

Francisco António Teixeira Magalhães

Coronavírus e outros vírus em circulação em animais não domésticos:
implicações para a Saúde Humana

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2021

Francisco António Teixeira Magalhães

Coronavírus e outros vírus em circulação em animais não domésticos:
implicações para a Saúde Humana

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2021

Francisco António Teixeira Magalhães

Coronavírus e outros vírus em circulação em animais não domésticos:
implicações para a Saúde Humana

Francisco António Teixeira Magalhães

(assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade

Fernando Pessoa como parte dos
requisitos para obtenção de grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professor Doutor Rui Medeiros

Sumário

Detetado nos finais de 2019, o SARS-CoV-2 é capaz de provocar COVID-19 em humanos apresentando uma rápida propagação pelo mundo sendo declarado o estado pandémico deste vírus. Este novo vírus tem a capacidade de provocar síndrome respiratória aguda grave bem como estados febris, tosse, fadiga e cefaleias, atingindo principalmente idosos, especialmente se já forem alvo de outras doenças, podendo provocar consequências mais severas a nível do trato respiratório podendo mesmo levar a episódios de pneumonia.

A deteção deste novo coronavírus é o terceiro caso documentado de um vírus pertencente a esta família capaz de provocar epidemias ou, no caso do SARS-CoV-2, pandemias. Em anos anteriores, 2 epidemias de coronavírus alastraram-se até aos seres humanos e foram causados, em 2002, pelo SARS-CoV e, em 2012, pelo MERS-CoV.

Segundo provas científicas concluiu-se que todos estes coronavírus provieram de origem zoonótica, reforçando a importância da vigilância de animais domésticos e não domésticos, bem como as inúmeras interações que ocorrem entre estes animais, sendo possível a mutação viral capaz de “saltar de espécie em espécie” acabando por atingir a espécie humana.

Palavras-chave: Coronavirus; SARS-CoV-2; MERS-CoV; SARS-CoV; COVID-19; Zoonose.

Abstract

Detected in late 2019, SARS-CoV-2 is able to cause COVID-19 in humans showing a rapid spread around the world being declared the pandemic state of this virus. This new virus has the ability to cause severe acute respiratory syndrome as well as fever, cough, fatigue and headaches, affecting mainly the elderly, especially if they already have other diseases, and can cause more severe consequences in the respiratory tract and even lead to episodes of pneumonia.

The detection of this new coronavirus is the third documented case of a virus belonging to this family capable of causing epidemics or, in the case of SARS-CoV-2, pandemics. In previous years, 2 coronavirus epidemics spread to humans and were caused in 2002 by SARS-CoV and in 2012 by MERS-CoV.

According to scientific evidence it was concluded that all these coronaviruses came from zoonotic origin, reinforcing the importance of surveillance of domestic and non-domestic animals, as well as the numerous interactions that occur between these animals, being possible the viral mutation able to "jump from species to species" eventually reaching the human species.

Key words: Coronavirus; SARS-CoV-2; MERS-CoV; SARS-CoV; COVID-19; Zoonose.

Agradecimentos

A toda a minha família, com especial ênfase aos meus pais, ao meu irmão, à minha avó e ao meu tio pelo vosso apoio incansável em todas as etapas da minha vida e por me incentivarem sempre a tentar mais.

Ao meu irmão por me incentivar sempre a mais e por não me deixar desistir, sem ti nada disto seria possível.

Aos meus amigos Jaime Oliveira, Henrique Mendes, Ricardo Dias, Marco Sousa, Helena Freitas e Ana Francisca Rodrigues um obrigado por estarem sempre do meu lado e por me proporcionarem memórias inesquecíveis.

Ao meu orientador Professor Doutor Rui Medeiros pela importante contribuição e pelos excelentes fundamentos transmitidos, não só como orientador do presente artigo científico, bem como durante a cadeira de Virologia, a base pela qual me fez optar por este tema, o meu muito obrigado.

Índice

Sumário.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Abreviaturas.....	ix
I. Introdução.....	1
1. Materiais e métodos.....	3
II. Desenvolvimento.....	5
2.1. Coronavírus: uma perspetiva histórica.....	5
2.2. Taxonomia e diferentes tipos de coronavírus.....	6
2.3. Estrutura dos coronavírus.....	8
2.4. Origem animal e evolução da SARS-CoV.....	10
2.4.1. Diagnóstico.....	11
2.5. Origem animal e evolução da MERS-CoV.....	12
2.5.1. Diagnóstico.....	13
2.6. Origem e evolução da SARS-CoV-2.....	14
2.6.1. Diagnóstico.....	15
2.7. Patogenicidade.....	16
2.8. Transmissibilidade.....	17
2.9. Mortalidade.....	18

III.	Modelos animais.....	19
3.1.	SARS-CoV.....	19
3.1.1.	Modelos de primatas.....	19
3.1.2.	Modelos de rato	19
3.1.3.	Modelos de hamsters	20
3.2	MERS-CoV.....	22
3.2.1.	Modelo de Camelo Dromedário	22
3.2.2.	Modelo de Alpaca.....	22
3.2.3.	Modelo de Primatas	22
3.2.4.	Modelo de Porco Yorkshire Landrace.....	24
3.2.5.	Modelo de coelho branco da Nova Zelândia.....	24
3.2.6.	Modelos de rato	25
3.3.	SARS-CoV-2	27
3.3.1.	Modelos de primatas.....	27
3.3.2.	Modelos de rato	28
3.3.3.	Modelos de Hamster	29
3.3.4.	Modelos de furão	30
IV.	Distribuição global dos coronavírus	32
4.1.	MERS-CoV.....	32
4.1.1.	Humanos.....	32
4.1.2.	Animais.....	34
4.2.	SARS-CoV.....	35
4.2.1.	Humanos.....	35
4.2.2.	Animais.....	37
4.3.	SARS-CoV-2	38

4.3.1. Humanos.....	38
4.3.2. Animais.....	39
V. Conclusão	43
VI. Referências Bibliográficas.....	45

Índice de Figuras

Figura 1: Taxonomia dos diferentes coronavírus, adaptado de Malik (2020).....	7
Figura 2: Distribuição de casos confirmados de MERS-CoV em humanos, desde 12 de abril de 2012 até 29 de junho de 2021, com base em dados obtidos a partir de ECDC (2021a).....	33
Figura 3: Relação entre casos positivos e mortes em humanos para a MERS-CoV, com base nos dados de Azkur et al. (2020).....	34
Figura 4: Evidências virológicas e serológicas para a MERS-CoV em camelos dromedários, com base em dados obtidos a partir de Sikkema et al. (2019).....	35
Figura 5: Relação entre casos positivos e mortes em humanos para a SARS-CoV, com base nos dados de WHO (2003)	36
Figura 6: Distribuição global dos casos prováveis relativos à SARS-CoV, em humanos, de 1 de novembro de 2002 até 31 de julho de 2003, adaptado de Hui et al. (2004).....	36
Figura 7: Casos positivos para a SARS-CoV, em animais, com base em dados obtidos a partir de Bonilla-Aldana et al. (2020).....	37
Figura 8: Relação entre casos positivos e mortes em humanos para a SARS-CoV-2, com base nos dados de ECDC (2021b)	38
Figura 9: Relação entre casos positivos e mortes em humanos para a MERS-CoV-2, com base nos dados de ECDC (2021b)	39
Figura 10: Surtos de SARS-CoV-2 registados em animais, adaptado de OIE (2021b) ..	41
Figura 11: Distribuição global do MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2 em diferentes espécies animais.....	42

Índice de Tabelas

Tabela 1: Diferentes proteínas dos coronavírus e as suas funções, adaptado de Hatmal et al. (2020).....	9
Tabela 2: Características epidemiológicas e reservatório animal da SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV, adaptado de Petrosillo et al. (2020)	17
Tabela 3: Modelos animais do SARS-CoV, adaptado de Singh et al. (2020).....	21
Tabela 4: Modelos animais da MERS-CoV, adaptado de Singh et al. (2020)	26
Tabela 5: Modelos animais da SARS-CoV-2, adaptado de Singh et al. (2020).....	31
Tabela 6: Características experimentais de diferentes espécies animais infectados com SARS-CoV-2, adaptado de Hobbs and Reid (2020)	40
Tabela 7: Número de surtos em animais (n=565) reportados globalmente, por espécie e região (até 31 de julho de 2021) OIE (2021b).....	40

Abreviaturas

ACE2 – Enzima conversora da angiotensina 2, do inglês, *Angiotensin-converting enzyme*
2

AMR – *Region of the Americas*

AFR – *African Region*

CCDC – Centro Chinês de Controlo e Prevenção de Doenças, do inglês *Chinese Center for Disease Control*

COVID-19 – *Coronavirus Disease-19*

DPP4 – Dipeptidil peptidase 4, do inglês dipeptidyl peptidase 4

ECDC – Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças, do inglês *European Center for Disease Prevention and Control*

EMR – *Eastern Mediterranean Region*

EUR – *European Region*

IBV – Vírus da bronquite infecciosa, do inglês, *Infectious bronchitis virus*

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

MERS – *Middle East Respiratory Syndrome*

MERS-CoV – *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*

MHV – Vírus da Hepatite Maurina, do inglês, *Murine Hepatitis Virus*

NSP – Proteína não estrutural, do inglês, *Non Structural Protein*

OMS – Organização Mundial de Saúde

Coronavírus e outros vírus em circulação em animais não domésticos: implicações para a Saúde Humana

ORF – Fase de leitura aberta, do inglês, *Open Reading Frame*

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

RBD – *Receptor Binding Domain*

RdRp – RNA Replicase, do inglês, *RNA dependent RNA polymerase*

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

rRT-PCR – Reação reversa em cadeia das polimerases, do inglês, *reverse real-time polymerase chain reaction*

SARS – *Severe Acute Respiratory Syndrome*

SARS-CoV – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*

SARS-CoV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SEAR – *South-East Asian Region*

TAC – *Tomografia Axial Computorizada* (),

WPR – *Western Pacific Region*

I. Introdução

O primeiro caso do que viria ser uma pandemia conhecida por COVID-19, do inglês *coronavirus disease-19*, foi relatado em Wuhan, na província de Hubei na China, nos finais de 2019. Trata-se de uma doença responsável por uma infecção respiratória aguda, provocada por um vírus da família *Coronaviridae*. Este surto pandémico trata-se do terceiro contágio documentado resultante de uma infecção por *Coronaviridae* em que há uma transmissão direta do vírus de animais para os humanos (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, 2020). Estes coronavírus são caracterizados por possuírem um envelope e apenas uma molécula de ácido ribonucleico, RNA, do inglês, *ribonucleic acid*, de cadeia simples (Azkur *et al.*, 2020). Até ao tempo de elaboração do presente artigo, há um total de 7 estirpes conhecidas de coronavírus, sendo estes HCoV-NL63, HCoV-229E (pertencente aos α -CoVs), HCoV-OC43, HCoV-HKU1 (pertencente aos β -CoVs), SARS-CoV, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*, MERS-CoV, do inglês *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* e o mais recente SARS-CoV-2, do inglês *Severe Acute Respiratory Coronavirus 2* (Halaji *et al.*, 2020).

A velocidade de propagação deste novo coronavírus fez com que a Organização Mundial de Saúde, OMS, a 11 de março de 2020 declarasse a SARS-CoV-2 como uma pandemia e a necessidade de controlar a sua propagação dependia de um esforço global. Após o decreto pandémico, a Organização Mundial de Saúde pretendia que a produção de uma vacina eficaz para a SARS-CoV-2 demorasse 18 meses, o que levou a uma corrida frenética para o desenvolvimento de vacinas e de medicamentos antivirais capazes de tratar a doença durante o período de desenvolvimento das vacinas. Ainda sem evidências científicas, estes tratamentos são meramente experimentais e funcionam na premissa de tratamento de sintomas e não do vírus em si, utilizando terapêuticas convencionais. Muitos fármacos foram utilizados para o tratamento da SARS-CoV-2, como inibidores da protease que previnem a infecção, impedindo a mediação da proteína *Spike* nas células humanas pulmonares (Hatmal *et al.*, 2020). Esta proteína *Spike* é o alvo principal dos fármacos uma vez que se trata de uma proteína responsável pela infecção, sendo também responsável pela ligação inicial nos recetores da enzima conversora da angiotensina 2, ACE2, o que leva, conseqüentemente, à infecção (Hatmal *et al.*, 2020).

Desde o momento inicial da propagação deste vírus, a transmissão entre humanos demonstrou ser algo difícil de combater uma vez que este se propaga pelo expelir de gotículas respiratórias do hospedeiro, que se encontra contaminado, através de partículas que são expelidas durante espirros, tosse ou através da fala. Esta transmissão pode envolver métodos diretos, em que ocorre uma transmissão direta de um indivíduo infetado com SARS-CoV-2 para um não infetado para SARS-CoV-2 através do expelir de gotículas; ou através de métodos indiretos de transmissão, podendo entrar em contacto com superfícies e objetos contaminados e caso não haja uma correta higienização a propagação deste vírus é exponencial (Harrison *et al.*, 2020).

O diagnóstico é feito maioritariamente através da técnica de PCR, proveniente do inglês *Polymerase Chain Reaction*, realizada em tempo real, RT-PCR, através de amostras nasofaríngeas. Apesar de ser um teste bastante fiável, apresenta a possibilidade de ocorrerem falsos negativos devido a diversos fatores, como a incorreta recolha da amostra, uma contaminação da mesma e erros técnicos durante a recolha ou o processo de armazenamento (Revzin *et al.*, 2020).

Com uma elevada taxa de transmissibilidade entre humanos, é importante compreendermos qual o papel que os animais domésticos e animais não domésticos têm no que diz respeito à questão epidemiológica e também englobando possíveis recombinações no que se considera, presumivelmente, a origem do surto provocado pelo SARS-CoV-2. Para chegarmos a esta resposta é preciso denotar que diariamente existe um número incalculável de interações entre animais-animais e entre animais-homem, quer seja como animais domésticos ou então como animais não domésticos, mais especificamente, animais de criação sendo que cerca de 60% de doenças emergentes têm origem zoonótica (entre os quais animais selvagens) e estes valores têm aumentado significativamente nos recentes anos (Jones *et al.*, 2008).

Com um alcance epidemiológico global, atingindo os 5 continentes habitáveis, 80% dos casos de SARS-CoV-2 que evoluíram para COVID-19 apresentam um quadro clínico de febre ligeira, tosse seca e irritativa e dispneia. Os casos mais severos apresentavam também dispneia em 44% dos pacientes, hipoxia (depleção de oxigénio nos tecidos) em 50% dos infetados e febre elevada em 14% dos pacientes totais e, dependendo da idade dos indivíduos, a taxa de hospitalização situa-se entre os 0,1% (em idades compreendidas

entre os 5-17 anos) e 17,2% (em idades superiores a 85 anos) sendo que destes, 5% apresentavam quadros clínicos críticos, como falha de múltiplos órgãos. Apesar destes sintomas, alguns casos são reportados como assintomáticos, ou seja, não apresentam qualquer sintoma para a doença, mas têm a capacidade de propagar a doença por pessoas saudáveis para a COVID-19. Devido a este cenário, e tendo em conta que o período de incubação é de 2 semanas, algumas medidas de distanciamento social foram impostas por todos os 5 continentes, bem como o uso obrigatório de máscara, que permite que gotículas que seriam expelidas fiquem retidas na máscara, e uma higienização correta das mãos consegue combater a propagação do SARS-CoV-2, e outros agentes infecciosos (Atzrodt *et al.*, 2020).

Os coronavírus apresentam taxas de mortalidade e morbidade bastante significativas em animais de companhia e agrícolas, incluindo cães, gatos, furões, cavalos, alpacas, porcos, bovinos e aves de capoeira, bem como inúmeras espécies animais selvagens. A transmissão cruzada de coronavírus entéricos entre caninos e felinos leva à recombinação de diversos serotipos levando ao aparecimento de novas estirpes. Do mesmo modo, outros coronavírus de um determinado hospedeiro podem ser transmitidos a outro, levando a novas recombinações, podendo formar diferentes variantes no domínio das principais proteínas virais através de recombinações não-homologas, mostrando uma plasticidade genética dos coronavírus alarmante no que diz respeito à capacidade de “saltar de espécie em espécie”. Estes dados são facilmente corroborados pelos três surtos causados por coronavírus em humanos, SARS-CoV, MERS-CoV e COVID-19, provocada pelo SARS-CoV-2 mostrando o seu verdadeiro potencial zoonótico (Haake *et al.*, 2020).

1. Materiais e métodos

A pesquisa bibliográfica utilizada no presente artigo científico foi efetuada num período compreendido entre novembro de 2020 e agosto de 2021. Foram revistos artigos da literatura, selecionando-se aqueles que tratam das questões envolvendo o SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 em humanos e animais. Para isso, realizou-se a pesquisa através das bases de dados *PubMed* e *B-On*, e também entidades reguladoras da saúde com as seguintes palavras-chave: SARS-CoV; MERS-CoV, SARS-CoV-2, modelos

Coronavírus e outros vírus em circulação em animais não domésticos: implicações para a Saúde Humana

animais, diagnóstico, distribuição mundial, animais domésticos, animais não-domésticos, coronavírus.

Os critérios para a utilização destes artigos foram: artigos em língua portuguesa ou inglesa, bem como a presença de palavras-chave encontradas no título ou no resumo.

II. Desenvolvimento

2.1. Coronavírus: uma perspectiva histórica

O primeiro coronavírus a ser identificado tratou-se do IBV, um vírus que se encontrava presente em galinhas e provocava doenças respiratórias. O vírus da hepatite murina, do inglês Murine hepatitis viruses (MHV), foi identificado em 1949; Em 1946 e com todos os avanços que tinham sido feitos relativamente a pesquisas virais, foi reconhecido que a gastroenterite era transmissível em suínos, no entanto, só depois da descoberta dos coronavírus humanos, na década de 60, e do género de coronavírus definido é que estas 3 doenças puderam ser relacionadas (Hasoksuz et al., 2020).

Em 1965, Tyrrell e Bynoe iniciaram as descobertas da família coronaviridae e das suas implicações para a saúde humana. Inicialmente o vírus denominado de B814, foi detetado na traqueia humana de um indivíduo adulto após o que se suspeitava tratar de uma gripe comum. Este vírus foi inoculado em meios de cultura através de recolhas de amostras orofaríngeas de indivíduos voluntários que se encontravam infetados com B814 e, quando observado ao microscópico eletrónico, este assemelhava-se ao vírus IBV aviário (Hasoksuz et al., 2020).

Apesar desta descoberta, Tyrrell e Bynoe foram incapazes de semear e cultivar o agente infeccioso. Neste mesmo período de tempo, Almeida e Tyrrell, e através da utilização de microscopia eletrónica, foram capazes de encontrar a presença do agente infeccioso B814 em fluídos de culturas em órgãos infetados e assemelharam o mesmo à bronquite infecciosa que estava presente em galinhas (Kahn and McIntosh, 2005). Utilizando a técnica de cultura de órgãos, Almeida e Tyrrell examinaram o protótipo da estirpe HCoV 229E e assemelharam a sua morfologia à B814 e IBV, e, através desta mesma técnica, foram capazes de recuperar 6 outras estirpes incluindo protótipos virais de HCoV OC43, bem como 3 outras estirpes que eram consideradas antigénicamente não relacionadas à OC43 ou 229E (Hasoksuz et al., 2020).

Durante o inverno de 2002 a 2003, na província de Guangdong, China, uma nova forma de pneumonia com elevado grau de mortalidade surge que, subsequentemente, seria

rotulada de SARS. Esta doença propagou-se a Hong Kong no final de fevereiro de 2003 e em poucos dias alastrou-se a uma vasta área, devido às viagens internacionais, tais como Vietname, Singapura, Canadá, entre outros. Com um número de casos registados de 8422, dos quais 916 fatais, a doença propagou-se a um total de 29 países em 6 continentes (Hasoksuz et al., 2020).

Isolado a primeira vez em 2012 a partir de amostras de pulmão de um doente que desenvolveu pneumonia aguda e insuficiência renal na Arabia Saudita, o MERS-CoV é um vírus idêntico ao vírus encontrado nos esfregaços nasais de camelos dromedários, indicando que estes mesmos camelos se tratam de hospedeiros reservatório. A 14 de fevereiro de 2020, mais de 2500 casos, confirmados em laboratório, foram notificados, apresentando uma elevada taxa de mortalidade, rondando os 34.4% (Hasoksuz et al., 2020).

2.2. Taxonomia e diferentes tipos de coronavírus

Os coronavírus pertencem à ordem *Nidovirales*, família *coronaviridae* composta por duas subfamílias, sendo elas, *Orthocoronavirinae* (na qual estão inseridos) e *Torovirinae*. Estes coronavírus podem ser genotipicamente classificados em quatro géneros, sendo eles os *Alfa coronavírus* (α), *Beta coronavírus* (β), *Gama coronavírus* (γ) e *Delta coronavírus* (δ) (Seyed Hosseini et al., 2020).

Os géneros *Alfa coronavírus* e *Beta coronavírus* apenas têm a capacidade de infetar mamíferos, podendo provocar doenças respiratórias em seres humanos e gastroenterites nas espécies animais. Em contrapartida, os *Gama coronavírus* e os *Delta coronavírus* infetam aves, que por sua vez podem transmitir estes coronavírus aos mamíferos (Cui et al., 2019).

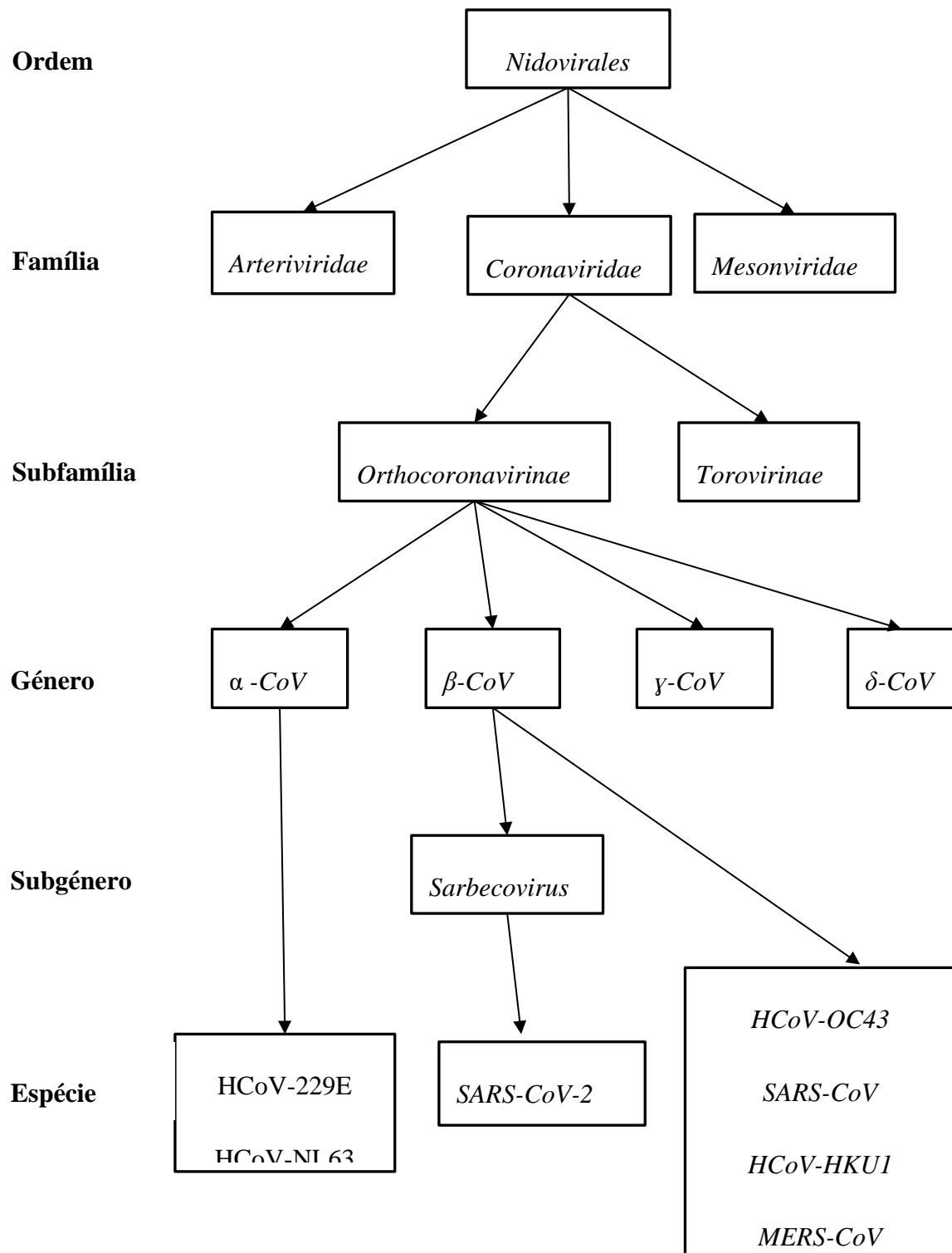


Figura 1: Taxonomia dos diferentes coronavírus, adaptado de Malik (2020)

2.3. Estrutura dos coronavírus

Os coronavírus tratam-se de uma espécie viral constituída por um envelope formado de RNA de cadeia simples poliadenilada, com um comprimento genómico compreendido entre 27-32 kb de sentido positivo e o seu nome deriva da sua estrutura externa que é composta por pontas em forma de coroa, projetadas para o exterior do vírus. A codificação presente no seu RNA para uma glicoproteína de grandes dimensões conhecida como glicoproteína Spike, é a ligação responsável por mediar os recetores celulares da célula hospedeira e a entrada viral na mesma (Seyed Hosseini *et al.*, 2020).

De todos os vírus RNA existentes, os coronavírus são os que apresentam o maior genoma, sendo constituído por uma cauda de 30 nucleótidos de poliadenosina e todos os coronavírus altamente patogénicos, incluindo o SARS-CoV-2, pertencem ao género *Betacoronavirus*, sendo que o SARS-CoV-2 partilha cerca de 80% do seu sequenciamento genético com o SARS-CoV e cerca de 50% com o MERS-CoV. O seu esquema genómico compreende 14 fases de leitura aberta, do inglês *Open Reading Frames* (ORF's) em que dois terços codificam 16 proteínas não estruturais denominadas de nsp 1-16, do inglês *nonstructural proteins*, que formam o complexo replicase. O restante terço é responsável por codificar 9 proteínas acessórias e 4 proteínas estruturais, sendo elas a *Spike* (S), o envelope (E), a membrana (M) e a nucleocapside (N), contudo a proteína estrutural *Spike* é altamente variável na SARS-CoV-2 e possui um domínio de ligação-recetor, do inglês *receptor-binding domain*, RBD, responsável por mediar o contacto com o recetor celular, que no caso da SARS-CoV e SARS-CoV-2 se trata da enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2) e no caso da MERS-CoV se trata da dipeptidil peptidase 4 (DDP4) (Harrison *et al.*, 2020).

As semelhanças entre o SARS-CoV-2 e o SARS-CoV também se apresentam a nível dos aminoácidos, embora haja diferenças no seu tamanho, tal como é o exemplo da proteína 8b que se encontra presente em ambos coronavírus, mas apresenta um comprimento de 84 aminoácidos no SARS-CoV, enquanto que no SARS-CoV-2 apresenta um comprimento de 121 aminoácidos. Algumas alterações também foram observadas na proteína *Spike*, que poderá ser uma das razões pela qual se desempenham diferentes afinidades no que diz respeito à ligação do vírus e a consequente patogenicidade (Hatmal *et al.*, 2020).

Tabela 1: Diferentes proteínas dos coronavírus e as suas funções, adaptado de Hatmal et al. (2020)

Proteína	Função
nsp1, nsp3	Inibição da sinalização do interferão e bloqueio de resposta imunitária do hospedeiro por promoção de degradação celular e bloqueio da tradução de RNA do hospedeiro
nsp2	Ligação à proteína de proibição
nsp3	Domínio da protease do tipo papaína, promoção da clivagem poliproteica viral e expressão de citocinas
nsp4, nsp6	Contribuição para a estrutura de vales metilação do DNA (<i>DNA methylation valleys</i>) como proteína andaime, do inglês <i>Scaffold</i>
nsp5	Domínio de protease do tipo 3C
nsp7, nsp8	Grampo para RNA polimerase pelo complexo hexadecamerico, nsp8 com atividade adenililtransferase
nsp9	Fosfatase proteica de ligação ao RNA
nsp12	RNA polimerase dependente de RNA
nsp10, nsp16, nsp14	Estimulante de atividade ExoN e 2-O-MT
nsp13	RNA helicase, 5' trifosfato
nsp14	Revisão do genoma viral
Proteína Spike (S)	Forma homotrimeros que se projetam na superfície viral e facilitam a ligação viral à célula hospedeira pela ligação ao complexo ACE2, expresso nas células do trato respiratório inferior. É clivada pelas células hospedeiras e forma duas subunidades S1 (responsável pela determinação do alcance do vírus no hospedeiro e o tropismo celular com o recetor de ligação) e S2 (responsável por mediar a fusão do vírus na transmissão de células hospedeiras).
Proteína Nucleocapside (N)	Componente estrutural localiza-se na região endoplasmática do retículo de Golgi que está ligado ao material nucleico do vírus. A proteína está ligada ao RNA pelo que se encontra envolvida nos processos do genoma viral, replicação viral e a resposta celular das células hospedeiras a infeções virais. É também fortemente fosforilada e sugere que a sua presença leva a mudanças estruturais que aumentam a afinidade pelo RNA viral.
Proteína de Membrana (M)	É a proteína mais bem estruturada e desempenha um papel na determinação da forma do envelope viral. Tem a capacidade de se ligar a todas as outras proteínas estruturais. A ligação ajuda a estabilizar a proteína N e promove a conclusão da montagem viral através da estabilização do complexo proteína N-RNA dentro do virião interno.

NSP – Non Structural Protein

2.4. Origem animal e evolução da SARS-CoV

A novembro de 2002 a doença que viria ser conhecida como síndrome respiratória aguda grave (SARS) emergiu na província de Guangdong, China. A fácil propagação deste vírus permitiu que, a meados de fevereiro de 2003 a doença se tivesse propagado por mais de 30 países e tivesse infetado cerca de 7900 pessoas por 5 continentes. Pesquisas e estudos mais aprofundados permitiram concluir que o agente etiológico viral causador da SARS se tratava de um novo coronavírus, a qual foi atribuído o seu nome à doença como SCoV, no entanto este nome viria ser alterado para SARS-CoV, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus* (Guan *et al.*, 2003).

Resultados preliminares e o acesso antecipado aos casos iniciais de SARS-CoV, permitiram concluir que a vasta maioria dos casos ocorreram em funcionários de restaurantes que trabalhavam com mamíferos de não criação sendo usados como carnes exóticas e, tendo por base este ponto, a investigação envolveu animais capturados e transacionados, tanto nos restaurantes com os casos positivos como em mercados de venda destes animais. O mercado de venda animal de Shenzhen foi o local de investigação, onde os animais se encontravam em cativeiro, com jaulas individuais de reduzido tamanho e eram construídas por pequenos fios metálicos. As amostras animais contavam com 7 animais selvagens e 1 animal doméstico, todos provenientes de diferentes regiões do Sul da China e até ao momento da chegada ao mercado, tinham sido mantidos separadamente. O período de tempo no qual permaneciam no mercado era variável e cada responsável pela venda na sua banca recebia uma pequena quantidade de animais de cada espécie. Foram realizados testes nasais e fecais a estes animais e de diferentes bancas e, quando possível, amostras de sangue eram colhidas para sorologia. Antes de qualquer teste realizado, todas as amostras recolhidas tiveram de ser analisadas por um cirurgião veterinário para confirmar que se encontravam livres de qualquer tipo de doença. Foram testados esfregaços nasais e fecais em 25 animais para o ácido nucleico viral do SCoV usando o método RT-PCR, do inglês *reverse transcription-polymerase chain reaction*, para o gene N humano do SCoV. Os resultados destas investigações permitiram localizar a origem animal deste surto, sendo este encontrado numa civeta de palmeira dos Himalaias, *Paguma larvata*, um mamífero de pequeno porte que habita as florestas tropicais da Ásia e da África. Um vírus também foi detetado após o isolamento e RT-PCR direto a partir de um esfregaço fecal de um guaxinim cão, *Nyctereutes*

procyonoides. Após microscopia eletrônica mais partículas virais com morfologia compatível com o coronavírus foram encontradas e análises sorológicas mostraram que 5 animais tinham anticorpos para o coronavírus, sendo eles *Paguma larvata*, *Nyctereutes procyonoides* e *Melogale moschata*, conhecido como Texugo-furão chinês (Guan *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2019).

Em 2005 duas equipas independentes reportaram a descoberta de um novo coronavírus, o SARS-CoV, que tinha a capacidade de infectar a espécie humana e que era proveniente de morcegos, do género *Rhinolophus*. Estas descobertas sugeriram então que o morcego se tratava de um hospedeiro natural para o SARS-CoV e que as civetas, onde foi encontrado o vírus, se tratavam apenas de um hospedeiro intermediário. Depois destas descobertas, inúmeros testes foram realizados em morcegos e foram encontradas diversas espécies de coronavírus em morcegos com uma grande dispersão global, desde a China, Europa, África e países do Sudeste Asiático. Durante um estudo com uma duração de 5 anos conseguiu-se determinar que coexistiam uma grande diversidade de morcegos com coronavírus filogeneticamente relacionados ao SARS-CoV, SARSr-CoV do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome related Coronavirus*, numa gruta na província de Yunnan, na China. Esta localização ficou a ser conhecida como um *Hot Spot* na diversidade destes SARSr-CoV e esta localização possui todos os elementos genéticos de diversas estirpes, necessários para formar o SARS-CoV. Apesar de inúmeras tentativas e de pesquisas utilizando RNA recombinante nestes coronavírus, ainda nenhum progenitor do SARS-CoV foi encontrado na população de morcegos, pelo que será mais provável que o SARS-CoV tenha sido resultado de recombinações dentro de morcegos com SARSr-CoV ou então tenha sido transmitido por outros morcegos de algumas grutas ainda por explorar e cartografar. Esta hipótese é sustentada por dados que mostram que o progenitor direto do SARS-CoV emergiu antes de 2002 (Cui *et al.*, 2019).

2.4.1. Diagnóstico

Após a infeção, os sintomas iniciais assemelham-se aos do vírus *influenza*, sendo necessária a distinção e, para isso, recorre-se a esfregaços nasofaríngeos para a realização de testes virais. Atualmente e até ao momento da realização deste artigo científico, os

testes de diagnóstico incluem rRT-PCR, do inglês, *reverse real-time polymerase chain reaction*, reação em tempo real reversa da cadeia da polimerase; RT-LAMP, do inglês, *reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification*, amplificação isotérmica mediada por alça com transcrição reversa, bem como a utilização da tecnologia LAMP em RT, tempo real (Xu *et al.*, 2020).

2.5. Origem animal e evolução da MERS-CoV

Identificado em 2012 na Arábia Saudita, mais de 1600 casos foram reportados em humanos em cerca de 26 países até 2016. Muitos destes doentes necessitaram de cuidados intensivos e de um regime de internamento hospitalar, em que valores primários relataram um pico na taxa de mortalidade na ordem dos 70%. Com a proliferação do vírus, a Coreia do Sul relatou o segundo maior surto de MERS-CoV descrito, conseguindo isolar a fonte num único caso com historial de viagens ao Médio Oriente e que se alastrou a várias instalações de cuidados intensivos (Arabi *et al.*, 2016).

Ao contrário do aparecimento de SARS-CoV que envolveu civetas de palmeira, o MERS-CoV surgiu no Médio Oriente, Ásia e África e a maior parte das pessoas infetadas estiveram em contacto com camelos dromedários, *Camelus dromedarius* (Cui *et al.*, 2019).

Após recolhidas as amostras aos camelos dromedários e comparadas com as amostras retiradas aos humanos, concluiu-se que as estirpes encontradas de MERS-CoV eram idênticas, sendo também detetadas em amostras de soro de camelo dromedário datadas de 1983, sugerindo que o MERS-CoV estaria presente em camelos dromedários no mínimo há 30 anos (Cui *et al.*, 2019).

Futuras investigações e através de sequenciamento genómico descobriu-se que o coronavírus *HCOV-HKU5* do morcego *Tylonycteris* e *HCOV-HKU4* do morcego *Pipistrellus*, da linhagem dos betacoronavírus, eram filogeneticamente relacionados e se encontravam altamente conservados nas suas poliproteínas, bem como na grande maioria de proteínas estruturais apresentando apenas diversificações na sua proteína S (Cui *et al.*, 2019).

Em seguimento do amplo alcance destas investigações, a presença de MERSr-CoV, do inglês *Middle East Respiratory Syndrome related Coronavirus*, foi detetada em pelo menos 14 espécies de morcegos provenientes da família *Vespertilionidae* e *Nycteridae*, não se tratando, contudo, do progenitor direto de MERS-CoV pelo que, e após futuras análises, a proteína S encontrada neste MERSr-CoV diferiam substancialmente do MERS-CoV (Cui *et al.*, 2019).

2.5.1. Diagnóstico

A detecção viral em amostras de vias respiratórias trata-se do método de eleição no que diz respeito à detecção de uma infeção por MERS-CoV, podendo ser diversas amostras recolhidas, tratando-se de aspirados traqueais, esfregaços nasofaríngeos, lavagem bronco alveolar e através de amostras de expetoração. Diversos estudos sobre as amostragens permitem concluir que os aspirados traqueais e as amostras do lavado bronco alveolar produzem copias viais significativamente mais elevadas do que amostras nasofaríngeas ou amostras salivares. Até ao momento da elaboração do presente artigo científico, a RT-PCR é a base para o diagnóstico da MERS-CoV, usando o gene do envelope da MERS-CoV e comparando com leituras *open frame* do gene 1A, 1B ou o gene da nucleocapside. Contudo, amostras negativas em RT-PCR podem ser expostas a outro teste que utiliza a sequenciação do gene RNA polimerase dependente de RNA, do inglês, *RNA dependent RNA polimerase* (RdRp) e pode ser utilizado um resultado positivo como diagnóstico (Al Johani and Hajeer, 2016).

2.6. Origem e evolução da SARS-CoV-2

É bastante improvável que o SARS-CoV-2 tenha surgido através de manipulação laboratorial de um coronavírus relacionado com a SARS-CoV, uma vez que o RBD, da SARS-CoV-2 está otimizado à ligação com a ACE2 humana com uma solução mais eficiente daqueles coronavírus anteriormente relatados. A possibilidade de uma manipulação laboratorial é, novamente, posta em causa uma vez que um dos vários sistemas genéticos invertidos disponíveis para o betacoronavírus teria de ser utilizado, o que seria mais uma vez refutado, pela caracterização dos dados genéticos relativos ao SARS-CoV-2 revelam, irrefutavelmente, que o SARS-CoV-2 não é derivado de qualquer *backbone* viral anteriormente utilizado. Tendo em conta o que foi referido anteriormente podemos supor que a origem da SARS-CoV-2 se deve à seleção natural num hospedeiro animal antes de uma transferência zoonótica (Andersen *et al.*, 2020).

Com o elevado número de casos relatados relacionados com o mercado Huanan, na província de Wuhan, é possível que uma fonte animal do SARS-CoV-2 estivesse presente neste local. Dada a semelhança do SARS-CoV-2 com os coronavírus relacionados com o SARS-CoV-2 em morcegos, a probabilidade de estes serem hospedeiros reservatórios é bastante elevada. Apesar de uma amostra recolhida de um morcego *Rhinolophus affinis* apresentar um perfil genómico cerca de 96% semelhante ao da SARS-CoV-2, a sua proteína *Spike* diverge no RBD, o que sugere que não se consegue ligar de forma eficiente à ACE2 humana. Pangolins malaios, *Manis javanica*, ilegalmente importados para a província de Guangdong contém coronavírus semelhantes ao SARS-CoV-2 e, apesar do vírus encontrado no morcego *Rhinolophus affinis* apresentar um perfil genómico mais próximo do SARS-CoV-2, alguns coronavírus encontrados em *Manis javanica* apresentam uma ligação ao RBD que se assemelha mais ao SARS-CoV-2, mostrando claramente que a proteína *Spike* do SARS-CoV-2 se encontra otimizada na ligação à ACE2 humana se tratar de uma seleção natural. Embora não se tenha conseguido identificar o progenitor natural do SARS-CoV-2, a diversidade de coronavírus em morcegos e outras espécies é muito superior às amostragens que se encontram presentes na comunidade científica, onde, através do cruzamento de coronavírus entre espécies, surgem inúmeras mutações, inserções e supressões ao RNA viral (Andersen *et al.*, 2020).

As primeiras caracterizações genómicas das estirpes de SARS-CoV-2 em Wuhan apresentavam de 88% a 89% de semelhança genómica com *bat-SL-CoV*, 78% a 89% semelhante ao SARS-CoV e mais distante do MERS-CoV, a rondar os 50%. Embora a epidemia de SARS-CoV-2 estivesse ligada ao mercado de marisco de Wuhan, um total de 41 casos foram reportados, sendo que 14 casos não estiveram relacionados com o mercado de marisco. Assim, uma investigação mais detalhada era necessária e, chegando às conclusões de semelhança genómica apresentadas anteriormente e também da exclusão da manipulação laboratorial, o estudo voltou-se para a clivagem polibásica, característica da SARS-CoV-2 (Malaiyan *et al.*, 2021).

Destes estudos, concluiu-se que o RBD da proteína *Spike* do SARS-CoV-2 se liga fortemente aos recetores humanos, pangolins e morcegos através dos recetores da ACE2. Investigações mais aprofundadas confirmam que a proteína *Spike* se liga à ACE2 no trato respiratório inferior humano e outras espécies animais (porco, pangolim, civetas, vacas, búfalo, cabra, gato, ovelha e pombo) como recetor de entrada celular. Estes estudos permitiram ainda indicar que além dos pangolins, as cobras e as tartarugas podem atuar como potenciais hospedeiros intermediários e como transmissores do SARS-CoV-2 aos humanos (Malaiyan *et al.*, 2021).

Além disso, foi possível demonstrar que o RBD do SARS-CoV-2 foi introduzido através de recombinações com coronavírus presentes em pangolins, sendo este, possivelmente, um passo crítico na evolução do SARS-CoV-2 e na capacidade de infetar humanos. Apesar de estudos apoiarem a provável origem natural da SARS-CoV-2 em morcegos, esta terá sido transmitida aos pangolins antes de ter a capacidade de se espalhar ao homem, onde, através de contacto com outros coronavírus, teve a capacidade de infetar humanos através de sucessivas mutações genómicas (Malaiyan *et al.*, 2021).

2.6.1. Diagnóstico

De acordo com a sétima edição do programa Diagnóstico e Tratamento da Pneumonia, o tratamento por uma nova infeção causada por coronavírus relatado pela *National Health Commission of People's Republic of China*, os casos suspeitos foram definidos utilizando pacientes com febre ou sintomas de síndromes respiratórias, através da assistência a

imagens pela utilização da Tomografia Axial Computorizada (TAC), bem como historial de exposição à vida selvagem no mercado de animais e marisco de Wuhan e pelo registo de contacto com pessoas da província Wuhan no prazo de duas semanas após diagnóstico (Wang *et al.*, 2020).

Os resultados positivos para a SARS-CoV-2 foram confirmados através da sequenciação de alto rendimento, do inglês, *High-throughput sequencing*, ou através de um ensaio de RT-PCR, para amostras respiratórias que incluem esfregaços nasais e faríngeos, líquido de lavagem broncoalveolar, expetoração ou através de aspirados brônquicos, podendo ser também ser confirmado por resultados positivos anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG ou pelo anticorpo anti-SARS-CoV-2 IgG em que o período de recuperação tenha sido quatro vezes superior ao período de doença aguda (Wang *et al.*, 2020).

Atualmente e, até à data de elaboração do presente artigo científico, o diagnóstico do SARS-CoV-2 baseia-se, principalmente, nas características clínicas, epidemiológicas, imagem torácica e deteção laboratorial (Wang *et al.*, 2020).

2.7. Patogenicidade

Provas acumuladas com base na análise genómica sugerem que tanto o SARS-CoV-2 e SARS-CoV apresentem o mesmo recetor de células humanas, enquanto que o MERS-CoV apresenta um diferente recetor. A ACE2 é responsável pela ligação da molécula viral de SARS-CoV e SARS-CoV-2 e a consequente infeção da célula hospedeira através de sucessivas mutações que foram ocorrendo na proteína *Spike*, permitindo aumentar a sua patogenicidade e o reforço da ligação ao recetor humano. Com as mutações que foram ocorrendo, é possível confirmar que o SARS-CoV-2 apresenta uma ligação mais eficiente e patogénica do que a estirpe anterior de SARS-CoV. A ACE2 é uma ectoenzima que se encontra ancorada à membrana plasmática das células, nomeadamente às do trato respiratório inferior, coração, rins e trato gastrointestinal. Após inoculação *in vitro* do SARS-CoV-2 é possível observar, nas camadas superficiais das células epiteliais do trato respiratório humano, a cessação dos movimentos ciliares bem como efeitos citopáticos. A sua replicação é muito ativa em pneumócitos do tipo I e II e nos enterócitos e a

desregulação que é induzida nos reguladores da ACE2 no epitélio pulmonar contribui para patogénese de uma lesão pulmonar. (Petrosillo *et al.*, 2020).

Apresentando um recetor diferente no que diz respeito ao MERS-CoV, o DPP4, dipeptidil peptidase 4, o mesmo não apresenta qualquer similaridade estrutural dos coronavírus anteriormente referidos, sendo expresso sobre a superfície de vários tipos de células, incluindo vias respiratórias humanas, tendo uma atividade ectopeptidase, embora esta atividade não pareça ser essencial para a entrada viral (Wang *et al.*, 2013).

2.8. Transmissibilidade

Segundo estimativas realizadas pela OMS, o número reprodutivo (R0) do SARS-CoV-2 apresenta valores na ordem dos 2 e 2,5, resultados bastantes superiores aos encontrados no SARS-CoV, cerca de 1,7 e 1,9, e os valores para a MERS-CoV, com valores de R0 inferiores a 1. Apesar destes valores divulgados pela OMS, novos estudos têm vindo a ser realizados que descartam os valores apresentados para o SARS-CoV-2 e realçam o facto de poderem mesmo se tratar de valores superiores, na ordem de 4, que após uma revisão ter sido elaborada se concluiu que o valor de R0 seja de 3,28, com um valor mediano de 2,79. (Petrosillo *et al.*, 2020).

Tabela 2: Características epidemiológicas e reservatório animal da SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV, adaptado de Petrosillo *et al.* (2020)

Coronavírus	Reservatório animal	Hospedeiro intermediário	Recetores celulares	Número reprodutivo (R0)
SARS-CoV-2	Morcegos	Desconhecido	ACE2	2 - 2,5 (valores iniciais) 3,28 com um valor mediano de 2,79 (após revisão)
SARS-CoV	Morcegos	<i>Paguma larvata</i>	ACE2	1,7 – 1,9
MERS-CoV	Morcegos	<i>Camelus dromedarius</i>	Dipeptidil peptidase 4 (DDP4)	0.7

Os coronavírus são transmitidos aos humanos principalmente por gotículas respiratórias sob a forma de aerossol, em contacto direto com superfícies que se encontrem contaminadas e através de uma transmissão fecal-oral. (Harrison *et al.*, 2020).

2.9. Mortalidade

De acordo com um estudo realizado em 44672 indivíduos diagnosticados com COVID-19 na China pelo Centro Chinês de Controlo e Prevenção de Doenças, do inglês (CCDC), a taxa de fatalidade deste SARS-CoV-2 é estimada nos 2,3%, que se trata de uma taxa de mortalidade inferior à estabelecida pelo SARS-CoV (9,5%) e muito inferior quando comparada com os 34,4% da MERS-CoV (Petrosillo *et al.*, 2020).

III. Modelos animais

3.1. SARS-CoV

3.1.1. Modelos de primatas

No desenvolvimento dos modelos de infecção por SARS-CoV, foram utilizadas diversas espécies de primatas, desde os mais antigos até às espécies mais recentes. Foram observadas alterações significativas em quatro espécies de primatas quando o SARS-CoV era inoculado através das vias respiratórias, sendo essas quatro espécies: *cynomolgus*, *rhesus macaques*, *chlorocebus aethiops* e *callithrix jacchus*. O desenvolvimento da replicação viral apresentou-se elevada nas espécies *cynomolgus*, *rhesus macaques* e *chlorocebus aethiops*, enquanto que na espécie *callithrix jacchus* houve um desenvolvimento de sintomas clínicos como a diarreia, pneumonite, febre, fezes aquosas e hepatite. Para a equipa de investigadores, estes resultados podem ser explicados devido à idade e origem do primata, da dose viral administrada bem como a via de administração e inoculação viral (Singh *et al.*, 2020).

Devido à variabilidade biológica os resultados não se apresentam consistentes e consequentemente devem ser retiradas grandes quantidades de amostras para que se origine conclusões significativas do estudo (Singh *et al.*, 2020).

3.1.2. Modelos de rato

Para o desenvolvimento do estudo de modelos de ratos para a infecção por SARS-CoV, foram utilizados diferentes ratos. BALB/c *Mus musculus*, inoculados por via intranasal sofreram uma replicação viral pulmonar severa, mas não demonstraram qualquer sinal de morbidade ou de mortalidade. Três dias após a infecção, a replicação viral aumentou significativamente no trato respiratório, mas ao quinto dia denotou-se uma diminuição na taxa replicativa. Uma análise mais profunda permitiu concluir que os ratos mais jovens BALB/c não apresentavam quaisquer sinais clínicos da doença, mas permitiam uma replicação viral; em contrapartida os ratos BALB/c que se apresentavam com um ano ou

mais exibiam infecções críticas após a injeção viral de SARS-CoV. Uma comparação com o estudo e o surto de SARS-CoV ocorrido em 2003 permitiu concluir que os ratos BALB/c de idade avançada estavam mais propensos a que a doença desenvolvesse sintomas clínicos, podendo os dados ser extrapolados para os humanos ao nível da população mais idosa (Singh et al., 2020).

Estes estudos apontam que os ratos da estirpe 129S infetados com SARS-CoV apresentavam uma replicação viral e uma bronquiolite autolimitada, com relatos de perda de peso ligeira e o aparecimento de pneumonia após a infecção por SARS-CoV. Em situação oposta encontram-se os ratos da estirpe STAT 1-/- em que os desenvolvimentos de alterações histopatológicas são sustentados pela replicação viral autossuficiente, semelhante ao que ocorria na doença humana. Os ratos da estirpe C57BL/6 também foram utilizados neste modelo, em que a carga viral foi induzida por via intranasal e mostraram uma elevada replicação no trato respiratório, com o pico a situar-se por volta do terceiro dia após a infecção e uma clearance no nono dia. Após investigações mais profundas observou-se uma infecção sistémica transitória nos pulmões com a capacidade de atingir o cérebro (Singh et al., 2020).

3.1.3. Modelos de hamsters

O último modelo utilizado neste estudo trata-se da infecção da espécie *Mesocricetus auratus*, também conhecido por hamster-sírio, pelo SARS-CoV. Após a realização do estudo foi possível observar-se um aumento significativo da carga viral a nível pulmonar, provocando uma pneumonia intersticial. A eliminação viral foi observada após sete dias, fazendo com que o hamster seja um bom modelo comparativo à terapêutica devido à histopatologia pulmonar e a elevada carga viral pulmonar (Singh et al., 2020).

Tabela 3: Modelos animais do SARS-CoV, adaptado de Singh et al. (2020)

Modelo animal	Doença induzida (estirpe e rota)	Sinais clínicos
<i>Rhesus macaques</i>	SARS-CoV-Tor2, 10 ⁷ PFU, IV/IT	Carga viral significativa nos pulmões
<i>Rhesus macaques</i>	SARS-CoV, Urbani, 10 ⁶ PFU, IT/ IN	Sinais clínicos não detetados
<i>Rhesus macaques</i>	SARS-CoV, PUMC01, 10 ⁵ PFU, IN	Alterações pulmonares e febre em todos os macacos
<i>Cynomolgus monkeys</i>	SARS-CoV, 103 e 10 ⁶ TCID50, IN/ IT	Pneumonia intersticial, macrófagos alveolares e difusão neutrófila alveolar danificada
<i>Cynomolgus monkeys</i>	SARS-CoV, 1 9 10 ⁶ TCID50, IT/IN,	Sintomas surgem com a dificuldade respiratória, pneumonia tipo 2 e macrófagos alveolares
<i>Cynomolgus monkeys</i>	SARS-CoV, Tor2, 10 ⁷ PFU, IT	Tosse ligeira e adesões pleurais
<i>Cynomolgus monkeys</i>	SARS-CoV, Urbani, 3 9 10 ⁶ PFU, IB/ IN,	Congestão nasal, desconforto respiratório, letargia e doença pulmonar
<i>Chlorocebus aethiops</i>	SARS-CoV, Urbani, 10 ⁶ TCID50, IB/IN,	Pneumonite intersticial
<i>Callithrix jacchus</i>	SARS-CoV, Urbani, 10 ⁶ PFU, IT	Subida da temperatura corporal, pneumonia intersticial, hepatite linfócito multifocal e colite difusa intersticial
BALB/c musculus	Mus SARS-CoV maturados por 4-6 semanas, Urbani, 10 ⁵ TCID50, IN	Elevada carga viral no trato respiratório
BALB/c musculus	Mus SARS-CoV maturados por 12-14 meses, Urbani, 10 ⁵ TCID50, IN	<i>Mus musculus</i> de maior idade apresentam perda de peso significativa, danos alveolares e ligeira desidratação; edemas intra-alveolares e infiltrados perivasculares
129SvEv/STAT Mus musculus	1-/- SARS-CoV, Tor2, 6 9 10 ⁶ PFU/30 IL, IN	Replicação viral, morbidez, mortalidade e pneumonite
129SvEv/STAT Mus musculus	1-/- SARS-CoV, Urbani, 10 ⁵ PFU, IN	Relatos de doença grave, elevada replicação viral e lesões pulmonares severas
C57BL/6 musculus	Mus SARS-CoV, Urbani 1 9 10 ⁴ TCID50, IN	Infeção viral atinge o trato respiratório (bronquial e epitélio bronquiolar); infeção atinge o cérebro
Mus musculus transgênico hACE2	SARS-CoV, PUMC01 10 ⁵ TCID50, IN	Danos pulmonares graves, reações inflamatórias sistêmicas, degeneração e necrose em órgãos extrapulmonares
Mesocricetus auratus	SARS-CoV maturados por 5 semanas, Urbani, 10 ³ TCID50, IN	Aumento da replicação viral nos pulmões, danos na difusão alveolar

SARS – Severe Acute Respiratory Syndrome; IN – inoculação intranasal; IT – inoculação intratraqueal; IV – inoculação intravenosa; IB – inoculação intrabronqueal; TCID50 – Cultura Mediana de Dose Infeciosa Tecidual; PFU – Unidades formadoras de placas

3.2 MERS-CoV

3.2.1. Modelo de Camelo Dromedário

Nos estudos realizados relativos ao MERS-CoV, e relativamente a estudos passados, foram realizados testes em espécies de camelos, nomeadamente *Camelus dromedarius*, que apresentavam ligeiros aumentos de temperatura corporal e sinais de rinorreia. Para além disso, uma grande quantidade de carga viral proveniente da cavidade nasal, sugere que a transmissão animal-animal e animal-humano pode ocorrer através destas gotículas expelidas ou pelo contacto direto com as mesmas. Neste modelo animal, o MERS-CoV afeta principalmente o trato respiratório superior com a presença de alguns sinais clínicos ligeiros. Uma vez que se trata de uma doença que em sinais clínicos apresenta patologia grave, *Camelus dromedarius* não poderia ser utilizado como modelo de estudo à terapêutica (Adney *et al.*, 2014).

3.2.2. Modelo de Alpaca

Da família *Camelidae* surgem as alpacas, *Vicugna pacos*, uma possível alternativa para o estudo do MERS-CoV. As alpacas foram vistas como possíveis substitutos para *Camelus dromedarius* na pesquisa e teste para uma vacina viável para o combate à MERS-CoV. Apesar das possíveis utilidades das alpacas, o estudo apresentou diversas dissemelhanças entre a resposta imunitária de *Camelus dromedarius* e de *Vicugna pacos*, concluindo que a patogénese da infeção por MERS-CoV nas alpacas era desconhecida (Cramer *et al.*, 2016).

3.2.3. Modelo de Primatas

Para se desenvolver o modelo de primatas para o estudo do MERS-CoV, foram usados *Rhesus macaques*, nos quais a infeção viral e respetiva carga viral se encontrava em elevadas percentagens no trato respiratório inferior. A estirpe viral afetou principalmente pneumócitos do tipo I e II, rearranjando o espaço alveolar. Devido à elevada presença do MERS-CoV a nível pulmonar, o número de descarga viral era reduzido e, uma vez que

só se observou a presença viral a nível pulmonar, não foram encontrados quaisquer vestígios de replicação viral a nível renal. Comparando os resultados obtidos em *Rhesus macaques* com os seres humanos, concluiu-se que a insuficiência renal que era observada nos humanos poderia estar associado a uma hipoxia e não à disseminação viral. Neste modelo foram observados vários sinais clínicos, tais como um ligeiro aumento de temperatura, uma pneumonia significativa, sem disseminação sistémica e sem quaisquer traços de carga viral a nível do trato respiratório superior, permitindo assim que se concluísse que se tratava apenas de uma infeção do trato respiratório inferior, sem efeitos extrapulmonares (de Wit *et al.*, 2013).

Comparando os resultados obtidos de *Rhesus macaques* com a exposição humana ao MERS-CoV, este forma doenças respiratórias graves em humanos podendo resultar mesmo em falência e morte, apresentando valores de mortalidade superiores aos obtidos no modelo de *Rhesus macaques*. Para se iniciar o estudo em *Rhesus macaques*, um clone viral de MERS-CoV, denominado de icMERS-0 foi induzido, mas rapidamente se observou que o clone induzido apresentava uma maior patogenicidade que a estirpe selvagem de MERS-CoV. Apesar da sua maior patogenicidade, o MERS-CoV atingiu o pico de replicação viral entre o terceiro e o quinto dia após a infeção e encontrava-se totalmente resolvido após o trigésimo dia, apresentando apenas sinais clínicos breves e plácidos, imitando apenas infeções ligeiras de MERS-CoV nos humanos (Cockrell *et al.*, 2018).

Na maioria dos casos, a mortalidade apresentada é uma associação de comorbidades de MERS-CoV com outra patologia e a severidade da doença está também associada ao estado imunocomprometido. Para se estudar a gravidade e resposta imunológica da doença, foram utilizados medicamentos imunossupressores para se diminuir a imunidade de *Rhesus macaques*. Em tecidos pulmonares foi observado um decréscimo nas células inflamatórias nos animais imunocomprometidos que, por sua vez, representa o estado imunitário de um indivíduo e o desprendimento da carga viral, que descreve uma importância entre a resposta imunitária com a utilização da terapêutica adequada para controlar a infeção em ambientes clínicos (Prescott *et al.*, 2018).

Outra espécie de primatas utilizados foram os Saguis, *Callithrix jacchus*, e rapidamente se concluiu que estes são mais propensos à infeção por MERS-CoV do que *Rhesus*

macaques e se poderiam tratar de uma escolha adequada para o espelhamento de estratégias terapêuticas. O estudo revelou um aumento da gravidade após a exposição ao MERS-CoV em *Callithrix jacchus* do que a *Rhesus macaques*, sendo que se apresentavam nos valores na ordem de 1000 vezes superior, persistindo a infecção durante mais tempo, obrigando à execução da eutanásia. Uma análise aprofundada revelou a ocorrência de uma disseminação sistêmica do vírus, apesar de não haver qualquer infecção a nível renal. Este estudo permitiu observar que o modelo utilizado na espécie de primatas *Callithrix jacchus* se encontra mais próximo ao MERS-CoV que infeta os humanos (Falzarano *et al.*, 2014).

3.2.4. Modelo de Porco Yorkshire Landrace

Os porcos Yorkshire Landrace, *Sus scrofa domesticus*, são naturalmente permissivos à infecção por MERS-CoV e, apesar de terem sido infetados com HCoVEMC/2012, não se observou qualquer transmissão animal-animal, mas observou-se uma disseminação viral de RNA elevada, sendo que este modelo não pode ser utilizado como estudo de estratégias terapêuticas, não retratando condições clínicas semelhantes à do ser humano, apesar da sua disseminação viral (Vergara-Alert *et al.*, 2017).

3.2.5. Modelo de coelho branco da Nova Zelândia

Na continuação da pesquisa relativa a animais suscetíveis ao MERS-CoV e possíveis investigações no desenvolvimento do tratamento para a espécie humana, foram realizados testes modelo em coelhos brancos da Nova Zelândia, *Oryctolagus cuniculus*, na qual foi administrada a estirpe MERS-CoVMC/2012, demonstrando que o animal exibe uma infecção assintomática não estando associada a qualquer tipo de sinal clínico significativo. Conclui-se que *Oryctolagus cuniculus* não é adequado para o rastreio pré-clínico ou para a investigação relativa à vacinação para a MERS-CoV (Houser *et al.*, 2017).

3.2.6. Modelos de rato

Um dos métodos mais utilizados no campo da investigação são os modelos de ratos, tratam--se de modelos rentáveis, facilmente disponíveis, fáceis de manusear e são adequados no que diz respeito ao rastreio inicial de terapêuticas medicamentosas e desenvolvimento de vacinas. Apesar dos modelos de ratos não serem suscetíveis à infecção por MERS-CoV, através de avanços tecnológicos foi possível produzir uma versão recombinante de MERS-CoV, utilizando um adenovírus, na qual era expresso um gene humano para a DDP4, o recetor específico da MERS-CoV. Os resultados finais relatam uma perda de peso significativa, bem como a disseminação viral ao longo do trato respiratório, podendo, em casos mais intersticiais, causar pneumonias (Zhao *et al.*, 2014).

Apesar dos primeiros estudos utilizarem um adenovírus como vetor para desenvolver a infecção, os resultados clínicos não eram muito semelhantes ao humano. Para contornar o problema foram utilizados tecidos específicos e promotores da indução para derivar a DDP4 dos humanos em ratos transgênicos. Isto permitiu que os ratos tivessem uma maior facilidade a desenvolver pneumonias (Agrawal *et al.*, 2015).

O modelo transgênico criado, derivado do humano, mostrou uma replicação viral ativa no trato respiratório sem qualquer infecção cerebral, sendo observados todos os infiltrados respiratórios, tanto no cérebro como nos pulmões. Apesar de não haver qualquer tipo de infecção cerebral, o índice viral encontra-se elevando tanto no cérebro como nos pulmões nos ratos transgênicos. Um exame patológico permitiu encontrar inflamações severas e inflamações microscópicas que não se encontravam limitadas aos pulmões, indicando que se disseminou sistemicamente quatro a seis dias após a infecção (Tao *et al.*, 2016).

Tabela 4: Modelos animais da MERS-CoV, adaptado de Singh et al. (2020)

Modelo animal	Doença induzida (estirpe e rota)	Sinais clínicos
<i>Camelus dromedarius</i>	HCoV-EMC/2012, 1.9×10^7 TCID50, IN, IT, CON	Rinorreia; ligeiro aumento da temperatura corporal; descarga nasal; inflamação submucosa e intraepitelial ligeira a moderada
<i>Vicugna Pacos</i>	Dromedário MERS-CoV Al-Hasa_KFUHKU13/ 2013, 1.9×10^6 TCID50, oro nasal	Esfregaço nasofaríngeo positivo 10 dias após infecção
<i>Rhesus macaque</i>	HCoV-EMC/ 2012, 7.9×10^6 TCID50, IT, IN, oral e ocular	Eliminação viral pelo nariz; infecção no trato respiratório inferior transitória
<i>Rhesus macaques</i>	hCoV-EMC, 6.5×10^7 TCID50, IT	Aumento da temperatura corporal entre o primeiro e segundo dia após infecção; pneumonia intersticial ligeira a moderada multifocal; pneumócitos tipo I e II e macrófagos infetados
<i>Rhesus monkeys</i>	icMERS-0, 5.9×10^6 PFU, IT	Alteração na hiperdensidade pulmonar; pneumonia intersticial mínima a ligeira; patologia pulmonar transitória ligeira
<i>Rhesus macaques (imunossuprimidos)</i>	EMC/2012, 7.9×10^6 TCID50, ocular	Elevada taxa de eliminação viral; patologia pulmonar ligeira
<i>Callithrix jacchus</i> comum	HCoV-EMC/2012, 4.9×10^6 TCID50, IN, IT e ocular	Perda de apetite; níveis de atividade baixos; pneumonia severa; lesões pulmonares extensas
<i>Callithrix jacchus</i> comum	MERS-CoVJordan-n3/2012, 5.9×10^7 PFU, IT; MERS- CoVEMC/2012, 5.9×10^7 PFU, IT	Taxa respiratória elevada; pneumonia intersticial multifocal moderada
<i>Sus scrofa domesticus</i>	MERS-CoV, 1.9×10^7 TCID50, IN	RNA viral detetado até ao sétimo dia após infecção
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	EMC/2012, 1.9×10^3 TCID50, ou 1.9×10^5 TCID50, IV	Nenhum sinal clínico, nem após reinfeção
Ratos transgênicos (DDP4)	EMC-2012, 1.9×10^5 PFU, IN	Perda de peso; replicação viral no trato respiratório; pneumonia intersticial

MERS – Middle East Respiratory Syndrome; IN – inoculação intranasal; IT – inoculação intratraqueal; IV – inoculação intravenosa; TCID50 – Cultura Mediana de Dose Infeciosa Tecidual; PFU – Unidades formadoras de placas; CON – Conjuntival

3.3. SARS-CoV-2

3.3.1. Modelos de primatas

Recentemente reconhecido como um novo coronavírus e, com o intuito de avaliar os aspectos da infecção por SARS-CoV-2, diversos modelos animais foram utilizados para estudar a patogenicidade, transmissão e replicação viral. Para avaliar a patogenicidade da COVID-19 por infecção do SARS-CoV-2, foram utilizados modelos primatas, *Rhesus macaques*. Esfregaços recolhidos da região nasofaríngea permitiram observar elevados títulos virais, bem como lesões pulmonares em diferentes graus na totalidade das amostras (Munster *et al.*, 2020).

Através da utilização do modelo de *Cynomolgus macaques*, foi possível comparar a patogenicidade do SARS-CoV e MERS-CoV com o SARS-CoV-2, através da inoculação viral. As amostras foram recolhidas por via nasofaríngea e foram reportados danos alveolares difusos e, através da confirmação dos resultados, a indução do SARS-CoV-2 em primatas induziu sinais que se assemelham à COVID-19 encontrada em humanos, e a gravidade da infecção situa-se entre a MERS-CoV e a SARS-CoV (Mahase, 2020).

Além do estudo realizado em modelos de primatas, também foram realizados estudos com o intuito de verificar se a idade do animal se tratava de um fator importante numa infecção viral por SARS-CoV-2. A estirpe viral foi inoculada em macacos *Rhesus macaques* com idade compreendida entre os 3 e 5 anos e com 15 anos, por via intra-traqueal, estando sob observação o surgimento de sinais clínicos, como por exemplo, replicação viral e alterações histopatológicas. A replicação viral apresentou-se em maior ênfase nos pulmões e nasofaringe de *Rhesus macaques* de idade avançada em comparação com *Rhesus macaques* jovens, após infecção, observando-se uma pneumonia intersticial grave difusa nos macacos mais velhos (Yu *et al.*, 2020).

Num estudo comparativo, três espécies de primatas, *Rhesus macaque*, *Macaca fascicularis* e *Callithrix jacchus*, foram infetados com SARS-CoV-2 e foram observadas lesões graves e alterações histopatológicas nos órgãos vitais nestas três espécies de primatas. Contudo, o estudo concluiu que o modelo *Rhesus macaques* era o mais suscetível à SARS-CoV-2 em comparação com as outras duas espécies em estudo (Singh *et al.*, 2020).

Através de um outro estudo, foi possível determinar que os macacos verdes africanos, *Chlorocebus sabaeus*, suportavam um elevado grau de replicação e desenvolveram doença associada nas vias respiratórias que, poderia ser mais substancial do que as espécies relatadas anteriormente. Este estudo permitiu também a observação de carga viral nas fezes e amostras de mucosas de todos os macacos 15 dias após a infecção (Woolsey *et al.*, 2020).

3.3.2. Modelos de rato

Para o desenvolvimento do modelo em ratos, a inoculação foi feita em ratos BALB/c para o SARS-CoV-2 adaptada para a passagem 6 (MACSp6) o que permitiu afetar todos os grupos de ratos, independentemente da sua idade, obtendo-se dados clínicos como pneumonia moderada e inflamação, relatando também uma maior carga viral pulmonar, juntamente com alterações histopatológicas significativas a nível da traqueia, como por exemplo traqueia desnaturada, infecção dos alvéolos pulmonares, deteção de antigénio a nível traqueal, sintomas de bronquiolite em pneumócitos do tipo II. Relatou-se também uma elevação significativa a nível das quimiocinas e citocinas inflamatórias em soros e macrófagos pulmonares (Gu *et al.*, 2020).

Dinnon *et al.* construíram um vírus recombinante capaz de se replicar tanto nas vias aéreas superiores como nas inferiores em todos os ratos envolventes ao grupo BALB/c, independentemente da sua idade, mostrando uma infecção mais severa nos ratos idosos em comparação aos ratos mais jovens.

Um estudo com base em ratos transgênicos (hACE2) envolvendo a ACE2 foi realizado para se investigar a patogenicidade da COVID-19, relatando que os ratos infetados com o SARS-CoV-2 tiveram perda de peso, um aumento do título viral a nível pulmonar bem como alterações histopatológicas que identificaram uma pneumonia intersticial (Bao *et al.*, 2020).

Um dos estudos realizados em ratos examinou a infecciosidade e as alterações patológicas em ratos transgênicos hACE2 infetados com SARS-CoV-2, desenvolvido usando um promotor HFH4/FOXJ1 específico para células epiteliais pulmonares, mostrando uma

simulação parcial da COVID-19 humana. A diminuição de peso corporal significativa, pneumonia intersticial e fatalidade, juntamente com o envolvimento de outros órgãos, como o cérebro, coração e olhos, representa a semelhança homóloga humana (Jiang *et al.*, 2020).

3.3.3. Modelos de Hamster

Durante a realização deste modelo, foi observado uma ligação significativa do novo coronavírus com o recetor ACE2 do Hamster sírio dourado, *Mesocricetus auratus*. A carga viral que se encontrava presente no hamster aumentou significativamente, levando a danos alveolares difusos, numa fase inicial e uma apoptose extensa numa fase posterior da infeção (Chan *et al.*, 2020).

Observações clínicas e histopatológicas relativas ao modelo de Hamster na infeção por SARS-CoV-2, assemelham-se muito à condição clínica no que diz respeito ao envolvimento das vias aéreas, desde a concha nasal até à traqueia e alvéolos pulmonares, associando esta doença a alterações por inflamação, pela expressão celular da proteína N viral e pela elevada carga viral encontrada nos hamsters ao longo da primeira semana. É possível denotar um progresso da doença com o aumento da frequência respiratória, com a diminuição de atividade, pela perda de peso progressiva e, podendo ser considerada uma doença mais severa nos primeiros 6 dias após infeção, semelhante ao que os doentes humanos experienciam com a COVID-19 (Huang *et al.*, 2020).

Através de um acompanhamento, foi possível avaliar a transmissão e patogenicidade da infeção, mostrando que os grupos de hamster sírio dourado apresentam uma perda de peso significativa bem como uma elevada taxa de replicação no trato respiratório, sendo a carga viral elevada 2 dias após a infeção e a sua remoção observada 7 dias após infeção, podendo ser atribuído o decréscimo da carga viral pela presença de linfócitos T CD3 positivos. O envolvimento de neurónios sensoriais olfativos simula uma situação de anosmia em casos de COVID-19 (Sia *et al.*, 2020).

3.3.4. Modelos de furão

O estudo relativo ao uso de furões, *Mustela putorius furo*, no que diz respeito ao estudo da infecção e transmissão de SARS-CoV-2, reportou que os furões são mais suscetíveis à infecção e transmissão do vírus, tratando-se de um furão para furões *naive*, do inglês ingênuo, por via direta ou indireta de contacto físico. Estes furões infetados apresentam uma replicação viral no trato respiratório superior e reproduz as condições humanas para a COVID-19, podendo ainda ser utilizado para avaliar contramedidas para a doença (Kim *et al.*, 2020).

Tabela 5: Modelos animais da SARS-CoV-2, adaptado de Singh et al. (2020)

Modelo animal	Doença induzida (estirpe e rota)	Sinais clínicos
<i>Rhesus macaques</i>	SARS-CoV-2, 2.6 9 10 ⁶ TCID50, IT e IN	Descamação viral no trato respiratório superior, inferior e trato intestinal
<i>Rhesus macaques</i>	3–5 anos e 15 anos, SARS-CoV-2, 1 9 10 ⁶ TCID50, IT	Pneumonia intersticial severa e significativa replicação viral no trato respiratório, em macacos mais velhos
<i>Rhesus macaques</i>	SARS-CoV-2, 4.75 9 10 ⁶ PFU, IT e IN	Aumento da temperatura corporal, infiltração pulmonar progressiva, nível de genoma viral de RNA elevados e radiografias torácicas anormais
<i>Macaca fascicularis</i>	SARS-CoV-2, 4.75 9 10 ⁶ PFU, IT e IN	Infiltração pulmonar progressiva, radiografia anormal torácica, 2 dias após infecção mostram níveis de genoma viral muito elevado
<i>Callithrix jacchus</i>	SARS-CoV-2, 1.0 9 10 ⁶ PFU, IT e IN	Um terço apresentou temperatura corporal elevada, elevada carga viral no sangue
<i>Chlorocebus sabaeus</i>	SARS-CoV-2, 5.0 9 10 ⁵ PFU, IT ou IN	Consolidação pulmonar com hemorragia, pneumonia viral, libertação de mediadores da inflamação semelhantes aos humanos
<i>Cynomolgus monkeys</i>	SARS-CoV-2, 2 9 10 ⁵ TCID50, IT ou IN	Dano alveolar difuso nos pulmões, elevada carga viral no trato respiratório
Rato transgênico hACE2	SARS-CoV-2 (HB-01), 10 ⁵ TCID50/50 IL, IN	Perda de peso, aumento da replicação viral a nível pulmonar, pneumonia intersticial, acumulação de macrófagos nas cavidades alveolares
Rato BALB/c	SARS-CoV-2 (MACSp6), 7.2 9 10 ⁵ PFU, IN	Infeção a todas as idades, resposta inflamatória aguda com dano nos tecidos pulmonares, aumento das quimiocinas em proporção com a idade dos ratos
Rato BALB/c	10 semanas e 12 meses SARS-CoV-2 MA, 10 ⁵ PFU, IN	Patogenicidade relacionada com a idade
Rato Transgênico hACE2 HFH4-hACE2 em C3B6	SARS-CoV-2, 3 9 10 ⁴ TCID50 (para infecções <i>naïve</i>) e 7 9 10 ⁵ TCID50, IN	Perda de peso, pneumonia intersticial, linfopenia, suscetibilidade de géneros, carga viral nos olhos, coração e cérebro, além dos pulmões
Rato hACE2	SARS-CoV-2 4 9 10 ⁵ PFU-IN, 4 9 10 ⁶ PFU-IG	Elevada carga viral nos pulmões, cérebro e traqueia, pneumonia intersticial, aumento dos níveis de citoquinas
Rato Ad5-hACE2-traduzido	SARS-CoV-2 1 9 10 ⁵ PFU-IN	Perda de peso, carga viral pulmonar, patologia pulmonar severa
Rato HACE2-traduzido	SARS-CoV-2 1 9 10 ⁵ FFU-IN & IV	Perda de peso, elevada carga viral pulmonar, patologia pulmonar severa
<i>Mesocricetus auratus</i>	SARS-CoV-2, 10 ⁵ – 10 ⁷ TCID50, IN	Hiperventilação, perda de peso, danos alveolares difusos, elevada carga viral pulmonar
<i>Mesocricetus auratus</i>	SARS-CoV-2, Beta-CoV/Hong Kong/ VM20001061/ 2020 vírus, 8 9 10 ⁴ TCID50, IN	Perda de peso, replicação viral significativa, transmissão da infecção por via de aerossol
<i>Mustela putorius furo</i>	SARS-CoV-2, 105.5 CID50, IN	Aumento de temperatura corporal, elevadas cargas virais no trato respiratório superior

SARS-CoV-2 - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavírus 2; IN – inoculação intranasal; IT - inoculação intratraqueal; IG - inoculação intragástrica; TCID50 – Cultura Mediana de Dose Infeciosa Tecidual; PFU - Unidades formadoras de plaquetas; DPI – dias após infecção

IV. Distribuição global dos coronavírus

Como medidas de prevenção e identificação de ameaças para a saúde humana a União Europeia estabeleceu o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças, proveniente do inglês *European Center for Disease Prevention and Control*, ECDC (ECDC, 2021a).

O ECDC é responsável pela pesquisa, recolha, avaliação e divulgação de dados científicos e técnicos relevantes para doenças emergentes ou que se encontrem sob observação pelos mesmos. Além de fornecer pareceres científicos, é também responsável pela assistência técnica e científica no que diz respeito à formação (ECDC, 2021a).

O ECDC é também incumbido de fornecer informações atempadas à Comissão, aos Estados-Membros, agências comunitárias e às organizações internacionais que se encontrem no domínio da saúde pública, sendo responsáveis por coordenar a rede europeia e têm por objetivos os mesmos que a missão do ECDC (ECDC, 2021a).

Para uma melhor compreensão sobre os dados apresentados e o seguimento de linearidade sobre os mesmos, optou-se pela metodologia de divisão global em 5 regiões segundo a OMS, sendo elas: Região Africana (AFR), Região das Américas (AMR), Região do Sudeste Asiático (SEAR), Região Europeia (EUR), Região Mediterrânea Oriental (EMR) e Região Mediterrânea Ocidental (WPR) (WHO, 2021a).

4.1. MERS-CoV

4.1.1. Humanos

Utilizando uma compilação e agregação de dados providenciados pelas autoridades de saúde mundiais, desde abril de 2012 até 29 de junho de 2021, 2591 casos de MERS-CoV foram reportados a nível global, sendo predominantes na zona do médio oriente, que segundo a classificação da OMS se enquadra na Região Mediterrânea Oriental (EMR), tal como se verifica na Figura 2 (ECDC, 2015).

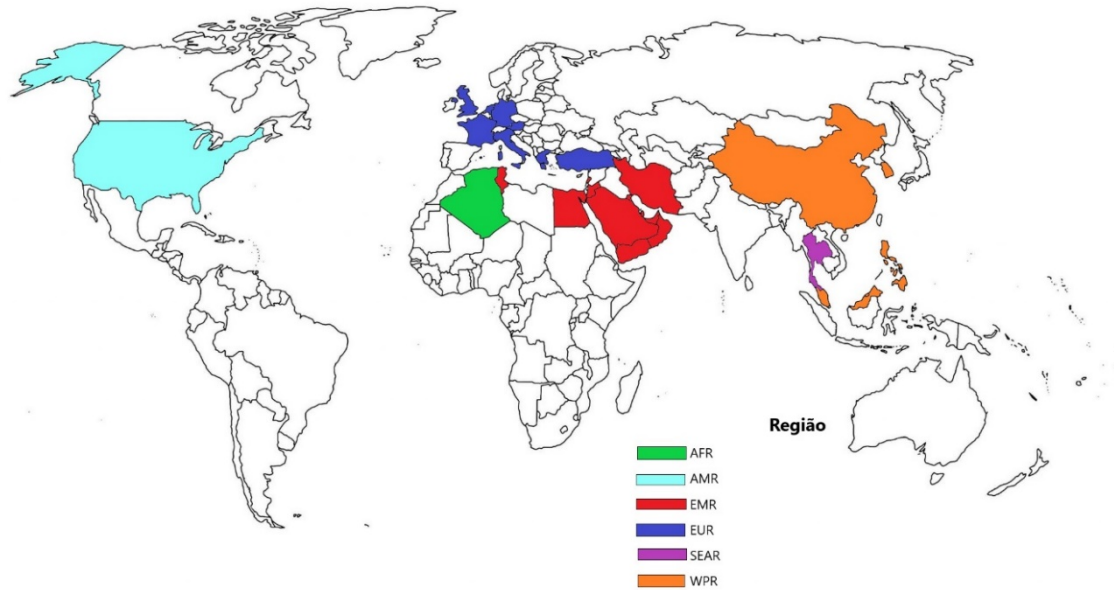


Figura 2: Distribuição de casos confirmados de MERS-CoV em humanos, desde 12 de abril de 2012 até 29 de junho de 2021, com base em dados obtidos a partir de ECDC (2021a)

Segundo os dados recolhidos e armazenados de forma contínua pelo ECDC, desde o mês de abril de 2012 até à data de lançamento do último *update* epidemiológico, relativo a ameaças e surtos, a 1 de setembro de 2015, 1545 casos foram identificados, dos quais resultaram 588 mortes, sendo os casos predominantes nos Emirados do Árabes Unidos e na Arábia Saudita, com cerca de 95% dos mesmos, tal como descrito na Figura 3 (ECDC, 2015).

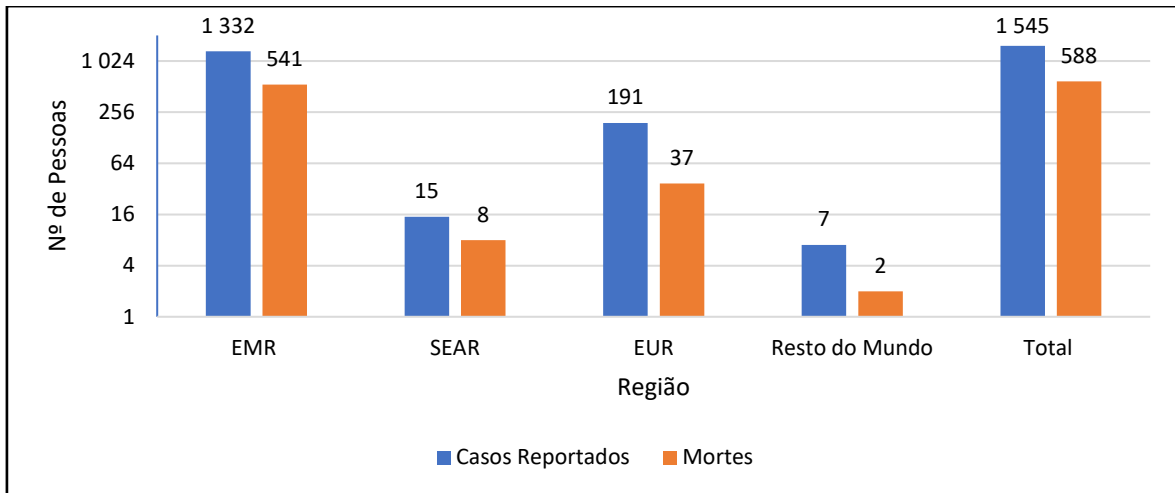


Figura 3: Relação entre casos positivos e mortes em humanos para a MERS-CoV, com base nos dados de Azkur *et al.* (2020)

4.1.2. Animais

A primeira evidência de MERS-CoV em camelos é datada de 1983 a partir da deteção de anticorpos para a MERS-CoV em amostras sorológicas de camelos da Somália e do Sudão. Provas sorológicas adicionais permitiram detetar a presença generalizada desta infeção em mais 18 países: Bangladesh, Burkina Faso, Egipto, Etiópia, Iraque, Israel, Jordânia, Quênia, Arábia Saudita, Mali, Marrocos, Nigéria, Omã, Paquistão, Qatar, Espanha, Tunísia e Emirados dos Árabes Unidos. Estas investigações permitiram também concluir que não existia qualquer evidência que este vírus se encontrasse em circulação na Austrália, Japão, Cazaquistão, Estados Unidos da América e Canadá. Em todos os outros países foram encontradas evidências que este vírus se encontrava em circulação dentro da população de camelos, com a exceção das Ilhas Canárias (Espanha), Paquistão e Bangladesh (Sikkema *et al.*, 2019).

Ao combinar os dados sorológicos incluídos na revisão de Sikkema *et al.* (2019), a soro prevalência dos camelos em África é de 81% (6106 positivos em 8526 camelos, com um alcance a entre os 28-98%) comparado com uma prevalência média de 93% dos camelos do Médio Oriente (3230 positivos em 3846 camelos, com um alcance entre os 53-100%). Com base nos estudos de descamação viral em países africanos de 5% (1108/6318, num intervalo de 1-15%) em comparação a 12% a camelos do Médio Oriente (1191/14902, num intervalo de 0-100%), tal como é apresentado na Figura 4.

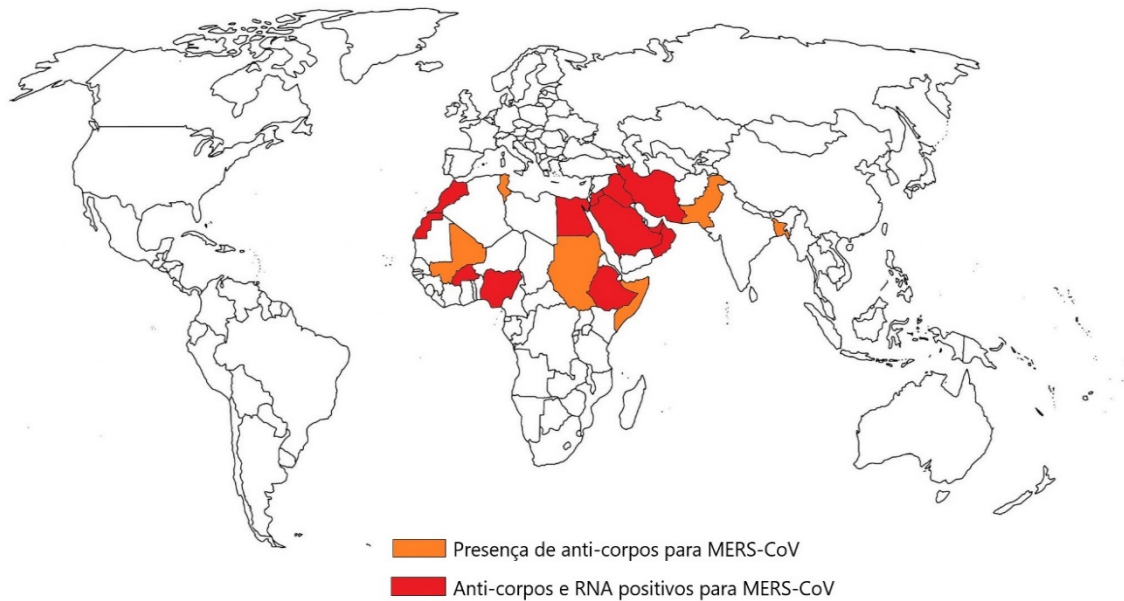


Figura 4: Evidências virológicas e serológicas para a MERS-CoV em camelos dromedários, com base em dados obtidos a partir de Sikkema et al. (2019)

4.2. SARS-CoV

4.2.1. Humanos

No dia 5 de julho de 2003, a OMS reporta que a última cadeia de transmissão entre humanos, em Taiwan, relativo ao SARS-CoV, se encontrava quebrada, pondo um término no surto que tinha começado a meados de novembro de 2002 e se difundiu até fevereiro de 2003, infectando 8096 humanos e levando à morte de 774 dos mesmos, como demonstrado na Figura 5, mostrando uma taxa de mortalidade inferior à do MERS-CoV (Hui *et al.*, 2004).

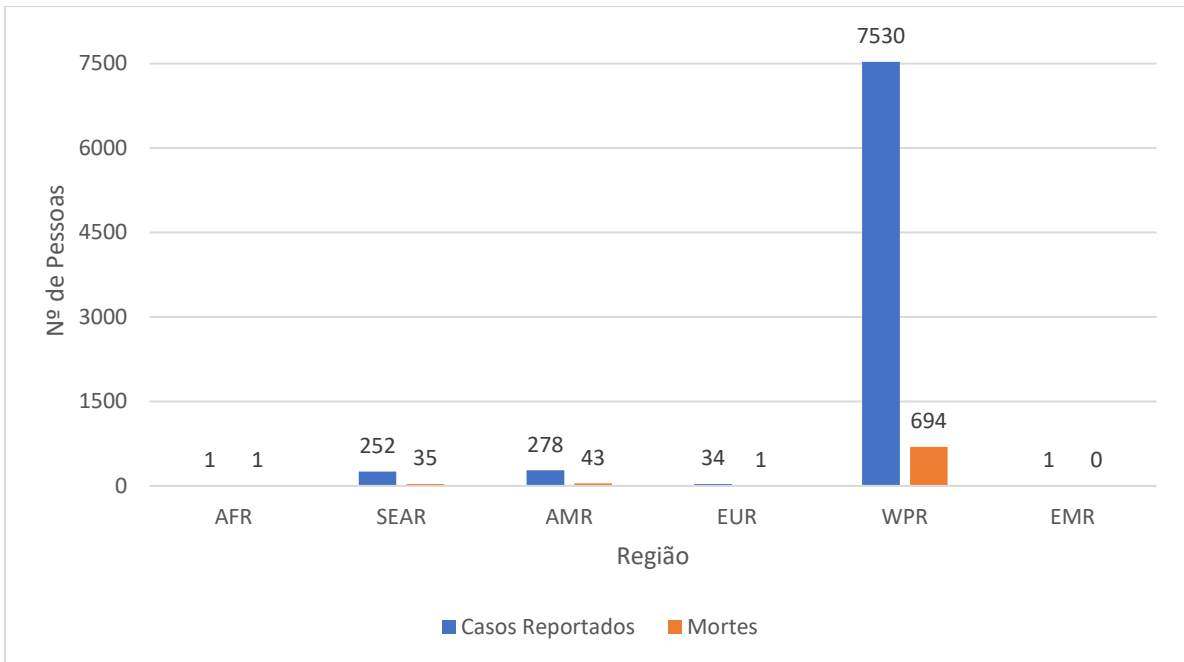


Figura 5: Relação entre casos positivos e mortes em humanos para a SARS-CoV, com base nos dados de WHO (2003)

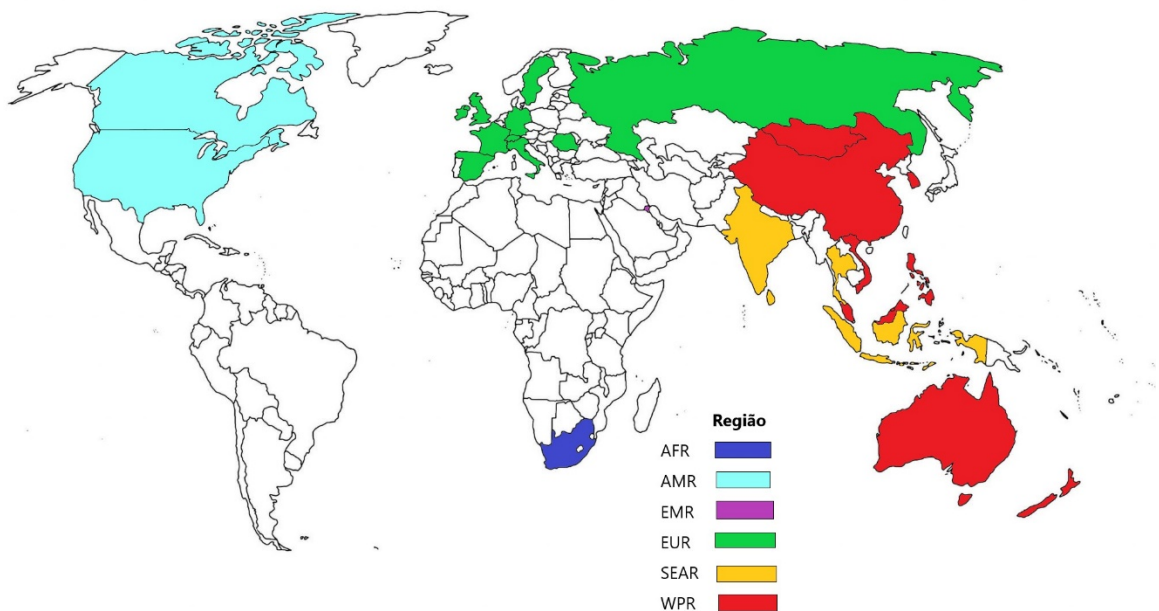


Figura 6: Distribuição global dos casos prováveis relativos à SARS-CoV, em humanos, de 1 de novembro de 2002 até 31 de julho de 2003, adaptado de Hui et al. (2004)

4.2.2. Animais

Segundo a revisão realizada por Bonilla-Aldana *et al.* (2020), no caso da SARS-CoV em animais, foram realizados testes em 2618 animais provenientes de 5 estudos, em que se concluiu que a prevalência era de 2.3%, com um intervalo de confiança de 95%. Foi possível, ainda, na população de animais testados, provenientes da China, demonstrado na Figura 7, separar os morcegos, sendo eles o reservatório natural conhecido para o SARS-CoV, com uma prevalência de 14.1% numa população de morcegos de 1004.



Figura 7: Casos positivos para a SARS-CoV, em animais, com base em dados obtidos a partir de Bonilla-Aldana *et al.* (2020)

4.3. SARS-CoV-2

4.3.1. Humanos

Causador da COVID-19, o SARS-CoV-2 trata-se de uma doença infecciosa altamente capaz de se transmitir entre humanos atingindo o nível pandémico, como descrito na Figura 9 e, apesar da maior parte das pessoas infetadas apresentarem sintomas ligeiros a moderados, pessoas suscetíveis, ou seja, pessoas idosas, que sofram de alguma patologia identificada, como por exemplo doença cardiovascular, diabetes, doença respiratória crónica ou cancro, podem desenvolver patologia severa ou até mesmo provocar a morte, quando infetados pelo SARS-CoV-2, tal como apresentado na Figura 8 (WHO, 2021b).

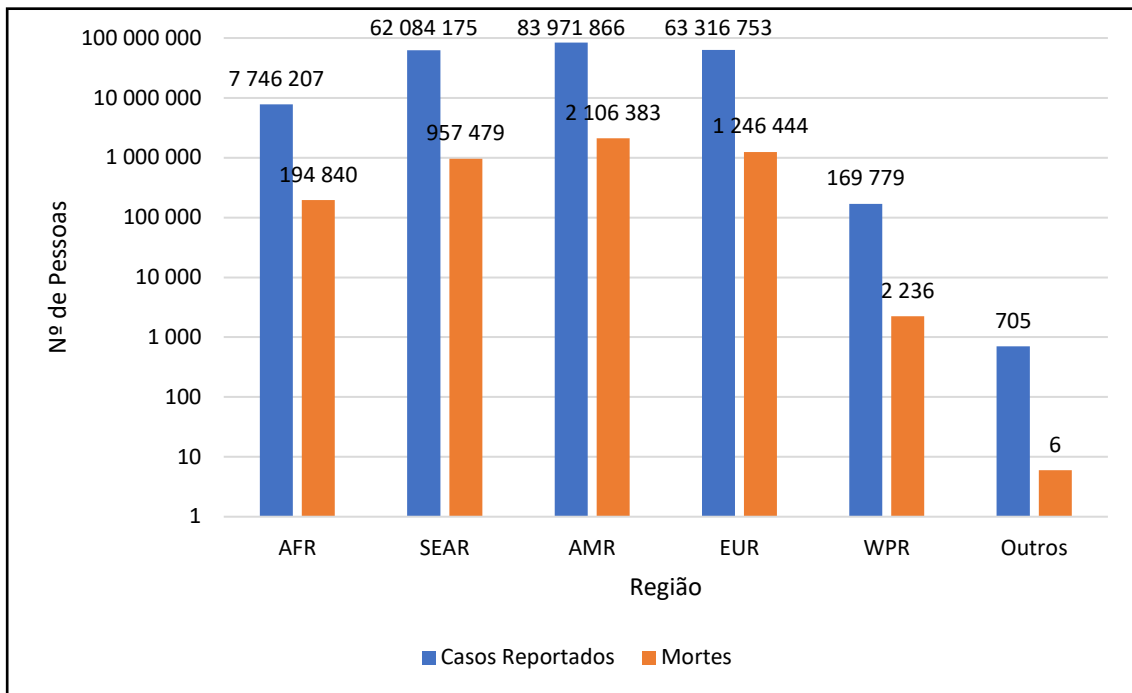


Figura 8: Relação entre casos positivos e mortes em humanos para a SARS-CoV-2, com base nos dados de ECDC (2021b)

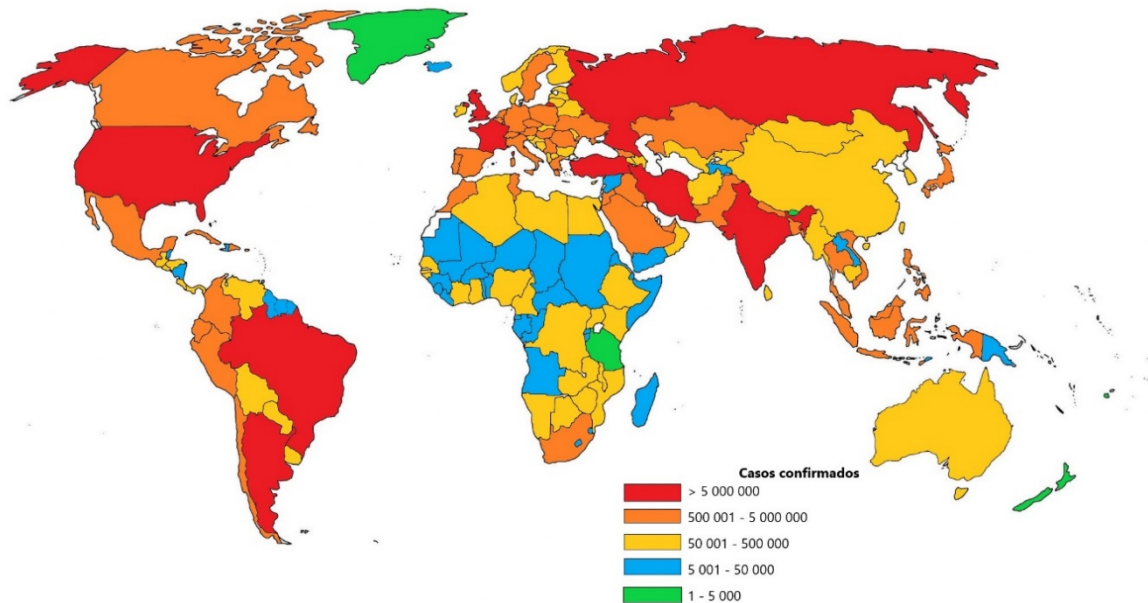


Figura 9: Relação entre casos positivos e mortes em humanos para a MERS-CoV-2, com base nos dados de ECDC (2021b)

4.3.2. Animais

A natureza zoonótica deste coronavírus, juntamente com uma distribuição global e a suscetibilidade de algumas espécies animais ao mesmo, permite que este se propague dentro das mesmas, sendo a grande parte das infeções causadas pelo contacto próximo de animais e o ser humano. Tratando-se de uma percentagem inferior de infeções, o contacto entre animais previamente infetados com animais domésticos sãos, também se mostrou uma possibilidade e uma possível via de infeção humana (OIE, 2021a).

A organização OIE, *World Organization for Animal Health*, em contacto com as suas representações regionais e sub-regionais, delegados da OIE em países membro, o Grupo de trabalho da OIE para a vida selvagem, bem como a FAO, *Food and Agriculture Organization*, e a OMS recolhem e partilham informações disponíveis relacionadas, entre outras doenças, com o SARS-CoV-2 em animais, investigando, além dos casos confirmados em animais, a origem do SARS-CoV-2, tal como os surtos apresentados na Tabela 8 e Figura 10 (OIE, 2021a).

Tabela 6: Características experimentais de diferentes espécies animais infetados com SARS-CoV-2, adaptado de Hobbs and Reid (2020)

Espécie animal	Sinais clínicos	Alterações patológicas em necropsia	Replicação	Transmissão após contacto animal	Resposta dos anticorpos
Furões	+++	+++	+++	+++	+++
Gatos	++	++	+++	+++	+++
Cães	-	-	-	-	+
Hamsters	+	DI	+	++	++
Primatas	+	+++	++	++	++
Morcego de fruta	-	DI	++	++	++
Galinhas	-	-	-	-	-
Patos	-	-	-	-	-

Nota: - (não observado); + (em certa medida); ++ (de forma moderada); +++ (em grande medida); DI – Data indisponível

Tabela 7: Número de surtos em animais (n=565) reportados globalmente, por espécie e região (até 31 de julho de 2021) OIE (2021b)

Espécie	Região	África	América	Ásia	Europa	Total
<i>Gatos</i>			67	11	24	102
<i>Cães</i>			66	15	6	87
<i>Visons</i>			20		335	355
<i>Lontra</i>			1			1
<i>Furões domésticos</i>					1	1
<i>Leões</i>		1	2		3	6
<i>Tigres</i>			7		1	8
<i>Pumas</i>		1	2			3
<i>Leopardos da neve</i>			1			1
<i>Gorilas</i>			1			1

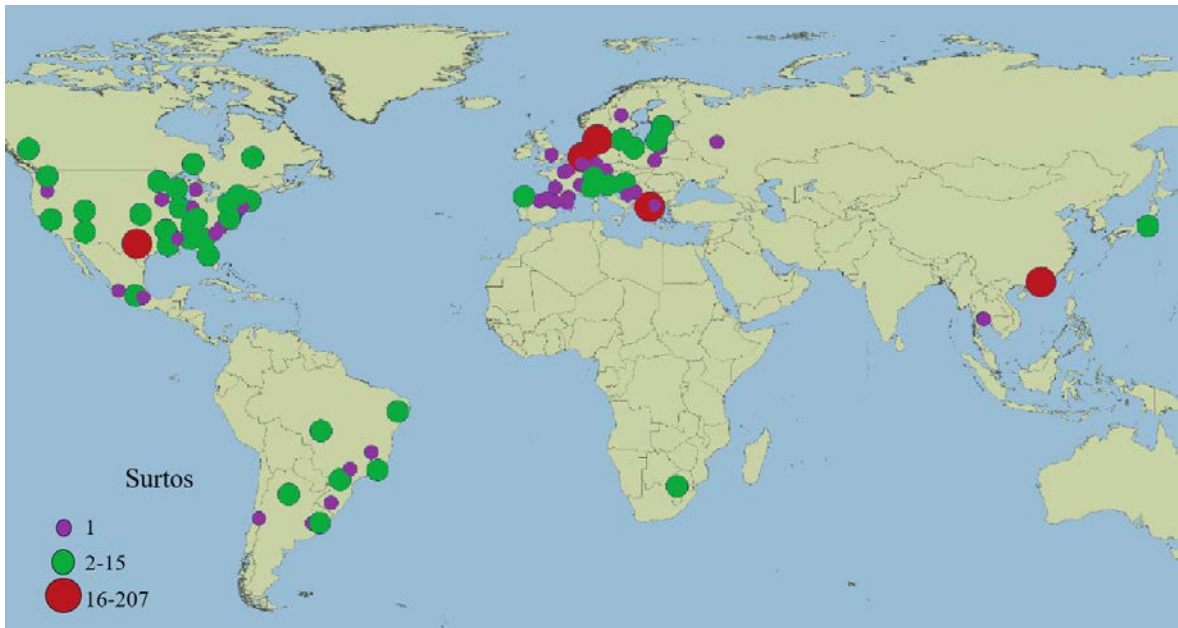


Figura 10: Surtos de SARS-CoV-2 registados em animais, adaptado de OIE (2021b)

Através da compilação de dados obtida na formulação deste artigo científico, é possível extrapolar quais os animais afetados por estes coronavírus e situá-los a nível global, tal como é apresentado na Figura 11, permitindo assim uma melhor perspetiva relativamente à distribuição e ao alcance global.

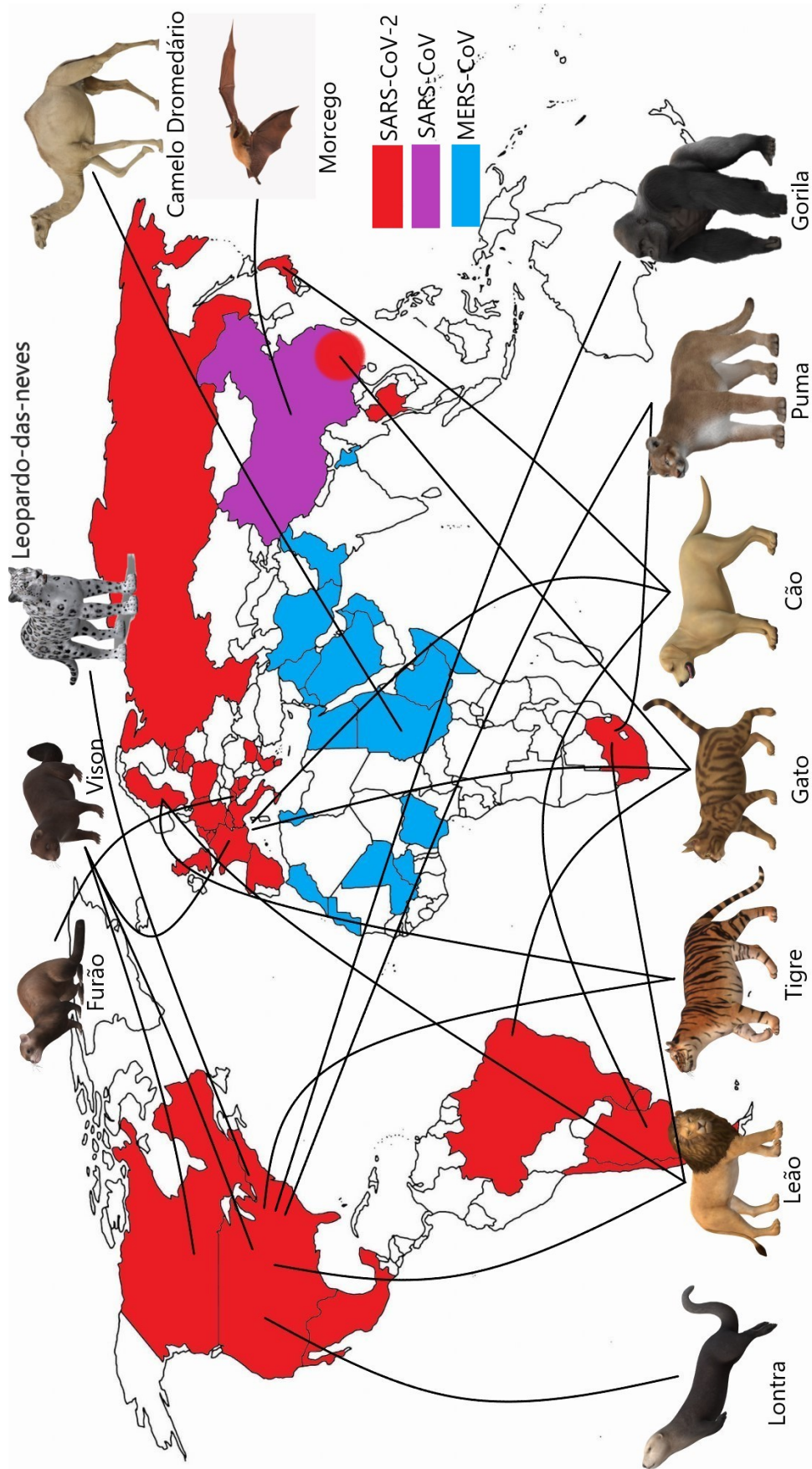


Figura 11: Distribuição global do MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2 em diferentes espécies animais

V. Conclusão

MERS-CoV

Desde a descoberta do MERS-CoV, em 2012, o camelo dromedário foi identificado como o reservatório animal, contudo, a rota exata das infeções primárias em humanos é, até ao momento da elaboração do presente artigo científico, desconhecida.

Apesar de não se conhecer a rota exata, o conhecimento do reservatório animal desta doença permite o desenvolvimento de medidas de intervenção, de prevenção e controlo no que se trata de futuras infeções pelo mesmo vírus.

Amostras recolhidas em animais permitem localizar o foco desta infeção, sendo que a zona geográfica da proliferação da doença é semelhante ao *hot spot* em casos humanos, podendo sugerir uma ligação causal entre a infeção animal e a infeção humana.

SARS

Com a descoberta da epidemia de SARS em 2002 na China, muita especulação rondou o aparecimento da doença sendo que reservatório animal morcegos.

Apesar dos inúmeros esforços realizados para se descobrir o local exato da origem da epidemia, o tamanho da região e as incontáveis grutas por cartografar, mantém a origem desconhecida, suspeitando-se que a transmissão da doença e as sucessíveis mutações permitiram que este se transmitisse para a espécie humana.

Com um *hot spot* de infeções na China, existe a possibilidade de uma ligação entre os casos em humanos e a demografia da infeção em animais, mostrando-se mais transmissível que o MERS-CoV e por consequente um maior alastrar da infeção em humanos.

SARS-CoV-2

Com provas que não se trata de uma manipulação laboratorial, é possível que se tenha desenvolvido através de sucessivas mutações entre diferentes hospedeiros.

Não sabendo a rota exata, nem hospedeiros intermediários, resta a especulação sobre a sua origem, sendo um tema muito aprofundado, mas, até ao momento da elaboração deste trabalho científico, ainda sem resposta.

Com o mecanismo de suporte e vigilância criado pela OMS, a OIE, há uma clara distribuição de SARS-CoV-2 por um maior espectro de animais, sendo a maior parte mamíferos.

Com o rápido alastrar da doença é incerto qual a rota que foi tomada nestes casos reportados, podendo ser humano-animal ou animal-humano. Contudo, demograficamente, os casos reportados em animais revelam-se numa zona geográfica de maior alastrar da doença em casos humanos, podendo ter uma relação direta.

Apesar do SARS-CoV-2 apresentar uma maior transmissibilidade entre humanos e uma menor taxa de mortalidade, relativamente a outros coronavírus, a sua vigilância e combate tratam-se de questões de máxima importância, uma vez que quanto maior o número de pessoas infetadas pelo SARS-CoV-2, o número de pessoas que padecem da doença aumenta proporcionalmente com a mesma.

Para evitar futuras pandemias, é necessário entender que os animais domésticos e não domésticos desempenham um papel fundamental na transmissão de doenças, bem como a geração/reformulação de doenças previamente conhecidas, através de mutações entre sucessivos hospedeiros.

VI. Referências Bibliográficas

Adney, D. R.; van Doremalen, N.; Brown, V. R., *et al.* (2014). Replication and shedding of MERS-CoV in upper respiratory tract of inoculated dromedary camels. *Emerg Infect Dis*, 20(12), pp. 1999-2005.

Agrawal, A. S.; Garron, T.; Tao, X., *et al.* (2015). Generation of a transgenic mouse model of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection and disease. *J Virol*, 89(7), pp. 3659-3670.

Al Johani, S. and Hajeer, A. H. (2016). MERS-CoV diagnosis: An update. *J Infect Public Health*, 9(3), pp. 216-219.

Andersen, K. G.; Rambaut, A.; Lipkin, W. I., *et al.* (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*, 26(4), pp. 450-452.

Arabi, Y. M.; Fowler, R. and Balkhy, H. H. (2016). Proceedings of the Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus research initiative workshop, September 9-10 2015 in Riyadh, KSA. *J Infect Public Health*, 9(3), pp. 205-207.

Atzrodt, C. L.; Maknojia, I.; McCarthy, R. D. P., *et al.* (2020). A Guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2. *FEBS J*, 287(17), pp. 3633-3650.

Azkur, A. K.; Akdis, M.; Azkur, D., *et al.* (2020). Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*, 75(7), pp. 1564-1581.

Bao, L.; Deng, W.; Huang, B., *et al.* (2020). The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*, 583(7818), pp. 830-833.

Bonilla-Aldana, D. K.; Cardona-Trujillo, M. C.; Garcia-Barco, A., *et al.* (2020). MERS-CoV and SARS-CoV infections in animals: a systematic review and meta-analysis of prevalence studies. *Infez Med*, 28(suppl 1), pp. 71-83.

Chan, J. F.; Zhang, A. J.; Yuan, S., *et al.* (2020). Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden

Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. *Clin Infect Dis*, 71(9), pp. 2428-2446.

Cockrell, A. S.; Johnson, J. C.; Moore, I. N., *et al.* (2018). A spike-modified Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infectious clone elicits mild respiratory disease in infected rhesus macaques. *Sci Rep*, 8(1), pp. 10727.

Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, V. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*, 5(4), pp. 536-544.

Cramer, G.; Durr, P. A.; Klein, R., *et al.* (2016). Experimental Infection and Response to Rechallenge of Alpacas with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Emerg Infect Dis*, 22(6), pp. 1071-1074.

Cui, J.; Li, F. and Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 17(3), pp. 181-192.

de Wit, E.; Rasmussen, A. L.; Falzarano, D., *et al.* (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) causes transient lower respiratory tract infection in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(41), pp. 16598-16603.

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. (2015). Epidemiological update: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), 1 September 2015.[Online]. Available: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers-cov-1-0>. [Accessed agosto de 2021]

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. (2021a). ECDC's Mission.[Online]. Available: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-uswhat-we-do/ecdc-mission>. [Accessed agosto de 2021]

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. (2021b). COVID-19 situation update worldwide, as of week 41, updated 21 October 2021.[Online]. Available: <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases>. [Accessed agosto de 2021]

Falzarano, D.; de Wit, E.; Feldmann, F., *et al.* (2014). Infection with MERS-CoV causes lethal pneumonia in the common marmoset. *PLoS Pathog*, 10(8), pp. e1004250.

Gu, H.; Chen, Q.; Yang, G., *et al.* (2020). Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science*, 369(6511), pp. 1603-1607.

Guan, Y.; Zheng, B. J.; He, Y. Q., *et al.* (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 302(5643), pp. 276-278.

Haake, C.; Cook, S.; Pusterla, N., *et al.* (2020). Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. *Viruses*, 12(9), pp.

Halaji, M.; Farahani, A.; Ranjbar, R., *et al.* (2020). Emerging coronaviruses: first SARS, second MERS and third SARS-CoV-2: epidemiological updates of COVID-19. *Infez Med*, 28(suppl 1), pp. 6-17.

Harrison, A. G.; Lin, T. and Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol*, 41(12), pp. 1100-1115.

Hasoksuz, M.; Kilic, S. and Sarac, F. (2020). Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turk J Med Sci*, 50(SI-1), pp. 549-556.

Hatmal, M. M.; Alshaer, W.; Al-Hatamleh, M. A. I., *et al.* (2020). Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their Interactions with ACE2. *Cells*, 9(12), pp.

Hobbs, E. C. and Reid, T. J. (2020). Animals and SARS-CoV-2: Species susceptibility and viral transmission in experimental and natural conditions, and the potential implications for community transmission. *Transbound Emerg Dis*, pp.

Houser, K. V.; Broadbent, A. J.; Gretebeck, L., *et al.* (2017). Enhanced inflammation in New Zealand white rabbits when MERS-CoV reinfection occurs in the absence of neutralizing antibody. *PLoS Pathog*, 13(8), pp. e1006565.

Huang, C.; Wang, Y.; Li, X., *et al.* (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223), pp. 497-506.

Hui, D. S.; Chan, M. C.; Wu, A. K., *et al.* (2004). Severe acute respiratory syndrome (SARS): epidemiology and clinical features. *Postgrad Med J*, 80(945), pp. 373-381.

Jiang, R. D.; Liu, M. Q.; Chen, Y., *et al.* (2020). Pathogenesis of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Cell*, 182(1), pp. 50-58 e58.

Jones, K. E.; Patel, N. G.; Levy, M. A., *et al.* (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), pp. 990-993.

Kahn, J. S. and McIntosh, K. (2005). History and recent advances in coronavirus discovery. *Pediatr Infect Dis J*, 24(11 Suppl), pp. S223-227, discussion S226.

Kim, Y. I.; Kim, S. G.; Kim, S. M., *et al.* (2020). Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host Microbe*, 27(5), pp. 704-709 e702.

Mahase, E. (2020). Coronavirus covid-19 has killed more people than SARS and MERS combined, despite lower case fatality rate. *BMJ*, 368pp. m641.

Malaiyan, J.; Arumugam, S.; Mohan, K., *et al.* (2021). 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*, 93(1), pp. 499-505.

Malik, Y. A. (2020). Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol*, 42(1), pp. 3-11.

Munster, V. J.; Feldmann, F.; Williamson, B. N., *et al.* (2020). Respiratory disease and virus shedding in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *bioRxiv*, pp.

OIE - World Organization For Animal Health. (2021a). COVID-19.[Online]. Available: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/emergency-and-resilience/covid-19/#ui-id-2>.

[Accessed junho de 2021]

OIE - World Organization For Animal Health. (2021b). COVID-19.[Online]. Available: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/emergency-and-resilience/covid-19/#ui-id-3>.

[Accessed agosto de 2021]

Petrosillo, N.; Viceconte, G.; Ergonul, O., *et al.* (2020). COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin Microbiol Infect*, 26(6), pp. 729-734.

Prescott, J.; Falzarano, D.; de Wit, E., *et al.* (2018). Pathogenicity and Viral Shedding of MERS-CoV in Immunocompromised Rhesus Macaques. *Front Immunol*, 9pp. 205.

Revzin, M. V.; Raza, S.; Warshawsky, R., *et al.* (2020). Multisystem Imaging Manifestations of COVID-19, Part 1: Viral Pathogenesis and Pulmonary and Vascular System Complications. *Radiographics*, 40(6), pp. 1574-1599.

Seyed Hosseini, E.; Riahi Kashani, N.; Nikzad, H., *et al.* (2020). The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. *Virology*, 551pp. 1-9.

Sia, S. F.; Yan, L. M.; Chin, A. W. H., *et al.* (2020). Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*, 583(7818), pp. 834-838.

Sikkema, R. S.; Farag, E.; Islam, M., *et al.* (2019). Global status of Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: a systematic review. *Epidemiol Infect*, 147pp. e84.

Singh, A.; Singh, R. S.; Sarma, P., *et al.* (2020). A Comprehensive Review of Animal Models for Coronaviruses: SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV. *Virol Sin*, 35(3), pp. 290-304.

Tao, X.; Garron, T.; Agrawal, A. S., *et al.* (2016). Characterization and Demonstration of the Value of a Lethal Mouse Model of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection and Disease. *J Virol*, 90(1), pp. 57-67.

Vergara-Alert, J.; Raj, V. S.; Munoz, M., *et al.* (2017). Middle East respiratory syndrome coronavirus experimental transmission using a pig model. *Transbound Emerg Dis*, 64(5), pp. 1342-1345.

Wang, H.; Li, X.; Li, T., *et al.* (2020). The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 39(9), pp. 1629-1635.

Wang, N.; Shi, X.; Jiang, L., *et al.* (2013). Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res*, 23(8), pp. 986-993.

WHO - World Health Organization. (2003). Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003.[Online]. Available: <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>. [Accessed junho de 2021]

WHO - World Health Organization. (2021a). WHO regional offices.[Online]. Available: <https://www.who.int/about/who-we-are/regional-offices>. [Accessed julho de 2021]

WHO - World Health Organization. (2021b). Coronavirus disease (COVID-19).[Online]. Available: https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1. [Accessed junho de 2021]

Woolsey, C.; Borisevich, V.; Prasad, A. N., *et al.* (2020). Establishment of an African green monkey model for COVID-19. *bioRxiv*, pp.

Xu, J.; Zhao, S.; Teng, T., *et al.* (2020). Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses*, 12(2), pp.

Yu, P.; Qi, F.; Xu, Y., *et al.* (2020). Age-related rhesus macaque models of COVID-19. *Animal Model Exp Med*, 3(1), pp. 93-97.

Zhao, J.; Li, K.; Wohlford-Lenane, C., *et al.* (2014). Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(13), pp. 4970-4975.