



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Daíse Damaris Carnietto de Hippólito Moretto

**Inibição *in vitro* do SARS-CoV-2 em células VERO
expostas ao vírus por β -glucana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Botucatu
2023

Daíse Damaris Carnietto de Hippólito
Moretto

Inibição *in vitro* do SARS-CoV-2 em células
VERO expostas ao vírus por β -glucana

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em Pesquisa e
Desenvolvimento (Biotecnologia
Médica).

Orientadora: Profa. Dra Rejane Maria Tommasini Grotto.

Botucatu
2023

M845i

Moretto, Daíse Damaris Carnietto de Hippólito

Inibição in vitro do SARS-CoV-2 em células VERO expostas ao vírus por -glucana / Daíse Damaris Carnietto de Hippólito Moretto. -- Botucatu, 2023

80 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientadora: Rejane Maria Tommasini Grotto

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. -glucana. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DAÍSE DAMARIS CARNIETTO DE HIPÓLITO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (BIOTECNOLOGIA MÉDICA), DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 13 dias do mês de novembro do ano de 2023, às 15:00 horas, no(a) Sala de reuniões 05 do Prédio da Administração da FMB/Unesp, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de DAÍSE DAMARIS CARNIETTO DE HIPÓLITO, intitulada **Inibição *in vitro* do SARS-CoV-2 em Células VERO (ATCC® CCL-81™) expostas ao vírus por β -glucana**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. FABIANA BARCELOS FURTADO (Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. ANGELO JOSÉ MAGRO (Participação Presencial) do(a) Depto de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. JAYME AUGUSTO DE SOUZA NETO (Participação Virtual) do(a) Kansas State University, Profa. Dra. MICHELE JANEGITZ ACORCI VALERIO (Participação Presencial) do(a) Universidade Paulista (UNIP). Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTO

Rejane Maria J. Grotto

Esta tese é dedicada aos meus pais, **Carlos (*in memorian*) e Nilva**, pilares da minha formação como ser humano e cujo empenho em me educar sempre veio em primeiro lugar. Aqui estão os resultados dos seus esforços. Com muita gratidão eu agradeço com todo o meu amor. Amo vocês!

Agradeço a minha orientadora **Profa. Dra Rejane Maria Tommasini Grotto**, por aceitar me orientar, por acreditar em mim e por transmitir seu conhecimento. Gratidão!!

Agradecimentos

A **DEUS**, que me carregou quando faltaram forças e sem Ele, não poderia estar aqui.

Ao meu marido, **Manuel** (Gal), por ser tão importante na minha vida. Obrigada por todo apoio, por sempre me incentivar a continuar e por torcer pelo meu sucesso profissional, me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Muito obrigada. Amo demais você! “Mas você - eu não posso e nem quero explicar, eu agradeço.” (Clarice Lispector)

Aos meus irmãos, **Daher e Dyogines**, sou muito feliz pela família que somos. “Quando não souberes para onde ir, olha para trás e saiba pelo menos de onde vens.

A gratidão é a memória do coração (Antístenes). Por isso venho aqui expressar meus sinceros agradecimentos, pois sem vocês meu objetivo seria difícil de alcançar ou até mesmo inatingível:

A minha amiga, **Nathalia Almeida Souza Tancler**, que trilhou comigo a trajetória do doutorado, por todos esses anos de amizade, pelo apoio e compreensão. Obrigada por festejar as minhas conquistas, pelos conselhos, por ouvir meus desabafos, pelos momentos de alegrias. Tenha a certeza de que você está no meu coração.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia Aplicada, em especial a **Heloysa, Leonardo, Fabiana e Lauana**, pelos ensinamentos e solidariedade.

Aos funcionários do Laboratório de Hemostasia e Hematologia do Hemocentro do HCFMB, pela ajuda e incentivo. Em especial a **Cristina**

Ferreira Ramos Rossetto, por me apoiar, acatando meus pedidos de folga para que eu pudesse cursar as disciplinas e claro deixando essa trajetória mais leve.

E às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, porventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio concedido, processo nº 2022/02261-5.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é
perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão
certas”. (Carl Sagan)

RESUMO

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de cadeia simples que pertence à família *Coronaviridae*, agente causador da COVID-19. Foi descrito, pela primeira vez, na cidade de Wuhan, na província de Hubei, na China, em dezembro de 2019, e desde então se disseminou pelo mundo, tornando-se uma pandemia global, levando a milhões de casos confirmados e óbitos. Até o momento somente medidas de prevenção que incluem lavar as mãos regularmente, usar máscaras, manter o distanciamento físico podem evitar a transmissão do vírus. A vacinação é uma abordagem importante para ajudar a prevenir a transmissão e limitar os impactos da doença. Devido à dificuldade de um tratamento para a COVID-19 severa, a busca por potenciais fármacos e ou suplementos alimentares que possam evitar a infecção e/ou a evolução dos quadros leves torna-se de suma importância. Diante desse cenário, este estudo teve como objetivo avaliar a possibilidade da atividade antiviral da β -glucana através de teste *in vitro* contra o vírus SARS-CoV-2. Foi realizado o teste de inibição *in vitro* do SARS-CoV-2, o qual consistiu em colocar a diluição da β -glucana não tóxica diretamente em contato com as células VERO (ATCC CCL-81TM) e o vírus SARS-CoV-2 sendo realizada avaliação qualitativa pelo exame macroscópico e microscópico das células. O efeito citopático do vírus foi avaliado

depois de 72 horas em microscópio invertido em aumento de 100X. Os resultados demonstraram que não houve ação inibitória direta da β -glucana, sobre o SARS-CoV-2, o que difere de achados prévios da literatura, sugerindo que a atuação da β -glucana na infecção por SARS-CoV-2 pode estar relacionada a diferentes dos aqui abordados. Novos estudos devem ser conduzidos concentrando-se na combinação de modelo *in vitro*, modelo animal e estudo clínico para alcançar para avaliar o provável mecanismo antiviral das β -glucanas.

Palavras- chave: COVID-19; SARS-CoV-2; β -glucana.

ABSTRACT

SARS-CoV-2 is a single-stranded RNA virus that belongs to the Coronaviridae family, the causative agent of COVID-19. It was first described in the city of Wuhan, Hubei province, China, in December 2019, and has since spread around the world, becoming a global pandemic, leading to millions of confirmed cases and deaths. So far, only prevention measures that include washing hands regularly, wearing masks, maintaining physical distancing can prevent the transmission of the virus. Vaccination is an important approach to help prevent transmission and limit the impacts of the disease. Due to the difficulty of a treatment for severe COVID-19, the search for potential drugs and/or food supplements that can prevent infection and/or the evolution of mild conditions becomes of paramount importance. *In view of this scenario, this study aimed to evaluate the possibility of the antiviral activity of β -glucan through in vitro testing against the SARS-CoV-2 virus. The in vitro SARS-CoV-2 inhibition test was performed, which consisted of placing the dilution of non-toxic β -glucan directly in contact with the VERO cells (ATCC CCL-81™) and the SARS-CoV-2 virus, and a qualitative evaluation was performed by macroscopic and microscopic examination of the cells. The cytopathic effect of the virus was evaluated after 72 hours under an inverted microscope at 100X magnification. The results showed that there was no direct inhibitory action of β -glucan on*

SARS-CoV-2, which differs from previous findings in the literature, suggesting that the action of β -glucan in SARS-CoV-2 infection may use indirect mechanisms other than direct binding to the virus, inhibiting its cytopathic effect. Further studies should be conducted focusing on the combination of in vitro model, animal model, and human study to achieve to evaluate the probable antiviral effect of β -glucans.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; β -glucan.

LISTA DE ABREVIÇÃO E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

atm- Pressão Atmosférica

Células NK - Células Natural Killer

CO₂ - Dióxido De Carbono

DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos

DMEM - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

ECA2 - Enzima Conversora De Angiotensina 2

FLU- Vírus Influenza

g- gramas

HCl - Ácido Clorídrico

IFN - Interferon

IL - Interleucina

Kb – Quilobyte

MERS-CoV - coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio

Min – Minutos

mL- mililitros

NaCl - Cloreto De Sódio

°C - Grau Celsius

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF – Do inglês open reading frames: são definidos como extensões de sequência de DNA entre os códons inicial e de parada.

PAMPs- Padrões Moleculares Associados A Patógenos

PRRs - Receptores De Reconhecimento De Padrões

RNA - Ácido Ribonucleico

RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa

S. cerevisiae - *Saccharomyces cerevisiae*

SARS-CoV-2 - Síndrome respiratória aguda grave de coronavírus 2

SFB - Soro Fetal Bovino

SRAG - Síndrome Respiratória Aguda Grave

TNF- α - Fator De Necrose Tumoral- α

TRIM - Indução Da Imunidade Treinada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação dos coronavírus humanos.....	24
Figura 2 A e B - Representação esquemática do SARS-CoV-2.....	28
Figura 3 : Infiltração do SARS-CoV-2 na célula do hospedeiro, mediada pela proteína S.....	29
Figura 4 : Resultado dos métodos diagnósticos nos estágios da infecção por SARS-CoV-2.....	33
Figura 5 : Apresentação β -glucana comercial insolúvel.....	42
Figura 6-A : Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando alterações morfológicas devido ao efeito tóxico na diluição 1:2 de β -glucana (100 X).....	48
Figura 6-B : Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando alterações morfológicas devido ao efeito tóxico na diluição 1:4 de β -glucana (100 X).....	48
Figura 6-C : Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando alterações morfológicas devido ao efeito tóxico na diluição 1:8 (100 X).....	49
Figura 6-D : Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando alterações morfológicas devido ao efeito tóxico na diluição 1:16 de β -glucana (100 X).....	49
Figura 6-E : Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando células normais na diluição 1:32 de β - glucana (100 X)	50
Figura 6-F : Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando células normais do controle negativo (100 X).....	50
Figura 7 : Esquema representativo da placa com as amostras e controles para o teste de inibição in vitro do SARS-CoV 2.....	51
Figura 8 : A - controle negativo – célula VERO (ATCC CCL-81™) + β -glucana; B – Controle positivo – célula VERO (ATCC CCL-81™) + 1:10 vírus SARS-CoV-2; C – Célula VERO (ATCC CCL-81™) + 10^{-6} de vírus	

SARS-CoV-2 + 1:32 β-glucana, D – Controle positivo: – Célula VERO
(ATCC CCL-81™) + 10⁻⁶ de vírus SARS-CoV-2.....52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. LEVANTAMENTO TEÓRICO	21
2.1 Coronavírus e síndromes respiratórias agudas	21
2.2 SARS-CoV-2, infecção celular e reprodução	23
2.3 Transmissão e manifestação clínica	30
2.4 Diagnóstico da COVID-19	31
2.5 Resposta Imune	33
2.6 Medicamentos, tratamentos e vacinas para a COVID-19	36
2.7 Uso de produtos naturais para prevenir ou tratar doenças	38
2.8 β -glucana	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Substância teste	42
4.2 Solubilização da fração glucana (insolúvel)	42
4.3 Cultivo de célula VERO (ATCC® CCL-81™)	43
4.4 Cepa Vírus SARS-CoV-2 Standart	43
4.5 Teste de citotoxicidade	44
4.6 Teste de inibição in vitro do SARS-CoV-2	45
5. RESULTADOS	47
5.1 Teste de citotoxicidade	47
5.2 Teste de inibição in vitro do SARS-CoV-2	51
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	65
8. PROCESSO GERADO NESTE TRABALHO	65
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

INTRODUÇÃO

O Brasil e o mundo, no começo de 2020, enfrentaram uma grande pandemia da história, que levou o planeta a uma crise sanitária e humanitária (ZHU et al., 2020). A última vez em que houve uma pandemia nas proporções da atual foi em 1918-1920, a Gripe Espanhola, cujo agente etiológico foi o vírus Influenza (FLU) (TAUBENBERGER; MORENS, 2006).

A COVID-19 se espalhou pelo mundo após surgirem os primeiros casos na cidade de Wuhan, capital da província de Hubei na China, em dezembro de 2019 (CHAN et al., 2020). Até novembro 2023, foram confirmados 771.820.937 casos e relatadas 6.978.175 mortes (WHO,2023).

O patógeno provoca sintomas semelhantes ao coronavírus SARS-CoV (síndrome respiratória aguda grave) causador da epidemia de 2002-2003. O novo coronavírus foi, então, denominado SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave 2), responsável por uma variedade de sintomas relacionados principalmente ao trato respiratório (GRALINSKI e MENACHERY, 2020; ZHU et al., 2020; HU et al., 2021; HOJYO et al., 2020).

Devido ao seu alto poder de contágio e transmissibilidade, a doença se disseminou rapidamente, tomando proporções globais, passando a ser declarada situação de pandemia e emergência sanitária internacional em março de 2020 pela Organização Mundial da Saúde

(OMS) (RUDBERG et. al, 2020).

A COVID-19 é uma doença letal podendo desencadear uma resposta inflamatória local e sistêmica exacerbada com tempestade de citocinas que lesionam os tecidos pulmonares, prejudicando a hematose, contribuindo para características patológicas prejudiciais, e levando como consequência ao desenvolvimento da síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e a complicações letais (GRALINSKI & MENACHERY, 2020; ZHU et al., 2020; HU et al., 2021; HOJYO et al., 2020).

Devido à dificuldade de um tratamento para a COVID-19 severa, a busca por potenciais fármacos e ou suplementos alimentares que possam evitar a infecção e/ou a evolução dos quadros leves torna-se de suma importância. Para tanto, o entendimento do vírus, bem como de suas propriedades biológicas e interações com o hospedeiro, vem se tornando de grande importância devido às consequências graves que a infecção pode trazer.

Considerando este contexto, este estudo realizou o teste *in vitro* da β -glucana, em apresentação comercial já liberada para comercialização pelas agências regulatórias, para avaliar a possibilidade da atividade inibitória e/ou redução da atividade citopática do vírus SARS-CoV-2 sobre as células.

1. Levantamento Teórico

2.1 Coronavírus e síndromes respiratórias agudas

Diferentes tipos de vírus e bactérias podem infectar o trato respiratório e causar desde resfriados até doenças mais complexas, como pneumonia. Uma das famílias virais responsáveis por ocasionar uma das principais síndromes respiratórias agudas é a dos coronavírus (CoV) (ROGIER VAN DOORN E HONGJIE, 2020).

Existem muitos coronavírus diferentes, sendo que a maioria deles causam doenças em animais. No entanto, sete coronavírus humanos já foram identificados: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, SARS-COV (que causa síndrome respiratória aguda grave), MERS-COV (que causa síndrome respiratória do Oriente Médio) e o, mais recente, SARS-CoV-2. Esse novo coronavírus é responsável por causar a doença COVID-19 (OMS, 2023). Os três que podem gerar infecções graves e provocaram grandes problemas de saúde pública, foram o SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, onde este último foi o agente causador da pandemia de dimensões mundiais (TESINI, 2020).

Os três CoVs que podem gerar infecções graves, apresentam semelhanças filogenéticas e compartilham a capacidade de codificar proteínas não estruturais como a protease 3 do tipo quimi tripsina, a protease do tipo papaína, a helicase e a RNA polimerase dependente de RNA. Todas essas proteínas não estruturais são enzimas imprescindíveis para a replicação viral e altamente conservadas entre os CoV de

importância médica. (PRAJAPAT et al., 2020; LI e DE CLERCQ, 2020; MORSE et al., 2020)

Antes de 2002, as infecções causadas pelos coronavírus em humanos eram conhecidas como infecções respiratórias brandas e quadros semelhantes ao resfriado comum, sem grande relevância para a saúde pública. Já no século XXI ocorreu a disseminação principalmente na China e Oriente Médio de dois coronavírus anteriormente não reconhecidos, o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), respectivamente, ambos altamente patogênicos (ROTA et al., 2003).

O SARS-CoV, em 2002, causou um surto de síndrome respiratória aguda grave, associada à pneumonia, falência respiratória e óbitos na província de Guangdong, na China, sendo a primeira epidemia de coronavírus de relevância para saúde pública (GUAN et al., 2003). No entanto, foi rapidamente controlada e somente alguns países como China, Canadá e EUA foram afetados pelo vírus (SCHWARTZ DA, GRAHAM AL, 2020). Esse surto resultou em uma média de 8000 casos e mais de 800 mortes. A emergência do SARS-CoV foi associada a mutações identificadas em um coronavírus de morcego, o reservatório natural da maioria dos coronavírus (CORMAN et al., 2018; LI et al., 2005).

Uma década depois, em junho de 2012, foi detectado pela primeira vez na Jordânia e na Arábia Saudita, outro coronavírus altamente

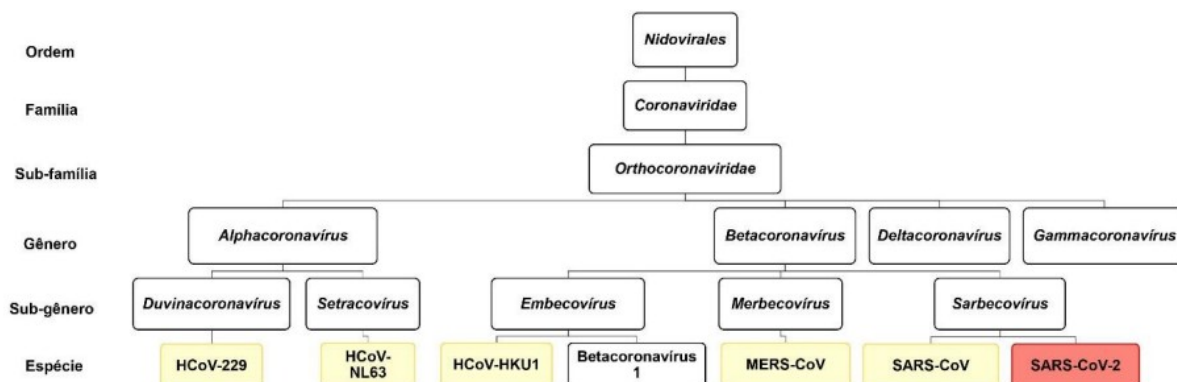
patogênico, o MERS-CoV. Em 31 de julho de 2019, 2458 casos de MERS foram confirmados laboratorialmente e relatados à OMS, destes, 848 evoluíram para óbito (34% de mortalidade) (WHO, 2019). Aproximadamente 80% dos casos humanos foram relatados pela Arábia Saudita, entretanto 27 países relataram casos de MERS (WHO, 2018).

Já o SARS-CoV-2 é um coronavírus novo, que foi identificado pela primeira vez em Wuhan, China, no final 2019, como a causa da doença por coronavírus de 2019 (COVID-19) e se disseminou por todo o mundo. As primeiras infecções pelo SARS-CoV 2 foram relacionadas a um mercado de animais vivos em Wuhan, China, sugerindo que o vírus foi transmitido por animais que estavam sendo vendidos como alimentos exóticos para os seres humanos (YEE et al., 2020; LAN et al., 2020)

2.2 SARS-COV-2, infecção celular e reprodução

O SARS-CoV-2 é um vírus pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, subfamília *Orthocoronavirinae*, família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*, reino *Riboviria*. (GORBALENYA et al., 2020, ICTV,2022) (figura 1).

Figura 1 – Esquema representativo da classificação dos coronavírus humanos.



Fonte: ICTV- International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 15 de dezembro de 2022

Os coronavírus são capazes de infectar humanos e uma variedade de hospedeiros, incluindo morcegos, camundongos, cães, ratos, suínos, felinos, cetáceos, bovinos e aves, causando doenças respiratórias, hepáticas, entéricas e do sistema nervoso central (Quadro 1). De acordo com as relações genéticas e filogenéticas entre seus membros, esta subfamília é dividida em quatro variantes: alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ). Os membros das variantes α e β infectam mamíferos, ao passo que os membros das variantes γ e δ infectam principalmente pássaros e, adicionalmente, alguns mamíferos. Atualmente, os CoVs que infectam humanos e causam infecções respiratórias são dois α -CoVs (229E e NL63), causadores de infecção respiratória leve e dois β -CoVs (OC43 e HKU1), responsáveis por quadros mais brandos de infecção respiratória (CUI, LI & SHUI, 2019).

Todos os CoVs são vírus envelopados, com genoma composto por uma molécula de RNA de fita simples, não segmentado, de polaridade positiva, com as seguintes proteínas estruturais principais: proteína de envelope (proteína E), proteína de membrana (proteína M), proteína de nucleocapsídeo (proteína N) e espícula (proteína S, do inglês *spike*), responsáveis pela infectividade viral (Figura 2 A) (CHOUDHURY et al., 2020, SAGHAZADEH et al., 2020; SHUO et al., 2016). A proteína S, presente na superfície do SARS-CoV-2 um fator importante para a infectividade viral, pois é essencial para a interação do vírus com os receptores humanos, principalmente a proteína ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2), relatada como o principal receptor para o vírus nas células hospedeiras (HOFFMANN et al., 2020).

A alta frequência de mutações somadas à elevada taxa de recombinação, aliada ao tamanho do genoma, promove plasticidade extra à família *Coronaviridae*, o que pode culminar na capacidade de adaptação em novos hospedeiros e nichos ecológicos (WOO et al., 2006; WOO et al 2009).

Quadro 1: Características gerais dos coronavírus contendo a descrição dos grupos de coronavírus atuais, hospedeiros, doenças decorrentes, receptores virais, vias de transmissão e distribuição geográfica.

Gênero de Coronavírus	Vírus	Hospedeiro	Tropismo tecidual	Receptor celular	Doença(s) associadas	Via de transmissão	Distribuição geográfica
Alfacoronavírus	HCoV-229E	Humano	Trato respiratório	APN	Infecção respiratória branda (resfriado comum)	Aerosol	Mundial
Alfacoronavírus	HCoV-NL63	Humano	Trato respiratório	ACE2	Infecção respiratória branda, croup	Aerosol	Mundial
Alfacoronavírus	TGEV	Suínos domésticos e selvagens	Epitélio do Trato respiratório e entérico	APN	Infecção respiratória e entérica	Fecal-Oral	Mundial
Alfacoronavírus	FIPV	Felinos domésticos e selvagens	Peritонеo, fígado, órgãos linfóides	APN	Peritonite infecciosa felina	Fecal-Oral	Mundial
Alfacoronavírus	BatCoV	Morcegos	?	?	?	?	Mundial
Alfacoronavírus	PEDV	Suíno	Epitélio entérico e respiratório	?	Infecção respiratória e entérica	?	Europa, Ásia
Betacoronavírus	HCoV-OC43	Humano	Trato respiratório superior	9-O- ácido siálico acetilado	Infecção respiratória	Aerosol	Mundial
Betacoronavírus	HCoV-HKU1	Humano	Trato respiratório superior e inferior	?	Infecção respiratória	Aerosol	Mundial
Betacoronavírus	BCoV	Bovinos	Intestino	9-O- ácido siálico acetilado	Infecção entérica	Fecal-Oral	Mundial
Betacoronavírus	MHV	Camundongos	Intestino, fígado, Sistema Nervoso Central	CEACAM	Infecção entérica e neurológica, hepatite	Fecal-Oral	Cobaías de laboratório
Betacoronavírus	SARS	Humano	Trato respiratório	ACE2	Síndrome respiratória aguda grave	Aerosol	Mundial
Betacoronavírus	BatCoV	Morcegos	?	?	?	?	Mundial
Gamacoronavírus	IBV	Galinhas	Epitélio respiratório, Rim	?	Infecção respiratória, hepatite	Aerosol	Mundial
Gamacoronavírus	TCoV	Perus	Jejuno, duodeno, íleo	?	Infecção respiratória e entérica	Fecal-Oral	EUA
Gamacoronavírus	BWCoV-SW1	Baleia Beluga	Fígado ?	?	Infecção respiratória e hepática?	?	Animal em cativeiro
Deltacoronavírus	ALCoV	Leopardo asiático e Ferret chinês	?	?	?	Fecal-Oral ?	?
Deltacoronavírus	MuCoV	Munia (Passeriforme)	?	?	?	?	?

Fonte: LAI et al. 2007, Modificado GÓES et al., 2012

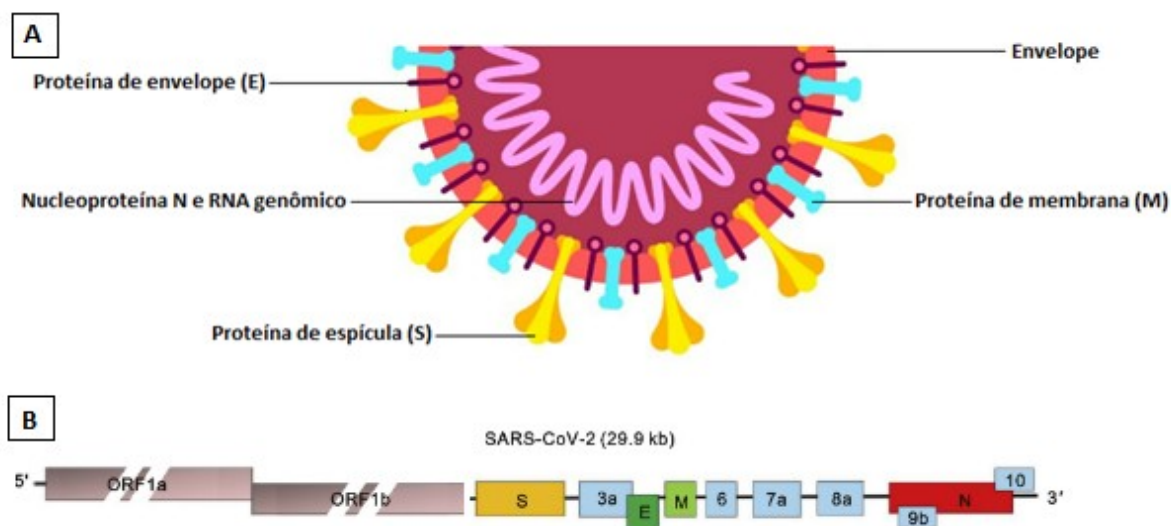
O genoma do SARS-CoV-2 possui aproximadamente 30kb, sendo considerado o maior genoma de RNA de ocorrência natural conhecido atualmente. Pelo menos dois terços do genoma viral estão contidos em regiões abertas de leituras (ORF), ORF1a e ORF1b, que codificam 16

proteínas não estruturais que estão envolvidas na transcrição e replicação do genoma do vírus, como a RNA polimerase dependente de RNA. As ORFs restantes codificam as proteínas estruturais *spike* (S), de envelope (E), de membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N), além de várias proteínas acessórias (Figura 2 B) (RANDO et al., 2021 e JAIN et al., 2020).

A estrutura proteica S é composta por duas subunidades funcionais: S1 e S2. A ligação ao receptor da célula hospedeira é feita pela subunidade S1, enquanto a subunidade S2 é responsável pela fusão das membranas virais e celulares. A enzima conversora de angiotensina 2 foi identificada como um receptor funcional para SARS-CoV-2 (CHEN et al., 2020; WALLS et al., 2020).

As pandemias originárias de zoonoses nada mais são que um reflexo das intervenções do homem no meio ambiente. No anseio para se expandir, a humanidade invade o habitat natural dos animais, abrindo caminho para essas doenças. A ligação do vírus com os receptores de células hospedeiras é um determinante significativo para a patogênese da infecção. O SARS-CoV provavelmente se originou em morcegos (GE et al. 2013) e se adaptou através das mutações para sobreviver no meio ambiente, à medida que cruzava espécie infectante animal, passando infectar a espécie humana (Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium, 2004).

Figura 2: (A) Representação esquemática do SARS-CoV-2, evidenciando suas proteínas e **(B)**, esquema representativo do genoma viral com as principais ORFs.

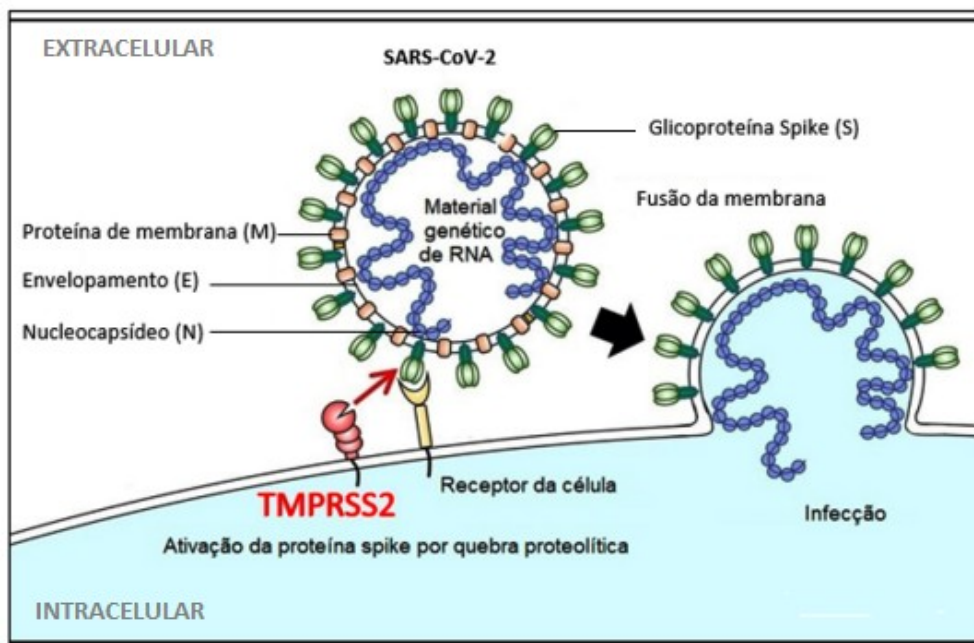


Fonte: (A) Adaptado de ELTAYEB L. B. (2020); (B) Adaptado de LI et al. (2020)

Uma característica excepcional do SARS-CoV-2 é a presença de um sítio de clivagem por proteases tipo-furina na sua proteína S, diferenciando-o do SARS-CoV (COUTARD et al., 2020). O tropismo celular amplo do SARS-CoV-2 observado em órgãos vitais, como pulmão, coração, rins, intestino delgado, pâncreas, vasos sanguíneos e bexiga, é devido à expressão aumentada da ECA2, visto que essas proteínas apresentam expressão celular e tecidual generalizada e/ou decorrente da alta taxa de recombinação consequente do mecanismo único de sua replicação (LIU et al, 2021, WOO et al., 2012, ZOU et al., 2020). Devido a

esse sítio de ligação, muitos órgãos se tornem susceptível à infiltração do vírus em suas estruturas celulares (Figura 3).

Figura 3: Infiltração do SARS-CoV-2 na célula do hospedeiro, mediada pela proteína S.



Fonte: Adaptado de INOUE & YAMAMOTO, 2020.

O ciclo viral ocorre após entrada celular bem-sucedida, seguida da replicação do genoma viral e a expressão de sequências específicas que resultam na produção de proteínas acessórias, promovendo a adaptação do vírus à estrutura celular do ser humano (SHEERVALILOU et al., 2020). As fases do ciclo de vida do vírus no organismo humano são: adsorção, penetração, biossíntese, maturação e liberação. A adsorção é quando o vírus se liga aos receptores do hospedeiro e posteriormente ocorre a penetração nas células através de endocitose ou fusão da membrana.

Após a liberação do conteúdo viral dentro das células hospedeiras, o RNA viral infiltra o núcleo para replicação. Através do RNAm viral ocorre a produção de proteínas virais pelo processo de biossíntese. Então, novas partículas virais são produzidas e liberadas no organismo humano (YUKI et al., 2020).

2.3 Transmissão e manifestação clínica

O SARS-CoV-2 se dissemina principalmente por gotículas, secreções respiratórias e contato direto com a pessoa infectada, principalmente entre membros familiares, entre os quais existe maior contato próximo e por tempo prolongado (FAN et al, 2020). Embora a transmissão direta seja reconhecida como um dos principais mecanismos de disseminação, a transmissão indireta pode acontecer por meio de superfícies contaminadas, quando um indivíduo entra em contato com uma superfície infectada e, em seguida, toca os próprios olhos, nariz ou boca, contribuindo para a perpetuação do vírus (VAN DOREMALEN et al., 2020).

Após a entrada do vírus na célula, inicia-se o processo de replicação viral, que culmina com a formação de novas partículas e o período de incubação é em média de 7 dias, com relatos em alguns estudos de até 21 dias. Após este período, os indivíduos podem permanecer assintomáticos ou apresentar um quadro clínico majoritariamente leve. Contudo, nos casos mais graves, a demora para o

desfecho da doença pode implicar em uma internação prolongada em média de 14 a 21 dias (JIN et al., 2020; FUNG et al., 2020).

Os sinais e sintomas da COVID-19 são bastante variáveis, incluindo febre, tosse, dor de garganta, falta de ar, fadiga e mal-estar, como mencionado por SINGHAL, em 2020, embora manifestações gastrintestinais, perda do paladar e do olfato têm sido descritas e relacionadas à COVID-19, conforme registrado por GU e por GAUTIER e seus colaboradores, em 2020. Existem ainda os indivíduos assintomáticos, caracterizando a diversidade de quadro clínico que tem sido observada na pandemia da COVID-19. Essa ausência de sintomas pode ser considerada um grande problema em nível epidemiológico, constituindo fontes de transmissão viral em potencial, pois, por não apresentarem sintomas os indivíduos assintomáticos não são isolados dos demais, intensificando a disseminação viral (BAI et al., 2020; ROTHE et al., 2020).

2.4 Diagnóstico da COVID-19

Por ser um problema de saúde pública e de extrema relevância para a sociedade, com a emergência do novo SARS-CoV-2, os laboratórios necessitaram se adequar na mesma velocidade da pandemia para atender com segurança à crescente demanda por testes diagnósticos, tornando-se peça-chave no diagnóstico da doença.

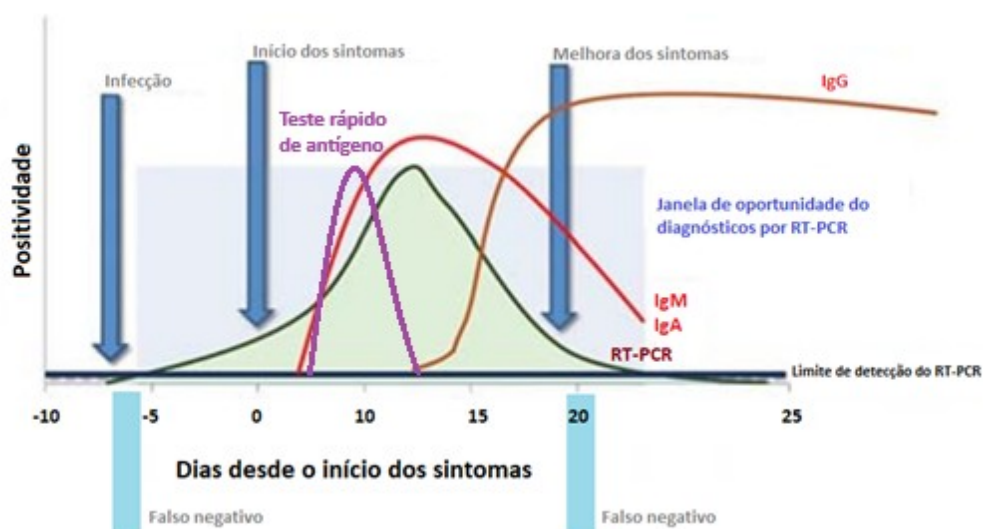
Da mesma forma, a medicina laboratorial contribui efetivamente na

vigilância epidemiológica da COVID-19, seja através do rastreamento de casos assintomáticos, definição do prognóstico da doença, no acompanhamento da evolução dos pacientes, no monitoramento terapêutico, no diagnóstico clínico, bem como em situações de prevenção e contenção da pandemia (GOUDOURIS, 2021; LAI&LAM, 2021).

A infecção por SARS-CoV-2, de acordo com a evolução dos sintomas, pode ser apresentada em três estágios, favorecendo a utilização de diferentes métodos de diagnóstico, como mostra a Figura 4. No primeiro estágio, ocorre a fase assintomática com ou sem vírus detectável. Já no segundo estágio, observa-se um período sintomático não grave e com a presença de vírus, enquanto no último estágio, a carga viral é elevada e o paciente apresenta sintomas respiratórios graves. (LIPPI et al., 2020)

O teste padrão-ouro para o diagnóstico da COVID-19 é a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR). Além desse, para auxiliar no diagnóstico, a partir da segunda semana, pode-se solicitar testes sorológicos. Já os exames laboratoriais como hemograma completo, proteína C reativa, dímero-D, teste de coagulação, lactato desidrogenase, ferritina e procalcitonina são exames que auxiliam a clínica bem como o prognóstico do paciente. Esses testes devem ser precisos e robustos para garantir eficácia no controle e tratamento da infecção (GOUDOURIS, 2021).

Figura 4: Resultado dos métodos diagnósticos nos estágios da infecção por SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado LIPPI et al., 2020.

2.5 Resposta Imune

As células do sistema imune fazem parte da defesa do organismo humano contra patógenos. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro, seus componentes funcionam como sentinelas e que reconhecem estruturas químicas dos microrganismos, ativando células capazes de bloquear a infecção usando diferentes receptores de reconhecimento para detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), os quais são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), e se comunicam por meio de citocinas e contato direto com outras células (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; ZINDEL et al., 2020, TAY et

al., 2020).

O sistema imune inato gera uma resposta rápida, inespecífica e é a primeira linha de defesa que pode contribuir diretamente PARA A resposta inflamatória via fagocitose e secreção de moléculas biologicamente ativas. É um sistema que reconhece microrganismos, distingue tecidos próprios de patógenos e, posteriormente, elimina os invasores. (TAY et al., 2020; LI et al., 2020)

O sistema imune adaptativo, por sua vez, é composto principalmente por linfócitos T e B e seus mediadores, como citocinas e anticorpos e é conhecido por sua especificidade a antígenos de resposta lenta, maior memória imunológica e baixa proporção de células circulantes responsivas. A resposta imune adaptativa aumenta em magnitude e capacidade defensiva a cada exposição sucessiva a um antígeno específico (NETEA et al., 2020).

A resposta imune do hospedeiro é essencial para o controle da infecção viral nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, mas também pode ocorrer a resposta imune exacerbada, que pode contribuir para a fisiopatologia da doença. Portanto, a resposta imunológica eficaz contra o SARS-CoV-2 envolve as células dendríticas ou de Langerhans, células *Natural Killer* (NK) da imunidade inata e, no que se refere à imunidade adquirida, linfócitos B e T. Porém, ao contrário do que se observa na maioria das respostas antivirais, os pacientes com COVID-19, principalmente os casos com quadros mais graves, apresentam

alterações na resposta imunológica, como altas concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, linfopenia e neutrofilia, o que leva à uma alta relação neutrófilos/linfócitos, considerado um marcador de prognóstico da doença (LIU et al., 2020; SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020, DIAO et al., 2020).

No início da infecção por SAR-CoV-2, ocorre um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL)-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferons (IFN) α e β . Essa superprodução e expressão de citocinas causam danos sistêmicos, sendo correlacionadas com a gravidade da infecção. Por outro lado, o aumento de citocinas pode atuar como sinalização adaptativa na resposta contra o SARS-CoV-2 (HU et al., 2021; PONTELLI 2020; ZHENG et al., 2020; MAJANO et al 2004; PROMPETCHARA et al., 2020).

Na COVID-19, evidências e hipóteses têm sido levantadas de que seriam justamente o padrão e a intensidade da resposta imune inata dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 um dos principais determinantes do desfecho e prognóstico da doença (MATRICARDI et al., 2020). Portanto, a intensa resposta imune a nível sistêmico leva ao dano endotelial, hipercoagulabilidade, com a formação de microtrombos, resultando em complicações como embolia pulmonar e infarto do miocárdio, além do desenvolvimento da sepse viral, que contribui para a falência de múltiplos órgãos, ocasionando óbito do paciente (GUPTA et al., 2020; KLOK et al., 2020; TANG et al., 2020).

2.6 Medicamentos, tratamentos e vacinas para a COVID-19

A pandemia impôs grandes desafios a todas as nações e povos do mundo, a comunidade científica correu contra o tempo e respondeu de forma rápida e eficiente em várias esferas prioritárias, como no desenvolvimento de tratamentos, vacinas, diagnósticos, entre outros, apoiada em conhecimento e inovação (FERREIRA e ANDRICOPULO, 2020).

Atualmente, vários estudos estão sendo feitos a fim de desenvolver e encontrar tratamento com produtos naturais, drogas e medicamentos já desenvolvidos e comercializados no mercado (PANG et al., 2020).

Apesar dos esforços dos pesquisadores científicos em todo o mundo, o desenvolvimento de novos medicamentos é um processo complexo e os resultados levam tempo para aparecer. Um longo caminho foi percorrido na busca do reposicionamento de fármacos para a Covid-19, e alguns medicamentos foram eficazes contra o SARS-CoV-2. Na tabela 1, é possível observar os antivirais e anticorpo monoclonal investigados para o tratamento de COVID-19, bem como sua ação e via de administração.

Com a divulgação da sequência genética do vírus e sua alta transmissibilidade, foi desencadeada uma intensa pesquisa para o rápido desenvolvimento das vacinas, o que representou um importante avanço na ciência e na saúde pública (SANTOS et al., 2021)

Tabela 1: Antivirais e anticorpo monoclonal investigados para o tratamento de COVID-19 em ensaios clínicos ou estudos *in vitro*.

Droga	Ação	Via de administração
Remdesivir	Inibidor da RNA polimerase viral/ síntese de RNA (HOFFMANN, C.,2020)	Intravenosa
Favipiravir	Inibidor da RNA polimerase viral/ síntese de RNA (HOFFMANN, C.,2020)	Oral
Paxlovid	Inibidor da replicação viral (HAMMOND, J; et al. 2022)	Oral
Tocilizumabe	Inibidor da proteína interleucina IL-6, ação imunossupressora sobre o sistema imunológico (PELAIA, C; et al., 2021	Intravenosa e subcutânea
Lopinavir/ritonavir	Inibidor de protease (HOFFMANN, C.,2020)	Oral

Modificado de “Hoffmann C. Treatment. In: Kamps BS, Hoffmann C, eds.

Referência Covid, Edição 2020-2. Disponível em: www.covidreference.com

As vacinas desenvolvidas contra COVID-19 podem ser classificadas como: de 1ª geração, com vírus inativado ou atenuado, como a CoronaVac/SinoVac, Bharat Biotech e Sinopharm; de 2ª geração, com o uso de vetor viral com tecnologia recombinante, como a AstraZeneca/Oxford, Janssen/Johnson&Johnson e Sputnik V; e as de 3ª geração, que são vacinas com ácidos nucleicos DNA e RNA, como Pfizer/BioNTech e Moderna (ALMEIDA et al., 2021).

No Brasil, as vacinas contra a doença que receberam autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uso foram: Vacina adsorvida Covid-19 (inativada) CoronaVac (Butantan), a Vacina Covid-19-RNA Comirnaty (Pfizer/Wyeth), a Vacina Covid-19-recombinante Oxford/Covishield (Fiocruz e Astrazeneca) e a Vacina Covid-19-recombinante Janssen Vaccine (Janssen-Cilag), Sputnik V, Bivalente (Moderna), Spikevax bivalente (Moderna) (ANVISA, 2021; ANVISA, 2023).

2.7 Uso de produtos naturais para prevenir ou tratar doenças

Ao longo da história humana, os produtos naturais têm sido muito demandados para a prevenção e tratamento de doenças. Nesse sentido, as β -glucanas oriundas de fungos, leveduras e algas são modificadores de resposta biológica bem conhecidos que atuam como imunoestimulantes contra doenças infecciosas e por aumentar a resistência do hospedeiro a doenças virais (BORCHERS et al., 1999; BORCHERS et al., 2004; WILLIAMS e DI LUZIO, 1980; MORADALI et al., 2007).

As β -glucanas purificadas mantêm sua bioatividade, o que torna possível caracterizar seu funcionamento a nível celular e molecular. Esse composto tem ação na melhora e ativação do sistema imunológico, estimulando linfócitos, células NK e macrófagos, melhorando a produção de citocinas e estimulando a apoptose (ZHENG et al., 2018; GAO E

ZHOU, 2002).

2.8 β - Glucana

β -glucanas são um grupo heterogêneo de polissacarídeos constituintes estruturais e funcionais da parede celular de leveduras, fungos, algas, bactérias e alguns grãos. Apresentam diferentes esqueletos que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (WOOD et al., 1994, BROWN; GORDON, 2003).

β -glucanas que consistem em uma espinha dorsal de D-glicose com ligações beta (1,3) e cadeia ramificadas através de ligações beta (1,6) são classificados como modificadores de resposta biológica e são conhecidos por terem propriedades imunogênicas. A maioria dessas β -glucanas imunogênicas são purificadas de fungos e leveduras (KATAOKA et al., 2002).

Uma importante fonte de β -glucana é a parede celular de *S. cerevisiae*, também conhecida como levedura de fermentação, que é vastamente empregada nas indústrias de panificação, cervejaria e sucroalcooleira. Pode ser usado como suplemento alimentar, imunoestimulante e como agente espessante, devido ao seu alto teor de fibras e características funcionais (DIJKGRAAF et al., 2002).

Em *S. cerevisiae*, a β -glucana é constituída por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição (1-3), com cadeias

laterais unidas em (1-6), que ocorrem em diferentes intervalos e têm tamanhos variados (AIMANIANDA, 2009).

Ensaio clínico têm demonstrado que β -glucana com ligações glicosídicas nas posições 1,3 e 1,6 originadas de leveduras são mais eficazes na ativação do sistema imunológico e que os macrófagos apresentam receptores específicos para a molécula de β -glucana. Estes receptores foram também encontrados em outras células do sistema imune, como os neutrófilos e as células NK (VETVICKA et al, 1997, COUSO et al 2001).

O mecanismo de ação das β -glucanas parece estar relacionado ao peso molecular, tipo de ligações glicosídicas, resíduos presentes, solubilidade em água, conformação espacial e grau de polimerização (WILLIAMSON et al., 1992).

O maior obstáculo para a utilização de β -glucana é a sua insolubilidade em meio aquoso. A extração química de glucanas pode ser realizada por tratamento com base, com ácido e a quente. Ainda não existem estudos que correlacionem o uso da β -glucana nas infecções por SARS-CoV-2. Há uma carência de estudos preliminares que evidenciem seu benefício como adjuvante no tratamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se β -glucana com ligações beta (1,3) de glicose e cadeia ramificadas através de ligações beta (1,6) comercial é capaz de minimizar e/ou inibir a interação com SARS-CoV-2 *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substância teste

Foi utilizada β -glucana comercial insolúvel (Produto Industrial sob sigilo), em parceria com uma empresa (sob sigilo). Essa β -glucana é obtida a partir da parede celular de leveduras *S. cerevisiae*. Trata-se de um pó fino, sem aglomerações, de boa fluidez, de coloração bege a marrom clara e odor característico (Figura 5).

Figura 5: Apresentação da β -glucana comercial insolúvel.



Fonte: L&P Foods. **Produtos**. Disponível em: https://pt.lpfoodswy.com/oat-beta-glucan-70-from-oat-bran_p20.html. Acesso em: 10 de janeiro de 2023

4.2 Solubilização da fração glucana (insolúvel)

A solubilização foi feita de acordo com o protocolo cedido pela

empresa parceira que já utiliza esse processo: 29g de β -glucana foram adicionados em 500 mL de água deionizada sob agitação magnética seguida de adição 20mL de HCl (2M), permanecendo em agitação por 20horas. Em seguida, adicionou-se 11,5g de NaCl com agitação até a dissolução do sal. A solução foi pasteurizada a 80°C por 30 min. Para os experimentos foi utilizado o sobrenadante dessa solução.

4.3 Cultivo de célula VERO (ATCC® CCL-81™)

As células da linhagem normais epiteliais obtidas de rim de macacos verdes africanos, células VERO (ATCC® CCL-81™) utilizadas no isolamento viral foram cultivadas como monocamadas com confluência de 90% ou mais, em frascos, colocadas a 37 °C e 5% atm de dióxido de carbono (CO₂) com solução DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) - Sigma®, suplementado com 10% de soro fetal bovino- (SFB – Nova Biotecnologia®) e com adição de 1% de antimicótico e antibiótico – (solução de Penicilina Estreptomicina - anfotericina B – Nova Biotecnologia®) .

4.4 Cepa Vírus SARS-CoV-2 Standard

A cepa utilizada foi a SARS-CoV-2 standard B.1.1.28 que faz parte do repositório do Laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Foi realizado teste de

quantificação viral por ensaio de placa e para verificação da viabilidade viral.

4.5 Teste de citotoxicidade

Neste estudo, foi utilizada a linhagem celular VERO (ATCC CCL-81TM), células da linhagem normais epiteliais obtidas de rim de macacos verdes africanos. Esta linhagem foi cultivada em solução DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) - Sigma® suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Nova Biotecnologia®) e mantidas a 37 °C. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando-se 5ml de tripsina a 0,25% (Sigma®), com incubação a 37°C por 4 min. Em seguida, foi adicionado novo meio e suspensão celular foi semeada em placa de 96 poços.

Este teste de citotoxicidade consistiu em colocar o material teste diretamente em contato com a cultura de células e realizada a avaliação qualitativa pelo exame microscópico das células, verificando-se as alterações celulares como mudanças na morfologia geral, vacuolização, destacamento, lise celular ou de membrana.

Foram utilizados como controle positivo β -glucana pura mais células celular VERO (ATCC CCL-81TM) e como controle negativo apenas as células celular VERO (ATCC CCL-81TM), respeitando a capacidade de volume do poço da placa. As amostras foram avaliadas em duplicata.

Foram testadas diluições 1:2 até 1:256 do composto β -glucana para verificar a citotoxicidade.

Os 96 poços da placa foram analisados macroscopicamente quanto a presença de halo e microscopicamente quanto a integridade celular. A característica de citotoxicidade foi constatada pela presença de um halo na monocamada e/ou pela mudança na característica morfológica das células e/ou presença de vacuolização e lise celular.

4.6 Teste de inibição *in vitro* do SARS-CoV-2

Após definir a diluição da β -glucana no teste de citotoxicidade, foi realizado o teste de inibição *in vitro* do SARS-CoV-2.

Neste teste, foi utilizada a linhagem celular VERO (ATCC CCL-81TM), células da linhagem normais epiteliais obtidas de rim de macacos verdes africanos. Esta linhagem foi cultivada em solução DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) -Sigma® suplementado com 10% de soro fetal bovino - (SFB – Nova Biotecnologia®) a 37 °C. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando 5ml de tripsina a 0,25% (Sigma®) com incubação à 37°C por 4 minutos. Foi adicionado mais meio e a suspensão celular foi semeada em quantidades adequadas em placa de 96 poços.

Este teste de inibição *in vitro* do SARS-CoV-2 consistiu em colocar a diluição da β -glucana não tóxica diretamente em contato com a cultura

de células VERO (ATCC CCL-81TM) com o vírus SARS-CoV-2 e realizado a avaliação qualitativa pelo exame macroscópico e microscópico das células verificando a presença de halos, alterações celulares, tanto morfológicas como lise. O efeito citopático do vírus foi avaliado depois de 72 horas.

5. RESULTADOS

5.1 Teste de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, verificando as alterações celulares e morfológicas. Foram testadas diluições da β -glucana de 1:2 a 1:256.

A citotoxicidade foi determinada pela avaliação qualitativa através do exame microscópico das células, para verificar as mudanças na morfologia, presença de vacuolização, destacamento, lise celular ou de membrana. Como controle negativo, foi usado apenas a célula VERO (ATCC CCL-81TM), como referência para análise da sua morfologia e confluência no poço (células atóxicas). Na análise qualitativa, as diluições 1:2 até 1:16 (Figura 6-A até D) apresentaram alterações celulares morfológicas, destacamento, presença de vacúolos e lise celular, apresentando nocividade celular (toxicidade). Já na diluição 1:32 (Figura 6-E), a morfologia celular e confluência foram preservadas, usando como referência o teste negativo (Figura 6-F). Portanto, a diluição 1:32 foi considerada atóxica e foi utilizada para a realização do teste de *inibição in vitro* do SARS-CoV-2. Todas as outras diluições apresentaram o mesmo resultado da diluição de 1:32.

Figura 6- A: Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™), apresentando alterações morfológicas devido ao efeito tóxico na diluição 1:2 de β -glucana (100 X).

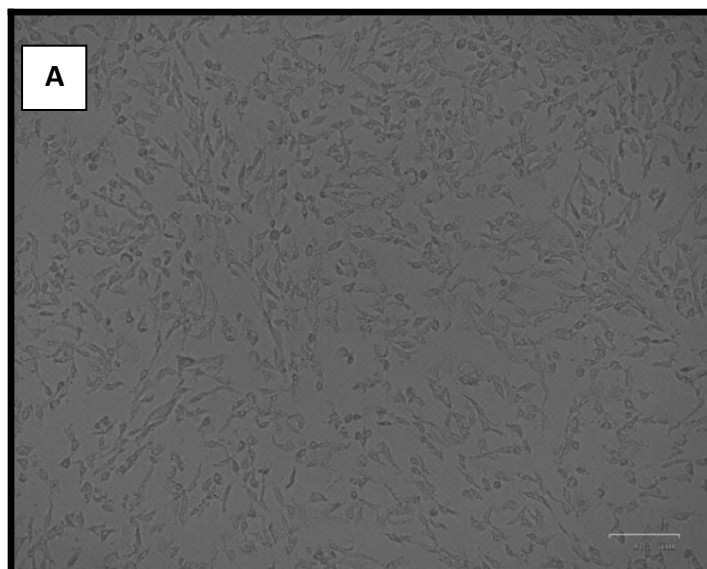


Figura 6-B: Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando alterações morfológicas devido ao efeito tóxico na diluição 1:4 de β -glucana (100 X).

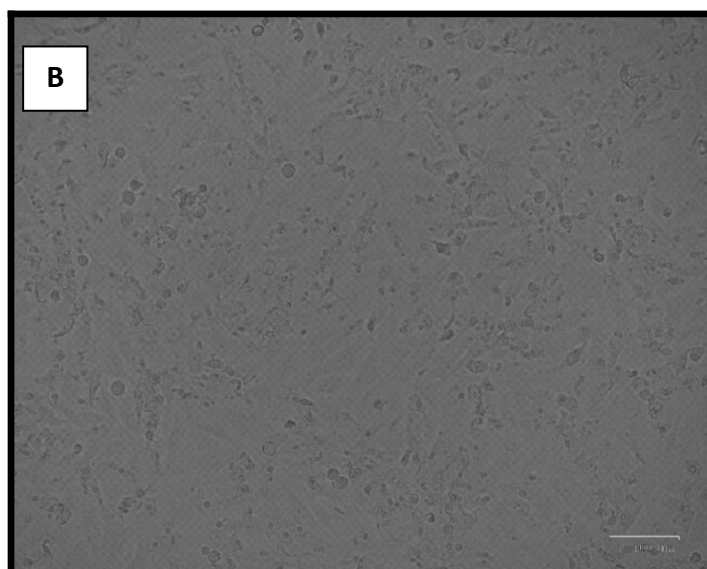


Figura 6-C: Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando alterações morfológicas devido ao efeito tóxico na diluição 1:8 (100 X).

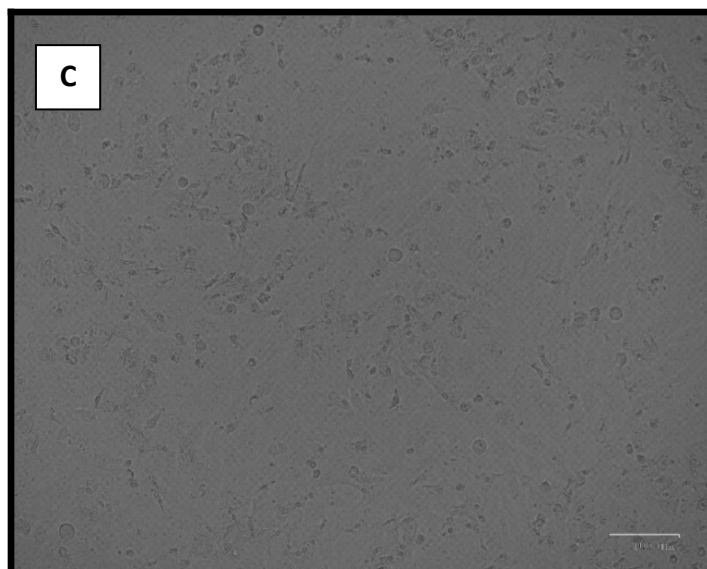


Figura 6-D: Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando alterações morfológicas devido ao efeito tóxico na diluição 1:16 de β -glucana (100 X).

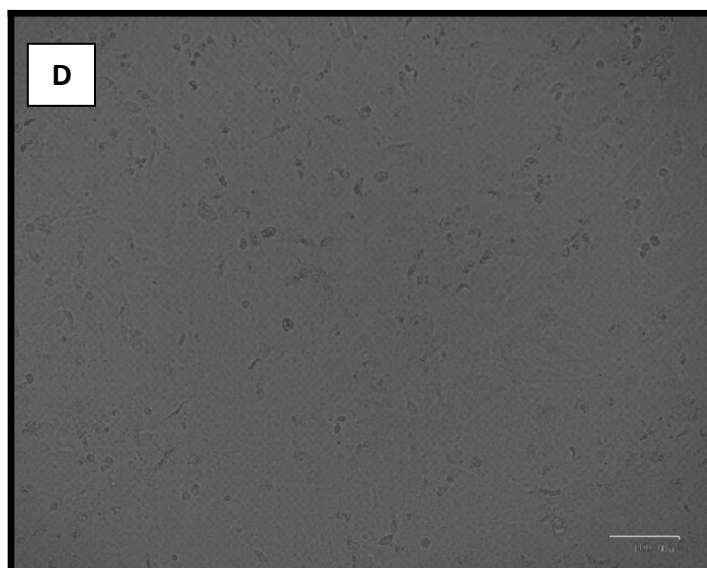


Figura 6-E: Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando células normais na diluição 1:32 de β -glucana (100 X). A β -glucana não mostrou efeito citotóxico.

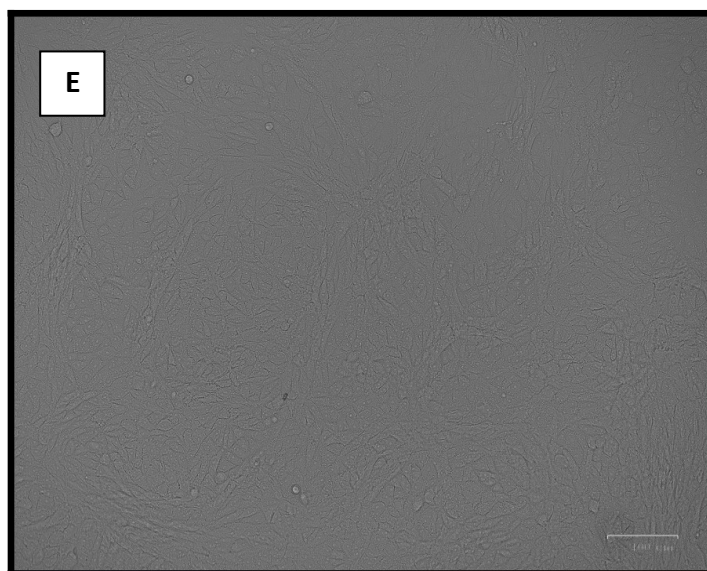
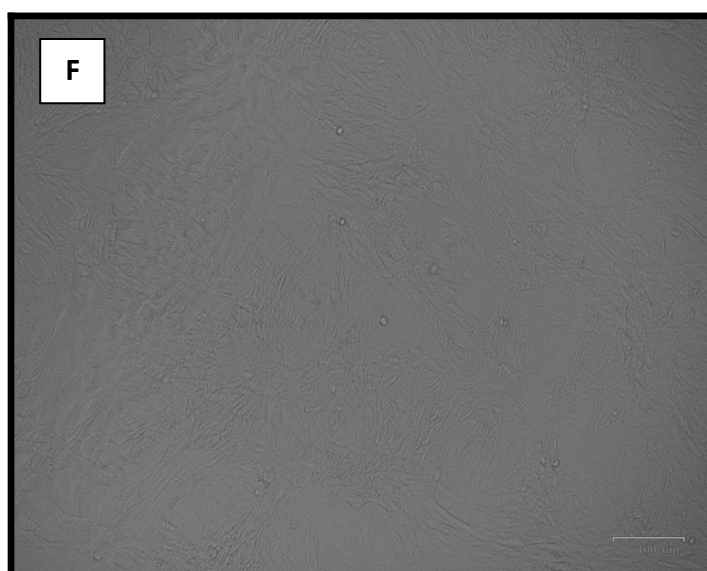


Figura 6-F: Monocamada da linhagem celular VERO (ATCC CCL-81™) apresentando células normais do controle negativo (100 X).

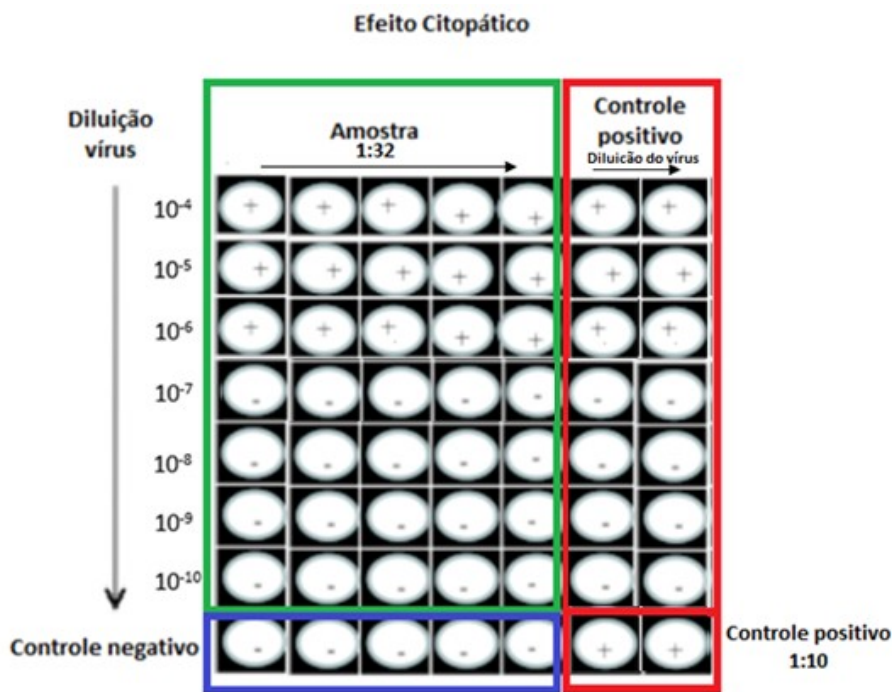


5.2 Teste de inibição *in vitro* do SARS-CoV-2

O controle negativo foi utilizado como referência para avaliar o crescimento e morfologia das células VERO (ATCC CCL-81™). O controle positivo, com carga viral 10⁶, foi utilizado para verificar o efeito citopático sobre a célula VERO (ATCC CCL-81™). Já o controle positivo com a β-glucana 1:32, foi utilizado para ser comparado com o teste de inibição das concentrações virais de 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰ testadas (Figura 7).

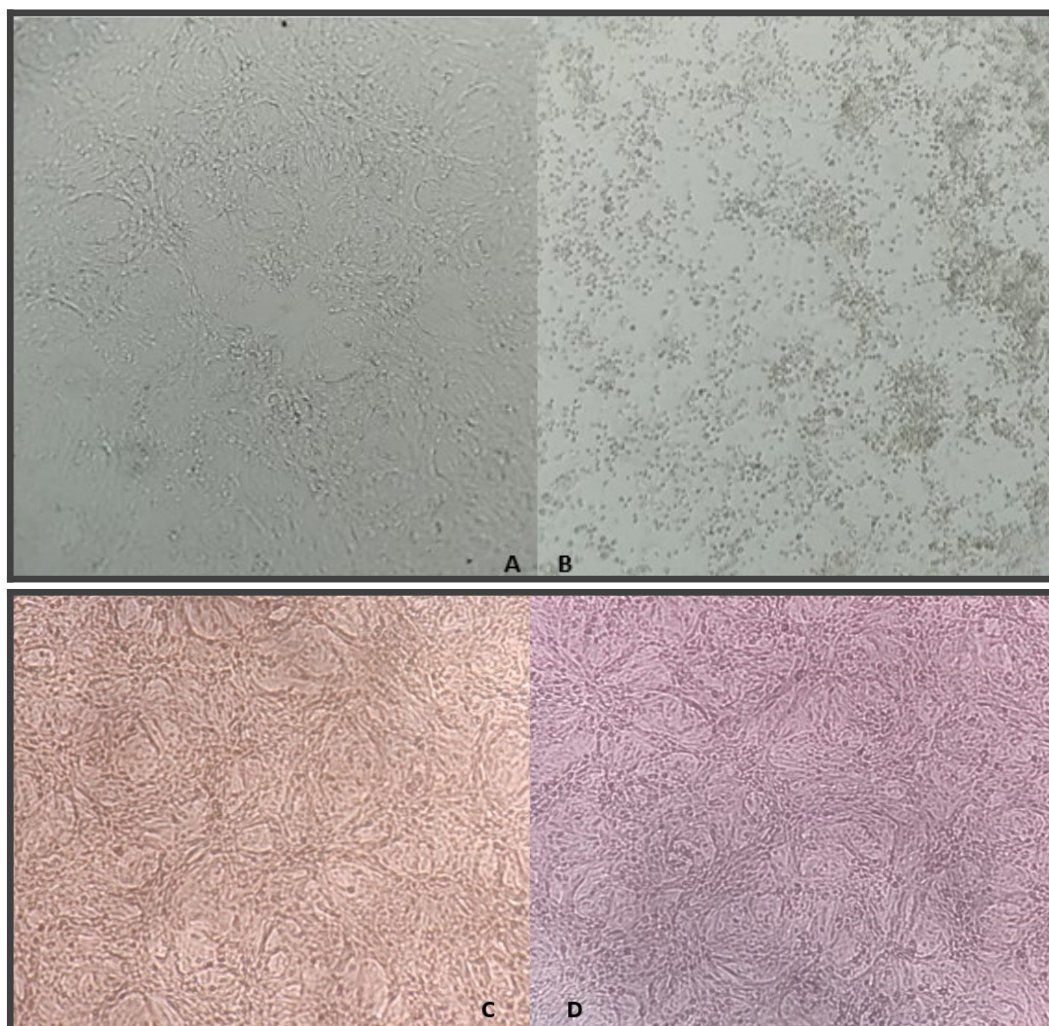
Foi realizado uma padronização antes das diluições para serem utilizadas no teste de inibição *in vitro*, onde a melhor concentração viral inicial para observar o efeito citopático foi de 10⁻⁴.

Figura 7: Esquema representativo da placa com as amostras e controles para o teste de inibição *in vitro* do SARS-CoV-2



Todos os poços foram observados em microscópio invertido (Eclipse Ti-S- Nikon®) em aumento de 100X e nas concentrações virais de 10^{-4} a 10^{-6} foram observados efeitos citopáticos comparando com o controle positivo, tornando o poço positivo, logo não houve a inibição do vírus, culminando na infecção celular (Figura 8).

Figura 8: A - controle negativo – célula VERO (ATCC CCL-81™) + β -glucana; B – Controle positivo – célula VERO (ATCC CCL-81™) + 1:10 vírus SARS-CoV-2; C – Célula VERO (ATCC CCL-81™) + 10^{-6} de vírus SARS-CoV-2 + 1:32 β -glucana, D – Controle positivo: – Célula VERO (ATCC CCL-81™) + 10^{-6} de vírus SARS-CoV-2.



Já nas concentrações de 10^{-7} a 10^{-10} , não foi observado efeito citopático, provavelmente pela baixa concentração viral, não tendo partículas virais infectantes, comparando com o controle positivo.

6 DISCUSSÃO

A COVID-19 apresentou ao mundo moderno um desafio que as infraestruturas globais de saúde não enfrentaram em mais de um século desde a pandemia de gripe espanhola (GELLER E YAN, 2020). Frente a essa realidade, muitos estudos foram desenvolvidos para combater esse novo coronavírus e os cientistas se mobilizaram na busca por novos tratamentos baseados no reposicionamento de fármacos e/ou utilização de produtos naturais.. Dentre os produtos naturais, estudos envolvendo β -glucana, descobriram que um dos efeitos biológicos desse polissacarídeo são as propriedades antivirais. (GELLER E YAN, 2020).

A atividade das β -glucanas *in vitro* tem sido descrita como ativadoras diretas de leucócitos, estimulando fagocitose, citotoxicidade e atividades antimicrobiológicas. Poucos estudos têm demonstrado eficácia das β -glucanas contra vírus que infectam o trato respiratório superior e inferior. A possível ação antiviral dos polissacarídeos derivados de fungos, foi estudada contra o vírus da gripe suína por JUNG et al., 2004; vírus da dengue por ELLAN et al., 2019 e Citomegalovirus por ROY et al., 2020 (Tabela 2).

Já estudos envolvendo atividade imunomoduladora das β -glucanas para SARS-CoV-2, foram realizados por JESENAK et al., 2013, DHARSONO et al., 2019, KESER E BILAL, 2008, GELLER E YAN, 2020 e VETVICKA et al., 2007.

Tabela 2: Estudos realizados para verificar a possível ação antiviral de polissacarídeos derivados de fungos.

Autor	Modelo de estudo	Patógeno	Via de administração/ teste	Resultado
Jung et al., 2004	Suínos	Vírus da influenza suína	Oral	↑ produção de IFN- γ e óxido nítrico nos pulmões dos suínos ↓ do grau de lesões pulmonares sem diferenças significativas nas concentrações de IFN- γ e óxido nítrico nos lavados brônquicos alveolares
Ellan et al., 2019	Monócitos	Vírus da dengue	Teste <i>in vitro</i>	Baixo efeito antiviral, demonstrou apenas atividades anti-inflamatórias ao inibir citocinas pró-inflamatórias.
ROY et al., 2020	Fibroblastos pulmonares humanos	Citomegalovírus humano	Teste <i>in vitro</i>	Resposta antiviral potente contra o citomegalovírus humano

Estudo realizado por Jung et al., 2004, em suínos infectados experimentalmente com o vírus da influenza suína, demonstrou que a β -glucana derivada de *S. cerevisiae*, administrada oralmente, aumentou a produção de IFN- γ e óxido nítrico nos pulmões dos suínos e reduziu o grau de lesões pulmonares, porém não foram detectadas diferenças significativas nas concentrações de IFN- γ e óxido nítrico nos lavados

brônquios alveolares entre os quatro tratamentos realizados, não sendo comprovado o efeito antiviral.

Ellan et al., 2019 utilizaram extratos de *Schizophyllum commune* e *Ganoderma lucidium* para avaliação do seu efeito antiviral e a diminuição da produção de inflamação decorrente da resposta de citocinas por monócitos infectados pelo vírus da dengue, porém através de ensaio de placa, obtiveram um baixo efeito antiviral, demonstrando apenas atividades anti-inflamatórias ao inibir citocinas pró-inflamatórias.

Uma pesquisa *in vitro* da atividade antiviral contra o citomegalovírus humano (CMV), foi realizada por ROY et al., 2020. Nesse estudo, foram utilizados fibroblastos pulmonares humanos e quatro tipos de cogumelos medicinais, sendo que apenas *Pleurotus* sp. e *Lentinus* sp. obtiveram uma resposta antiviral potente com citotoxicidade mínima. Seus extratos brutos mostraram 100% de inibição de replicação do CMV a 180 µg/ml e 160 µg/ml, respectivamente. Esse estudo mostrou que os extratos desses dois cogumelos podem ser usados como estratégia terapêutica alternativa para o CMV.

O estudo realizado por GELLER E YAN (2020) sugeriu que a β -glucana seria mais bem aproveitada no cenário profilático, pois hipotetizaram que através de processos de indução da imunidade treinada (TRIM) ocorre estímulo das células imunes inatas e a melhor eficiência das respostas imunes iniciais na população geral para prevenir a infecção potencial por SARS-CoV-2. A β -glucana também pode contribuir para a

diminuição dos sintomas em pacientes leves e moderados. Entretanto, não se pode descartar que o pré-tratamento com β -glucana possa exacerbar ainda mais a hiperinflamação já grave que se desenvolve em alguns pacientes. GELLER E YAN (2020) sugeriram ainda que ensaios clínicos são necessários para determinar o perfil de segurança e a eficácia da β -glucana no cenário antiviral profilático.

Segundo JESENAK et al., 2013 e DHARSONO et al., 2019 β -glucanas de várias fontes demonstraram ter efeitos imunomoduladores significativos e diminuir a gravidade das infecções virais do trato respiratório superior e inferior. Esses achados da literatura dos efeitos antivirais da β -glucana, difere dos nossos, pois não foi usado estudo *in vitro* colocando diretamente o vírus com a β -glucana, sugerindo que, diferente de outros vírus, para SARS-CoV-2 a atuação da β -glucana possa ser indireta e não pela ligação direta ao vírus inibindo o seu efeito citopático. Tal inibição pode ocorrer através da ativação do sistema imunológico. Postulamos, portanto, que esses efeitos antivirais provavelmente podem ser devidos à TRIM, onde os efeitos imunoestimulatórios gerais das β -glucanas ou a indução de TRIM são diretamente responsáveis pela ação, segundo GELLER E YAN, 2020.

S. cerevisiae, é um fungo não patogênico que contém como principais componentes da parede celular a β -glucana (48-60%) e manoproteínas (20-23%) (DERENGOWSKI, 2011; KLIS, 1994) e segundo VOLMAN et al., 2008 ao ingerir esta levedura, o sistema imune pode detectar estas

estruturas e ser ativado. A ativação através de PAMP não relacionada ao vírus pode ativar a resposta antiviral, facilitando a eliminação do vírus, segundo GOLONKA et al., 2020 e NANTZ et al., 2012.

Segundo GELLER E YAN, 2020, a indução da imunidade treinada é uma estratégia de defesa promissora contra a COVID-19. Como o sistema imune inato está sempre presente para agir contra qualquer invasor, ele entra em ação imediatamente após o reconhecimento de um sinalizador PAMP. É desta forma que a β -glucana pode ativá-lo, mesmo que não sejam associadas a agentes patogênicos (GOW et al., 2007).

Segundo CHEN et al., 2007, β -glucanas podem atuar como PAMPs e são reconhecidos por PRRs, uma vez que as β -glucanas não podem penetrar diretamente na membrana celular devido ao seu grande peso molecular.

Segundo BROWN, 2003, entre os polissacarídeos que atuam como imunoestimulantes, as β -glucanas foram consideradas as mais eficazes contra algumas doenças. Imunologicamente, a ação da β -glucana em humanos é através do aumento dos efeitos funcionais de macrófagos, células NK e neutrófilos (KESER E BILAL, 2008). Lembrando que a potência imunológica das β -glucanas pode variar com a massa molecular, a conformação da solução, a estrutura da espinha dorsal, o grau de ramificação, bem como o tipo de célula visada (SONCK, 2010).

Macrófagos e células dendríticas têm receptores típicos de superfície celular chamados PRRs que detectam moléculas inatamente

não-próprias, incluindo PAMPs (BROWN GD & GORDON S, 2005). Os principais PRRs para β -glucanas podem ser a dectina-1 e o receptor do tipo toll-like (TLR). Após a ligação com β -glucana, a dectina-1 e o TLR podem induzir cascata de sinalização e ativar células imunes. Outros receptores, como o receptor do complemento 3, os receptores de eliminação e a lactosilceramida, podem estar envolvidos (BROWN E GORDON, 2005). Além disso, segundo CHAN et al., 2009 a β -glucana aumenta a secreção de citocinas e agentes inflamatórios mediadores no sistema imunológico.

O papel de 1,3 β -glucanas de leveduras, fungos, cogumelos e algas marinhas como imunomoduladores biológicos têm sido documentados nos últimos 40 anos (VETVICKA, 2009). *In vitro*, estudos em animais e humanos demonstraram que 1,3 β -glucanas podem melhorar a capacidade de resposta e a função das células imunológicas, estimulando a imunidade humoral e celular (VETVICKA et al., 2007). Estudos *in vitro* demonstraram que β -glucanas podem aumentar a atividade funcional de macrófagos e ativar a atividade antimicrobiana de células mononucleares e neutrófilos (ZEKOVIĆ et al., 2005, TZIANABOS, 2000). Estudos *in vivo* de uma variedade de β -glucanas sobre as respostas a infecções por patógenos em animais observaram aumento da depuração microbiana e redução da mortalidade em animais letalmente infectados quando expostos a β -glucanas (HETLAND et al., 2000, SAEGUSA et al., 2004).

Em contrapartida, Dritz et al. (1995) não verificaram diferenças significativas no número ou na função de macrófagos e de neutrófilos em leitões desmamados que receberam β -glucana pela alimentação. Além disto, Rylander e Holt (1998) também não verificaram diferenças significativas no número de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos de cobaias que receberam β -glucana pela via nasal.

Poucos estudos em humanos examinaram a função imunológica das β -glucanas. Estudos clínicos demonstraram que o pré-tratamento de pacientes cirúrgicos de alto risco com levedura intravenosa β -1,3;1,6-D-glucana diminuiu a incidência de infecção, encurtou a permanência na unidade de terapia intensiva e melhorou a sobrevida em comparação com uma injeção de placebo salino (BABINEAU et al., 1994; DELLINGER et al., 1999).

Segundo MENG et al. 2022, que realizou um estudo de coorte de base populacional, o uso habitual de glucosamina está associado a redução de 30% no risco de internação hospitalar e redução de 28% no risco de morte entre os pacientes com COVID-19, mas não o risco de infecção.

ŞÖHRETOĞLU e UZ, 2015, observaram que a frequência de pegar resfriados diminuiu com o uso de β -glucana em pessoas saudáveis e TALBOTT e TALBOTT (2019) mostraram que o uso de β -glucana em corredores de maratona reduziu os sintomas de infecção do trato respiratório superior e melhorou os estados de humor de corredores. Além disso, em estudos *in vitro* em animais e humanos realizados por EL

KHOURY et al., 2021, foi comprovado que a β -glucana estimula a imunidade humoral e celular, aumentando assim o efeito e a atividade celular do sistema imunológico.

Naturalmente, o reconhecimento de moléculas não-próprias pelos TLRs expressos em macrófagos e células dendríticas, é seguido por uma cadeia de sinalização que alerta células do sistema imune adaptativo, tais como os linfócitos T. Estas células participam do combate ao vírus diretamente, eliminando células infectadas ou liberando mediadores inflamatórios que auxiliam no desenvolvimento da imunidade adaptativa (KAWASAKI et al., 2014; SALLUSTO et al., 2002; VOLMAN et al., 2008).

O uso de marcadores biológicos a partir de β -glucanas para fins de diagnóstico, é uma alternativa, como método não invasivo para a detecção de infecções fúngicas invasivas onde é usado como o antígeno galactomanana e o (1–3)- β -D-glucana (MENNINK-KERSTEN, MA E VERWEIJ PE, 2006). A utilidade clínica da β -glucana como marcador laboratorial para o diagnóstico de Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* foi comprovada por DEL BONO et al., 2009; DESMET et al., 2009, SERINGA, 2012 e TASAKA et al., 2014. Além do uso para a vigilância e o diagnóstico de infecções fúngicas invasivas em pacientes de alto risco, esse marcador fúngico também pode ser útil para o monitoramento terapêutico (PAZOS, C et al., 2005; KAWAGISHI, N et al., 2007).

A vacinação é uma das estratégias mais eficientes para prevenir doenças infecciosas através da produção de anticorpos imunogênicos.

Vacinas e aditivos são eficazes na indução de linfócitos citotóxicos, bem como células T, que são necessárias para combater a infecção (SOARES et al., 2019). Os efeitos imunoestimulante e anti-inflamatório de produtos naturais podem auxiliar na prevenção e/ou controle da COVID-19 causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, pois podem ser administrados com vacinas ou tomados por via oral. Estes são conhecidos como adjuvantes e podem funcionar aliviando os sintomas da COVID-19, bem como aumentando a ação da própria vacina. Os adjuvantes da vacina são substâncias de uma ampla estrutura química que são usadas para aumentar a resposta imune contra um antígeno específico. Nesse contexto, as glucanas podem ser considerados adjuvantes devido à sua atividade biológica imunomoduladora (VETVICKA et al., 2019; VETVICKA & VETVICKOVA, 2014; SOARES e GROOTHUISMINK et al., 2019). Portanto, os adjuvantes são utilizados para diversas finalidades: como componentes essenciais ou complementos das vacinas; estimuladores na produção de anticorpos ou como ferramentas para diminuir a resposta inflamatória (COX et al., 1997). Em um estudo, Soares et al., 2019 mostraram o potencial desempenho da glucana para a preparação de nanossistema de entrega como plataforma de vacinação de DNA (SOARES et al. 2019).

É importante ressaltar que, ao contrário de outros produtos naturais, as β -glucanas preservam sua bioatividade mesmo após a digestão oral (DE GRAAFF et al., 2018). Embora incorporado na parede celular do fungo (1–3)- β -D-glucana normalmente existe como uma estrutura insolú-

vel. Na presença de sangue ou outros fluidos corporais, (1–3)- β -D-glucana se transforma em hélice única, tripla hélice ou formas aleatórias de bobina e torna-se solúvel (MENNINK-KERSTEN, MA E VERWEIJ PE, 2006., LATGÉ, JP; 2007; BOWMAN, SM AND FREE, SJ, 2006). Segundo TSUKADA et al., 2003, a β -glucana aumentou o número e a função dos linfócitos intraepiteliais no intestino quando administrado por via oral, indicando que a β -glucana de *S. cerevisiae* pode ser bem absorvida no intestino.

Um ponto essencial para o uso de adjuvantes é que eles não devem produzir efeitos adversos, toxicidade ou quaisquer outros sintomas que possam afetar a função do sistema imunológico. A este respeito, as β -1,3;1,6-glucanas são considerados seguras de acordo com a lista emitida pela Comissão Europeia (CAVALERI et al., 2021). A lista estabelece as alegações gerais de saúde permitidas nos alimentos, incluindo aquelas relacionadas à redução do risco de doenças e ao desenvolvimento e saúde das crianças. Somente glucanas com uma ligação β -(1,3) ligada a um β -(1,6) são considerados modificadoras biológicas da resposta imune (CAVALERI et al., 2021).

Os nossos resultados demonstram que diferente de outros vírus, para SARS-CoV-2, a atuação das β -glucanas é indireta, onde a inibição não ocorre pela ligação direta ao vírus, não ocorrendo efeito citopático. Postulamos que a ação antiviral possa ocorrer através da ativação do sistema imunológico. Portanto, trabalhos de pesquisa futuros combinando

modelo *in vitro*, modelo animal e estudo humano são necessários para alcançar completamente o efeito antiviral das β -glucanas.

7 CONCLUSÃO

A β -glucana não foi capaz de minimizar e/ou inibir *in vitro* o SARS-CoV-2 por ação antiviral direta.

8 PRODUTO GERADO NESTE TRABALHO

Tentativa de uso de um produto natural com possível ação antiviral contra SARS-CoV-2 para desenvolvimento de um fármaco ou suplemento alimentar.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIMANIANDA, V; CLAVAUD, C; SIMENEL, C; et al. Cell wall beta-(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. **J Biol Chem.**28420:13401–12, 2009.

ALMEIDA, SLAC et al. Uma análise crítica das vacinas disponíveis para SARS-CoV-2. **Brazilian Journal of Health Review**. Vol 4. N. 2, 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa>. Acesso em: 20 de maio de 2022

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: Anvisa aprova registro de vacina bivalente contra a Covid-19 — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (www.gov.br). Acesso em: 27 de junho de 2023

BABINEAU, TJ; HACKFORD, A; KENLER, A; et al. **A phase II multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of three dosages of an immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients.** *Archives of Surgery*. 1994;129(11):1204–1210.

BAI, Y et al. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID19. **J Am Med Assoc**. 323(14): 1406-1407, 2020.

BORCHERS, A; KEEN, CL; GERSHWIN, ME. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. **Experimental Biology and Medicine**, 229, 393-406,2004.

BORCHERS, AT; STERN, JS; HACKMAN, RM. Mushrooms, tumors and immunity Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 221 (1999), pp. 281-293.

BOWMAN, SM AND FREE, SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**. 28:799–808, 2006.

BROWN, GD; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**. 2003;19(3):311–315.7.

BROWN, GD; GORDON S. Immune recognition of fungal beta-glucans.

Cell Microbiol. 2005. 7:471–479.

CAVALERI, M; ENZMANN, H; STRAUS, S; COOKE, E. The European medicines agency's EU conditional marketing authorisations for COVID-19 vaccines. **Lancet**, 397, 355–357, 2021.

CHAN, GCF; CHAN, WK; SZE, DMY. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of hematology & oncology**, 2(1), 1-11, 2009.

CHAN, JF; KOK, KH; ZHU, Z; et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerg Microbes Infect.** Jan 28;9(1):221-236, 2020.

CHEN, J; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal beta-(1→3), (1→6)-glucans. **Mycol Res.** 111:635–652, 2007.

CHEN, J; PAN, Y; LI, G; et al. Distinguishing between COVID-19 and influenza during the early stages by measurement of peripheral blood parameters. **Journal Of Medical Virology**. 93(2), p. 1029-1037, 2020.

Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium. **Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China.** Science. 2004 Mar 12;303(5664):1666-9.

CHOUDHURY, A; MUKHERJEE S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. **J Med Virol.**92(10):2105-13, 2020.

CORMAN, VM et al. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, New York, v. 100, p. 163-188, 2018.

COUSO, N; CASTRO, R; NOYA,M; et al. Location of superoxide production sites in turbot neutrophils and gilthead seabream acidophilic granulocytes during phagocytosis of glucan particles. **Develipmental and Comparative Immunology**, v.25, n.7,p.607-618, 2001.

COUTARD, B. et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. **Antiviral Research**, 176: 1047-42, 2020.

COX, JC; COULTER, AR. Adjuvants—A classification and review of their modes of action. **Vaccine** 1997, 15, 248–256.

CUI, J; LI, F; SHI, ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews. Microbiology*, 17: 181-192, 2019.

DE GRAAFF P, GOVERS C, WICHERS HJ et al. Consumption of beta-glucans to spice up T cell treatment of tumors: a review. **Expert Opin Biol Ther**. 18:1023–40, 2018.

DEL BONO, V., MULARONI, A., FURFARO, E., DELFINO, E., ROSASCO, L., MILETICH, F., et al. Clinical evaluation of (1→3)-β-glucan assay in presumptive *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients. **Clin Vacc Immunol**, 16, 1524-1526, 2009.

DELLINGER, EP; BABINEAU, TJ; BLEICHER, P; et al. Effect of PGG-glucan on the rate of serious postoperative infection or death observed after high-risk gastrointestinal operations. **Archives of Surgery**. 1999;134(9):977–983.

DERENGOWSKI, LS. **Caracterização da resposta de fungos patogênicos a diferentes condições de interação intra e inter-reinos**. 2011. 177 f., il. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular] - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

DESMET, S., VAN WIJNGAERDEN, E., MAERTENS, J., et al. Serum (1→3)-β-D-glucan as a tool for Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection or Hematological Malignancy. **J Clin Microbiol**, 47 , 3781-3784, 2009.

DHARSONO ,T; RUDNICKA, K; WILHELM, M; et al. Effects of yeast (1,3)-(1,6)-beta-glucan on severity of upper respiratory tract infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy subjects. **J Am Coll Nutr**. 38:40–50, 2019.

DIAO, B; WANG, C; TAN, Y; et al. Reduction and Functional Exhaustion of

T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in Immunology**.11:827, 2020.

DIJKGRAAF, GJP; LI, H; BUSSEY, H. Cell- β glucans of *Saccharomyces cerevisiae*. In: VANDAMME, E. J.; De BAETS, S.; STEINBUCHER, A. (Eds.). *Biopolymers*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2002. v. 6, p. 179-213.

DRITZ, S.S.; SHI, J.; KIELIAN, T.L.; GOODBAND, R.D.; NELSEN, J.L.; TOKACH, M.D.; CHENGAPPA, M.M.; SMITH, J.E.; BLECHA, F. Influence of Dietary β -Glucan on Growth Performance, Nonspecific Immunity, and Resistance to *Streptococcus suis* Infection in Weanling Pigs. *Journal of Animal Science*, v. 73, n. 11, p. 3341-3350, 1995.

SOARES, E; CORDEIRO, R; FANCA, H; et al. Polymeric nanoengineered HBsAg DNA vaccine designed in combination with β -glucan. **Int. J. Biol. Macromol.**, 122, pp. 930-939, 2019.

SOARES, E; GROOTHUISMINK, ZMA.; BOONSTRA, A; et al. Glucan particles are a powerful adjuvant for the HBsAg, favoring antiviral immunity. **Mol. Pharm.**, 16, pp. 1971-1981, 2019.

EL KHOURY, D; CUD, C; LUHOVYY, BL; ANDERSON, GH. Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal of nutrition and metabolism**. 2012:851362.

ELLAN, K; THAYAN, R; PHAN, CW; et al. Anti-inflammatory effect of mushrooms in dengue-infected human monocytes. **Trop Biomed**. Dec 1;36(4):1087-1098, 2019.

ELTAYEB, LB. An update about Coronaviruses with Emphasis on Newly Emerged COVID 19, **J Biochem Tech**. 11 (3): 14-20, 2020.

FAN, C; LIU, L; GUO, W; et al. Prediction of epidemic spread of the 2019 novel coronavirus driven by spring festival transportation in China: a population-based study. **Int J Environ Res Public Health**.17(5):1-27, 2020.

FERREIRA, LLG; ANDRICOPULO, AD. **Medicamentos e tratamentos para a Covid-19**. Impactos da pandemia • Estud. av. 34 (100) • Sep-Dec. 2020

FUNG, SY; YUEN, KS; YE, ZW; et al. A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses. **Emerg Microbes Infect.** 9(1):558-70, 2020.

GAO, Y AND ZHOU, S. The Immunomodulating Effects of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi Mushroom) (Aphyllphoromycetideae). **Int. J. Med. Mushrooms.** 4(1): 1–11, 2002.

GAUTIER, JF; et al. New Symptom of COVID-19: Loss of Taste and Smell. *Obesity.* 2020; 28(5): 848.

GELLER, A and YAN, J. Could the Induction of Trained Immunity by β -Glucan Serve as a Defense Against COVID-19? **Front. Immunol.** 11:1782, 2020.

GOLONKA, RM; SAHA, P; YEOH, BS; et al. Harnessing innate immunity to eliminate SARS-CoV-2 and ameliorate COVID-19 disease. **Physiol Genomics.** 52(5): 217–221, 2020.

GORBALENYA, AE; BAKER, SC; BARIC, RS; et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus : The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. **Nature Microbiology** volume 5, p. 536–544, 2020.

GOUDOURIS, ES. Laboratory diagnosis of COVID-19. **Jornal de Pediatria,** 97(1), 7-12, 2021.

GOW, NAR; NETEA, MG; MUNRO, CA; et al. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. **J Infect Dis.** 196(10): 1565-71, 2007.

GRALINSKI, LE & MENACHERY, VD. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. **Viruses,** 12(2), 1–8, 2020.

GU, J; et al. COVID-19: Gastrointestinal manifestations and potential fecal-oral transmission **Gastroenterology.** 158:1518–1519, 2020.

GUAN, Y; ZHENG, BJ; HE, YQ; et al. Isolation and Characterization of

Viruses Related to the SARS Coronavirus from Animals in Southern China. **SCIENCE**. Vol 302, Issue 5643. pp. 276-278, 2003.

GUPTA, A; MADHAVAN, MV; SEHGAL, K; et al.. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nat Med**. Jul;26(7):1017-1032, 2020.

HAMMOND J, LEISTER-TEBBE H, GARDNER A, et al. EPIC-HR Investigators. Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with Covid-19. **N Engl J Med** 2022; 386:1397–408.

HETLAND, G; OHNO, N; AABERGE, IS; et al. Protective effect of β -glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 27(2):111–116, 2000.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, v. 181, n. 2, p. 271-280, 2020.

HOFFMANN, C. Treatment. In: Kamps BS, Hoffmann C, eds. Covid Reference, Edition 2020-2. SteinHauser Verlag; Amedeo, Germany; 2020. Disponível em: www.covidreference.com. Acesso em: 02 de agosto de 2023.

HOJYO, S; UCHIDA, M; TANAKA, K; et al. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. **Inflammation and regeneration**. 40(1):1-7, 2020.

HU, B; HUANG, S; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of medical virology**. 93(1):250-56, 2021.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 15 de dezembro de 2022

INOUE, JI; YAMAMOTO, M. Identification of an existing Japanese pancreatitis drug, Nafamostat, which is expected to prevent the transmission of new coronavirus infection (COVID-19). **The University of Tokyo**. Mar, 2020.

IWASAKI, A; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat Immunol**. Apr;16(4):343-53, 2015.

JAIN, SWATI et al. COVID-19 vaccines currently under preclinical and clinical studies, and associated antiviral immune response. **Vaccines**, v. 8, n. 4, p. 649, 2020.

JESENAK, M; MAJTAN, J; RENNEROVA, Z; et al. Immunomodulatory effect of pleuran (β -glucan from *pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. **Int Immunopharmacol**. 15:39.–9, 2013.

JIN, YH; CAI, L; CHENG, ZS; et al. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). **Mil Med Res**. 7(1):1-23, 2020.

JUNG, K; HA, Y; HA, SK.; et al. Antiviral Effect of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan to Swine Influenza Virus by Increased Production of Interferon- γ and Nitric Oxide. **Journal of Veterinary Medicine Series B**. March, 51(2):72-6, 2004.

KATAOKA, K; et al. Activation of macrophages by linear (1 $\rightarrow$ 3)- β -glucans Kawasaki T, Kawai T. Toll-like Receptor Signaling Pathways. **Front Immunol**. 5: 461, 2014.

KAWAGISHI, N; et al. Usefulness of beta-D glucan in diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia and monitoring its treatment in a living-donor liver-transplant recipient. **J Hepatobiliary Pancreat Surg**. 14:308–311, 2007.

KESER, O & BILAL, T. Effect of beta-glucan on immune system and performance in animal nutrition. **Journal of Erciyes University Faculty of Veterinary Medicine**, 5(2), 107-119, 2008.

KLIS, FM. Review: Cell Wall Assembly in Yeast. **Yeast**. 10(7): 851-69, 1994.

KLOK, FA; KRUIP, MJHA; VAN DER MEER, NJM; et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. **Thromb Res**. Jul;191:148-150, 2020.

LAI, MM; PERLMAN, S; ANDERSON, LJ. Coronaviridae. In Knipe DM and Howley PM eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia. **Lippincott Williams & Wilkins**. Cap., p. 1306-35, 2007.

LAI, CKC; LAM, W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 538, 226-230, 2021.

LAN, RM; COELHO, FC; GOMES, MFDC; et al. Emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva. **Cad. Saúde Pública**, v. 36, n. 3, fev. 2020.

LATGÉ JP. The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol Microbiol**. 66:279–290, 2007.

L&P Foods. **Produtos**. Disponível em: https://pt.lpfoodswy.com/oat-beta-glucan-70-from-oat-bran_p20.html. Acesso em: 10 de janeiro de 2023

LI, G; DE CLERCQ, E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). **Nat Rev Drug Discov**. 19(3):149-50, 2020.

LI, W; SHI, Z; YU, M; et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**, New York, v. 310, n. 5748, p. 676-679, 2005.

LIPPI, G; SIMUNDIC, AM; PLEBANI, M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Clin Chem Lab Med**. 58(7):1070- 1076, 2020.

LIU, J; LI, S; LIU, J; et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. **EBioMedicine**. 55:102763, 2020.

LIU, J; LI, Y; LIU, Q; et al. SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. **Cell Discov** 7, 17, 2021.

MAJANO, P; RODA-NAVARRO, P; ALONSO-LEBRERO, JL; et al. AM3 inhibits HBV replication through activation of peripheral blood mononuclear cells. **Int. Immunopharmacol**. 4:921–92, 2004.

MATRICARDI, PM; DAL NEGRO, RW; NISINI, R. The first, holistic immunological model of COVID-19: Implications for prevention, diagnosis,

and public health measures. *Pediatr Allergy Immunol.* Jul;31(5):454-470, 2020.

MENNINK-KERSTEN, MA AND VERWEIJ PE, 2006 . Non-culture-based diagnostics for opportunistic fungi. **Infect Dis Clin North Am.** 2006;20:711–727.

MENG, M; WU, Y; ZENG, R; et al. Associations of habitual glucosamine use with SARS-CoV-2 infection and hospital admission and death with COVID-19: Evidence from a large population based cohort study. *medRxiv*; 2022.

MORADALI, MF; MOSTAFAVI, H; GHODS, S; et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International Immunopharmacology**, 7, 701-724, 2007.

MORSE, JS; LALONDE, T; XU, S; LIU, WR. Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV. **Chembiochem.** 21(5):730-8, 2020.

NANTZ, MP; ROWE, CA; MULLER, CE; et al. Supplementation with aged garlic extract improves both NK and $\gamma\delta$ -T cell function and reduces the severity of cold and flu symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled nutrition intervention. **Clin Nutr.** 31(3): 337-44, 2012.

NETEA, MG; DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J; BARREIRO, LB; et al.. Defining trained immunity and its role in health and disease. **Nat Rev Immunol.** Jun;20(6):375-388, 2020.

OMS, 2023. Histórico da pandemia de COVID-19. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>. Acesso em 15 de novembro de 2023.

PANG, J; WANG, MX; ANG, IYH; et al. Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019- nCoV): A Systematic Review. **J Clin Med.** Fev; 9(3): 623, 2020.

PAZOS, C; PONTÓN, J; DEL PALACIO, A . Contribution of (1-->3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of

invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: A comparison with serial screening for circulating galactomannan. **J Clin Microbiol.**43:299–305, 2005.

PELAIA, C, et al. Therapeutic Role of Tocilizumab in SARS-CoV-2-Induced Cytokine Storm: Rationale and Current Evidence. **Int J Mol Sci.** 2021

PONTELLI, MC; CASTRO, IA; MARTINS, RB; et al. Infection of human lymphomononuclear cells by SARS-CoV-2. **bioRxiv.** 11:1–7, 2020.

PRAJAPAT, M; SARMA, P; SHEKHAR, N; et al. Drug targets for corona virus: a systematic review. **Indian J Pharmacol.** 52(1):56-65, 2020.

PROMPETCHARA, E; KETLOY, C; PALAGA, T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. **Asian Pac. J. Allergy Immunol.** 38:1–9, 2020.

RANDO, HM; et al. Pathogenesis, symptomatology, and transmission of SARSCoV-2 through analysis of viral genomics and structure. **Msystems,** v. 6, n. 5, p. e00095-21, 2021.

RYLANDER, R.; HOLT, P.G. (1'! (1'Ç°3)-â-D-Glucan na endotoxin modulate immune response to inhaled allergen. **Mediators of Inflammation,** v. 7, p. 105–110, 1998

ROGIER VAN DOORN, H and HONGJIE, YU. Viral Respiratory Infections. Hunter's **Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition).** Pages 284-288, 2020.

ROTA, PA; OBERSTE, MS; MONROE, SS; et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **Science.** May 30;300(5624):1394-9, 2003.

ROTHER, C; et al. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. **N Engl J Med.** 382(10): 970-971, 2020.

ROY, D; ANSARI, S; CHATTERJEE, A; et al. In Vitro Search for Antiviral Activity against Human Cytomegalovirus from Medicinal Mushrooms

Pleurotus sp. and *Lentinus* sp. **J Antivir Antiretrovir.**12:201. DOI: 10.35248/1948-5964.20.12.201, 2020.

RUDBERG, AS; HAVERVALL, S; MÅNBERG, A; et al. SARS-CoV-2 exposure, symptoms and seroprevalence in healthcare workers in Sweden. **Nature communications**, 11(1), 1-8, 2020.

SAEGUSA, S;TOTSUKA, M; KAMINOGAWA, S; et al. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* induce interleukin-8 production from intestinal epithelial-like Caco-2 cells in the presence of butyric acid. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 41(3):227–235, 2004.

SAGHAZADEH, A; REZAEI, N. Immune-epidemiological parameters of the novel coronavirus: a perspective. **Expert Rev Clin Immunol**. 16(5):465-70, 2020.

SALLUSTO, F; LANZAVECCHIA, A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. **Arthritis Res**. 4(Suppl 3): S127-32, 2002.

SANDERS, JM; MONOGUE, ML; JODLOWSKI, TZ; et al. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): **A Review**. *Jama* 323, 1824–1836, 2020.

SANTOS, KMRD; GALVÃO, MHR; GOMES, SM; et al. Depressão e ansiedade em profissionais de enfermagem durante a pandemia da covid-19. **Escola Anna Nery**, V. 25, N. SPE. 2021

SCHULTE-SCHREPPING, J; REUSCH, N; PACLIK, D; et al. Deutsche COVID-19 OMICS Initiative (DeCOI). Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. **Cell**. Sep 17;182(6):1419-1440.e23, 2020.

SCHWARTZ, DA; GRAHAM, AL. Potential maternal and infant outcomes from (Wuhan) coronavirus 2019-nCoV infecting pregnant women: lessons from SARS, MERS, and other human coronavirus infections. **Viruses**.12(2):1-16, 2020

SERINGA, MMM. **Utilidade clínica do (1→3)-β-D-glucano como marcador laboratorial no diagnóstico de Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii***. Dissertação de candidatura ao grau de Mestre

em Parasitologia Médica Pela Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Lisboa, 2012.

SHEERVALILOU, R; SHIRVALILOO, A; DADASHZADEH, N; et al. COVID-19 under spotlight: A close look at the origin, transmission, diagnosis, and treatment of the 2019- nCoV disease. **Journal of cellular physiology**. P. 1-52, 2020.

SINGHAL, T. A review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). **Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 4, p. 281-286, 2020.

ŞÖHRETOĞLU, D; UZ, AK. β -Glucan and the Immune System. Hacettepe University **Journal of the Faculty of Pharmacy**, (2), 103-115, 2015.

SONCK, E; STUYVEN, E; GODDEERIS, B; et al. The effect of β -glucans on porcine leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 135(3-4):199–207, 2010.

SHUO, SU; et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 6, p. 490-502, 2016.

TALBOTT, S and TALBOTT, J. Effect of Beta 1, 3/1, 6 Glucan on upper respiratory tract infection symptoms and mood state in marathon athletes. **Journal of sports science & medicine**, 8(4), 509, 2009.

TANG, N; BAI, H; CHEN, X; et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost*. May;18(5):1094-1099, 2020.

TASAKA S, KOBAYASHI S, YAGI K, et al. Serum (1 $\rightarrow$ 3) β -D-glucan assay for discrimination between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *Journal of Infection and Chemotherapy* : **Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy**. 2014 Nov;20(11):678-681.

TAUBENBERGER, JK and MORENS, DM. Influenza: the mother of all pandemics. **Emerg Infect Dis**. Jan;12(1):15-22, 2006.

TAY, MZ; POH, CM; RÉNIA, L; et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology** 20(6):363-74, 2020.

TESINI, BL. 2020. Coronavírus e Síndromes respiratórias agudas (COVID-19, MERS e SARS). MANUAL MSD Versão Saúde para a Família. Merck Sharp & Dohme Corp., subsidiária da Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, EUA). Disponível em: https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/80/coronavirus_e_sin_dromes_respiratorias_agudas_covid-19_mers_e_sars_-_infeccoes_-_manual_msd_versao_saude_para_a_familia.pdf. Acesso em: 10 de janeiro de 2023

TSUKADA, C; YOKOYAMA, H; MIYAJI, C; et al. Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of β -glucan. **Cell. Immunol.** 221:1-5, 2003.

TZIANABOS, AO. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews.** 13(4):523–533, 2000.

VAN DOREMALEN, N; BUSHMAKER, T; MORRIS, DH; et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. **N Engl J Med.** 382(16):1564-7, 2020.

VETVICKA, V; DVORAK, B; VETVICKOVA, J; et al. Orally administered marine (1→3)- β -d-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. **International Journal of Biological Macromolecules.** 40(4):291–298, 2007.

VETVICKA, V; THORNTON, BP; WIEMAN, TJ; et al. Targeting of natural killer cells to mammary carcinoma via naturally occurring tumor cell-bound iC3b and beta-glucan-primed CR3 (CD11b/CD18). **The Journal of Immunology**, 2v. 159,n.2, p. 599-605,1997.

VETVICKA, V; VETVICKOVA, J. Effects of yeast-derived β -glucans on blood cholesterol and macrophage functionality Glucans, blood cholesterol, and macrophage function V. **Journal of Immunotoxicology.** 6(1):30–35, 2009.

VETVICKA, V; VANNUCCI, L; SIMA, P; et al. Beta glucan: Supplement or drug? From laboratory to clinical trials. **Molecules** 24, 1251, 2019.

VETVICKA, V; VETVICKOVA, J. Natural immunomodulators and their stimulation of immune reaction: True or false? **Anticancer. Res.** 34, 2275–2282, 2014.

VOLMAN, JJ; RAMAKERS, JD; PLAT J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. **Physiol Behav.** 94(2): 276-84. PMID: 18222501, 2008.

WALLS, AC; PARK, YJ; TORTORICI, MA; et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell.** (2), p. 281-292, 2020.

WHO. **MERS Global summary and assessment of risk.** Disponível em: https://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/risk-assessment-august-2018.pdf. Acesso 12 março 2023.

WHO. **Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV).** 2019. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>. Acesso em 12 março de 2023.

WHO. **Coronavirus (COVID-19) Dashboard.** Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em 15 de novembro de 2023.

WILLIAMS, DL and DI LUZIO, NR. Glucan-induced modification of murine viral hepatitis. **Science** 208, 67– 69, 1980.

WILLIAMSON, G; DAMANI, K; DEVENNEY, P; et al. Mechanism of action of cyclic beta-1,2-glucan synthetase from *Agrobacterium tumefaciens*: competition between cyclization and elongation reactions. **Journal of Bacteriology**, v, 174,n. 24, p. 7941-7947, 1992.

WOO, PC; LAU, SK; LAM, CS; et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **J Virol.** Apr;86(7):3995-4008, 2012.

WOO, PC; LAU, SK; LI, KS; et al. Molecular diversity of coronaviruses in bats. **Virology**, 35(1):180-7, 2006.

WOO, PC; LAU, SK; YIP, CC; et al. More and more coronaviruses: Human Coronavirus HKU1. **Viruses**. 1:57-71, 2009.

WOOD, PJ; BRAATEN, JT; SCOTT, FW; et al. Effect of dose and modification of viscous properties of oat gum on plasma and insulin following an oral glucose load. **Brit. J. Nutr.**, v.72, p.731-743, 1994.

LI, X; et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis** 10, 102e10, 2020.

GE, XY; LI, JL; YANG, XL; et al. **Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor** Nature, 503 (2013), pp. 535-538.

YEE, J; UNGER, L; ZADRAVECZ, F; et al. Novel coronavirus 2019 (COVID-19): Emergence and implications for emergency care. **Jacep Open**, v. 1, n.7. Fev. 2020.

YUKI, K; et al. COVID-19 pathophysiology: A review. **Clinical Immunology**, v. 215, p. 1-8, 2020.

ZEKOVIĆ, DB; KWIATKOWSKI, S; VRVIĆ, MM; et al. Natural and modified (1→3)-β-D-glucans in health promotion and disease alleviation. **Critical Reviews in Biotechnology**. 25(4):205–230, 2005.

ZHENG, F; ZHOU, Y; ZHOU, Z; et al. SARS-CoV-2 clearance in COVID-19 patients with Novaferon treatment: A randomized, open-label, parallel-group trial. **Int. J. Infect. Dis.** 99:84–91, 2020.

ZHENG, MX; ZHU, YJ; LIU, B; et al. Research progress on β-glucan and its application on food industry. **J. Food Saf. Food Qual.** 19(16): 4333–4342, 2018.

ZHU, N; ZHANG, D; WANG, W; et al. China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med.** Feb 20;382(8):727-733, 2020.

ZINDEL, J; KUBES, P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. **Annu Rev Pathol.** Jan 24;15:493-518, 2020.