$).

-> A expressão do HLA-DR também foi associada à imunossupressão, mas de maneira diferente em comparação com ARG1. Assim, a média da expressão do HLA-DR e a atividade imunossupressora agruparam três grupos de pacientes: controles saudáveis com alta expressão do HLA-DR e baixa imunossupressão; pacientes leves e pacientes graves que sobreviveram com alta imunossupressão e alta expressão do HLA-DR; um terceiro grupo de pacientes graves com baixa imunossupressão e expressão do HLA-DR. Como mais da metade (7/12) dos pacientes dos últimos grupos morreram, foi hipotetizado que esse grupo corresponde a pacientes que sofrem de disfunções imunológicas terminais e, portanto, com maior risco de desfecho fatal.

-> Por fim, observada uma associação limitada entre PD-L1 e imunossupressão (Spearman $\rho = 0,57$). Além disso, a concentração de 20 citocinas diferentes, incluindo pró-inflamatórias (IL-6, TNF) e antiinflamatórias (IL-10), foi avaliada no sobrenadante de monócitos; no entanto, nenhuma das citocinas analisadas se correlacionou com a imunossupressão (Spearman absoluto ρ inferior a 0,4).

-> Em resumo, a atividade imunossupressora de monócitos e neutrófilos é um forte preditor de sobrevida grave do paciente e está principalmente associada à expressão de ARG1 e, em menor extensão, a PD-L1, mas não a qualquer secreção de citocina específica.

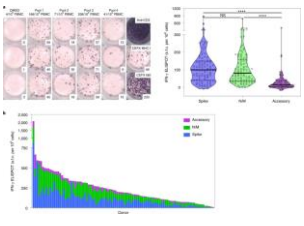
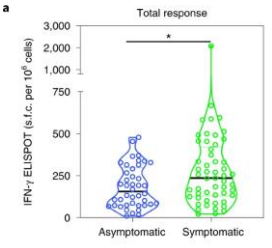
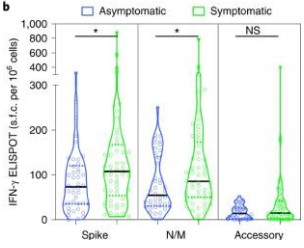
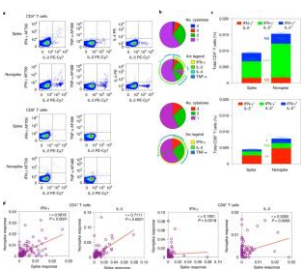
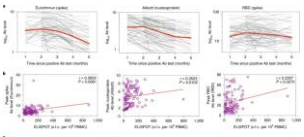
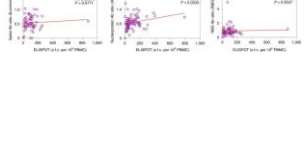
-> Desta forma, a perda de imunossupressão dependente de monócitos e neutrófilos está associada a resultados clínicos fatais em pacientes graves.

-> O compartimento dos linfócitos é extremamente heterogêneo e dinâmico, pois contém vários tipos de células com propriedades e funções que podem evoluir com a inflamação e infecção. Ao reagrupar as células identificadas como linfócitos, os autores obtiveram uma imagem mais precisa de sua heterogeneidade: identificados 14 clusters, incluindo vários linfócitos T efetores e de memória, linfócitos T naive e linfócitos T $\gamma\delta$ -T ativadas.

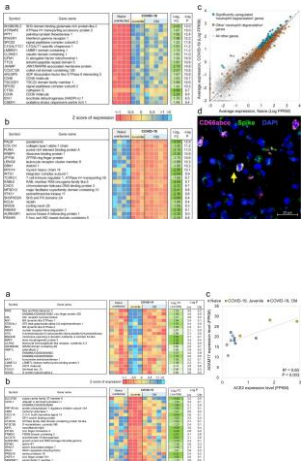
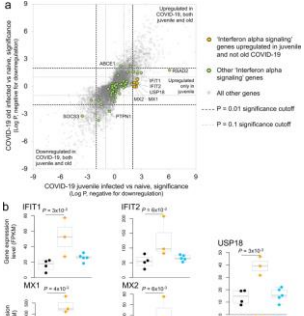
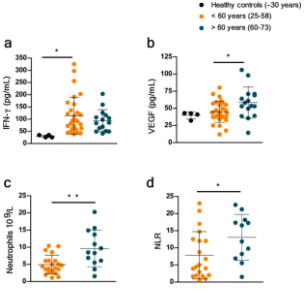
-> Como esperado, diferenças significativas puderam ser observadas entre o sangue e os linfócitos BAL, com células T de memória, efectoras e em divisão encontradas principalmente nas células do BAL e NK no sangue

-> Além disso, os dados mostram que um subconjunto de linfócitos T efetores de memória CXCR6 + do pulmão está associado a um melhor prognóstico em pacientes com COVID-19 grave.

- Conclusão:

			<p>-> A desregulação mieloide induzida pela COVID-19 e o comprometimento linfóide estabelecem uma condição de 'silêncio imunológico' em pacientes com COVID-19 crítica.</p> <p>-> Seria importante validar esses dados em estudos longitudinais.</p>
<p>Nat Immunol 05MAR2021</p>	<p>Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection</p>	<p>Zuo J et al. UK. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674800/</p>  <p>a</p>  <p>b</p>    	<p>Resposta dos linfócitos T ao SARS-CoV-2 e mantida após 6 meses da infecção leve-moderada é caracterizada pela produção de IL-2 pelos linfócitos T CD4 e apresenta correlação com os anticorpos da nucleoproteína, mas não com os da <i>spike</i></p> <p>- Prévio: A resposta imune ao SARS-CoV-2 é crítica no controle da doença, mas existe a preocupação de que o declínio da imunidade possa predispor à reinfecção.</p> <p>- Objetivo: Analisar a magnitude e o fenótipo da resposta de linfócitos T específicos para o SARS-CoV-2.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> N=100 doadores; sangue coletado 6 meses após a infecção.</p> <p>-> Interferon (IFN)-γ ELISPOT, análise de citocinas intracelulares por citometria e ELISPOT.</p> <p>-> Peptídeos Sintéticos: Pepmixes de peptídeos 15-mer sobrepostos por 11 resíduos de aminoácidos cobrindo as principais proteínas do SARS-CoV-2 (glicoproteína <i>spike</i> (PM-WCPV-S), proteína de membrana (PM-WCPV-VME), nucleoproteína (PM-WCPV-NCAP), ORF3A (PM-WCPV-ORF3A), ORF 7A / B (PM-WCPV-NS7A / 7B), ORF10 (PM-WCPV-ORF10) e proteína não estrutural 8 (PM-WCPV-NS8); JPT Peptide Technologies).</p> <p>-> Um pool de epítomos imunodominantes de vírus comuns, incluindo citomegalovírus, vírus Epstein-Barr e vírus influenza (PM-CEFX), foi incluído como controle positivo (JPT Peptide Technologies).</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> As respostas dos linfócitos T estavam presentes por ELISPOT e/ou análise de coloração de citocina intracelular em todos os doadores e caracterizadas por respostas de linfócitos T CD4 + predominantes com forte expressão da citocina interleucina (IL)-2.</p> <p>-> As medianas das respostas dos linfócitos T foram 50% maiores em doadores que experimentaram infecção sintomática, indicando que a gravidade da infecção primária estabelece um 'ponto de ajuste' para a imunidade celular.</p> <p>-> As respostas dos linfócitos T à proteína <i>spike</i> e às proteínas da nucleoproteína/membrana (N/M) foram</p>

			<p>correlacionadas com os níveis máximos de anticorpos.</p> <p>-> Além disso, níveis mais elevados de linfócitos T específicos para a nucleoproteína foram associados à preservação do nível de anticorpos específicos de nucleoproteína, embora nenhuma correlação tenha sido observada em relação às respostas específicas da <i>spike</i>.</p> <p>-> Não foram observadas diferenças na proporção de CD4: CD8 específica para vírus em relação a fatores demográficos como idade, doença sintomática ou sexo.</p> <p>- Conclusão:</p> <p>-> Os dados são tranquilizadores em relação às respostas funcionais dos linfócitos T específicos para SARS-CoV-2, as quais são mantidas 6 meses após a infecção.</p>
<p>Int J Infect Dis 05MAR2021</p>	<p>Infection sustained by lineage B.1.1.7 of SARS-CoV-2 is characterised by longer persistence and higher viral RNA loads in nasopharyngeal swabs</p>	<p>Calistri P et al. Italy. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33684558/</p>	<p>Infecção pela linhagem B.1.1.7: maior tempo de detecção do RNA viral no swab e menores valores do Ct para o gene do nucleocapsídeo (N)</p> <p>- Prévio: Após o anúncio em dezembro de 2020 sobre o surgimento de uma nova variante (linhagem VOC 202012/01, B.1.1.7) no Reino Unido, uma vigilância direcionada foi implementada na região de Abruzzo (Itália), que permitiu detectar 313 pessoas afetados pela linhagem B.1.1.7, até o dia 20 de fevereiro de 2021.</p> <p>- Objetivo: Investigar os resultados da RT-PCR em swabs nasofaríngeos testados de dezembro de 2020 a fevereiro de 2021, para verificar qualquer diferença na carga viral e persistência entre pessoas infectadas pela linhagem B.1.1.7.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> No período de observação, 1.724 amostras testaram positivas para o RNA de SARS-CoV-2 com o padrão de leitura Spike negativa. Destes, 655 foram sequenciados. VOC 202012/01 foi detectado em 313 indivíduos, em sua maioria originários da província de Chieti (n = 258, 82,4%), que experimentaram um aumento do número de casos da COVID-19 nos 1^{os} dois meses do ano de 2021.</p> <p>-> Valores mais baixos estatisticamente significativos do Ct associados à detecção do gene que codifica a proteína N (Ct N) foram observados em pessoas com infecção da linhagem B.1.1.7 (Ct médio N=15,8) em comparação com aqueles infectados por outras linhagens (mediana do Ct=16,9).</p> <p>-> Uma duração significativamente mais longa da persistência do RNA do SARS-</p>

			<p>CoV-2 em swabs nasofaríngeos foi observada em pessoas com infecção pela linhagem B.1.1.7 (16 dias) em comparação com aqueles infectados por outras linhagens (14 dias). -> Uma limitação do estudo é a falta de correlação com achados clínicos.</p>
<p>Commun Biol 05MAR2021</p>	<p>IFN signaling and neutrophil degranulation transcriptional signatures are induced during SARS-CoV-2 infection</p>	<p>Rosa BA et al. USA & Mexico. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674719/</p>   	<p>Assinatura molecular na COVID-19</p> <p>- Prévio: O SARS-CoV-2 infectou mais de 92 milhões de pessoas em todo o mundo, resultando na COVID-19. - Objetivo: No modelo de macaco rhesus de infecção pelo SARS-CoV-2, caracterizar as assinaturas transcricionais induzidas nos pulmões de macacos jovens e velhos após a infecção. - Métodos: -> Macacos rhesus SPF de origem indiana (<i>Macaca mulatta</i>) foram infectados por múltiplas vias (ocular, intratraqueal e intranasal) com o vírus de sexta passagem em uma dose alvo de $1,05 \times 10^6$ PFU/por animal e estudados por duas semanas. -> Os macacos foram agrupados como naïve (não infectados) e infectados (juvenis ou velhos). Todos os animais infectados desenvolveram sinais clínicos de infecção viral. Ambos os macacos jovens e velhos exibiram doença clínica comparável e cargas virais longitudinais equivalentes no lavado bronco-alveolar (LBA), nos swabs nasofaríngeos e bucofaríngeos, bem como nos pulmões. -> A fim de compreender completamente as vias imunológicas reguladas após a infecção pelo SARS-CoV-2, o RNA foi extraído e o sequenciamento de RNA foi realizado a partir de uma biópsia pulmonar de macacos juvenis (n=3, 1 macho e 2 fêmeas) e idosos macacos infectados com SARS-CoV-2 (n=5, 1 macho e 4 fêmeas) e macacos naïve não infectados (n=4, 2 machos e 2 fêmeas). -> Uma média de 68,6 milhões de leituras foi gerada, com uma média de 20,3 milhões de fragmentos (pares de leitura ou leituras órfãs) mapeados para sequências de codificação de macacos, após processamento analítico e mapeamento. - Resultados: -> Genes associados à sinalização de interferon (IFN), desgranulação de neutrófilos e vias imunológicas inatas foram significativamente induzidos nos pulmões infectados dos macacos, enquanto as vias associadas à formação de colágeno foram inibidas, como também observado em pulmões de macacos com tuberculose (dados da literatura). -> A avaliação dos 30 genes mais significativamente induzidos nos pulmões de macacos infectados com SARS-CoV-2 revelou uma expressão significativamente mais alta de</p>

CTSG (Cathepsina G), ATP6AP2 (ATPase H+ transportador da proteína acessória 2), IFN γ R1 (Receptor de Interferon Gama), CD36 e CD58, em comparação com a expressão em pulmões de macacos não infectados. A cathepsina G é uma serina protease encontrada proeminentemente em grânulos neutrofílicos. O IFN γ R1 se associa ao IFN γ R2 para formar um receptor para o interferon gama da citocina (IFN γ) e é necessário para a ativação de respostas antivirais, como IRF3 (fator regulador de IFN-3), fator nuclear- κ B (NF- κ B) e vias de sinalização JAK (Janus quinase)/STAT (transdutor de sinal e ativador da transcrição).

-> A análise da via Reactome dos genes induzidos e inibidos nos pulmões de macacos rhesus infectados com SARS-CoV-2 mostrou que os genes significativamente induzidos pela infecção incluíam o enriquecimento da via para genes envolvidos em "Desgranulação de neutrófilos", "Sistema imunológico inato", "Sistema imunológico" e "Sinalização de IFN". A indução do CD36 durante COVID-19 nos pulmões está em conformidade com essas vias enriquecidas, uma vez que CD36, um receptor eliminador expresso em vários tipos de células, medeia a captação de lipídios, reconhecimento imunológico, inflamação, adesão molecular e apoptose, e é um substrato da metaloproteinase de matriz-9 que induz apoptose de neutrófilos.

-> A molécula CD58 (antígeno-3 associado à função linfocitária) é expressa em células humanas hematopoiéticas e não hematopoiéticas, incluindo células dendríticas, macrófagos e células endoteliais e interage com sua molécula receptora CD2 nos linfócitos T citotóxico CD8+ e células NK para mediar reações citotóxicas.

-> ATP6AP2 foi o mais significativo dos 65 genes regulados positivamente dentro da via enriquecida de "desgranulação de neutrófilos" (R-HSA-6798695). Ele interage com a renina ou prorenina para causar ativação das vias de sinalização intracelular, resultando na secreção de fatores inflamatórios e fibróticos. CEACAM8 (Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 8) é o gene que codifica CD66b, um marcador bem caracterizado de desgranulação. A regulação positiva significativa dos genes de degranulação de neutrófilos foi observada em macacos infectados com SARS-CoV-2. De fato, os neutrófilos CD66b+ se acumulam nos pulmões de macacos infectados com SARS-CoV-2.

-> Genes adicionais fortemente induzidos durante a COVID-19 na via de desgranulação de neutrófilos foram a IDH-1 (Isocitrato Desidrogenase (NADP (+) 1) que regula a quimiotaxia de neutrófilos e FPR2 (Formyl

Peptide Receptor 2), um receptor-G de superfície acoplado que tem um papel deletério no curso da infecção viral, incluindo influenza (dado da literatura).

-> LTA4H (Hidrolase do Leucotrieno A4) é uma enzima que gera um quimioatraente neutrófilo, leucotrieno B4, um marcador para ARDS39. Expressão de 162 genes pertencentes ao "sistema imunológico" (R-HSA-168256) foram induzidos em macacos infectados pelo SARS-CoV-2. Estes incluíram LAMP-2 (Lysosomal Associated Membrane Protein 2) e ATG7 (Autophagy Related 7), genes-chave envolvidos na autofagia. LAMP-2 é conhecido para influenciar a maturação fagossômica em neutrófilos.

-> A resposta de IFN constitui a principal linha de defesa contra vírus. Consistente com isso, observada a indução de positiva de genes associados às vias de sinalização do IFN, especificamente *Interferon Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 1* (IFIT3), receptor 1 de IFN alfa (IFNAR1), receptor 1 de IFN gama (IFNGR1) e proteína OAS 1 (2'-5'-Oligoadenilato Sintetase 1).

-> Em resumo, os resultados sugerem que a suprarregulação da desgranulação de neutrófilos, a sinalização de IFN tipo I e o sistema imunológico inato é uma característica das respostas do hospedeiro à infecção pelo SARS-CoV-2.

-> Verificado que 1109 genes enriquecidos para degradação, regulação e formação de colágeno foram significativamente inibidos em macacos infectados com SARS-CoV-2. Por exemplo, entre os genes da via enriquecida de "degradação de colágeno" (R-HSA-1442490), COLA1 (cadeia de colágeno tipo I), outros membros da família de genes de colágeno (COL4A2 COL16A1 COL4A4 COL6A2 COL6A1 COL5A1 COL9A1 COL13A1 COL12A1 COL1A2) foram todos significativamente inibidos nos pulmões de animais com COVID-19 quando comparados à expressão nos pulmões de controles não infectados.

-> O TGFβ (Transforming Growth Factor Beta 1) está envolvido no reparo do tecido normal após lesão pulmonar e na mediação da remodelação do tecido fibrótico, aumentando a produção e diminuindo a degradação do tecido conjuntivo. Os resultados indicaram inibição dos genes associados à sinalização de TGFβ, incluindo os genes PARD3 (regulador de polaridade celular familiar par-3) e PARD6A (regulador de polaridade celular familiar par-6 alfa), que estão envolvidos na regulação na polarização ápico-basolateral das células epiteliais, SMURF (SMAD específico E3 ubiquitina-proteína ligase 1), um regulador

negativo da via TGF β e FURIN, que é uma enzima conversora de TGF β . Embora a interação dos genes dentro dessas vias seja complexa, os resultados indicam uma ampla regulação negativa dos mecanismos que contribuem para o reparo e remodelamento pulmonar em animais com controle anamnóstico da infecção pelo SARS-CoV-2.

-> Na COVID-19, o aumento da idade é um fator de risco significativo para mau prognóstico e aumento da mortalidade. As vias de sinalização de IFN e Notch tipo I foram significativamente induzidas nos pulmões de macacos infectados juvenis em comparação aos macacos infectados mais velhos.

-> Esses resultados foram corroborados com o aumento da contagem de neutrófilos periféricos e da proporção de linfócitos de neutrófilos em indivíduos mais velhos com COVID-19.

- Em resumo, os genes com expressão significativamente induzidos em macacos juvenis infectados com SARS-CoV-2, mas não velhos, incluíam MX1 (MX Dynamin Like GTPase 1), MX2 (MX Dynamin Like GTPase 2) e USP18 (Ubiquitin Specific Peptidase 18). Isso é consistente e destaca o papel da via Reactome “sinalização de interferon alfa/beta” sendo enriquecida em macacos jovens durante a infecção pelo SARS-CoV-2. Outros genes nesta via que exibiram expressão aumentada incluíam IFIT1 e IFIT2.

-> ADAM17 (ADAM Metalopeptidase Domain 17), um componente chave das vias de sinalização Notch, é conhecido por estar envolvido na liberação da proteína de superfície ECA2. Portanto, é interessante que exista uma correlação linear entre a expressão da ECA2 e ADAM17 em macacos infectados, além da indução da ECA2 nas amostras infectadas com SARS-CoV-2, substancialmente maior entre as amostras juvenis (7,1 vezes, $P = 3,4 \times 10^{-4}$). Além disso, a indução de DLL4, um ligante Notch, aumentou nos macacos juvenis infectados. Finalmente, a indução diferencial de DTX3L (Deltex E3 Ubiquitin Ligase 3L) em macacos infectados juvenis em comparação aos macacos infectados mais velhos é importante porque Deltex estabiliza o receptor no compartimento endocítico permitindo que a transdução de sinal prossiga na sinalização Notch.

-> Em pacientes com > 60 anos, houve aumento dos níveis plasmáticos do VEGF, o que coincidiu com o aumento dos neutrófilos e na relação neutrófilos/linfócitos .

-> De modo importante, a desgranulação de neutrófilo e as vias do IFN apresentam uma sobreposição com os achados na tuberculose.

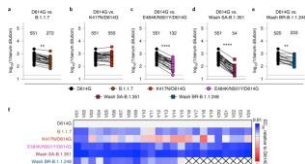
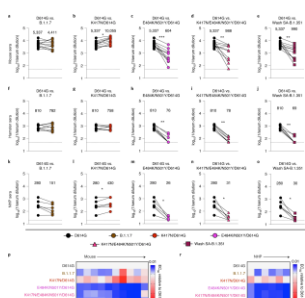
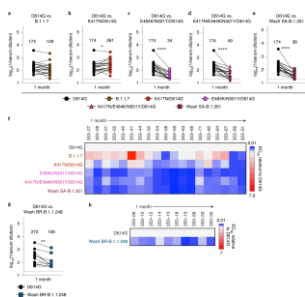
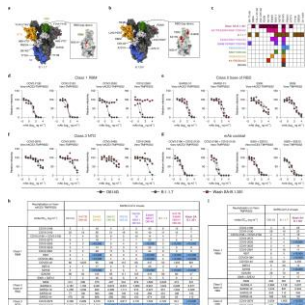
- Conclusões:

-> Os dados transcriptômicos delinearam as

Nat Med
04MAR2021

Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies

Chen RE et al. USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33664494/>



Resistência das variantes do SARS-CoV-2 aos anticorpos monoclonais, soros convalescentes e soros de indivíduos vacunados com a vacina de mRNA BNT162B2

vias da doença que melhoram a compreensão da imunopatogênese de COVID-19.

- Prévio: O SARS-CoV-2 causou a pandemia global de COVID-19. A disseminação rápida de variantes do SARS-CoV-2 pode prejudicar a eficácia dos anticorpos e vacinas recém-introduzidos.

- Objetivo: Relatar o impacto na neutralização de anticorpos de um painel de variantes autênticas do SARS-CoV-2 incluindo a B.1.1.7, cepas quiméricas com genes spike sul-africanos ou brasileiros e variantes virais recombinantes isogênicas. Para atingir este objetivo, foram utilizados anticorpos monoclonais (mAbs), soros imunes animais, soros convalescentes humanos e soros humanos de receptores da vacina de mRNA BNT162b2 (Pfizer-BioNTech).

- Métodos:
-> Utilizadas as células Vero E6 (CRL-1586, American Type Culture Collection), Vero-TMPRSS2 (presente de S. Ding, Washington University) e Vero-hACE2-TMPRSS2 (presente de A. Creanga and B. Graham, National Institutes of Health (NIH)).

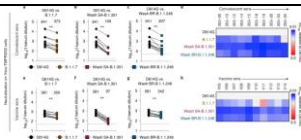
-> O isolado 2019n-CoV/USA_WA1/2020 do SARS-CoV-2 foi obtido do CDC dos EUA. O isolado B.1.1.7 foi obtido de um indivíduo infectado. Mutações pontuais individuais no gene da proteína spike (D614G, K417N/D614G, E484K/D614G, N501Y/D614G, P681H/ D614G, del69-70/N501Y/D614G e E484K/N501Y/D614G) foram introduzidas num clone de DNA complementar infeccioso da cepa 2019n-CoV/USA_WA1/2020 (WA1/2020). As substituições de nucleotídeos foram introduzidas num subclone puc57-CoV-2-F5-7 contendo o gene spike do clone infeccioso de tipo selvagem SARS-CoV-252. Os genes spike variantes sul-africano (B.1.351) e brasileiro (B.1.1.248) foram produzidos sinteticamente por montagem de Gibson.

-> Os anticorpos monoclonais (mAbs) humanos estudados neste artigo (COV2-2196, COV2-2072, COV2-2050, COV2-2381, COV2-2130, COVOX-384, COVOX-40, S309, S2E12, S2H58, S2X333, VIR-7381 e S2X259) foram isolados de amostras de sangue de indivíduos na América do Norte ou Europa com infecção sintomática pelo SARS-CoV ou SARS-CoV-2 anterior e confirmada em laboratório.

-> Múltiplas fontes de amostras de soro humano foram utilizadas neste estudo: amostras de soro de convalescença foram obtidas de uma coorte recrutada na área metropolitana de St. Louis (EUA) que apresentou infecção leve pelo SARS-CoV-2. Nenhum desses pacientes precisou de intubação.

-> Os soros imunes de camundongo, hamster e primatas não-humanos foram obtidos 1 mês após a imunização intranasal com ChAd-SARS-CoV-2, uma vacina de vetor adenoviral de chimpanzé que codifica para uma forma estabilizada de pré-fusão da proteína spike.

-> Teste de neutralização: Diluições em série dos mAbs (começando com diluição de 10 µg/ml) ou soro foram incubadas com 10² unidades formadoras de foco de diferentes cepas ou variantes do SARS-CoV-2 por 1 h a 37°C. Os complexos de anticorpo-vírus foram adicionados a monocamadas das células Vero-hACE2-TMPRSS2 ou Vero-TMPRSS2 em placas de 96 poços e incubados a 37 ° C por 1 h.



Subsequentemente, as células foram cobertas com 1% (p/v) de metilcelulose em meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino. As placas foram coletadas 24 h mais tarde, removendo as sobreposições e fixadas com PFA 4% em PBS por 20 min em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas sequencialmente com um pool oligoclonal de anticorpos anti-S SARS2-2, SARS2-11, SARS2-16, SARS2-31, SARS2-38, SARS2-57 e SARS2-71 e anticorpos anti-S de cabra conjugados com HRP IgG (Sigma, 12-349) em PBS suplementado com 0,1% de saponina e 0,1% de albumina de soro bovino. Os focos de células infectadas com SARS-CoV-2 foram visualizados usando substrato de peroxidase TrueBlue (KPL) e quantificados em um microanalisador ImmunoSpot (Cellular Technologies).

-> ELISA para as proteínas spike e RBD.

-> Expressão transitória das proteínas de pico SARS-CoV-2 recombinantes e citometria de fluxo: O gene S de comprimento total da cepa SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2-S) do isolado BetaCoV/Wuhan-Hu-1/2019 (número de acesso MN908947) carregando D614G foi otimizado por códons para expressão em células de hamster e clonado no vetor de expressão pcDNA3. Substituições de aminoácidos para B.1.1.7, P.1 (linhagem brasileira: L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y, T1027I e V1167F) e variantes B.1.351 foram introduzidas por PCR de extensão de sobreposição. Resumidamente, fragmentos de DNA com sequências de sobreposição foram amplificados por PCR (etapa 1). As mutações foram introduzidas por amplificação com primers com pontos de fusão semelhantes. A deleção dos 21 aminoácidos do terminal C foi introduzida para aumentar a expressão da superfície da *spike* recombinante. Em seguida, três fragmentos sobrepostos contíguos foram fundidos por uma primeira PCR de sobreposição (etapa 2) usando os primers externos de cada conjunto, resultando em três fragmentos maiores com sequências sobrepostas. Uma PCR de sobreposição final (etapa 3) foi realizada nos três fragmentos grandes usando os primers externos mais extremos para amplificar o gene S e as sequências de flanqueamento, incluindo os locais de restrição KpnI e NotI. Este fragmento foi digerido e clonado no plasmídeo de expressão pHCMV1.

-> Produção de vírus pseudotipado SARS-CoV-2: As células 293T/17 (American Type Culture Collection CRL-11268) foram semeadas em placas de 10 cm para atingir 80% de confluência no dia seguinte, quando foram, então, transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1 (+)-spike-D19 (que codifica a proteína de spike SARS-CoV-2) ou pcDNA3.1 (+)-variantes spike-D19 usando o reagente de transfecção TransIT-Lenti. Um dia após a transfecção, as células foram infectadas com VSV-luc (VSV-G) em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 3. O sobrenadante celular contendo o vírus pseudotipado SARS-CoV-2 foi coletado no dia 2 após a transfecção, centrifugado a 1.000 g por 5 min para remover detritos celulares, alíquotados e congelados a -80°C . A preparação do vírus pseudotipado SARS-CoV-2 foi quantificada usando células Vero E6 semeadas a 20.000 células por poço em placas de 96 no dia anterior. As células foram inoculadas com

uma série de diluições 1:10 de vírus pseudotipado em 50 µl de DMEM por 1h a 37°C. Um adicional de 50 µl de DMEM foi adicionado, já que as células foram incubadas durante a noite a 37°C. A atividade da luciferase foi quantificada com o reagente Bio-Glo pela adição de 100 µl de Bio-Glo (diluído 1:1 em PBS), incubado em temperatura ambiente por 5 min e as unidades relativas de luz foram lidas em um leitor de placa EnSight ou EnVision.

-> Neutralização do vírus pseudotipado SARS-CoV-2: As células Vero E6 foram semeadas em placas de 96 poços n densidade de 20.000 células por poço em 100 µl de meio e cultivadas durante a noite a 37°C. Vinte e quatro horas depois, diluições em série de 1:3 de 8 pontos de mAb foram preparadas em meio, com cada diluição testada em duplicata em cada placa (intervalo: 10 µg/ml a 4 ng/ml concentração final). O pseudovírus foi diluído 1:25 em meio e adicionado 1:1 a 110 µl de cada diluição de anticorpo. EM seguida, pseudovírus:misturas de anticorpos foram incubados durante 1 h a 37°C. O meio foi removido das células Vero E6 e 50 µl do pseudovírus:misturas de anticorpos foram adicionados às células. Uma hora após a infecção, 100 µl de meio foram adicionados aos poços contendo misturas de pseudovírus:anticorpos e incubados por 17 horas a 37°C. O meio foi então removido e 100 µl de reagente Bio-Glo (diluído 1:1 em DPBS) foram adicionados a cada poço. A placa foi agitada num agitador de placas a 300 r.p.m. à temperatura ambiente durante 20 min e as unidades relativas de luz foram lidas num leitor de placas EnSight ou EnVision.

- Resultados:

-> Para avaliar os efeitos da variação da cepa SARS-CoV-2 na neutralização de anticorpos, foram obtidas ou geradas cepas infecciosas autênticas do SARS-CoV-2 com variações de sequência no gene spike. Um isolado B.1.1.7 teve alterações de assinatura no gene spike, incluindo as deleções 69-70 e 144-145 e substituições N501Y, A570D, D614G e P681H. Criado o SARS-CoV-2 quimérico totalmente infeccioso com o gene da spike sul-africano (Wash SA-B.1.351; D80A, deleção 242-244, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G e A701V) e um painel de isogênicos mutantes da spike (D614G, K417N/D614G, E484K/D614G, N501Y/D614G, P681H/D614G, del69-70/N501Y/D614G, E484K/N501Y/D614G e K417N/E484K/N501Y/D614G) no background da cepa de Washington (2019n-CoV/ USA_WA1/2020 (WA1/2020).

-> Os vírus recombinantes e B.1.1.7 foram propagados nas células Vero-TMPRSS2 e Vero-hACE2-TMPRSS2 que expressam serina 2 protease transmembrana (TMPRSS2) e ECA2 humana (hECA2) para prevenir o desenvolvimento de mutações adventícias na spike, especialmente próximo ao local de clivagem da furina, que se acumula rapidamente nas células Vero E615 e pode afetar as vias de entrada e a virulência.

-> Anticorpos de classe 1 (como COV2-2196, COV2-2072, COV2-2050, COV2-2381, COV2-2130, COVOX-384, COVOX-40, 1B07, S2E12, S2H58 e S2X259) são potentemente neutralizantes, bloqueiam a ligação da hECA2 e a ligação a múltiplos locais proximais no RBM (receptor

binding motif) do RBD conforme determinado por análises estruturais ou de mutação de escape; anticorpos neutralizantes de classe 2 (como S309, SARS2-3, SARS2-10, SARS2-31, SARS2-44) costumam ter reação cruzada com SARS-CoV, ligam-se à base do RBD e bloqueiam de forma variável a ligação da hECA2; e mAbs neutralizantes de classe 3 (tais como COV2-2676 e COV2-2489) que reconhecem o NTD.

-> Com a cepa D614G, a neutralização pela maioria dos mAbs de classe 1 e classe 2 foi semelhante em células Vero-hACE2-TMPRSS2 e Vero-TMPRSS2. No entanto, mAbs reativos a NTD mostraram maior potência (até 13 vezes) e neutralização mais completa em células Vero-TMPRSS2 do que células Vero-hACE2-TMPRSS2.

-> Em seguida, avaliado o impacto das mutações da proteína spike na neutralização de mAb em células Vero-hACE2-TMPRSS2 e células Vero-TMPRSS2: (1) A mutação P681H (na região C-terminal de S1) e a deleção 69-70 (no NTD) tiveram efeitos marginais na potência de neutralização dos mAbs RBM e RBD; foi difícil avaliar o impacto do P681H e outras mutações nos mAbs NTD, uma vez que estes mAbs não neutralizaram o vírus D614G no tempo basal nas células Vero-hACE2-TMPRSS2; (2) A mutação K417N resultou numa redução de ~ 27 vezes na neutralização pelo mAb COVOX-40, mas não afetou negativamente outros mAbs; no mínimo, vários mAbs de classe 1 e também o SARS2-44 mostraram atividade inibitória ligeiramente melhorada ($P = 0,002$, teste de classificação sinalizada de pares combinados de Wilcoxon bicaudal) com esta mutação; (3) A mutação em N501Y reduziu ligeiramente a atividade neutralizante de COVOX-40, SARS2-31 e SARS2-10, mas não alterou substancialmente a potência de outros mAbs; este resultado é consistente com os dados que mostram que os soros convalescentes humanos neutralizam eficazmente os vírus com substituições N501Y; (4) A mutação E484K impactou negativamente a potência de vários anticorpos de classe 1. Em comparação com o vírus D614G, os mAbs COV2-2196, COV2-3025, COV2-2381 e S2E12 mostraram atividade reduzida de 4 a 5 vezes contra o vírus E484K e COV2-2050, 1B07, COVOX-384 e S2H58 perderam virtualmente todo o potencial de neutralização; (5) A combinação das mutações E484K e N501Y, que está presente nas cepas circulantes da África do Sul B.1.351 e B.1.1.248 brasileira, mostrou efeitos ainda maiores (reduções de 6 a 13 vezes) na atividade dos mAbs classe 1 COV2-2196, COV2-3025, COV2-2381 e mAbs S2E12; (6) Quando testamos mAbs de classe 1 para a inibição do vírus Wash SA-B.1.351 contendo a sequência da spike sul-africana completa, como esperado, vários mAbs (COV2-2050, 1B07, COVOX-384 e S2H58) perderam atividade em ambas as células Vero-hACE2-TMPRSS2 e Vero-TMPRSS2. No entanto, as reduções no potencial de neutralização por outros mAbs de classe 1 (COV2-2196, COV2-3025, COV2-2381 e S2E12) observadas contra o vírus E484K / N501Y estavam ausentes com Wash SA-B.1.351, que contém mutações adicionais.

-> A substituição K417N, que está localizada na borda do RBM e aumenta a neutralização por alguns

mAbs de classe 1, pode compensar os efeitos negativos na inibição das mutações E484K/N501Y; em comparação, observado um padrão de neutralização distinto com Wash SA-B.1.351 para mAbs das classes 2 e 3. Como alguns mAbs neutralizaram fracamente em células Vero-hACE2-TMPRSS2, realizamos experimentos paralelos em células Vero-TMPRSS2. Os mAbs de classe 2 que se ligam à base do RBD não mostraram nenhuma perda substantiva de potência contra o Wash SA-B.1.351. No entanto, os dois mAbs NTD na classe 3 (COV2-2676 e COV2-2489) perderam a atividade neutralizante contra Wash SA-B.1.351 nas células Vero-hECA2-TMPRSS2 e Vero-TMPRSS2, consistente com dados recentes com outros mAbs NTD e pseudovírus; (7) Nenhum dos mAbs de classe 1 perdeu atividade neutralizante contra o vírus B.1.1.7 nas células Vero-hECA2-TMPRSS2. No entanto, observadas algumas pequenas reduções na potência (2,5 a 6 vezes) com os mAbs COV2-2381, S2E12 e S2X259 nas células Vero-TMPRSS2, embora tenham permanecido altamente neutralizantes. Em comparação, observada atividade neutralizante diminuída (6 a 13 vezes) de alguns mAbs de classe 2 (SARS2-31 e S309) contra a cepa B.1.1.7 nas células Vero-hACE2-TMPRSS2, mas não células Vero-TMPRSS2. A potência reduzida do mAb S309 contra a cepa B.1.1.7 nas células Vero-hECA2-TMPRSS2 contrasta com os dados que mostram que ele se liga avidamente à proteína *spike* B.1.1.7 na superfície das células e neutraliza potentemente um vírus de estomatite vesicular (VSV) pseudotipado com a proteína *spike* B.1.1.7 nas células Vero E6 ou um vírus WA1/2020 derivado nas células Vero CCL81 e testado nas células Vero-hECA2-TMPRSS2 ou Vero-TMPRSS2. Finalmente, um dos mAbs NTD de classe 3 (COV2-2489) perdeu atividade inibitória contra a cepa B.1.1.7 em ambos os tipos de células, possivelmente devido às deleções presentes no NTD (69-70 e 144-145).

-> Em seguida, avaliado como as mutações da proteína *spike* impactaram a atividade neutralizante de soros policlonais obtidos de indivíduos (n = 19), aproximadamente 1 mês após infecção leve pelo SARS-CoV-226. Com base em experimentos com os mAbs, as células Vero-hECA2-TMPRSS2 foram utilizadas e os testes foram focados nas cepas WA1/2020 D614G, B.1.1.7, Wash SA-B.1.351 e WA1/2020 D614G com mutações em K417N, E484K/N501Y ou K417N/E484K/N501Y. Quando comparado ao vírus WA1/2020 D614G, foram observados os seguintes achados: (1) diferenças na neutralização não foram observadas com a cepa B.1.1.7; (2) um pequeno aumento (1,5 vezes, $P < 0,05$) na neutralização foi detectado com o vírus K417N, semelhante ao observado com alguns mAbs; e (3) os títulos de neutralização do soro foram menores contra E484K/N501Y (5 vezes, $p < 0,0001$), K417N / E484K / N501Y (3,5 vezes, $p < 0,0001$) e Wash SA-B.1.351 (4,6 vezes, $p < 0,0001$), todos contendo a mutação E484K.

-> Uma análise de mapa de calor mostrou que a maioria dos indivíduos perdeu atividade neutralizante contra todos os três vírus contendo as mutações E484K e N501Y. Dados esses resultados com vírus que codificam mutações E484K,

realizados estudos separados com soro convalescente humano (n=10) e uma cepa quimérica SARS-CoV-2 WA1/2020 que codifica um gene spike variante brasileiro (Wash BR-B.1.1.248; L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I e V1176F. Como esperado, vários mAbs de classe 1 (ligação a RBM) e classe 3 (ligação a NTD) mostraram atividade neutralizante reduzida contra Wash BR-B.1.1.248. No entanto, observada uma diminuição menor, mas significativa (2,5 vezes, $p < 0,01$) na potência de neutralização do soro convalescente contra Wash BR-B.1.1.248.

-> Estudos em animais: Para amostras de soro de camundongos, ao comparar os títulos médios geométricos de neutralização (GMTs) da neutralização com a cepa WA1/2020 D614G, foi observado um ligeiro aumento (1,9 vezes, $p < 0,05$) com K417N, diminuição com E484K/N501Y (9 vezes, $p < 0,001$), diminuição com K417N/E484K/N501Y (cinco vezes, $p < 0,01$) e diminuição com Wash SA-B.1.351 (5 vezes, $p < 0,01$), ainda sem diferenças significativas com B.1.1.7.

-> No gráfico de mapa de calor, 9/10 soros de camundongos mostram perda da atividade neutralizante contra vários vírus contendo a mutação E484K.

-> Em hamsters, os resultados foram semelhantes. Observada uma diminuição acentuada (10 a 12 vezes, $p < 0,01$) na neutralização sérica de E484K/N501Y, K417N/E484K/N501Y e Wash SA-B.1.351. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na neutralização com os vírus K417N e B.1.1.7.

-> Nos primatas não humanos, também observada uma diminuição substancial (9 a 11 vezes, $p < 0,05$) na neutralização sérica de E484K/N501Y, K417N/E484K/N501Y e Wash SA-B.1.351. Em comparação, com os vírus B.1.1.7 ou K417N, não foi detectada nenhuma mudança ou pequenos aumentos significativos (1,5 vezes, $p < 0,05$) na neutralização, respectivamente.

-> A análise do mapa de calor mostrou que todos os soros dos primatas não-humanos exibiram consistentemente atividade neutralizante reduzida contra vírus contendo a mutação E484K.

-> Como as amostras de ensaios de imunização humana com ChAd-SARS-CoV-2 ainda não estão disponíveis, foram incluídos soros de indivíduos que receberam a vacina Pfizer-BioNTech (BNT162b2), uma nanopartícula lipídica encapsulada-mRNA que codifica a proteína pré-fusão ligada à membrana semelhante à forma estabilizada da proteína *spike* de comprimento completo do SARS-CoV-2.

-> Testados os soros para neutralização do painel de variantes do SARS-CoV-2: em comparação com a variante WA1/2020 D614G, observadas reduções moderadas na atividade neutralizante (GMTs) para B.1.1.7 (2 vezes, $p < 0,01$) e E484K/N501Y (4 vezes, $p < 0,0001$) e diminuições maiores na atividade contra Wash SA-B.1.351 (10 vezes, $p < 0,0001$), com todos os participantes mostrando potência substancialmente reduzida, de modo que os resultados estão de acordo com estudos de pseudovírus.

-> Análogo aos resultados com soros convalescentes humanos, observada uma diminuição menor (2,2

vezes, $p < 0,01$) na potência de neutralização do soro de receptores de vacina contra o vírus Wash BR-B.1.1.248. Não foram detectadas diferenças significativas na atividade neutralizante com K417N/D614G.

-> Devido às diferenças na neutralização vistas com alguns mAbs nas células Vero-hECA2-TMPRSS2 e Vero-TMPRSS2, foi também avaliado o impacto da expressão do receptor hECA2 na atividade neutralizante de amostras de soro de adultos convalescentes e de indivíduos vacinados com mRNA de BNT162b2: dadas as quantidades limitadas de soro restantes, realizados experimentos de neutralização nas células Vero-TMPRSS2 com os vírus WA1/2020 D614G, B.1.1.7 e Wash SA-B.1.351 e Wash BR-B.1.1.248; os resultados revelaram o seguinte: (1) Os soros convalescentes e vacinais mostraram pequenas, mas significativas reduções (1,7 a 2,5 vezes, $p < 0,01$) na atividade neutralizante de B.1.1.7 em comparação com o vírus WA1/2020 D614G; (2) os soros de indivíduos convalescentes e vacinados mostraram uma redução marcada de 6 a 9 vezes ($p < 0,01$) na potência neutralizante contra o vírus Wash SA-B.1.351; e (3) observada novamente uma diminuição menor (1,7 a 4,5 vezes, $p < 0,01$) na potência de neutralização do soro contra Wash BR-B.1.1.248. Os resultados foram semelhantes em magnitude entre as células Vero-hECA2-TMPRSS2 e Vero-TMPRSS2 e sugerem que a expressão celular da hECA2 não tem impacto marcante no resultado da neutralização de anticorpos policlonais nestes ensaios.

- Conclusões:

-> Muitos mAbs altamente neutralizantes que envolvem o domínio de ligação ao receptor (RBD) ou domínio N-terminal e a maioria dos soros convalescentes e soros imunes induzidos pela vacina de mRNA mostraram atividade inibitória reduzida contra vírus contendo a mutação da spike E484K.

-> Como os anticorpos que se ligam ao RBD da proteína spike e ao domínio N-terminal demonstram potência de neutralização diminuída in vitro contra algumas variantes emergentes, coquetéis de mAb atualizados direcionados a regiões altamente conservadas, aumento da potência de mAb ou ajustes nas sequências de pico de vacinas podem ser necessários para prevenir a perda de proteção in vivo.

Plos Med
04MAR2021

Cardiometabolic risk factors for COVID-19 susceptibility and severity: A Mendelian randomization analysis

Leong A et al. USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33661905/>

Exposures	COVID-19 Susceptibility		COVID-19 Severity	
	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
LDL cholesterol	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
HDL cholesterol	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
Triglycerides	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
Body mass index	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
Diastolic blood pressure	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
Systolic blood pressure	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
Glucose	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
Insulin	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
Alcohol consumption	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
Smoking	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
Height	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01
Age	1.00 (0.99-1.01)	0.08	1.00 (0.99-1.01)	0.01

Base genética para obesidade e maior susceptibilidade e progressão da COVID-19

- Prévio: Estudos epidemiológicos relataram associações de diversas condições cardiometabólicas, incluindo obesidade com a COVID-19, mas a causalidade não foi estabelecida.

- Objetivo: Avaliar as associações de 17 características cardiometabólicas com a susceptibilidade e gravidade da COVID-19 usando análises de randomização Mendeliana (RM) de 2 amostras.

- Métodos e resultados:

-> Selecionadas variantes genéticas associadas a cada exposição, incluindo índice de massa corporal (IMC), em $p < 5 \times 10^{-8}$ de estudos de associação do genoma

total (GWASs – genoma-wide association studies).

-> Em seguida, foram calculadas as médias ponderadas da variância inversa de estimativas específicas das variantes utilizando as estatísticas resumidas para suscetibilidade e gravidade da meta-análise GWAS da COVID-19 Host Genetics Initiative, que inclui coortes populacionais e registros hospitalares compreendendo indivíduos com autorrelato ou inferência genética de Ancestralidade europeia.

-> A suscetibilidade foi definida como teste positivo para COVID-19 e a gravidade foi definida como hospitalização com COVID-19 versus controles populacionais (qualquer um que não seja um caso em coortes contribuintes).

-> Repetida a análise do IMC com estimativas de efeito do UK Biobank e realizada a randomização mendeliana (RM) multivariável par a par para estimar os efeitos diretos e indiretos do IMC por meio de doenças cardiometabólicas relacionadas à obesidade.

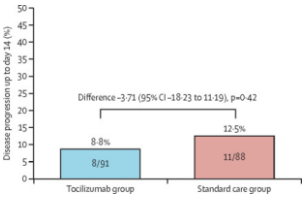
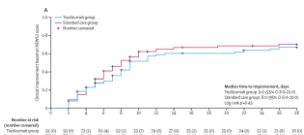
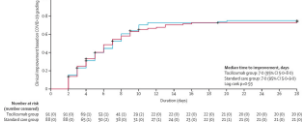
-> Usando $p < 0,05/34$ testes = 0,0015 para declarar significância estatística, encontramos uma associação geneticamente não significativa de IMC mais alto com teste positivo para COVID-19 (14.134 casos COVID-19/1.284.876 controles, $p=0,002$; UK Biobank: OR=1,06 [IC 95% 1,02, 1,10] por kg/m^2 ; $p = 0,004$) e uma associação estatisticamente significativa com maior risco de hospitalização pela COVID-19 (6.406 casos de COVID-19 hospitalizados/902.088 controles, $p = 4,3 \times 10^{-5}$; UK Biobank: OR=1,14 [IC95%, 1,07, 1,21] por kg/m^2 , $p=2,1 \times 10^{-5}$).

-> O efeito direto implícito do IMC foi abolido após o condicionamento sobre o efeito no diabetes tipo 2, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e doença renal crônica.

-> Nenhuma outra exposição cardiometabólica testada foi associada a um maior risco de piores desfechos na COVID-19.

- Conclusões:

-> No estudo, foram encontradas evidências genéticas para apoiar o IMC mais elevado como um fator de risco causal para a suscetibilidade e gravidade do COVID-19.

			<p>-> Esses resultados levantam a possibilidade de que a obesidade pode amplificar a carga da doença COVID-19 de forma independente ou por meio de suas consequências cardiometabólicas e sugerem que o direcionamento à obesidade pode ser uma estratégia para reduzir o risco de desfechos COVID-19 graves.</p> <p>-> Amostras de estudo pequenas e instrumentos genéticos fracos podem ter limitado a detecção de outras associações modestas, e a pleiotropia (processo no qual um único par de alelos atua na manifestação de diversas características) pode ter enviesado os achados.</p>
<p>Lancet Respir Med 04MAR2021</p>	<p>Tocilizumab plus standard care versus standard care in patients in India with moderate to severe COVID-19-associated cytokine release syndrome (COVINTOC): an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 trial</p>	<p>Soim AS. India & UK. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33676589/</p>   	<p>Ausência de eficácia do Tocilizumabe num estudo randomizado na Índia</p> <p>- Prévio: Ensaios clínicos randomizados globais utilizando o Tocilizumabe (TCZ), um anticorpo anti-receptor da IL-6, em pacientes internados com COVID-19 tem mostrado resultados conflitantes, embora tenham sido descritas diminuições potenciais no tempo da alta e na morbidade na terapia intensiva. Além disto, TCZ reduziu a progressão para ventilação mecânica e morte numa população experimental enriquecida por minorias raciais e étnicas.</p> <p>-> Objetivo: investigar se o tratamento com TCZ poderia prevenir a progressão de COVID-19 no primeiro ensaio clínico multicêntrico randomizado realizado inteiramente em um país de renda média-baixa (Índia).</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> COVINTOC é um ensaio clínico aberto, multicêntrico, randomizado, controlado, de fase 3 realizado em 12 hospitais públicos e privados em toda a Índia.</p> <p>-> Adultos (com idade ≥ 18 anos) internados no hospital com COVID-19 moderado a grave (classificação do Ministério da Saúde da Índia) confirmado por resultado do teste PCR positivo para SARS-CoV-2 foram aleatoriamente designados (randomização de bloco 1: 1) para receber tocilizumabe 6 mg/kg mais cuidado padrão (grupo TCZ) ou apenas cuidado padrão (grupo controle).</p> <p>-> Desfecho primário: progressão de COVID-19 (de moderado para grave ou de grave para morte) até o dia 14 utilizando o método intenção de tratar modificada de todos os participantes que tiveram pelo menos uma avaliação basal até o desfecho primário.</p>

-> A segurança foi avaliada em todos os pacientes designados aleatoriamente.

- Resultados:

-> N=180 pacientes foram recrutados entre 30 de maio de 2020 e 31 de agosto de 2020, e aleatoriamente designados para o grupo TCZ (n=90) ou o grupo de tratamento padrão (n=90).

-> Um paciente designado aleatoriamente para o grupo de tratamento padrão recebeu inadvertidamente TCZ no início do estudo e foi incluído no grupo de tocilizumabe para todas as análises.

-> Um paciente designado aleatoriamente para o grupo de tratamento padrão retirou o consentimento após a visita inicial e não recebeu nenhum medicamento do estudo e não foi incluído na população de intenção de tratar modificada, mas ainda foi incluído nas análises de segurança.

-> TCZ (n=91) *versus* controle (n=99): sexo masculino 84% *vs* 96%, mediana de idade 56 (47-63) *vs* 54 (43-63) anos, DM 34% *vs* 49%, HAS 40% *vs* 39%, doença cardíaca 16% *vs* 14%.

-> 75 (82%) de 91 no grupo com TCZ e 68 (76%) de 89 no grupo de tratamento padrão completaram 28 dias de acompanhamento.

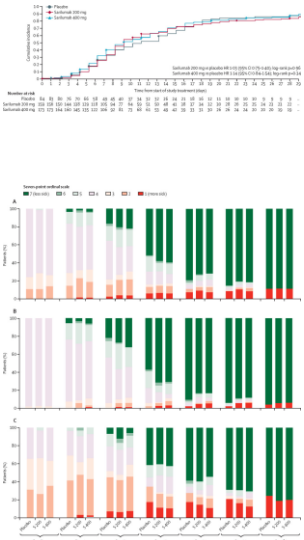
-> A progressão da COVID-19 até o dia 14 ocorreu em oito (9%) de 91 pacientes no grupo TCZ e 11 (13%) de 88 no grupo tratamento padrão (diferença -3,71 [IC 95%, -18,23 a 11,19]; p = 0,42).

-> 33 (36%) de 91 pacientes no grupo TCZ e 22 (25%) de 89 pacientes no grupo de tratamento padrão tiveram eventos adversos; 18 (20%) e 15 (17%) tiveram eventos adversos graves. O evento adverso mais comum foi a síndrome do desconforto respiratório agudo, relatado em sete (8%) pacientes em cada grupo. Eventos adversos de grau 3 foram relatados em dois (2%) pacientes no grupo TCZ e cinco (6%) pacientes no grupo de tratamento padrão. Não houve eventos adversos de grau 4. Eventos adversos graves foram relatados em 18 (20%) pacientes no grupo de TCZ e 15 (17%) no grupo tratamento padrão; 13 (14%) e 15 (17%) pacientes morreram durante o estudo.

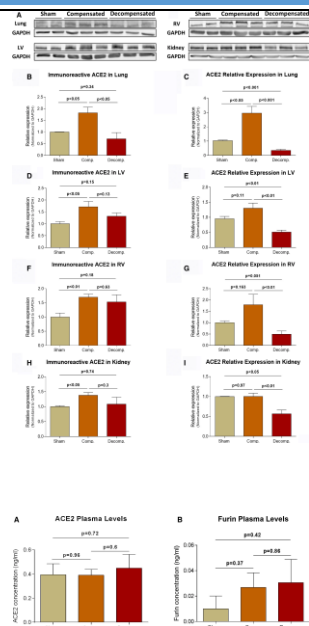
- Conclusão:

-> O uso rotineiro de TCZ em pacientes internados no hospital com COVID-19 moderada a grave não é indicado.

-> No entanto, a evidência post-hoc deste

				<p>estudo sugere que o TCZ ainda pode ser eficaz em pacientes com COVID-19 grave e, portanto, deve ser investigado em estudos futuros.</p>
<p>Lancet Respir Med 04MAR2021</p>	<p>Sarilumab in patients admitted to hospital with severe or critical COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial</p>	<p>Lescure FX et al. France, Japan, Canada, USA. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33676590/</p>  <p>The figure consists of four subplots. The top subplot is a Kaplan-Meier survival plot showing the percentage of patients alive over 28 days for three groups: Placebo (red), Sarilumab 200 mg (green), and Sarilumab 400 mg (blue). The survival curves are very similar, indicating no significant difference in survival between groups. The bottom three subplots (A, B, C) are stacked bar charts showing the percentage of patients in different clinical states (e.g., alive, deceased, discharged) at various time points (Day 0, Day 7, Day 14, Day 21, Day 28) for each group. The bars are color-coded: red for deceased, orange for discharged, green for alive, and blue for unknown status.</p>	<p>Ausência de eficácia do Sarilumab na COVID-19 grave e crítica</p>	<p>- Prévio: Citocinas pró-inflamatórias elevadas estão associadas a maior gravidade da COVID-19. - Objetivo: Avaliar a segurança e eficácia do sarilumabe, um inibidor do receptor da interleucina-6, em pacientes com COVID-19 grave (requerendo oxigênio suplementar por cânula nasal ou máscara facial) ou crítico (requerendo maior oxigênio suplementar, ventilação mecânica ou suporte extracorpóreo). - Métodos: -> Ensaio clínico multinacional de fase 3 de 60 dias, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, em 45 hospitais na Argentina, Brasil, Canadá, Chile, França, Alemanha, Israel, Itália, Japão, Rússia e Espanha. -> Incluídos adultos (≥ 18 anos) internados no hospital com infecção pelo SARS-CoV-2 confirmada por laboratório e pneumonia, que necessitaram de suplementação de oxigênio ou tratamento intensivo. -> Os pacientes foram designados aleatoriamente (2:2:1) para receber sarilumabe intravenoso 400 mg, sarilumabe 200 mg ou placebo. -> Pacientes, prestadores de cuidados, avaliadores de resultados e investigadores permaneceram mascarados para a intervenção atribuída ao longo do estudo. - Desfecho primário: tempo para melhora clínica de dois ou mais pontos (escala de sete pontos variando de 1 [morte] a 7 [alta hospitalar]) na população com intenção de tratar modificada. -> Desfecho secundário: proporção de pacientes vivos no dia 29. - Resultados: -> entre 28 de março e 3 de julho de 2020, dos 431 pacientes que foram selecionados, 420 pacientes foram designados aleatoriamente e 416 receberam placebo (n=84 [20%]), sarilumabe 200 mg (n=159 [38%]), ou sarilumabe 400 mg (n=173 [42%]). -> Média de idade 59 (50-68) anos, 63% sexo masculino, IMC ≥ 30 kg/m² em 42%, HAS 43%, DM 26%, doença arterial coronariana 5%, DPOC 4% e doença renal crônica 4%</p>

				<p>-> No dia 29, nenhuma diferença significativa foi observada na média de tempo para a melhora de dois ou mais pontos entre o placebo (12,0 dias [IC 95% 9,0 a 15,0]) e sarilumabe 200 mg (10,0 dias [9,0 a 12,0]; razão de risco [HR]=1,03 [IC95%, 0,75 a 1,40]; log-rank p=0,96) ou sarilumabe 400 mg (10,0 dias [9,0 a 13,0]; HR=1,14 [IC95%, 0,84 a 1,54]; log-rank p=0,34), ou em proporções de pacientes vivos (77 [92%] de 84 pacientes no grupo de placebo; 143 [90%] de 159 pacientes no grupo de sarilumabe 200 mg; diferença -1,7 [-9,3 a 5,8]; p=0,63 vs placebo; e 159 [92%] de 173 pacientes no grupo de 400 mg de sarilumabe; diferença 0,2 [-6,9 a 7,4]; p=0,85 vs placebo).</p> <p>-> No dia 29, havia diferenças numéricas da sobrevivência não significativas entre sarilumabe 400 mg (88%) e placebo (79%; diferença + 8,9% [IC 95% -7,7 a 25,5]; p=0,25) para pacientes com doença crítica.</p> <p>-> Nenhum sinal de segurança inesperado foi visto. As taxas de eventos adversos emergentes do tratamento foram de 65% (55/84) no grupo placebo, 65% (103/159) no grupo sarilumabe 200 mg e 70% (121/173) no grupo sarilumabe de 400 mg, e daqueles que levaram à morte 11% (9/84) no grupo placebo, 11% (17/159) no grupo de sarilumabe 200 mg e 10% (18/173) no grupo de sarilumabe de 400 mg.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Este estudo não mostrou eficácia do sarilumabe em pacientes internados com COVID-19 e recebendo oxigênio suplementar.</p> <p>-> Ensaios com potência adequada de terapias imunomodulatórias direcionadas que avaliam a sobrevida como um desfecho primário são sugeridos em pacientes com COVID-19 crítica.</p>
<p>J Cell Mol Med 04MAR2021</p>	<p>Pulmonary, cardiac and renal distribution of ACE2, furin, TMPRSS2 and ADAM17 in rats with heart failure: Potential implication for COVID-19 disease</p>	<p>Khoury EE et al. Israel. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33660945/</p>	<p>Aumento da ECA2 e furin no coração, pulmão e rim de animais com insuficiência cardíaca: implicações potenciais na COVID-19</p>	<p>- Prévio: A insuficiência cardíaca congestiva (ICC) costuma estar associada à disfunção renal e pulmonar. A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) contribui para a retenção ávida de sódio, hipertrofia cardíaca e formação de edema, incluindo congestão pulmonar.</p> <p>-> Embora o estado dos componentes clássicos do SRAA, como renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensina II (Ang II) e receptor AT-1 da angiotensina II seja bem estudado na ICC, a expressão da enzima conversora de</p>



angiotensina-2 (ECA2), uma enzima chave para a geração da angiotensina 1-7 (Ang 1-7) nos sistemas pulmonar, cardíaco e renal não foi estudada exaustivamente neste cenário clínico. Esta questão é de especial interesse, pois a Ang 1-7 contrabalança as ações vasoconstritoras, pró-inflamatórias e pró-proliferativas da Ang II.

-> Além disso, a ICC predispõe à gravidade da doença COVID-19, enquanto ECA2 também serve como o domínio de ligação do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras humanas e atua em conjunto com a furina, uma enzima importante na síntese de BNP na ICC, além de permeando a funcionalidade viral em conjunto com a TMPRSS2.

-> ADAM17 governa, por sua vez, a eliminação da ECA2 das membranas celulares.

- Objetivo: Investigar a expressão da ECA2, furin, TMPRSS2 e ADAM17 no pulmão, coração e rins de ratos com ICC para entender a suscetibilidade exagerada da ICC clínica à doença COVID-19.

- Métodos:

-> A insuficiência cardíaca foi induzida em ratos Sprague Dawley machos pela criação de uma fístula cirúrgica aorto-cava. Ratos operados de forma simulada serviram como controle.

-> Uma semana após a cirurgia, os animais foram subdivididos em ICC compensada e descompensada de acordo com a excreção urinária de sódio.

-> Ambos os grupos e seus controles foram sacrificados, e seus corações, pulmões e rins foram colhidos para avaliação da remodelação do tecido e imunorreatividade, expressão e coloração imunohistoquímica da ECA2, furin, TMPRSS2 e ADAM17.

-> Métodos da biologia molecular: qPCR, Western blot, imunofluorescência, ELISA

- Resultados:

-> A imunorreatividade da ECA2 e os níveis do mRNA aumentaram nos tecidos pulmonar, cardíaco e renal da ICC compensada, mas não na descompensada.

-> A imunorreatividade da furin foi aumentada na ICC compensada e descompensada nos tecidos pulmonar, cardíaco e córtex renal, mas não na medula.

-> Curiosamente, tanto a expressão quanto

a abundância da TMPRSS2 pulmonar, cardíaca e renal diminuíram na ICC em correlação com a gravidade da doença.

-> Os níveis do mRNA da ADAM17 pulmonar, cardíaca e renal também foram regulados para baixo na ICC descompensada.

-> Os níveis circulantes da furin aumentaram em proporção à gravidade da ICC, enquanto a ECA2 plasmática permaneceu inalterada.

-> Em resumo, ECA2 e furin são superexpressos nos tecidos pulmonar, cardíaco e renal da ICC compensada e, em menor grau, da ICC descompensada, em comparação com o grupo controle.

- Conclusões:

-> A expressão aumentada da ECA2 na insuficiência cardíaca pode servir como um mecanismo compensatório, contrabalançando a hiperatividade da isoforma deletéria, a ECA.

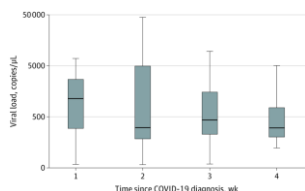
-> A ADAM17 regulada para baixo pode aumentar a ECA2 membranar na doença COVID-19, enquanto a supressão de TMPRSS2 na ICC argumenta contra seu envolvimento na suscetibilidade exagerada de pacientes com ICC ao SARS-CoV2.

-> Seria importante avaliar a expressão da ECA2, TMPRSS2, furin e ADAM17 em diferentes células de cada um dos órgãos estudados.

JAMA
Ophtalmol
04MAR2021

SARS-CoV-2 on Ocular Surfaces in a Cohort of Patients With COVID-19 From the Lombardy Region, Italy

Azzolini C et al. Italy.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33662099/>



Screening do SARS-CoV-2 no *swab* conjunctival

Importância: Desde fevereiro de 2020, a COVID-19 se espalhou rapidamente por todo o mundo, com um cluster epidemiológico na Lombardia, Itália.

-> A comunicabilidade viral pode ser mediada por vários fluidos corporais, mas as informações disponíveis sobre a presença do vírus em lágrimas humanas são insuficientes.

- Objetivos: Investigar a taxa de infecção pelo SARS-CoV-2 em lágrimas coletadas de pacientes com COVID-19 por meio de ensaio em tempo real da reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (rRT-PCR) e avaliar a associação da presença do vírus com condições clínicas concomitantes.

- Métodos:

-> Estudo transversal realizado entre 9 de abril e 5 de maio de 2020.

-> Cenário: UTI do Hospital Azienda Socio-Sanitaria Territoriale (ASST) Sette-Laghi, Universidade de Insubria, em

Varese, Lombardia, Itália.

-> N=91 pacientes com COVID-19 (cl clinicamente diagnosticado por ensaio rRT-PCR em *swabs* nasofaríngeos e por imagem radiológica) realizaram swab conjuntival e posteriormente rRT-PCR.

-> Foram coletados swabs conjuntivais de 17 participantes voluntários saudáveis adicionais sem sintomas de COVID-19 a fim de avaliar a disponibilidade e aplicabilidade do teste de swab conjuntival.

-> Principais desfechos e medidas: os resultados dos *swabs* conjuntival e nasofaríngeo são relatados, bem como dados demográficos e clínicos.

- Resultados:

-> Um total de 108 participantes (média de idade 58,7±14,2 anos; 55 mulheres e 53 homens foram testados para SARS-CoV-2 usando o ensaio rRT-PCR, incluindo 91 pacientes hospitalizados com COVID-19 e 17 eram voluntários saudáveis.

-> SARS-CoV-2 foi encontrado na superfície ocular em 52/91 pacientes com COVID-19 (57,1%; IC95%, 46,3%-7,5%), com uma grande variabilidade na média da carga viral de ambos os olhos. Houve uma grande variabilidade na média da carga viral de ambos os olhos (mediana [intervalo], 284 cópias/μL [29-45000 cópias / μL]).

-> O vírus estava presente em ambos os olhos em 31/52 pacientes. Vários pacientes (22/31 [71%]) tiveram uma ligeira diferença nos valores de carga viral entre os 2 olhos. Uma discrepância nos resultados do *swab* conjuntival no mesmo paciente (ou seja, 1 olho positivo e 1 olho negativo) foi observada em 21/91 pacientes (23,1%); uma carga viral superior a 50 cópias/μL foi detectada em 1 olho. A carga viral mais alta de um único olho (até 90.000 cópias/μL) foi encontrada em pacientes com o vírus detectado em ambos os olhos. O menor valor de carga viral encontrado em pacientes considerados positivos para o *swab* conjuntival (58 cópias/μL) foi encontrado em pacientes nos quais o vírus foi detectado em apenas 1 olho.

-> Numa subpopulação de 41 pacientes, a concordância de 63,0% (IC 95%, 41,0% - 81,0%) foi encontrada entre os resultados positivos do teste de *swabs* conjuntival e nasofaríngeo quando realizados dentro de 2

dias um do outro.
 -> Em 17 desses pacientes, os resultados do *swab* nasofaríngeo foram negativos para SARS-CoV-2. Em 10 desses 17 pacientes, os resultados do *swab* conjuntival foram positivos para o vírus.
 - Conclusões:
 -> Neste estudo, o RNA do SARS-CoV-2 foi encontrado na superfície ocular em grande parte desta coorte de pacientes com COVID-19, embora a infectividade desse material não pudesse ser determinada.
 -> Como os pacientes podem ter resultados de teste positivos com um *swab* conjuntival e resultados negativos com um *swab* nasofaríngeo, o uso do *swab* conjuntival minimamente invasivo pode ser considerado como um teste diagnóstico complementar.

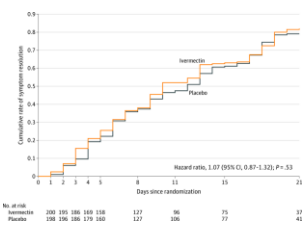
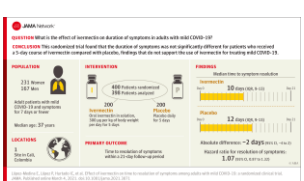
JAMA
04MAR2021

Effect of Ivermectin on Time to Resolution of Symptoms Among Adults With Mild COVID-19: A Randomized Clinical Trial

López-Medina E et al. Colombia.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33662102/>

Ausência de eficácia da Ivermectina

- Prévio: A ivermectina é amplamente prescrita como um tratamento potencial para COVID-19, apesar da incerteza sobre seu benefício clínico.
 - Objetivo: Determinar se a ivermectina é um tratamento eficaz para COVID-19 leve.
 - Métodos:
 -> Ensaio duplo-cego, randomizado, realizado num único local em Cali, Colômbia.
 -> Os participantes potenciais do estudo foram identificados por amostragem aleatória simples do banco de dados eletrônico do departamento de saúde do estado de pacientes com COVID-19 sintomático confirmada em laboratório durante o período do estudo.
 -> Um total de 476 pacientes adultos com doença leve e sintomas por 7 dias ou menos (em casa ou hospitalizados) foram inscritos entre 15 de julho e 30 de novembro de 2020 e acompanhados até 21 de dezembro de 2020.
 -> Intervenção: Os pacientes foram randomizados para receber ivermectina, 300 µg/kg de peso corporal por dia durante 5 dias (n = 200) ou placebo (n = 200).
 - > Desfecho primário: tempo para resolução dos sintomas num período de acompanhamento de 21 dias. Eventos adversos solicitados e eventos adversos graves também foram coletados.
 - Resultados:
 -> Entre 400 pacientes que foram randomizados na população de análise primária (mediana de idade, 37 anos [IQR,



29-48]; 231 mulheres [58%]), 398 (99,5%) completaram o estudo.

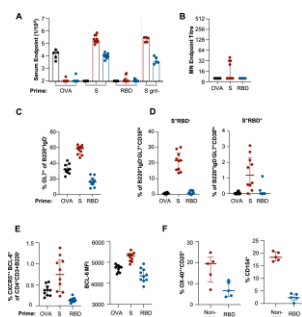
- > Ivermectina (n=200) vs placebo (n=198): obesidade 18,4% vs 19,4%, HAS 14% vs 12,6%, DM 5% vs 6,1%, doença cardiovascular 2% vs 1,5%; todos p>0,05.
- A média de tempo para resolução dos sintomas foi 10 dias (IQR, 9-13) no grupo de ivermectina em comparação com 12 dias (IQR, 9-13) no grupo de placebo (razão de risco para resolução dos sintomas, 1,07 [IC 95%, 0,87 a 1,32]; p=0,53 pelo teste de log-rank).
- > No dia 21, 82% no grupo ivermectina e 79% no grupo de placebo haviam resolvido os sintomas.
- > O evento adverso mais comum foi cefaléia, relatado por 104 pacientes (52%) que receberam ivermectina e 111 (56%) que receberam placebo.
- > O evento adverso sério mais comum foi a falência de vários órgãos, ocorrendo em 4 pacientes (2 em cada grupo).
- Conclusão:
- > Entre os adultos com COVID-19 leve, um curso de ivermectina de 5 dias, em comparação com o placebo, não melhorou significativamente o tempo de resolução dos sintomas.
- > Os resultados não apóiam o uso de ivermectina para o tratamento de COVID-19 leve, embora estudos maiores possam ser necessários para compreender os efeitos da ivermectina em outros resultados clinicamente relevantes.

Nat Commun
03MAR2021

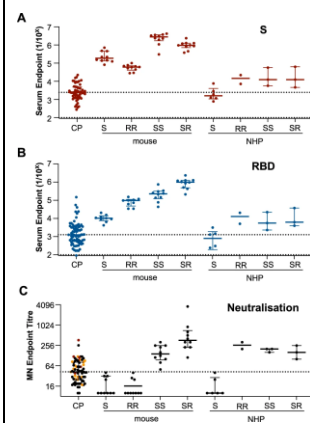
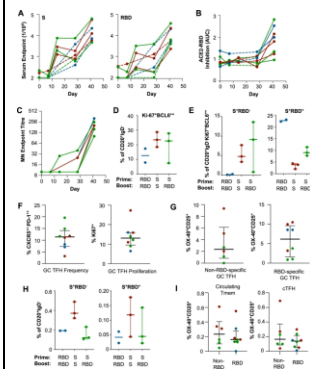
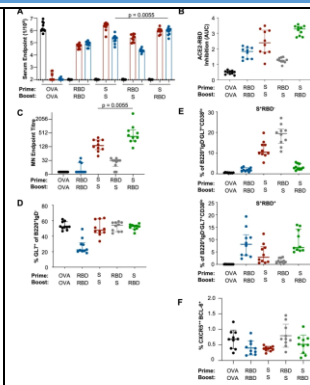
Immunogenicity of prime-boost protein subunit vaccine strategies against SARS-CoV-2 in mice and macaques

Tan HX et al. Australia.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33658497/>

Imunogenicidade das vacinas contendo as proteínas S e RBD em camundongos e macacos



- Prévio: As vacinas contra o SARS-CoV-2 estão avançando em ensaios clínicos em humanos, com ênfase na identificação de altos títulos de anticorpos neutralizantes contra a *spike* viral (S). No entanto, o estabelecimento de estratégias direcionadas para a *spike* viral versus direcionadas para o anticorpo no domínio de ligação ao receptor menor (RBD) não são claros.
- Objetivos: Avaliar as vacinas prototípicas direcionadas para as subunidades S e RBD do SARS-CoV-2 em regimes homólogos ou heterólogos de iniciação-reforço em camundongos e primatas não-humanos. A imunogenicidade primária contra a *spike* e RBD do SARS-CoV-2 foi avaliada em grupos de camundongos C57BL/6 vacinados com imunógenos S, RBD ou ovalbumina controle (OVA).
- > Para avaliar as respostas dos imunógenos direcionados para o RBD versus direcionamento mais holístico para a *spike* de



comprimento total, os camundongos C57BL/6 foram desafiados com S ou RBD e, em seguida, os animais receberam reforço 21 dias depois com imunógenos homólogos ou heterólogos.

- Métodos:

-> Cinco microgramas das proteínas S, RBD ou OVA foram formulados em PBS a uma proporção de 1:1 com adjuvante Addavax (InvivoGen) ou uma proporção de 1: 2 com lipossomas de Monofosforil Lípido A (MPLA) (Polymun).

-> Os camundongos C57BL/6 ou camundongos BALB/c receberam a administração intramuscular da injeção de 50 µL da vacina em cada quadríceps posterior.

-> As principais respostas foram avaliadas 14 ou 28 dias após a imunização primária. As imunizações de reforço foram administradas 3 semanas após o início e as respostas avaliadas 14 ou 28 dias após o reforço.

-> Oito macacos machos (*Macaca nemestrina*) (6-15 anos) foram vacinados com 100 µg do imunógenos da spike ou RBD do SARS-CoV-2 formulados com 200 µg de lipossomas de Monofosforil Lípido A (MPLA) (Polymun) por via intramuscular no quadríceps direito. Vinte e oito dias após o início, imunizações de reforço consistindo em 100 µg dos imunógenos S ou RBD com 200 µg MPLA e 1% de tinta de tatuagem foram administrados por via intramuscular em ambos os quadríceps.

-> Os macacos foram vacinados simultaneamente nos deltóides direito e esquerdo com imunógenos de proteína gp140 do envelope trimérico de HIV (SOSIP) (100 µg) formulado com MPLA e tinta de tatuagem 1,0% (apenas deltóide direito). Os macacos foram necropsiados 14 dias após a administração da vacina de reforço. Vinte e quatro horas antes necropsia, os macacos receberam uma infusão intravenosa de linfócitos T autólogas Vδ2 + Vγ9 + marcados com CellTrace Blue (Life Technologies).

-> Todas as células CellTrace Blue + foram excluídas da análise de citometria de fluxo de populações de linfócitos B ou T.

-> Quantificação da secreção de citocinas induzidas pelos peptídeos.

-> Sequenciamento e análise dos receptores dos linfócitos B.

-> ELISA para detecção dos anticorpos anti-S e anti-RBD do SARS-CoV-2 e para avaliar a capacidade dos anticorpos plasmáticos em bloquear a interação entre a hECA2 e o RBD do SARS-CoV-2.

-> Teste de microneutralização

- Resultados:

-> A proteína *spike* é altamente imunogênica em camundongos, enquanto a imunogenicidade comparativamente baixa do RBD está

associada com a limitação do centro germinativo e da atividade dos linfócitos T foliculares auxiliares.

-> Uma única imunização da *spike* formulada com Addavax (um adjuvante de esqualeno semelhante a MF-59) foi altamente imunogênica, induzindo altos títulos de anticorpo específico anti-*spike* no dia 14 após a imunização (mediana $1,85 \times 10^5$; IQR 1,34-4,61), mas sem induzir atividade de neutralização significativa (Mandolesi M et al, 2020).

-> Em contraste, uma única imunização do RBD induziu anticorpos séricos mínimos, de acordo com outros relatórios de imunogenicidade subótima do RBD em camundongos e estudos recentes de Fase I comparando RBD ou *spike* codificados pelas vacinas baseadas em RNA (Walsh E et al, 2020).

-> Títulos sorológicos comparáveis foram observados se medidos no dia 28 pós-imunização ou se imunógenos SARS-CoV-2 foram formulados com um adjuvante lipossomal alternativo baseado em MPLA (monophosphoryl lipid A).

-> Embora a *spike* seja amplamente glicosilada, limitar a deposição do complexo glicano pela expressão das células HEK293 sem N-acetilglucosaminiltransferase I (S gnt-) não impactou negativamente a imunogenicidade do imunogênico *spike*.

-> O reforço de camundongos S-primed com S ou RBD aumenta significativamente os títulos de neutralização, com o foco em RBD levando a uma melhora moderada na neutralização do soro.

-> Desta forma, para avaliar a eficácia das respostas de anticorpos focados no RBD versus direcionamento mais holístico de toda a proteína S: o imunógeno spike homólogo de iniciação-reforço (S-S) induziu altos títulos do soro recíproco de ambos S- (mediana $2,77 \times 10^6$; IQR 1,71-3,62) e anticorpos específicos para o RBD ($2,28 \times 10^6$; IQR 1,23-3,17). Em contraste com uma dose única do RBD, verificado que a imunização homóloga com RBD prime-boost (R-R) foi capaz de induzir títulos séricos modestos de anticorpos específicos de S- e RBD, sugestivos de linfócitos B de memória induzidas após o RBD-prime. O reforço do RBD prime-S (R-S) induziu títulos igualmente modestos. No entanto, verificado que o reforço de RBD de animais S-primed (S-R) aumentou marcadamente os títulos de anticorpos séricos específicos de RBD 4,2 vezes em relação a S-S ($p = 0,0055$). A inibição da interação ECA2-RBD por anticorpos séricos foi aumentada de forma semelhante no grupo S-R em

comparação com o grupo S-S. O foco seletivo do RBD se traduziu em neutralização sérica aumentada, com S-R provocando atividade 2,5 vezes maior (mediana 361; IQR 226–706) em comparação com S-S (143; IQR 96–254) ($p = 0,0055$). Nem a imunização com R-R nem com R-S induziram de forma confiável atividade neutralizante do soro de forma significativa, embora tenham induzido níveis modestos de anticorpos que bloqueiam o engajamento da ECA2-RBD.

->A capacidade da imunização S-S e S-R de induzir uma ligação potente e respostas neutralizantes em camundongos C57BL/6 foi espelhada em camundongos BALB/c.

-> Apesar da imunogenicidade potencialmente comprometida, o pequeno alvo antigênico do RBD permanece atraente para focar a imunidade em epítomos neutralizantes protetores. No entanto, a recente identificação do domínio N-terminal (NTD) e outros epítomos protetores localizados na proteína *spike* (S) destaca alvos alternativos de anticorpos adicionais para proteção de vacina.

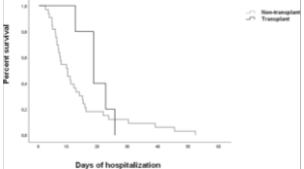
-> Em contraste, as vacinas S e RBD foram comparativamente imunogênicas em macacos, provocando atividade sorológica neutralizante que geralmente excede os níveis em humanos convalescentes.

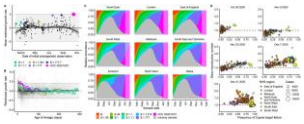
-> Nos macacos, as respostas robustas dos linfócitos B do centro germinativo (CG; CD20 + IgD-Ki-67 + BCL-6 +) foram eliciadas em todos os animais imunizados com S-S (23,4%, intervalo 18,5–28,7) e S-R (22,6%, intervalo 7,5–27,8), exibindo frequências do CG mais altas em relação aos animais imunizados R-R (12,6%, intervalo 7,86–17,4).

-> A frequência dos dos linfócitos TFH (*T follicular helper*) do CG (CD3 + CD4 + CXCR5 ++ PD-1 ++) também foi detectada em todos os linfonodos (11,4% do total dos linfócitos T CD4 + LN), com uma média de 13% exibindo proliferação recente conforme medido pela expressão de Ki-67.

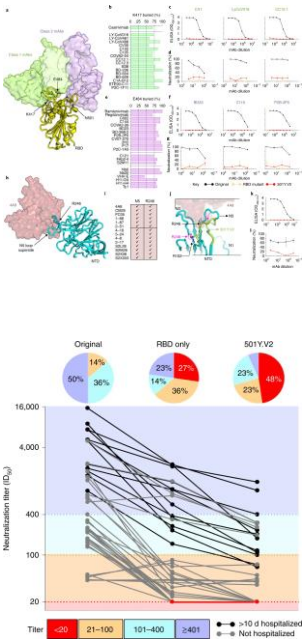
-> A elicitação de populações de linfócitos de memória é um objetivo fundamental para vacinas protetoras. Linfócitos B de memória específicas da S e RBD circulantes (CD20 + IgD-) foram avaliadas em PBMCs. Os linfócitos B de memória específica da S foram mais altas nos animais imunizados com S-S (0,37%, faixa de 0,32–0,49) e frequências aproximadamente equivalentes em R-R (0,1925%, faixa de 0,192–0,193) e S-R (0,12%, faixa de 0,11–0,23).

-> Em contraste, os linfócitos B de memória específicos do RBD foram detectados com menos frequência em geral, ou seja, animais S-S (0,12%, intervalo 0,04–0,18) exibindo o nível mais alto, seguido pelo S-R (0,04%, intervalo

			<p>0,02–0,14) e R-R (0,04%, intervalo 0,02–0,06). - Conclusões: -> O estudo confirma as proteínas <i>spike</i> recombinantes como candidatas a vacinas promissoras e destacam várias vias para alcançar uma neutralização sorológica potente.</p>
<p>PloSOne 03MAR2021</p>	<p>A propensity score-matched analysis of mortality in solid organ transplant patients with COVID-19 compared to non-solid organ transplant patients</p>	<p>Linares L et al. Spain. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33657157/</p> 	<p>Trasplante de órgãos sólidos não é fator de risco paa os desdechos</p> <p>- Objetivo: Analisar a epidemiologia, as características clínicas, os fatores de risco para mortalidade e o impacto da COVID-19 nos resultados de receptores de transplante de órgãos sólidos (SOT) em comparação com uma coorte de pacientes não transplantados, avaliando se o transplante pode ser considerado um fator de risco para mortalidade. - Métodos: -> De março a maio de 2020, 261 pacientes hospitalizados com pneumonia COVID-19 foram avaliados, incluindo 41 receptores de SOT. -> Destes, trinta e dois eram receptores de rim (78%), 4 de fígado (10%), 3 de coração (7%) e 2 transplantes combinados de rim-fígado (5%). -> Mediana de tempo desde o transplante até o diagnóstico de COVID-19: 6 anos (variação, 1-21 anos). - Resultados: -> Medina de idade 58 (33-8) anos; 66% homens; HAS 81%, DM 83%, doença cardiovascular 24%, DPOC 20%, doença renal crônica 34%. -> N=13 receptores de SOT (32%) necessitaram de internação na UTI e 5 pacientes morreram (12%). -> Usando uma análise de correspondência de escore de propensão, não foram encontradas diferenças significativas entre os receptores de SOT e os pacientes não transplantados em relação à necessidade de oxigênio (44% vs 59%), necessidade de ventilação mecânica (17% vs 20%) e mortalidade (12% vs 15%). -> Idade mais avançada (OR=1,142; IC95%, 1,08-1,197]) níveis mais elevados de proteína C reativa (OR=3,068; IC95%, 1,22-7,71]) e níveis de creatinina sérica na admissão (OR=3,048, IC95%, 1,22 -7,57]) foram associados a maior mortalidade. -> Os resultados clínicos da infecção por SARS-CoV-2 na coorte de receptores de SOT parecem ser semelhantes aos observados na população não transplantada. - Conclusão:</p>

				<p>-> Idade avançada, níveis mais elevados de proteína C reativa e creatinina sérica foram associados a maior mortalidade, enquanto o transplante de órgãos sólidos <i>per se</i> não foi associado a piores desfechos.</p>
<p>Science 03MAR2021</p>	<p>Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England</p>	<p>Davies NG et al. UK, USA & Belgium. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33658326/</p> 	<p>Variante B.1.1.7 do SARS-CoV-2 no Reino Unido: maior transmissibilidade</p>	<p>- Prévio: Uma nova variante do SARS-CoV-2, VOC 202012/01 (variante B.1.1.7), surgiu no sudeste da Inglaterra em novembro de 2020 e está se espalhando rapidamente em direção à fixação.</p> <p>-> Características da variante: A VOC 202012/01 é definida por 17 mutações (14 mutações pontuais não sinônimas e 3 deleções), das quais oito estão na proteína spike, que medeia a adesão e a entrada do SARS-CoV-2 nas células humanas. Pelo menos três mutações afetam potencialmente a função viral. A mutação N501Y é um resíduo de contato chave no domínio de ligação ao receptor (RBD) e aumenta a afinidade de ligação do vírus à ECA2. A mutação P681H está imediatamente adjacente ao local de clivagem da furina no pico, uma região conhecida de importância para infecção e transmissão. A deleção ΔH69/ΔV70 na <i>spike</i> surgiu em várias linhagens independentes do SARS-CoV-2, está ligada ao escape imunológico em pacientes imunocomprometidos e aumenta a infectividade viral in vitro. Essa deleção também é responsável pelo achado de que certos kits de teste comerciais não detectam o gene da glicoproteína <i>spike</i>.</p> <p>- Métodos e Resultados:</p> <p>-> Usando uma variedade de abordagens de modelagem estatística e dinâmica, estimado que essa variante tenha um número de reprodução 43-90% (IC95%, 38-130%) maior do que as variantes preexistentes.</p> <p>-> Um modelo de transmissão dinâmica de duas deformações ajustado mostra que VOC 202012/01 levará a grandes ressurgimentos de casos de COVID-19.</p> <p>-> Sem medidas de controle rigorosas, incluindo o fechamento limitado de instituições educacionais e estabelecimento de programas de vacina muito acelerado, as hospitalizações e mortes pela COVID-19 em toda a Inglaterra em 2021 excederão as de 2020.</p> <p>-> De forma preocupante, COV 202012/01 se espalhou globalmente e exibe uma transmissão semelhante aumento (59-74%)</p>

<p>Gastroenterology 03MAR2021</p>	<p>Intestinal host response to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 outcomes in patients with gastrointestinal symptoms</p>	<p>Livanos AE et al. USA. Italy & Spain. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33676971/</p>  <p>Supplementary Figure 14. Nausea and vomiting were associated with reduced mortality and severity. Kaplan-Meier curves for mortality stratified by (A) nausea and (B) vomiting for patients in the Discovery Cohort. P-values from log-rank test and 95% confidence intervals of Kaplan-Meier curves are shown. Below each Kaplan-Meier, the number of patients at risk for different time points are reported.</p>	<p>Sintomas gastrointestinais estão associados ao melhor desfecho na COVID-19</p> <p>na Dinamarca, Suíça e Estados Unidos.</p> <p>- Prévio: Considerando que os sintomas gastrointestinais (GI) são uma manifestação extrapulmonar proeminente da COVID-19, foi investigada a infecção intestinal pelo SARS-CoV-2, seu efeito na patogênese e significado clínico.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Tecidos de biópsia intestinal humana foram obtidos de pacientes com COVID-19 (n=19) e controles não infectados (n=10) para exame microscópico, análises de CyTOF e sequenciamento de RNA.</p> <p>-> Além disso, a gravidade da doença e a mortalidade foram examinadas em pacientes com e sem sintomas gastrointestinais em duas grandes coortes independentes de pacientes hospitalizados nos Estados Unidos (n=634) e na Europa (n=287) usando regressões logísticas multivariadas.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> Coorte de 634 pacientes: média de idade 64±15,7 anos, 58,2% sexo masculino, 36,1% DM, 22,2%. Obesidade 37,1%, DPOC 9,3%, doença cardíaca 17,5%; doença leve 8,5%, doença moderada 56,9%, doença grave 24,9%, doença crítica 9,6%; admissão UTI 17,4%, mortalidade 23,8%; sintomas GI – náusea 24,8%, vômito 12,9%, diarreia 38,6%, qualquer sintoma GI 47,2%</p> <p>-> Os casos e controles COVID-19 na coorte de biópsia foram comparáveis para idade, sexo, taxas de hospitalização e comorbidades relevantes.</p> <p>-> SARS-CoV-2 foi detectado nas células epiteliais do intestino delgado por coloração de imunofluorescência ou microscopia eletrônica, em 14 dos 16 pacientes estudados. Análises de alta dimensão dos tecidos GI revelaram baixos níveis de inflamação, incluindo regulação negativa dos principais genes inflamatórios, incluindo IFNG, CXCL8, CXCL2 e IL1B e frequências reduzidas de células dendríticas pró-inflamatórias em comparação com os controles.</p> <p>-> Consistente com esses achados, encontrada redução significativa na gravidade da doença e mortalidade em pacientes que apresentavam sintomas gastrointestinais que eram independentes de sexo, idade e doenças comórbidas e apesar de cargas virais de SARS-CoV-2</p>
---------------------------------------	---	---	---

			<p>nasofaríngeas semelhantes.</p> <p>-> Além disso, houve redução dos níveis de proteínas inflamatórias essenciais (IL-6, IL-8, TNF-α e IL-1β) na circulação em pacientes com sintomas gastrointestinais.</p> <p>- Conclusão:</p> <p>-> Esses dados destacam a ausência de uma resposta pró-inflamatória no trato GI, apesar da detecção do SARS-CoV-2. Paralelamente, foi observada redução da mortalidade em pacientes com COVID-19 apresentando sintomas gastrointestinais.</p> <p>-> Um papel potencial do trato GI na atenuação da inflamação associada ao SARS-CoV-2 precisa ser examinado mais detalhadamente</p>																				
<p>Nat Med 02MAR2021</p>	<p>SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma</p>	<p>Wibmer CK et al. South Africa https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33654292/</p>  <p>The figure includes a 3D protein structure of the SARS-CoV-2 spike protein, a grid of neutralization titration curves for various samples, and a summary pie chart and line graph. The pie chart compares neutralization titers for Original, RBD only, and 501YV2 variants. The line graph shows neutralization titer (ID₅₀) for individual samples, with a legend indicating hospitalization status and titer ranges.</p> <table border="1"> <caption>Neutralization Titer (ID₅₀) Summary</caption> <thead> <tr> <th>Variant</th> <th><20</th> <th>21-100</th> <th>101-400</th> <th>>401</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Original</td> <td>14%</td> <td>50%</td> <td>36%</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>RBD only</td> <td>23%</td> <td>14%</td> <td>36%</td> <td>27%</td> </tr> <tr> <td>501YV2</td> <td>23%</td> <td>22%</td> <td>48%</td> <td>0%</td> </tr> </tbody> </table>	Variant	<20	21-100	101-400	>401	Original	14%	50%	36%	0%	RBD only	23%	14%	36%	27%	501YV2	23%	22%	48%	0%	<p>Linagem SARS-CoV-2 501Y.V2 escapa da neutralização</p> <p>- Prévio SARS-CoV-2 501Y.V2 (B.1.351), uma nova linhagem da coronavírus causando COVID-19, contém substituições em dois domínios imunodominantes da proteína <i>spike</i>.</p> <p>-> Esta linhagem é definida por nove mudanças na proteína <i>spike</i> em relação à linhagem Wuhan-1 D614G que anteriormente dominava na África do Sul. Essas alterações incluem N501Y, que confere afinidade aumentada para ECA2 e grupos de substituições em duas regiões imunodominantes da <i>spike</i>, sugerindo fuga da neutralização. De fato, as substituições em E484 reduzem a sensibilidade de neutralização ao plasma convalescente.</p> <p>- Objetivo: Comparar a neutralização por anticorpos monoclonais e plasma convalescente de 501Y.V2 com Wuhan-1 D614G, usando um ensaio de neutralização de lentivírus com pseudotipagem da <i>spike</i>.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> Uma análise de 17 estruturas de anticorpos de classe I revelou que seus epítomos estavam centrados no resíduo da spike K417, uma das três substituições no RBD da linhagem 501Y.V2. Esses anticorpos contatam 60-100% da área de superfície acessível da cadeia lateral do resíduo K417, incluindo ligações de hidrogênio importantes neste local. Três anticorpos representativos (CA1, LyCOV016 e CC12.1) foram avaliados por ELISA e alcançaram ligação saturada a RBD recombinante da linhagem original, mas não 501Y.V2 RBD. Da mesma forma, todos os três anticorpos neutralizaram potentemente a linhagem original, mas não o pseudovírus 501Y.V2 (a 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$),</p>
Variant	<20	21-100	101-400	>401																			
Original	14%	50%	36%	0%																			
RBD only	23%	14%	36%	27%																			
501YV2	23%	22%	48%	0%																			

confirmando a dependência do resíduo K417.

-> Uma análise estrutural de 15 anticorpos de classe 2 e 6 nanocorpos revelou interações importantes com o resíduo de spike E484. Cada um contactou 40-100% da área de superfície acessível da cadeia lateral E484 e formou ligações de hidrogênio críticas ou interações carregadas neste local. Tal como acontece com os anticorpos de classe 1, três anticorpos de classe 2 representativos falharam em se ligar a 501Y.V2 RBD e foram incapazes de neutralizar o pseudovírus 501Y.V2. Assim, a linhagem SARS-CoV-2 501Y.V2 escapou efetivamente de duas classes principais de anticorpos neutralizantes que alvejam um sítio imunodominante altamente antigênico no RBD da proteína *spike*.

-> Em seguida, foi avaliado o efeito das substituições da *spike* 501Y.V2 no plasma/soro policlonal derivadas de indivíduos com infecção pelo SARS-CoV-2 confirmada pela PCR, incluindo indivíduos que foram hospitalizados com COVID-19 grave. As amostras foram divididas em dois grupos, metade com anticorpos neutralizantes de título mais alto (22 de 44, diluição inibitória de 50% (ID_{50}) > 400) e metade com títulos mais baixos (22 de 44, $400 \geq ID_{50} > 25$) para o SARS-CoV original D614G. Consistente com estudos anteriores, quando estratificados pela gravidade da doença, os indivíduos convalescentes que relataram doença leve a moderada desenvolveram títulos de anticorpos neutralizantes substancialmente mais baixos (título ID_{50} médio 488, n=30) do que os indivíduos gravemente enfermos das coortes hospitalizadas (título ID_{50} médio 4.212, n=14).

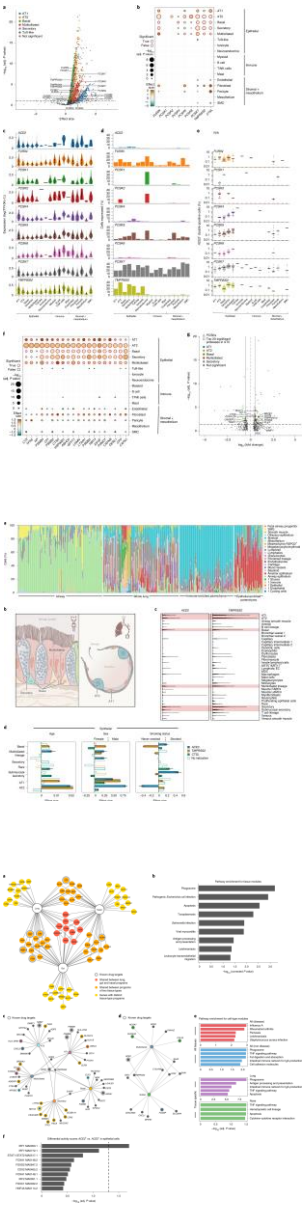
-> Quando essas mesmas amostras foram avaliadas contra o pseudovírus 501Y.V2, quase metade (21 de 44, 48%) não tinha atividade de neutralização detectável (e 71% tinha $ID_{50} < 100$). Apenas três amostras (7%) retiveram títulos de $ID_{50} > 400$. Notavelmente, essas três amostras foram obtidas de indivíduos que relataram doença grave e tinham os títulos de neutralização mais altos contra o vírus original. Por outro lado, quatro amostras com neutralização limítrofe do vírus

original não foram afetadas pelas substituições 501Y.V2, talvez representando especificidades adicionais menos potentes. Para definir a localização das substituições de escape dominantes, a neutralização também foi avaliada contra o pseudovírus quimérico RBD contendo apenas três substituições 501Y.V2 (K417N, E484K e N501Y). Perda substancial de neutralização também foi observada contra o mutante apenas para RBD, com 27% das amostras perdendo toda a atividade contra os mutantes triplos RBD (63% tinham $ID_{50} < 100$) e apenas 23% retendo títulos mais altos de $ID_{50} > 400$. Estes dados fornecem mais evidências para a predominância de anticorpos neutralizantes de classe 1 e classe 2 em soros policlonais; no entanto, as diferenças na neutralização entre a quimera apenas com RBD e 501Y.V2 também destacam a contribuição das substituições 501Y.V2 NTD (L18F, D80A, D215G e $\Delta 242-244$) para o escape da neutralização. Isto foi particularmente evidente em amostras de títulos mais elevados, que mantiveram um título ID_{50} médio de 680 contra o mutante isolado do RBD.

-> A esmagadora maioria dos anticorpos monoclonais já a caminho para serem licenciados não contemplam as mutações-alvo K417 ou E484 e, portanto, provavelmente serão fúteis contra 501Y.V2. Além disso, as variantes emergentes podem limitar o uso de anticorpos neutralizantes recentemente identificados que têm como alvo o supersítio NTD N5-loop. Alguns desses anticorpos monoclonais já receberam autorização de uso de emergência nos Estados Unidos (Regeneron Pharmaceuticals e Eli Lilly and Company), incluindo anticorpos ineficazes contra 501Y.V2 (como REGN10933 e LY-CoV555), bem como anticorpos com probabilidade de reter a neutralização desta variante (REGN10987 e VIR-7831), alguns dos quais estão sendo projetadas para potencializar a função dos linfócitos T específicas para o vírus (VIR-7832).

- Conclusões:

-> O pseudovírus que expressa a proteína spike 501Y.V2 escapa completamente de três classes de anticorpos terapeuticamente relevantes.

			<p>-> Este pseudovírus também exibe um escape substancial a completo da neutralização, mas não se liga ao plasma convalescente.</p> <p>-> Esses dados destacam a perspectiva de reinfeção com variantes antigenicamente distintas e prenunciam a eficácia reduzida das vacinas baseadas na spike.</p>
<p>Nat Med 02MAR2021</p>	<p>Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics</p>	<p>Muus C et al. USA, Germany, UK, Sweden, France, South Africa, The Netherlands. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33654293/</p> 	<p>Sequenciamento de célula única para ECA2, TMPRSS2 e CTSL: impacto na COVID-19</p> <p>- Prévio: A enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e proteases acessórias (TMPRSS2 e CTSL) são necessárias para a entrada celular do SARS-CoV-2 e sua expressão pode lançar luz sobre o tropismo viral e o impacto em todo o corpo.</p> <p>- Objetivo: Avaliar a expressão específica ao nível celular da ECA2, TMPRSS2 e CTSL em 107 estudos de sequenciamento de RNA de célula única de diferentes tecidos.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> ECA2, TMPRSS2 e CTSL são coexpressos em subconjuntos específicos de células epiteliais respiratórias nas passagens nasais, vias aéreas e alvéolos, e em células de outros órgãos associados à transmissão ou patologia da COVID-19.</p> <p>-> Realizada uma meta-análise de 31 estudos de sequenciamento de RNA de célula única de pulmão com 1.320.896 células de 377 amostras de parênquima nasal, das vias aéreas e do pulmão de 228 indivíduos.</p> <p>-> Observadas associações específicas do tipo de célula em relação à idade, sexo e tabagismo com os níveis de expressão da ECA2, TMPRSS2 e CTSL.</p> <p>-> A expressão dos fatores de entrada aumentou com a idade e nos homens, incluindo nas células secretoras das vias aéreas e nas células alveolares do tipo 2.</p> <p>-> Os níveis da ECA2 foram maiores em fumantes anteriores ou atuais nas células secretoras basais e submucosas, e menores nas células AT2. A análise de dados da RNA-seq em massa de escovações brônquicas indicou uma regulação positiva da ECA2 e TMPRSS2 em fumantes atuais em comparação com ex-fumantes. Além disso, evidenciado aumento da expressão da ECA2 com a idade e em homens em células multiciliadas.</p> <p>-> Os programas da expressão compartilhados pelas células ECA2⁺ TMPRSS2⁺ nos tecidos nasais, pulmonares</p>

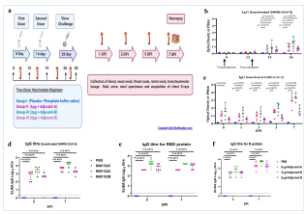
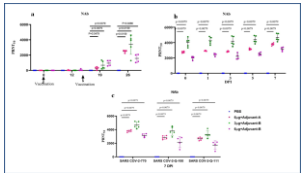
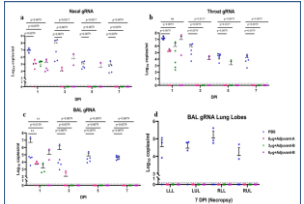
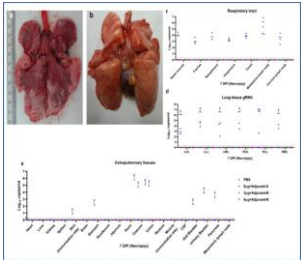
e intestinais incluíram genes que podem mediar a entrada viral, funções imunológicas essenciais e cross-talk epitelial-macrófago, como genes envolvidos na expressão da interleucina-6, interleucina-1, fator de necrose tumoral e fatores do complemento.

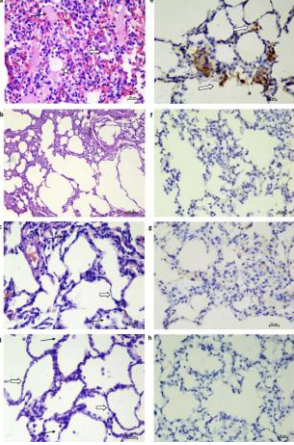
-> -> A subfração de células ECA2⁺ TMPRSS2⁺ foram encontradas principalmente em células epiteliais e em relação aos órgãos, em ordem decrescente no íleo> fígado> pulmão> epitélio nasal>bexiga>testículo>próstata>rins> mamas > cérebro.

-> O SARS-CoV-2 infecta células na ausência da TMPRSS2, portanto, proteases adicionais provavelmente desempenham papéis na clivagem proteolítica de proteínas virais para entrada e saída. Para prever tais proteases, foi verificada a coexpressão da ECA2 com cada um dos 625 genes de protease humana.

-> A TMPRSS2 foi significativamente co-expressa em vários tipos de células epiteliais pulmonares, assim como vários membros da família da pró-proteína convertase subtilisina kexina (PCSK), incluindo FURIN, PCSK2, PCSK5, PCSK6 e PCSK7 nas células AT2. De modo importante, as pró-proteínas convertases têm papéis conhecidos na iniciação da proteína S do coronavírus.

-> Os programas de tecido foram enriquecidos em vias relacionadas à infecção viral e resposta imune, incluindo a estrutura do fagossoma, processamento e apresentação de antígenos e apoptose. Estes incluíram CEACAM5 (programas de pulmão, nasal e intestino) e CEACAM6, fatores de fixação de superfície para a proteína S do coronavírus; SLPI (pulmão e nasal); PIGR (pulmão e intestino; pode promover aumento dependente de anticorpos via IgA44); e CXCL17 (pulmão e nasal). Os programas de tecido também tinham genes associados a vias metabólicas de colesterol e lipídios e endocitose (DHCR24, LCN2 e FASN), vias do complexo principal de histocompatibilidade I e II46, preparação contra lesão celular (interferons; RNase extracelular: PLAC8 e TXNIP), complemento (C3 e C4BPA), modulação imunológica (BTG1) e junções estreitas (DST, CLDN3 e CLDN4).

			<p>- Conclusões: -> Os padrões de expressão específicos do tipo de célula podem contribuir para a patogênese da COVID-19, de modo que o trabalho destaca possíveis vias moleculares para intervenção terapêutica.</p>
<p>Nat Commun 02MAR2021</p>	<p>Immunogenicity and protective efficacy of inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidate, BBV152 in rhesus macaques</p>	<p>Yadav PD et al. India. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33654090/</p>    	<p>Resultado pré-clínico da eficácia da vacina com vírus inativado (BBV152) produzida na Índia</p> <p>- Prévio: A pandemia COVID-19 é uma crise de saúde global que representa um grande desafio para o sistema de saúde pública dos países afetados. Vacinas seguras e eficazes são necessárias para superar esta crise. - > Objetivo: Desenvolver e avaliar a eficácia protetora e imunogenicidade da vacina inativada contra SARS-CoV-2 em macacos rhesus. - Métodos: -> N=20 macacos foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada. Um grupo recebeu um placebo, enquanto três grupos foram imunizados com três vacinas candidatas diferentes de BBV152 em 0 e 14 dias, por via intramuscular, na região deltóide. -> Todos os macacos foram desafiados com SARS-CoV-2 quatorze dias após a segunda dose. -> Avaliados os títulos de anticorpos anti-SARS-CoV-2 imunoglobulina G (IgG) e anticorpos neutralizantes (NAb) das amostras de soro durante a fase de imunização em 0, 12, 19, 26 e 28 dias e após a infecção por SARS-CoV-2 em 0, 1, 3, 5 e 7 dias após a infecção (DPI) -> Produção da vacina BBV152: O vírus foi inativado com β-propiolactona na proporção de 1: 2500 a 2–8 ° C por 24–32h. Três formulações de vacinas candidatas SARS CoV-2 inativadas foram preparadas com dois adjuvantes (A e B): Algel 1 (gel de hidróxido de alumínio) e Algel 2 (imidazoquinolina, agonista aTLR7/TLR8 adsorvido em gel de hidróxido de alumínio). Neste estudo, foi definido Algel 1 como Adjuvante A e Algel 2 como adjuvante B. A imunogenicidade preliminar e o estudo de segurança de BBV152 com Algel 1 e Algel 2, em várias doses de 3, 6 e 9 µg, foram realizados em camundongos, ratos e coelho model (Ganneru et al, 2020). Com base nas observações deste estudo, três formulações candidatas (6 µg + Algel 1 (BBV152A), 3 µg + Algel 2 (BBV152B) e 6 µg + Algel 2 (BBV152C)) foram escolhidas. Algel 2 foi</p>

			<p>encontrado induzindo altos títulos de NAb e imunidade robusta de células T. Além disso, essas três formulações candidatas foram estudadas quanto à sua eficácia protetora contra SARS-CoV-2 em modelo de hamster sírio e todas as candidatas foram consideradas imunogênicas e protetoras (Mohandas S et al, 2021).</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> Vinte animais adultos com idades entre 3–12 anos foram divididos em quatro grupos de cinco animais (3 M, 2 F): grupo placebo, grupos II, III e IV. O grupo placebo recebeu solução salina de tampão fosfato (PBS), os grupos II, III e IV foram imunizados com formulações de candidatas à vacina SARS-CoV-2 inativada purificada: 6 µg + adjuvante-A, 3 µg + banda adjuvante 6 µg + adjuvante -B, respectivamente.</p> <p>-> A resposta protetora foi observada com o aumento da IgG específica para SARS-CoV-2 e títulos de anticorpos neutralizantes a partir da 3ª semana pós-imunização.</p> <p>-> A eliminação viral foi observada a partir do fluido de lavagem broncoalveolar, <i>swab</i> nasal, <i>swab</i> orofarínge e tecidos pulmonares 7 dias após a infecção nos grupos vacinados.</p> <p>-> Nenhuma evidência de pneumonia foi observada por exame histopatológico nos grupos vacinados, ao contrário do grupo placebo que exibiu pneumonia intersticial e localização de antígeno viral no epitélio alveolar e macrófagos por imunohistoquímica.</p> <p>-> Esta vacina candidata BBV152 concluiu os ensaios clínicos de Fase I/II (NCT04471519) na Índia e está atualmente na fase III.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Os dados deste estudo comprovam a imunogenicidade e a eficácia protetora das vacina candidatas BBV152.</p>
<p>Respir Care 02MAR2021</p>	<p>Prone Positioning in Spontaneously Breathing Subjects With Moderate or Severe ARDS During Invasive Ventilation</p>	<p>Wiaert A et al. Belgium. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33653912/</p>	<p>Melhora da oxigenação com o posicionamento prono (PP)</p> <p>-Prévio: O posicionamento prono (PP) durante a ventilação mecânica invasiva melhora os resultados de pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) grave. Estudos recentes sugerem que o PP em pacientes com respiração espontânea, não intubados e com insuficiência respiratória aguda, é bem tolerada e melhora a oxigenação.</p> <p>-> No entanto, pouco se sabe a respeito da</p>

ventilação desencadeada pelo paciente em pacientes intubados com SDRA submetidos ao PP.

- Ojetivo: Métodos: Realizar uma revisão retrospectiva da experiência com a colocação de pacientes na posição prona em 2 coortes de indivíduos com SDRA moderada e grave (ou seja, uma coorte com SDRA relacionada à COVID-19, a outra com SDRA não relacionada à COVID-19), muitos dos quais estavam recebendo ventilação de suporte de pressão (PSV).

- Métodos:

-> Análise retrospectiva numa UTI mista com 22 leitos. Os indivíduos incluídos na análise tinham ≥ 18 anos de idade, atendiam à definição de Berlim para SDRA moderada ou grave (relacionada ou não à COVID-19) e foram submetidos ao PP durante a ventilação invasiva.

- Resultados:

-> N=39 indivíduos foram incluídos na análise: 20 tinham SDRA relacionada à COVID-19, enquanto 19 tinham SDRA relacionada a outras etiologias.

-> Um total de 113 episódios de PP foram analisados: 84 durante a PSV e 29 durante a ventilação mandatória contínua com controle de volume.

-> PP durante PSV foi bem tolerado e foi eficaz em melhorar a oxigenação arterial (ou seja, um aumento da mediana da $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ de 100 mm Hg [IQR, 75-120] antes da PP para 135 mm Hg [IQR, 111-161] no final da sessão PP, $p < 0,0001$).

-> Nenhuma diferença significativa entre ventilação mandatória contínua e PSV foi observada em relação à oxigenação arterial durante o PP.

-> Em comparação com o modo de ventilação mandatória contínua, PP durante PSV foi associada a uma diminuição significativa no uso de agentes bloqueadores neuromusculares (4% vs 69% dos indivíduos, $p < 0,001$), enquanto as necessidades de sedativos permaneceram inalteradas.

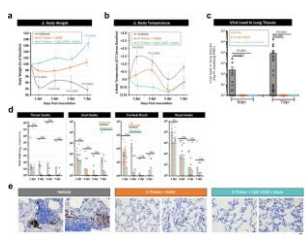
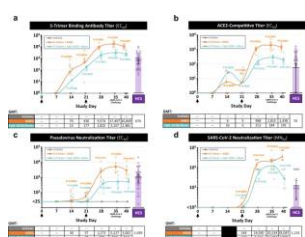
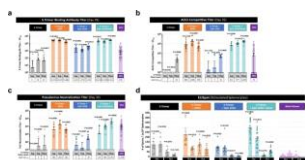
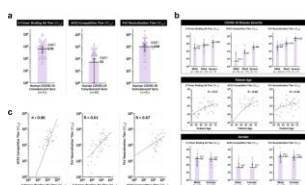
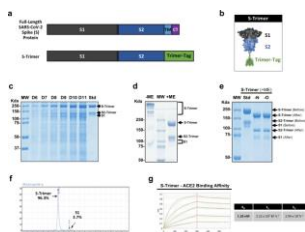
- Conclusões:

-> Numa análise retrospectiva de indivíduos consecutivos intubados com SDRA moderada ou grave, relacionada ou não à COVID-19, a respiração espontânea durante o PP foi bem tolerado e obteve melhora significativa na oxigenação arterial.

Nat Commun
01MAR2021

S-Trimer, a COVID-19 subunit vaccine candidate, induces protective immunity in nonhuman primates

Liang JG et al. China.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33649323/>



Vacina S-Trimer: eficácia nos estudos pré-clínicos em camundongos e macacos

- Prévio: O SARS-CoV-2 é a causa subjacente da pandemia COVID-19.

-> Como a maioria dos vírus de RNA com envelope (como o RSV, HIV e influenza), o SARS-CoV-2 usa um antígeno de superfície homotrimérico para entrar nas células hospedeiras.

- Objetivo: Descrever a S-Trimer, uma vacina candidata da subunidade trimérica do SARS-CoV-2 com base na tecnologia Trimer-Tag.

- Métodos:

-> Para expressar rapidamente o antígeno S-Trimer, foi utilizada a tecnologia Trimer-Tag: o cDNA que codifica o ectodomínio da proteína spike (S) do SARS-CoV-2 do tipo selvagem foi subclonado no vetor de expressão de mamífero pTRIMER para permitir a fusão in-frame com Trimer-Tag, que é capaz de auto-trimerização via ligações dissulfeto.

-> Após a transfecção estável em células CHO, triagem subsequente para clones de produção de alto título e otimização do processo extensivo, um processo de cultura de células sem soro em lote alimentado em biorreator foi desenvolvido levando a expressão de alto nível de S-Trimer como uma proteína secretada um título de ~ 500 µg/l.

-> Para obter S-Trimer em uma forma altamente purificada para estudos de vacinas, foi desenvolvido um esquema de purificação por afinidade, aproveitando a alta afinidade de ligação entre Trimer-Tag e Endo180, um receptor de colágeno capaz de se ligar à região C-terminal do procolágeno Tipo 1 e para o colágeno maduro; a proteína de fusão Endo180-Fc foi carregada numa coluna de proteína A e capturada pelas resinas via ligação de alta afinidade entre a proteína A e o domínio Fc de IgG1 humano de Endo180-Fc; em seguida, meio de cultura de células sem soro contendo S-Trimer secretado por células CHO foi carregado na coluna da proteína A com Endo180-Fc pré-capturado; depois de lavar quaisquer proteínas da célula hospedeira contaminantes não ligadas (HCP) e outras impurezas, o S-Trimer ligado foi purificado até quase homogeneidade em uma única etapa usando eluição de sal moderada, condições que não se dissociam Endo180-Fc da coluna da proteína A; S-Trimer foi ainda purificada através de baixo pH para inativação viral preventiva (VI), cromatografia de troca aniônica para remover o DNA da célula hospedeira e quaisquer endotoxinas residuais, nanofiltração como uma etapa de remoção viral preventiva (VR) e finalmente UF/DF para concentrar S-Trimer para a concentração desejada no tampão de formulação para obter a substância ativa do fármaco do candidato a vacina de subunidade S-Trimer; a análise de

estabilidade do S-Trimer purificado indica que o S-Trimer é estável em formulações de solução líquida a 2–8 ° C por pelo menos 6 meses; estudos de estabilidade de longo prazo estão em andamento.

-> O S-Trimer foi usado como um antígeno para detectar a presença de anticorpos de ligação à proteína *spike* do SARS-CoV-2 e anticorpos ACE2-competitivos em 41 amostras de soros convalescentes humanos coletados de pacientes COVID-19 recuperados: altos níveis de anticorpo de ligação S-Trimer (GMT: 670) e títulos ECA-2 competitivos (GMT: 55) foram detectados nos soros convalescentes, bem como altos títulos de anticorpos neutralizantes usando um ensaio de neutralização de pseudovírus (GMT: 1.039).

-> Os anticorpos de ligação ao S-Trimer não foram detectados no soro de voluntários humanos naïve, enquanto os anticorpos que se ligam à hemaglutinina (HA)-Trimers da influenza foram detectados em ambos os soros convalescentes COVID-19 e soros naïve, implicando em infecção prévia por influenza em todos os indivíduos testados, mas apenas na infecção pelo SARS-CoV-2 nos indivíduos convalescentes COVID-19. -> Estes resultados suportam a especificidade do ensaio e demonstram a capacidade do S-Trimer em detectar anticorpos específicos da proteína *spike* do SARS-CoV-2 em soros convalescentes, confirmando ainda a conformação do tipo nativo do antígeno *spike* no S-Trimer.

-> Imunogenicidade da S-Timer em camundongos BALB/c: os camundongos foram vacinados por via intramuscular duas vezes em um regime de iniciação-reforço de duas doses (Dias 0 e 21) com S-Trimer sem adjuvante ou com vários adjuvantes, incluindo AS03, CpG 1018 e CpG 1018 mais alúmen.

- Resultados:

-> A imunização da S-Trimer com o adjuvante AS03 (emulsão de óleo em água) ou CpG 1018 (agonista do TLR9 [toll-like receptor-9]) mais adjuvantes de alúmen induziu alto nível de anticorpos neutralizantes e respostas imunes celulares influenciadas por Th1 em modelos animais.

-> Os efeitos adjuvantes na imunogenicidade humoral foram evidentes, pois os títulos de anticorpos de ligação ao S-Trimer, títulos competitivos da ECA2 e títulos de anticorpos neutralizantes nos grupos com adjuvante foram significativamente maiores do que a vacina sem adjuvante nos níveis de dose de antígeno correspondentes.

-> Níveis elevados de títulos de anticorpos neutralizantes foram observados apenas em AS03 e CpG 1018 mais grupos com adjuvante

de alumínio, mas não para S-Trímero sem adjuvante nem com S-Trímero com CpG 1018 sozinho com adjuvante.

-> S-Trimer com adjuvante AS03 ou CpG 1018 mais alumínio desencadeou títulos de anticorpos neutralizantes de pseudovírus e ECA2-competitivos semelhantes ou superiores aos níveis observados em amostras de soros convalescentes humanos.

-> Resultados semelhantes foram observados em ratos imunizados com S-Trimer, embora em títulos gerais de anticorpos mais elevados do que nos estudos em camundongos, provavelmente em grande parte devido à administração de adjuvantes (AS03, CpG 1018 e CpG 1018 mais alumínio) comparáveis aos níveis da dose em humano (10 vezes maior para AS03 e 75 a 150 vezes maior para CpG 1018 em comparação com as doses usadas em estudos em camundongos).

-> Para determinar se o antígeno *spike* (S) do SARS- Cov-2 na forma trimérica consegue desencadear a resposta imune ideal, que é crucial para a proteção imune, os autores compararam a imunogenicidade das proteínas de fusão S-Trimer e S-Fc (uma forma dimérica da proteína S solúvel de comprimento total) nos camundongos. Como esperado, após a imunização dos animais, S-Trimer com adjuvante AS03 induziu títulos de anticorpos neutralizantes significativamente maiores do que os do antígeno S dimérico com o mesmo adjuvante, apesar de seus títulos de anticorpos de ligação serem comparáveis.

-> A imunidade mediada por células específicas do antígeno S-Trimer foi estudada através da análise dos esplenócitos de camundongos imunizados e que foram submetidos à eutanásia, seguido pela estimulação com antígeno S-Trimer e detecção das citocinas das respostas Th1 (IL-2 e IFN γ) e Th2 (IL-4 e IL-5) por ELISpot. Os grupos CpG 1018 mais alumínio e AS03 pareceram induzir uma resposta referente à imunidade mediada por célula mais forte do que S-Trimer sem adjuvante. Uma resposta imune mediada pelas células polarizadas por Th1 foi observada nos grupos S-Trímero não adjuvados e CpG 1018 adjuvados (com ou sem alumínio), enquanto um perfil Th1-Th2 misto foi observado para AS03. A imunidade mediada por célula não pareceu ser dependente da dose de antígeno usada, e é possível que uma diminuição adicional na quantidade de antígeno seja necessária para observar a faixa linear de resposta na imunidade mediada por célula.

-> Além disso, macacos rhesus imunizados com S-Trimer adjuvado foram protegidos do desafio com SARS-CoV-2 em comparação aos controles que receberam o veículo, com base

15.03.2021- ATUALIZAÇÃO COVID-19 (artigos aceitos) – Hospital Israelita Albert Einstein

				<p>em observações clínicas e redução das cargas virais nos pulmões, além dos títulos dos anticorpos ligantes do S-trimer, competitivos para a ECA2, neutralizantes para o SARS-CoV-2 e neutralizantes para o pseudovírus.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Trimer-Tag pode ser uma importante plataforma de tecnologia para produção escalonável e rápido desenvolvimento de vacinas de subunidades seguras e eficazes contra vírus de RNA emergentes atuais e futuros.</p>
<p>Clin Microbiol Infect 01MAR2021</p>	<p>Pulmonary long-term consequences of COVID-19 infections after hospital discharge</p>	<p>Blanco JR et al. Spain. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33662544/</p>	<p>Valores mais baixos de DHL e capacidade de difusão do monóxido de carbono [DLCO] menor estão associados a quadros mais graves da COVID-19</p>	<p>- Prévio: Os sobreviventes da COVID-19 estão relatando anormalidades residuais após a alta hospitalar. Informações limitadas estão disponíveis sobre este estágio de recuperação ou os efeitos prolongados do vírus na função pulmonar e inflamação.</p> <p>- Objetivo: Descrever a função pulmonar e identificar biomarcadores em amostras do soro e da expectoração induzida de pacientes em recuperação da internação pela COVID-19.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Pacientes internados em hospitais espanhóis com infecção pelo SARS-CoV-2 confirmada laboratorialmente pelo teste da PCR em tempo real (RT-PCR)</p> <p>-> Cada hospital examinou suas listas de pacientes que receberam alta pelo menos 45 dias após o início dos sintomas. Os pacientes infectados com SARS-CoV-2 foram divididos em grupos de doenças leves/moderadas e graves de acordo com a gravidade de seus sintomas durante a internação. Foram avaliados os históricos epidemiológicos e médicos, comorbidades, tratamentos crônicos e parâmetros laboratoriais dos pacientes.</p> <p>-> Testes de função pulmonar, teste padronizado de caminhada de 6 minutos (TC6) e tomografia computadorizada (TC) de tórax também foram realizados.</p> <p>-> Os níveis de proteases, seus inibidores e receptores de liberação foram medidos em amostras de soro e de escarro induzido.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> N=100 pacientes com testes de função respiratória foram incluídos neste estudo.</p> <p>-> A mediana de dias após o início dos sintomas foi 104 (IQR 89,25, 126,75).</p> <p>-> COVID-19 grave em 47% (47/100) dos pacientes.</p> <p>-> A TC foi normal em 48% (48/100) dos pacientes.</p>

-> A função pulmonar estava normal (FEV1 \geq 80%, FVC \geq 80%, FEV1 / FVC \geq 0,7 e capacidade de difusão do monóxido de carbono [DLCO] \geq 80%) em 92% (92/100), 94% (94/100), 100% (100/100) e 48% (48/100) dos pacientes, respectivamente.

-> A análise multivariada mostrou que um DLCO <80% (OR=5,92; IC95%, 2,28-15,37; p <0,0001) e um nível sérico de DHL mais baixo (OR=0,98; IC95%, 0,97-0,99) foram associados ao grupo de COVID-19 grave durante a internação hospitalar.

-> DLCO< 80 versus DLCO \geq 80: média de ida 55 \pm 10,7 vs 54,7 \pm 9,8 anos, sexo masculino 63,5% vs 64,6%, HAS 28,8% vs 20,8%, DM 13,5% vs 6,4%, doença cardiovascular 7,7% vs 0%, doença renal crônica 3,8% vs 0%; todos p>0,05

-> No escarro induzido, não houve diferença para os grupos DLCO< 80 versus DLCO \geq 80 quanto à determinação da OPG, TIMP-1, ICAM-1 e ICAM-3.

-> - No sangue, não houve diferença para os grupos DLCO< 80 versus DLCO \geq 80 quanto à determinação da OPG, TIMP-1, ICAM-1, ICAM-3, PAI-1 e PAI-2

- Conclusões:

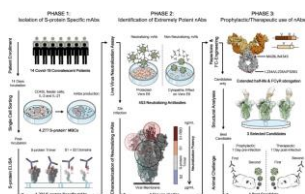
-> Um déficit de difusão (DLCO <80%) ainda estava presente após a alta hospitalar e foi associado aos casos mais graves de infecção pelo SARS-CoV-2.

-> Seria importante avaliar um número maior de pacientes e incluir um grupo controle.

Cell
23FEV2021

Extremely potent human monoclonal antibodies from COVID-19 convalescent patients

Andreano E et al. Italy, USA & UK.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33667349/>



Em busca de anticorpos para as novas variantes

- Prévio: Os anticorpos monoclonais humanos são ferramentas seguras, preventivas e terapêuticas que podem ser desenvolvidas rapidamente para ajudar a restaurar a saúde massiva e os problemas econômicos causados pela pandemia da COVID-19.

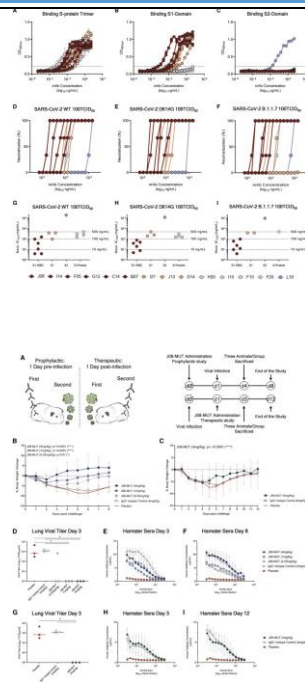
- Métodos:

-> Identificação de 453 anticorpos neutralizantes a partir da separação de célula única utilizando 4.277 linfócitos B de memória específicos para a proteína *spike* do SARS-CoV-2 de 14 sobreviventes da COVID-19.

- Resultados:

-> Os anticorpos neutralizantes mais potentes reconheceram o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína *spike*, seguidos em potência por anticorpos que reconhecem o domínio S1, o trímero da proteína *spike* e a subunidade S2.

-> Apenas 1,4% deles neutralizou o vírus autêntico com uma potência de 1-10 ng/ml.



-> Na busca por anticorpos potentes, foi observado que aproximadamente 10% do total de linfócitos B contra a proteína S isolada produzem anticorpos neutralizantes (nAbs), e estes podem ser divididos em quatro grupos diferentes que reconhecem o S1 RBD, o domínio S1, o domínio S2 e o S trímico de proteína.

-> Com base na primeira rodada de triagem, 14 nAbs foram selecionados para posterior caracterização. Todos os nAbs foram capazes de se ligar à proteína SARS-CoV-2 S em sua conformação trimérica.

-> Os mAbs denominados J08, I14, F05, G12, C14, B07, I21, J13 e D14 também foram capazes de se ligar especificamente ao domínio S1.

-> Os nAbs denominados H20, I15, F10 e F20 não foram capazes de se ligar a domínios únicos S1 ou S2, mas apenas à proteína *spike* em seu estado trimérico, enquanto o nAb L19 se ligou apenas à subunidade S2.

-> Entre o grupo de nAbs específicos da S1, apenas J08, I14, F05, G12, C14 e B07 foram capazes de se ligar ao RBD-S1 e inibir fortemente a interação entre a proteína S e os receptores nas células Vero E6, apresentando metade da concentração efetiva máxima (EC_{50}) no ensaio NoB de 78,6, 15,6 e 68,5 ng/ml para J08-MUT, I14-MUT e F05-MUT, respectivamente.

-> Por outro lado, I21, J13 e D14, apesar de apresentarem especificidade de ligação à S1, não mostraram qualquer ligação à atividade de RBD e NoB. Com base nesta descrição, quatro grupos diferentes de nAbs contra SARS-CoV-2 foram identificados.

-> O primeiro grupo (Grupo I) é composto por nAbs específicos da S1-RBD (J08, I14, F05, G12, C14 e B07), que mostraram potência de neutralização contra o tipo selvagem autêntico (WT), a variante D614G e a variante emergente recentemente isolada no Reino Unido B.1.1.7. Os nAbs específicos da RBD-S1 mostraram uma potência neutralizante variando de 3,9 a 157,5 ng/ml e afinidade picomolar para a proteína S com uma constante de dissociação de equilíbrio (KD) variando de 0,2 a 4,6 E - 10M. Além das variantes D614G e B.1.1.7, o nAb J08 específico da S1-RBD mostrou também neutralizar as variantes SARS-CoV-2 contendo a mutação E484K

-> O segundo grupo (Grupo II) incluiu nAbs específicos da S1 que não se ligaram ao RBD (I21, J13 e D14). Esses anticorpos também mostraram boa potência de neutralização variando de 99,2 a 500,0 ng/ml, mas inferior àquela dos nAbs direcionados à RBD-S1. Um anticorpo deste grupo não foi capaz de neutralizar a variante B.1.1.7 (I21).

-> O terceiro grupo (Grupo III) é composto por anticorpos capazes de se ligar à proteína S apenas em toda a sua conformação trimérica (H20, I15, F10 e F20). Os anticorpos pertencentes a este grupo mostraram menor afinidade para o trímero da proteína S (KD 64,0 E⁻¹⁰M-757,0 E⁻¹⁰M) em comparação com nAbs do Grupo I e potências de neutralização médias variando de 155,0 a 492,2 ng/ml contra o WT autêntico e D614G. Por outro lado, apenas um nAb específico da proteína S (D21) mostrou atividade de neutralização moderada contra o B.1.1.7 com um IC₁₀₀ de 500,0 ng/ml. Três nAbs específicos da proteína S (I15, F10 e F20) não mostraram qualquer atividade funcional contra esta última variante.

-> O quarto e último grupo (Grupo IV) é composto por anticorpos que reconhecem exclusivamente o domínio S2. Diferentes anticorpos com propriedades semelhantes foram identificados para o Grupo IV, mas apenas o nAb L19 foi mostrado. O Grupo IV nAb L19 mostra a menor potência de neutralização com 19,8 µg/ml para o WT autêntico, 12,5 µg/ml contra o D614G e 9,9 µg/ml contra a variante B.1.1.7.

-> *Antibody-dependent enhancement* (ADE) é um risco clínico potencial após infecção por coronavírus. O ADE pode aumentar a gravidade de infecções virais múltiplas, incluindo outros vírus respiratórios, como o vírus sincicial respiratório (VSR) e o sarampo. ADE em infecções respiratórias está incluído em uma categoria mais ampla chamada doença respiratória intensificada (ERD), que também inclui mecanismos não baseados em anticorpos, como cascatas de citocinas e imunopatologia mediada por células. O ADE foi documentado como ocorrendo por meio de dois mecanismos distintos em infecções virais: por aumento da captação de vírus mediada por anticorpos no receptor Fc gama IIa (FcγRIIa) - expressando células fagocíticas que levam ao aumento da infecção e replicação viral, ou por funções efetoras excessivas mediadas pela Fc ou formação de imunocomplexo causando inflamação aumentada e imunopatologia.

-> Portanto, para otimizar a adequação para o desenvolvimento clínico e reduzir o risco de ADE, cinco mutações pontuais diferentes foram introduzidas na região constante (Fc) dos três nAbs mais potentes (J08, I14 e F05), que foram renomeados J08-MUT, I14-MUT e F05-MUT. As duas primeiras mutações pontuais (M428L e N434S) foram introduzidas para aumentar a meia-vida do anticorpo e aumentar a distribuição e persistência nos tecidos (Zalevsky et al., 2010; Gaudinski et al., 2018; Pegu et al., 2017). As três mutações pontuais restantes (L234A, L235A e P329G) foram

introduzidas para reduzir as funções dependentes de anticorpos, como a ligação a FcγRs e atividades baseadas em células (Schlothauer et al., 2016).

-> Para confirmar a falta de ligação de FcγR, bem como a meia-vida estendida, foi realizado um ensaio Luminex com base em grânulos. Resumidamente, as *beads* foram revestidas com a proteína *spike*-RBD do SARS-CoV-2. Os anticorpos foram testados em diluições de oito pontos, e a ligação foi detectada com FcγR2A e receptor Fc neonatal (FcRn) em pH 6,2 e 7,4. O FcγR2A foi selecionado porque é predominantemente expresso na superfície das células fagocíticas (como monócitos, macrófagos e neutrófilos) e está associado à fagocitose de imunocomplexos e alvos opsonizados com anticorpos (Ackerman et al., 2013). Por outro lado, o FcRn, que é altamente expresso nas células endoteliais e monócitos circulantes, foi selecionado por ser responsável pela reciclagem e meia-vida sérica da IgG na circulação (Mackness et al., 2019). Este último receptor demonstrou possuir uma ligação mais forte em pH mais baixo (por exemplo, pH 6,2) em comparação com um pH fisiológico (por exemplo, pH 7,4) (Booth et al., 2018).

-> Os três anticorpos projetados foram testados, então, para confirmar sua especificidade de ligação e potência de neutralização contra o WT, o mutante SARS-CoV-2 D614G difundido e a variante emergente B.1.1.7 para avaliar sua capacidade de neutralização cruzada. Os três nAbs projetados mantiveram sua especificidade de ligação ao domínio S1 e potência de neutralização extremamente alta com J08-MUT e F05-MUT sendo capaz de neutralizar a variante WT e D614G com um IC₁₀₀ inferior a 10 ng/ml (ambos a 3,9 ng/ml para as cepas WT e D614G).

-> O anticorpo J08-MUT também mostrou potência de neutralização extrema contra variantes emergentes, pois foi capaz de neutralizar o B.1.1.7 com um IC₁₀₀ idêntico em comparação com o vírus WT e também mostrou neutralizar variantes que incluem a mutação E484K

-> Posteriormente, a eficácia profilática e terapêutica do J08-MUT no modelo de hamster foi observada com doses de 0,25mg/kg e 4 mg/kg, respectivamente, na ausência de funções Fc.

- Conclusão:

-> O anticorpo monoclonal mais potente, projetado para reduzir o risco do aumento dependente do anticorpo e prolongar a meia-vida, neutralizou o vírus do tipo selvagem autêntico e variantes emergentes contendo substituições D614G, E484K e N501Y.

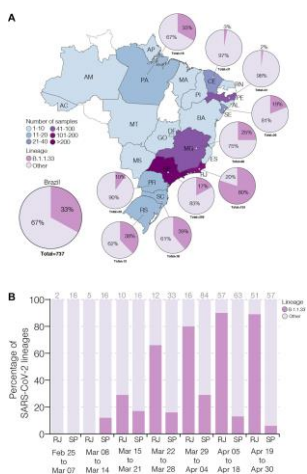
-> Esforços contínuos são necessários para

			<p>identificar anticorpos que possam neutralizar as variantes emergentes.</p>
<p>Stem Cell Res 20FEV2021</p>	<p>Human pluripotent stem cell-based organoids and cell platforms for modelling SARS-CoV-2 infection and drug discovery</p>	<p>Giani AM & Chen S. USA. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33677394/</p> 	<p>Artigo de revisão sobre o uso das células-tronco humanas pluripotentes como plataforma para o screening de drogas para o combate à COVID-19</p> <p>- Prévio: A pandemia global da COVID-19 afetou mais de 200 países e territórios em todo o mundo e resultou em mais de 2,5 milhões de mortes. Numa busca urgente por tratamentos e vacinas, modelos de pesquisa baseados em células-tronco humanas estão surgindo como ferramentas cruciais para investigar os mecanismos de infecção do SARS-CoV-2 e as respostas celulares em diferentes tecidos.</p> <p>- Objetivo: Fornecer uma visão geral da variedade de plataformas baseadas em células-tronco pluripotentes humanas adotadas na pesquisa SARS-CoV-2, compreendendo culturas em monocamada e organóides, que modelam a multidão de tecidos afetados in vitro.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> Trata-se dum artigo de revisão bem importante até o momento.</p> <p>-> Foram destacados os pontos fortes das plataformas utilizando células-tronco humanas pluripotentes (tantos células-tronco embrionárias humanas quanto células-tronco induzíveis pluripotentes, incluindo sua aplicação para avaliar os tipos de células suscetíveis e a patogênese do SARS-CoV-2.</p> <p>-> Há informações sobre as células derivadas das células-tronco humanas pluripotentes, como células cardíacas, pulmonares, renais, intestinais, hepáticas, cerebrais e oculares, incluindo métodos de cultura (2D ou 3D), MOI (concentração e duração) ou PFU/ml, intervalos analisados, permissividade ao SARS-CoV-2, características patológicas e resultados preliminares com screening de drogas (nesta última informação inclui o teste com o remdesivir nos organóides alveolares, por exemplo)</p> <p>-> Foram descritos o uso para identificar candidatos a medicamentos para investigação adicional, além de discutir suas limitações na recapitulação completa da fisiopatologia da COVID-19.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> No geral, os modelos de células-tronco estão facilitando a compreensão do SARS-CoV-2 e provam ser plataformas versáteis para estudar infecções, bem como avaliar a susceptibilidade genética e definir tratamentos personalizados.</p>

Front
Microbiol
17FEV2021

**Evolutionary
Dynamics and
Dissemination
Pattern of the
SARS-CoV-2
Lineage B.1.1.33
During the Early
Pandemic Phase
in Brazil**

Resende PC et al. Brazil.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33679622/>



Origem da
variante B.1.133
no Brasil no
início da
pandemia em
2020

- Prévio: Um estudo anterior demonstra que a maioria das cepas brasileiras do SARS-CoV-2 está incluída em três clados locais que foram introduzidos na Europa por volta do final de fevereiro de 2020.

- Objetivo: Investigar a origem da principal variante brasileira do SARS-CoV-2, a B1.1.33.

- Métodos:

-> Recuperados 190 genomas virais inteiros coletados em 13 estados brasileiros de 29 de fevereiro a 31 de abril de 2020; inclusão de outros genomas B.1.1 coletados globalmente.

-> Whole-Genome Sequencing (Illumina)

- Resultados:

-> O levantamento genômico confirma que a variante B.1.1.33 foi responsável por uma fração variável das transmissões virais da comunidade nos estados brasileiros, variando de 2% de todos os genomas SARS-CoV-2 de Pernambuco a 80% dos do Rio de Janeiro.

-> Detectada uma prevalência moderada (5-18%) da variante B.1.1.33 em alguns países da América do Sul e uma prevalência muito baixa (<1%) na América do Norte, Europa e Oceania.

-> A variante B.1.1.33 evoluiu de um clado ancestral, aqui designado como B.1.1.33, que carrega uma das duas mutações sinapomórficas B.1.1.33.

-> A variante B.1.1.33-like pode ter sido introduzida da Europa ou surgiu no Brasil no início de fevereiro de 2020 e algumas semanas depois deu origem à variante B.1.1.33.

-> Essas variantes do SARS-CoV-2 provavelmente circularam durante fevereiro de 2020 e alcançaram todas as regiões brasileiras e vários países ao redor do mundo em meados de março, antes da implementação das restrições de viagens aéreas no Brasil.

-> A análise filodinâmica também indica que as intervenções de saúde pública foram parcialmente eficazes para controlar a expansão da variante B.1.1.33 no Rio de Janeiro porque seu número reprodutivo efetivo mediano (R_e) foi drasticamente reduzido em cerca de 66% durante março de 2020, mas falhou para trazê-lo para menos de um.

- Conclusão:

-> A vigilância genômica contínua da

15.03.2021- ATUALIZAÇÃO COVID-19 (artigos aceitos) – Hospital Israelita Albert Einstein

				variante B.1.1.33 pode fornecer informações valiosas sobre a dinâmica da epidemia e a eficácia das intervenções de saúde pública em alguns estados brasileiros.
--	--	--	--	---