

Virologia

Introdução

Os coronavírus são vírus de ARN simples de sentido positivo amplamente distribuídos no ser humano e noutros mamíferos. O tamanho do genoma dos coronavírus é o maior dentro dos vírus de ARN. Por outro lado, as taxas de mutação durante as fases iniciais de replicação e os fenómenos de recombinação dos vírus de ARN é muito maior do que as dos vírus de ADN, resultando na produção de uma maior diversidade de proteínas estruturais com capacidade de adaptação a diferentes ambientes.¹⁻³ A proximidade do ser humano com o reservatório animal associado à alta prevalência e distribuição dos coronavírus, à sua diversidade genética e aos fenómenos de recombinação frequentes dos seus genomas, justificam o aparecimento periódico de novos coronavírus capazes de ultrapassar a barreira entre espécies e causar infeções no ser humano.⁴⁻⁶ Foi mais uma vez o que aconteceu com a identificação de um novo coronavírus como causa de um surto de pneumonia com início no final do ano de 2019 na cidade de Wuhan, inicialmente denominado por 2019-nCoV⁷, nome atribuído de forma temporária no dia 12 de Janeiro de 2020 pela OMS, e mais tarde SARS-CoV-2.

O SARS-CoV-2 pertence à subfamília *Coronavirinae* dentro da família *Coronaviridae* da ordem *Nidovirales*. Nesta sub-família incluem-se 4 géneros de coronavírus: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Destes, sabe-se que apenas os primeiros dois géneros são capazes de infetar o ser humano.¹ Quatro coronavírus são endémicos globalmente (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 e HCoV-HKU1) e contribuem para 10-30% dos casos de infeções das vias respiratórias superiores. Duas outras espécies, SARS-CoV e MERS-CoV, foram reconhecidos como vírus emergentes com origem em reservatórios animais, e causa de surtos de infeções respiratórias em humanos em 2003 e 2012, respetivamente. O tropismo que as proteínas de superfície (S) destas últimas espécies apresentam para recetores presentes no trato respiratório inferior justifica a apresentação na forma de pneumonia vírica potencialmente grave que provocam, incluindo a síndrome de dificuldade respiratória aguda.⁸

Breve história dos Coronavírus

Historicamente, o primeiro caso de doença humana por coronavírus foi descrito em 1965, quando Tyrrel e Bynoe isolaram um vírus, inicialmente designado B814, nas amostras respiratórias de um rapaz com resfriado comum.⁹ Por volta da mesma altura, Hamre e Procknow isolaram em cultura um outro vírus, por eles designado de 299E, em amostras respiratórias de um *cluster* de estudantes de medicina com clínica de infeção respiratória. Mais tarde, McIntosh e colegas isolaram o vírus OC43 que, morfológicamente, fazia lembrar dois coronavírus animais, os vírus da hepatite dos murinos e o da gastroenterite dos suínos. Todos estes vírus isolados apresentavam, ao microscópio electrónico, uma característica comum entre si e diferente de qualquer outro vírus humano conhecido até então – proteínas de superfície em redor de um envelope vírico que faziam lembrar uma coroa (no latim *corona*) solar. Deste modo, em 1968, o Comité Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) reconheceu e aceitou a nomenclatura *Coronaviridae* para designar a família à qual acabariam por pertencer este grupo de vírus.¹⁰

No entanto, o verdadeiro interesse na investigação na área dos coronavírus despontou já no século XXI, quando, em novembro de 2002, foram detetados casos de uma pneumonia atípica e letal por um agente até então desconhecido, na província de Guangdong, China, e que foi designada por síndrome respiratória aguda severa (SARS). A epidemia recebeu atenção pública em fevereiro de 2003, quando um empresário sino-americano, Johny Chen, desenvolveu sintomas compatíveis com SARS num voo para Singapura. O voo acabaria por aterrar no Vietname, onde o empresário foi internado no Hospital Francês de Hanoi e onde acabaria por morrer 10 dias depois. Vários profissionais de saúde que prestaram cuidados diretos a Johny Chen desenvolveram sintomas respiratórios semelhantes ao do empresário, mas foi o médico Italiano Carlo Urbani que identificou e comunicou ao governo Vietnamita e à Organização Mundial de Saúde (OMS) este *cluster* de casos. O Dr. Carlo Urbani era um médico italiano especialista em doenças transmissíveis que estava no Vietname a cargo da OMS. Um mês após a morte do empresário sino-americano, também o Dr. Urbani sucumbiu à SARS-CoV em Bangucoque, para onde tinha viajado para participar numa conferência internacional à qual acabou por não conseguir comparecer. A transmissão nosocomial e a gravidade de sintomas desta pneumonia alarmaram as autoridades internacionais de saúde e, a 12 de março de 2003, a OMS emitiu um alerta global. Também por esta altura “o vírus chegava a Pequim” através do voo CA112 da *China Airlines*, a 15 de março. Partia de Hong Kong com 120 pessoas, entre elas um homem com tosse e febre que acabaria por infetar 22 passageiros e 2 tripulantes. Não nos é difícil imaginar o que aconteceu a partir daí: só em Pequim a doença assomou cerca de 70 hospitais infetando aproximadamente 400 profissionais de saúde, assim como utentes e visitantes.^{11,12}

Se Guangdong foi a origem do SARS-CoV, Hong Kong tornou-se a ponta de lança para a sua dispersão mundial. A doença chegou a Hong Kong através de um médico nefrologista de 64 anos, Liu Jianlun. A 15 de fevereiro, o professor Liu começou a sentir sintomas semelhantes a uma gripe. Duas semanas antes, fora exposto a um comerciante de marisco, Zhou Zuofeng, que tinha sido transferido do hospital de Guangzhou para um hospital universitário especializado em tratar pneumonias atípicas e onde o professor Liu trabalhava. Acredita-se que Zhou Zuofeng tenha sido o primeiro supertransmissor da

epidemia SARS, por muitos localmente apelidado de “Rei do Veneno”, uma vez que, em última análise, seria responsável por uma série de cadeia de transmissões que circularam pelo mundo. De facto, atribuindo os seus sintomas a uma gripe, o professor Liu e a sua mulher viajaram para Hong Kong a 21 de fevereiro para comparecer ao casamento de um sobrinho. Atravessaram a fronteira entre Guangzhou e Hong Kong de autocarro, numa viagem de cerca de três horas, e ficaram hospedados no quarto 911 do infamado hotel Metropole. Na primeira noite em que ficou hospedado, o estado clínico do Dr. Liu agravou. Durante a sua estadia, infetou pelo menos 16 outros hóspedes, entre eles uma turista de 78 anos do Canadá, alojada no quarto 904. No dia seguinte, Liu foi internado num hospital em Hong Kong, nunca tendo comparecido ao casamento, e morreu a 4 de março. Infetada, embora ainda assintomática, a turista canadiana partiu para Toronto, globalizando o SARS. A série de eventos fatídicos que tiveram lugar na noite de 21 de Fevereiro do hotel Metropole ficou conhecido como o segundo grande fenómeno de supertransmissão do SARS-CoV.¹³

A transmissão do SARS é presumivelmente zoonótica, tendo sido transmitida ao ser humano através de uma fonte animal ainda não totalmente esclarecida. No final de maio de 2003, os estudos revelariam o isolamento do vírus SARS-CoV em civetas-de-palmeiras-mascaradas. A conclusão preliminar foi de que o SARS-CoV tinha cruzado a barreira de espécie e infetado o ser humano, pelo que mais de 10 000 civetas foram mortas só na província de Guangdong. No entanto, o vírus acabaria também por ser isolado noutros animais selvagens, como o cão-guaxinim e os texugos-furões. Assim, parecia precipitada a conclusão de que as civetas constituíam o reservatório deste vírus, uma que também elas poderiam ter sido infetadas por um outro animal ainda desconhecido, o verdadeiro reservatório do vírus na natureza. Na verdade, pareciam funcionar mais como hospedeiros intermediários, amplificadores, tal como acontece com as aves na doença transmitida pelo vírus do Nilo Ocidental. De facto, os mercados húmidos da China, como o de Dongmen, onde são comercializados estes animais selvagens e exóticos, são locais únicos para vírus, como os coronavírus, se amplificarem e serem transmitidos a outros hospedeiros, como o ser humano, resultando em fenómenos de *spillover*.¹³

Mas qual seria o verdadeiro reservatório do SARS-CoV? As análises filogenéticas destes vírus indicam uma alta probabilidade de que o SARS-CoV tenha origem em morcegos, com transmissão ao ser humano ou de forma direta ou de forma indireta através do contacto e/ou consumo de animais vendidos nos mercados húmidos. Após anos a tentar decifrar o *hotspot* da origem da epidemia de SARS na China, um estudo sugeriu que o SARS tem como reservatório o mocego-de-ferradura-pequeno, *Rhinolophus pusillus*, nos quais foi detetada a presença de coronavírus semelhantes ao SARS numa gruta na província de Yunnan.¹³⁻¹⁵

Em julho de 2003, a epidemia de SARS chegou ao fim devido a uma resposta de saúde pública e controlo de infeção intensas. Até julho de 2003, acabariam por se reportados 8096 casos, 744 fatais, com uma taxa de letalidade de 9.6%.⁶

O impacto da SARS trouxe consigo um interesse crescente na investigação dos coronavírus humanos, o que levou à descoberta de inúmeros coronavírus emergentes quer humanos (HCoV) quer animais, ao desenvolvimento de métodos moleculares sensíveis para o diagnóstico e deteção destes vírus, e ao maior entendimento da sua patogénese. Após o SARS-CoV, foram descobertos dois outros coronavírus humanos endémicos, NL63 e HKU-1.¹⁰ Em 2004, a equipa de van der Hoek, isolou o HCoV-NL63 em crianças com doença respiratória na Holanda e em New Haven.¹⁶ No ano seguinte, o HCoV-HKU-1 foi isolado num adulto em Hong Kong com sintomas de infeção respiratória após uma viagem a Shenzhen, China.¹⁷

Em junho de 2012, um homem saudita de 60 anos com sintomas de pneumonia adquirida na comunidade grave foi admitido num hospital em Jedha. A deterioração rápida do seu estado clínico, com subsequente insuficiência renal e falência multiorgânica, conduziram à sua morte. Após falha em identificar o vírus causador da pneumonia deste doente em métodos de diagnóstico de rotina, o virologista egípcio, Dr. Ali Mohamed Zaki, enviou as amostras respiratórias para o instituto *Erasmus Medical Center*, em Roterdão, onde a equipa de Fouchier foi responsável pela identificação de um novo coronavírus. Em setembro de 2012, os achados do Dr. Zaki foram publicados na rede ProMED, um fórum *online* para monitorização de Doenças Emergentes, e em novembro do mesmo ano, numa publicação do *New England Journal of Medicine*, o novo coronavírus foi designado de HCoV-EMC (Human Coronavir-*Erasmus Medical Center*).^{18,19} Em maio de 2013, o Grupo de Estudo dos Coronavírus do ICTV designou este novo coronavírus por MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*), nome também adotado pela OMS para “tornar a comunicação desta nova doença mais fácil e uniforme”.

Desde 2012, têm sido notificados vários casos de infeção por MERS-CoV em mais de 25 países, num total de 2519 casos e 866 mortes (taxa de letalidade de 37.1%).⁶ Estudos revelam que o MERS-CoV se encontra geneticamente relacionado com outros coronavírus isolados em morcegos existentes na China e Arábia Saudita. No entanto, desconhece-se se algum dos morcegos destas regiões constitua o seu reservatório. Apesar de os camelos dromedários terem sido considerados como hospedeiros naturais para MERS-CoV, a sua importância como fonte de transmissão desta infeção ao homem é até hoje controversa. Os casos primários, em que se admite uma transmissão direta ao homem a partir do camelo dromedário, estão limitados aos países do Médio Oriente, sendo os casos notificados nos restantes países de indivíduos que visitaram o Médio Oriente e que foram diagnosticados após regresso ao seu país de origem.²⁰

Para além da Arábia Saudita, Emirados Árabes Unidos, Qatar, Jordânia, Omã e Kuwait, um outro foco epidémico importante ocorreu em julho de 2015, na Coreia do Sul, do qual resultaram 186 casos confirmados e 36 mortes. O caso índice foi o de um empresário de 68 anos, com viagens frequentes à península arábica, a últimas das quais entre 24 de abril e 4 de maio de

2015. Estava hospedado em Bahrain, no golfo pérsico, com visitas de negócios à Arábia Saudita entre 1-2 de maio e aos Emirados Árabes Unidos entre 29-30 de abril. Já de regresso à Coreia do Sul, a 11 de maio iniciou um quadro de febre e mialgias que motivou observação médica numa clínica local a 12 e 14 de maio. A 15 de maio é transferido para o hospital de Pyeongtaek, na província de Gyeonggi, por agravamento do quadro clínico, com aparecimento de tosse e dispneia. Ficou internado 2 dias e teve alta medicado para pneumonia adquirida na comunidade. Por agravamento clínico, é internado num hospital central em Seoul a 18 de maio. A 20 de maio, aquando do conhecimento da sua história epidemiológica, foi diagnosticado com MERS-CoV através da deteção deste coronavírus por técnica de amplificação de ácidos nucleicos numa amostra de expetoração.²¹

As epidemias de SARS e MERS relembram-nos de que os coronavírus animais podem saltar a barreira das espécies e tornarem-se potenciais ameaças zoonóticas para o homem quando as condições ecológicas assim o permitem. Citando David Quammen, “Hoje em dia tudo se move pelo planeta com maior rapidez, inclusive os vírus. Se a SARS se enquadrasse no padrão perverso de infecciosidade pré-sintomática, o seu surgimento em 2003 não seria uma história clínica de boa sorte e resposta eficaz ao surto. Seria uma história muito mais sombria.” Em 2012, quando escrevia o seu livro “Contágio” estaria provavelmente longe de imaginar o que aconteceria a 31 de dezembro de 2019, e o que se viveria nos anos seguintes com a emergência de um outro coronavírus, o SARS-CoV-2, mas profetizava: “A história muito mais sombria está por ser contada, provavelmente não sobre este vírus, mas sobre outro. Podemos adivinhar que, quando Próxima Grande Pandemia chegar, agirá provavelmente em conformidade com o mesmo padrão perverso, com uma alta infecciosidade a preceder sintomas perceptíveis. Isso vai ajudá-la a percorrer cidades e aeroportos.”¹³

Classificação e taxonomia

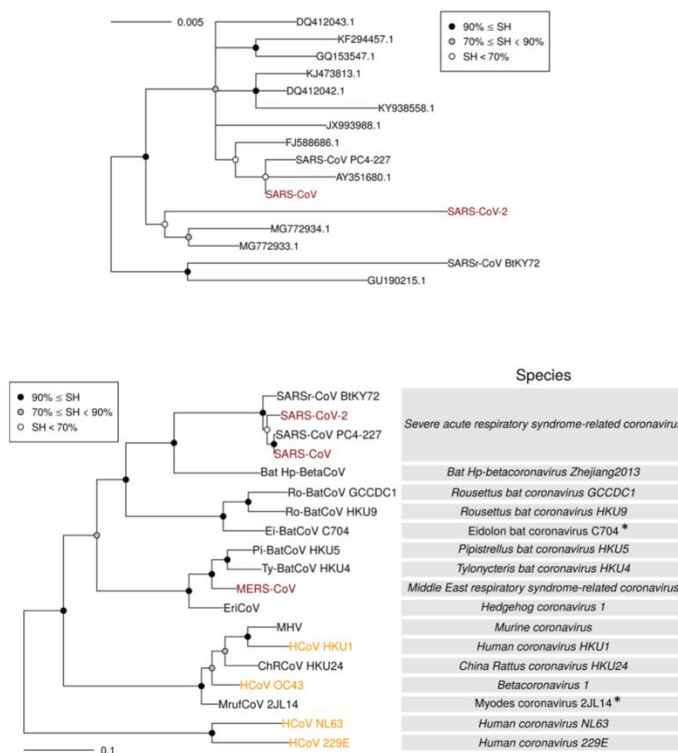
De acordo com a taxonomia atual, os coronavírus são classificados na ordem *Nidovirales*. A família *Coronaviridae* é subdividida em duas subfamílias, *Coronavirinae* e *Torovirinae*. À subfamília dos *Coronavirinae* pertencem quatro géneros: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* e *Deltacoronavirus*. Os hospedeiros da maioria dos *Alpha-* e *Betacoronavirus* são mamíferos enquanto que os dos *Gamma-* e *Deltacoronavirus* são na sua maioria aviários. O género *Betacoronavirus* pode ser subdividido em quatro subgéneros: *Embecovirus*, *Sarbecovirus*, *Merbecovirus* e *Norbecovirus*. A maioria dos coronavírus humanos pertencem ao género *Betacoronavirus*, sendo apenas os CoV-229E e NL63 classificados dentro do género *Alphacoronavirus*. No que diz respeito aos *Betacoronavirus*, o HKU-1 e OC43 fazem parte do subgénero *Embecovirus*, o MERS-CoV do *Merbecovirus*, e quer o SARS-CoV quer o SARS-CoV-2 do *Sarbecovirus*. Dado que inúmeras espécies de coronavírus pertencentes aos géneros *Alpha-* e *Betacoronavirus* foram encontradas em morcegos, estes têm sido implicados como reservatórios para a sua incubação, evolução e transmissão inter-espécie.^{18,22}

A classificação dos vírus pertencentes à família *Coronaviridae* é da responsabilidade do Grupo de Estudo dos Coronavírus do ICTV. O processo de classificação envolve a avaliação do grau de semelhança genética entre um novo vírus candidato e aqueles já existentes dentro de um mesmo grupo taxonómico. A um vírus candidato é atribuído um *cluster* apropriado se apresentar mais de 46% de homologia com os vírus pertencentes a esse mesmo *cluster*.²²

No entanto, é difícil definir um vírus de ARN como pertencente a uma espécie nova (ou distinta): devido às suas altas taxas de mutação e fenómenos de recombinação à medida que a replicação e seleção viral prossegue, é natural que surjam variantes de determinadas sequências definidas (haplótipos), também conhecidos como quasispécies. A sua sequência genómica está em contínua evolução e pode variar entre diferentes hospedeiros infetados ou mesmo ao longo de um surto. Assim, do ponto de vista da virologia, se usarmos o critério “novo” para designar um coronavírus cuja semelhança genómica é incompleta face a outros coronavírus isolados previamente, qualificaríamos qualquer vírus de ARN após sequenciação total do seu genoma como tal. Para contornar este problema, os virologistas olham para dois vírus com genomas não idênticos, embora similares, como variantes do mesmo vírus, colocando a questão: “quão grande deve ser a diferença de um vírus para classificá-lo como pertencente a uma espécie nova ou distinta?”. No que diz respeito ao vírus identificado neste surto, esta questão é respondida pelo Grupo de Estudo dos Coronavírus do ICTV através da avaliação do grau de proximidade do vírus candidato em relação a coronavírus previamente isolados em humanos e em relação a grupos monofiléticos de coronavírus (clades) que podem ou não incluir vírus de diferentes hospedeiros.²²

A classificação dos vírus pertencentes à ordem dos *Nidovirales* pelo ICTV atualmente baseia-se na análise comparativa de sequências dos domínios de proteínas envolvidas na replicação: 3CLpro, NiRAN, RdRp, ZBD e HEL1, os únicos domínios codificados pelas ORF1a/1b conservados em todos os vírus pertencentes a esta ordem. Desde 2011 que a classificação dos coronavírus e outros nidovírus tem sido ajudada pelo *software* DEmARC (*DivErsity pArtitioning by hieRarchical Clustering*), que delimita grupos (*clusters*) monofiléticos de vírus de acordo com distâncias patrísticas.²² A designação 2019-nCoV inicialmente atribuída ao novo coronavírus identificado na China no final do ano de 2019 foi formalmente alterada para SARS-CoV-2 pelo ICTV no dia 11 de fevereiro de 2020. O SARS-CoV-2 (nome pelo qual será referido daqui em diante) agrupa-se com SARS-CoVs nas árvores de espécies de coronavírus relacionados com o SARS (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*) e nas árvores de vírus pertencentes ao género *Betacoronavirus* (figura 1). A demarcação de espécies dentro da família *Coronaviridae* é imposta por vírus cuja distância patrística cruze o limite de demarcação inter-espécies

(figura 2). Nenhum vírus pertencente à espécie de coronavírus relacionados com SARS viola este limite de demarcação como



demonstrado numa análise de diferenças patrísticas máximas intra-espécie de 2505 vírus pertencentes a todas as 49 espécies de coronavírus conhecidas (figura 2) e numa análise de diferenças genéticas emparelhadas de 256 vírus pertencentes à espécie de coronavírus relacionados com SARS (figura 3), facilitando a atribuição da designação SARS-CoV-2 a esta espécie. Apesar de não cruzar o limite inter-espécies baseado na distância patrística, o não isolamento inicial do SARS-CoV-2 utilizando técnicas de PCR específicas para o SARS-CoV juntamente com a sua distância filogenética em relação ao último levou a que muitos investigadores – “erradamente” - o considerassem como um vírus pertencente a uma espécie distinta (“nova”) dentro dos coronavírus.²²

Assim, em termos de classificação taxonómica, o SARS-CoV-2 é considerado como mais um vírus dentro da espécie de vírus relacionados com o SARS. Todos os vírus pertencentes a esta espécie têm nomes derivados do SARS-CoV apesar de apenas as estirpes isoladas em humanos colhidas

durante 2002-2003 terem causado a clínica de SARS (síndrome respiratória aguda grave) nos indivíduos infetados. A referência ao SARS em todos os nomes dos vírus pertencentes a esta espécie tem em consideração o seu agrupamento filogenético com a dos vírus isolados nos doentes com SARS (exemplo: SARS-CoV-Urbani) e não a sua ligação com determinada síndrome clínica.

Figura 1. O SARS-CoV-2 agrupa-se com SARS-CoVs nas árvores de espécies de coronavírus relacionados com o SARS (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*) e nas árvores de vírus pertencentes ao género *Betacoronavirus*.²²

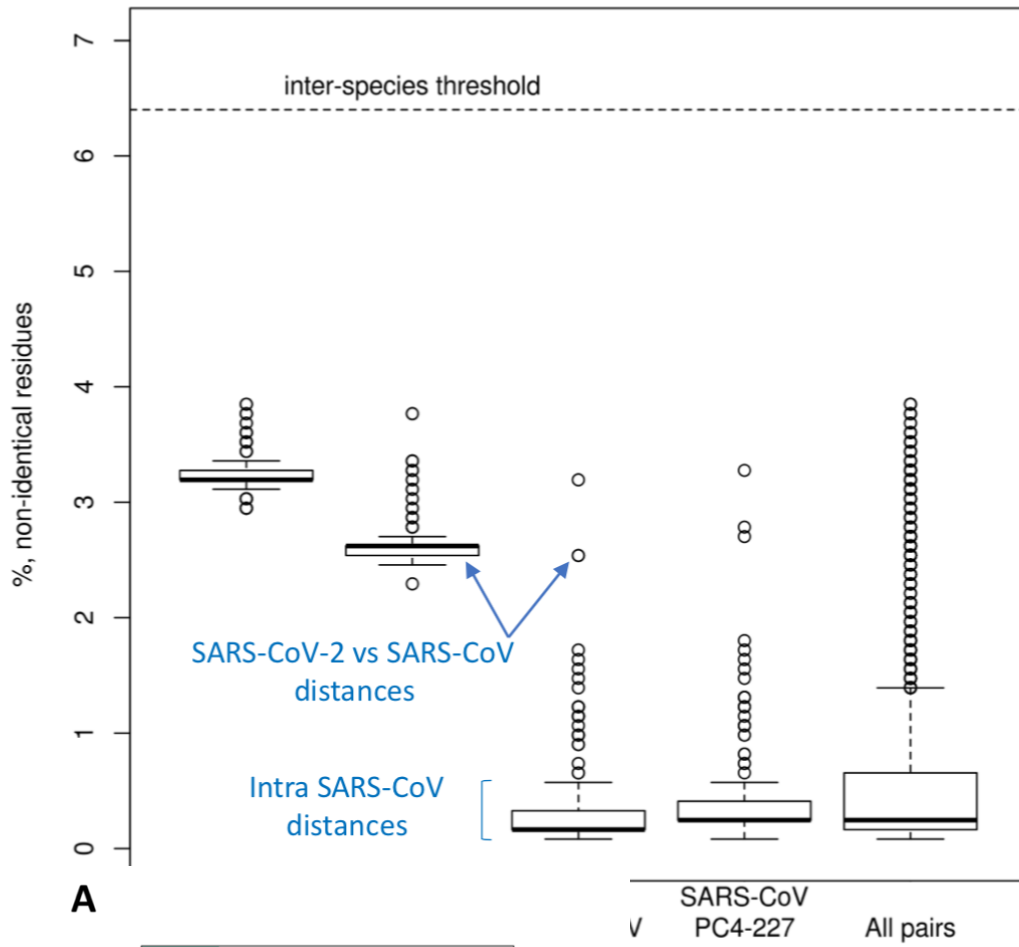
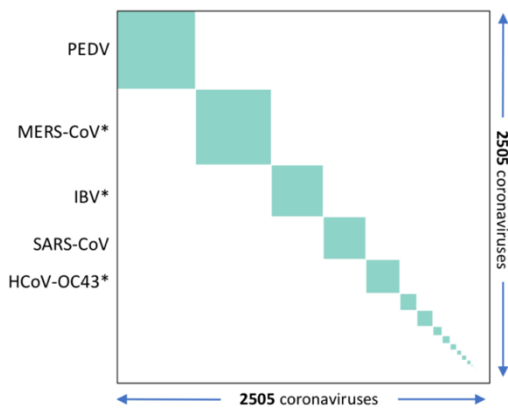


Figura 2. A demarcação de espécies dentro da família *Coronaviridae* é imposta por vírus cuja distância patrística cruze o limite de demarcação inter-espécies (**A**). Nenhum vírus pertencente à espécie de coronavírus relacionados com SARS viola o limite de demarcação inter-espécie como demonstrado numa análise de diferenças patrísticas máximas intra-espécie de 2505 vírus pertencentes a todas as 49 espécies de coronavírus conhecidas (**B**).²²



B

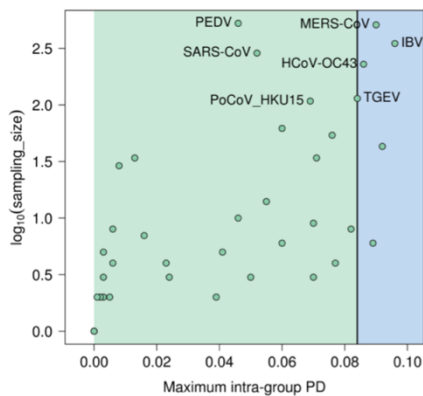


Figura 3. Nenhum vírus pertencente à espécie de coronavírus relacionados com SARS viola o limite de demarcação inter-espécie numa análise de diferenças genéticas emparelhadas de 256 vírus pertencentes à espécie de coronavírus relacionados com SARS.²²

A origem animal do SARS-CoV-2

Muitos dos casos de COVID-19 inicialmente reportados tinham como elo epidemiológico o *mercado Huanan Seafood Wholesale Market* em Wuhan, onde se vendiam muitas espécies de animais vivos, sugerindo uma possível origem zoonótica. A genômica comparativa e análise filogenética tentam explicar a origem e evolução do SARS-CoV-2 ao identificar quais os coronavírus com a semelhança genética mais próxima, desta forma inferindo os potenciais reservatórios naturais do vírus.²³

A sequenciação genômica inicial do SARS-CoV-2 a partir de amostras obtidas de 9 doentes infectados em Wuhan revelou uma semelhança global de 87.99% e 87.23% com a de outros dois coronavírus do tipo SARS previamente isolados em morcegos em 2018 em Zhoushan, na China oriental (bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21, respetivamente). Demonstrou ainda que as estirpes de SARS-CoV-2 isolados eram geneticamente menos semelhantes ao SARS-CoV (cerca de 79%) e MERS-CoV (cerca de 50%).²⁴ No entanto, é com um outro coronavírus previamente isolado em morcegos-de ferradura (*Rhinolophus affinis*), Bat-CoV-RaTG13, que o SARS-CoV-2 apresenta a semelhança genômica mais próxima, ao apresentar uma homologia superior a 96% ao longo de todo o seu genoma.^{25,26} Dadas as semelhanças e relações filogenéticas próximas entre estes dois coronavírus, é razoável inferir que o SARS-CoV-2 tenha tido origem em morcegos. Apesar da homologia entre estes dois coronavírus, existem diferenças fundamentais no domínio de ligação ao recetor (RBD) da proteína de superfície S responsável pela ligação ao recetor humano da enzima conversora da angiotensina 2 – ACE2. Ao contrário da RBD do RaTG13, a do SARS-CoV-2 liga-se de forma eficiente à ACE-2. Assim, é improvável que o RaTG13 seja um progenitor direto SARS-CoV-2, sendo necessário um hospedeiro intermediário para a sua transmissão zoonótica.²⁷

Mas qual será este hospedeiro intermediário? A 7 de Fevereiro de 2020, numa conferência de imprensa, a Universidade de Agricultura do Sul da China, em Guangzhou, revelou que 2 dos seus investigadores, Shen Youngyi e Xiao Lihua, identificaram o pangolim como potencial hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2 com base na semelhança de 99% entre as sequências genômicas dos coronavírus isolados nestes animais e em humanos infectados durante o surto atual.²⁸ Os pangolins malaios (*Manis javanica*) são hospedeiros para vários coronavírus relacionados com o SARS. O domínio RBD dos coronavírus isolados nos pangolins exibe uma sequência de aminoácidos com uma homologia superior a 97% em todos os seis motivos aminoácídicos-chave para a ligação ao recetor ACE-2.^{25,29} Quando consideramos os morcegos como o grande reservatório natural para os coronavírus relacionados com o SARS associado ao contacto próximo entre animais selvagens nos mercados húmidos na China, é plausível pensar que um coronavírus que infete o pangolim tenha como ancestral direto um coronavírus isolado em morcegos, como por exemplo o RaTG13. No entanto, o SARS-CoV-2 apresenta um local de clivagem polibásico único que não se encontra presente quer no RaTG13 quer nos coronavírus isolados em pangolins, o que parece contra-argumentar o facto dos últimos poderem ser os progenitores diretos do SARS-CoV-2.³⁰ Talvez possamos ver o SARS-CoV-2 como resultado da seleção natural de um vírus recombinante com origem em morcegos, com os pangolins a servirem como hospedeiros intermediários, e com as alterações “certas” no seu genoma para ultrapassar a barreira de espécie e infetar o ser humano num fenómeno de *spillover*.

A evidência científica sustenta a evolução natural do SARS-CoV-2 como resultado de um evento de transmissão zoonótica.^{23,31} No entanto, pelo que vimos anteriormente, atualmente não existe nenhum coronavírus animal com homologia suficiente para ser considerado o seu claro progenitor direto. Dada a diversidade de coronavírus isolados quer em morcegos quer em outras espécies de animais selvagens e domésticos, um dos desafios futuros será testar um enorme reservatório de possíveis animais para estes vírus de forma a identificar qual o seu verdadeiro hospedeiro intermediário e qual o ancestral direto do SARS-CoV-2.

A estrutura vírica do SARS-CoV-2 e seu genoma

Os coronavírus apresentam uma morfologia esférica com diâmetro médio de 90-120 nm. São vírus de cadeia de ácido ribonucleico (ARN) de sentido positivo, encapsulados por uma camada bilipídica. O seu genoma, que contém cerca de 30 pares de quilobases, codifica quatro proteínas estruturais homólogas em todos os coronavírus: *spike* ou proteína de superfície (S), *envelope* ou proteína de invólucro (E), *membrane* ou proteína de membrana (M), e *nucleocapside* ou proteína de nucleocápside (N), conforme se mostra na figura 4.³²

A proteína de superfície S, uma glicoproteína transmembranar do tipo 1, medeia a ligação aos recetores do hospedeiro e a fusão necessária para a sua entrada no interior das células. Cada proteína S é montada sob a forma de um trímero que se projeta cerca de 20 nm do invólucro. São estas protrusões globulares que conferem o aspeto de coroa solar aos coronavírus quando visualizados ao microscópio eletrónico. Cada monómero é constituído por um ectodomínio N-terminal extracelular, um domínio transmembranar ancorado ao invólucro vírico e um endodomínio C-terminal intracelular. Após clivagem por proteases das células do hospedeiro, o ectodomínio da proteína S é dividido em duas subunidades funcionais, S1 e S2 – a primeira responsável pela ligação ao recetor das células do hospedeiro através do motivo de ligação ao recetor (RBD) localizado na porção C-terminal da S1, e a segunda responsável pela fusão entre as membranas do vírus e da célula-alvo facilitando a entrada deste. A sequência de aminoácidos da glicoproteína S do SARS-CoV-2 partilha uma homologia de cerca

de 75% com a do SARS-CoV, com uma semelhança de 70% e 90% entre os subdomínios S1 e S2, respetivamente, o que justifica a ligação destes dois vírus a um recetor comum nas células humanas, a ACE-2.³³⁻³⁶

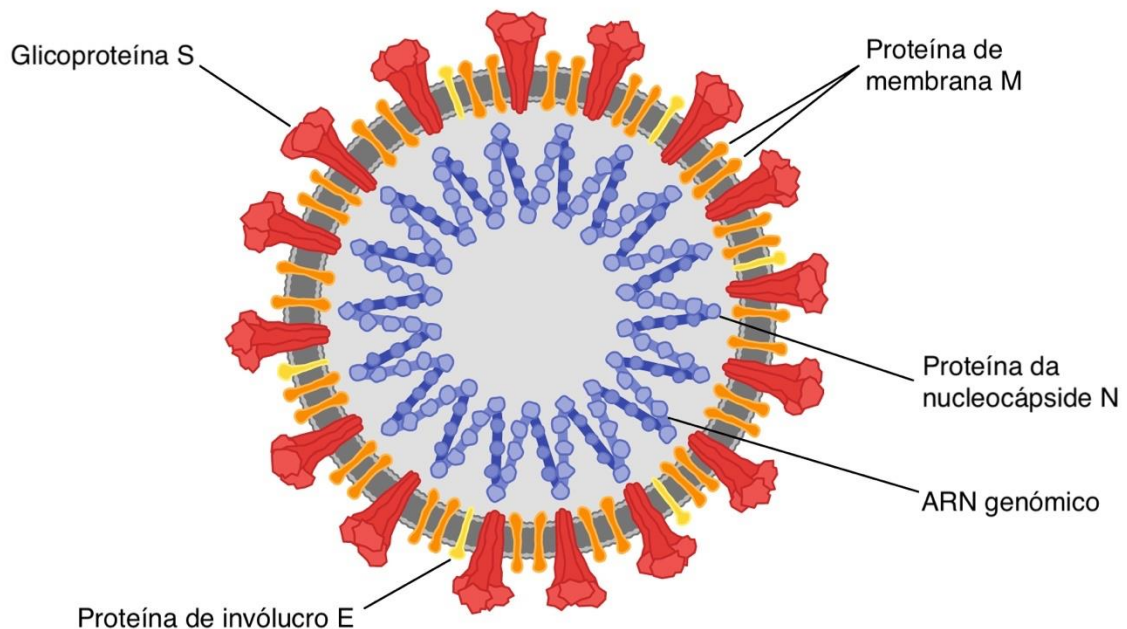


Figura 4. Estrutura do vírus SARS-CoV-2 (adaptado de Encyclopædia Britannica, Inc./Patrick O'Neill Riley)

A localização exposta da proteína S na superfície do vírus, assim como a sua função na ligação e fusão às células do hospedeiro, torna-a no alvo principal dos anticorpos neutralizantes adquiridos após a infeção. A extensa glicosilação das proteínas S tem um papel na estabilidade desta proteína e pode proteger os seus epítomos de anticorpos neutralizantes, deste modo facilitando a evasão ao sistema imunitário.³⁷

A proteína de membrana (M), a mais abundante de todas as proteínas estruturais, encontra-se presente sob a forma de dímeros dentro do invólucro viral, podendo adotar uma forma compacta ou alongada. A forma mais compacta confere a estrutura esférica ao coronavírus. Já a forma alongada desempenha um papel central na montagem de novos vírus ao promover a correta inserção da proteína S através da interação com a ribonucleocápside. Para além da sua função estrutural, esta proteína é importante na resposta imunológica inata ao promover a libertação do interferão β .³³

A proteína do invólucro (E) é uma proteína transmembranar que parece ter um papel na montagem do vírus através da interação do seu C-terminal com a proteína de membrana (M). O seu domínio hidrofóbico transmembranar, ao formar um canal iónico na superfície viral, também conhecido por viroporina, é essencial para o tráfico de novos viriões através de uma via secretora. De facto, os coronavírus recombinantes sem expressão desta proteína produzem viriões incompetentes com consequente redução da carga viral infecciosa e sua patogenicidade. Assim, parece que esta proteína desempenha funções importantes para a produção de novos vírus e sua maturação.^{33,38}

Encapsulada pelo invólucro, encontra-se a **proteína de nucleocápside (N)**, que se liga ao ARN genómico formando uma ribonucleoproteína que, por sua vez, se liga à proteína M, estabilizando o genoma viral. A proteína N apresenta uma estrutura helicoidal simétrica, que é pouco comum nos vírus de ARN de sentido positivo, ao contrário daqueles com ARN de sentido negativo nos quais protege contra ribonucleases.³³

O genoma dos coronavírus é composto por uma cadeia de ARN de sentido positivo não segmentada com um comprimento entre 26-32 pares de quilobases. Comparativamente a outros vírus de ARN, com genomas geralmente medindo menos de 10 pares de quilobases, os coronavírus são dos maiores vírus de ARN conhecidos, facto atribuído à existência de uma ARN polimerase – ARN dependente (RdRp) com atividade de *proofreading*. Estruturalmente são compostos por uma extremidade

5', uma extremidade poli-adenilada 3', regiões não codificantes (UTR) 5' e 3', um conjunto de genes conservados que codificam para proteínas estruturais e não estruturais, assim como genes acessórios que podem variar entre diferentes coronavírus. Quando ordenados da extremidade 5' para a 3', a ordem dos genes conservados entre os diferentes coronavírus é a seguinte: *open reading frame* (ORF) 1a/b (gene da replicase), proteína S, proteína E, proteína M, proteína N, encontrando-se os genes acessórios misturados entre os genes que codificam para as proteínas estruturais na extremidade 3'. Entre cada gene que se encontra para lá da ORF1a/b encontram-se pequenos motivos designados de sequências reguladoras da transcrição, que desempenham um papel na produção de ARN subgenômicos (sgRNA). Abaixo do gene que codifica para replicase, caminhando em direção à extremidade 3', no último 1/3 do genoma, encontram-se ORF que codificam para proteínas estruturais e acessórios. As proteínas acessórios dos coronavírus variam em localização e tamanho entre os diferentes coronavírus. Não desempenham um papel essencial na replicação viral, mas pensa-se que estão envolvidas na patogenicidade do vírus.^{32,39,40}

Após infeção de uma determinada célula, a ORF1a/b localizada na extremidade 5', e que ocupa 2/3 do seu genoma, é traduzida numa grande poliproteína (pp1ab) que é, subsequentemente, clivada por proteases virais (3CLpro, Mpro e 2 proteases *papain-like*) para formar várias proteínas não estruturais que formam o complexo de transcrição-replicação, que inclui a helicase e a ARN polimerase- ARN dependente (RdRp). Estas proteínas são depois responsáveis pela replicação de todo o genoma viral assim como dos transcritos de mRNA subgenômico usados para a síntese das diferentes proteínas virais. Toda a cópia de ARN genômico sintetizada serve de material genético que é incluído aquando da formação de novos viriões.^{32,39,40}

Tal como outros coronavírus, o genoma do SARS-CoV-2 é constituído por cerca de 30 pares de quilobases (29903 pares de bases) e compreende os genes da replicase, os que codificam para as proteínas estruturais e dez ORF que codificam para proteínas acessórios. Da extremidade 5' para a 3' o genoma segue a seguinte sequência (figura 5): extremidade 5', 5' UTR, ORF1a/b (replicase), S, ORF3a, ORF3b, E, M, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, N, ORF9, ORF10, 3'UTR, extremidade 3'.⁴¹

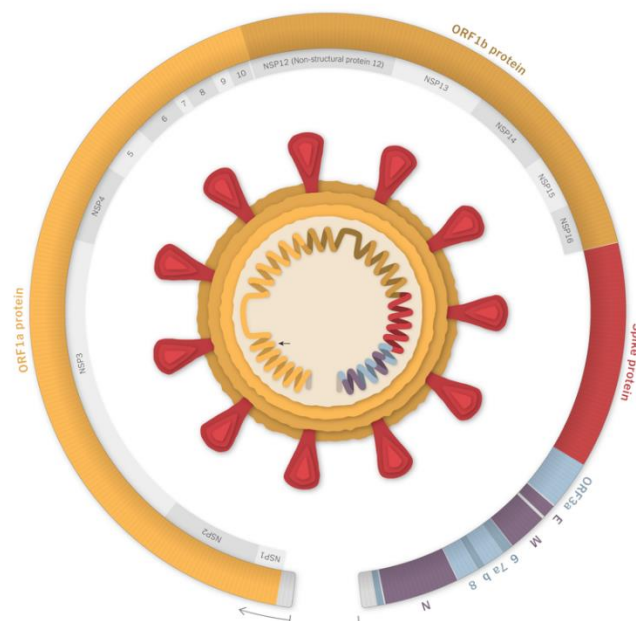


Figura 5. Diagrama da estrutura genômica do SARS-CoV-2⁴²

As mutações de um determinado vírus são determinantes para a variação de um determinado genoma e conseqüente evolução viral, podendo resultar num aumento da sua virulência, maior transmissibilidade ou escape imunológico. No entanto, estas mutações podem também trazer conseqüências negativas para o próprio vírus, como a morte deste. Os vírus de ARN são conhecidos por sofrerem altas taxas de mutação uma vez que não apresentam mecanismos de *proofreading*. Como referido anteriormente, tal não acontece com o SARS-CoV-2, que apresenta uma 3'-5'-exoribonuclease (proteína não estrutural 14, NSP14) com atividade de *proofreading*, conferindo ao vírus a capacidade de manter um genoma tão grande.³²

Variantes do SARS-CoV-2 de interesse

Ao longo do curso da pandemia COVID-19 surgiram um número de variantes de SARS-CoV-2, algumas das quais preocupantes para a comunidade científica pela sua maior infeciosidade e/ou por causarem doença mais grave, resultando em maior letalidade. Até à data existem pelos menos 4 variantes de interesse em circulação.⁴²

- **Linhagem B.1.1.7**
Identificada inicialmente no condado de Kent, no Reino Unido, desta linhagem faz parte a variante 20I/501Y.V1. Pensa-se que os coronavírus desta linhagem sejam 30-50% mais infeciosos e 55% mais letais do que outras variantes atualmente em circulação. Após a sua descoberta em dezembro de 2020, emergiu rapidamente de forma exponencial em vários países do mundo, encontrando-se em circulação em cerca de 110 países. Esta variante parece ser mais infeciosa devido a um conjunto de mutações na proteína S: N501Y, que confere uma maior afinidade para o recetor das células humanas; P681H, adjacente ao local de clivagem da furina, tornando-o mais sensível à hidrólise pela TMPRSS2, o que facilita a fusão viral; e deleções H69-V70 e Y144/145, que alteram a forma da proteína S, ajudando-a na evasão a certos anticorpos. Até à data, os estudos indicam que as vacinas disponíveis são também eficazes contra esta variante.⁴²
- **Linhagem B.1.351**
Inclui a variante 20H/501Y.V2, inicialmente identificada em África do Sul em dezembro de 2020. A comunidade científica está preocupada com esta variante uma vez que os ensaios clínicos com vacinas demonstram que estas conferem uma menor proteção contra esta variante. Já foi detetada em 68 países, incluindo Portugal. As mutações de interesse no gene que codifica a proteína S são a N501Y (também presente nas variantes B.1.1.7 e P.1), a K417N (que à semelhança da N501Y confere maior afinidade ao vírus para o seu recetor celular) e a E484K, uma mutação de escape viral que justifica o porquê de as vacinas conferirem uma menor proteção contra esta variante e o motivo pelo qual pessoas com imunidade natural contra a COVID-19 por infeção prévia possam estar mais suscetíveis a uma reinfeção por esta variante.⁴²
- **Linhagem P.1**
Inicialmente reportada no Japão, em 4 pessoas infetadas pela variante 20J/501Y.V3 após uma viagem ao Brasil. Esta linhagem emergiu no final de 2020 em Manaus, na Amazónia. Tornou-se rapidamente na linhagem a circular com maior predominância no Brasil e noutros países da América do sul. A P.1 é um parente próximo da linhagem B.1.351, albergando as mesmas mutações na proteína S e consequências a elas associadas. A circular desde outubro de 2020 no Brasil, esta linhagem já foi detetada em 37 países, incluindo Portugal.⁴²
- **Variante CAL.20C**
Descoberta na Califórnia no final de 2020, esta variante abrange as linhagens B.1.427 e B.1.429. Dois estudos sugerem que esta variante possa ser mais transmissível do que outras variantes, embora não pareça estar a expandir-se tão rapidamente quanto a B.1.1.7. Mais de metade dos casos em Los Angeles são devidos a esta variante. Uma das suas mutações de relevo é a L452R na região da RBD que confere uma maior afinidade na ligação entre o SARS-CoV-2 e a ACE-2.⁴²

Referências

1. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020.
2. Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv Virus Res.* 2016;96:59-126.
3. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(6):439-450.
4. Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG. A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol.* 2007;81(1):20-29.
5. Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Coronavirus Infections—More Than Just the Common Cold. *JAMA.* 2020.
6. Perlman S. Another Decade, Another Coronavirus. *N Engl J Med.* 2020.
7. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020.
8. de Wilde AH, Snijder EJ, Kikkert M, van Hemert MJ. Host Factors in Coronavirus Replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;419:1-42.
9. Zuckerman AJ. Coronaviruses and Toroviruses. *Principles and Practice of Clinical Virology.* Wiley; 2009. p. 511-531. Richman.
10. Kahn JS, McIntosh K. History and recent advances in coronavirus discovery. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 Nov;24(11 Suppl):S223-7, discussion S226.
11. Berger A, Drosten Ch, Doerr HW, Stürmer M, Preiser W. Severe acute respiratory syndrome (SARS) - paradigm of an emerging viral infection. *J Clin Virol.* 2004 Jan; 29 (1): 13- 22.
12. Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.*
13. Quammen D. (2012). *Spillover: animal infections and the next human pandemic.* New York, USA: W.W. Norton & Company. ISBN 978-0393066807.
14. Hu B, Ge X, Wang LF, Shi Z. Bat origin of human coronaviruses. *Virol J.* 2015 Dec 22;12:221.
15. David Cyranoski. Bat cave solves mystery of deadly SARS virus — and suggests new outbreak could occur. *Nature* 552, 15-16 (2017)
16. Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med.* 2004 Apr;10(4):368-73.
17. Woo PC, Lau SK, Chu CM, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol.* 2005 Jan;79(2):884-95.
18. Perlman S, McIntosh K. Coronaviruses, Including Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East Respiratory Syndrome (MERS). In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (2019). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, p. 2072. Elsevier Inc.
19. Andiman WA. (2018). *Animal Viruses and Humans: a narrow divide. How lethal zoonotic viruses spill over and threaten us.* Filadélfia, EUA: Paul Dry Books. ISBN: 978-1-58988-122-8
20. Zaki A. M., Van Boheemen S., Bestebroer T. M., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England Journal of Medicine.* 2012;367(19):1814–1820. doi: 10.1056/nejmoa1211721.
21. Lee JY, Kim YJ, Chung EH, Kim DW, Jeong I, Kim Y, Yun MR, Kim SS, Kim G, Joh JS. The clinical and virological features of the first imported case causing MERS-CoV outbreak in South Korea, 2015. *BMC Infect Dis.* 2017 Jul 14;17(1):498.
22. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020 Apr;5(4):536-544.
23. Lau SKP, Luk HKH, Wong ACP, et al. Possible Bat Origin of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg Infect Dis.* 2020 Jul;26(7):1542-1547.
24. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020.
25. Xiao K, Zhai J, Feng Y, et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature.* 2020 Jul;583(7815):286-289.
26. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020 Mar;579(7798):270-273.
27. Zhou H, Chen X, Hu T, et al. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Curr Biol.* 2020 Oct 5;30(19):3896.

28. Liu P, Chen W, Chen JP. Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins. *Viruses*. 2019;11(11).
29. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2020 Apr;26(4):450-452.
30. Malaiyan J, Arumugam S, Mohan K, Gomathi Radhakrishnan G. An update on the origin of SARS-CoV-2: Despite closest identity, bat (RaTG13) and pangolin derived coronaviruses varied in the critical binding site and O-linked glycan residues. *J Med Virol*. 2020 Jul 7;10.1002/jmv.26261.
31. Dallavilla T, Bertelli M, Morresi A, et al. Bioinformatic analysis indicates that SARS-CoV-2 is unrelated to known artificial coronaviruses. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Apr;24(8):4558-4564.
32. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*. 2020 Apr;92(4):418-423. doi: 10.1002/jmv.25681. Epub 2020 Feb 7. Erratum in: *J Med Virol*. 2020 Oct;92(10):2249.
33. Satarker S, Nampoothiri M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Arch Med Res*. 2020 Aug;51(6):482-491.
34. Lan J, Ge J, Yu J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020 May;581(7807):215-220.
35. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res*. 2020 Apr; 176:104742.
36. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):281-292.e6.
37. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020 Jul 17;369(6501):330-333.
38. Ruch TR, Machamer CE. The coronavirus E protein: assembly and beyond. *Viruses*. 2012 Mar;4(3):363-82.
39. Fehr A.R., Perlman S. (2015) Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: Maier H., Bickerton E., Britton P. (eds) *Coronaviruses. Methods in Molecular Biology*, vol 1282. Humana Press, New York, NY
40. O'Leary VB, Ovsepian SV. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Trends in Genetics*. Published August 26, 2020.
41. Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, Maga G, Berisio R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells*. 2020 May 20;9(5):1267. PubMed: <https://pubmed.gov/32443810>.
42. Corum J, Zimmer C. (2021). "Coronavirus Variants and Mutations", *The New York Times*, available at: <https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/coronavirus-variant-tracker.html> (last checked on May 9th, 2021)