

,;Revista e data	Título	Autores e links	Pergunta Principal	Aspectos-chaves
<p>Lancet 30MAR2021</p>	<p>Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial</p>	<p>Emary KRW et al. COVID-19 Genomics UK consortium; AMPHEUS Project; Oxford COVID-19 Vaccine Trial Group. UK. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33798499/</p>	<p>Eficácia da vacina ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) contra a variante B.1.1.7 do SARS-CoV-2 no Reino Unido</p>	<p>- Prévio: Uma nova variante do SARS-CoV-2, B.1.1.7, emergiu como a causa dominante da doença COVID-19 no Reino Unido em novembro de 2020. A variante B.1.1.7 no Reino Unido surgiu enquanto havia um baixo nível de imunidade da população contra a infecção natural e antes do início dos programas de vacinas, então é provável que a variante tenha sido selecionada para melhorar a ligação e transmissibilidade do receptor ECA2, ao invés de resultado da imunidade induzida pela vacina.</p> <p>- Objetivo: Realizar a análise post-hoc da eficácia do vetor adenoviral vacina, ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222), contra esta variante.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Voluntários (com idade ≥ 18 anos) que foram inscritos em estudos de eficácia da vacina de fase 2/3 no Reino Unido, sendo designados aleatoriamente (1:1) para receber ChAdOx1 nCoV-19 ou uma vacina de controle meningocócica conjugada (MenACWY),</p> <p>-> Coleta de swabs das vias aéreas superiores semanalmente e investigação dos sintomas da doença COVID-19 (tosse, febre de $37,8^{\circ}\text{C}$ ou mais, falta de ar, anosmia ou ageusia).</p> <p>-> As amostras dos swabs foram testadas pelo teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT) para SARS-CoV-2 e as amostras positivas foram sequenciadas através do consórcio COVID-19 Genomics UK.</p> <p>-> As respostas de anticorpos neutralizantes foram medidas usando um ensaio de microneutralização de vírus vivo contra a linhagem B.1.1.7 e uma linhagem não-B.1.1.7 canônica (Victoria).</p> <p>-> A análise de eficácia incluiu COVID-19 sintomática em participantes soronegativos com um swab NAAT positivo mais de 14 dias</p>

após uma segunda dose da vacina.

-> Os participantes foram analisados de acordo com a vacina recebida. A eficácia da vacina foi calculada como 1 - risco relativo (grupos ChAdOx1 nCoV-19 vs MenACWY) derivado de um modelo de regressão de Poisson robusto.

- Resultados:

-> Os participantes em coortes de eficácia foram recrutados entre 31 de maio e 13 de novembro de 2020, e receberam doses de reforço entre 3 de agosto e 30 de dezembro de 2020.

-> Dos 8534 participantes na coorte de eficácia primária, 6.636 (78%) tinham idades entre 18-55 anos e 5.065 (59%) eram mulheres.

-> Entre 1º de outubro de 2020 e 14 de janeiro de 2021, 520 participantes desenvolveram infecção pelo SARS-CoV-2. 1466 swabs nasais e orofaríngeos positivos para NAAT foram coletados desses participantes durante o ensaio. Destes, 401 swabs de 311 participantes foram sequenciados com sucesso.

-> Os valores mínimos de Ct (um proxy inverso para o pico de carga viral) dos swabs dos participantes que receberam ChAdOx1 nCoV-19 (mediana 28,8, IQR 20,5–33,5) foram maiores do que aqueles que receberam a vacina de controle (20,2, 15,5–29,6, $p < 0,0001$).

-> Os casos sintomáticos primários tinham valores de Ct mais baixos do que os casos de sintomas desconhecidos ou assintomáticos (mediana 18, 2 [15,0–25,0] vs 29,7 [21,6–33,5], $p < 0,0001$) e foram NAAT positivos por um longo período de tempo ($p < 0,0001$).

-> A atividade de neutralização do vírus de laboratório para anticorpos induzidos pela vacina foi menor contra a variante B.1.1.7 do que contra a linhagem Victoria (proporção média geométrica 8,9, IC 95% 7,2-11,0).

-> A eficácia da vacina clínica contra infecção sintomática positiva por

NAAT foi 70,4% (IC 95% 43,684,5) para B.1.1.7 e 81,5% (67,9-89,4%) para as linhagens não-B. 1.1.7.
 - Discussão:
 -> ChAdOx1 nCoV-19 mostrou atividade de neutralização reduzida contra a variante B.1.1.7 em comparação com uma variante não B.1.1.7 in vitro, mas a vacina mostrou eficácia contra a variante B.1.1.7 do SARS-CoV-2

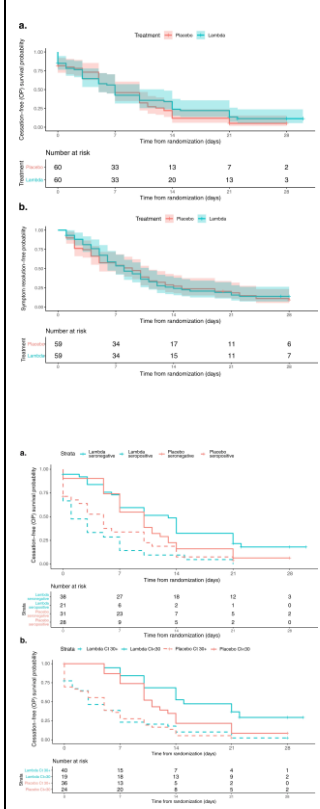
Nat Commun
30MAR2021

Peginterferon Lambda-1a for treatment of outpatients with uncomplicated COVID-19: a randomized placebo-controlled trial

Jagannathan P et al. USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33785743/>

Ausência de eficácia do peginterferon lambda-1a no tratamento de pacientes com COVID-19 leve a moderada

- Prévio: Os interferons do tipo III têm sido apontados como terapêuticas promissoras em pacientes ambulatoriais com COVID-19.
 - Métodos:
 -> Estudo clínico randomizado, simples-cego, controlado por placebo (NCT04331899) em 120 pacientes ambulatoriais com COVID-19 leve a moderada
 -> Determinar se uma única dose subcutânea de 180 mcg de Peginterferon Lambda-1a (Lambda) dentro de 72 horas após o diagnóstico encurta a duração da eliminação viral (desfecho primário) ou sintomas (desfecho secundário).
 - Resultados:
 -> Lambda (n=60) versus Placebo (n=60): mediana de idade 37 (18-66) vs 34 (20-71) anos, sexo feminino 40% vs 43,3%, latinos 56,7% vs 68,3%, HAS 15,5 vs 8,3%, DM 6,7% vs 13,3%, asma 3,3 vs 3,3%, doença cardíaca 5% vs 1,7%, mediana IMC 27,6 (25,4-31,1) vs 28,5 (24,8-32,3) kg/m²; mediana de tempo para randomização: 4 (3-6) vs 6 (3-5); todoso p>0,05
 -> Lambda versus placebo: a média de tempo para a cessação da eliminação viral foi 7 dias (razão de risco [HR]=0,81; IC95% 0,56 a 1,19).
 -> Os sintomas foram resolvidos em 8 e 9 dias com Lambda e placebo, respectivamente, e a duração dos sintomas não diferiu significativamente entre os grupos (HR 0,94; IC95% 0,64-1,39).
 -> A trajetória dos níveis de RNA viral



			<p>não variou de acordo com o braço de tratamento ($p=0,91$), nem a área sob a curva do RNA viral ($p=0,95$). Na análise exploratória, a soropositividade no início do estudo foi associada com a interrupção significativamente acelerada da eliminação. A média de tempo para a cessação da eliminação foi 10 dias em indivíduos soronegativos para SARS-CoV-2 IgG <i>versus</i> 3 dias em indivíduos soropositivos (IC95% 7–14 dias para soronegativos <i>versus</i> 1–6 dias para soropositivos, aHR=2,65, IC95% 1,74–4,03, $p<0,001$).</p> <p>-> O sorostatus na linha de base modificou significativamente o efeito do tratamento sobre o tempo da cessação da eliminação viral ($p=0,03$). Entre os indivíduos soronegativos, as estimativas pontuais sugerem que Lambda retardou a cessação da eliminação em comparação com o placebo (aHR 0,66, IC 95% 0,39-1,10). Entre os indivíduos soropositivos, as estimativas pontuais sugerem que Lambda acelerou a cessação da eliminação em comparação com o placebo (aHR 1,58, IC de 95% 0,88–2,86).</p> <p>-> Lambda e placebo foram bem tolerados, embora as elevações das transaminases hepáticas foram mais comuns no braço Lambda vs. placebo (15/60 vs. 5/60; $p = 0,027$).</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Neste estudo, uma dose única de Peginterferon Lambda-1a subcutâneo não encurtou a duração da eliminação do vírus SARS-CoV-2 nem melhorou os sintomas em pacientes ambulatoriais com COVID-19 não complicada.</p>
Eur J Immunol 30MAR2021	Upregulation of CCR4 in activated CD8+ T cells indicates enhanced lung-homing in patients with severe acute SARS-CoV-2	Spoerl S et al. Germany. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33784417/	<p>Indução da quimiocina CCR4 nos linfócitos T CD8 ativados pode explicar o <i>homing</i> para os pulmões na COVID-19</p> <p>- Prévio: COVID-19 é uma doença com risco de vida que causa pneumonia bilateral e insuficiência respiratória.</p> <p>- Objetivo: Identificar as razões subjacentes pelas quais uma porcentagem menor de pacientes apresenta sintomas pulmonares graves, enquanto a maioria é apenas levemente afetada.</p>

infection

- Métodos:
 -> Coleta de sangue periférico e dos PBMCs.
 -> Citometria de fluxo (7-AAD e várias outras moléculas, além do marcador de proliferação Ki67), imunoensaio de quimioluminescência (CLIA) para detecção da IgG do SARS-CoV-2, imunoensaio multiplex

- Resultados:
 -> Foram analisados doadores saudáveis e pacientes com casos leves (NIH Score 4 + 5) e graves (NIH Score 1-3) de infecção pelo SARS-CoV-2. Os doadores saudáveis tinham média de idade de 35 anos (variação de 26-46).
 -> Na população controle, 8 doadores saudáveis eram mulheres e 7 homens. Todos os pacientes foram selecionados como positivos para infecção pelo SARS-CoV-2 por PCR a partir da coleta do swab nariz-garganta.
 -> A carga viral no momento da coleta de sangue já se tornou negativa em 4 dos pacientes com doença leve e em 4 dos pacientes com doença grave. 15 pacientes tiveram um curso leve da doença, com idade mediana de 65 anos (variação: 18-96). A média de tempo após o início dos sintomas da doença até o dia da coleta da amostra foi de 5 dias. Pacientes com curso leve apresentaram COVID-19 específica, principalmente sintomas respiratórios, como febre, tosse seca e falta de ar (um paciente estava sem sintomas), no entanto, nenhum paciente necessitou de tratamento na UTI, ventilação mecânica nem morreu devido à COVID- 19.
 -> 14/15 pacientes (mediana de idade e 69 anos, variação de 37-88) com um curso grave da doença foram tratados no departamento de UTI, todos precisando de oxigênio suplementar, 11 deles precisando de ventilação mecânica e 3 deles foram transferidos para um sistema de suporte ECMO (oxigenação por membrana extracorpórea). Os demais pacientes recusaram ventilação invasiva ou

tratamento em UTI. A taxa de mortalidade da coorte com pacientes graves foi de 33%. Em pacientes gravemente doentes, as amostras de sangue foram coletadas com uma média de 11 dias após o início dos sintomas da doença.

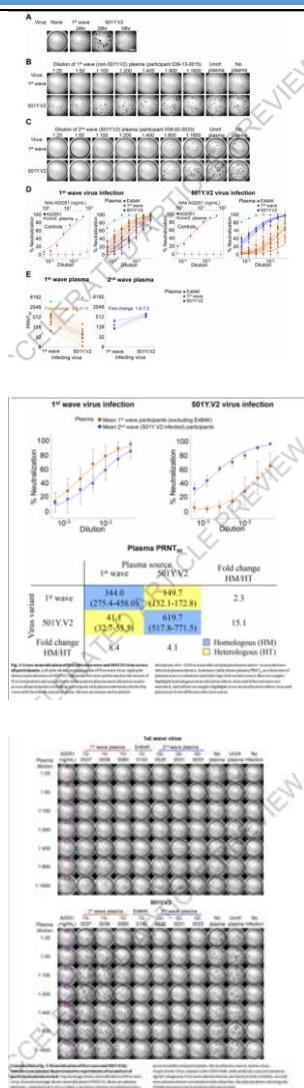
-> A comparação do fenótipo imunológico em doadores saudáveis e pacientes com COVID-19 leve *versus* grave mostra que em pacientes com COVID-19, a ativação e proliferação dos linfócitos NK/B estão aumentadas independentemente da gravidade.

-> Como uma pré-condição importante para respostas eficazes de anticorpos, os linfócitos T foliculares auxiliares e os linfócitos secretores de anticorpos estavam aumentados em pacientes com infecção pelo SARS-CoV-2 leve e grave.

-> Além disso, os linfócitos T em pacientes com COVID-19 exibem um perfil de ativação mais forte com diferenciação para fenótipos de linfócitos efetores.

-> No entanto, os pacientes com doença grave mostraram uma expansão de linfócitos T CD4 da memória central (CM) apontando para uma resposta imune ativa. Notavelmente, o compartimento de linfócitos T CD8 em pacientes com COVID-19 leve exibiu uma mudança para células de memória efetoras terminalmente diferenciadas que reexpressam CD45RA (TEMRA), células altamente diferenciadas com funções efetoras, mas atividade mitótica limitada e capacidade de sobrevivência. Além disso, as frequências de linfócitos T CD8 naïve e efetoras diminuíram nesses pacientes. O declínio no compartimento CD8 naïve foi ainda mais acentuado em pacientes com doença grave. Curiosamente, os casos graves mostraram uma expansão das células efetoras, enquanto a indução das células TEMRA não pôde ser observada. Foi encontrada também uma correlação

			<p>significativa de ativação e diferenciação de linfócitos T CD8 em pacientes com infecção grave pelo SARS-CoV2, visto que o estado de alta ativação está associado a um efector aumentado e a uma diferenciação terminal diminuída.</p> <p>-> Observado aumento da expressão de PD1 (marcador de exaustão ou senescência) nos linfócitos T CD4 e CD8 de pacientes com COVID-19 grave em comparação aos casos leve e indivíduos saudáveis.</p> <p>-> É importante observar que, ao observar as taxas de complicações pulmonares em pacientes com COVID-19, o receptor de quimiocina CCR4 foi mais expresso pelos linfócitos T CD4 e CD8 de pacientes com COVID-19 grave.</p> <p>-> Tais dados levantam a hipótese de que a suprarregulação do CCR4 nos linfócitos T na patogênese da COVID-19 promove uma atração mais forte dos linfócitos T pelos pulmões, levando ao aumento da ativação imunológica com presumivelmente maior toxicidade pulmonar.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> O estudo contribui significativamente para a compreensão das alterações imunológicas durante a COVID-19, uma vez que novos agentes terapêuticos, preferencialmente direcionados ao sistema imunológico, são altamente justificados.</p>
<p>Nature 29MAR2021</p>	<p>Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 from neutralization by convalescent plasma</p>	<p>Cele S et al. South Africa, Israel, UK, USA & Germany. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33780970/</p>	<p>Escape da variante 501Y.V2 do SARS-CoV-2 da neutralização do plasma</p> <p>- Prévio: Variantes de preocupação (VOC) do SARS-CoV-2 surgiram independentemente em vários locais e podem reduzir a eficácia das vacinas atuais que têm como alvo a glicoproteína spike.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Utilizado o ensaio de neutralização de vírus vivo (LVNA) para comparação da neutralização de uma variante não VOC versus a variante 501Y.V2 usando plasma coletado de adultos hospitalizados com COVID-19 de duas ondas de infecção sul-africanas, com a segunda onda dominada pelas</p>



infecções por 501Y.V2.

-> Foram escolhidos os plasmas de 14 participantes da primeira onda sul-africana da infecção em que o vírus infectante foi sequenciado com sucesso.

-> As amostras de plasma eram de sangue colhido aproximadamente 1 mês após o início dos sintomas, perto do pico de resposta de anticorpos.

-> Dos 14 participantes, 13 não mostraram mutações RBD ou NTD no vírus infectante. Um único participante amostrado em outubro de 2020 mostrou a mutação de escape E484K na ausência das outras mutações 501Y.V2

-> Havia menos participantes da segunda onda de infecção no momento do envio do artigo, pois a maioria ainda não atingiu o início de 1 mês pós-sintoma. Os participantes da segunda onda neste estudo foram infectados no final de dezembro de 2020 ou início de janeiro de 2021.

-> Foram sequenciadas amostras de três participantes da 2ª onda, sendo que a sequência permitia caracterizar a variante.

-> Microneutralização em placa (PRNT₅₀)

- Resultados:

-> O sequenciamento demonstrou que as infecções nos doadores de plasma da primeira onda eram com vírus que não albergavam nenhuma das mutações definidoras de 501Y.V2, exceto uma com a mutação E484K no domínio de ligação ao receptor (RBD).

-> O vírus 501Y.V2 foi efetivamente neutralizado pelo plasma de infecções da segunda onda e o vírus da primeira onda foi efetivamente neutralizado pelo plasma da primeira onda.

-> Observada diminuição (fold change) de 8,4 vezes da neutralização do plasma da primeira onda da variante 501Y.V2 em comparação com o vírus homólogo. Diminuição da neutralização do plasma da segunda onda em comparação com o vírus homólogo na primeira onda de 4.1.

-> Na neutralização cruzada, o vírus 501Y.V2 foi mal neutralizado pelo plasma da primeira onda, com uma queda de 15,1 vezes em relação à neutralização do 501Y.V2 pelo plasma da segunda onda entre os participantes.

-> Em contraste, a neutralização cruzada do plasma da segunda onda do vírus da primeira onda foi mais eficaz, mostrando apenas um declínio de 2,3 vezes em relação à neutralização do plasma da primeira onda do vírus da primeira onda.

-> Havia apenas um plasma com a mutação E484K isolado, o qual neutralizou potentemente as duas variantes.

- Discussão:

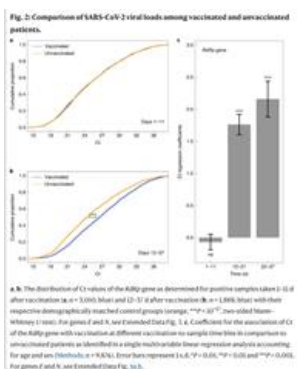
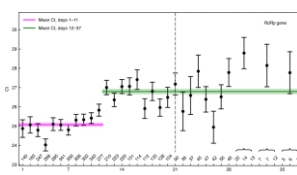
-> A neutralização efetiva observada do vírus da primeira onda pelo plasma obtido pela infecção pelo 501Y.V2 fornece evidências preliminares de que as vacinas baseadas em sequências de VOC podem reter a atividade contra outras linhagens circulantes do SARS-CoV-2.

Nat Med
29MAR2021

Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine

Levine-Tiefenbrun M et al. Israel.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33782619/>

Redução da carga viral após a vacinação: um estudo de mundo real em Israel



- Prévio: Além de sua proteção substancial aos vacinados individuais, as vacinas contra a COVID-19 podem reduzir a carga viral na infecção inicial e, assim, suprimir ainda mais a transmissão progressiva.

- Métodos:

-> Análise dos dados do mundo real dos resultados positivos do teste para SARS-CoV-2 após a inoculação com a vacina de RNA mensageiro BNT162b2.

-> Coletadas e analisadas retrospectivamente as medições do teste quantitativo da PCR de transcrição reversa (RT-qPCR) de três genes SARS-CoV-2 - E, N e RdRp (ensaio Allplex 2019-nCoV, Seegene) a partir de testes positivos pós-vacinação realizados de dezembro de 2020 e 11 de fevereiro de 2021 (n = 4.938 pacientes), em Israel. O período de estudo foi caracterizado por taxas altas e constantes de testes COVID-19 positivos, indicando uma onda

epidêmica em andamento.

- Resultados:

Table 1 Study population

From: Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine

Age group (years)	Total no. of patients	Male	Female
18-29	241	143	98
30-39	435	236	209
40-49	485	277	208
50-59	1,077	513	564
60-69	1,344	708	636
70-79	821	445	376
80-89	422	216	206
90-99	123	53	70

-> A carga viral foi substancialmente reduzida para infecções ocorrendo 12-37 dias após a primeira dose da vacina (uma segunda dose foi administrada no dia 21 para todas as amostras coletadas após o dia 21).

-> Assim, os Ct foram maiores do que os valores de Ct das amostras positivas coletadas durante os primeiros 11 dias após a vacinação para o gene RdRp e para os genes N e E ($P < 10^{-19}$ para os três genes).

-> As diferenças na média do Ct calculada para esses dois períodos de tempo variaram de $1,7 \pm 0,2$ para RdRp a $1,6 \pm 0,2$ para o gene E e $1,4 \pm 0,2$ para o gene N.

-> Dado que uma diferença de unidade de 1 Ct é aproximadamente equivalente a um fator de 2 no número de partículas virais por amostra, essas diferenças de Ct representam uma diminuição de 2,8 a 4,5 vezes na carga viral em indivíduos vacinados.

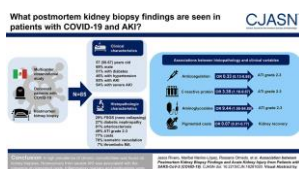
- Conclusões:

-> Essas cargas virais reduzidas sugerem uma infecciosidade potencialmente menor, contribuindo ainda mais para o efeito da vacina na disseminação do vírus.

Clin J Am Soc Nephrol 29MAR2021

Association between Postmortem Kidney Biopsy Findings and Acute Kidney Injury from Patients with SARS-CoV-2 (COVID-19)

Rivero J et al. Mexico. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33782033/>

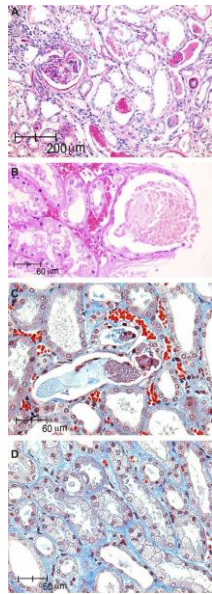
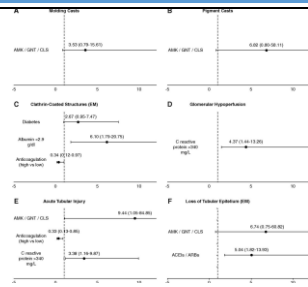


Achados histopatológicos nas biópsias renais de pacientes que foram a óbito pela COVID-19

- Prévio: A Lesão Renal Aguda (LRA) na COVID-19 está associada a maior morbimortalidade. O objetivo deste estudo foi identificar as características histopatológicas renais de pacientes falecidos com diagnóstico de COVID-19 e avaliar a associação entre os achados de biópsia e variáveis clínicas, incluindo a gravidade da LRA.

- Métodos:

-> Estudo observacional multicêntrico de pacientes falecidos com COVID-19 em três centros na Cidade do México.



-> Avaliação da biópsia renal pós-morte por análise de microscopia de luz e eletrônica em todos os casos.

-> Foram realizadas estatísticas descritivas e de associação entre as variáveis clínicas e histológicas.

- Resultados:

-> N=85 pacientes; média de idade 57 (49-66) anos, 69% eram homens, índice de massa corporal 29 (26-35) kg/m², 51% DM, 46% HAS, 98% receberam anticoagulação, 66% (n=56) usaram esteroides e 35% (n=30) receberam pelo menos um medicamento potencialmente nefrotóxico.

-> Todos os pacientes necessitaram de ventilação mecânica invasiva, 70 (82%) receberam vasopressores, 83 (98%) foram tratados com anticoagulantes (43% profilático e 53% dose terapêutica).

-> Infecções bacterianas sobrepostas intra-hospitalares estiveram presentes em 45 (53%) pacientes, e 40 (47%) pacientes preencheram os critérios de choque séptico. O diagnóstico final principal foi síndrome do desconforto respiratório agudo devido a COVID-19, e o tempo médio de internação hospitalar foi de 11 (7-17) dias.

-> LRA grave estava presente em 54% dos pacientes. Os achados da biópsia incluíram GESF em 29%, nefropatia diabética em 27% e arteriosclerose em 81%.

-> Lesão tubular aguda grau 2-3 foram observados em 49%; cilindros foram encontrados em 65 (77%), pigmentos citoplasmáticos em 50 (59%), vacuolização isométrica em 66 (78%) e hipoperfusão glomerular em 46 (54%). Nefrite tubulointersticial aguda (NIA) foi observada em seis (7%), microtrombose intersticial em dois (2%) e microangiopatia trombótica (TMA) em seis (7%) pacientes.

-> As características histopatológicas não foram associadas à LRA grave; no entanto, a presença de cilindros pigmentares na biópsia foi associadas à

				<p>probabilidade significativamente menor de recuperação da função renal (OR=0,07; IC95%, 0,01-0,77).</p> <p>-> O uso de aminoglicosídeos/colistina, níveis de proteína C reativa e albumina sérica, uso prévio de inibidores da enzima conversora da angiotensina ou bloqueadores do receptor da angiotensina II, antivirais, antiinflamatórios não esteroides e anticoagulantes foram associados a achados histopatológicos específicos.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Encontrada alta prevalência de comorbidades crônicas nas biópsias renais. A não recuperação de LRA grave foi associada à presença de cilindros pigmentados. Marcadores inflamatórios e medicamentos foram associados a achados histopatológicos específicos em pacientes que morreram de COVID-19.</p>
<p>Clin Infect Dis 27MAR2021</p>	<p>Phylogenetic analyses of SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage suggest a single origin followed by multiple exportation events versus convergent evolution</p>	<p>Chaillon A & Smith DM. USA. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33772259/</p>	<p>Disseminação da variante B.1.1.7 ocorre por dispersão local e global e não por mutação convergente.</p>	<p>- Prévio: O surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2 anuncia uma nova fase da pandemia.</p> <p>-> Após investigações filogenéticas e epidemiológicas, suspeita-se que a linhagem genética SARS-CoV-2 B.1.1.7 esteja associada ao aumento da transmissibilidade viral humano-humano e foi classificada como uma "Variante da Preocupação" ou "Variant of Concern" (VOC B.1.1.7) em 18 de dezembro de 2020. A variante foi descoberta pela primeira vez em Kent, Reino Unido em 21 de setembro de 2020, e desde então foi identificado em mais de 40 países em todo o mundo</p> <p>- Objetivos: Avaliar se a amplitude da identificação da VOC B.1.1.7 representa evolução convergente ou rápida dispersão local e global após o surgimento desta linhagem.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Em 14 de janeiro de 2021, analisadas todas as sequências genômicas da linhagem SARS-CoV-2 de 2021 disponíveis no banco de dados público GISAID (17.118 sequências de genoma de comprimento completo em</p>

36 países). A grande maioria era do Reino Unido (95%, n=16.263, gerado pelo consórcio nacional COVID-19 Genomics UK (COG-UK), mas 855 das sequências eram de outros países, incluindo 80 da América do Norte (74 dos EUA).

- Resultados:

-> Para estimar o tempo de introdução de variantes B.1.1.7 fora do Reino Unido, foi aplicada uma abordagem analítica multistep.

-> Clusters B.1.1.7 de tamanho ≥ 2 , incluindo apenas sequências não-britânicas foram identificados a partir da filogenia ML em R. Para cada clade não-Reino Unido, a filogenia foi redimensionada em unidades de tempo com *treedater*, assumindo um relógio molecular rigoroso com a taxa de evolução do genoma SARS-CoV-2 extraída de uma distribuição externamente estimada, como descrito anteriormente, e a taxa foi uma média de $9,41 \times 10^{-4}$ substituições de nucleotídeos por site por ano com um desvio padrão de $4,99 \times 10^{-5}$. Para incorporar a incerteza na taxa de relógio estimada, a projeção do relógio molecular foi replicada 100 vezes para cada clade B.1.1.7 não-Reino Unido. Identificado um total de 90 clades de tamanho ≥ 2 para um total de 513 sequências (variando de 2 a 135) incluindo apenas variantes B.1.1.7 de fora do Reino Unido. O maior conjunto de 135 sequências foi identificado na Dinamarca em 5 regiões. Um terço (60/90) eram clusters exclusivos europeus, enquanto 12 clusters incluídos eram equências dos Estados Unidos (5 amostrados na Califórnia).

-> A primeira semente estimada da variante B.1.1.7 do Reino Unido data de 9 de setembro de 2020 na Dinamarca, e o mais recente até 8 de janeiro de 2021 na Espanha. O número de apresentações semanais fora do Reino Unido atingiu o pico em meados de dezembro. Nos EUA, a primeira

introdução foi estimada em 14 de novembro na Flórida. Cinco apresentações distintas na Califórnia também foram identificadas de 3 a 26 de dezembro, incluindo um conjunto de 19 sequências.

- Discussão:

-> Os resultados não sugerem que as mutações canônicas da VOC B.1.1.7 evoluíram independentemente em diferentes locais. Em vez disso, as análises apontam para uma origem e disseminação da VOC B.1.1.7 do Reino Unido. Quanto à propagação inicial do vírus e subsequente disseminação, a conectividade global e altos níveis de mobilidade humana, sem dúvida, facilitaram a disseminação da VOC B.1.1.7.

-> A rápida disseminação global da VOC B.1.1.7 ilustra que as restrições atuais são insuficientes para evitar a disseminação de variantes novas e emergentes. Semelhante ao Ebola, HCV e HIV, as contramedidas para a propagação SARS-CoV-2 devem ser desenvolvidas com uma perspectiva mais ampla do que o nível nacional. Caso contrário, sem imunidade populacional, reduções locais bem-sucedidas na carga SARS-CoV-2 serão neutralizadas pelas infecções importadas que desencadearam novas ondas de propagação viral, possivelmente exacerbada pelas novas características fenotípicas das cepas importadas.

- Prévio: Vacinas ideais são necessárias para a supressão sustentada do SARS-CoV-2 e outros novos coronavírus.

- Objetivo: Desenvolver um vetor de adenovírus tipo 5 recombinante codificando o gene para o antígeno de subunidade SARS-CoV-2 S1 (Ad5.SARS-CoV-2-S1) para imunização contra a COVID-19 e avaliação da sua imunogenicidade em camundongos.

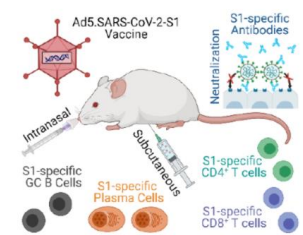
- Resultados:

-> Uma única imunização com

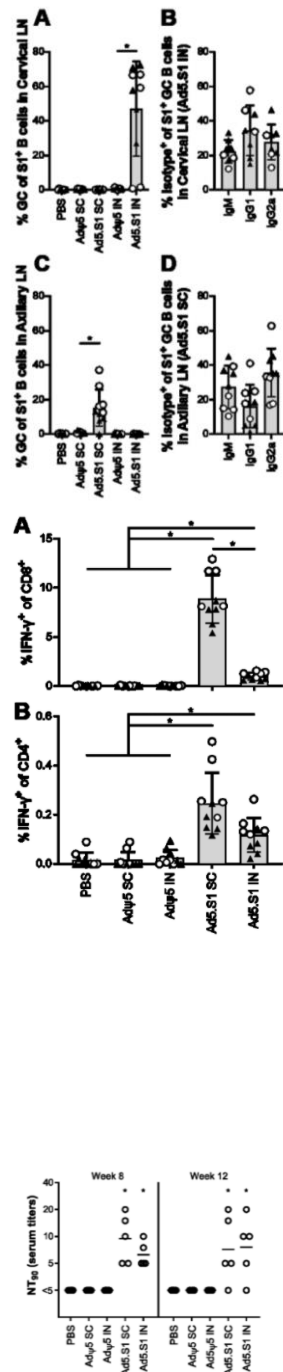
Eur J Immunol
27MAR2021

A Single Subcutaneous or Intranasal Immunization with Adenovirus-Based SARS-CoV-2 Vaccine Induces Robust Humoral and Cellular Immune Responses in Mice

Kim E et al. USA & Italy.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33772778/>



Vacina vetorizada com adenovírus – eficácia da dose única via SC e IN no modelo pré-clínico



Ad5.SARS-CoV-2-S1 via injeção S.C. ou entrega de I.N induziu anticorpos robustos e respostas imunes celulares. -> A vacinação induziu títulos elevados de IgG, IgG1 e IgG2a específicos para S1 tão precocemente quanto 2 semanas e os anticorpos induzidos foram duradouros.

-> A administração da vacina Ad5.SARS-CoV-2-S1 S.C. e I.N. produziu linfócitos B do centro germinal específico S1 em linfonodos cervicais e axilares, respectivamente.

-> Além disso, a imunização de I.N. e S.C. evocou respostas significativamente maiores de linfócitos T específicas CD4 e CD8 ao antígeno em comparação com grupos de controle não imunizados, de modo que a injeção S.C foi mais eficaz do que a entrega de I.N. na obtenção de respostas imunes celulares (> resposta dos linfócitos T CD8⁺ IFN- γ).

-> Camundongos vacinados por qualquer rota demonstraram um aumento significativo dos anticorpos de neutralização específicos do vírus (ensaio de microneutralização NT₉₀) nas semanas 8 e 12 em comparação ao grupo controle, bem como a AFC (*antibody forming cells*) na medula óssea, indicativo de imunidade a longo prazo.

- Conclusão:

-> Assim, este candidato à vacina SARS-CoV-2 vetorial aD5 mostrou imunogenicidade promissora em camundongos após a administração pelas vias S.C. e I.N. apoiando o desenvolvimento de vacinas baseadas em adenovírus contra a COVID-19 e outras doenças infecciosas para programas de imunização global sustentável.

Eur J Nucl Med Mol Imaging
27MAR2021

Hypermetabolic lymphadenopathy following administration of BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine:

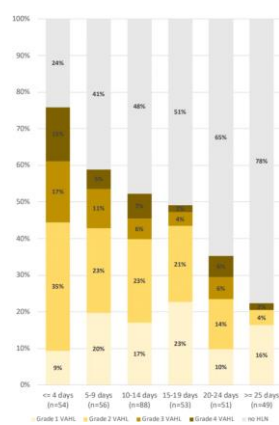
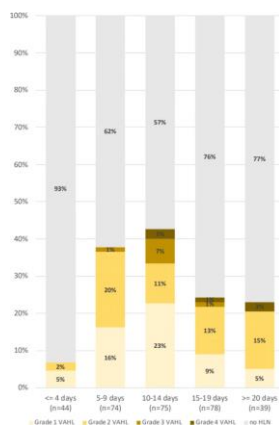
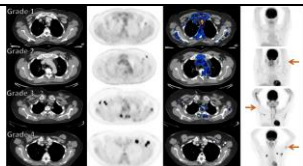
Coen D et al. Israel. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33774684/>

Linfadenopatia hipermetabólica associada a vacina (VAHL) BNT162b2

- Prévio: A vacinação em massa contra Covid-19 começou em Israel no final de 2020.

-> Objetivo: Utilizar [¹⁸F] FDG PET-CT em estudos de linfadenopatia hipermetabólica associada a vacina

incidence assessed by [¹⁸F]FDG PET-CT and relevance to study interpretation



(VAHL) em linfonodos axilares ou supraclaviculares (ASLN) ipsilateral ao local de vacinação. Às vezes, a diferenciação entre a natureza maligna e benigna da linfadenopatia hipermetabólica (HLN) não pôde ser feita, e HLN equívoco (EqHL) foi relatado. Assim, o objetivo do estudo foi determinar a incidência geral de VAHL após a vacinação com BNT162b2 e também sua relevância para a interpretação do PET-CT em pacientes oncológicos.

- Métodos:

-> Um total de 951 pacientes consecutivos submetidos a estudos [¹⁸F] FDG PET-CT foi entrevistado em relação aos locais e datas das doses da vacina.

-> Um total de 728 pacientes vacinados (grupo All-Vac) foram incluídos: 346 receberam apenas a primeira dose (grupo Vac-1) e 382 receberam a dose de reforço (grupo Vac-2).

-> Os estudos foram categorizados como sem HLN, malignant-HLN (MHL), VAHL ou EqHL. Em estudos com VAHL, localização, captação de intensidade de [¹⁸F] FDG e tamanho dos nódulos foram registrados.

- Resultados:

-> Mediana de idade 68,3 (58, 75,4) anos, 57,2% mulheres, neoplasias mais comuns: linfoma (17,1%), câncer de pulmão (15,8%) câncer de mama (15%), câncer colo-retal (11,6%) e neoplasia hematológica (7,8%)

-> As incidências de HLN foram 45,6%, 36,4% e 53,9% nos grupos All-Vac, Vac-1 e Vac-2, respectivamente.

-> VAHL foi relatado em 80,1% dos pacientes vacinados com HLN.

-> Incidências mais baixas de VAHL foram encontradas durante os primeiros 5 dias ou na terceira semana após a primeira vacina e além de 20 dias após a dose de reforço.

-> Em 49 de 332 (14,8%) pacientes vacinados, não foi possível determinar se HLN era MHL ou VAHL.

-> Câncer de mama e linfoma foram as principais doenças com EqHL.
 - Conclusão:
 -> VAHL é freqüentemente observada após administração de BNT162b2, mais comumente e com maior intensidade após a dose de reforço. Para minimizar relatos falsos e ambíguos em pacientes oncológicos, o tempo de [¹⁸F] FDG PET-CT deve ser baseado nos intervalos de tempo encontrados para ter uma incidência mais baixa de VAHL, e a escolha do local de injeção da vacina deve ser aconselhada, principalmente em pacientes onde ASLN são um local relevante de envolvimento do tumor.

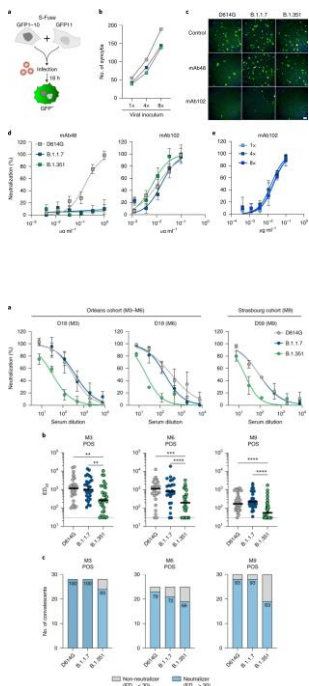
Nat Med
 26MAR2021

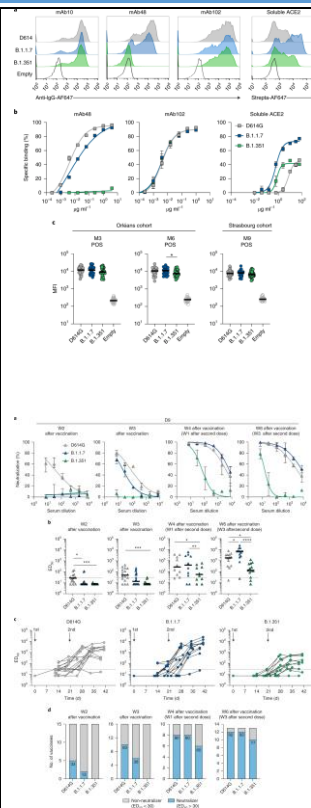
Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies

Planas D et al. France.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33772244>

Eficácia da vacina BNT162b2 contra as variantes D614G, B1.1.7 e B.1.351

- Prévio: As variantes do SARS-CoV-2 B.1.1.7 e B.1.351 foram identificadas pela primeira vez no Reino Unido e na África do Sul, respectivamente, e desde então se espalharam por muitos países. Essas variantes que abrigam diversas mutações no gene que codificam a proteína *spike* levantam preocupações importantes sobre seu potencial de evasão imunológica.
 - Objetivo: Isolar cepas infecciosas de B.1.1.7 e B.1.351 de indivíduos gravemente infectados e depois examinar a sensibilidade das duas variantes aos anticorpos SARS-CoV-2 presentes em swabs nasais e no soro de indivíduos infectados com cepas circulantes anteriormente ou que foram recentemente vacinados (2 doses; Pfizer Cominarty/BNT162b2), em comparação com um vírus de referência D614G.
 - Métodos:
 -> Utilizado um novo ensaio de neutralização rápida, baseado em células repórteres que se tornam positivas para GFP (*green fluorescent protein*) após infecção *overnight*. O número de células GFP+ foi correlacionado com o inóculo viral.
 -> Neutralizar os anticorpos monoclonais SARS-CoV-2 (mAbs) direcionados ao RBD pode ser





classificado em quatro categorias principais.

-> Usando o ensaio S-Fuse, testada a sensibilidade das três cepas virais para dois anticorpos RBD, mAb102 e mAb48, derivados de indivíduos convalescentes.

-> Ligação de anticorpos monoclonais ou ECA2 solúvel: as células HEK293T foram transitoriamente transfectadas com plasmídeos expressando as proteínas D614G, B.1.1.7 e B.1.351 S. Após 24 h, as células foram marcadas com anticorpo SARS-CoV-2 mAb10 (um anticorpo pan-coronavírus), mAb48, mAb102 ou ECA2 solúvel (ECA2-biotina a 10 µg ml⁻¹ revelada com streptavidina fluorescente) e analisada por citometria de fluxo.

- Resultados:

-> Os anticorpos pertencem à primeira categoria e agem bloqueando a vinculação da conformação 'up' do RBD à ECA2. MAb102 neutralizou eficiente e da mesma forma as três cepas virais, com um IC₅₀ de ≈0,01 µg ml⁻¹. MAb48 neutralizou D614G (IC₅₀ de 0,1 µg ml⁻¹), mas foi inativo contra as variantes B.1.1.7 e B.1.351. Esses resultados confirmam que as duas variantes podem exibir seletivamente sensibilidade reduzida a certos anticorpos. Note-se que a atividade dos anticorpos monoclonais foi semelhante em diferentes inoculações virais, dentro de uma faixa de 50 a 200 células GFP+ por poço, indicando que variações potenciais no número de células S-Fusíveis infectadas não impactam no cálculo da IC₅₀.

-> Assim, o soro de 58 indivíduos convalescentes coletados até 9 meses após os sintomas, neutralizaram B.1.1.7 e D614G.

-> Em contrapartida, após 9 meses, o soro convalescente apresentou redução média de seis vezes nos títulos neutralizantes, e 40% das amostras não tinham atividade contra B.1.351.

-> Os soros de 19 indivíduos vacinados

duas vezes com a Pfizer Cominarty (BNT162b2), longitudinalmente testados até 6 semanas após a vacinação, foram igualmente potentes contra B.1.1.7, mas menos eficazes contra B.1.351, quando comparados ao D614G.

-> Os títulos neutralizantes aumentaram após a segunda dose da vacina, mas permaneceram 14 e 53 vezes mais baixos contra B.1.351 quando comparado com a atividade contra as variantes D614G e B.1.17, respectivamente.

-> Na semana 3 após a vacinação, 63%, 38% e 0% das amostras neutralizaram as cepas D614G, B.1.1,7 e B.1,351, respectivamente. Na semana 6 (3 semanas após a 2ª dose), 92% das amostras neutralizaram D614G e B.1,1,7, enquanto 77% neutralizaram B.1,351 com baixo título.

-> O ensaio S-Flow demonstrou a presença de anticorpos ligados às três proteínas S nos diferentes tempos de amostragem. Portanto, a vacina Pfizer Cominarty gerou uma resposta neutralizante que visava eficientemente d614G e B.1.1.7 com um atraso no aparecimento de anticorpos neutralizantes para B.1.1.7 e B.1.351 em relação ao D614G. Os títulos permaneceram mais baixos contra B.1.351, mesmo em respondentes. A vacina apresenta uma eficácia protetora contra a COVID-19 logo após 2 semanas após a primeira dose.

-> Os resultados sugerem que os títulos de baixa neutralização (ED_{50} de 50-100) no soro podem corresponder à proteção observada contra doenças graves.

-> Pouco se sabe sobre os níveis e a função dos anticorpos induzidos pelas vacinas em amostras mucosas. Assim, foi avaliada a atividade neutralizante e os níveis de anticorpos em swabs nasais da série de receptores de vacinas. No entanto, não foi detectado nenhum efeito antiviral nessas amostras em

todos os pontos de tempo (até 6 semanas após a vacinação. Este dado indica que a análise da resposta imune ao SARS-CoV-2 não deva ser avaliada por esta metodologia.

- Conclusões:

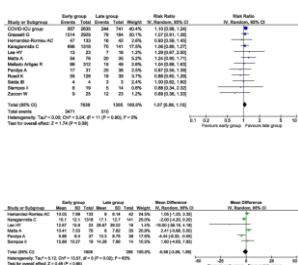
-> Assim, as variantes SARS-CoV-2 de disseminação mais rápida adquiriram uma resistência parcial à neutralização de anticorpos gerados pela infecção natural ou vacinação, que foi mais frequentemente detectada em indivíduos com baixos níveis de anticorpos.

-> Os resultados indicam que a variante B1.351, mas não a variante B.1.1.7, pode aumentar o risco de infecção em indivíduos imunizados.

Crit Care
25MAR2021

Effect of timing of intubation on clinical outcomes of critically ill patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis of non-randomized cohort studies

Papoutsis E et al.
Greece & USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33766109/>



Ausência de diferença nos desfechos clínicos de pacientes com intubação precoce ou tardia

- Prévio: Embora várias diretrizes internacionais recomendem a intubação precoce em relação à tardia de pacientes com COVID-19, essa questão ainda é controversa.

- Objetivo: Investigar o efeito do momento da intubação sobre os resultados clínicos de pacientes com COVID-19 grave, realizando uma revisão sistemática e meta-análise.

- Métodos:

-> PubMed e Scopus foram sistematicamente pesquisados, enquanto referências e servidores de pré-impressão foram explorados, para artigos relevantes até 26 de dezembro de 2020, para identificar estudos que relataram sobre mortalidade e/ou morbidade de pacientes com COVID-19 submetidos a intubação precoce versus tardia. "Precoce" foi definido como intubação dentro de 24 horas da admissão na unidade de terapia intensiva (UTI), enquanto "tardio" como intubação a qualquer momento após 24 horas da admissão na UTI.

-> Desfechos primários da meta-análise: mortalidade por todas as causas e duração da ventilação mecânica (VM) primários.

-> Razão de risco agrupada (RR), diferença média agrupada (MD) e

intervalos de confiança de 95% (IC) foram calculados usando um modelo de efeitos aleatórios. A meta-análise foi registrada com PROSPERO (CRD42020222147).

- Resultados:

-> N=12 estudos, envolvendo 8.944 pacientes com COVID-19 grave.

-> Não houve diferença estatisticamente detectável na mortalidade por todas as causas entre os pacientes submetidos à intubação precoce e tardia (3981 mortes; 45,4% versus 39,1%; RR 1,07, IC 95% 0,99-1,15, p=0,08).

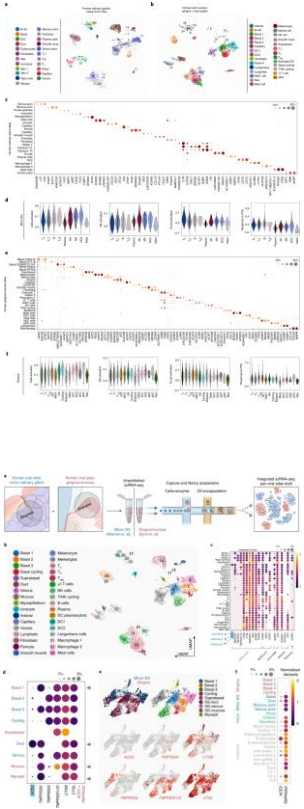
-> Este também foi o caso para a duração da VM (1892 pacientes; DM - 0,58 dias, IC 95% - 3,06 a 1,89 dias, p=0,65).

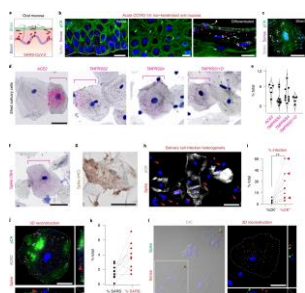
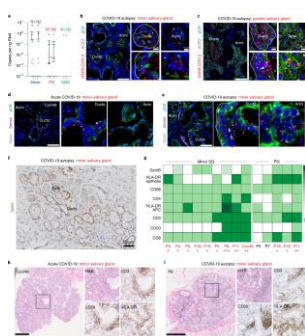
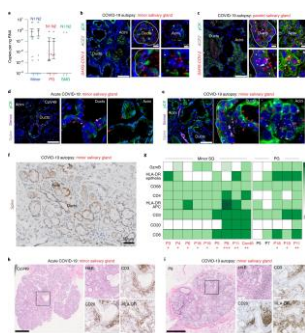
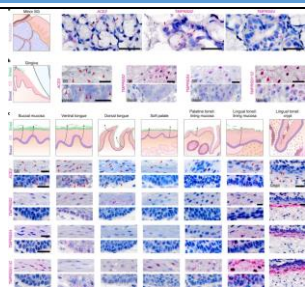
-> Análise de sensibilidade usando uma definição alternativa de intubação precoce/tardia, ausência de intubação versus ensaio prévio com cânula nasal de alto fluxo ou ventilação mecânica não invasiva: não observada diferença estatisticamente detectável na mortalidade por todas as causas (1128 mortes; 48,9 % versus 42,5%; RR 1,11, IC 95% 0,99-1,25, p = 0,08).

-> Desfechos secundários:

(i) Tempo de internação na UTI: cinco estudos forneceram dados sobre o tempo de permanência na UTI. Foi detectada considerável heterogeneidade estatística ($I^2=78\%$). Não houve diferença estatisticamente detectável entre os pacientes submetidos à intubação precoce e tardia em relação ao tempo de permanência na UTI (433 pacientes; DM - 1,83 dias, IC 95% - 6,05 a 2,38 dias, p = 0,39).

(ii) Terapia de reposição renal: cinco estudos forneceram dados sobre a terapia de substituição renal. Nenhuma heterogeneidade estatística foi detectada ($I^2=0\%$). A necessidade de terapia de substituição renal foi comparável entre os grupos de intubação precoce e tardia (547 pacientes; 30,3% versus 29,0%; RR

			<p>1,04, IC 95% 0,83-1,29, p = 0,75).</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> A evidência sintetizada sugere que o momento da intubação pode não ter efeito sobre a mortalidade e morbidade de pacientes criticamente doentes com COVID-19. Esses resultados podem justificar uma abordagem “de esperar para ver”, o que pode levar a menos intubações. Portanto, as diretrizes relevantes podem precisar ser atualizadas.</p>
<p>Nat Med 25MAR2021</p>	<p>SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva</p>	<p>Huang N et al. USA. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33767405/</p> 	<p>A cavidade oral participa ativamente da transmissão do SARS-CoV-2</p> <p>- Prévio: Apesar dos sinais de infecção, incluindo perda de paladar, boca seca e lesões na mucosa, como ulcerações, enantema e máculas, o envolvimento da cavidade oral na COVID-19 requer mais investigação.</p> <p>-> As glândulas salivares e a barreira da mucosa da cavidade oral e orofaringe são prováveis portas de entrada para infecção viral, replicação e transmissão. A mucosa da cavidade oral é revestida por epitélios escamosos estratificados, divididos em mucosas queratinizadas (gingiva e palato duro) e não queratinizadas (bucal, labial, língua ventral e orofaríngea). A mucosa dorsal da língua é adaptada ao paladar e contém projeções especializadas (papilas); além disso, toda a cavidade oral é banhada por saliva que lubrifica e protege a mucosa subjacente</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Geração e análise de dois conjuntos de dados do sequenciamento do RNA de célula única das glândulas salivares menores humanas e gengiva (9 amostras, 13.824 células), identificando 50 agrupamentos de células.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> Usando a normalização e anotação de células integradas, classificadas 34 subpopulações celulares exclusivas entre as glândulas salivares e a gengiva.</p> <p>-> O compartimento epitelial das glândulas salivares continha os principais tipos de células, incluindo ácinos serosos (LPO e ODAM), ácinos mucosos (MUC5B e BPIFB2), dutos (S100A2 e WFDC2), uma população epitelial ductal/basal (KRT15 e SOX2), mioepitélios (KRT14) e ACTA2) e células neuroendócrinas (CHGA e GFRA3). Ionócitos (CFTR e FOXI1) foram encontrados nas glândulas salivares em maior proporção do que relatos do pulmão; essas células regulam a composição iônica das secreções. O compartimento do tecido conjuntivo consistia em fibroblastos (DCN e LUM), endotélio - arterial (CLDN5), vênulas (AQP1) e capilares (CA4) - músculo liso (ITGA8) e pericitos (MYO1B). Oito populações distintas de células imunes foram</p>



identificadas e consistiam em uma alta proporção de células plasmáticas IgA +, linfócitos B (MS4A1), linfócitos T auxiliares (Th) (CD40LG) e dois subtipos de Tc citotóxicos (linfócitos T (CD8A) - subtipo 1 (EOMES e GMZA, tipo exausto) e subtipo 2 (SPRY1 e ITAG1, tipo de memória residente em tecido). O compartimento derivado das células mieloides incluiu subpopulações de DC2 convencional (CD1C) e dois tipos de macrófagos - tipo 1 (CD163; M1) e tipo 2 (FCGR3A, IFNGR1 e CX3CR1; M2). Digno de nota, as células M2 eram CD86 + TNF + e uma minoria dos subtipos Tc eram IFNG +, embora nem M2 nem Tc exibissem assinaturas de ativação usando análise de enriquecimento de conjunto de genes (Banco de Dados de Assinaturas Moleculares (MsigDB)).

-> A gengiva pode servir como um indicador da saúde bucal global. Usando biópsias gengivais saudáveis, o atlas de mucosa contribuiu para a identificação de 15 subpopulações imunológicas. Cinco populações de células dendríticas foram identificadas, incluindo células dendríticas convencionais subtipo 1 (XCR1) e 2 (CD300E), células dendríticas ativadas (CCR7 + e LAMP3), células dendríticas plasmocitoides (PACSIN1) e células de Langerhans residentes no epitélio (CD207). Entre os linfócitos T, linfócitos T citotóxicos (Tc; CD8A), linfócitos T auxiliares (Th; CD40LG), linfócitos T reguladores (Treg; LAIR2), linfócitos T $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$; KLRC4), linfócitos T invariantes associados à mucosa (MAIT) (IL23R) e um subconjunto de ciclagem (KI67) foram catalogados. Uma fração (aproximadamente 20-30%) das células MAIT expressou TNF; uma fração (~ 30%) dos clusters de ciclagem e Tc expressavam IFNG e eram CD95 + (receptor Fas). Essas células também não apresentaram perfis de ativação imune, apontando para um estado de repouso/homeostático.

-> Quatro populações de células epiteliais basais (Basal 1-4) foram descobertas, definidas pela expressão enriquecida de CXCL14, KRT19, COL7A1 e DSC2/3, respectivamente. As células que expressam KRT19 definem o epitélio de "bolsa" da gengiva não queratinizada. As células suprabasais eram esparsas neste conjunto de dados. Em COVID-19, os epitélios de barreira estão especialmente sob risco de infecção. Esses dados revelam que, entre muitas populações de células de barreira oral, a diversidade de células epiteliais orais fornece vários alvos disponíveis para a infecção viral.

-> Os fatores de entrada viral do SARS-CoV-2, como membros da ECA2 e do TMPRSS, foram amplamente enriquecidos nas células epiteliais

das glândulas salivares e da mucosa oral.

-> Usando RNA ortogonal e avaliações de expressão de proteínas, confirmada a infecção pelo SARS-CoV-2 nas glândulas salivares e mucosas.

-> O SARS-CoV-2 pode infectar e replicar nas glândulas salivares e nas mucosas: avaliados os transcritos do SARS-CoV-2 por reação em cadeia da polimerase digital de gotículas (ddPCR) em uma coorte de tecidos de autópsia COVID-19 de 28 locais das glândulas salivares e seis locais da mucosa de 18 pacientes. O SARS-CoV-2 foi detectado em 57% das glândulas (16/28) com uma tendência a cargas virais mais altas nas glândulas salivares menores do que nas parótidas (n=8 pares, P = 0,0625, Wilcoxon dois- teste de classificação com sinais laterais). Infecção por SARS-CoV-2 das glândulas submandibulares também foi observada em dois casos. A infecção por SARS-CoV-2 de células de revestimento da mucosa oral foi observada em dois conjuntos de tecidos de pacientes com autópsia (P11 e P23), onde 5/6 dos locais de mucosa disponíveis (língua dorsal, amígdala e úvula) exibiram SARS-CoV-2 detectável por ddPCR.

-> A saliva de indivíduos infectados com SARS-CoV-2 abrigava células epiteliais exibindo expressão da ECA2 e TMPRSS e infecção sustentada do SARS-CoV-2.

-> Constatou-se que as frações salivares acelulares e celulares de indivíduos assintomáticos transmitem o SARS-CoV-2 ex vivo.

-> Cinética de anticorpos específicos de vírus na saliva: dados da literatura já documentaram uma queda rápida dos anticorpos IgA e IgM e títulos estáveis de anticorpos IgG em amostras de saliva até 15 semanas após a infecção. No estudo atual de coorte prospectiva, anticorpos IgG salivares foram detectados para o nucleocapsídeo dos antígenos virais e spike em 73% (22/30) e 54% (15/28) das amostras, respectivamente, em indivíduos recuperados precocemente com COVID-19, com anticorpos anti-spike se desenvolvendo mais tarde do que os anticorpos anti-nucleocapsídeo. Anticorpos anti-nucleocapsídeo e anti-spike na saliva e soro exibiram concordância moderada (n=10, kappa: 0,588, P=0,0651) e forte (n=9, kappa: 0,781, P=0,0164 bilateral), respectivamente.

-> Vários dos indivíduos com anticorpos anti-nucleocapsídeo e anti-spike foram aqueles com positividade de RNA viral prolongada na nasofaringe e saliva, sintomas moderados e infecção do tecido oral. Esses dados apóiam ainda que a infecção por SARS-CoV-2 pode desencadear respostas imunológicas locais sustentadas na saliva.

- Conclusões:

-> Coletivamente, esses dados mostram que a cavidade oral é um local importante para a infecção pelo SARS-CoV-2 e indica a saliva como uma rota potencial de transmissão do SARS-CoV-2.

-> Amostras de nasofaringe e saliva combinadas exibiram uma dinâmica de eliminação viral distinta e a carga viral salivar correlacionada com os sintomas da COVID-19, incluindo perda de paladar.

-> Após a recuperação, esta coorte assintomática exibiu anticorpos IgG salivares sustentados contra SARS-CoV-2.

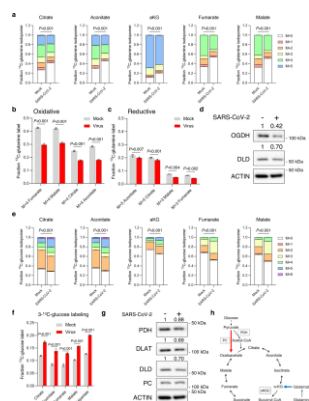
-> Considerando a infecção oral pelo SARS-CoV-2 e a facilidade de transmissão da saliva, continua sendo fundamental para uma maior compreensão dos modos dominantes de disseminação viral em todo o espectro de indivíduos assintomáticos, pré-sintomáticos e sintomáticos. A transmissão assintomática do SARS-CoV-2 continua sendo o 'calcanhar de Aquiles' desta pandemia e, devido à localização anatômica periférica e à exposição frequente dos tecidos orais ao ambiente externo, é possível que esses tecidos desempenhem um papel importante na propagação assintomática do SARS-CoV-2. Em conjunto, isso levanta a possibilidade de que a cavidade oral participe ativamente da transmissão do SARS-CoV-2.

Nat Commun 25MAR2021

SARS-CoV-2 infection rewires host cell metabolism and is potentially susceptible to mTORC1 inhibition

Mullen PJ et al. USA. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33767183/>

Inibidores de mTOR tem potencial terapêutico na COVID-19?



Précio: Os vírus sequestram o metabolismo da célula hospedeira para adquirir os blocos de construção necessários para a replicação. Compreender como o SARS-CoV-2 altera o metabolismo da célula hospedeira pode levar a potenciais tratamentos para COVID-19.

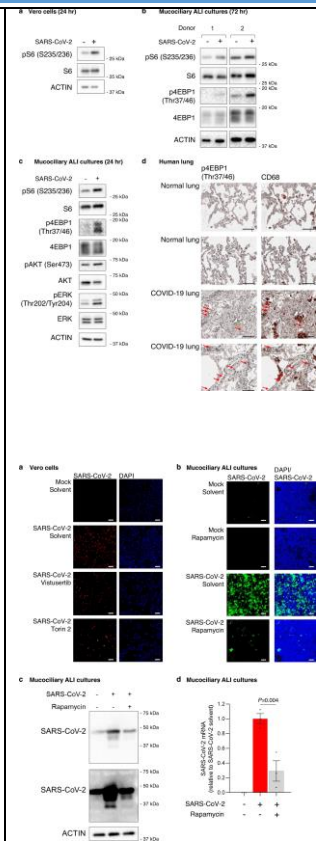
Objetivos: Traçar o perfil das alterações metabólicas conferidas pela infecção por SARS-CoV-2 em células epiteliais renais e culturas de interface ar-líquido do pulmão (ALI),

Resultados:

-> A infecção pelo SARS-CoV-2 aumenta a entrada da glicose-carbono no ciclo de TCA através do aumento da expressão da piruvato carboxilase.

-> O SARS-CoV-2 reduz o metabolismo oxidativo da glutamina enquanto mantém a carboxilação reductiva.

-> Consistente com essas mudanças, a infecção pelo SARS-CoV-2 aumenta a atividade da mTORC1 (aumento das proteínas downstream pS6 e p4EBP1; e



proteínas downstream pERK e pAKT) nas linhagens celulares e culturas do pulmão ALI.

-> Há evidências da ativação de mTORC1 no tecido pulmonar de pacientes com COVID-19 e os inibidores da mTORC1 (rapamicina, everolimus e temsirolimus; aprovados pelo FDA) reduzem a replicação viral nas células epiteliais renais (VeroE6) e culturas de ALI do pulmão.

-> Uma vez que foi demonstrado que macrófagos estão presentes nos pulmões de pacientes com COVID-19, foi realizada IHC para CD68, um marcador de macrófagos, para determinar se as células positivas para p4EBP1 nas biópsias pulmonares de COVID-19 eram macrófagos. Embora os autores observaram níveis aumentados de CD68 nos pulmões de COVID-19, não foi observada colocalização de p4EBP1 nas células positivas para CD68, sugerindo que as células com ativação de mTORC1 nas biópsias pulmonares de pacientes com COVID-19 não são macrófagos.

- Discussão:

-> Os resultados sugerem que alvejar mTORC1 pode ser uma estratégia de tratamento viável para pacientes com COVID-19, embora mais estudos sejam necessários para determinar o mecanismo de inibição e eficácia potencial em pacientes.

Lancet Infect Dis 24MAR2021

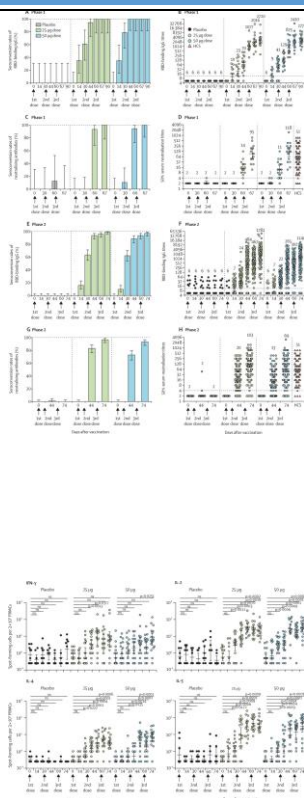
Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials

Yang S et al. China. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33773111/>

Segurança e eficácia da vacina ZF2001 (proteína quimérica do RBD)

- Prévio: Embora várias vacinas contra a COVID-19 tenham sido desenvolvidas até agora, elas não serão suficientes para atender à demanda global. O desenvolvimento de uma gama mais ampla de vacinas, com diferentes mecanismos de ação, poderia ajudar a controlar a disseminação do SARS-CoV-2 em todo o mundo.

-> Os autores relatam o desenvolvimento de uma vacina de subunidade de proteína contra COVID-19 usando uma forma dimerica do domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína spike SARS-CoV-2 como o



antígeno.

- Objetivo: Avaliar a segurança e imunogenicidade desta vacina, ZF2001, e determinar a dose apropriada e o cronograma para um estudo de eficácia.

- Métodos:

-> Dois ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos, controlados por placebo, fase 1 e fase 2.

-> A fase 1 foi realizada em dois hospitais universitários em Chongqing e Pequim, China, e a fase 2 foi realizada no Centro Provincial de Hunan para Controle e Prevenção de Doenças em Xiangtan, China.

-> Adultos saudáveis com idade entre 18-59 anos, sem história de infecção pelo SARS-CoV ou SARS-CoV-2, resultado do teste RT-PCR positivo para SARS-CoV-2, história de contato com casos confirmados ou suspeitos de COVID-19, e alergias graves a qualquer componente da vacina foram elegíveis.

-> Na fase 1, os participantes foram designados aleatoriamente (2: 2: 1) para receber três doses da vacina (25 µg ou 50 µg) ou placebo por via intramuscular, com 30 dias de intervalo.

-> Na fase 2, os participantes foram designados aleatoriamente (1: 1: 1: 1: 1) para receber a vacina (25 µg ou 50 µg) ou placebo por via intramuscular, com 30 dias de intervalo, em um esquema de duas ou três doses.

-> Os investigadores, participantes e a equipe do laboratório foram mascarados para a alocação do grupo.

-> Para a fase 1, o desfecho primário foi a segurança, medida pela ocorrência de eventos adversos e eventos adversos graves.

-> Para a fase 2, o resultado primário foi segurança e imunogenicidade (a taxa de seroconversão e a magnitude, em títulos médios geométricos [GMTs], de anticorpos neutralizantes de SARS-CoV-2).

-> As análises foram feitas com base na

intenção de tratar e por protocolo. Esses estudos estão registrados no ClinicalTrials.gov (NCT04445194 e NCT04466085) e o acompanhamento dos participantes está em andamento.

- Resultados:

-> Entre 22 de junho e 3 de julho de 2020, 50 participantes foram inscritos no ensaio de fase 1 e designados aleatoriamente para receber três doses de placebo (n = 10), a vacina de 25 µg (n = 20) ou a vacina de 50 µg (n = 20); média de idade: 32,6±SD 9,4 anos.

-> Entre 12 de julho e 17 de julho de 2020, 900 participantes foram inscritos no ensaio de fase 2 e designados aleatoriamente para receber duas doses de placebo (n=150), vacina de 25 µg (n=150) ou vacina de 50 µg (n=150), ou três doses de placebo (n=150), vacina de 25 µg (n=150) ou vacina de 50 µg (n=150); média de idade média 43,5±9,2 anos.

-> Na fase 1 e na fase 2, os eventos adversos relatados dentro de 30 dias após a vacinação foram leves ou moderados (grau 1 ou 2) na maioria dos casos (fase 1: seis [60%] de dez participantes no grupo placebo, 14 [70%] de 20 no grupo-25 µg e 18 [90%] de 20 no grupo-50 µg; fase 2: 37 [25%] de 150 no grupo placebo de duas doses, 43 [29%] de 150 no grupo-25 µg de duas doses, 50 [33%] de 150 no grupo-50 µg de duas doses, 47 [31%] de 150 no grupo placebo de três doses, 72 [48%] de 150 no grupo de três doses do grupo-25 µg e 65 [43%] de 150 no grupo-50 µg de três doses).

-> Na fase 1, dois (10%) eventos adversos de grau 3 ou piores foram relatados no grupo de 50 µg. Na fase 2, eventos adversos de grau 3 ou piores foram relatados por 18 participantes (quatro [3%] no grupo de vacina de duas doses de 25 µg, dois [1%] no grupo de vacina de duas doses de 50 µg, dois [1%] no grupo de três doses de placebo, quatro [3%] no grupo de três doses de vacina de 25 µg e seis

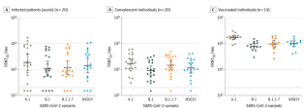
[4%] no grupo de três doses de vacina de 50 µg) e 11 foram considerados relacionados à vacina (dois [1%] no grupo de vacina de duas doses de 25 µg, um [1%] no grupo de vacina de duas doses de 50 µg, um [1%] no grupo de três doses de placebo, dois [1%] no grupo de três dose de 25 µg grupo de vacina e cinco [3%] no grupo de três doses de vacina de 50 µg); sete participantes relataram eventos adversos sérios (um [1%] no grupo de vacina de duas doses de 25 µg, um [1%] no grupo de vacina de duas doses de 50 µg, dois [1%] no grupo de três doses de placebo, um [1%] no grupo de vacina de três doses de 25 µg e dois [1%] no grupo de vacina de três doses de 50 µg), mas nenhum foi considerado relacionado à vacina.

-> Na fase 2, no esquema de duas doses, as taxas de seroconversão de anticorpos neutralizantes 14 dias após a segunda dose foram 76% (114/150 participantes) no grupo-25 µg e 72% (108/150) no grupo-50 µg; no esquema de três doses, as taxas de seroconversão de anticorpos neutralizantes 14 dias após a terceira dose foram de 97% (143/148 participantes) no grupo-25 µg e 93% (138/148) no grupo-50 µg.

-> Nos grupos de duas doses na fase 2, os GMTs neutralizantes do SARS-CoV-2 14 dias após a segunda dose foram 17,7 (IC95% 13,6-23,1) no grupo-25 µg e 14,1 (10,8-18,3) no grupo-50 µg.

-> Nos grupos de três doses na fase 2, os GMTs neutralizantes de SARS-CoV-2 14 dias após a terceira dose foram 102,5 (IC95% 81,8-128,5) no grupo-25 µg e 69,1 (53,0-90,0) no grupo-50 µg.

-> Para avaliar as respostas dos linfócitos T, no ensaio de fase 1, foram realizados ensaios ELISpot para PBMCs de participantes contra a proteína RBD SARS-CoV-2: As respostas dos linfócitos T-helper 1 (Th1) e T-helper 2 (Th2) foram

			<p>medidas para detecção das citocinas Th1 IFNγ e IL-2 e das citocinas Th2 IL-4 e IL-5. As doses de 25 μg e 50 μg levaram a níveis moderados da produção de citocinas Th1 (IFNγ e IL-2) e Th2 (IL-4 e IL-5) após as imunizações em comparação ao grupo placebo.</p> <p>- Discussão:</p> <p>-> A vacina de subunidade protéica ZF2001 parece ser bem tolerada e imunogênica.</p> <p>-> Os dados de segurança e imunogenicidade dos estudos de fase 1 e 2 apoiam o uso da dose de 25 μg em um esquema de três doses num estudo de fase 3 em andamento para avaliação em larga escala da segurança e eficácia da vacina ZF2001.</p>
<p>JAMA 19MAR2021</p>	<p>Neutralizing Antibodies Against SARS-CoV-2 Variants After Infection and Vaccination</p>	<p>Edara VV et al. USA. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33739374/</p> 	<p>Capacidade de neutralização reduz de acordo com as variantes do SARS-CoV-2</p> <p>- Prévio: Os anticorpos neutralizantes séricos aparecem rapidamente após a infecção pelo SARS-CoV-2 e vacinação e são mantidos por vários meses. O surgimento de variantes do SARS-CoV-2 levantou preocupações sobre a amplitude das respostas dos anticorpos neutralizantes.</p> <p>- Objetivo: Comparar a resposta do anticorpo neutralizante a 4 variantes em indivíduos infectados e vacinados para determinar como as mutações na proteína spike estão associadas à neutralização do vírus.</p> <p>- Métodos</p> <p>-> As amostras de soro foram obtidas de 3 grupos de indivíduos. Na Emory University, adultos hospitalizados com infecção pelo SARS-CoV-2 (reação em cadeia da polimerase confirmada) foram inscritos 5 a 19 dias após o início dos sintomas (julho de 2020). Indivíduos convalescentes infectados (reação em cadeia da polimerase ou teste de antígeno confirmado) foram inscritos 32 a 94 dias após o início dos sintomas (março a agosto de 2020). Amostras de soro não identificadas coletadas 14 dias após a segunda dose (coorte de 100 μg) de indivíduos no ensaio clínico de fase 1 de mRNA-</p>

12732 foram obtidas no National Institutes of Health.

-> Quatro variantes foram examinadas, escolhidas para representar a cepa SARS-CoV-2 original e variantes emergentes com mutações na proteína spike. A primeira variante, nCoV/USA_WA1/2020 (linhagem A.1), se assemelhava muito à cepa Wuhan original e à spike utilizada na vacina de mRNA-1273, e foi propagada a partir de um clone infeccioso do SARS-CoV-2.

-> A segunda variante, EHC-083E (linhagem B.1), contendo uma mutação D614G dentro da spike, era a cepa circulante predominante no momento do estudo e foi isolada de um swab nasofaríngeo residual de um paciente em Atlanta, Geórgia, em Março de 2020 (SARS-CoV-2/humano/EUA/GA-EHC-083E / 2020).

-> A terceira variante, B.1.1.7 (SARS-CoV-2/humano/EUA/CA_CDC_5574/2020), foi originalmente identificada no Reino Unido e é preocupante devido ao aumento da transmissibilidade. Continha várias mutações da spike e foi isolada do swab nasofaríngeo residual de um paciente em San Diego, Califórnia, em dezembro de 2020.

-> A quarta variante, o vírus N501Y SARS-CoV-2, contém uma mutação no domínio crítico de ligação ao receptor da spike que está presente em várias variantes emergentes, incluindo a variante B.1.1.7 neste estudo, foi gerado a partir de um clone infeccioso; Este vírus não é encontrado na natureza.

-> Testes de neutralização de redução de foco de vírus vivo (FRNTs) + títulos de FRNT50, que representam a diluição recíproca do soro que neutraliza 50% da entrada do vírus: interpolados com uma regressão não linear de 4 parâmetros e títulos médios geométricos (GMTs).

- Resultados:

-> N=20 pacientes com infecção aguda

de COVID-19 forneceram amostras de soro (média de idade 56,6 anos; 50% homens).

-> O FRNT50 GMT para a variante A.1 foi 186 (IC95%, 90-383); para B.1, 110 (IC95%, 57-209); para B.1.1.7, 116 (IC95%, 62-215); e para N501Y, 141 (IC95% CI, 74-269). A comparação do FRNT50 GMT das variantes não foi estatisticamente significativa.

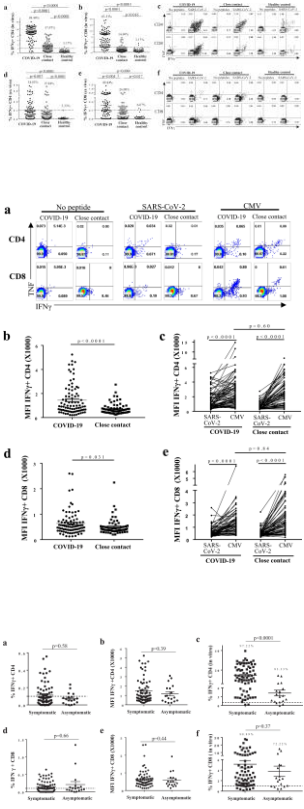
-> N=20 indivíduos convalescentes forneceram amostras de soro (média de idade 45 anos; 55% homens). O FRNT50 GMT para a variante A.1 foi 168 (IC95%, 113-249); para B.1, 91 (IC95%, 60-138); para B.1.1.7, 145 (IC95%, 96-220); e para N501Y, 145 (IC95%, 76-172). A comparação do FRNT50 GMT das variantes não foi estatisticamente significativa.

-> As amostras de soro estavam disponíveis para 14 indivíduos vacinados com mRNA-12732 (faixa etária, 18-55 anos; 43% homens). O FRNT50 GMT para a variante A.1 foi 1.709 (IC95%, 1412-2069); para B.1, 804 (IC95%, 632-1023); para B.1.1.7, 965 (IC95%, 695-1341); e para N501Y, 994 (IC95%, 777-1272). As comparações do FRNT50 GMT de B.1, B.1.1.7 e a variante N501Y não foram estatisticamente significativas. Os FRNT50 GMTs para as variantes B.1 ($P < 0,001$), B.1.1.7 ($P = 0,02$) e N501Y ($P = 0,02$) foram estatisticamente significativamente menores do que para a variante A.1.

- Discussão:

-> O estudo descreve atividade neutralizante de anticorpos induzidos pela infecção e vacina contra 4 variantes do SARS-CoV-2, incluindo B.1, B.1.1.7 e N501Y.

-> Como os estudos de neutralização medem a capacidade dos anticorpos de bloquear a infecção pelo vírus, esses resultados sugerem que a imunidade induzida pela infecção e pela vacina pode ser mantida contra a variante B.1.1.7. À medida que outras variantes

			<p>surgem, as respostas dos anticorpos neutralizantes após a infecção e vacinação devem ser monitoradas.</p>
<p>Nat Commun 19MAR2021</p>	<p>Exposure to SARS-CoV-2 generates T-cell memory in the absence of a detectable viral infection</p>	<p>Wang Z et al. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33741972/</p> 	<p>Exposição ao SARS-CoV-2 gera reposta de memória dos linfócitos T mesmo que não tenha havido infecção detectada previamente</p> <p>- Prévio: A imunidade dos linfócitos T é importante para a recuperação da COVID-19 e fornece imunidade contra a reinfeção. No entanto, pouco se sabe sobre a imunidade dos linfócitos T específicos para SARS-CoV-2 em indivíduos expostos ao vírus. -> Estudos recentes estabeleceram que a gravidade da COVID-19 se correlaciona inversamente com a imunidade dos linfócitos T do hospedeiro. Na presença de anticorpos neutralizantes adequados, os linfócitos T CD4 + e CD8 + desempenham um papel importante na recuperação de pacientes COVID-19 críticos. Outros estudos mostraram que em casos moderados e graves da COVID-19 caracterizados por linfopenia, houve uma redução drástica no número de linfócitos T CD4 + e CD8 +. Embora a razão para essa redução permaneça desconhecida, a autópsia revelou infiltração extensa de linfócitos T nos pulmões. A análise de células imunes do fluido do lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com COVID-19 demonstrou a presença da expansão clonal. Além disso, os números de linfócitos T CD4 + específicos para vírus estão associados à produção de IgG que tem como alvo o domínio de ligação ao receptor (RBD) do SARS-CoV-28. Notavelmente, análises de casos persistentes de COVID-19 mostraram que, após ativação, os linfócitos T pareciam perder polifuncionalidade e citotoxicidade, tendendo a um fenótipo exaurido.</p> <p>- Objetivo: Relatar a memória dos linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos para o vírus em pacientes com COVID-19 recuperados e dos contatos próximos.</p> <p>- Resultados: -> O tamanho e a qualidade do pool de linfócitos T de memória de pacientes com COVID-19 são maiores e melhores do que os de contatos próximos. -> Assim, para avaliar a memória dos linfócitos T específicos para SARS-CoV-2, células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) de 90 pacientes com COVID-19 coletadas entre 48-86 dias após o início da doença foram estimuladas in</p>

vitro por 10 dias com pools de peptídeos projetados para visar a glicoproteína de pico (S), glicoproteína de membrana (M), nucleocapsídeo (N), glicoproteína de envelope (E) e região ORF1ab da polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) de SARS-CoV-2.

-> Os dados mostraram que os linfócitos T CD4 + e CD8 + de memória de 94,44% e 83,33%, respectivamente, dos pacientes com COVID-19 foram submetidas à expansão com sucess. Estes resultados indicam claramente que a maioria dos pacientes COVID-19 recuperados desenvolveram pools de memória de linfócitos T eficazes contra SARS-CoV-2.

-> No entanto, a capacidade de proliferação, tamanho e qualidade das respostas de linfócitos T em contatos próximos são facilmente distinguíveis de doadores saudáveis, sugerindo que contatos próximos são capazes de ganhar imunidade de linfócitos T contra SARS-CoV-2, apesar da falta de uma infecção detectável.

-> Assim, os contatos próximos na coorte estudada eram todos negativos no teste de ácido nucleico (NAT) e na triagem de anticorpos SARS-CoV-2, a possível exposição desses indivíduos ao vírus pode ter levado à geração de imunidade de linfócitos T, mesmo na ausência de uma infecção bem-sucedida. Para testar essa possibilidade, realizado um ensaio de estimulação de peptídeo in vitro de 10 dias para 69 contatos próximos de 45 grupos de famílias. Os resultados mostram que 57,97% e 14,49% (Fig. 1b, c) dos contatos próximos continham linfócitos T CD4 + e CD8 + de memória específica para vírus, respectivamente. Notavelmente, todos os contatos próximos desenvolveram respostas em frequências inferiores a 4%, enquanto 64 (71,11%) e 32 (35,56%) dos 90 pacientes COVID-19 desenvolveram respostas marcadas em frequências superiores a 4% para linfócitos T IFN γ + CD4 + e linfócitos T IFN γ + CD8 +, respectivamente. Em comparação com os pacientes COVID-19, uma proporção significativamente menor de contatos próximos respondeu ($p < 0,0001$ para CD4+; $p < 0,0001$ para CD8+).

-> As principais diferenças entre a proporção de pacientes COVID-19 e doadores saudáveis ($p < 0,0001$ para CD4+;

p<0,0001 para CD8+), ou entre contatos próximos e doadores saudáveis (p<0,0001 para CD4+; p=0,0157 para CD8+) com linfócitos T de memória capazes de proliferar em resposta aos peptídeos SARS-CoV2 enfatizam que a exposição ao SARS-CoV-2 pode facilitar o estabelecimento da imunidade de memória T não apenas em pacientes COVID-19, mas também em alguns contatos próximos, mesmo na ausência de uma infecção bem-sucedida.

-> Além disso, os pacientes com COVID-19 assintomáticos e sintomáticos contêm níveis semelhantes de linfócitos T de memória específicos para SARS-CoV-2.

-> Assim, PBMCs de 72 pacientes sintomáticos e 18 assintomáticos COVID-19 foram usados nos ensaios de expansão ex vivo e de 10 dias in vitro para avaliar os tamanhos, qualidades e capacidades de proliferação dos pools de linfócitos T de memória. Após a estimulação durante a noite por pools de peptídeos, 4/18 (22,22%) e 7/18 (38,89%) das amostras de pacientes assintomáticos com COVID-19 desenvolveram números detectáveis de linfócitos T CD4 + produtoras de IFN γ específicos para o SARS-CoV-2 e linfócitos T CD8 +, respectivamente. Para os pacientes sintomáticos COVID-19, 27/71 (35,23%) e 36/71 (50,70%) das amostras também desenvolveram linfócitos T CD4 + específicos para vírus e linfócitos T CD8 + específicos, respectivamente. Não houve diferença significativa nos tamanhos dos pools de linfócitos T de memória específicos para SARS-CoV-2 entre os pacientes COVID-19 sintomáticos e assintomáticos (p=0,58 para CD4 + e p=0,66 para CD8+). Enquanto isso, a análise ex vivo mostrou que a coloração MFI de IFN γ dos linfócitos T de memória (SARS-CoV-2-específicas) de pacientes assintomáticos e sintomáticos foi 1536,37 \pm 165,28 e 1182,18 \pm 219,92 para CD4+ e 636,54 \pm 56,25 e 578,47 \pm 102,37 para CD8+, respectivamente. Assim, não houve diferença significativa nas qualidades dos linfócitos T de memória entre os pacientes assintomáticos e sintomáticos (p=0,39 para CD4+ e p=0,44 para CD8+).

-> Em seguida, foi verificado se havia qualquer correlação entre a magnitude das

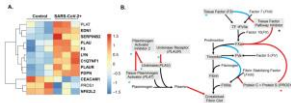
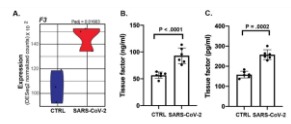
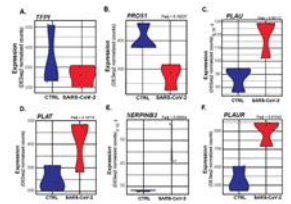
respostas dos linfócitos T (medidas por um ensaio de expansão in vitro) e o intervalo de tempo entre 48 e 86 dias após o início dos sintomas e não foi encontrada nenhuma relação entre os níveis de SARS-CoV-2-linfócitos T específicos (CD4 + e CD8 +) e o intervalo de tempo dentro deste período ($R^2=0,025$, $p=0,14$ para CD4+ e $R^2=0,005$, $p=0,52$ para CD8+). Enquanto isso, os dados também mostraram que não houve associação entre os níveis de linfócitos T de memória medidos por um ensaio ex vivo e o intervalo de tempo entre 48-86 dias após o início da doença ($R^2=0,064$, $p=0,021$ para CD4+ e $R^2=0,066$, $p=0,019$ para CD8+).

-> Desta forma, os dados in vitro e ex vivo sugerem que os linfócitos T de memória CD4+ e CD8+ podem ter atingido um patamar estável no momento em que essas amostras foram coletadas. Além disso, também não foi observada qualquer diferença entre os pacientes com COVID-19 grave e COVID-19 moderada na proporção de linfócitos T CD4 + ou CD8 + produtoras de IFN γ específicas para o SARS-Co-V2 expandidas in vitro ($p=0,71$ para CD4+ e $p=0,48$ para CD8+).

-> As respostas de linfócitos T CD4+ de memória se correlacionam com os títulos de IgG contra a proteína N e S RBD de SARS-CoV-2.

-> A resposta de anticorpos neutralizantes na infecção por MERS-CoV-2 foi anteriormente demonstrado ser dependente da resposta dos linfócitos T CD4+. Para determinar se isso também é verdadeiro para a infecção pelo SARS-CoV, foram realizadas análises de correlação entre os títulos de IgG (anti N e anti-RBD) e a magnitude dos linfócitos T de memória medidas por ensaios in vitro e ex vivo. Após a expansão in vitro, o pool de linfócitos T CD4+ de memória específica para vírus correlacionou-se com os títulos de IgG contra a região S RBD ($R^2=0,51$, $p<0,0001$) e a proteína N ($R^2=0,48$, $p<0,0001$), enquanto nenhuma correlação aparente entre linfócitos T CD8 + e títulos de IgG foi observada ($R^2=0,28$, $p<0,0001$, anti-S RBD IgG, e $R^2=0,28$, $p<0,0001$, anti-N IgG). No ensaio ex vivo, nenhuma correlação foi encontrada entre os linfócitos T CD4+ específicos do vírus e os títulos de IgG ($R^2=0,01$, $p=0,27$ anti-S

			<p>RBD IgG e $R^2=0,01$, $p=0,29$, anti-N IgG) ou os linfócitos T CD8+ específicos do vírus e títulos de IgG ($R^2=0,03$, $p=0,10$, anti-S RBD e $R^2=0,03$, $p=0,10$, anti-N IgG), indicando que, devido ao baixo número de linfócitos T específicos que podem ser detectados ex vivo na fase de memória, a expansão dos linfócitos T in vitro é necessária para para observar essas correlações.</p> <p>- Discussão:</p> <p>-> No geral, o estudo demonstra a versatilidade e o potencial dos linfócitos T de memória de pacientes com COVID-19 e contatos próximos, o que pode ser importante para a proteção do hospedeiro.</p>
--	--	--	--

<p>Am J Respir Cell Mol Biol 19MAR2021</p>	<p>Lung Epithelial Cell Transcriptional Regulation as a Factor in COVID-19 Associated Coagulopathies</p>	<p>FitzGerald ES et al. USA. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33740387/</p>  <p>Figure 1: The gene expression profile of differentially expressed genes within the enriched the regulation of blood coagulation GO term for SARS-CoV-2 infected NBE cells. (A) Heatmap of selected genes in the regulation of blood coagulation GO term. Bolded genes represent differentially expressed genes as calculated by DESeq2 (Padj < 0.5). (B) Pathway map of the intrinsic blood coagulation cascade (right) and the plasminogen activation system (left) with overlaid expression values. Blue asterisks indicate upregulation, black asterisks indicate no change, and red asterisks indicate down regulation.</p>  <p>Figure 2: (A) Violin plot depicting raw counts of reads mapping to key regulators of the extrinsic blood coagulation cascade in mock infected and SARS-CoV-2 infected NBE cells as performed by Blomqvist et al. Raw counts were normalized to library size in the DESeq2 software package. Adjusted P values for all differentially expressed genes were also calculated within DESeq2. Images were generated using GGPLOT2 in the R studio environment. (B-C) ELISA measurements quantifying tissue factor in lysate and supernatant respectively. Samples were isolated at 24 hours post-infection (MOI 2) in NBEs. Plotted values are the mean of 2 technical replicates + standard deviation. P values were determined using and reported two-tailed t-test.</p>  <p>Figure 3: Violin plots depicting raw counts of reads mapping to regulators of the plasminogen activation system in mock infected and SARS-CoV-2 infected NBE cells. Raw counts were normalized to library size in the DESeq2 software package. Adjusted P values depicting for significant differences were also calculated within DESeq2. Images were generated using GGPLOT2 in the R studio environment.</p>	<p>Análise do transcriptoma das células epiteliais pulmonares demonstram hiperativação do sistema de coagulação, mas não nos PBMCs</p> <p>- Prévio: O SARS-CoV-2 tornou-se rapidamente uma pandemia global. Além dos sintomas pulmonares agudos da COVID-19, as coagulopatias pulmonares e distais causaram morbidade e mortalidade em muitos pacientes. Atualmente, a patogênese molecular subjacente às coagulopatias associadas à COVID-19 é desconhecida. Desta forma, identificar a base molecular de como o SARS-CoV-2 conduz a coagulação é essencial para mitigar os riscos trombóticos de curto e longo prazos de pacientes com COVID-19 doentes e recuperados.</p> <p>- Objetivo: realizar a análise do transcriptoma focada na coagulação de células epiteliais respiratórias primárias infectadas in vitro, células do lavado bronco-alveolar derivadas de pacientes (BALF) e células imunes circulantes durante a infecção pelo SARS-CoV-2.</p> <p>-> Identificar também as vias de sinalização mediadas pela transcrição que conduzem coagulopatias associadas à COVID-19.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Análise dos conjuntos de dados de sequenciamento do RNA de célula única ou em massa recentemente publicados experimentalmente e clinicamente relacionados à infecção pelo SARS-CoV-2 para identificar mudanças na regulação da transcrição da coagulação do sangue. Análise dos</p>
--	---	---	--

transcriptomas do BALF e dos PBMC.

-> Experimentos in vitro de infecção pelo SARS-CoV-2 em células epiteliais de pulmão humano primárias (normal human bronchial epithelial [NHBE] cells) para confirmar que a suprarregulação da transcrição e tradução do *Tissue Factor*, o regulador mestre da cascata de coagulação extrínseca

- Resultados:

-> Análise especificamente de genes expressos no tecido pulmonar que regulam a cascata de coagulação extrínseca e o sistema de ativação do plasminogênio nas células epiteliais brônquicas humanas normais (NHBE) infectadas in vitro e amostras BALF derivadas de pacientes: revelou que a infecção pelo SARS-CoV-2 induz a cascata extrínseca de coagulação do sangue e suprime o sistema de ativação do plasminogênio.

-> Experimentos in vitro de infecção pelo SARS-CoV-2 em células epiteliais do pulmão humano primárias: confirmam que a suprarregulação transcricional do *Fator de Tecido*, o regulador mestre da cascata de coagulação extrínseca, está aumentado no nível da proteína.

-> Estes incluem a regulação positiva de genes de pró-coagulação, como F3 (TF), SERPINA10 e SERPINB2, e regulação negativa de genes de anticoagulação, como PROS1 e PLAU e PLAT. Além disso, PROCR, que codifica um receptor que aumenta a inibição a atividade da proteína S e da proteína C foi suprimida no BALF de pacientes com COVID-19. Ao contrário do perfil de expressão nas NHBE, há aumento da expressão de TFPI e PLAT no BALF de pacientes com COVID-19, indicando algum antagonismo de hipercoagulação. No entanto, coagulopatias observadas em alguns pacientes COVID-19 indicam que esta sinalização pode ser insuficiente para prevenir hipercoagulação.

-> Além disso, a infecção de NHBEs com o vírus influenza A (IAV) não induziu os principais reguladores da coagulação do sangue de maneira semelhante ao SARS-CoV-2.

-> Ademais, as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) não expressaram diferencialmente genes que regulam a cascata de coagulação extrínseca ou o sistema de ativação do plasminogênio durante a infecção pelo SARS-CoV-2, sugerindo que não estão induzindo diretamente a coagulopatia por essas vias.

-> A hiperativação da cascata extrínseca de coagulação sanguínea e a supressão do sistema de ativação do plasminogênio em células epiteliais infectadas com SARS-CoV-2 podem conduzir a diversas coagulopatias no pulmão e em sistemas de órgãos distais.

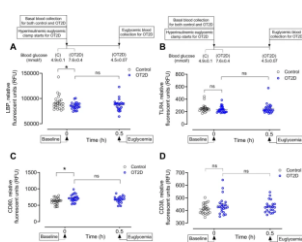
- Discussão:

-> Compreender como os hospedeiros conduzem tais mudanças transcricionais com infecção pelo SARS-CoV-2 pode permitir o desenho de estratégias terapêuticas dirigidas ao hospedeiro para tratar a COVID-19 e outros coronavírus que induzem hipercoagulação.

Sci Rep
19MAR2021

Identification of macrophage activation-related biomarkers in obese type 2 diabetes that may be indicative of enhanced respiratory risk in COVID-19

Moin ASM et al.
Qatar.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33742062/>



Ativação dos macrófagos em pacientes diabéticos mesmo após o controle glicêmico

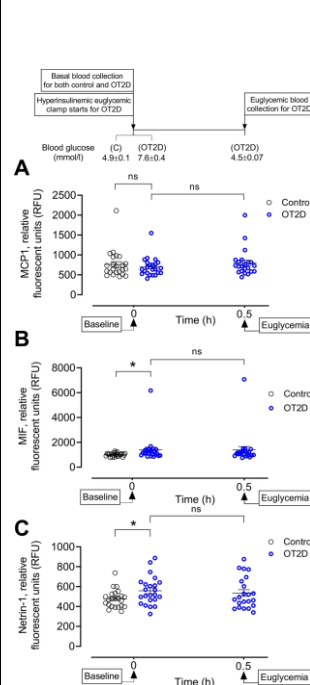
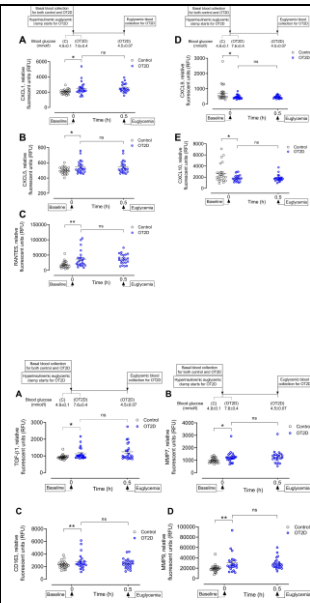
- Prévio: A hiperativação do sistema imunológico através da obesidade e diabetes pode aumentar a gravidade da infecção complicada pela Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS).

- Objetivo: Determinar os biomarcadores circulatórios para ativação de macrófagos na linha de base e após a normalização da glicose sérica em indivíduos obesos com DM tipo 2 (OT2D).

- Métodos:

-> Estudo piloto intervencionista controlado por caso em OT2D (n=23) e sujeitos de controle (n=23). Todos caucasiano e com idade de 40-70 anos.

-> Os indivíduos OT2D foram submetidos ao *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico para normalizar a



glicose sérica: a taxa de infusão de insulina foi constante em toda a fixação [área de superfície corporal de 60 mU/corpo (m²)/min], enquanto a taxa de infusão de 20% de dextrose foi ajustada a cada 5 minutos para atingir o nível de glicose no sangue alvo. A glicose basal para OT2D foi 7,6±0,4 mmol/l (136,8 ± 7,2 mg/dl), reduzida a 4,5±0,07 mmol/l (81±1,2 mg/dl) com o clamp por 1^h. Para os controles, a glicemia foi mantida em 4,9±0,1 mmol/l (88,2 ± 1,8 mg/dl).

-> As proteínas plasmáticas relacionadas ao macrófago foram determinadas usando a medição da proteína plasmática de aptamer modificado de slow off-rate no basal (controle e sujeitos OT2D) e após 1^h do clamp de insulina (somente sujeitos OT2D).

-> A ativação basal do macrófago M1 foi caracterizada por níveis elevados de proteínas superficiais específicas do macrófago M1, CD80 e CD38, e citocinas ou quimiocinas (CXCL1, CXCL5, RANTES) liberadas por macrófagos M1 ativados.

-> Macrófagos M2 ativados foram caracterizados por níveis elevados de plasma CD163, TFGβ-1, MMP7 e MMP9.

- Resultados:

-> Estímulos pró-inflamatórios para diferenciação monócito a macrófago não foram alterados nos indivíduos OT2D: Os níveis plasmáticos de IFN-γ não foram diferentes em OT2D versus controles (676±62 vs 610±20 unidades fluorescentes relativas [RFU] de IFN-γ, OT2D vs controle, p=ns).

-> Os níveis plasmáticos de IL-4 e IL-13 também não foram diferentes em OT2D em comparação com o controle (294±10 vs 278±6 RFU de IL-4 e 598±23 vs 663±59 RFU de IL-13, OT2D vs controle, p=ns). Esses dados sugerem que não há uma resposta imune mediada por Th1 ou Th2 aumentada em indivíduos OT2D

(condição basal).

-> LPS plasmático estava alterado (um ativador de monócito pró-inflamatório para diferenciação de macrófago M1) em indivíduos OT2D: Macrófagos M1 classicamente ativados constituem a primeira linha de defesa contra patógenos intracelulares e, portanto, apresentam um alto nível de atividade fagocítica. Uma redução significativa da proteína de ligação de lipopolissacarídeo plasmático (LPS) foi encontrada em OT2D *versus* controles (85.311 ± 1453 vs 91.747 ± 3048 RFU de LBP, OT2D vs controle, $p < 0,05$) sugerindo ativação mediada por LPS de monócitos pró-inflamatórios para macrófagos M1 em OT2D.

-> Outra sugestão da ativação induzida pelo LPS de macrófagos M1 em OT2D foi demonstrada pela ausência da mudança nos níveis de TLR4 nos indivíduos OT2D (235 ± 11 vs 254 ± 13 RFU de TLR4, OT2D vs controle, $p = ns$) que sugeriu endocitose mediada pelo LPS elevado do TLR-4 em OT2D.

-> Dois potentes marcadores de ativação do macrófago M1, CXCL9 e CXCL10, estavam diminuídos em OT2D.

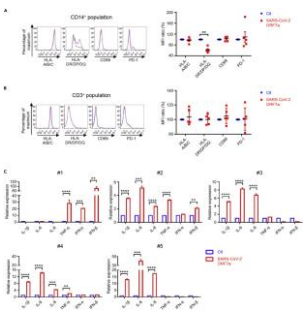
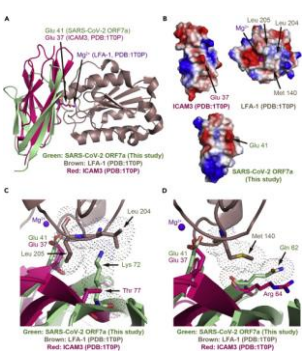
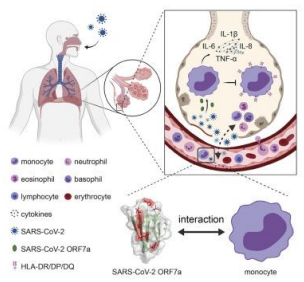
-> Os mediadores convencionais dos marcadores de ativação do macrófago M1 e M2 (IFN- γ , IL-4, IL-13) não foram alterados.

-> Não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos dos marcadores de ativação do macrófago M1/M2 nos indivíduos OT2D em resposta à normalização aguda da glicemia.

-> Marcadores solúveis relacionados à ativação de macrófagos de tecido adiposo (ATM) em OT2D: Uma vez que os indivíduos com DM2 neste estudo eram obesos, foram investigados marcadores circulatórios para ativação de macrófagos do tecido adiposo (ATMs) em OT2D. ATMs humanos são caracterizados por sua expressão de CD163 e, neste estudo, foi demonstrado que o nível de CD163 no plasma estava

				<p>aumentado em OT2D, sugerindo ativação de ATMs em OT2D. Para determinar se esses ATMs são derivados de monócitos circulantes, medimos a proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1, também conhecida como CCL2). Os achados indicaram que o nível circulatório de MCP-1 não diferiu em OT2D em comparação com o controle (698 ± 49 vs 760 ± 73 RFU de MCP-1, OT2D vs controle, $p=ns$), sugerindo redução ou nenhuma migração de macrófagos derivados de monócitos no tecido adiposo. Esta observação foi apoiada pelo nível de fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) que foi maior em OT2D (1387 ± 223 vs 1007 ± 29 RFU de MIF-1, OT2D vs controle, $p < 0,05$). Avaliado ainda o nível de netrin-1 para determinar se a ativação ATM é mediada por um modulador local. O nível de netrina-1 no plasma foi maior em OT2D (558 ± 30 vs 477 ± 19 RFU de netrin-1, OT2D vs controle, $p < 0,05$). Nenhuma mudança foi observada nos níveis plasmáticos de macrófagos do tecido adiposo em resposta à normalização aguda da glicemia nos indivíduos OT2D.</p> <p>- Conclusão:</p> <p>-> No estado basal, os marcadores de ativação do macrófago são elevados, e estes refletem a expressão de citocinas circulatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e metaloproteinases matricial em indivíduos obesos com diabetes tipo 2, que não foram alteradas pela normalização da glicose.</p> <p>-> Essas diferenças poderiam predispor potencialmente indivíduos diabéticos ao aumento da gravidade da infecção complicada pela síndrome do desconforto respiratório agudo.</p>
iScience 19MAR2021	Structural insight reveals SARS-CoV-2 ORF7a as an immunomodulating factor for human	Zhou Z et al. China. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33615195/	SARS-CoV-2 ORF7a imunomodula os monócitos CD14+	- Prévio: Respostas desreguladas das células imunes foram associadas à gravidade da COVID-19, mas os fatores virais específicos do SARS-CoV-2 relacionados a este processo são desconhecidos.

CD14⁺ monocytes



- Métodos e resultados:
 -> Semelhante ao SARS-CoV ORF7a, o SARS-CoV-2 ORF7a é uma proteína transmembrana do tipo I com 121 resíduos de aminoácidos, consistindo em uma região de sinalização N-terminal (resíduos 1–15), um ectodomínio semelhante a Ig (resíduos 16– 96), um domínio transmembranar hidrofóbico (resíduos 97-116) e um motivo de retenção ER típico (resíduos 117-121). O domínio da imunoglobulina foi encontrado em muitas outras proteínas com diversas funções biológicas, como adesão intercelular, identificação ou ligação.

-> Revelado que o ectodomínio semelhante à imunoglobulina da proteína viral SARS-CoV-2 ORF7a interage com alta eficiência com monócitos CD14 + no sangue periférico humano, em comparação com a proteína patogênica SARS-CoV ORF7a.

-> A estrutura cristalina do SARS-CoV-2 ORF7a com resolução de 2,2 Å revela três mudanças notáveis no lado anfipático da folha β de quatro fitas, implicando em uma interface funcional potencial da proteína viral.

-> A coincubação do SARS-CoV-2 ORF7a com monócitos CD14 + ex vivo desencadeou uma diminuição nos níveis de expressão de HLA-DR/DP/DQ e aumentou a produção significativa de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na “tempestade de citocinas”, incluindo IL-6, IL-1β, IL-8 e TNF-α. A expressão de HLA A/B/C não foi modificada.

- Discussão:
 -> O estudo demonstra que SARS-CoV-2 ORF7a é um fator imunomodulador para a ligação das células imunes e desencadeia respostas inflamatórias dramáticas, fornecendo alvos terapêuticos promissores para abordagem da COVID-19.

PloS One
19MAR2021

Validation of an admission

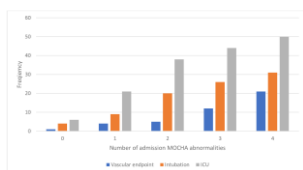
Alabyad D et al. USA. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

Validação dum painel de exames

- Prévio: Existem dados limitados sobre o perfil dos marcadores de coagulação e ativação

**coagulation panel
for risk
stratification of
COVID-19
patients**

m.nih.gov/33740793/



de coagulação
para estratificar o
risco de pacientes
com COVID-19

hemostática (*markers of coagulation and hemostatic activation*, MOCHA) e sua capacidade de identificar pacientes com COVID-19 em risco de eventos trombóticos e outras complicações.

- Métodos:

-> Pacientes hospitalizados com SARS-COV-2 confirmado de quatro hospitais de Atlanta foram incluídos neste estudo de coorte observacional e submetidos a testes de admissão de parâmetros MOCHA (dímero plasmático, fragmento de protrombina 1.2, complexo trombina-antitrombina, monômero de fibrina).

-> Desfechos clínicos: trombose venosa profunda, embolia pulmonar, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico, trombose de linha de acesso, admissão na UTI, intubação e mortalidade.

- Resultados:

-> De 276 pacientes (média de idade: $59 \pm 6,4$ anos, 47% mulheres, 62% afro-americanos), medianado IMC 30 (IQR, 26-37) kg/m^2 .

-> Comorbidades: hipertensão (59%), obesidade (n = 140, 51%) e diabetes (n = 108, 39%).

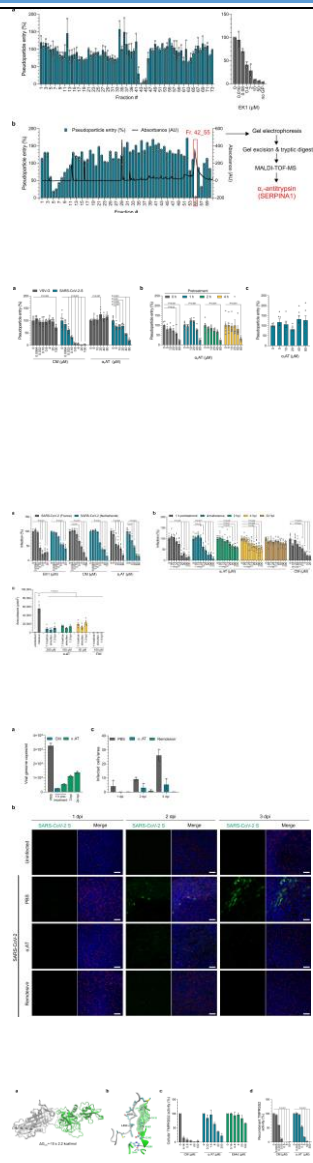
-> Mediana da internação: 10 dias (IQR: 6–19), incluindo 159 pacientes (58%) admitidos na UTI durante a internação, 90 (33%) que foram intubados. Na coorte, 241 (87%) pacientes tiveram alta, 31 (11%) morreram e 4 (1%) permaneceram internados até a data da censura.

-> 45 (16%) tiveram um desfecho trombótico: média de dias para o diagnóstico de um evento trombótico foi 7 dias (IQR: 2–15) a partir da admissão, com 32 (71%) desses eventos ocorrendo nas primeiras duas semanas de hospitalização. TVP ocorreu em 24 (8,7%) pacientes, EP em 8 (2,9%), IM em 4 (1,5%), acidente vascular cerebral isquêmico em 5 (1,8%) e trombose central ou de linha de diálise em 7 (2,5%) pacientes, sendo que 6 (2,2%) desenvolveram trombose da terapia de substituição renal e 1 (0,4%) paciente desenvolveu trombose do circuito de oxigenação por membrana extracorpórea. Três pacientes (1%) desenvolveram mais de uma dessas complicações.

-> No geral, 7 (2,5%) pacientes não tinham anormalidades MOCHA na admissão, 66 (24%) tinham uma anormalidade, 62 (23%) tinham duas anormalidades, 69 (25%) tinham três anormalidades e 72 (26,1%) tinham anormalidades em todos os quatro MOCHA; 217 pacientes (79%) tiveram um D-dímero anormal na admissão, 51 (19%) tiveram um D-dímero na admissão maior que 2.000 ng/ml e 40 (15%) tiveram um D-dímero na admissão maior que 3.000 ng/ml. Houve 115 (42%) pacientes que tinham um nível elevado do

				<p>fragmento 1,2 da protrombina, 185 (67%) com um nível elevado do complexo trombina-antitrombina e 167 (61%) com níveis elevados de monômero de fibrina. A frequência de eventos trombóticos, taxas de admissão na UTI e intubação aumentaram progressivamente com o número de anormalidades MOCHA</p> <p>-> Cada parâmetro MOCHA foi independentemente associado a um evento trombótico ($p < 0,05$) e ≥ 2 anormalidades foram associadas a desfechos trombóticos (OR 3,3, IC95% 1,2-8,8, $p=0,02$), assim como D-dímero de admissão ≥ 2000 ng/ml (OR 3,1, IC de 95% 1,5-6,6, $p=0,003$) e ≥ 3000 ng/ml (OR 3,6, IC de 95% 1,6-7,9, $p=0,002$).</p> <p>-> No entanto, apenas ≥ 2 anormalidades MOCHA foram associadas à admissão na UTI (OR 3,0, IC 95% 1,7-5,2) e intubação (OR 3,2, IC 95% 1,6-6,4).</p> <p>-> Na análise multivariada, os fatores associados a eventos trombóticos em 14 dias da admissão incluíram sexo masculino (OR 2,2, IC 95% 1,0-5,0; $p = 0,049$), MOCHA ≥ 2 anormalidades (OR 6,4, IC 95% 1,5-27,6; $p = 0,013$) e dímero D ≥ 2.000 ng / mL (OR 2,5, IC 95% 1,1-5,9; $p = 0,03$).</p> <p>-> Os pontos de corte de MOCHA e D-dímero não foram associados à mortalidade.</p> <p>-> MOCHA com <2 anormalidades (26% da coorte) teve 89% de sensibilidade e 93% de valor preditivo negativo para um desfecho trombótico.</p> <p>-> O nível de D-dímero D ≥ 2.000 ng/ml na admissão teve uma sensibilidade de 33% (VPN 87%) para um evento trombótico durante a hospitalização total, sensibilidade de 31% (VPN 90%) para um evento trombótico dentro de duas semanas de admissão e uma sensibilidade de 43% (VPN 94%) para TEV em duas semanas.</p> <p>-> Na análise univariada, MOCHA na admissão ≥ 2 anormalidades, história de acidente vascular cerebral, hipertensão, diabetes e IMC foram significativamente associados à mortalidade. Na análise multivariada, apenas o IMC permaneceu um preditor significativo de mortalidade (OR=1,04, IC95% 1,01-1,08; $p=0,02$).</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Um perfil MOCHA de admissão é útil para estratificar o risco de pacientes com COVID-19 para complicações trombóticas e mais eficaz do que o D-dímero isolado para prever o risco de admissão na UTI e intubação.</p>
Nat Commun 19MAR2021	Alpha-1 antitrypsin inhibits TMPRSS2 protease activity	Wettstein L et al. Germany. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33741941/	Alfa-1 antitripsina inibe a atividade da protease TMPRSS2 e a	<p>- Prévio: O SARS-CoV-2 é um patógeno respiratório e infecta principalmente o epitélio das vias aéreas.</p> <p>- Objetivo: Para ampliar o conhecimento sobre fatores imunes inatos do trato</p>

and SARS-CoV-2 infection



infecção pelo SARS-CoV-2

respiratório contra o SARS-CoV-2, foi gerada e rastreada uma biblioteca de peptídeos/proteínas derivada do lavado broncoalveolar para inibidores da entrada impulsionada pela proteína spike do SARS-CoV-2. A análise das frações antivirais revelou a presença de α 1-antitripsina (α 1AT), um inibidor de serina protease circulante altamente abundante.

- Métodos:

-> Para identificar os peptídeos e proteínas antivirais endógenos, foram extraídos polipeptídeos de 6,5 kg de pulmão humano homogeneizado ou 20 litros de lavado broncoalveolar agrupado (BAL) e realizada a separação por métodos cromatográficos. As frações correspondentes foram adicionadas a células de carcinoma colorretal epitelial humano (Caco2) e as células foram inoculadas com luciferase expressando pseudopartículas lentivirais portadoras da proteína spike do SARS-CoV-2.

- Resultados:

-> Nenhuma das frações da biblioteca pulmonar suprimiu a infecção. No entanto, as frações 42-45 da biblioteca BAL impediram a entrada induzida por pico de SARS-CoV-2 com uma eficiência comparável à de 10 μ M de EK1, um inibidor de fusão de peptídeo específico da spike do coronavírus. A titulação das frações de BAL 42-45 em células Caco2 confirmou a inibição dependente da dose de pseudopartículas da spike do SARS-CoV-2.

-> Para isolar o fator antiviral responsável pelo bloqueio da entrada impulsionada pela spike, a fração mãe BAL 42 foi separada cromatograficamente e as subfrações resultantes analisadas quanto à atividade antiviral. As subfrações 42_3 a 42_8 e 42_57 foram reduzidas e a subfração 42_55 impediu quase completamente a entrada na célula hospedeira de pseudopartículas da spike do SARS-CoV-2. A análise dessas frações inibitórias por eletroforese em gel revelou bandas de proteínas distintas nas subfrações 42_55 e 42_57, enquanto nenhuma proteína foi detectável nas subfrações 42_5 a 42_7. A subfração mais

ativa 42_55 continha uma banda proeminente em ~ 52 kDa, que também estava presente em outras frações ativas, mas dificilmente encontrada em frações vizinhas que não mostram atividade antiviral. Esta banda foi excisada do gel, digerida com tripsina e submetida a MALDI-TOF-MS revelando uma identidade de sequência de 100% para α 1-antitripsina (α 1AT; SERPINA1), um inibidor de protease de 52 kDa.

-> α 1AT: inibiu a entrada de SARS-CoV-2 em concentrações fisiológicas e suprimiu a replicação viral em linhagens celulares e células primárias, incluindo culturas epiteliais das vias aéreas humanas.

-> Para testar se a serpina realmente inibe SARS-CoV-2, as células Caco2 foram expostas a Prolastina, uma preparação farmacêutica da α 1AT, ou mesilato de camostat (CM), um inibidor da molécula da protease de iniciação da spike do SARS-CoV-2 TMRSS2. α 1AT e CM suprimiram a entrada da pseudopartícula de pico do SARS-CoV-2 com metade das concentrações inibitórias máximas (IC_{50}) de ~ 38,5 μ M para α 1AT e ~ 0,05 μ M para CM, respectivamente. Os ensaios de viabilidade celular mostraram que α 1AT não apresentou efeitos citotóxicos em concentrações de até 160 μ M (8,3 mg/ml), enquanto que o CM reduziu a viabilidade celular em concentrações de 200 μ M. A atividade antiviral da α 1AT e do CM foi específica para a spike do coronavírus porque a entrada de pseudopartículas carregando a proteína G de VSV não foi afetada. Tomados em conjunto, esses dados mostram que α 1AT visa especificamente a entrada impulsionada pelo pico de SARS-CoV-2.

-> α 1AT inibe a infecção e replicação de SARS-CoV-2: Para determinar se α 1AT inibe não apenas as pseudopartículas do spike, mas também o SARS-CoV-2 do tipo selvagem, examinada sua atividade contra dois isolados de SARS-CoV-2 da França (com a variante D614 do pico) e da Holanda (com a variante do pico adaptador G614). Para isso, avaliadas as taxas de sobrevivência das células Vero E6 que

expressam TMPRSS2 infectadas na ausência ou presença de EK1, CM ou α 1AT pelo ensaio MTS. Na ausência de drogas, a infecção por ambos os isolados de SARS-CoV-2 resultou em efeitos citopáticos induzidos pelo vírus (CPE) e redução da viabilidade celular em ~ 80%. A avaliação microscópica revelou a ausência de CPE na presença de altas concentrações de EK1, CM ou α 1AT, e o ensaio MTS confirmou uma inibição dependente da concentração de morte celular e replicação viral por EK1 e CM com valores médios de IC_{50} contra ambos os isolados de SARS-CoV-2 de 2,8 μ M para EK1 e 3,6 μ M para CM, respectivamente. α 1AT inibiu o isolado francês SARS-CoV-2 com um IC_{50} de 21,2 μ M (1,1 mg/ml), e a cepa holandesa com um IC_{50} de 17,3 μ M (0,9 mg/ml). O resgate quase completo da viabilidade celular foi observado em concentrações de α 1AT de 40–80 μ M. Uma atividade antiviral semelhante de α 1AT contra ambos os isolados de SARS-CoV-2 foi determinada em células Caco2.

-> α 1AT inibe a replicação do SARS-CoV-2 em células primárias das vias aéreas humanas: Para corroborar a atividade antiviral de α 1AT em células-alvo primárias humanas, utilizadas as células epiteliais de pequenas vias aéreas (SAECs) que apresentam a replicação do SARS-CoV-2. Para isso, SAECs pré-tratados apenas com tampão (PBS), 80 μ M de α 1AT ou 100 μ M de CM foram infectados com uma alta dose (MOI de 1) de SARS-CoV-2. Além disso, α 1AT foi adicionado 3 e 24 h após a infecção a células pré-tratadas com PBS. As células foram cultivadas na presença dos inibidores por 6 dias, e então as cópias do genoma viral nos sobrenadantes foram quantificadas pela RT-qPCR. Assim, CM e α 1AT presentes durante a infecção reduziram os títulos virais em ~ 92 e 83%, respectivamente. α 1AT que foi adicionado 3 e 24 h após a infecção também inibiu a replicação viral, embora em menor extensão (redução de 67 e 58%, respectivamente). Em seguida, analisada a atividade antiviral de α 1AT em células epiteliais primárias das vias aéreas

humanas totalmente diferenciadas (HAECs) cultivadas na interface ar-líquido. HAECs derivados de dois doadores foram tratados com 10 µM (0,5 mg/ml) de α1AT e depois expostos ao SARS-CoV-2. Como controle, utilizados 5 µM de remdesivir, que anteriormente demonstrou suprimir a replicação do coronavírus nas HAECs. Nos dias 1, 2 e 3 após a infecção, as células foram fixadas e coradas com anticorpos contra SARS-CoV-2 spike e α-tubulina como marcador para células ciliadas na superfície apical. Nas HAECs infectadas e tratadas com PBS, a expressão da spike do SARS-CoV-2 foi prontamente detectável, principalmente nas células ciliadas vizinhas, e aumentou entre os dias 2 e 3, demonstrando infecção produtiva e viral espalhar no epitélio. Os níveis de expressão da spike em culturas tratadas com α1AT e remdesivir foram bastante reduzidos nos dias 2 e 3 em ambos os doadores. Assim, α1AT suprime a infecção pelo SARS-CoV-2 nas HAECs.

-> Por fim, demonstrada que a α1AT inibe a atividade da TMPRSS2.

- Conclusão:
-> α1AT: liga e inativa a serina protease TMPRSS2, que prepara enzimaticamente a proteína spike do SARS-CoV-2 para fusão da membrana do hospedeiro.

-> Desta forma, a proteína de fase aguda α1AT pode desempenhar um papel importante na defesa imune inata contra o novo coronavírus. Os resultados sugerem que a redefinição de medicamentos contendo α1AT tem perspectivas para a terapia da COVID-19.

Transplantation
19MAR2021

Kidney Transplant Recipients Rarely Show an Early Antibody Response Following the First COVID-19 Vaccine Administration

Y SG et al. USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33741844/>

Table 1. Patients with anti-SARS-CoV-2 antibodies after first COVID-19 vaccine dose.

	Kidney transplant recipients (n = 148)	Kidney transplant patients (n = 311)	P
Anti-SARS-CoV-2 total antibody, n (%)	9 (6.2)	27 (8.7)	<0.001
Anti-SARS-CoV-2 IgG, n (%)	3 (2.0)	24 (7.7)	<0.001
COVID-19 anti-Spike antibody (IQR, n (%))	130 (88.5)	432 (91.9)	
<150	3 (2.3)	4 (0.9)	
150	4 (3.1)	13 (3.0)	
1500	1 (0.7)	3 (0.7)	
>11300	2 (1.5)	1 (0.2)	

Comparisons between groups were conducted using the chi-square or Fisher's exact tests as appropriate.

Pacientes transplantados: apresentam menor resposta da geração de anticorpos anti-SARS-CoV-2 após a vacinação

- Prévio: A disponibilidade e administração da vacina COVID-19 proporcionou uma visão otimista para a pandemia em receptores de transplante de órgãos sólidos (SOTR). Os relatórios de ensaios clínicos iniciais documentaram respostas sorológicas contra o SARS-CoV-2 após vacinação na população em geral. No entanto, não está claro se e quando os SOTR apresentam uma resposta de anticorpos

contra a COVID-19.

- Objetivo: Para entender a eficácia da vacina, realizado um estudo para determinar a resposta de anticorpos no momento de ambas as doses das vacinas Pfizer-BioNTech ou Moderna mRNA-1273.
- Métodos:
 - > Até o momento, foram vacinados 1130 SOTR no Houston Methodist Hospital, Houston, TX, EUA, dos quais 461 receberam 2 doses da vacina Pfizer-BioNTech ou Moderna mRNA-1273.
 - > Avaliada a presença da IgG anti-SARS-CoV-2 e do anticorpo total, além da IgG anti-SARS-CoV-2 Nucleocapsídeo e o título da IgG anti-spike.
 - > Coletados dados de anticorpos de pacientes com doença renal crônica (DRC) em lista de espera que receberam a vacina COVID-19.
 - > Aqueles com teste da PCR para COVID-19 positivo ou com anticorpos anti-SARS-CoV-2 no momento da primeira vacina foram excluídos da análise
- Resultados:
 - > 145 SOTR eram transplantados renais, com uma mediana de tempo de transplante de 5 anos (IQR 3,10).
 - > Dos 145 transplantados renais que receberam a primeira vacina COVID-19, apenas 6,2% mostraram uma resposta de anticorpos antes da segunda administração da vacina. 73% desses pacientes tinham anticorpos totais anti-IgG SARS-CoV-2, com 8 desenvolvendo títulos de anticorpos IgG anti-Spike variando de 1:50 a <1:450. Nenhum paciente demonstrou anticorpos IgG anti-nucleocapsídeo.
 - > Pelo contrário, entre os 31 pacientes com DRC em lista de espera que receberam a primeira dose da vacina,

87,1% produziram uma resposta de anticorpos no momento da segunda dose ($p < 0,05$). Os títulos de IgG anti-spike variaram de 1:50 a $> 1:1350$. Curiosamente, os 4 pacientes sem resposta de anticorpos foram mantidos em imunossupressão de baixa dose para controle da doença renal.

- Conclusões:

-> Transplantados renais ou aqueles mantidos em imunossupressão foram, em sua maioria, incapazes de montar uma resposta de anticorpos após uma única dose da vacina de mRNA COVID-19. Isso está em contraste com pacientes não imunossuprimidos em lista de espera com DRC, os quais foram capazes de mostrar uma resposta aos anticorpos.

-> Semelhante ao observado com outras vacinas, os resultados sugerem que esta resposta embotada à vacina COVID-19 pode estar associada ao estado imunossuprimido no transplante renal.

-> Estudos em andamento incluem vigilância contínua de anticorpos e avaliação do impacto de imunossupressão na resposta à vacina.

JAMA
18MAR2021

Effect of Intermediate-Dose vs Standard-Dose Prophylactic Anticoagulation on Thrombotic Events, Extracorporeal Membrane Oxygenation Treatment, or Mortality Among Patients With COVID-19 Admitted to the Intensive Care Unit: The INSPIRATION Randomized

INSPIRATION
Investigators. Spain, UK, Denmark, Iran & USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33734299>

Dose padrão e dose intermediária de anticoagulação e desfechos na COVID-19

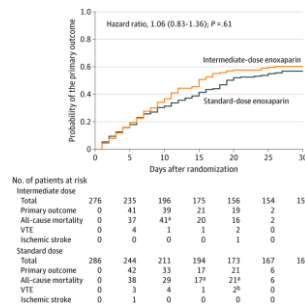
- Prévio: Eventos tromboticos são comumente relatados em pacientes com COVID-19 crítica. Existem dados limitados para orientar a intensidade da profilaxia antitrombótica.

- Objetivo: Avaliar os efeitos da anticoagulação profilática em dose intermediária versus dose padrão em pacientes com COVID-19 internados na UTI.

- Métodos:

-> Ensaio multicêntrico randomizado com um projeto fatorial 2×2 realizado em 10 centros acadêmicos no Irã comparando dose intermediária vs dose padrão anticoagulação profilática (primeira hipótese) e terapia com estatina vs placebo correspondente (segunda hipótese; não relatado neste artigo) entre pacientes adultos internados em UTI com COVID-19.

-> Os pacientes foram recrutados entre 29 de julho de 2020 e 19 de novembro de 2020. A data final de acompanhamento para o desfecho primário de 30 dias foi 19 de dezembro de 2020.



Clinical Trial

	Intermediate dose No. Patient No. (%)	Standard dose No. Patient No. (%)	Odds ratio (95% CI)	Events Intermediate dose	Events Standard dose	P value
Age						
<65 y	75(138/64.6)	72(117/61.5)	1.14 (0.87-1.50)	—	—	.30
≥65 y	14(24/15.4)	14(21/13.0)	0.99 (0.52-1.90)	—	—	
Sex						
Men	14(24/15.4)	14(21/13.0)	1.06 (0.52-2.12)	—	—	.86
Men	72(132/84.6)	81(130/86.9)	0.81 (0.52-1.25)	—	—	
Comorbidity						
Yes	15(26/16.2)	8(13/8.3)	1.21 (0.40-3.68)	—	—	.21
No	111(204/146.3)	118(203/144.5)	0.96 (0.74-1.23)	—	—	
Disease						
Yes	43(82/204.0)	30(73/107.9)	1.08 (0.57-2.06)	—	—	.84
No	80(194/125.8)	90(212/142.5)	1.08 (0.71-1.65)	—	—	
Hypertension						
Yes	64(123/148.9)	64(118/104.2)	0.80 (0.49-1.32)	—	—	.33
No	60(142/142.3)	62(167/157.3)	1.23 (0.78-1.93)	—	—	
Heart failure						
Yes	4(7/57.1)	0(0/0.0)	1.33 (0.14-11.92)	—	—	.71
No	122(209/164.4)	118(209/145.9)	0.89 (0.75-1.06)	—	—	
Obstructive Artery Disease						
Yes	4(8/127.0)	0(0/0.0)	1.08 (0.75-1.46)	—	—	.78
No	118(215/145.8)	120(219/144.4)	1.28 (0.94-1.75)	—	—	
Smoking status						
>7 y	22(39/144.7)	24(38/146.4)	1.00 (0.64-1.54)	—	—	.97
≤7 y	29(98/142.2)	26(73/134.2)	1.34 (0.87-1.96)	—	—	
Cardiovascular						
Yes	110(202/145.0)	110(212/145.4)	0.98 (0.80-1.20)	—	—	.87
No	80(142/115.1)	104(150.2)	1.23 (0.82-1.82)	—	—	
Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor use						
Yes	15(26/16.2)	10(21/13.0)	0.59 (0.30-1.16)	—	—	.09
No	80(138/84.0)	90(212/142.5)	1.10 (0.74-1.63)	—	—	

-> Intervenções: Dose intermediária (enoxaparina, 1 mg/kg por dia) (n=276) vs anticoagulação profilática padrão (enoxaparina, 40 mg por dia) (n=286), com modificação de acordo com o peso corporal e clearance de depuração da creatinina.

-> Os tratamentos atribuídos foram planejados para continuar até a conclusão do acompanhamento de 30 dias.

-> Desfecho primário de eficácia: desfecho composto de trombose venosa ou arterial, tratamento com oxigenação por membrana extracorpórea ou mortalidade em 30 dias, avaliados em pacientes randomizados que preencheram os critérios de elegibilidade e receberam pelo menos 1 dose do tratamento designado.

-> Os resultados de segurança pré-especificados incluíram sangramento maior de acordo com o Bleeding Academic Research Consortium (definição do tipo 3 ou 5), com base na não inferioridade (uma margem de não inferioridade de 1,8 com base na razão de chances) e trombocitopenia grave (contagem de plaquetas <20 × 10³/μl). Todos os resultados foram julgados cegamente.

- Resultados:

-> Entre 600 pacientes randomizados, 562 (93,7%) foram incluídos na análise primária (mediana de idade 62 anos [IQR 50-71]; 237 [42,2%] mulheres).

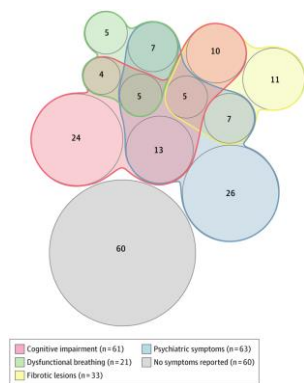
-> Dose intermediária versus dose padrão: media do IMC 26,7 (24,4-29,10 vs 27,2 (24,3-29,1) kg/m², tabagismo atual 12,7% vs 7,3%, HAS 48% vs 41,2%, DM 29,7% vs 25,6%, dislipidemia 27,2% vs 23,8%, doença arterial coronarian 16,3% vs 11,5%, DPOC 8,35 vs 5,6%, Insuficiência cardíaca 2,5% vs 2,1%

-> O resultado de eficácia primária ocorreu em 126 pacientes (45,7%) no grupo de dose intermediária e 126 pacientes (44,1%) no grupo de profilaxia de dose padrão (diferença de risco absoluto, 1,5% [IC de 95%, -6,6% a 9,8%]; OR=1,06 [IC95%, 0,76-1,48]; p=0,70).

-> Com relação aos desfechos de eficácia secundária, durante o acompanhamento de 30 dias, a mortalidade por todas as causas ocorreu em 236 pacientes (42,0%) e não foi significativamente diferente no grupo de dose intermediária em comparação com o grupo de profilaxia de dose padrão (119 [43.1 %] vs 117 [40.9%]; diferença de risco, 2,2% [IC 95%, -5,9% a 10,3%]; razão de chances, 1,09 [IC 95%, 0,78-1,53]; P = 0,50). Eventos de TEV ocorreram em 19 pacientes (3,4%), incluindo 12 episódios de trombose venosa profunda e 7 eventos de embolia pulmonar. O risco de TEV não foi significativamente diferente entre os grupos de dose intermediária e dose padrão (3,3% vs 3,5%; diferença de risco, -0,2% [IC

				<p>de 95%, -3,2% a 2,7%]; odds ratio, 0,93 [95 % CI, 0,37-2,32]; P = 0,94). Mediana de dias sem ventilação foi 30 (1-30) na população do estudo, sem diferença significativa entre os grupos de dose intermediária e dose padrão (30 [3-30] vs 30 [1-30] dias; P = 0,50).</p> <p>-> Mediana de permanência na UTI (IQR) foi 6 (2-11) dias (5 [2-10] dias no grupo de dose intermediária vs 6 [3-11] dias no grupo de dose padrão; p=0,14), e um total de 343 pacientes (61,0%) receberam alta da UTI, incluindo 169 pacientes (61,2%) no grupo dose intermediária e 174 pacientes (60,8%) designados para receber o regime de profilaxia de dose padrão (diferença de risco, 0,3% [IC95%, -7,8% a 8,4%]; razão de chances, 1,01 [IC95%, 0,72-1,42]; p=0,72). Nova terapia de substituição renal intra-hospitalar foi realizada em 17 pacientes (3,0%) (3,6% no grupo de dose intermediária vs 2,4% no grupo de dose padrão; diferença de risco, 1,1% [IC 95%, -1,6% a 4,0 %]; odds ratio, 1,49 [IC95%, 0,58-3,86]; p=0,41) e nova fibrilação atrial foi detectada em 8 pacientes (1,4%), sem uma diferença significativa entre o grupo de dose intermediária e o padrão grupo de dose (0,7% vs 2,1%; diferença, -1,3% [IC 95%, -3,3% a 0,5%]; OR=0,34 [IC95%, 0,00-1,49];p= 0,16).</p> <p>-> Sangramento maior ocorreu em 7 pacientes (2,5%) no grupo de dose intermediária e 4 pacientes (1,4%) no grupo de profilaxia de dose padrão (diferença de risco, 1,1% [IC97,5% unilateral, -∞ a 3,4%]; OR=1,83 [ICde 97,5% unilateral, 0,00-5,93]), não atendendo aos critérios de não inferioridade (P para não inferioridade > 0,99).</p> <p>-> Trombocitopenia grave ocorreu apenas em pacientes designados ao grupo de dose intermediária (6 vs 0 pacientes; diferença de risco, 2,2% [IC 95%, 0,4% -3,8%]; p=0,01).</p> <p>- Conclusões e relevância:</p> <p>-> Entre os pacientes admitidos na UTI com COVID-19, a anticoagulação profilática em dose intermediária, em comparação com a anticoagulação profilática em dose padrão, não resultou numa diferença significativa no desfecho primário composto de trombose venosa ou arterial julgada, tratamento com oxigenação por membrana extracorpórea ou mortalidade em 30 dias.</p> <p>-> Esses resultados não apoiam o uso empírico de rotina de anticoagulação profilática de dose intermediária em pacientes não selecionados admitidos na UTI com COVID-19.</p>
JAMA 17MAR2021	Four-Month Clinical Status of a Cohort of Patients After Hospitalization	Writing Committee for the COMEBAC Study Group, France. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33729425/	Impacto da COVID-19 no longo prazo	<p>- Prévio: Pouco se sabe sobre as sequelas de longo prazo de COVID-19.</p> <p>- Objetivo: Descrever as consequências em 4 meses em pacientes hospitalizados por COVID-19.</p>

for COVID-19



- Métodos:

-> Estudo de coorte prospectivo não controlado, que incluiu sobreviventes da COVID-19 que foram hospitalizados em um hospital universitário na França entre 1º de março e 29 de maio de 2020.

-> Pacientes submetidos a uma avaliação por telefone 4 meses após a alta, entre 15 de julho e 18 de setembro de 2020. Pacientes com sintomas relevantes e todos os pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI) foram convidados para uma avaliação mais aprofundada em uma visita de atendimento ambulatorial.

-> Principais desfechos e medidas: os sintomas respiratórios, cognitivos e funcionais foram avaliados por telefone com o questionário de triagem cognitiva Q3PC e uma lista de verificação de sintomas. Na consulta ambulatorial, os pacientes foram submetidos a testes de função pulmonar, tomografia computadorizada de pulmão, testes psicométricos e cognitivos (incluindo a Pesquisa de Saúde Curta de 36 Itens e o Inventário Multidimensional de Fadiga de 20 itens) e, para pacientes que foram hospitalizados em UTI ou sintomas em andamento relatados, ecocardiografia.

- Resultados:

-> Entre 834 pacientes elegíveis, 478 foram avaliados por telefone (média de idade 61 ± 16 anos; 201 homens, 277 mulheres).

-> Comorbidades presentes: HAS 47,1%, obesidade 37%, DM 26,8%, doença cardíaca 16,2%, doença pulmonar (não incluindo DPOC, 15,7%), doença renal crônica 10,7%, doença psiquiátrica 8,8%, DPOC 3,6%

-> Durante a entrevista por telefone, 244 pacientes (51%) declararam pelo menos 1 sintoma inexistente antes do COVID-19: fadiga em 31%, sintomas cognitivos em 21% e dispneia de início recente em 16%.

-> Houve avaliação adicional em 177 pacientes (37%), incluindo 97/142 ex-pacientes de UTI. A mediana da pontuação do Inventário de Fadiga Multidimensional de 20 itens (n=130) foi 4,5 (IQR, 3,0-5,0) para motivação reduzida e 3,7 (IQR, 3,0-4,5) para fadiga mental (intervalo possível, 1 [melhor] a 5 [pior]).

-> A mediana da pontuação da Pesquisa de Saúde de Formulário Curto de 36 itens (n=145) foi 25 (IQR, 25,0-75,0) para a

subescala "função limitada devido a problemas físicos" (intervalo possível, 0 [melhor] a 100 [pior]).

-> Anormalidades na tomografia computadorizada do pulmão foram encontradas em 108/171 pacientes (63%), principalmente opacidades em vidro fosco sutis. Lesões fibróticas foram observadas em 33/171 pacientes (19%), envolvendo menos de 25% do parênquima em todos, exceto 1 paciente. Lesões fibróticas foram observadas em 19/49 sobreviventes (39%) com síndrome do desconforto respiratório agudo. Entre 94 ex-pacientes de UTI, ansiedade, depressão e sintomas pós-traumáticos foram observados em 23%, 18% e 7%, respectivamente.

-> A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi inferior a 50% em 8/83 pacientes de UTI (10%). Doença renal crônica de início recente foi observada em 2 pacientes da UTI. A sorologia foi positiva em 172/177 pacientes ambulatoriais (97%).

- Conclusões:

-> Quatro meses após a hospitalização por COVID-19, uma coorte de pacientes relatou freqüentemente sintomas não presentes anteriormente, e anormalidades pulmonares foram comuns entre aqueles que foram testados.

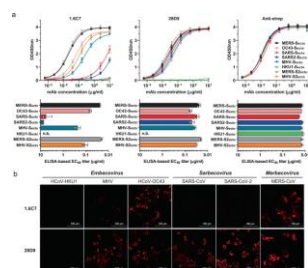
-> Esses achados são limitados pela ausência de um grupo de controle e de avaliações pré-COVID nesta coorte.

-> Mais pesquisas são necessárias para entender os resultados de longo prazo e se esses achados refletem associações com a doença.

Nat Commun
17MAR2021

A conserved immunogenic and vulnerable site on the coronavirus spike protein delineated by cross-reactive monoclonal antibodies

Wang C et al. The Netherlands, Spain & UK.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33731724/>



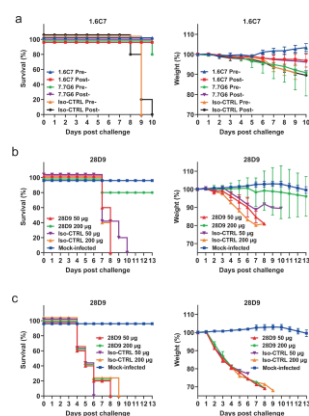
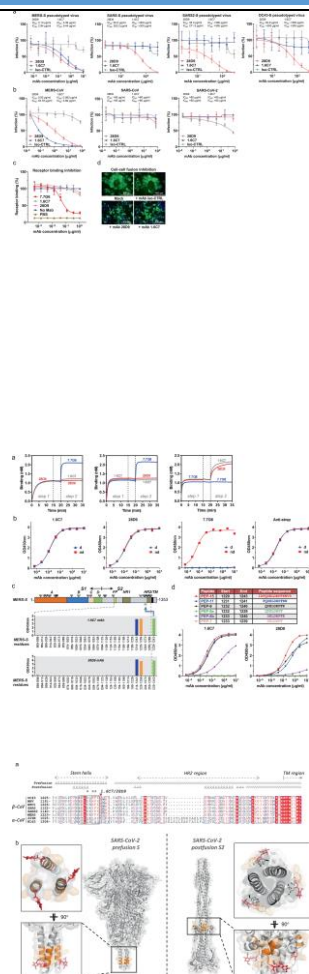
Região da spike é conservada entre as espécies de coronavírus e é um alvo para desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a COVID-19

- Prévio: A glicoproteína spike do coronavírus, localizada na superfície do vírion, é o mediador chave da entrada na célula e o foco para o desenvolvimento de anticorpos e vacinas protetoras. Estudos estruturais mostram locais expostos no trímero da spike que podem ser direcionados por anticorpos com especificidade entre espécies.

- Métodos:

-> Curvas de ligação de ELISA e títulos correspondentes à metade das concentrações efetivas máximas (EC₅₀) com base em ELISA.

-> Ligação dos anticorpos monoclonais (mAbs) 1.6C7 e 28D9 a células HEK-293T que expressam proteínas spike de



comprimento total ancoradas em membrana marcadas com GFP de MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 e MHV por Imunofluorescência

-> Avaliação da capacidade de neutralização cruzada: Neutralização mediada por anticorpos da infecção de partículas de VSV que codificam luciferase pseudotipadas com proteínas spike do MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2 e HCoV-OC43. Partículas de VSV pseudotipadas pré-incubadas com anticorpos nas concentrações indicadas foram usadas para infectar células VeroCCL81 (VSV pseudotipado MERS-S), células VeroE6 (VSV pseudotipado SARS-S e SARS2-S) ou células HRT-18 (VSV pseudotipado OC43-S) e as atividades da luciferase em lisados celulares foram determinadas 20 h após a transdução para calcular a infecção (%) em relação aos controles não tratados com anticorpos. A média \pm SD ($n \geq 6$) de pelo menos dois experimentos independentes realizados foi calculada.

-> Ambos os anticorpos foram testados quanto à ligação competitiva a MERS-S_{ecto} usando interferometria de biolayer.

-> Para mapear os resíduos críticos para a ligação pelos anticorpos 1.6C7/28D9, realizada a mutagênese de varredura da alanina do epítipo baseada em ELISA no fragmento do peptídeo spike do 15-mer compreendendo o epítipo linear. A análise de varredura da alanina do fragmento de peptídeo 15-mer definiu três resíduos (D1236, F1238 e F1239) como críticos para a ligação de ambos os anticorpos.

-> Para avaliar a contribuição individual para a ligação do anticorpo de resíduos identificados no contexto da proteína spike de comprimento total ancorada na membrana, um ensaio baseado em citometria de fluxo foi realizado medindo a ligação do anticorpo a mutantes MERS-S expressos na superfície celular: a ligação do anticorpo foi detectada usando o anticorpo secundário conjugado com AlexaFluor 594. A ligação de superfície relativa foi determinada calculando a porcentagem de células GFP⁺/Alexa Fluor 594⁺ sobre células GFP⁺.

-> Para avaliar a capacidade de proteção in vivo de anticorpos direcionados ao epítipo

de haste-hélice, testada a atividade profilática e terapêutica do mAb 1.6C7 contra o desafio letal de MERS-CoV usando o modelo de camundongo transgênico K18-hDPP4 que expressa DPP453 humano. Camundongos com 20-30 semanas de idade foram injetados com 50 µg de anticorpo (equivalente a 1,8 mg mAb por kg de peso corporal) por injeção intraperitoneal 24 h antes (pré-) ou 24 h após a infecção (pós-) com uma dose letal de MERS-CoV.

- Resultados:

-> Isolamento de dois anticorpos imunizados (1.6C7 e 28D9) monoclonais humanos de camundongos humanizados H2L2 que exibem uma notável reatividade cruzada contra proteínas spike distintas de betacoronavírus, incluindo SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV e o coronavírus humano endêmico HCoV-OC43.

-> Ambos os anticorpos de reação cruzada têm como alvo a hélice da haste na subunidade de fusão S2 da spike que, na conformação de pré-fusão trimérica, forma um feixe helicoidal proximal à membrana exposto à superfície.

-> Ambos os anticorpos bloqueiam a infecção por MERS-CoV nas células e fornecem proteção aos camundongos contra o desafio letal de MERS-CoV em modelos profiláticos e/ou terapêuticos.

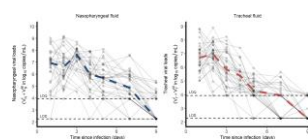
- Discussão:

-> O trabalho destaca um local imunogênico e vulnerável na proteína spike do betacoronavírus, permitindo o desenvolvimento de anticorpos direcionados ao epítipo, usados isoladamente ou em cocktail, e que podem mitigar o risco potencial das mutações antigênicas sobre a circulação contínua de coronavírus na população, bem como a ameaça iminente de surgimento de novos coronavírus em humanos.

Plos Comput Biol
17MAR2021

SARS-CoV-2 viral dynamics in non-human primates

Gonçalves A et al. France.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33730053/>

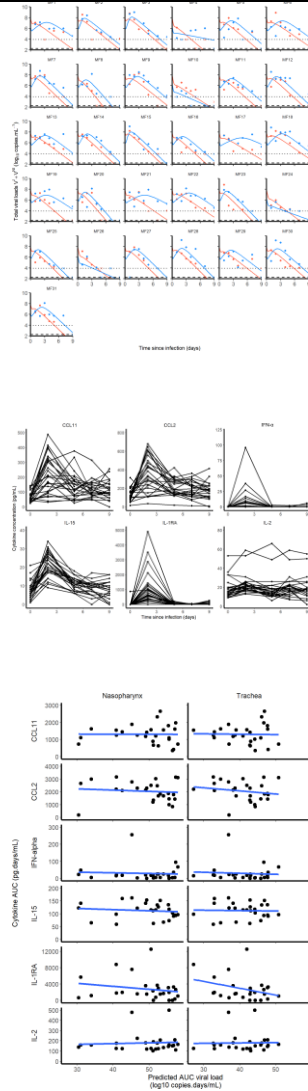


Dinâmica viral do SARS-CoV-2 em primatas não-humanos

- Prévio: Primatas não humanos infectados com SARS-CoV-2 exibem sinais clínicos leves.

- Métodos

-> Utilizado um modelo matemático para caracterizar em detalhes a dinâmica viral em 31 macacos cynomolgus infectados com 10⁶ pfu (correspondendo a 10¹⁰ cópias totais de RNA) de um isolado primário de SARS-CoV-2 (BetaCoV/França/IDF/0372/2020) para os quais a carga viral



nasofaríngea e traqueal foi avaliada com frequência.

-> Títulos dos vírus foram obtidos através da inoculação nas células Vero-E6; investigação do efeito citopático (CPE) e o e o TCID₅₀, ou seja, a dose infecciosa da cultura de tecidos levando a 50% do efeito citopático máximo foram calculados.

-> Em todos os 31 macacos, a concentração de 30 citocinas foi medida a 0, 2, 5, 7 e 9 dpi. Entre eles, CCL11, CCL2, IFN-α, IL-15, IL-1Ra e IL-2 foram de particular interesse, pois sua cinética mudou durante a infecção. Para identificar as citocinas a serem incorporadas ao modelo, correlacionada a área sob a curva de citocinas (AUC, calculada pelo método trapezoidal linear) com a AUC do log₁₀ de cargas virais previstas pelo modelo.

- Resultados:

-> Os macacos cynomolgus desenvolveram uma infecção rápida, com cargas virais com pico 2 dias após a infecção (dpi) nos compartimentos nasofaríngeo e traqueal. Posteriormente, as cargas virais nasofaríngea e traqueal caíram rapidamente de forma exponencial, com uma taxa mediana semelhante de 1,9 d⁻¹, correspondendo a uma redução diária de 0,8 log₁₀ cópias/ml. Como a carga viral atingiu o pico mais tarde e mais alto na nasofaringe do que na traqueia (7,9 e 7,2 log₁₀, respectivamente), a média de tempo para que a carga viral ficasse não quantificável ocorreu mais tarde na nasofaringe do que na traqueia (9 e 7 dpi, respectivamente).

-> Identificadas que as células infectadas tinham um tamanho de explosão grande (> 10⁴ vírus) e um número reprodutivo básico dentro do hospedeiro de aproximadamente 6 e 4 no compartimento nasofaríngeo e traqueal, respectivamente.

-> Após o pico de carga viral, as células infectadas foram perdidas rapidamente com meia-vida de 9 horas, sem associação significativa entre a elevação e depuração de citocinas, levando a um tempo médio de depuração viral de 10 dias, consistente com observações em infecções humanas leves.

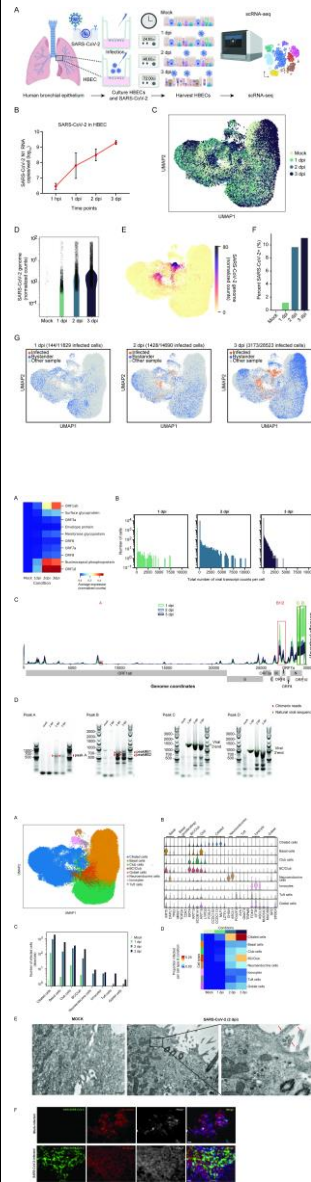
- Discussão:

-> Dadas essas estimativas de parâmetro, os autores preveem que um tratamento profilático bloqueando 90% da produção viral ou infecção viral poderia prevenir o

Plos Biol
17MAR2021

Single-cell longitudinal analysis of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelium identifies target cells, alterations in gene expression, and cell state changes

Ravindra NG et al. USA & France.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33730024/>



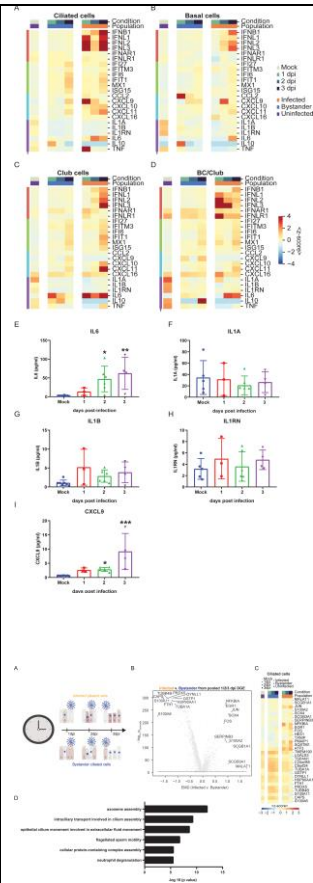
Caracterização dos genes, tipos de células e mudanças no estado celular associadas à infecção pelo SARS-CoV-2 nas vias aéreas humanas.

crescimento viral.
-> Os resultados fornecem estimativas dos parâmetros cinéticos do vírus SARS-CoV-2 em um modelo experimental de infecção leve e fornecem meios para avaliar a eficácia de futuros tratamentos antivirais.

- Prévio: Atualmente, existem medicamentos e vacinas aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento ou prevenção da COVID-19. A compreensão aprimorada da infecção e patogênese do SARS-CoV-2 é crítica para o desenvolvimento da terapêutica.

- Métodos:
-> Para fornecer informações sobre a replicação viral, tropismo celular e interações hospedeiro-viral de SARS-CoV-2, realizado sequenciamento do RNA de célula única (sc) (RNA-seq) de células epiteliais brônquicas humanas experimentalmente infectadas (HBECS) no sistema de cultura celular com interface ar-líquido (ALI) ao longo do tempo (28 dias).

- Resultados:
-> Caracterizado o transcriptoma SARS-CoV-2 ao nível de célula única nas diferentes condições nas células HBECS: Detecção aumentada da *open reading frame* (ORF) do SARS-CoV-2 de maneira dependente do tempo; em particular, ORF1ab, nucleocapsídeo e ORF10 foram altamente detectados. Em seguida, foi investigada a distribuição das contagens de transcritos virais totais por célula ao longo do curso da infecção. Em paralelo com a detecção de ORFs individuais, aumentos nas contagens de transcritos virais totais por célula foram observados ao longo do curso da infecção, consistente com a replicação viral ativa. Além disso, a distribuição dos transcritos virais poliadenilados muda de 3' para 5' durante o curso da infecção. Além das leituras virais esperadas para alinhar imediatamente a montante da cauda canônica de poli-A SARS-CoV-2, os resultados mostram leituras adicionais alinhadas em outras partes do genoma viral, sugerindo a existência de RNAs subgenômicos poliadenilados não canônicos (sgRNAs). Usando PCR de transcrição reversa (RT-PCR), validado com sucesso 2 picos únicos, ou seja um pico (A) mapeado no meio da região ORF1ab e um segundo pico (B1/2) mapeado próximo à ORF6. Os



resultados confirmam, portanto, que os produtos RT-PCR correspondentes a cada um dos 2 picos aparecem após 2 dpi.

-> As células ciliadas foram o principal alvo no início da infecção, o que foi confirmado por microscopia eletrônica e imunofluorescência a partir de estudos da co-localização com FOXJ1 e tubulina acetilada.

-> Durante o curso da infecção, o tropismo celular do SARS-CoV-2 se expande para outros tipos de células epiteliais, incluindo células basais e club.

-> A expressão da ECA2 é um preditor significativo de infecção a nível do tipo de célula, de modo que a expressão da ECA2 estava aumentada nas 4 populações de células suscetíveis: ciliadas, basais, club e BC/club em relação aos tipos de células não suscetíveis (neuroendócrinas, ionócitos, células em tufo e células caliciformes). No entanto, a expressão da ECA2 foi mal correlacionada com a infecção pelo SARS-CoV-2 por célula (r de Spearman entre o genoma viral e ECA2 em células ciliadas, $\rho = -0,06$). A ECA2 foi recentemente demonstrado ser um ISG [Ziegler C et al, Cell, 2020]. No entanto, no presente trabalho não foi observado um aumento significativo na expressão da ECA2 em células infectadas ou mock em relação à amostra simulada.

-> A infecção induz a expressão intrínseca da célula de interferons tipo I e tipo III (IFNs) e interleucina (IL)-6, mas não IL-1. Isso resulta na expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) em ambas as células infectadas e espectadoras.

-> A fim de determinar como a infecção pelo SARS-CoV-2 perturba o transcriptoma celular, foram agrupadas computacionalmente as 3 amostras infectadas e analisamos os 100 DEGs (*differentially expressed genes*) principais entre células espectadoras infectadas e não infectadas de um determinado tipo de célula nas amostras de 1, 2 e 3 dpi. Também analisamos os 30 primeiros DEGs por ponto no tempo nos 4 principais tipos de células (ciliadas, basais, club e BC/club) comparando as células infectadas e as mock. A análise da ontologia do gene PANTHER revelou que as células ciliadas infectadas *versus* células mock tiveram uma regulação negativa significativa dos

genes incluídos nos processos biológicos envolvidos na função ciliar (por exemplo, DYNLL1), sinalização de cálcio (CALM1 e CALM2) e homeostase do ferro (por exemplo, FTH1 e FTL). Aumento da expressão de genes envolvidos na apoptose (PMAIP1, SQSTM1 e ATF3), início da tradução e expressão gênica viral (RPS12 e RPL37A) e inflamação (NFKBIA e NFKBIZ) foram observados em células ciliadas infectadas em comparação com as células mock.

- Discussão:
-> Os dados fornecem uma caracterização detalhada dos genes, tipos de células e mudanças no estado celular associadas à infecção pelo SARS-CoV-2 nas vias aéreas humanas.

Nature
16MAR2021

Clofazimine broadly inhibits coronaviruses including SARS-CoV-2

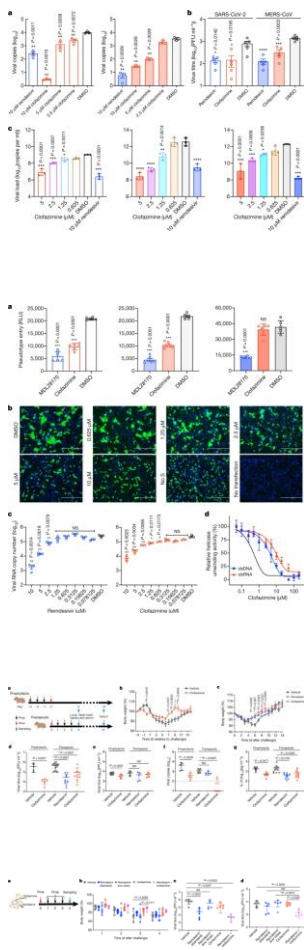
Yuan C. USA, Denmark & China.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33727703/>

Segurança e eficácia da clofazimina no modelo pré-clínico de infecção pelo SARS-CoV-2

- Prévio: A pandemia da COVID-19 é o terceiro surto neste século de uma doença zoonótica causada por um coronavírus, após o surgimento da síndrome respiratória aguda grave (SARS) em 2003 e da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2012. As opções de tratamento para coronavírus são limitadas.

- Objetivos: Demonstrar que a clofazimina, um fármaco anti-hanseníase com um perfil de segurança favorável, possui atividade inibitória contra vários coronavírus e pode antagonizar a replicação de SARS-CoV-2 e MERS-CoV em uma variedade de sistemas in vitro. Este fármaco foi aprovado pela Food and Drug Administration dos EUA

-Métodos e Resultados:
-> A clofazimina reduziu a replicação de MERS-CoV em células Vero E6, com um EC50 de $1,48 \pm 0,17 \mu\text{M}$. Em seguida, foi caracterizada a atividade antiviral da clofazimina em duas linhas celulares que são mais fisiologicamente relevantes para doenças coronavírus: cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias humanas e células epiteliais primárias de pequenas vias aéreas humanas, que suportam robustamente a replicação de SARS-CoV-2 e MERS-CoV, respectivamente. O tratamento com clofazimina reduziu o título de SARS-CoV-2 em mais de 3 log10, e o título de MERS-CoV em 2 log10.
-> Em seguida, avaliada a atividade antiviral da clofazimina num sistema de cultura pulmonar ex vivo e observado que a clofazimina antagonizou potentemente a replicação viral em tecidos pulmonares humanos que refletem o sítio primário de replicação de SARS-CoV-2 e MERS-CoV.
-> A clofazimina também bloqueou a infecção pelo SARS-CoV-2 numa etapa pós-entrada,



conforme evidenciado por uma redução observada na replicação viral quando a clofazimina foi adicionada 5 h após a infecção. Para avaliar ainda mais o efeito da clofazimina na entrada viral, utilizados vírions pseudotipados de glicoproteína (S) com base no vírus da estomatite vesicular (VSV). O tratamento com clofazimina reduziu a infecciosidade de ambos os vírions pseudotipados SARS-CoV S e SARS-CoV-2 S nas células Vero E6, mas não afetou as partículas de vírus pseudotipados MERS-CoV S. Em seguida, examinada uma série de eventos para determinar a etapa precisa da entrada de SARS-CoV-2 que é bloqueada pela clofazimina e excluídos os possíveis efeitos da clofazimina sobre: (1) a expressão da superfície celular do receptor de angiotensina SARS-CoV-2 - enzima conversora 2 (ACE2) ou o receptor MERS-CoV dipeptidil peptidase 4 (DPP4) e (2) a interrupção da ligação entre ACE2, ou outro fator de ligação (sulfato de heparano), e SARS-CoV-2 S.

-> Usando um ensaio de fusão de membrana celular mediado pelo SARS-CoV-2 S, observado que a clofazimina inibiu a atividade de fusão celular mediada pela S. Especificamente, observada que a fusão entre células efectoras que expressam S e células alvo foram efetivamente reduzidas após a adição de clofazimina, de uma maneira dependente da dose. Para confirmar se a clofazimina também inibe as etapas pós-entrada da replicação viral, foi avaliado o efeito da clofazimina na produção de RNA viral por eletroporação de RNA viral transcrito in vitro nas células Vero E6, que ignora a inibição mediada pela clofazimina no processo de entrada e mede diretamente a síntese de RNA. Como esperado, o remdesivir reduziu a síntese de RNA de fita negativa de uma maneira dependente da dose. Os níveis de RNA viral também foram reduzidos em cerca de 1-1,5 log₁₀ nas células tratadas com clofazimina.

-> Desta forma, a clofazimina inibe a fusão celular mediada pela glicoproteína spike viral, bem como a atividade da helicase viral.

-> Utilizado o sequenciamento de RNA (RNA-seq) para traçar o perfil de mudanças em todo o transcriptoma das células Caco-2 humanas infectadas com SARS-CoV-2, nas quais a clofazimina exibiu potência antiviral comparável à do remdesivir. Realizada análise transcricional em células Caco-2 que foram infectadas ou não infectadas e que foram subsequentemente tratadas com clofazimina ou dimetilsulfóxido (DMSO; tratamento simulado) por 3 ou 6 h. Três horas após a infecção, o tratamento com clofazimina causou uma mudança geral do transcriptoma em direção ao

grupo de controle de tratamento simulado, o que corrobora a hipótese de que a droga interfere no estágio inicial do ciclo de vida do vírus. 6 h após a infecção, havia 607 e 448 genes regulados positivamente e regulados negativamente, respectivamente, pela infecção pelo SARS-CoV-2

-> A administração profilática ou terapêutica de clofazimina num modelo de hamster de infecção pelo SARS-CoV-2 levou a cargas virais reduzidas no pulmão e eliminação de vírus nas fezes, e também aliviou a inflamação associada à infecção viral.

-> As combinações de clofazimina e remdesivir exibiram sinergia antiviral in vitro e in vivo e restringiram a eliminação viral do trato respiratório superior.

- Discussão:

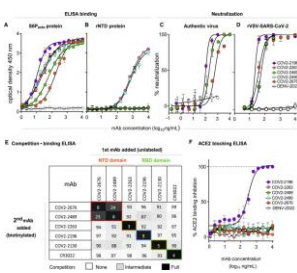
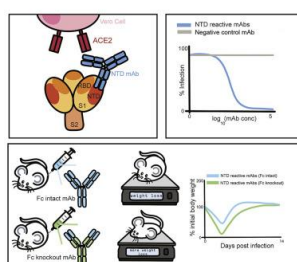
-> A clofazimina, que é oralmente biodisponível e comparativamente barata para fabricar, é uma candidata clínica atraente para o tratamento de pacientes ambulatoriais e, quando combinada com a terapia com remdesivir, para pacientes hospitalizados com COVID-19, particularmente em contextos em que os custos são um fator importante ou as instalações médicas especializadas são limitadas.

-> O dados fornecem evidências de que a clofazimina pode ter um papel no controle da atual pandemia da COVID-19 e, possivelmente mais importante, no tratamento de doenças por coronavírus que podem surgir no futuro.

Cell
16MAR2021

Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein

Suryadevara N et al.
USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33773105/>



Eficácia dos anticorpos monoclonais que reconhecem o domínio N-terminal da proteína spike do SARS-CoV-2

- A maioria dos anticorpos monoclonais humanos (mAbs) que neutralizam o SARS-CoV-2 reconhecem o domínio de ligação do receptor (RBD) da proteína spike (S) e bloqueiam as interações do vírus com o receptor celular da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2).

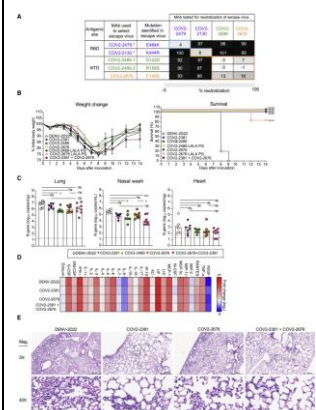
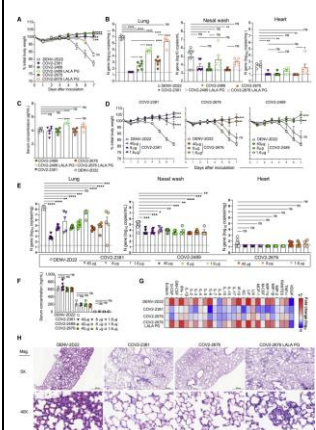
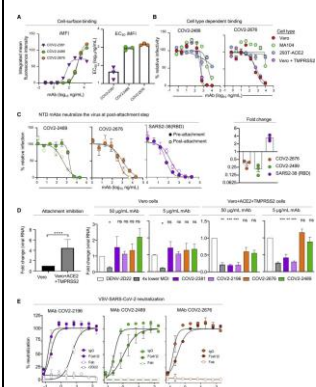
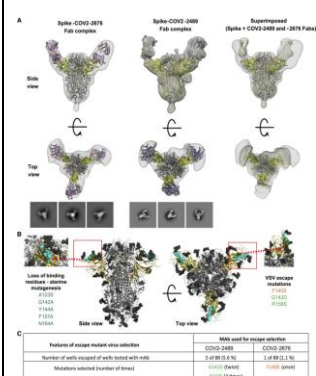
- Métodos:

-> Descrição de um painel de mAbs humanos que se ligam a diversos epítomos em o domínio N-terminal (NTD) da proteína S de doadores convalescentes SARS-CoV-2.

- Resultados:

-> Uma minoria destes mAbs possuía atividade neutralizante.

-> Dois mAbs (COV2-2676 e COV2-2489) inibiram a infecção do vírus SARS-CoV-2 autênticos e VSV/SARS-CoV-2 recombinantes: ambos COV2-2676 e COV2-2489 neutralizaram individualmente o SARS-CoV-2 autêntico de uma maneira dependente da dose com um valor da metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) de 501 ou 199 ng/ml,

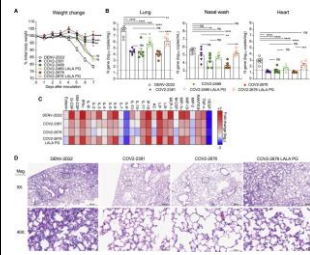


respectivamente. Além disso, COV2-2676 e COV2-2489 neutralizaram VSV-SARS-CoV-2 quimérico com valores de IC₅₀ de 38 ou 56 ng/ml, respectivamente.

-> Esses anticorpos se ligam ao NTD e reconhecem o estado conformacional “fechado” do trímero S6P_{ecto}.

-> Mapeados seus epítomos de ligação por mutagênese de varredura de alanina e seleção de variantes de escape de neutralização do SARS-CoV-2 S funcionais: estudos mecanísticos mostraram que esses anticorpos neutralizam em parte por inibir uma etapa pós-fixação no ciclo da infecção. Assim, após a infecção pelo SARS-CoV-2, as células Vero foram incubadas com diluições em série de COV2-2489, COV2-2676, o mAb COV2-2381 de direcionamento de RBD neutralizante (Zost et al., 2020a), ou o controle de isotipo mAb 2D22 do vírus da dengue antes da análise da intensidade da coloração por citometria de fluxo. COV2-2489 e COV2-2676 exibiram avides semelhante para proteína S associada à superfície celular, com valores de EC₅₀ para coloração de células infectadas de 896 ou 1.438 ng/ml, respectivamente. Enquanto o mAb direcionado a RBD COV2-2381 tinha um valor EC₅₀ mais potente para a ligação a células infectadas (45 ng/ml), os mAbs direcionados a NTD tinham maior intensidade da coloração nas células infectadas, como o pico de intensidade de fluorescência média integrada (iMFI) que foi maior para COV2-2489 e COV2-2676 do que para COV2-2381. Estes dados sugerem que mAbs direcionados a NTD podem se ligar de forma eficiente e em alta densidade à proteína S na superfície de células infectadas com SARS-CoV-2.

-> O pré-tratamento com COV2-2676 ou COV2-2489 protegeu contra a perda de peso e carga viral com uma dose 25 vezes menor, enquanto o pré-tratamento com COV2-2381 protegeu com uma dose 125 vezes menor. Esses tratamentos foram associados a concentrações séricas de IgG1 de ~ 200 ng/ml ou ~ 10 ng/ml, respectivamente. Uma vez que a infecção pelo SARS-CoV-2 causa inflamação pulmonar substancial em camundongos K18-hACE2 e em humanos (Golden et al., 2020; Oladunni et al., 2020; Winkler et al.,



2020), foram avaliados os efeitos do tratamento com mAb na produção de citocinas e quimiocinas em tecidos pulmonares em 7 dpi. A profilaxia com 200 µg de COV2-2676 reduziu vários níveis de citocinas e quimiocinas de maneira semelhante a COV2-2381, em contraste com os resultados do grupo de controle de isotipo mAb DENV-2D22. Consistente com estes resultados, a análise de seções de pulmão coradas com H&E mostrou uma redução na infiltração de células imunes perivascular e parenquimatosas e consolidação do espaço alveolar nos pulmões de camundongos tratados com COV2-2676 ou COV2-2381 em comparação com camundongos tratados com DENV-2D22.

-> Em seguida, avaliada a eficácia terapêutica da monoterapia com COV2-2676 ou COV-2489 em um ambiente pós-exposição. Os camundongos tratados com 200 µg de COV2-2676 ou COV2-2489 1 dia após a inoculação do SARS-CoV-2 mantiveram o peso, de maneira semelhante ao tratamento COV2-2381 e em contraste com o mAb de controle de isotipo, DENV-2D22. A terapia com COV2-2676 ou COV2-2489 também diminuiu a carga viral em 7 dpi no trato respiratório superior e inferior e no coração, em comparação com DENV-2D22, de maneira semelhante a COV2-2381. Os animais tratados com COV2-2676 também apresentaram níveis mais baixos de múltiplas citocinas e quimiocinas em homogenatos de pulmão, semelhantes a COV2-2381 e em contraste com DENV-2D22. A análise patológica também mostrou menos infiltração de células imunes e consolidação do espaço aéreo após a terapia com COV2-2676 ou COV2-2381 em comparação com o tratamento com DENV-2D22.

-> Em resumo, COV2-2676 e COV2-2489 ofereciam proteção como profilaxia ou terapia, e as funções efetoras Fc foram necessárias para uma proteção ideal no modelo de camundongo transgênico hACE2.

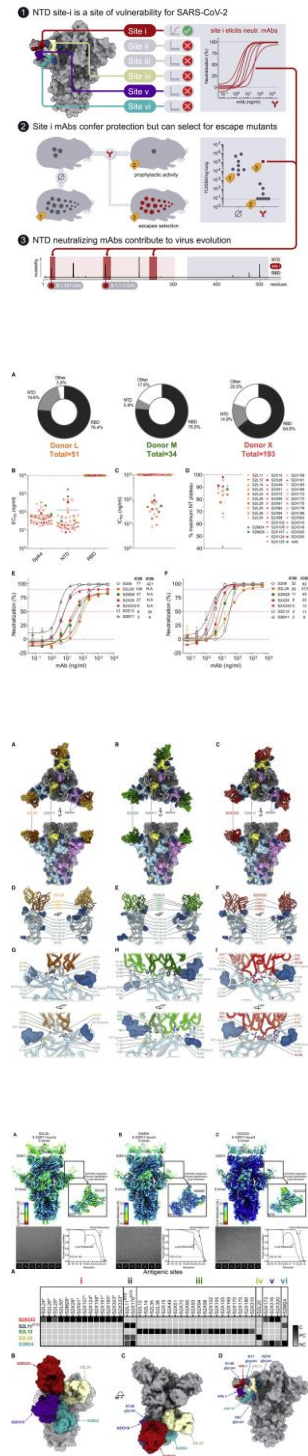
- Conclusões:

-> A infecção natural induz um subconjunto de mAbs específicos de NTD potentes que alavancam atividades neutralizantes e mediadas por Fc para proteger contra a infecção pelo SARS-

Cell
16MAR2021

N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2

McCallum M et al. USA, Switzerland, Belgium, Italy & France.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33761326/>



Domínio N-terminal da proteína spike revela um sítio de vulnerabilidade do SARS-CoV-2 e que pode representar um aestratégia terapêutica

CoV-2 usando vários atributos funcionais.

- Prévio: A glicoproteína spike (S) SARS-CoV-2 contém um domínio de ligação ao receptor imunodominante (RBD) direcionado pela maioria dos anticorpos neutralizantes (Abs) no plasma do paciente COVID-19. Pouco se sabe sobre a neutralização da ligação de Abs a epítomos fora do RBD e sua contribuição para a proteção.

- Métodos:
-> A fim de descobrir anticorpos monoclonais (mAbs) que visam diversos epítomos SARS-CoV-2, classificamos os linfócitos B de memória G+ de imunoglobulina (Ig) de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de três indivíduos convalescentes COVID-19 (L, M, X) utilizando a Ig do SARS-CoV de pré-fusão biotinizada como isca. A porcentagem de linfócitos B de memória IgG+ SARS-CoV-2 S-reativos variou entre 1,1% -1,3%. Um total de 278 mAbs foi isolado e produzido de forma recombinante como IgG1 humano.

-> A caracterização por ELISA mostrou que a maioria dos mAbs isolados dos três doadores reconhecem o RBD (65% -77%), com uma fração menor direcionada ao NTD (6% -20%). Espera-se que os mAbs restantes (4% a 20%) se liguem à subunidade S2 ou aos domínios C-D dentro da subunidade S1. A baixa proporção de mAbs específicos de NTD isolados desses doadores está de acordo com a imunogenicidade limitada de NTD observada anteriormente em indivíduos expostos ao SARS-CoV-2

-> no geral, foram descritos 41 Abs monoclonais humanos (mAbs) derivados dos linfócitos B de memória, que reconhecem o domínio N-terminal (NTD) SARS-CoV-2 S, de modo que um subconjunto deles neutraliza o SARS-CoV-2 ultrapotentemente.

- Resultados:
-> Definido um mapa antigênico do NTD-SARS-CoV-2 e identificado um *supersite* (local designado i) reconhecido por todos os mAbs neutralizantes específicos do NTD conhecidos.

-> S2L28, S2M28 e S2X333 contatam a região N-terminal (resíduos 14-20, terminal NTD N), um grampo β formado pelos resíduos 140-158 (*supersite* β-hairpin) e um loop abrangendo resíduos 245-264 (*supersite* ciclo). Essas três regiões coletivamente formam um *supersítio* antigênico no pináculo do NTD no lado distal à membrana viral. Os epítomos direcionados por S2L28, S2M28 e S2X333 estão sobrepostos e flanqueados pelos oligossacarídeos na posição N17 e N149, que estão localizados em lados opostos do *supersítio* antigênico.

-> A análise das 508.771 sequências do genoma SARS-CoV-2 depositadas em GISAID em 12 de fevereiro de 2021 revela um maior número

de mutações e deleções prevalentes no NTD em relação a outras regiões da glicoproteína S. Portanto, os autores se propuseram a avaliar o impacto na ligação do mAb específico de NTD de várias mutações identificadas dentro e fora do supersítio antigênico de NTD, juntamente com alguns mutantes projetados com base nos dados estruturais. Os NTDs mutantes recombinantes testados incluíram S12F, L18F, T19A (remove o glicano N15), uma deleção 69/70, D80A, uma deleção Y144, H146Y, N149Q (remove o glicano N149), A222V, R246A, D253G / Y, S254F, S255F e o B1.351 NTD (compreendendo as mutações L18F, D80A, D215G, 242-244 deleção e R246I).

-> Todos os mAbs NTD neutralizantes ligaram-se de forma eficiente às variantes NTD transportando uma deleção 69/70 ou as substituições A222V, indicando que os mAbs de direcionamento de sítio i não seriam afetados por essas mutações SARS-CoV-2 comuns (Hodcroft et al., 2020). A substituição de R246A diminuiu a ligação de S2L28, S2M28 e S2X333 (em várias extensões), de acordo com as extensas interações formadas pela cadeia lateral de R246 com resíduos aromáticos e hidrofóbicos encontrados no HCDR3 de cada mAb. Esta substituição também afetou marcadamente a ligação de S2X28 e do mAb 4A8 previamente descrito (Chi et al., 2020). As variantes L18F, D80A, D253G/Y ou S255F revogaram apenas a ligação de S2L28 ao NTD, o que é relevante considerando que a substituição de L18F é um dos mutantes mais prevalentes sequenciados até o momento e está presente em B.1.351 e P. 1 linhagens (Tegally et al., 2020) (Figura 4B). Por outro lado, a exclusão Y144 anulou a ligação a S2M28, S2X28, S2X333 e 4A8, mas não S2L28, explicando a capacidade perdida desses mAbs de neutralizar o pseudovírus B.1.1.7 S, que contém essa exclusão (Collier et al., 2021 ; Davies et al., 2020) (Figura 4B). O mutante H146Y reduziu a ligação de S2M28, S2X28 e, em particular, de 4A8 (Figura 4A). A ligação de todos os mAbs de NTD específicos do local i ao NTD B.1.351 foi revogada, de acordo com um estudo recente que mostra que 4A8 não reconheceu esta variante de NTD (Wibmer et al., 2021). No entanto, a ligação do mAb específico para NTD S2L20 não neutralizante não foi afetada por qualquer uma dessas variantes, confirmando a retenção do dobramento adequado dos mutantes NTD purificados (Figura 4A). Coletivamente, esses dados mostram que S2M28, S2X28, S2X333 e 4A8 têm um perfil de reatividade semelhante a esses mutantes NTD, enquanto S2L28 tem um padrão distinto e complementar. Estes dados demonstram que várias variantes atualmente em

circulação escaparão parcial ou completamente da neutralização mediada por mAbs que visam o supersítio antigênico (local i), incluindo as linhagens B.1.1.7, B.1.351 e P.1.

-> Esses mAbs inibem a fusão célula a célula, ativam funções efetoras e protegem hamsters sírios do desafio do SARS-CoV-2, embora selecionando mutantes de escape em alguns animais.

- Discussão:

-> Anticorpos direcionados a NTD são uma parte fundamental da imunidade ao SARS-CoV-2.

-> Os anticorpos neutralizantes de NTD têm como alvo um único sítio antigênico de vulnerabilidade

-> Anticorpos NTD neutralizantes protegem os hamsters do desafio de SARS-CoV-2

-> Variantes preocupantes têm mutações no NTD que escapam da neutralização

-> De fato, várias variantes do SARS-CoV-2, incluindo as linhagens B.1.1.7, B.1.351 e P.1, abrigam mutações frequentes no supersítio NTD, sugerindo pressão seletiva contínua e a importância dos mAbs neutralizantes específicos para NTD para imunidade protetora e desenho de vacinas.

N Engl J Med
16MAR2021

Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Vaccine against the B.1.351 Variant

Madhi SA et al. South Africa & UK.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33725432/>

Eficácia da Vacina ChAdOx1 contra a variante B.1.351

- 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.

- Métodos:

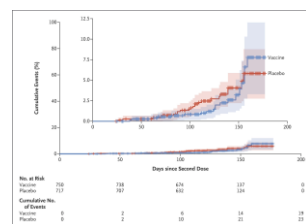
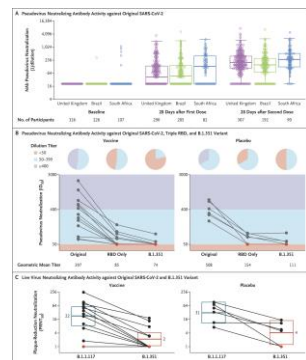
-> Ensaio multicêntrico fase 1b-2, duplo-cego, randomizado e controlado para avaliar a segurança e eficácia da vacina ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) em pessoas não infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) na África do Sul.

-> 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%).

-> 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).

-> 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.

-> 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.

- Resultados:

-> 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.

- > 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)

-> 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 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

			<p>neutralizante similarmente baixa, com títulos residuais de menos de 100 (ou indetectáveis) contra o pseudovírus mutante triplo RBD e a variante B.1.351.</p> <p>-> 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.</p> <p>-> 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).</p> <p>-> 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 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>
JAMA 15MAR2021	Immunogenicity of a Single Dose of SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccine in Solid Organ Transplant Recipients	Boyarsky BJ et al. USA. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33720292/	<p>Imunogenicidade das vacinas é menor em receptores de transplante de órgãos sólidos</p> <p>- Prévio: Os indivíduos imunocomprometidos foram excluídos dos estudos de vacinas de RNA mensageiro (mRNA) SARS-CoV-2. Em tais pacientes, a resposta imune à vacinação pode ser atenuada. Para entender melhor a imunogenicidade das vacinas de mRNA em indivíduos imunocomprometidos, foi avaliada a resposta humoral à primeira dose em receptores de transplante de</p>

órgãos sólidos.

- Métodos:

-> Receptores de transplante em todos os EUA foram recrutados por meio da mídia social para participar desta coorte prospectiva e aqueles que se submeteram à vacinação contra SARS-CoV-2 entre 16 de dezembro de 2020 e 5 de fevereiro de 2021 foram incluídos.

-> Os participantes foram submetidos a coleta de sangue em casa com o dispositivo de coleta de sangue TAPII (Seventh Sense Biosystems) ou punção venosa padrão.

- > As amostras TAPII foram testadas usando um imunoensaio enzimático (EUROIMMUN) que testa anticorpos para o domínio S1 da proteína spike SARS-CoV-2. As amostras de punção venosa foram testadas usando o imunoensaio enzimático anti-SARS-CoV-2 S (Roche Elecsys) que testa anticorpos contra o domínio de ligação ao receptor da proteína spike SARS-CoV-2. Ambos os testes são semiquantitativos, correspondem a antígenos de vacina de mRNA e estão consistentemente correlacionados com imunidade neutralizante. A sensibilidade e especificidade dos imunoenaios enzimáticos são excelentes para a detecção da resposta humoral anti-spike à infecção pelo SARS-CoV-2 (sensibilidade de 87,1% e especificidade de 98,9% para EUROIMMUN3 e sensibilidade de 84,0% e especificidade de 100% para Roche Elecsys4) e são análogos aos ensaios de anticorpos anti-spike usados durante avaliações de imunogenicidade em ensaios clínicos de vacinas de mRNA.

- Resultados:

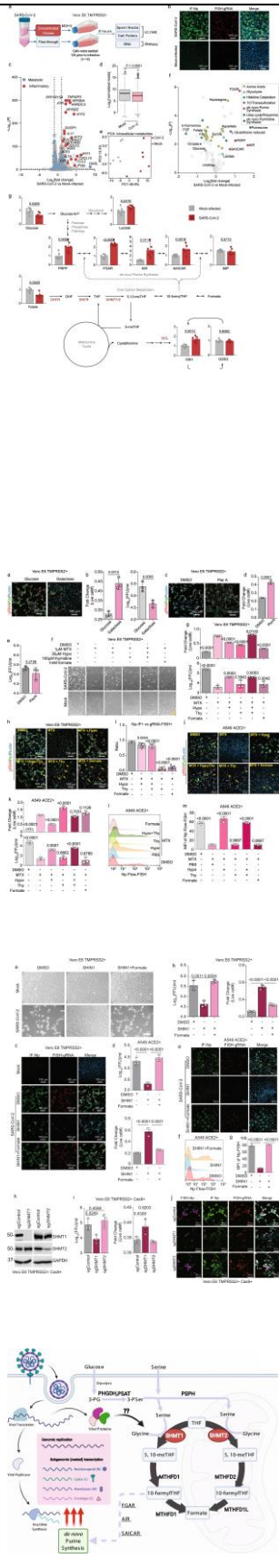
-> N=436 receptores de transplante. Nenhum tinha diagnóstico prévio de COVID-19 confirmado por reação em cadeia da polimerase.

-> A mediana de idade foi 55,9 anos ([IQR], 41,3-67,4 anos), 61% eram mulheres e 89% eram brancos; 52% receberam a vacina BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) e 48% receberam a vacina mRNA-1273 (Moderna).

-> Média de tempo de transplante 6,2 anos (IQR, 2,7-12,7 anos). O regime de imunossupressão de manutenção incluiu tacrolimus (83%), corticosteroides (54%), micofenolato (66%), azatioprina (9%), sirolimus (4%) e everolimus (2%).

				<p>-> Numa mediana de 20 dias (IQR, 17-24 dias) após a primeira dose da vacina, o anticorpo (anti-S1 ou domínio de ligação ao receptor) foi detectável em 76/436 participantes (17%; IC 95%, 14 % -21%).</p> <p>-> Receptores de transplante recebendo terapia de imunossupressão de manutenção com antimetabolito foram menos propensos a desenvolver uma resposta de anticorpos do que aqueles que não receberam tal terapia de imunossupressão (37% vs 63%, respectivamente; taxa de incidência ajustada [IRR], 0,22 [IC 95%, 0,15-0,34], p<0,001).</p> <p>-> Receptores de transplante mais velhos eram menos propensos a desenvolver uma resposta de anticorpos (IRR ajustada, 0,83 [IC 95%, 0,73-0,93] por 10 anos, p=0,002).</p> <p>-> Aqueles que receberam mRNA-1273 foram mais propensos a desenvolver uma resposta de anticorpos do que aqueles que receberam BNT162b2 (69% vs 31%, respectivamente; IRR ajustado, 2,15 [IC 95%, 1,29-3,57], p=0,003).</p> <p>-> Esta associação foi semelhante em uma análise de sensibilidade limitada aos testados 14 a 21 dias após a vacinação (n = 245; IRR ajustado, 2,29 [IC 95%, 1,32-3,94], P = 0,003).</p> <p>- Discussão:</p> <p>-> Neste estudo de imunogenicidade da primeira dose da vacina de mRNA SARS-CoV-2 entre receptores de transplante de órgão sólido, a maioria dos participantes não apresentou respostas de anticorpos anti-spike apreciáveis. No entanto, os participantes mais jovens, aqueles que não receberam imunossupressão de manutenção com antimetabolito e aqueles que receberam mRNA-1273 foram mais propensos a desenvolver respostas de anticorpos. Estes resultados contrastam com a robusta imunogenicidade precoce observada em ensaios de vacina de mRNA, incluindo 100% de soroconversão antispikes no dia 15 após a vacinação com mRNA-12735 e no dia 21 após a vacinação com BNT162b2.6</p>
Nat Commun 15MAR2021	SARS-CoV-2 hijacks folate and one-carbon metabolism for viral replication	Zhang Y et al. USA & China. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33723254/	O SARS-CoV-2 ativa o metabolismo da glicose e do folato no nível pós-transcricional em células	- Prévio: O SARS-CoV-2 é a causa da pandemia da COVID-19. Como este novo vírus beta-coronavírus, e os coronavírus em geral alteram o metabolismo celular para apoiar a produção maciça de genomas virais de ~ 30 kB e RNAs virais subgenômicos permanece amplamente desconhecido.

recém-infectadas para suprir a enorme necessidade de síntese de ribonucleotídeos



- Métodos:

-> Análises transcricional e metabolômica realizadas 8 horas após a infecção pelo SARS-CoV-2, um ponto de tempo inicial em que o ciclo de vida viral é concluído, mas antes dos efeitos evidentes no crescimento ou sobrevivência da célula hospedeira.

- Resultados:

-> A análise de RNA-seq em 8 hpi revelou indução robusta de genes antivirais (IFIT1, ZC3HAV1), alvos NF-κB (CCL5, CXCL10) e resposta ao estresse ER (por exemplo, DDIT3, PPP1R15A, GADD45B), consistente com análises publicadas. No entanto, surpreendentemente, poucas mudanças foram observadas na abundância de mRNAs que codificam enzimas metabólicas, apesar de uma diminuição global nos mRNAs do hospedeiro em células infectadas com SARS-CoV-2. A reanálise da abundância do mRNA das células Vero E6 infectadas com SARS-CoV-113 mostrou resultados surpreendentemente semelhantes, com remodelação mínima das vias de metabolismo evidente no nível de mRNA em 8 hpi, sugerindo que essa propriedade pode ser conservada em coronavírus SARS. Curiosamente, quase todos os transcritos codificados do DNA mitocondrial (mtDNA) relacionados à fosforilação oxidativa (OXPHOS) estavam elevados, enquanto os transcritos de OXPHOS codificados por genoma nuclear estavam todos modestamente diminuídos, um padrão de expressão gênica que foi previamente associado com depleção de ATP.

-> Em contraste, diferenças pronunciadas nos metabólitos intracelulares específicos já foram observadas no ponto de tempo inicial. A soma de todos os picos de metabólitos identificados (um proxy para a corrente iônica total) não foi alterada, sugerindo carga equivalente de amostras para análise LC-MS15. Enquanto a maioria dos aminoácidos foi esgotada pela infecção pelo SARS-CoV-2, aspartato e asparagina foram os mais regulados. Os aminoácidos podem ter sido amplamente consumidos para a síntese de proteínas virais, enquanto a ativação simultânea da resposta integrada ao estresse celular (ISR) pode levar ao aumento seletivo de aspartato e asparagina. Curiosamente, o inibidor ISR de molécula pequena ISRIB17 aumentou o número de células vivas em 48 hpi, embora não tenha diminuído significativamente a expressão de gRNA viral ou Np.

-> Uma das mudanças mais marcantes na metabolômica intracelular foi o acúmulo de intermediários de síntese de purina de novo, incluindo 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP), N-formilglicinamida ribonucleotídeo (FGAR),

aminoimidazole ribonucleotídeo (AIR) e succinilaminoimidazolarboxamida (SAASCINILAMINOICARboxamida) em células infectadas por vírus.

-> A síntese de ribonucleotídeos requer ribose derivada da glicose, bem como unidades de um carbono (1C) transportadas por espécies de folato. A glicose intracelular e o folato foram significativamente depletados nas células infectadas com SARS-CoV-2, levantando a possibilidade de que a glicose do hospedeiro e o metabolismo do folato foram sequestrados para atender à demanda de replicação do RNA subgenômico viral. Curiosamente, isso ocorre concomitantemente com uma diminuição significativa na abundância do mRNA do hospedeiro, especulando-se que foram desestabilizados pela atividade do "desligamento" do hospedeiro pelo SARS-CoV-2 para salvar o fornecimento de nucleotídeos do hospedeiro para a biossíntese viral¹⁸. Digno de nota, o monofosfato de inosina (IMP) não aumentou significativamente, sugerindo um equilíbrio entre a produção e o consumo nesta etapa regulada da síntese de purina. Consistente com a observação de que o SARS-CoV-2 também desliga a tradução da maioria das proteínas do hospedeiro, os resultados sugerem que ele desenvolveu uma estratégia para regular positivamente o metabolismo da purina no nível pós-tradução.

-> Os níveis de glicose intracelular estavam mais baixos e os níveis de lactato mais altos no ponto de tempo inicial, sugerindo aumento da glicólise. A glicólise induzida por SARS-CoV-2 e o metabolismo de um carbono suportam a expressão, replicação e efeito citopático do RNA viral e da proteína.

-> O metabolismo do folato é crítico para a transferência de unidades 1C para a síntese de nucleotídeos e também está intimamente ligado à biossíntese de glutatona por meio da via de transulfuração. A depleção de folato nas células infectadas com SARS-CoV-2 foi acoplada ao aumento da abundância de glutatona, levantando a possibilidade de que o metabolismo 1C possa suportar a replicação do SARS-CoV-2 por meio de papéis na defesa antioxidante. No entanto, o inibidor da gama-glutamylcisteína sintetase L-butionina-sulfoximina (BSO), que bloqueia a síntese de glutatona (GSH, GSSG), não teve qualquer efeito aparente nos níveis de gRNA viral e Np. Este resultado sugere que o aumento no pool de glutatona de células infectadas com SARS-CoV-2 pode ser um epifenômeno da reconfiguração metabólica e não diretamente necessário para a replicação viral, ou pode assumir um papel em microambientes in vivo.

-> Desta forma, o SARS-CoV-2 remodela o folato do hospedeiro e o metabolismo de um carbono no nível pós-transcricional para apoiar a síntese de purina de novo, ignorando o desligamento viral da tradução do hospedeiro.

-> A glicose intracelular e o folato são reduzidos nas células infectadas com SARS-CoV-2, e a replicação viral é extremamente sensível aos inibidores do folato e do metabolismo de um carbono, notadamente o metotrexato.

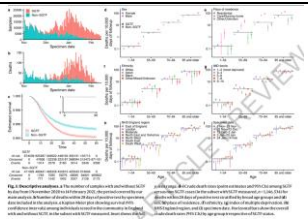
-> Guiados por essas mudanças metabólicas pós-infecção precoce, foi verificado se a inibição do metabolismo do folato pode diminuir a expressão do RNA viral e a produção de vírions. A droga amplamente utilizada metotrexato (MTX), um análogo do folato que inibe competitivamente a enzima diidrofolato redutase (DHFR), bem como várias etapas adicionais no metabolismo 1C e síntese de nucleotídeos bloqueou significativamente o efeito citopático (CPE) induzido por vírus, reduziu o gRNA viral e Níveis de Np e secreção diminuída de vírion infeccioso em quase 2 log). Todos os efeitos mencionados de 1 μM de MTX podem ser pelo menos parcialmente revertidos por 30 μM de hipoxantina, um intermediário da via de resgate de purinas e uma fonte alternativa de purinas. Curiosamente, a adição de 100 μM da timidina de desoxinucleotídeo de pirimidina ou 1 mM do formato de doador de grupo de um carbono poderia restaurar apenas parcialmente os níveis de gRNA viral, mas não foi capaz de resgatar a tradução de Np viral, produção de vírion ou CPE. Resultados semelhantes foram obtidos em células de câncer pulmonar A549 ACE2 +, onde o MTX diminuiu a expressão do gRNA e do RNA subgenômico Np, a carga viral e o CPE. Esses fenótipos foram significativamente resgatados pela adição de hipoxantina, mas não por formiato. A suplementação de timidina também aumentou gRNA, mas não a expressão de RNA subgenômico Np em células A594 ACE2 +. Por RNA Fluxo-FISH quantitativo, apenas a hipoxantina salvou significativamente a expressão de RNA subgenômico Np em A549 ACE2 +. Estes resultados sugerem que a sensibilidade da replicação viral ao metotrexato está intimamente relacionada ao papel crítico do metabolismo do folato no suporte da síntese de purina de novo e são indicativos de papéis conservados em um tipo de célula humana fisiologicamente relevante.

-> Por fim, observado que o metabolismo de um carbono da serina induzido pelo SARS-CoV-2 embasa a expressão, replicação e efeito citopático do RNA viral e da proteína.

-> Para isolar ainda mais os papéis da geração de espécies de folato e interconversão na

			<p>replicação viral, inibimos as isoformas citosólicas e mitocondriais da serina hidroximetiltransferase (SHMT1 e SHMT2). O tratamento de células Vero E6 pouco antes da infecção com o inibidor duplo SHMT1/2 altamente específico SHIN124 reduziu o título do vírus infeccioso em ~ 1-log a 48 hpi, diminuiu os níveis de gRNA e nucleoproteína da fita + e induziu resistência ao CPE viral. Os efeitos do SHIN1 podem ser resgatados pela adição de formato, demonstrando um mecanismo de ação do inibidor no alvo. SHIN1 exerceu efeitos semelhantes em células A549 ACE2 + na replicação de SARS-CoV-2 e CPE e RNA Flow-FISH demonstrou que SHIN1 também diminuiu significativamente a expressão de Np RNA. Como SHIN1 é um antagonista duplo de SHMT1/2, usamos o CRISPR para testar se a replicação do SARS-CoV-2 era especificamente dependente de uma via de metabolismo de um carbono mediada por SHMT1 ou SHMT2. CRISPR SHMT1 tendo como alvo a expressão reduzida da fita + gRNA, Np RNA e proteína, diminuição do título do vírus infeccioso em quase 1 log e aumento da sobrevivência celular. Em contraste, o direcionamento CRISPR SHMT2 teve efeito mínimo sobre esses parâmetros de infecção viral. Embora haja alguma expressão residual de SHMT2 neste experimento, o tratamento com PierA também é conhecido por bloquear indiretamente a via mitocondrial 1C23, mas também não reduziu a replicação viral. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que o ramo citosólico do metabolismo do hospedeiro 1C é particularmente importante para a produção de vírions, potencialmente para a produção de RNA subgenômico viral.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Coletivamente, essas observações levantam a hipótese de que o SARS-CoV-2 ativa o metabolismo da glicose e do folato no nível pós-transcricional em células recém-infectadas para suprir a enorme necessidade de síntese de ribonucleotídeos, de uma maneira que contorna o comprometimento viral da tradução do mRNA do hospedeiro.</p> <p>-> A terapia direcionada ao metabolismo do hospedeiro pode aumentar o arsenal contra futuros surtos de coronavírus.</p>
<p>Clin Infect Dis 15MAR2021</p>	<p>Reinfection Rates among Patients who Previously Tested Positive for COVID-19: a Retrospective Cohort Study</p>	<p>Sheehan MM et al. USA. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33718968/</p>	<p>Infecção prévia confere proteção contra a reinfecção e a COVID-19 sintomática</p> <p>- Prévio: A proteção conferida pela doença anterior entre os pacientes com COVID-19 é desconhecida. Se a infecção fornecer imunidade duradoura substancial, pode ser apropriado reconsiderar os planos de distribuição de vacinação.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Estudo de coorte retrospectivo de um sistema de saúde multi-hospitalar que</p>

				<p>incluiu 150.325 pacientes testados para infecção pela COVID-19 através da PCR de 12 de março de 2020 a 30 de agosto de 2020. Os testes realizados até 24 de fevereiro de 2021 nesses pacientes foram incluídos para análise.</p> <p>-> Desfecho principal: reinfecção, definida como infecção ≥ 90 dias após o teste inicial.</p> <p>-> Desfechos secundários: infecção sintomática e proteção de infecção anterior contra reinfecção.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> Média de idade 51,4\pm22,4 anos, 54,5% do sexo feminino</p> <p>-> De 150.325 pacientes, 8.845 (5,9%) testaram positivo e 141.480 (94,1%) testaram negativo antes de 30 de agosto.</p> <p>-> 1.278 (14,4%) dos pacientes positivos foram retestados após 90 dias, e 62 tiveram possível reinfecção. Destes, 31 (50%) eram sintomáticos.</p> <p>-> Daqueles com teste inicial negativo, 5.449 (3,9%) foram posteriormente positivos e 3.191 (58,5%) foram sintomáticos.</p> <p>-> A proteção oferecida contra a infecção anterior foi 81,8% (IC95% 76,6 a 85,8) e contra infecção sintomática foi 84,5% (IC 95% 77,9 a 89,1). Essa proteção aumentou com o tempo.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> A infecção prévia em pacientes com COVID-19 foi altamente protetora contra reinfecção e doença sintomática. Essa proteção aumentou com o tempo, sugerindo que a eliminação viral ou a resposta imune contínua podem persistir além de 90 dias e podem não representar uma reinfecção verdadeira. Como o fornecimento da vacina é limitado, os pacientes com história conhecida de COVID-19 podem atrasar a vacinação precoce para permitir que os mais vulneráveis tenham acesso à vacina e reduzam a transmissão.</p>
Nature 15MAR2021	Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7	Davies NG et al. UK https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33723411/	Aumento d amortalidade pela linhagem B.1.1.7	<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</p>



gravidade da doença.

- 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.

- Métodos:

- Vinculados três conjuntos de dados fornecidos pelo programa *Public Health England*: 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 (*spike*) 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 *Office for National Statistics*, por meio de relatórios diretos da *Public Health England and Health Protection*.

-> 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.

-> A falha do gene *spike* (SGTF; S gene target failure) foi definida como qualquer teste com Ct <30 para ORF1ab e N, mas sem detecção do gene spike e amostras não-SGTF como qualquer teste com Ct <30 para ORF1ab, N e S.

- Resultado:

-> 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 spike (falha do alvo do gene S, SGTF1/ *S gene target failure*).

-> 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.

-> 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.
 -> 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.
 - Conclusão:
 -> 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.

Cell
12MAR2021

Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity

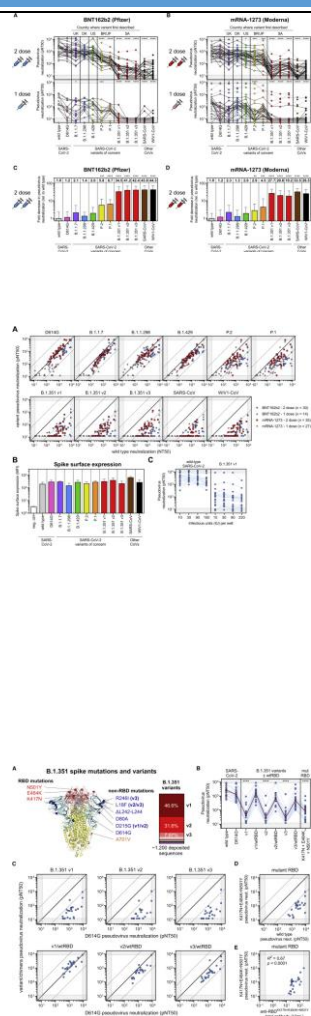
Garcia-Beltran WF et al. USA, Germany 7 South Africa.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33743213/>

The figure consists of several panels:

- COVID-19 vaccine recipients:** Shows BNT162b2 (Pfizer) with 1 and 2 doses, and mRNA-1273 (Moderna) with 1 and 2 doses.
- Pseudovirus neutralization by vaccinee sera:** A graph showing neutralization levels for various variants. Wildtype and D614G show high neutralization, while B.1.1.7, B.1.1.298, B.1.1.429, P.2, and F.1 show significantly reduced neutralization. B.1.351 shows almost no neutralization.
- B.1.351 spike mutations:** A 3D model of the spike protein highlighting mutations: N501Y, E484K, K417N, L452R, D614G, D215G, D414G, and A501V.
- Neutralization:** A diagram showing that B.1.351 has 'Good' neutralization with wildtype sera but 'Poorest' neutralization with B.1.351 sera. Mutations like E484K and K417N are labeled as 'Slightly decreased' or 'Poor'.
- Phylogenetic trees:** Panel A shows a tree of SARS-CoV-2 variant lineages from Jan 2020 to Jan 2021. Panel B shows the emergence of SARS-CoV-2 variant lineages on a world map. Panel C shows naturally occurring mutations in the SARS-CoV-2 spike protein. Panel D shows a sequence alignment of naturally occurring variants by strain. Panel E shows a sequence alignment of SARS-CoV-2 variants.

Várias variantes do SARS-CoV-2 escapam da neutralização viral desencadeada pela imunidade humoral obtida pela vacinação (mRNA-1273 e BNT162b2)

- 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 *spike*, o principal alvo dos anticorpos neutralizantes.
 -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.
 -Métodos:
 -> 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 amplificações 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 sequenciação 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 transfecção 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 reinfeção 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 reinfeção** (Paiva et al., 2020).

-> **Surpreendentemente, a neutralização de**

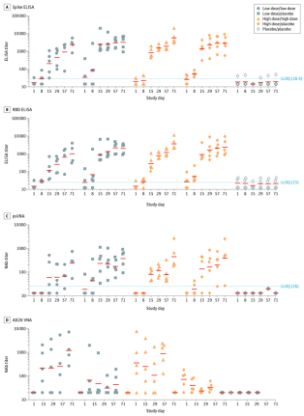
todas as três cepas sul-africanas B.1.351 foi substancialmente diminuída para ambas as vacinas com duas doses (v1: 34,5 vezes para BNT162b2 e 27,7 vezes para mRNA-1273; v2: 41,2 vezes para BNT162b2 e 20,8 vezes para mRNA-1273; v3: 42,4 vezes para BNT162b2 e 19,2 vezes para mRNA-1273; $p < 0,0001$ para 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 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.

- Conclusões:

-> 5/10 pseudovírus, com mutações no domínio de ligação ao receptor (RBD), incluindo K417N/T, E484K e N501Y, foram altamente resistentes à neutralização.

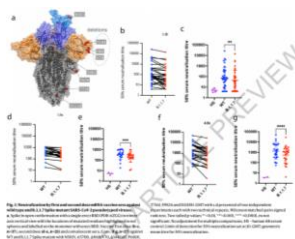
-> A neutralização cruzada de variantes B.1.351 foi comparável ao SARS-CoV e ao WIV1-CoV derivado do morcego, sugerindo que um número relativamente pequeno de mutações pode mediar o escape potente das

				<p>respostas à vacina. -> 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. -> 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. - 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 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</p>

				<p>(mediana de idade, 42; faixa etária, 22-52 anos; 52% mulheres) e todos completaram o ensaio até o ponto final intermediário do dia 71.</p> <p>-> Os anticorpos ligantes e neutralizantes surgiram rapidamente no dia 8 após a imunização inicial em 90% e 25% dos receptores da vacina, respectivamente.</p> <p>-> No dia 57, os anticorpos de ligação e neutralizantes foram detectados em 100% dos receptores da vacina após uma única imunização.</p> <p>-> 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.</p> <p>-> 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 +.</p> <p>-> 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 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.COV2.S 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.COV2.S</p>
Nature 11MAR2021	Sensitivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 to mRNA vaccine-elicited	Collier DA et al. UK, USA, Mexico, South Africa. https://pubmed.ncbi.nlm.	Mutação E484K da variante B.1.1.7 do SARS-CoV-2:	- 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 B1.1.7,

antibodies

nih.gov/33706364/



potencial escape das vacinas e anticorpos monoclonais

agora relatado em 94 países.

-> 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.

-> Objetivo: Avaliar as respostas imunes após a vacinação com a vacina de mRNA BNT162b22.

- Métodos:

-> Avaliação das respostas de anticorpos neutralizantes após a primeira e segunda imunizações usando pseudovírus que expressam a proteína *spike* do tipo selvagem ou as mutações de 8 aminoácidos encontradas na proteína *spike* B.1.1.7.

-> Títulos de IgG no soro para proteína Nucleocapsídeo (N), S e o RBD foram testados também.

- Resultados:

-> N=37 participantes receberam a primeira dose da vacina de mRNA BNT162b2 três semanas antes da coleta de sangue para coleta de células monoculares do sangue (PBMC).

-> Mediana de idade: 62 anos (IQR 47-84) e 35% eram mulheres.

-> N=21 desses participantes também tiveram uma coleta de sangue 3 semanas após receber a 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 $3,2 \pm 5,7$. Após a segunda dose, o GMT foi acentuadamente aumentado em comparação com os títulos da primeira dose, com média da variação $1,9 \pm 0,9$.

-> 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 ID_{50} 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.

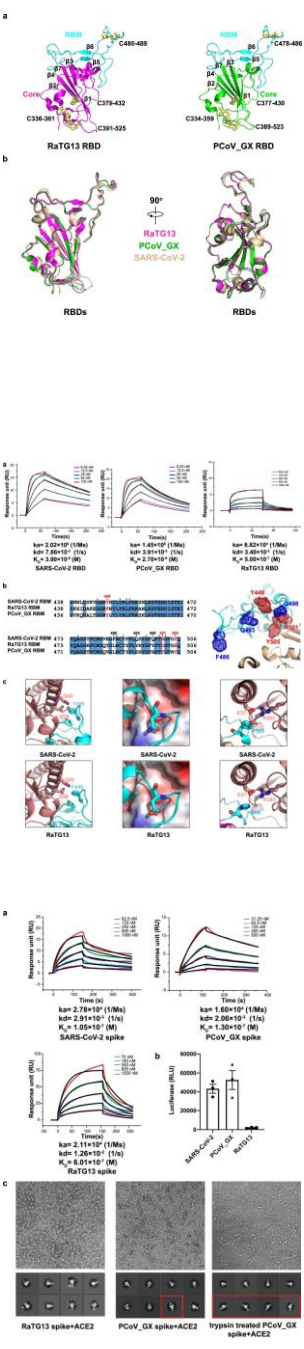
-> É importante ressaltar que mutações em K417 foram associadas ao escape da neutralização dos mAbs, incluindo o mAb LY-CoV016,6 recentemente aprovado.

-> 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

			<p>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.</p> <p>-> A emergência de E484K no fundo B.1.1.7 representa uma ameaça à vacina BNT162b.</p>
<p>Nat Commun 11MAR2021</p>	<p>Bat and pangolin coronavirus spike glycoprotein structures provide insights into SARS-CoV-2 evolution</p>	<p>Zhang S et al. China. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33707453/</p>  <p>a</p> <p>RaTG13 RBD (residues: C338-361, C378-432, C480-488, C476-486, C389-423)</p> <p>PCoV_GX RBD (residues: C334-359, C377-430, C389-423)</p> <p>b</p> <p>RBDs (RaTG13, PCoV_GX, SARS-CoV-2)</p> <p>c</p> <p>SPR sensorgrams for RBD-spike interactions:</p> <ul style="list-style-type: none"> SARS-CoV-2 RBD: $k_{on} = 2.22 \times 10^5 (1/Ms)$, $k_{off} = 7.88 \times 10^{-3} (1/s)$, $K_D = 3.56 \times 10^{-10} (M)$ PCoV_GX RBD: $k_{on} = 4.01 \times 10^5 (1/Ms)$, $k_{off} = 3.91 \times 10^{-3} (1/s)$, $K_D = 2.39 \times 10^{-10} (M)$ RaTG13 RBD: $k_{on} = 8.20 \times 10^4 (1/Ms)$, $k_{off} = 2.48 \times 10^{-3} (1/s)$, $K_D = 3.03 \times 10^{-10} (M)$ <p>d</p> <p>SPR sensorgrams for spike-spike interactions:</p> <ul style="list-style-type: none"> SARS-CoV-2 spike: $k_{on} = 2.78 \times 10^5 (1/Ms)$, $k_{off} = 2.91 \times 10^{-3} (1/s)$, $K_D = 1.05 \times 10^{-10} (M)$ PCoV_GX spike: $k_{on} = 1.60 \times 10^5 (1/Ms)$, $k_{off} = 2.06 \times 10^{-3} (1/s)$, $K_D = 1.28 \times 10^{-10} (M)$ RaTG13 spike: $k_{on} = 2.11 \times 10^5 (1/Ms)$, $k_{off} = 1.29 \times 10^{-3} (1/s)$, $K_D = 6.01 \times 10^{-10} (M)$ <p>e</p> <p>Microscopy images of RBD-spike interactions on ACE2.</p> <p>RaTG13 spike+ACE2, PCoV_GX spike+ACE2, trypsin treated PCoV_GX spike+ACE2</p>	<p>Evolução do SARS-CoV-2 a partir de mudanças no RBD da proteína spike</p> <p>- Prévio: Ao reconhecer o receptor celular do hospedeiro e mediar a fusão do vírus e das membranas celulares, a glicoproteína <i>spike</i> (S) dos coronavírus é a proteína viral mais crítica para a transmissão cruzada de espécies e infecção.</p> <p>-> O coronavírus RaTG13, detectado no morcego ferradura <i>Rhinolophus affinis</i> 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.</p> <p>-> Coronavírus do pangolin (PCoV), intimamente relacionados ao SARS-CoV-2, também foram identificados em pangolins malaios contrabandeados (<i>Manis javanica</i>) 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).</p> <p>-> 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.</p> <p>- 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.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> A glicoproteína <i>spike</i> homotrimerico (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</p> <p>-> Todos os três domínios de ligação ao receptor (RBDs) dos dois trímeros da proteína <i>spike</i> (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.</p> <p>-> No entanto, a proteína <i>spike</i> do PCoV_GX, mas não o RaTG13, é comparável à proteína <i>spike</i> do SARS-CoV-2 na ligação ao receptor ECA2 humano e no suporte à entrada nas células do pseudovírus.</p> <p>-> Identificados também resíduos críticos no</p>

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 medidada 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, Q498, N501 e Y505 no SARS-CoV-2 RBM formam um patch que tem interações hidrofílicas significativas com a hECA2.

-> 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.

-> 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.

-> 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.

-> 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

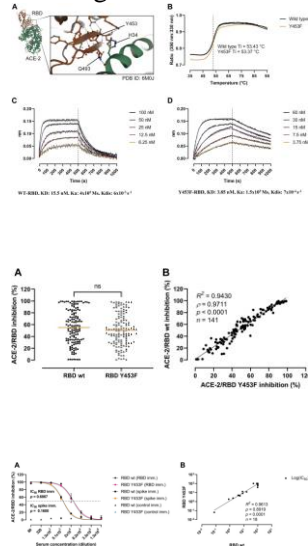
- Conclusões:

-> 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”).

J Biol Chem
10MAR2021

The SARS-CoV-2 Y453F mink variant displays a pronounced increase in ACE-2 affinity but does not challenge antibody neutralization

Bayarri-Olmos R et al.
Denmark.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33716040/>



A variante Y453F dos visons apresentam afinidade à ECA2 humana, mas não tem impacto na neutralização

- Prévio: A transmissão do SARS-CoV-2 de humanos para animais foi relatada para muitas espécies domesticadas, incluindo visons em fazendas.

-> A identificação de novas mutações no gene spike que aparecem em visons levantou grandes preocupações sobre a evasão imunológica em potencial e os desafios para a estratégia global de vacinas.

-> Uma variante genética, conhecida como "cluster-cinco", surgiu entre os visons cultivados na Dinamarca e resultou na paralisação completa da maior produção de visons do mundo.

-> No entanto, as propriedades funcionais desta nova variante não foram estabelecidas.

- Objetivos: Apresentar dados funcionais sobre a variante do cluster cinco, que contém uma mutação resultando em uma alteração do resíduo Y453F no domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína spike.

- Métodos:

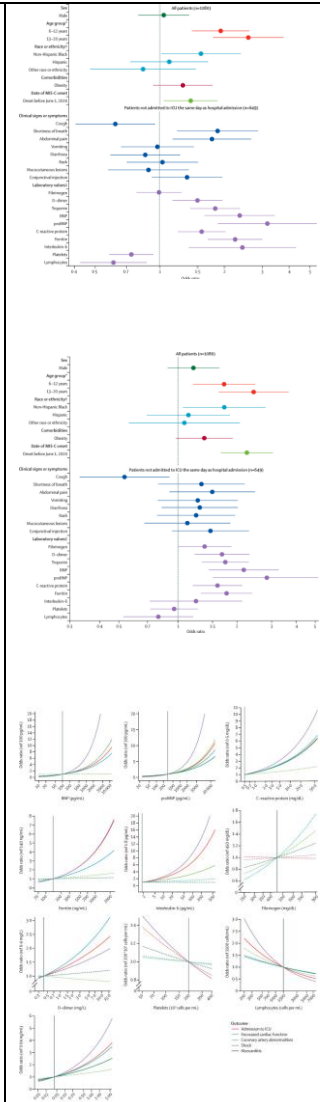
-> Ensaio de inibição da ECA-2/RBD baseado em ELISA

- Resultados:

-> Para determinar a significância biológica da mutação Y453F, estudado o impacto na estabilidade e função da proteína por desnaturação térmica e experimentos de cinética de ligação: usando a razão da fluorescência intrínseca a 350 e 330 nm ao longo de um gradiente de temperatura de 35 a 95°C, não observadas diferenças significativas nas

				<p>temperaturas de inflexão (53,43 e 53,37 ° C para o WT RBD e Y453F, respectivamente), sugerindo que a variante não tem efeito crítico na estabilidade da proteína. Também determinada a cinética da interação com o ectodomínio da ECA2 humano por interferometria de biolayer. A variante Y453F se ligou com uma afinidade 4 vezes maior do que o WT (3,85 nM vs 15,5 nM) e as análises de K_a e K_{dis} revelaram que se ligou mais rápido à ECA2 (K_a $1,5 \times 10^5$ Ms vs 4×10^5 Ms) e permaneceu limitado por mais tempo (7×10^{-4} s⁻¹ vs 6×10^{-3} s⁻¹).</p> <p>-> A variante Y453F não diminui a imunidade humoral estabelecida de indivíduos previamente infectados nem afeta a resposta de anticorpos neutralizantes em um modelo de camundongo vacinal com base na cepa RBD de Wuhan original ou com a utilização da spike como antígenos.</p> <p>-> Assim, os soros de camundongos imunizados com RBD inibiram a ligação de WT e Y453F RBD à ECA2 com uma IC_{50} de 28.369 e 26.579, respectivamente, várias vezes mais efetivamente do que os soros de camundongos imunizados com a spike (IC_{50} de 7.075 e 6.363, respectivamente). Mais importante, e independentemente da estratégia de imunização, os soros de camundongos não mostraram diferenças na potência de inibição das duas variantes da RBD.</p> <p>-> No entanto, a análise de interferometria de biolayer demonstra que ela se liga ao receptor ECA2 humano com uma afinidade quatro vezes maior em comparação com a cepa original, sugerindo uma capacidade de transmissão aprimorada e um possível desafio para o controle viral.</p> <p>- Discussão:</p> <p>-> Esses resultados também indicam que o aumento na frequência da variante do grupo cinco em fazendas de visons pode ser resultado da vantagem de aptidão conferida pela adaptação do receptor ao invés de evasão das respostas imunológicas.</p>
Lancet Child Adolesc Health 09MAR2021	Factors linked to severe outcomes in multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C)	Abrams JY et al. USA. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33711293/	Fatores de risco associados aos desfechos da síndrome multiinflamatória sistêmica em	- Prévio: A síndrome inflamatória multissistêmica em crianças (MIS-C) é uma condição de saúde séria recentemente identificada associada à infecção pelo SARS-CoV-2. As manifestações clínicas variam amplamente entre os pacientes com

in the USA: a retrospective surveillance study



crianças

MIS-C, e o objetivo deste estudo foi investigar os fatores associados a desfechos graves.

- Métodos:

-> Estudo de vigilância retrospectivo, que incluiu pacientes que atenderam à definição de caso do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA para MIS-C (menores de 21 anos, febre, evidência laboratorial de inflamação, internados no hospital, multissistema ≥ 2 envolvimento de órgãos [cardíaco, renal, respiratório, hematológico, gastrointestinal, dermatológico ou neurológico], nenhum diagnóstico alternativo plausível e confirmação laboratorial de infecção pelo SARS-CoV-2 pela RT-PCR, sorologia ou teste de antígeno, ou exposição conhecida para COVID-19 dentro de 4 semanas antes do início dos sintomas)

-> Os fatores avaliados quanto a possíveis ligações com desfechos graves incluíram fatores pré-existentes do paciente (sexo, idade, raça ou etnia, obesidade e data de início dos sintomas MIS-C antes de 1º de junho de 2020) e achados clínicos (sinais ou sintomas e marcadores laboratoriais).

-> Modelos de regressão logística, ajustados para todos os fatores pré-existentes, foram usados para estimar odds ratios entre fatores explicativos potenciais e os seguintes resultados: admissão à unidade de terapia intensiva (UTI), choque, função cardíaca diminuída, miocardite e anormalidades da artéria coronária.

- Resultados:

-> 1080 pacientes atenderam à definição de caso do CDC para MIS-C e tiveram início dos sintomas entre 11 de março e 10 de outubro de 2020.

-> A admissão na UTI foi mais provável em pacientes com idade entre 6-12 anos (odds ratio ajustado= 1,9 [IC95%, 1,4-2,6] e pacientes com idade entre 13-20 anos (2,6 [1,8-3,8]), em comparação com pacientes com 0-5 anos, e mais provavelmente em pacientes negros não hispânicos, em comparação com pacientes brancos não hispânicos (1,6 [1,0-2,4]).

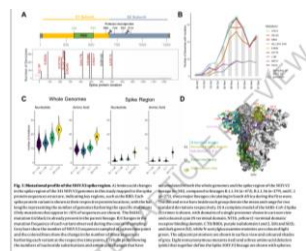
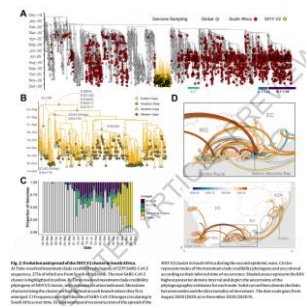
-> A admissão na UTI foi mais provável para pacientes com falta de ar (1,9 [1,2-2,9]), dor abdominal (1,7 [1,2-2,7]) e pacientes com concentrações aumentadas de proteína C-reativa, troponina, ferritina, dímero-D, peptídeo natriurético cerebral

(BNP), pró-BNP tipo B do terminal N ou interleucina-6, ou contagem reduzida de plaquetas ou linfócitos.
 -> Encontradas associações semelhantes para diminuição da função cardíaca, choque e miocardite. Anormalidades da artéria coronária foram mais comuns em pacientes do sexo masculino (1,5 [1,1-2,1]) do que em pacientes do sexo feminino e pacientes com lesões mucocutâneas (2,2 [1,3-3,5]) ou injeção conjuntival (2,3 [1,4-3,7]).
 - Discussão:
 -> A identificação de características demográficas e clínicas importantes pode ajudar no reconhecimento precoce e no gerenciamento imediato de desfechos graves para pacientes com MIS-C.

Nature
09MAR2021

Emergence of a SARS-CoV-2 variant of concern with mutations in spike glycoprotein

Tegally H et al. South Africa, Brazil, Germany, USA, UK.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33690265/>



Identificação e evolução da variante 501Y.V2 na África do Sul

- 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.
 - Resultados e Métodos:
 -> Descrição da nova variante do SARS-CoV-2 (501Y.V2) caracterizada por oito mutações 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 tempo-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.

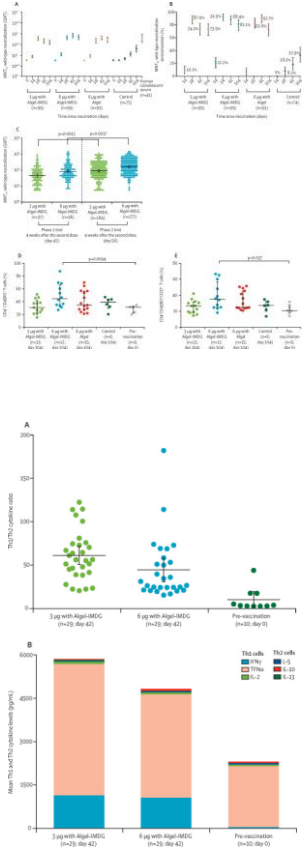
-> *Uma estimativa das taxas evolutivas indicam que as substituições na variante 501Y.V2 estão acontecendo em 1.917E-3 alterações de nucleotídeos/local/ano, em comparação com 5.344E-4, 4.251E-4 e 9.781E-4 respectivamente para B.1.1.54, B.1.1.56 e C.1.*

-> 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

			<p>-> 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.</p>
<p>Lancet Infect Dis 08MAR2021</p>	<p>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</p>	<p>Ella R et al. India. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33705727/</p> 	<p>Segurança e eficácia da vacina BBV152 (vírus SARS-Cov-2 inativado)</p> <p>- 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).</p> <p>-> 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.</p> <p>- 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.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> 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.</p> <p>-> Os participantes com ácido nucleico SARS-CoV-2 positivo e testes sorológicos foram excluídos.</p> <p>-> 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.</p> <p>-> Os participantes, investigadores, coordenadores do estudo, pessoal relacionado ao estudo e o patrocinador foram mascarados para a alocação do grupo de tratamento.</p> <p>-> Duas doses intramusculares da vacina foram administradas no dia 0 e no dia 28.</p> <p>-> Desfecho primário: títulos de anticorpos neutralizantes do tipo selvagem do SARS-CoV-2 e as taxas de seroconversão</p>

(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 seroconversão 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.

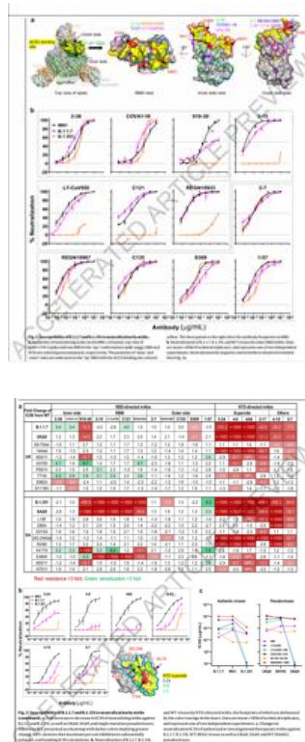
-> No ensaio de fase 2, o BBV152 mostrou melhores resultados de reatogenicidade e segurança, e respostas imunes humorais e mediadas por células aprimoradas em comparação com o ensaio de fase 1.

-> A formulação de 6 µg com Algel-IMDG foi selecionada para o ensaio de eficácia de fase 3.

Nature
08MAR2021

**Antibody
Resistance of
SARS-CoV-2
Variants B.1.351
and B.1.1.7**

Wang P et al. USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33684923/>



Resistência das
variants B.1.1.7 e
B.1.351 aos
anticorpos
monoclonais:
preocupação
quanto ao
impacto na
eficácia das
vacinas

- Prévio: A pandemia da COVID-19 devastou o globo e seu agente causador, a SARS-CoV-2, continua a se manifestar.

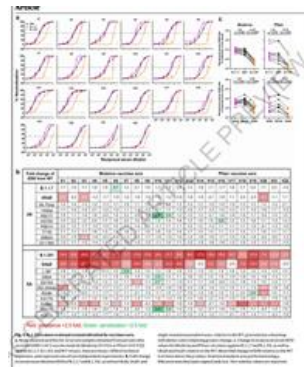
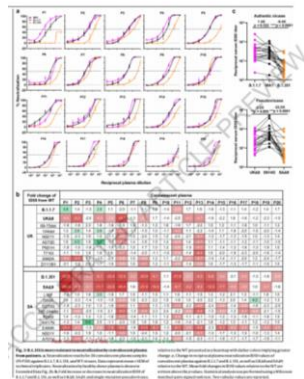
-> As perspectivas de acabar com esta pandemia dependem do desenvolvimento de intervenções eficazes. As terapêuticas de anticorpos monoclonais (mAb) simples e combinados receberam autorização de uso de emergência, com mais anticorpos em desenvolvimento.

-> 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 *spike*.

-> 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 antígeno 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:

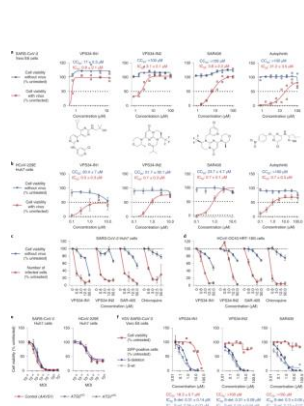
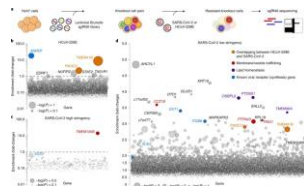
-> A variante B.1.1.7 é refratária à neutralização pela maioria dos mAbs ao domínio N-terminal (NTD) da proteína spike relativamente resistente a alguns mAbs ao domínio de ligação ao receptor (RBD), mas não foi mais resistente ao plasma convalescente ou aos soros de

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

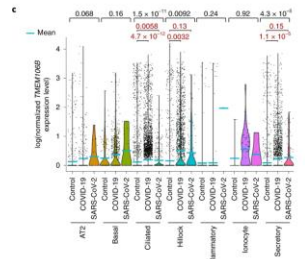
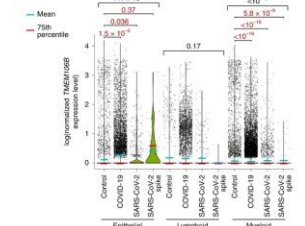
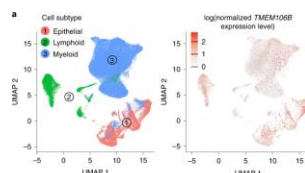
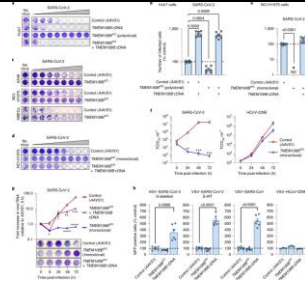
**Genome-wide
 CRISPR
 screening
 identifies
 TMEM106B as a
 proviral host
 factor for SARS-
 CoV-2**

Baggen J et al. Belgium.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33686287/>



Proteína
 transmembrana
 108B (TMEM
 106B) como alvo
 terapêutico na
 COVID-19

- Prévio: A atual pandemia ds COVID-19 causou uma crise econômica e de saúde 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.
 -> Realiza investigação do tipo *CRISPR-based genome-wide knockout screen* (nockaute 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.

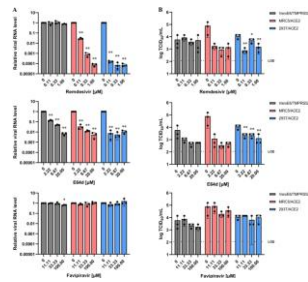
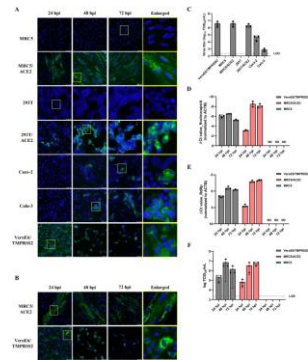
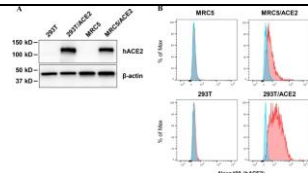
- Resultados:

-> 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

				<p>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.</p> <p>-> O SARS-CoV-2 requer ainda proteína lisossomal TMEM106B para infectar linhagens de células humanas e células pulmonares primárias.</p> <p>-> A superexpressão de TMEM106B aumentou a infecção pelo SARS-CoV-2, bem como infecção pelo pseudovírus, sugerindo um papel na entrada viral.</p> <p>-> 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.</p> <p>-> 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</p> <p>-> 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.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> 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.</p>
Sci Rep 08MAR2021	MRC5 cells engineered to express ACE2 serve as a model system for the	Uemura K et al. Japan. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33686154/	Células MRC5 do epitélio pulmonar humano modificadas com	- 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.

discovery of antivirals targeting SARS-CoV-2



a expressão da ECA2: plataforma para testar drogas anti-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 lentivirus: 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.

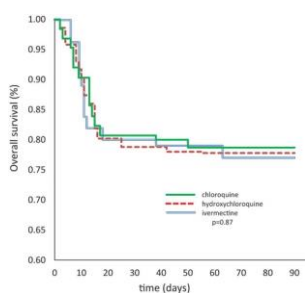
-> Além disso, a replicação do RNA viral e a produção do vírus da progênie foram significativamente reduzidas em resposta à administração do inibidor de replicação, remdesivir (0.11, 0.33 e 1 μM), nas células

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 de Referência em Roraima (Brasil) em maio de 2020.

-> 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).

-> Desfechos primários: necessidade de O2 suplementar, ventilação invasiva, admissão em UTI e óbito.

- Resultados:

-> N=168 pacientes foram randomizados.

-> Média de idade: 53,4 ± 15,6 anos, a maioria dos participantes era do sexo masculino (n = 95; 58,2%).

-> IMC > 30kg/m² em 37,5%, HAS 43,4%, DM 28,1%.

-> A terapia com corticosteroide, anticoagulante ou antibióticos foi uma decisão dos médicos assistentes, não havendo diferença entre os grupos.

-> A mortalidade foi semelhante em três grupos (22,2%; 21,3% e 23,0%) sugerindo inefetividade dos medicamentos.

-> Nenhuma diferença na incidência de eventos adversos graves foi observada.

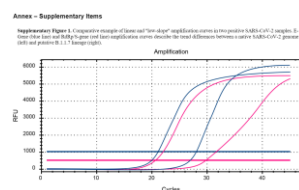
-> Ter mais de 60 anos de idade (37% vs 15%, HR=2,44, IC95% 1,4-4,3) obesidade

(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.
 - Conclusão:
 -> 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.

J Infect Dev
 Ctries
 07MAR2021

A straightforward molecular strategy to retrospectively investigate the spread of SARS-CoV-2 VOC202012/01 B.1.1.7 variant

Ibba G et al. Italy.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33690207/>



Estratégia para detecção da variante B.1.1.7 do SARS-CoV-2 pela RT-PCR

- 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.
 -> 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 com a deleção Δ69/70.
 - 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.
 - Métodos:
 -> Avaliação do padrão da curva de amplificação do gene S em comparação com os dos outros genes.
 -> 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.
 -> A RT-PCR foi realizada com o CFX96™ Real-time PCR Detection System-IVD (Bio-Rad Laboratories Inc, CA, EUA)
 -> 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.
 - Resultados:
 -> Esta abordagem permitiu detectar 64

amostras com curvas de amplificação não sigmoidais peculiares.
 -> 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.
 -> 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.
 - Discussão e conclusão:
 - > 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.

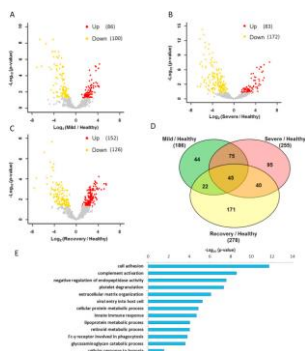
Urine (Amst)
05MAR2021

Urine proteome of COVID-19 patients

Li Y et al. China & USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33688631/>

Análise do proteasoma urinário numa pequena coorte de pacientes com COVID-19

- Prévio: Sangue e urina são biomateriais frequentes para descoberta de biomarcadores de doenças humanas devido à sua acessibilidade e não invasividade.
 - Objetivo: Avaliar os papéis diagnósticos das amostras de urina na progressão do tipo leve a grave da COVID-19 e no estado de recuperação com proteômica de urina de última geração.
 - Métodos:
 -> Seis pacientes COVID-19, compostos por 3 diagnosticados como casos graves, incluindo um óbito e 3 pacientes leves, foram investigados. Para confirmar os resultados derivados do proteoma da urina, duas amostras de recuperação foram analisadas posteriormente.
 -> No total, foram analisadas 40 amostras de urina que passaram no teste de qualidade, incluindo 32 controles saudáveis, 6 pacientes COVID-19 e 2 pessoas de recuperação correspondentes. Todos os pacientes foram testados positivo para a presença de ácido nucleico SARS-CoV-2. Todos eles desenvolveram febre ou tosse. Os pacientes graves apresentavam sintomas típicos de fadiga e dispneia. Todos os pacientes tinham comorbidades, incluindo 4 pacientes com hipertensão essencial, 1 paciente com hipertensão essencial e diabetes e 1 paciente com múltiplas metástases de câncer de cólon.
 -> Análise LC-MS/MS
 - Resultados:
 -> Um número total de 2.656 proteínas foi identificado a partir de 32 amostras de controle



saudáveis. Foram identificadas e quantificadas 1380 e 1641 proteínas em amostras de urina de COVID-19 e duas pessoas de recuperação no total, que foram significativamente inferiores às amostras de controles saudáveis.

-> Identificadas 56 proteínas exclusivas em conformidade com os critérios: Essas proteínas foram altamente associadas com a ativação do complemento, regulação da resposta imune, desintoxicação oxidante celular, resposta celular à hipóxia e apoptose induzida por estresse oxidativo, que podem refletir a patogênese da COVID-19 grave.

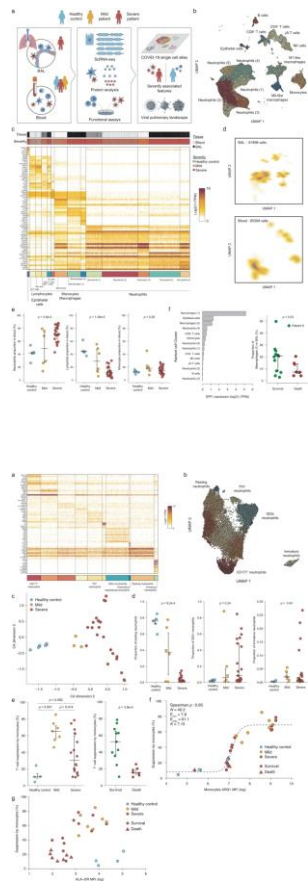
- Conclusões:

-> Este estudo demonstra que as alterações moleculares relacionadas à fisiopatologia da COVID-19 podem ser detectadas na urina e sua potencial aplicação no diagnóstico e prognóstico desta doença.

Nat Commun
05MAR2021

Deciphering the state of immune silence in fatal COVID-19 patients

Bost P et al. Israel, France, Italy.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674591/>



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

- Prévio: Desde o início da pandemia pelo 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.

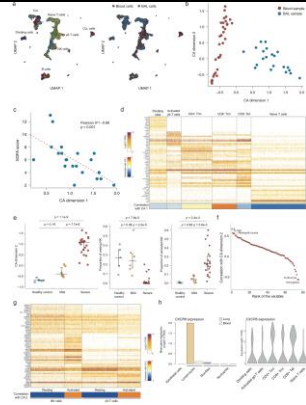
-> Assim, a análise multicêntrica em pacientes internados com COVID-19 estabeleceu uma associação entre os parâmetros clínicos e o resultado crítico não apenas a idade, comorbidades e doenças pré-existentes, mas também alterações imunológicas, como um aumento da proporção de neutrófilos/linfócitos, sugerindo 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 ativados; 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, efetoras 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:

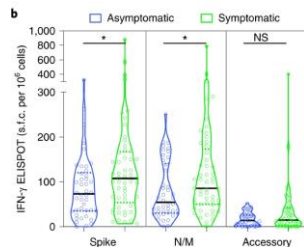
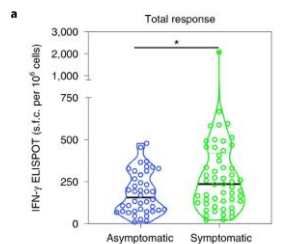
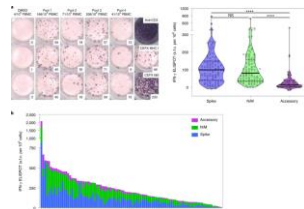
-> A desregulação mieloide induzida pela COVID-19 e o comprometimento linfóide estabelecem uma condição de 'silêncio imunológico' em pacientes com COVID-19 crítica.

-> Seria importante validar esses dados em estudos longitudinais.

Nat Immunol
05MAR2021

Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection

Zuo J et al. UK.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674800/>



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 *spike*

- 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 reinfeção.

- Objetivo: Analisar a magnitude e o fenótipo da resposta de linfócitos T específicos para o SARS-CoV-2.

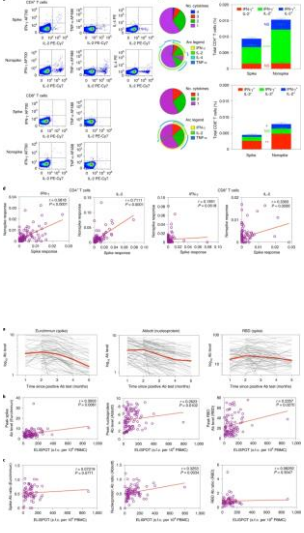
- Métodos:

-> N=100 doadores; sangue coletado 6 meses após a infecção.

-> Interferon (IFN)- γ ELISPOT, análise de citocinas intracelulares por citometria e ELISPOT.

-> Peptídeos Sintéticos: Pepmixes de peptídeos 15-mer sobrepostos por 11 resíduos de aminoácidos cobrindo as principais proteínas do SARS-CoV-2 (glicoproteína *spike* (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).

-> 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

			<p>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 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</p>

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.

-> 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).

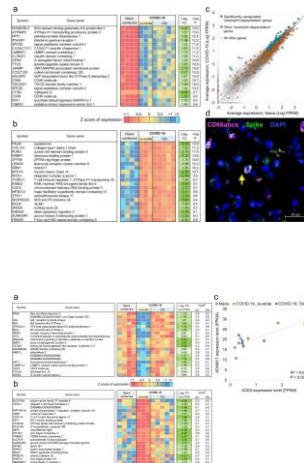
-> Uma duração significativamente mais longa da persistência do RNA do SARS-CoV-2 em swabs nasofaríngeos foi observada em pessoas com infecção pela linhagem B.1.1.7 (16 dias) em comparação com aqueles infectados por outras linhagens (14 dias).

-> Uma limitação do estudo é a falta de correlação com achados clínicos.

Commun Biol
05MAR2021

IFN signaling and neutrophil degranulation transcriptional signatures are induced during SARS-CoV-2 infection

Rosa BA et al. USA & Mexico.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674719/>



Assinatura molecular na COVID-19

- Prévio: O SARS-CoV-2 infectou mais de 92 milhões de pessoas em todo o mundo, resultando na COVID-19.

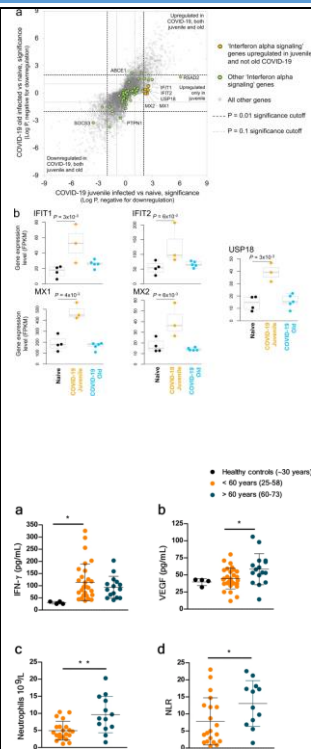
- Objetivo: No modelo de macaco rhesus de infecção pelo SARS-CoV-2, caracterizar as assinaturas transcricionais induzidas nos pulmões de macacos jovens e velhos após a infecção.

- Métodos:

-> Macacos rhesus SPF de origem indiana (*Macaca mulatta*) 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 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 metaloproteínase 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 TGFβ e FURIN, que é uma enzima conversora de TGFβ. 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 incluíram 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 aumento do 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.

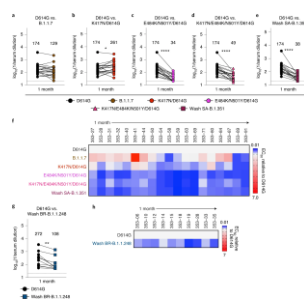
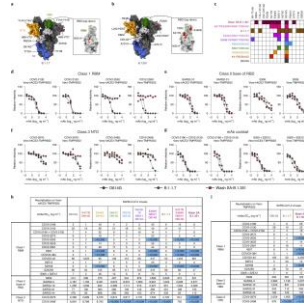
- Conclusões:

-> Os dados transcriptômicos delinearam as vias da doença que melhoram a compreensão da imunopatogênese de COVID-19.

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

- 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.

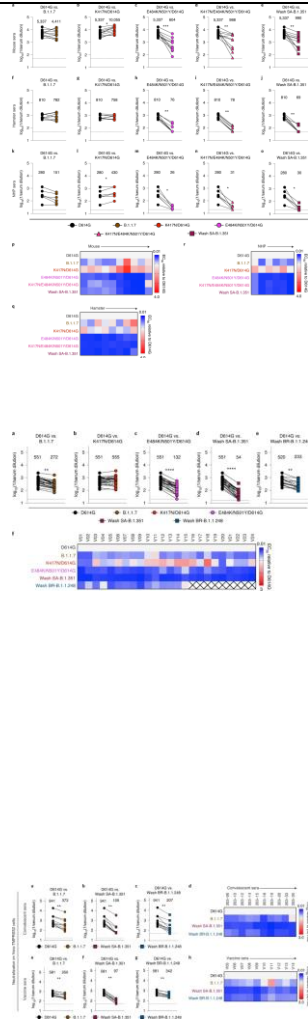
- Objetivo: Relatar o impacto na neutralização de anticorpos de um painel de variantes autênticas do SARS-CoV-2 incluindo a B.1.1.7, cepas quiméricas com genes spike sul-africanos ou brasileiros e variantes virais recombinantes isogênicas. Para atingir este objetivo, foram utilizados anticorpos monoclonais (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 pCMV1.

-> 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, aliquotados 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 próximas 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

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/>

Exposure	COVID-19 susceptibility		COVID-19 Severity	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Age 1 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 2 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 3 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 4 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 5 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 6 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 7 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 8 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 9 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 10 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 11 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 12 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 13 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 14 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 15 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 16 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 17 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 18 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 19 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 20 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 21 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 22 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 23 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 24 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 25 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 26 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 27 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 28 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 29 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 30 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 31 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 32 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 33 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 34 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 35 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 36 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 37 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 38 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 39 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 40 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 41 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 42 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 43 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 44 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 45 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 46 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 47 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 48 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 49 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 50 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 51 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 52 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 53 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 54 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 55 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 56 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 57 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 58 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 59 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 60 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 61 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 62 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 63 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 64 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 65 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 66 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 67 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 68 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 69 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 70 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 71 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 72 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 73 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 74 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 75 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 76 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 77 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 78 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 79 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 80 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 81 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 82 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 83 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 84 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 85 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 86 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 87 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 88 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 89 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 90 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 91 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 92 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 93 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 94 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 95 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 96 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 97 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 98 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 99 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00
Age 100 Standard	1.00 (0.99-1.00)	0.00	1.00 (0.99-1.00)	0.00

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

nas sequências de pico de vacinas podem ser necessários para prevenir a perda de proteção in vivo.

- 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:

-> Seleccionadas 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 susceptibilidade e gravidade do COVID-19.

-> 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.

-> 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.

Lancet Respir Med
04MAR2021

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

Soin AS. India & UK.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33676589/>

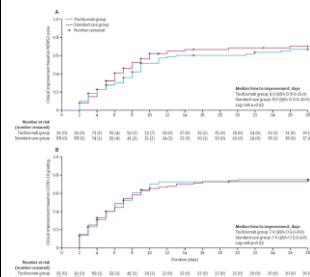
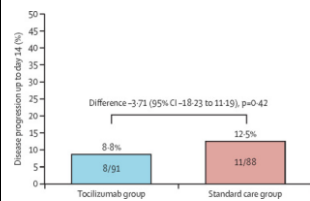
Ausência de eficácia do Tocilizumabe num estudo randomizado na Índia

- 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.

-> 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).

- Métodos:

-> COVINTOC é um ensaio clínico aberto, multicêntrico, randomizado, controlado, de fase 3 realizado em 12 hospitais públicos e



privados em toda a Índia.

-> 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).

-> 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.

-> 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 estudo sugere que o TCZ ainda pode ser eficaz em pacientes com COVID-19 grave e, portanto, deve ser investigado em estudos futuros.

Lancet Respir Med
 04MAR2021

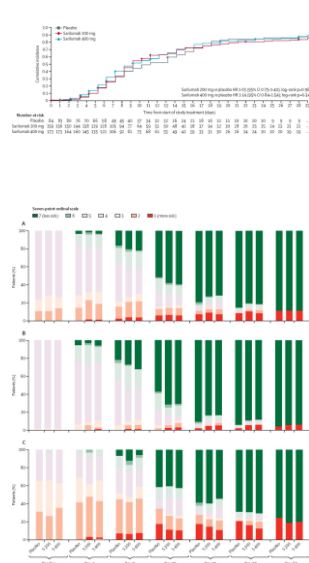
Sarilumab in patients admitted to hospital with severe or critical COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial

Lescure FX et al. France, Japan, Canada, USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33676590/>

Ausência de eficácia do Sarilumab na COVID-19 grave e crítica

- 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%

-> 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).

-> 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.

-> 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.

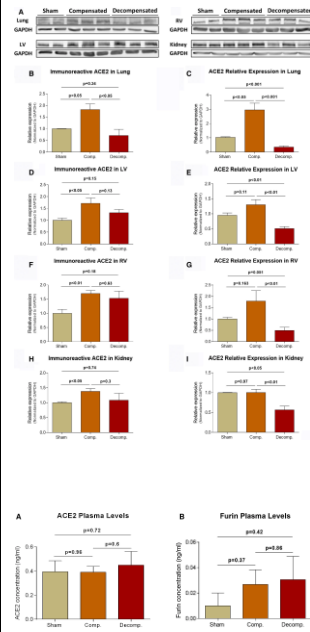
- Conclusões:

-> Este estudo não mostrou eficácia do sarilumabe em pacientes internados com COVID-19 e recebendo oxigênio suplementar.

J Cell Mol Med
04MAR2021

Pulmonary, cardiac and renal distribution of ACE2, furin, TMPRSS2 and ADAM17 in rats with heart failure: Potential implication for COVID-19 disease

Khoury EE et al. Israel. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33660945/>



Aumento da ECA2 e furin no coração, pulmão e rim de animais com insuficiência cardíaca: implicações potenciais na COVID-19

-> Ensaios com potência adequada de terapias imunomodulatórias direcionadas que avaliam a sobrevida como um desfecho primário são sugeridos em pacientes com COVID-19 crítica.

- 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.

-> 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 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.

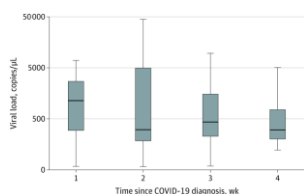
- Métodos:
-> A insuficiência cardíaca foi induzida em ratos Sprague Dawley machos pela criação de uma fístula cirúrgica aorto-cava. Ratos operados de forma simulada serviram como controle.

-> 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

				<p>rins foram colhidos para avaliação da remodelação do tecido e imunorreatividade, expressão e coloração imunohistoquímica da ECA2, furin, TMPRSS2 e ADAM17.</p> <p>-> Métodos da biologia molecular: qPCR, Western blot, imunofluorescência, ELISA</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> A imunorreatividade da ECA2 e os níveis do mRNA aumentaram nos tecidos pulmonar, cardíaco e renal da ICC compensada, mas não na descompensada.</p> <p>-> A imunorreatividade da furin foi aumentada na ICC compensada e descompensada nos tecidos pulmonar, cardíaco e córtex renal, mas não na medula.</p> <p>-> Curiosamente, tanto a expressão quanto a abundância da TMPRSS2 pulmonar, cardíaca e renal diminuíram na ICC em correlação com a gravidade da doença.</p> <p>-> Os níveis do mRNA da ADAM17 pulmonar, cardíaca e renal também foram regulados para baixo na ICC descompensada.</p> <p>-> Os níveis circulantes da furin aumentaram em proporção à gravidade da ICC, enquanto a ECA2 plasmática permaneceu inalterada.</p> <p>-> 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.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> A expressão aumentada da ECA2 na insuficiência cardíaca pode servir como um mecanismo compensatório, contrabalançando a hiperatividade da isoforma deletéria, a ECA.</p> <p>-> 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.</p> <p>-> Seria importante avaliar a expressão da ECA2, TMPRSS2, furin e ADAM17 em diferentes células de cada um dos órgãos estudados.</p>
<p>JAMA Ophthalmol 04MAR2021</p>	<p>SARS-CoV-2 on Ocular Surfaces in a Cohort of Patients With COVID-19 From</p>	<p>Azzolini C et al. Italy. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33662099/</p>	<p>Screening do SARS-CoV-2 no <i>swab</i> conjunctival</p>	<p>Importância: Desde fevereiro de 2020, a COVID-19 se espalhou rapidamente por todo o mundo, com um cluster epidemiológico na Lombardia, Itália.</p> <p>-> A comunicabilidade viral pode ser</p>

**the Lombardy
Region, Italy**



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 $58,7 \pm 14,2$ 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/ μ L [29-45000 cópias / μ L]).

-> 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:

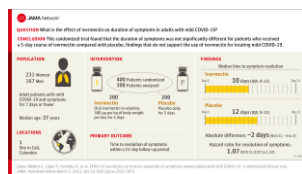
-> Neste estudo, o RNA do SARS-CoV-2 foi encontrado na superfície ocular em grande parte desta coorte de pacientes com COVID-19, embora a infectividade desse material não pudesse ser determinada.

-> 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.

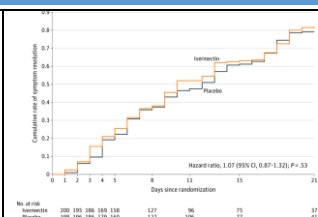
- Objetivo: Determinar se a ivermectina é um tratamento eficaz para COVID-19 leve.

- 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**

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

Imunogenicidade
das vacinas

- Prévio: As vacinas contra o SARS-CoV-2 estão avançando em ensaios clínicos em

protein subunit vaccine strategies against SARS-CoV-2 in mice and macaques

nih.gov/33658497/

contendo as proteínas S e RBD em camundongos e macacos

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:

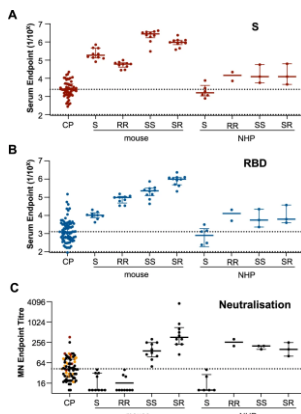
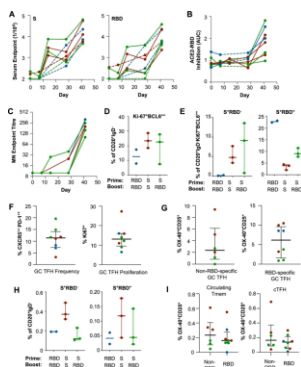
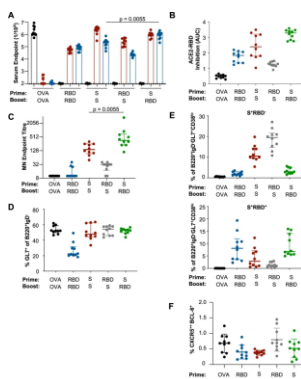
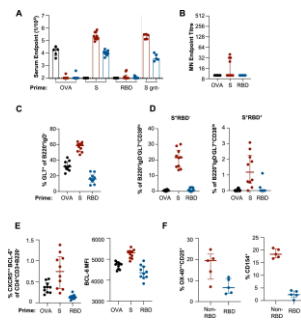
-> Cinco microgramas das proteínas S, RBD ou OVA foram formulados em PBS a uma proporção de 1:1 com adjuvante Addavax (InvivoGen) ou uma proporção de 1: 2 com lipossomas de Monofosforil Lípido A (MPLA) (Polymun).

-> 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 V δ 2 + V γ 9 + 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 todo 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 0,02–0,14) e R-R (0,04%, intervalo 0,02–0,06).

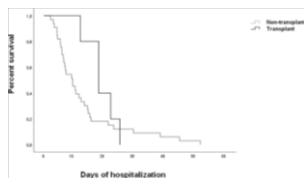
- Conclusões:

-> O estudo confirma as proteínas *spike* recombinantes como candidatas a vacinas promissoras e destacam várias vias para alcançar uma neutralização sorológica potente.

PloSOne
03MAR2021

A propensity score-matched analysis of mortality in solid organ transplant patients with COVID-19 compared to non-solid organ transplant patients

Linares L et al. Spain.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33657157/>



Trasplante de órgãos sólidos não é fator de risco paa os desfechos

- 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%).

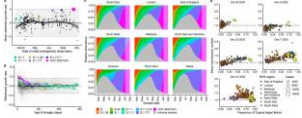
-> Mediana de tempo desde o transplante até o diagnóstico de COVID-19: 6 anos (variação, 1-21 anos).

- 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

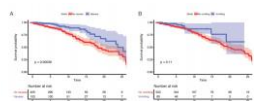
			<p>encontradas diferenças significativas entre os receptores de SOT e os pacientes não transplantados em relação à necessidade de oxigênio (44% vs 59%), necessidade de ventilação mecânica (175 vs 20%) e mortalidade (12% vs 15%).</p> <p>-> Idade mais avançada (OR=1,142; IC95%, 1,08-1,197]) níveis mais 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.</p> <p>-> Os resultados clínicos da infecção por SARS-CoV-2 na coorte de receptores de SOT parecem ser semelhantes aos observados na população não transplantada.</p> <p>- 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 e</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,</p>

estimado que essa variante tenha um número de reprodução 43-90% (IC95%, 38-130%) maior do que as variantes preexistentes.
 -> Um modelo de transmissão dinâmica de duas deformações ajustado mostra que VOC 202012/01 levará a grandes ressurgimentos de casos de COVID-19.
 -> 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.
 -> De forma preocupante, COV 202012/01 se espalhou globalmente e exibe uma transmissão semelhante aumento (59-74%) na Dinamarca, Suíça e Estados Unidos.

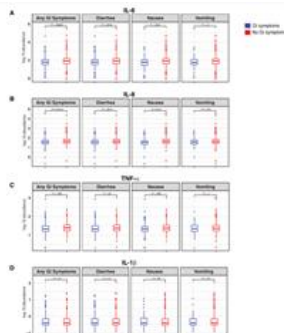
Gastroenterology
 03MAR2021

Intestinal host response to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 outcomes in patients with gastrointestinal symptoms

Livanos AE et al. USA. Italy & Spain.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33676971/>



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.



Sintomas gastrointestinais estão associados ao melhor desfecho na COVID-19

- 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.

- Métodos:
 -> 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.

-> 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.

- Resultados:
 -> 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%

-> Os casos e controles COVID-19 na coorte de biópsia foram comparáveis para idade, sexo, taxas de hospitalização e comorbidades relevantes.

-> 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.

-> 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 nasofaríngeas semelhantes.

-> Além disso, houve redução dos níveis de proteínas inflamatórias essenciais (IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β) na circulação em pacientes com sintomas gastrointestinais.

- Conclusão:

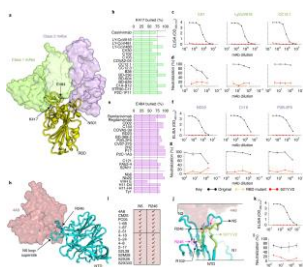
-> Esses dados destacam a ausência de uma resposta pró-inflamatória no trato GI, apesar da detecção do SARS-CoV-2. Paralelamente, foi observada redução da mortalidade em pacientes com COVID-19 apresentando sintomas gastrointestinais.

-> Um papel potencial do trato GI na atenuação da inflamação associada ao SARS-CoV-2 precisa ser examinado mais detalhadamente

Nat Med
02MAR2021

SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma

Wibmer CK et al. South Africa
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33654292/>

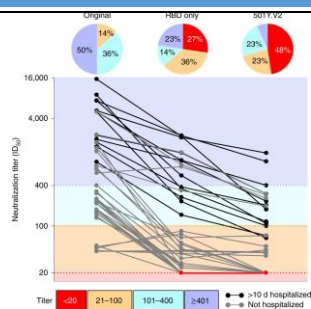


Linhagem SARS-CoV-2 501Y.V2 escapa da neutralização

- 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 *spike*.

-> Esta linhagem é definida por nove mudanças na proteína *spike* 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 *spike*, sugerindo fuga da neutralização. De fato, as substituições em E484 reduzem a sensibilidade de neutralização ao plasma convalescente.

- 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 *spike*.



- Resultados:

-> 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 $25 \mu\text{g ml}^{-1}$), 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 contatou 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, $400 \geq \text{ID}_{50} > 25$) 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 ID₅₀ médio 488, n=30) do que os indivíduos gravemente enfermos das coortes hospitalizadas (título ID₅₀ 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 ID₅₀ <100). Apenas três amostras (7%) retiveram títulos de ID₅₀>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 ID₅₀ <100) e apenas 23% retendo títulos mais altos de ID₅₀>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 Δ242-244) para o escape da neutralização. Isto foi particularmente evidente em amostras de títulos mais elevados, que mantiveram um título ID₅₀ 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.

-> Este pseudovírus também exibe um escape substancial a completo da neutralização, mas não se liga ao plasma convalescente.

-> Esses dados destacam a perspectiva de reinfeção com variantes antigenicamente distintas e prenunciam a eficácia reduzida das vacinas baseadas na spike.

Nat Med
02MAR2021

Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics

Muus C et al. USA, Germany, UK, Sweden, France, South Africa, The Netherlands.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33654293/>

Sequenciamento de célula única para ECA2, TMPRSS2 e CTSL: impacto na COVID-19



- 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.

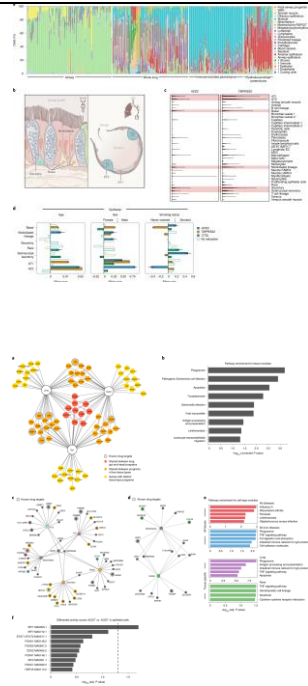
- Objetivo: Avaliar a expressão específica ao nível celular da ECA2, TMPRSS2 e CTSL em 107 estudos de sequenciamento de RNA de célula única de diferentes tecidos.

- Resultados:

-> 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.

-> 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.

-> Observadas associações específicas do tipo de célula em relação à idade, sexo e tabagismo com os níveis de expressão da ECA2, TMPRSS2 e CTSL.



-> 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.

-> 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.

-> Os programas da expressão compartilhados pelas células ECA2⁺ TMPRSS2⁺ nos tecidos nasais, pulmonares 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.

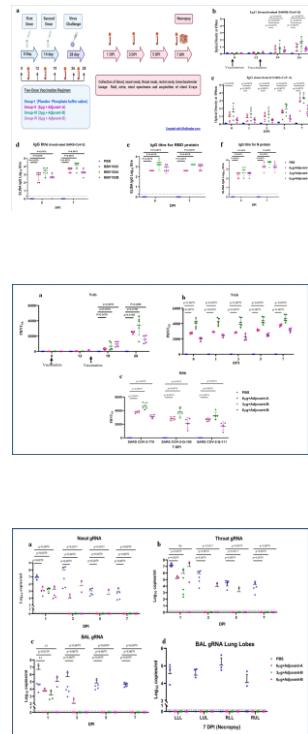
Estes incluíram CEACAM5 (programas de pulmão, nasal e intestino) e CEACAM6, fatores de fixação de superfície para a proteína S do coronavírus; SLPI (pulmão e nasal); PIGR (pulmão e intestino; pode promover aumento dependente de anticorpos via IgA44); e CXCL17 (pulmão e nasal). Os programas de tecido 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).

- 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.

Nat Commun
02MAR2021

Immunogenicity and protective efficacy of inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidate, BBV152 in rhesus macaques

Yadav PD et al. India.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33654090/>



Resultado pré-clínico da eficácia da vacina com vírus inativado (BBV152) produzida na Índia

- 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.

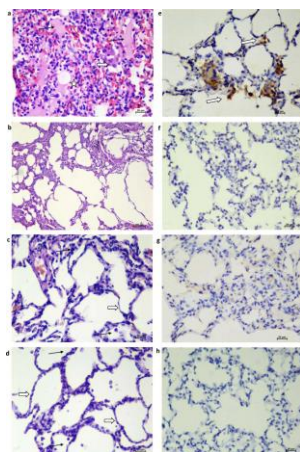
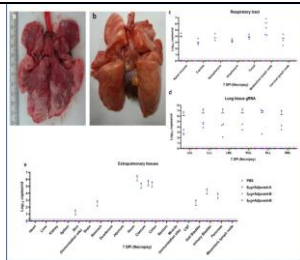
- > Objetivo: Desenvolver e avaliar a eficácia protetora e imunogenicidade da vacina inativada contra SARS-CoV-2 em macacos rhesus.

- 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 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).

- Resultados:

-> 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.

-> A resposta protetora foi observada com o aumento da IgG específica para SARS-CoV-2 e títulos de anticorpos neutralizantes a partir da 3^a semana pós-imunização.

-> A eliminação viral foi observada a partir do fluido de lavagem broncoalveolar, *swab* nasal, *swab* orofaringe e tecidos pulmonares 7 dias após a infecção nos grupos vacinados.

-> 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.

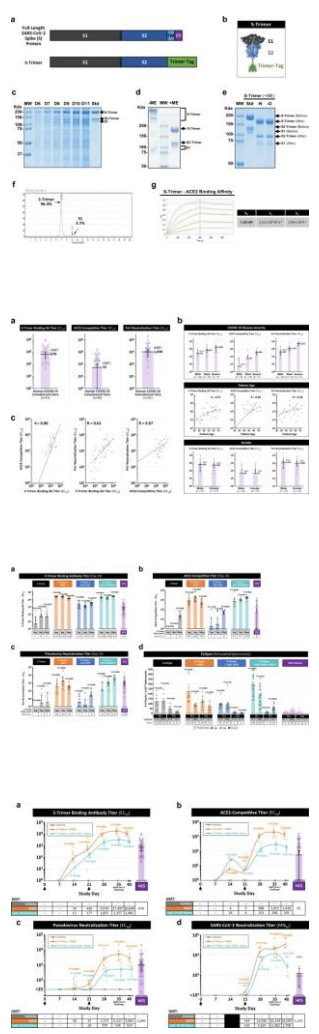
				<p>-> Esta vacina candidata BBV152 concluiu os ensaios clínicos de Fase I/II (NCT04471519) na Índia e está atualmente na fase III.</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Os dados deste estudo comprovam a imunogenicidade e a eficácia protetora das vacina candidata BBV152.</p>
<p>Respir Care 02MAR2021</p>	<p>Prone Positioning in Spontaneously Breathing Subjects With Moderate or Severe ARDS During Invasive Ventilation</p>	<p>Wiert 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 ventilação desencadeada pelo paciente em pacientes intubados com SDRA submetidos ao PP.</p> <p>- Ojvetivo: 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).</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> 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.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> N=39 indivíduos foram incluídos na análise: 20 tinham SDRA relacionada à COVID-19, enquanto 19 tinham SDRA relacionada a outras etiologias.</p> <p>-> Um total de 113 episódios de PP foram analisados: 84 durante a PSV e 29 durante a ventilação mandatória contínua com controle de volume.</p> <p>-> PP durante PSV foi bem tolerado e foi eficaz em melhorar a oxigenação arterial (ou seja, um aumento da mediana da PaO_2/FIO_2 de 100 mm Hg [IQR, 75-120] antes da PP para 135 mm Hg [IQR, 111-161] no final da sessão PP, $p < 0,0001$).</p> <p>-> Nenhuma diferença significativa entre ventilação mandatória contínua e PSV foi</p>

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

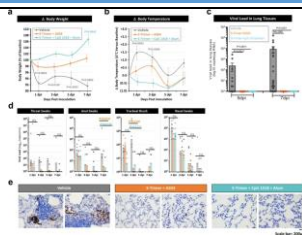
S-Trimer, a COVID-19 subunit vaccine candidate, induces protective immunity in nonhuman primates

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 mg/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-Trimer 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 alúmen, 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 alúmen 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 alúmen) 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

				<p>respostas Th1 (IL-2 e IFNγ) e Th2 (IL-4 e IL-5) por ELISpot. Os grupos CpG 1018 mais alúmen 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 alúmen), 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.</p> <p>-> Além disso, macacos rhesus imunizados com S-Trimer adjuvantado foram protegidos do desafio com SARS-CoV-2 em comparação aos controles que receberam o veículo, com base 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</p>

epidemiológicos e médicos, comorbidades, tratamentos crônicos e parâmetros laboratoriais dos pacientes.

-> Testes de função pulmonar, teste padronizado de caminhada de 6 minutos (TC6) e tomografia computadorizada (TC) de tórax também foram realizados.

-> Os níveis de proteases, seus inibidores e receptores de liberação foram medidos em amostras de soro e de escarro induzido.

- Resultados:

-> N=100 pacientes com testes de função respiratória foram incluídos neste estudo.

-> A mediana de dias após o início dos sintomas foi 104 (IQR 89,25, 126,75).

-> COVID-19 grave em 47% (47/100) dos pacientes.

-> A TC foi normal em 48% (48/100) dos pacientes.

-> 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 trímero 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.

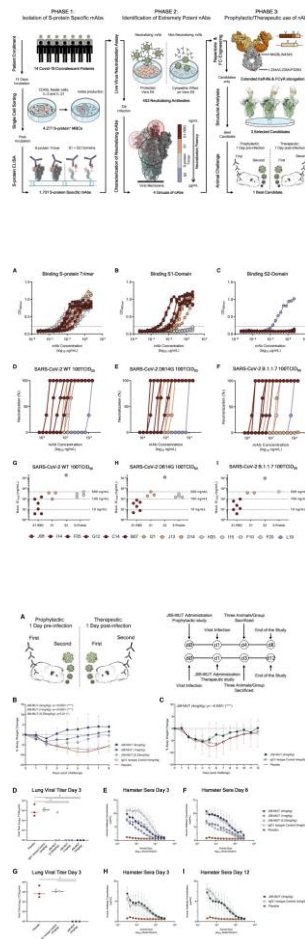
-> Os mAbs denominados J08, I14, F05, G12, C14, B07, I21, J13 e D14 também foram capazes de se ligar especificamente ao domínio S1.

-> 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 (EC₅₀) 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:

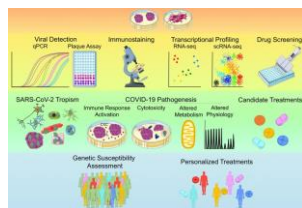
-> O anticorpo monoclonal mais potente, projetado para reduzir o risco do aumento dependente do anticorpo e prolongar a meia-vida, neutralizou o vírus do tipo selvagem autêntico e variantes emergentes contendo substituições D614G, E484K e N501Y.

-> Esforços contínuos são necessários para identificar anticorpos que possam neutralizar as variantes emergentes.

Stem Cell Res
20FEV2021

Human pluripotent stem cell-based organoids and cell platforms for modelling SARS-CoV-2 infection and drug discovery

Giani AM & Chen S. USA.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33677394/>



Artigo de revisão sobre o uso das células-tronco humanas pluripotentes como plataforma para o screening de drogas para o combate à COVID-19

- 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.

- 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.

- Resultados:

-> Trata-se dum artigo de revisão bem importante até o momento.

-> 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.

-> 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,

				<p>-> 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.</p> <p>-> 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.</p> <p>- Conclusão:</p> <p>-> A vigilância genômica contínua da 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.</p>
Transplantation 08FEV2021	SARS-CoV-2-Specific Cell-Mediated Immunity in Kidney Transplant Recipients Recovered from COVID-19	Fernández-Ruiz M et al. Spain. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33729741/	Imunidade em transplantados renais após a infecção pelo SARS-CoV-2	<p>- Prévio: Contexto: A magnitude e cinética do SARS-CoV-2 e a resposta imune específica mediada por células (SARS-CoV-2-CMI) em receptores de transplante de rim (Tx rim) permanecem amplamente desconhecidas.</p> <p>- Métodos:</p> <p>-> Avaliadas as respostas do linfócitos T-interferon-γ-específicas ao SARS-CoV-2 nos meses 4 e 6 do diagnóstico da COVID-19 em 21 receptores de Tx de rim pela análise da citocina intracelular (citometria de fluxo).</p> <p>-> Peptídeos sobrepostos que englobam a glicoproteína N-terminal 1- a 643-aminoácidos da sequência spike do SARS-CoV-2 (S) e a proteína da membrana foram usados como estímulo.</p> <p>-> Os anticorpos SARS-CoV-2 IgG direcionados para a proteína S1 foram avaliados por ELISA no mês 6.</p> <p>- Resultados:</p> <p>-> Resposta detectável ($\geq 0,1\%$) e específica dos linfócitos T CD4 para o SARS-CoV-2 foi encontrada em 57,1% e 47,4% dos pacientes nos meses 4 e 6.</p> <p>-> As taxas correspondentes para linfócitos T CD8 foram 19,0% e 42,1%, respectivamente.</p> <p>-> A contagem absoluta de linfócitos T CD8 específicos para o SARS-CoV-2 aumentou de 4 meses para 6 meses em (p=</p>

				<p>0,086), mas não par aos linfócitos T CD4 (p=0,349).</p> <p>-> Quatro em cada dez pacientes com qualquer resposta detectável no 4º mês perderam SARS-CoV-2-CMI no mês 6, enquanto 5 em cada 9 pacientes montaram SARS-CoV-2-CMI nesse período.</p> <p>-> Todos menos dois pacientes (89,5%) testado positivo para SARS-CoV-2 IgG.</p> <p>-> Pacientes sem resposta específica dos linfócitos T CD4 detectável até o mês 6 eram mais propensos a estar sob tacrolimus (100,0% versus 66,7%; p=0,087) e ter recebido tocilizumabe para tratamento da COVID-19 (40,0% versus 0,0%; p=0,087).</p> <p>- Conclusões:</p> <p>-> Embora ainda exploratórias e limitadas pelo pequeno tamanho amostral, o presente estudo sugere que uma proporção substancial de receptores de Tx de rim que apresentou SARS-CoV-2-CMI detectável após 6 meses a partir do diagnóstico COVID-19.</p> <p>-> Estudos com maior número de pacientes são necessários para uma melhor avaliação da resposta dos anticorpos direcionados ao SARS-CoV-2 no cenário do transplante renal.</p>
--	--	--	--	--