

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto De Ciências Biológicas
Programa De Pós-Graduação Em Microbiologia

Jéssica Pauline Coelho Souza

**CONSTRUÇÃO DE UM VÍRUS RECOMBINANTE *VACCÍNIA* ANKARA
MODIFICADO (MVA) EXPRESSANDO A ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA 2 (ACE2) HUMANA.**

Belo Horizonte

2023

Jéssica Pauline Coelho Souza

**CONSTRUÇÃO DE UM VÍRUS RECOMBINANTE *VACCÍ* NIA ANKARA
MODIFICADO (MVA) EXPRESSANDO A ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA 2 (ACE2) HUMANA.**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da
Fonseca

Co-orientadora: Dra. Sabrynna Brito
Oliveira

Belo Horizonte
2023

043

Souza, Jéssica Pauline Coelho.

Construção de um vírus recombinante Vaccinia Ankara Modificado (MVA) expressando a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) humana [manuscrito] / Jéssica Pauline Coelho Souza. – 2023.

121 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca. Co-orientadora: Dra. Sabryna Brito Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Covid-19. 3. Vírus da SARS. 4. Peptidil Dipeptidase A. 5. Vírus Vaccinia. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Oliveira, Sabryna Brito. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA

ATA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE JÉSSICA PAULINE COELHO SOUZA

Nº REGISTRO: 2020685013

Às 09:00 horas do dia 16 de janeiro de 2023, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pela Dra. Jaqueline Germano de Oliveira (Instituto René Rachou), Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e o Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca – Orientador, para julgar o trabalho final “Construção de um vírus recombinante Vaccinia Ankara Modificado (MVA) expressando a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) humana”, da aluna Jéssica Pauline Coelho Souza, requisito final para a obtenção do Grau de MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - Orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 16 de janeiro de 2023.

Membros da banca:

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Prof. Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues

De acordo:

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
(Orientador)

Profs. Drs. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por Flavio Guimaraes da Fonseca, Professor do Magistério Superior, em 20/01/2023, às 14:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Professor do Magistério Superior, em 20/01/2023, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Jaqueline Germano de Oliveira, Usuário Externo, em 23/01/2023, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, Professora do Magistério Superior, em 24/01/2023, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 02/02/2023, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.343, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2031966 e o código CRC E56FEED8.

A Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e sempre, agradeço a Deus por me abençoar e inspirar tão generosamente, em todos os aspectos da minha vida: espiritual, pessoal e profissional. A Ele dou graças por tornar possível mais essa conquista, ao mesmo tempo em que trabalhou a minha fé e me revestiu de sabedoria, resignação, resiliência e humildade para os desafios apresentados até aqui e para os que virão. Obrigada por sempre atender às minhas preces e me guiar segundo os teus caminhos.

Aos meus pais, Zoraide e Ednilson, pelos ensinamentos e valores morais. Pelo total e inquestionável apoio aos meus objetivos. Obrigada em especial, pela paciência, compreensão, amor e carinho que tiveram todo esse tempo até eu encontrar ou reencontrar o meu verdadeiro caminho. Obrigada pela abdicção e sacrifício em favor dos meus sonhos. Que eu possa sempre honrar e ser digna dessa perfeita entrega materna e paterna.

À minha irmã, Kênia, pela inigualável amizade e companheirismo. Amada, obrigada pelo amparo e apoio em todos os momentos difíceis e por dividir comigo todos os momentos felizes de nossas vidas. Obrigada por tudo e por tanto!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca, pela oportunidade, paciência e valiosa contribuição profissional.

À Profa. Dra. Edel e à profa. Dra. Jordana por contribuir para o sucesso desse trabalho, crescimento profissional e pessoal. Acima de tudo, grata pelo apoio emocional cedido por vocês nesses últimos momentos.

Grata à Profa. Dra. Betânia pela empatia e compreensão quando da chegada a hora derradeira.

À minha querida, humana e firme, co-orientadora, Dra. Sabrynna Brito, vulgo mermã, pela parceria profissional, pelas "dicas de milhões", pela compreensão nos piores momentos e por vibrar e contribuir para os resultados sucesso. Obrigada por acreditar em mim e me incentivar!

A todos os professores do PPGM e demais funcionários, em especial à Débora e Tiago, sempre tão atenciosos e prestativos.

Grata à Tânia Mara, que mais uma vez fez valer a sua fama no quesito competência profissional e mãe de todos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Machado e ao Dr. Daniel Doro, pela contribuição do projeto.

À toda equipe do LVBA, pelas experiências compartilhadas. À Bonita (Carolina), pela gratificante amizade simbiótica. À Laurys, Agatita, menino Geovanne e Igor, pela parceria que foi além do profissional. Vocês tornaram o mestrado mais leve e prazeroso.

À Dra. Danielle Daian, sua linda, obrigada por existir e contribuir para o êxito desse trabalho. Agradeço a Deus por Ele ter cruzado os nossos caminhos. Sua maravishells!

A todos os meus familiares e amigos, obrigada por vibrarem e contribuírem para o sucesso dos meus projetos. Gratidão enorme pela empatia coletiva nesses últimos momentos, com direito a mimos e mensagens de carinho. Amo vocês!

Deus não escolhe os capacitados, Ele capacita os escolhidos.

Albert Einstein

RESUMO

Em dezembro de 2019 um novo membro da família *Coronaviridae*, *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), emergiu na China, e desencadeou um novo tipo de pneumonia viral denominada de doença do coronavírus 2019 (COVID-19). Atualmente a doença é classificada como uma pandemia e é a sexta emergência de saúde pública de interesse internacional já declarada pela Organização Mundial da Saúde. Desse modo, esforços hercúleos têm sido realizados por pesquisadores de todo o mundo para elucidar a infecção e patogênese de SARS-CoV-2 e traçar estratégias de vacinação e terapias antivirais eficazes. O vírus *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA) é um dos vetores de poxvirus mais bem estudado e mundialmente utilizado para expressão de genes heterólogos. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou a construção de um MVA recombinante (rMVA) expressando a enzima conversora de angiotensina II humana (hACE2), proteína utilizada pelo SARS-CoV-2 para infectar as células hospedeiras, para a criação de um modelo de infecção experimental do vírus. Em síntese, culturas de células BHK-21 foram infectadas com MVA selvagem (MVA-WT) e transfectadas com o plasmídeo de transferência contendo o cDNA da ACE2 humana, pLW44-ACE2, gerando através de recombinação homóloga, o vírus recombinante MVA expressando a hACE2 (rMVA-hACE2). Os vírus recombinantes passaram por rodadas de purificação de placa para eleição dos clones de rMVA-hACE2 mais robustos, e eliminação do MVA-WT; para posterior amplificação gradativa do vírus. Paralelamente à técnica de seleção em meio semissólido, foi proposta a utilização da técnica de *Cell sorting*. A utilização da nova técnica foi efetiva na obtenção de clones, além de permitir uma amplificação mais eficiente e rápida. O vírus recombinante construído teve a expressão da proteína confirmada por citometria de fluxo e posteriormente purificado e titulado. Os dados obtidos sugerem uma reformulação na técnica de produção de MVAs recombinantes e confirmam o sucesso do construto de rMVA-hACE2, tornando-o elegível para a proposta de construção do modelo de infecção experimental para SARS-CoV-2.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, ACE2, modelo animal, poxvirus, vetores recombinantes

ABSTRACT

In December 2019, a new member of the *Coronaviridae* family, *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), emerged in China, and triggered a new type of viral pneumonia called coronavirus disease 2019 (COVID-19). The disease is currently classified as a pandemic and is the sixth public health emergency of international concern ever declared by the World Health Organization. Thus, herculean efforts have been undertaken by researchers around the world to elucidate the infection and pathogenesis of SARS-CoV-2 and to outline effective vaccination strategies and antiviral therapies. Modified *Vaccinia* Ankara virus (MVA) is one of the best-studied poxvirus vectors used worldwide for expression of heterologous genes. In view of the above, the present work aimed at the construction of a recombinant MVA (rMVA) expressing the human angiotensin II converting enzyme (hACE2), a protein used by SARS-CoV-2 to infect host cells, for the creation of a model of experimental virus infection. In summary, cultures of BHK-21 cells were infected with wild-type MVA (MVA-WT) and transfected with the transfer plasmid containing the human ACE2 cDNA, pLW44-ACE2, generating through homologous recombination, the recombinant MVA virus expressing hACE2 (rMVA-hACE2). Recombinant viruses underwent rounds of plaque purification to choose the most robust rMVA-hACE2 clones and eliminate MVA-WT; for further gradual amplification of the virus. Parallel to the selection technique in semi-solid medium, the use of the Cell sorting technique was proposed. The use of the new technique was effective in obtaining clones, in addition to allowing a more efficient and faster amplification. The constructed recombinant virus had protein expression confirmed by flow cytometry and subsequently purified and titrated. The data obtained suggest a reformulation of the technique for producing recombinant MVAs and confirm the success of the rMVA-hACE2 construct, making it eligible for the proposed construction of an experimental infection model for SARS-CoV-2.

Keywords: SARS-CoV-2, ACE2, animal model, poxvirus, recombinant vectors

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIÇÃO	PÁG
Figura 1.	Representação esquemática da árvore filogenética dos coronavírus.	23
Figura 2.	Esquema do genoma de SARS-CoV-2.	24
Figura 3.	Esquema da partícula viral de coronavírus.	26
Figura 4.	Estrutura geral do complexo RBD-ACE2-B0AT1.	29
Figura 5.	Ciclo de multiplicação de SARS-CoV-2.	32
Figura 6.	Possível origem de SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2.	34
Figura 7.	Número de casos de COVID-19 relatados por região, pela OMS.	39
Figura 8.	Distribuição do número de casos de COVID-19 por território, região ou país representado por escala de cores.	40
Figura 9.	Número de casos acumulados de COVID-19 por data de notificação, com destaque para os estados com os maiores números de casos.	41
Figura 10.	Morfologia e estrutura de poxvírus.	46
Figura 11.	Ciclo de Multiplicação dos <i>Poxvírus</i> ,	48
Figura 12.	Representação esquemática do vetor de transferência pLW44-hACE2.	55
Figura 13.	Representação dos pares de bases presentes no vetor de transferência pLW44-hACE2.	56
Figura 14.	Geração de vírus recombinantes (rMVA-hACE2) em cultura de células BHK-21.	72
Figura 15.	Esquema de rodadas de seleção clonal em gel de agarose com transfecção não submetida ao <i>Cell sorting</i> .	74
Figura 16.	Esquema de rodadas de seleção clonal em gel de agarose com transfecção não submetida ao <i>Cell sorting</i> .	76
Figura 17.	Purificação em placa – Comparação da robustez de clones recombinantes (rMVA-hACE2) em cultura de células BHK-	78

21 (Agarose com 1ª rodada de *Cell sorting* X Agarose com 2ª rodada de *Cell sorting*).

- Figura 18. Eficiência dos métodos de purificação em placa (agarose x 1º *Cell sorting* x 2º *Cell sorting*) para amplificação. 81
- Figura 19. Amplificação de vírus recombinantes (rMVA-hACE2) em cultura de células BHK-21. Comparação da robustez de amplificação (Antes do 2º *Cell sorting* X Após o 2º *Cell sorting*). 83
- Figura 20. Amplificação gradativa de vírus recombinantes (rMVA-hACE2) em cultura de células BHK-21. Progressão e eficiência de amplificação (antes do 2º *Cell sorting* x após 2º *Cell sorting*) 85
- Figura 21. Análise da expressão da proteína ACE2 pelo vetor MVA recombinante. 87

LISTA DE TABELAS

TABELA	DESCRIÇÃO	PÁG
Tabela 1.	Síntese do número de casos, óbitos, incidência e mortalidade da COVID-19 por região brasileira.	41

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

+ssRNA	GAGs - glicosaminoglicanos
ACE2 – enzima conversora de angiotensina II	GFP – Green Fluorescent Protein
ADE – aumento dependente de anticorpo	hACE2 – enzima conversora de angiotensina humana
anti-S-IgG – anticorpo anti-imunoglobulina-G-S	HCoV – coronavírus humano
CAP - capeamento	HGT – transferência gênica horizontal
cDNA – fita de DNA complementar	HR1 – região de repetição do heptato 1
CEF – células de fibroblastos de embrião de galinha	HR2 - região de repetição do heptato 2
CEV - envelope associado à célula	ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
CLD – domínio de colectrina C-terminal	IEV – vírus envelopado intracelular
CoV - coronavírus	IMV – vírus intracelular maduro
COVID-19 – Doença do coronavírus 2019	Kb - kilobases
CTD – domínio C-terminal	kd – constante de dissociação
CVA - Vaccinia Chorioallantois Ankara	kDa - quilodaltos
DNA – ácido desoxirribonucleico	L-15- meio Leibowitz-15
dNTP – desoxinucleotídeo trifosfato	LB – meio Luria Broth
DTT - ditioneitol	M – glicoproteína M
E – glicoproteína E	MEM – meio mínimo de Eagle
ECP – efeito citopático	min – minutos
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético	mL - mililitro
EEV – vírion externo envelopado	mM – milimolar
ERGIC – complexo intermediário ER-Golgi	M.O.I – multiplicidade de infecção
FcR – receptor Fc	mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
FP – peptídeo de fusão	MERS – síndrome respiratória do Oriente Médio
g - gravidade	MERS-CoV – coronavirus da síndrome respiratória do Oriente Médio
	MV – vírus maduros
	MVA – <i>Vaccinia</i> Ankara Modificado
	N – proteína do nucleocapsídeo
	NCLDV – vírus de DNA nucleocitoplasmático

nm - nanômetro
NSPs – proteínas não estruturais
nt - nucleotídeo
NTD – domínio N-terminal
OMS – Organização Mundial da Saúde
ORFs – janela de leitura aberta
ORORs – proteínas acessórias codificadoras
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR – reação em cadeia da polimerase
PD – domínio peptidase
PFU – unidade formadora de placa
pH – potencial hidrogeniônico
R0 – número reprodutivo básico
RBD – domínio de ligação ao receptor
RE – retículo endoplasmático
rpm – rotações por minuto
RNA – ácido ribonucleico
RRAR –
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase associada
S – glicoproteína S
SARS – síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV – coronavírus da síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV-2 – coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
SDS – sódio dodecil sulfato
SDRA – síndrome do desconforto respiratório agudo
SFB – soro fetal bovino
sgRNAs – RNAs subgenômicos
SRA – sistema renina-angiotensina
ssRNA – RNA de fita simples
TAE – tampão Tris acetato EDTA
TBE – tampão Tris-borato-EDTA
TE – tampão Tris EDTA
TGH – transferência gênica horizontal
TMPRSS2 - protease serina do tipo transmembranar II
UV - ultravioleta
V - volts
VACV – *Vaccinia virus*
VARV – *Variola virus*
WHO – World Health Organization
 α -CoV - *Alphacoronavirus*
 β -CoV - *Betacoronavirus*
 γ -CoV - *Gammacoronavirus*
 δ -CoV – *Deltacoronavirus*
 μ L – microlitro
 μ g - micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	FAMÍLIA CORONAVIRIDAE	22
2.1.1	Aspectos taxonômicos e filogenéticos	22
2.1.2	Estrutura do genoma	23
2.1.3	Partícula viral	25
2.1.4	Ciclo de multiplicação dos coronavírus	27
2.1.4.1	Enzima Conversora de Angiotensina II (ACE2)	27
2.1.4.2	Ciclo de multiplicação	29
2.1.5	Origem e transmissão de SARS-CoV-2	32
2.1.6	COVID-19	34
2.1.7	Manifestações clínicas e fisiopatologia	35
2.1.8	Epidemiologia	38
2.1.9	Modelos animais	42
2.2	FAMÍLIA POXVIRIDAE	44
2.2.1	Relações filogenéticas	44
2.2.2	Estrutura genômica	44
2.2.3	Partícula viral	45
2.2.4	Ciclo de multiplicação dos poxvírus	46
2.2.5	Poxvírus como vetores virais e o vírus <i>Vaccinia</i> Ankara Modificado (MVA)	49
3	JUSTIFICATIVA	51
4	OBJETIVOS	53
4.1	OBJETIVO GERAL	53
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
5	METODOLOGIA	54
5.1	CONSTRUÇÃO DO VETOR DE TRANSFERÊNCIA – PLASMÍDEO pLW44-hACE2	54
5.2	CULTURA DE CÉLULAS BHK-21	56
5.3	AMOSTRAS DE VÍRUS	57
5.3.1	Vírus MVA selvagem	57
5.3.1.1	Origem e multiplicação	57
5.3.1.2	Purificação	58
5.3.1.3	Titulação	58

5.3.2	Vírus MVA-GFP	59
5.3.3	Vírus recombinante rMVA-hACE2	59
5.3.3.1	Transfecção de células	59
5.3.3.2	Seleção de vírus recombinante	60
5.3.3.2.1	Purificação em Placa e triagem por microscopia de fluorescência	60
5.3.3.2.2	<i>Cell sorting</i>	61
5.3.3.3	Amplificação e purificação	62
5.3.3.4	Titulação e Estoque Viral	65
5.4	CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DOS VÍRUS RECOMBINANTES	66
5.4.1	Extração de material genético e Verificação da Presença do Inseto no vírus recombinante	66
5.4.2	Avaliação da expressão da proteína hACE2	68
6	RESULTADOS	71
6.1	CONSTRUÇÃO DO VÍRUS rMVA-hACE2	71
6.1.1	Transfecção	71
6.1.2	Seleção clonal – Purificação em placa x <i>Cell sorting</i>	73
6.1.3	Amplificação viral	82
6.2	Confirmação da expressão da proteína hACE2	86
7	DISCUSSÃO	88
8	CONCLUSÕES	94
9	PERSPECTIVAS	95
10	REFERÊNCIAS	96
11	GLOSSÁRIO	121

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, um surto de pneumonia de etiologia desconhecida surgiu na província de Hubei, cidade de Wuhan, China (SOHRABI et al, 2020; HARAPAN et al, 2020). Suas características clínicas eram muito semelhantes às de uma pneumonia viral e após análises de amostras do trato respiratório, realizadas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças da China, um novo tipo de coronavírus foi proposto como o causador da enfermidade. O vírus recém-descoberto foi nomeado oficialmente pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), como *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), e a doença recebeu o nome oficial de doença do coronavírus 2019 (COVID-19), pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (CUI, LI e CHI, 2019; LAI et al, 2020; WANG et al, 2020; WHO, 2020).

O SARS-CoV-2 é o terceiro coronavírus a desencadear uma epidemia em larga escala no século XXI, após o *Severe acute respiratory syndrome coronavirus* (SARS-CoV), em 2002, e o *Middle East Respiratory Syndrome-related Coronavirus* (MERS-CoV) em 2012. (WHO, 2019; ALANAGREH, ALZOUGHLOOL, ATOUM, 2020; SHEREEN et al, 2020; YANG et al, 2020; WANG et al, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 uma pandemia no dia 11 de março de 2020, dada sua sintomatologia distinta e velocidade de propagação. Até a data de 6 de janeiro de 2023, a OMS registrou mais de 657 milhões de casos de COVID-19 distribuídos em todo o mundo e mais de 6,5 milhões de óbitos (WHO, 2023).

Em 2021, muitas vacinas foram desenvolvidas com sucesso em todo o mundo, sendo mais de 13 milhões de doses administradas até 22 de dezembro de 2022, segundo a OMS (WHO, 2023). Além disso, também foram alcançados avanços com medicamentos antivirais, como o Paxlovid e Molnupiravir, por exemplo, ambos demonstrando bons efeitos terapêuticos (WEN et al, 2022). Entretanto, mesmo que grandes progressos tenham sido obtidos na pesquisa da COVID-19, ainda há um grande número de questões a serem respondidas, dentre elas a origem do vírus, a razão de sua alta transmissibilidade e os mecanismos subjacentes ao seu amplo espectro de manifestações clínicas. Adicionalmente, com o surgimento e detecção das variantes de SARS-CoV-2, acima de tudo, as variantes de

preocupação (VOCs), a pesquisa da COVID-19 entrou em uma nova fase (MUNÓZ-FONTELA et al, 2022).

Nesse aspecto, os modelos animais representam um componente indispensável na pesquisa da COVID-19, uma vez que podem reproduzir as características clínicas e patológicas da doença em humanos. Sendo assim, são essenciais para estudos sobre interação vírus-hospedeiro, patogênese viral, transmissão, agentes terapêuticos e vacinas (CHU, CHAN e YUEN, 2022).

No tocante à interação vírus-hospedeiro, a entrada mediada por receptor é a primeira etapa de uma infecção viral na célula hospedeira. O domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína S de SARS-CoV e SARS-CoV-2 interage com a enzima conversora de angiotensina II (ACE2) humana na etapa de adsorção do ciclo de multiplicação do vírus para permitir a sua ligação e posterior penetração na célula alvo (YUAN et al, 2020).

Considerando estudos experimentais, os camundongos (*Mus musculus*), modelos largamente utilizados na pesquisa, não são naturalmente suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2, já que a enzima conversora de angiotensina 2 de camundongo (mACE2) não interage com o receptor do vírus (SUN et al, 2020; BI et al, 2021; CHU, CHAN e YUEN, 2022; JOHANSEN et al, 2022; MUÑOZ-FONTELA et al, 2022; PANDAMOOZ et al, 2022).

Sendo assim, os camundongos podem ser sensibilizados à infecção por SARS-CoV-2 através de diferentes estratégias, dentre as quais, se destaca a introdução da expressão de hACE2 utilizando a transdução de vetor viral (SUN et al, 2020).

Nesse sentido, os poxvírus recombinantes têm sido propostos como refinadas ferramentas de trabalho para a pesquisa básica e aplicada. Uma propriedade relevante e bem sucedida dos vetores virais de poxvírus consiste na eficiência de entrega e expressão de genes exógenos para a síntese de proteínas recombinantes (SUTTER e STAIB, 2003; LUNDSTROM, 2018). Dentre os principais poxvírus atenuados em uso, destaca-se o *Vaccinia Ankara Modificado* (MVA, do inglês *Modified Vaccinia Ankara*), um poxvírus altamente atenuado e frequentemente utilizado como vetor viral (VERHEUST et al, 2012; ALTENBURG et al, 2017).

Nesse aspecto, embora a geração de MVAs seja bem sucedida com a metodologia tradicional (STAIB, DREXLER e SUTTER, 2004), a etapa de purificação em placa tem sido relatada como um dos pontos mais críticos na construção de

rMVAs, sendo referida como demorada e tediosa (BARBIERI et al, 2018; KUGLER et al, 2019; ANTOSHKINA et al, 2022). Sendo assim, a geração de MVAs recombinantes vem sendo aperfeiçoada e diversas metodologias alternativas e/ou auxiliares têm sido projetadas e propostas (STAIB et al , 2004; HOLZER et al, 2005; BARBIERI et al, 2018; KUGLER et al, 2019; ANTOSHKINA et al, 2022).

Desse modo, o presente trabalho objetivou a construção de um vírus MVA recombinante expressando a ACE2 humana, propondo ajuste de técnica, para a criação de um modelo de infecção experimental para ao SARS-CoV-2.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FAMÍLIA CORONAVIRIDAE

2.1.1 Aspectos taxonômicos e filogenéticos

A classificação atualizada dos coronavírus (CoV) abrange 39 espécies incluídas em 27 subgêneros. Estes, por sua vez, são agrupados em cinco gêneros de duas subfamílias, que pertencem à família *Coronaviridae*, subordem *Cornidovirineae*, ordem *Nidovirales* e reino *Riboviria* (ZIEBUHR et al, 2017; FUNG e LIU, 2019; SIDDELL et al, 2019; ZIEBUHR et al, 2019; ICTV, 2020; CHEN et al, 2020).

Anteriormente denominado de 2019-nCoV e, atualmente classificado pelo ICTV como *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), este novo CoV faz parte da subfamília *Coronavirinae* (ICTV, 2020; JIN et al, 2020; NADEEM et al, 2020). Esta subfamília compreende quatro gêneros: *Alphacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV), *Gammacoronavirus* (γ -CoV) e *Deltacoronavirus* (δ -CoV). O SARS-CoV-2 é um β -CoV incluído no subgênero *Sarbecovirus*. Os β -CoV e α -CoV infectam, exclusivamente, mamíferos. Os outros dois gêneros compreendem coronavírus parasitas de aves com alguns deles infectando mamíferos. A figura 1 esquematiza a árvore filogenética dos CoVs, com destaque para o recente acréscimo de SARS-CoV-2 (WOO et al, 2012; CUI, LI e SHI, 2018; CHEN et al, 2020; JIN et al, 2020; MUHAMMAD et al, 2020; TAY et al, 2020; WROBEL et al, 2020; WU et al, 2020).

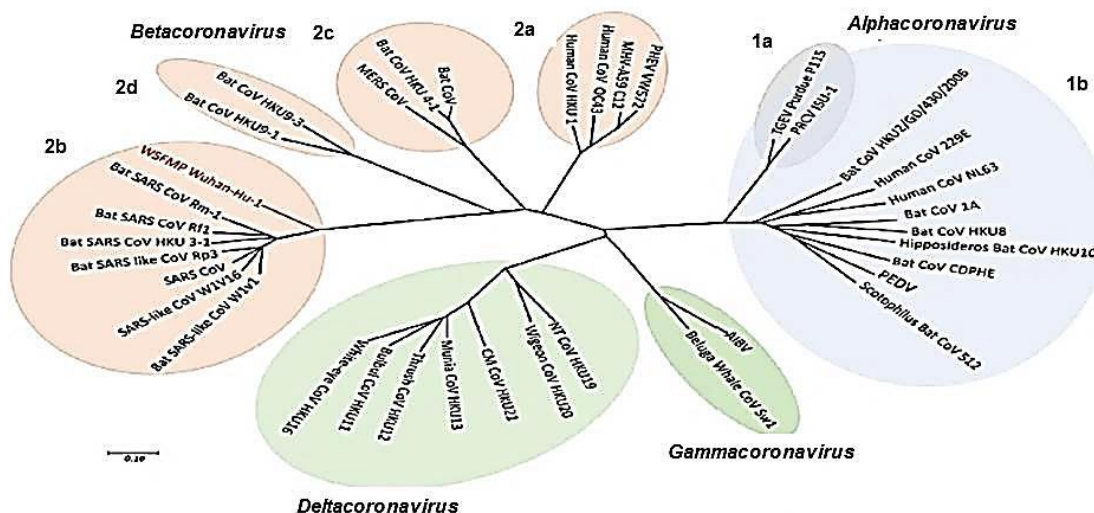


Figura 1. Representação esquemática da árvore filogenética dos coronavírus. O conteúdo destacado em vermelho resalta a atual adição do recém-emergido SARS-CoV-2 e o WSFMP Wuhan-Hu-1 é utilizado como referência na árvore. A árvore filogenética que aponta a relação de Wuhan-Hu-1 (destacada em vermelho) com coronavírus selecionado é baseada em sequências nucleotídicas do genoma completo. Os vírus estão organizados em quatro gêneros: *Alphacoronavirus* (azul), *Betacoronavirus* (rosa), *Gammacoronavirus* (verde) e *Deltacoronavirus* (azul claro). Os agrupamentos de subgrupos são rotulados como 1a e 1b para o *Alphacoronavirus* e 2a, 2b, 2c e 2d para o *Betacoronavirus*. Essa árvore tem embasamento nas árvores publicadas para a subfamília *Coronavirinae* e reconstruída com sequências da região completa de codificação da RNA polimerase dependente de RNA dos novos coronavírus representativos (método de máxima verossimilhança usando o software MEGA 7.2). Legenda: coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV); coronavírus relacionado à SARS (SARSr-CoV); coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV); vírus da diarreia entérica porcina (PEDV); Pneumonia no mercado de frutos do mar de Wuhan (Wuhan-Hu-1). BatCoV RaTG13 demonstrou alta identidade de sequência para SARS-CoV-2 (MUHAMMAD et al, 2020).

2.1.2 Estrutura do genoma

Os CoVs são vírus de RNA de fita simples, senso positivo (+ssRNA) e não segmentado. O tamanho do genoma é variável, entre 27 e 32 kilobases (kb), sendo um dos maiores vírus de RNA descritos (CUI, LI e SHI, 2018; ALANAGREH, ALZOUGHLOOL, ATOUM, 2020; CHEN et al, 2020; LAI et al, 2020; NADEEM et al, 2020; SHEEREN et al, 2020; SIVARAMAN et al, 2020; SU et al, 2020; WANG et al, 2020).

O RNA genômico dos CoVs codifica uma cadeia de poliproteínas compostas por 16 proteínas não estruturais e quatro proteínas estruturais; apresenta uma estrutura do tipo cap em 5' e é poliadenilado na região 3', além de conter várias janelas de leitura aberta (ORFs). A ordem dos genes é basicamente: 5-replicase-(glicoproteína spike – S)- (proteína do envelope – E)-(glicoproteína de membrana – M)-(proteína do nucleocapsídeo - N)-3, com vários ORFs (proteínas acessórias

codificadoras) pequenos espalhados entre os genes estruturais. Duas grandes ORFs (ORF1a e ORF1b), ocupam aproximadamente dois terços do genoma e são responsáveis por codificarem a replicase dos CoVs, que é diretamente traduzida a partir do RNA genômico. Os genes estruturais e acessórios, são traduzidos a partir de RNAs subgenômicos (sgRNAs) originados durante a transcrição/replicação do genoma (FUNG e LIU, 2019).

O genoma de SARS-CoV-2 possui aproximadamente 30 kb. Ele apresenta sequências terminais 5' e 3' típicas dos β -CoV, com 265 nucleotídeos não traduzidos (nt) na extremidade terminal 5' e 229 nt não traduzidos na extremidade terminal 3' (JIN et al, 2020; WU et al, 2020). Os comprimentos das sequências genômicas são: 3822 nt para o gene S, 228 nt para o gene E, 669 nt para o gene M e 1260 nt para o gene N. Semelhante ao SARS-CoV, SARS-CoV-2 carrega o gene ORF8 previsto, com 366 nt de comprimento, localizado entre os genes ORF M e N. Além disso, o gene ORF1ab da replicase previsto possui 21.291 nt de comprimento e contém 16 proteínas não estruturais (NSPs) denominadas (NSP1-NSP16), seguidas por, pelo menos, 13 ORFs a jusante. Outras ORFs na extremidade 3' codificam proteínas estruturais, incluindo S, E, M e N. A figura 2 exemplifica o genoma de SARS-CoV-2 (CHEN et al, 2020; JIN et al, 2020; WU et al, 2020; ZHU et al, 2020).

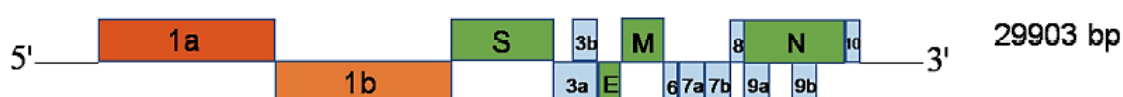


Figura 2. Esquema do genoma de SARS-CoV-2. Sequências terminais 5' e 3' do genoma de SARS-CoV-2. A ordem dos genes é 5'- replicase ORF1ab – spike S - envelope (E) - membrana (M) – N - 3'. ORF3ab, ORF6, ORF7ab, ORF8, ORF9ab e ORF10 estão localizados nas posições previstas mostradas na figura. 1a, 1b, 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9a, 9b, 10 na figura representam diferentes genes ORF (Modificado de JIN et al, 2020).

As taxas de mutações estimadas dos coronavírus variam de moderadas a altas em comparação com as de outros vírus de ssRNA (SU et al, 2016). Os dois locais genéticos de maior variabilidade no SARS-CoV estão localizados no gene da proteína S e no gene acessório ORF8. No MERS-CoV, os principais locais de variação estão localizados nos genes S, ORF4b e ORF3 (WOLF et al, 2018). Já para SARS-CoV-2 as principais diferenças na sequência do gene S são três

inserções curtas no domínio N-terminal e alterações em quatro dos cinco resíduos principais no motivo de ligação ao receptor (CHEN et al, 2020; ZHOU et al, 2020).

Com base nessas mutações, Tang e colaboradores et al (2020) demonstraram que SARS-CoV-2 evoluiu para dois tipos principais: o haplótipo “CT” foi definido como o tipo “L”, pois T28.144 codifica leucina, enquanto o haplótipo “TC” foi definido como o tipo “S” porque C28.144 codifica a serina. Devido à pressão seletiva severa no tipo L, este parece ser mais prevalente e agressivo, além de se espalhar mais rapidamente. Já o tipo “S” pode ser ancestral e permanecer mais suave devido à pressão seletiva relativamente mais fraca. Hospedeiros humanos são suscetíveis a um ou aos dois tipos (CHEN et al, 2020; TANG et al, 2020).

2.1.3 Partícula viral

Os CoVs são vírus envelopados, de forma esférica ou pleomórfica e possuem um diâmetro que varia entre 80 e 120 nm. A superfície externa do vírion é ornamentada com projeções que remetem ao formato de uma “coroa”, constituídas pela glicoproteína *spike* (S); sendo essa a característica responsável pelo nome da família (MASTERS, 2006; FUNG e LIU et al, 2019; CHEN et al, 2020).

A partícula viral de SARS-CoV-2 possui um diâmetro aproximado de 60 a 100 nm e formato esférico a oval, com picos únicos que variam de 9 a 12 nm (ZHU et al, 2020; JIN et al, 2020). A glicoproteína S é a proteína de superfície mais importante, pois permite a adsorção e posterior penetração na célula hospedeira (WALLS et al, 2020). Sua estrutura compreende duas subunidades proteoliticamente ativadas: subunidade S1, que compreende o domínio N-terminal (NTD) e um domínio de ligação ao receptor (RBD), também conhecido como domínio C-terminal (CTD) e uma subunidade S2 (COUTARD et al, 2020). O RBD envolve o receptor hospedeiro (SRINIVASAN et al, 2020). A subunidade S2 consiste em uma região de peptídeo de fusão (FP) e duas regiões de repetição do heptato: HR1 e HR2 (BOSCH et al, 2004; LIU et al, 2020; TAY et al, 2020). A subunidade S2 fica responsável pela fusão com a membrana da célula hospedeira (SRINIVASAN et al, 2020). A glicoproteína S revela uma conformação homotrimérica com as subunidades S1 e S2 presentes em cada unidade monomérica. A figura 3 esquematiza a partícula viral de SARS-CoV-2 (YUAN et al, 2017; SIVARAMAN et al, 2020; ALANAGREH, ALZOUGHLOO, ATOUM, 2020).

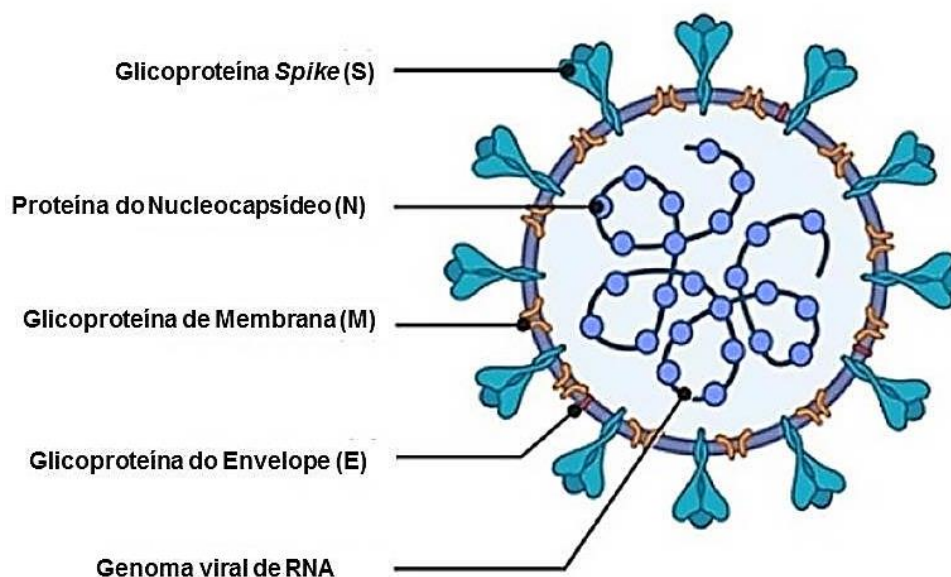


Figura 3. Esquema da partícula viral de coronavírus. Adaptado de ALANAGREH, ALZOUGHLOOL, ATOUM, 2020.

O envelope viral é constituído, principalmente, pela glicoproteína de membrana (M), a proteína estrutural de maior abundância incorporada ao envelope através de três domínios transmembranares. Ela é responsável pela formação do vírion (MASTERS, 2006). Além dessa, uma pequena proteína transmembranar conhecida como proteína do envelope (E) também está presente, apesar de em menor quantidade. Essa auxilia na montagem e liberação dos vírus. Tanto a proteína M quanto a proteína E estão localizadas entre as proteínas S no envelope do vírus (LIU e INGLIS, 1991; FUNG e LIU; 2019; WU et al, 2020).

Também existe a proteína do nucleocapsídeo (N), responsável por empacotar o genoma. Quando ligada ao RNA adquire um formato que lembra “miçangas” penduradas em uma corda, formando um nucleocapsídeo helicoidalmente simétrico. Sua posição é interna à bicamada fosfolipídica do envelope. Além dessas quatro proteínas principais, também existem proteínas estruturais e acessórias específicas para cada espécie (MASTERS, 2006; DEDIEGO et al, 2006; NEUMAN et al, 2011; DEMODGINES, FARZAN e SAWYER, 2012; CUI et al, 2015; FUNG e LIU; 2019; JIN et al, 2020).

2.1.4 Ciclo de multiplicação dos coronavírus

2.1.4.1 *Enzima Conversora de Angiotensina II (ACE2)*

A interação com o receptor alvo é o principal determinante da gama de hospedeiros e do tropismo tecidual para um vírus. Nesse aspecto, alguns coronavírus humanos (hCoVs) adotaram enzimas de superfície celular como receptores alvos no processo de infecção (FUNG e LIU, 2019; HOFFMANN et al, 2020; LETKO, MARZI e MUNSTER, 2020; WALLS, et al, 2020; WAN et al, 2020; YAN et al, 2020; WU et al, 2020). A enzima conversora de angiotensina II (ACE 2) humana, a princípio, descrita como um receptor funcional para SARS-CoV, também atua como receptor para o alfacoronavírus HCoV-NL63 (LI et al, 2003 e JACKSON et al, 2021) e para o SARS-CoV-2 (JIN et al, 2020; LI et al, 2020; ZHOU et al, 2020).

Originalmente descrita no ano 2000, a ACE2 têm sido sugerida como um homólogo da enzima conversora de angiotensina (ACE), uma vez que exibem 42% de homologia de sequência de aminoácidos (SAMAVATI e UHAL, 2020; MEDINA-ENRÍQUEZ et al, 2020). O gene codificante da ACE2 está localizado no cromossomo X e mapeado na posição Xp22. Ele possui 39,98 kb de tamanho e contém 18 éxons e 20 íntrons. Esse gene passa por splicing alternativo gerando seis variantes que são responsáveis pelo seu alto grau de polimorfismo. Essas variantes genéticas foram associadas a várias doenças, tais como hipertensão, doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e diabetes; algumas dentre as quais, são fatores predisponentes para o desenvolvimento da forma grave da COVID-19 ou fazem parte da sintomatologia da doença (CRACKOWER et al, 2002; DEVAUX, ROLAIN e RAOULT, 2020; MEDINA-ENRÍQUEZ et al, 2020; SAMAVATI e UHAL, 2020).

Para além de seu papel como receptor para alguns coronavírus, o seu papel fisiológico principal é o de maturar a angiotensina (Ang), um hormônio peptídico que controla a vasoconstrição e a pressão sanguínea (YAN et al, 2020). A ACE2 também funciona como acompanhante no tráfego de membranas do transportador de aminoácidos B0AT1, também conhecido como SLC6A19, que medeia a captação de aminoácidos neutros nas células intestinais de uma maneira dependente de sódio (YAN et al, 2020).

A ACE2 é amplamente expressa nos pulmões, que com uma vasta área de superfície torna o tecido pulmonar altamente suscetível à infecção por SARS-CoV-2 (HAMMING et al, 2004). Além dos pulmões, o receptor ACE2 também é expresso nas células endoteliais do coração, rim e intestinos, e esses órgãos são todos vulneráveis ao SARS-CoV-2 (JIN et al, 2020; XU et al, 2020; TAY et al, 2020; WALLS et al, 2020; YAN et al, 2020; ZHANG et al, 2020; ZHAO et al, 2020; ZOU et al, 2020).

Essa enzima é uma glicoproteína de membrana integral do tipo I. Sua estrutura completa consiste de um domínio peptidase (PD) N-terminal ativo, com dois lobos, semelhante à estrutura de uma “garra” e extracelular. Além disso, há também um domínio de colectrina C-terminal (CLD) que termina em uma hélice única transmembranar, mais um segmento intracelular de aproximadamente 40 resíduos. Esse último pode assumir conformações “abertas” e “fechadas” (ZHANG et al, 2001; HAMMING et al, 2004; JIN et al, 2020; NADEEM et al, 2020; SIVARAMAN et al, 2020; YAN et al, 2020; ZHANG e LIU, 2020). Além disso, ACE 2 é uma enzima do tipo metalopeptidase de zinco que contém 805 aminoácidos e um único domínio catalítico que funciona no metabolismo de peptídeos circulantes (HAMMING et al, 2007; FAM et al, 2020; HUSSAIN et al, 2020; ZHANG et al, 2020).

A interação da glicoproteína S de SARS-CoV-2 com ACE2 e sua subsequente clivagem por uma serina protease e fusão, são os principais eventos na fisiopatologia da COVID-19 (NADEEM et al, 2020). Seis aminoácidos são críticos para a ligação de ACE2 à proteína S de SARS-CoV-2: Leu455, Phe486, Gln493, Ser494, Asn501 e Try505 (ANDERSEN et al, 2020; WAN et al, 2020). A glicoproteína S exibe uma alta afinidade de ligação com ACE2, o que pode ser confirmado pelo baixo valor da constante de dissociação (kd 15nM). Ainda, a afinidade de ligação ao receptor da proteína S de SARS-CoV-2 é 10 vezes maior que a da proteína S de SARS-CoV (PEIRIS, GUAN e YUEN, 2004; WU et al, 2012; KIRCHDOERFER et al, 2018; WAN et al, 2020; WRAPP et al, 2020). Essa forte afinidade pode ser outra razão pela qual o SARS-CoV-2 se dissemina mais rapidamente. A figura 4 esquematiza a estrutura geral do complexo RBD-ACE2-BOAT1 (SIVARAMAN et al, 2020; YAN et al, 2020).

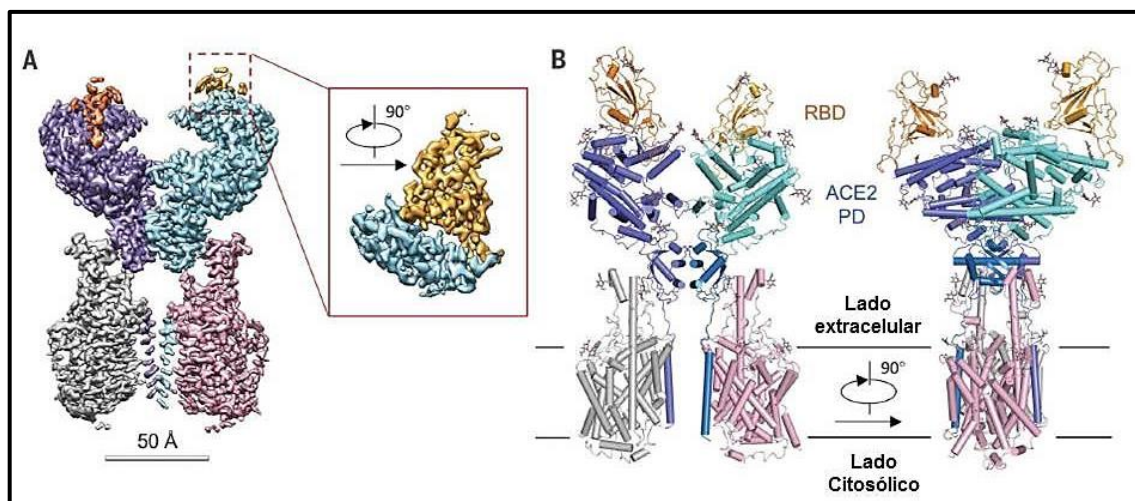


Figura 4. Estrutura geral do complexo RBD-ACE2-B0AT1. A etapa inicial da entrada do vírus SARS-CoV-2 durante a infecção é a ligação da proteína de pico trimérica viral (clivada nas subunidades S1 e S2, a primeira das quais contém o domínio de ligação do receptor, RBD) ao receptor dimérico da angiotensina - enzima conversora 2 (ACE2) que está aqui representada no complexo com a proteína de membrana que ela acompanha, B0AT1. ACE2 é formado por um domínio N-terminal de peptidase (PD) e o domínio C-terminal semelhante à colectrina (CLD). ACE2 mostra uma conformação fechada e uma conformação aberta (representada) no nível de contato PD; no entanto, apenas a conformação fechada liga o RBD de SARS-Cov-2. A) Estrutura do complexo: protômero A de ACE2 (ciano), protômero B de ACE2 (azul), protômero A de B0AT1 (rosa) e protômero B de B0AT1 (cinza). A porção vermelha e a porção dourada representam os protômeros de RBD. As porções de glicosilação são mostradas como bastões. O complexo é colorido por subunidades, com o PD e CLD em um protômero ACE2 colorido em ciano e azul, respectivamente. B) Uma conformação aberta e fechada do complexo. Os dois PDs, que entram em contato um com o outro na conformação fechada, são separados na conformação aberta. (Adaptado de YAN et al, 2020).

2.1.4.2 Ciclo de multiplicação

Como parasitas intracelulares obrigatórios restritos por capacidades genômicas limitadas, todos os vírus evoluíram para manipular fatores de seus hospedeiros de forma a facilitar sua multiplicação. O ciclo de multiplicação dos CoVs, assim como dos demais vírus, é dividido em etapas: adsorção, penetração, desnudamento, tradução da replicase viral, replicação do genoma, tradução de proteínas estruturais, morfogênese e liberação dos vírions, respectivamente (FUNG e LIU, 2019).

A adsorção se inicia com a ligação da proteína S ao receptor na superfície celular da célula hospedeira. A RBD de S se liga ao domínio peptidase (PD) da ACE2, o que inicia o processo de infecção (ZHOU et al, 2020). Trabalhos recentes demonstram que SARS-CoV-2 penetra na célula hospedeira via endocitose mediada por receptor (CHOU, 2007; OU et al, 2020). A ligação da RBD à ACE2 desencadeia a endocitose do vírion SARS-CoV-2 e a expõe a proteases endossômicas

(SIMMONS et al, 2005). A ACE2 é clivada por uma protease serina do tipo transmembranar II (TMPRSS2) para ativar a penetração do vírus (NADEEM et al, 2020). No interior do endossomo, a subunidade S1 é clivada, expondo o peptídeo de fusão, que se insere na membrana hospedeira. A região S2 se dobra sobre si mesma para reunir as regiões HR1 e HR2. Isso desencadeia a fusão com a membrana e liberação do pacote viral no citoplasma do hospedeiro (TAY et al, 2020). A glicoproteína S de SARS-CoV-2 e SARS-CoV interage com ACE 2 em condições de pH neutro para fusão ou endocitose e penetração nas células hospedeiras (MASTERS, 2006; SIVARAMAN et al, 2020).

É relevante ressaltar que SARS-CoV-2 possui um local de clivagem multibásico rico em arginina, também denominado como local de clivagem da furina (RRAR) que é sensível à furina, uma enzima presente nas células hospedeiras (WRAPP et al, 2020; WALLS et al, 2020; HOFFMANN et al, 2020). Através de análise mutacional, um estudo confirmou que o local de clivagem da furina deve permanecer intacto para o processamento proteolítico de alta eficiência da glicoproteína S de SARS-CoV-2 e posterior penetração na célula hospedeira (HOFFMANN et al, 2020; SIVARAMAN et al, 2020).

Após a penetração e posterior desnudamento, o RNA genômico serve de molde para permitir que a tradução da ORF1a produza a poliproteína pp1a. A clivagem autoproteolítica de pp1a e pp1ab, está última traduzida da ORF1b, gera 15 a 16 proteínas não estruturais (nsps) com diversas funções (MASTERS, 2006; FUNG e LIU, 2019).

A próxima etapa no ciclo de vida dos coronavírus é a transcrição e replicação de seu genoma. Utilizando o RNA genômico como molde, a replicase dos CoVs sintetiza o RNA de sentido negativo completo, que por sua vez é utilizado como molde para a síntese do RNA genômico. A polimerase também pode alternar o molde durante a transcrição, produzindo assim um conjunto aninhado de sgRNAs negativos, que são utilizados como moldes para a síntese de um conjunto aninhado de 3 sgRNAs sensoriais (MASTERS, 2006; FUNG e LIU, 2019).

A tradução das proteínas estruturais ocorre posteriormente à fase de biossíntese do material genético. A grande maioria dos sgRNAs de coronavírus é funcionalmente monocistrônica. Proteínas estruturais da membrana (S, M e E), além de algumas proteínas acessórias associadas à membrana são traduzidas no retículo endoplasmático (RE), enquanto a proteína N é traduzida por ribossomos livres no

citossol (MASTERS, 2006). Além disso, a maioria das proteínas estruturais dos CoVs estão sujeitas a modificações pós-traducionais que modulam suas funções; como por exemplo, as proteínas S e M que são modificadas por glicosilação. O dobramento e a maturação adequada de proteínas transmembranares virais, especialmente a glicoproteína S, também é fortemente dependente de proteínas chaperonas no RE, como por exemplo, a calnexina (FUKUSHI et al, 2012; FUNG e LIU, 2018; ZHENG et al, 2018; FUNG e LIU, 2019).

A montagem das partículas virais ocorre no compartimento intermediário entre o RE e o complexo de Golgi ER-Golgi (ERGIC) e é orientada pela proteína M (KLUMPERMAN et al, 1994; MASTERS, 2006). A interação homotípica da proteína M fornece o suporte para a morfogênese dos vírions, enquanto as interações M-S e M-N facilitam o recrutamento de componentes estruturais para o local de montagem (HOGUE e MACHAMER, 2008). A proteína E também contribui para a montagem das partículas, interagindo com M e induzindo a curvatura da membrana (LIM e LIU, 2001). No final da multiplicação, as partículas de CoVs são transferidas para o ERGIC e transportadas em vesículas de parede lisa, onde são trafegadas pela via secretora para posterior liberação por exocitose. A figura 5 ilustra o ciclo de vida de SARS-CoV-2 (FUNG e LIU, 2019; ALANAGREH, ALZOUGHLOOL, ATOUM, 2020).

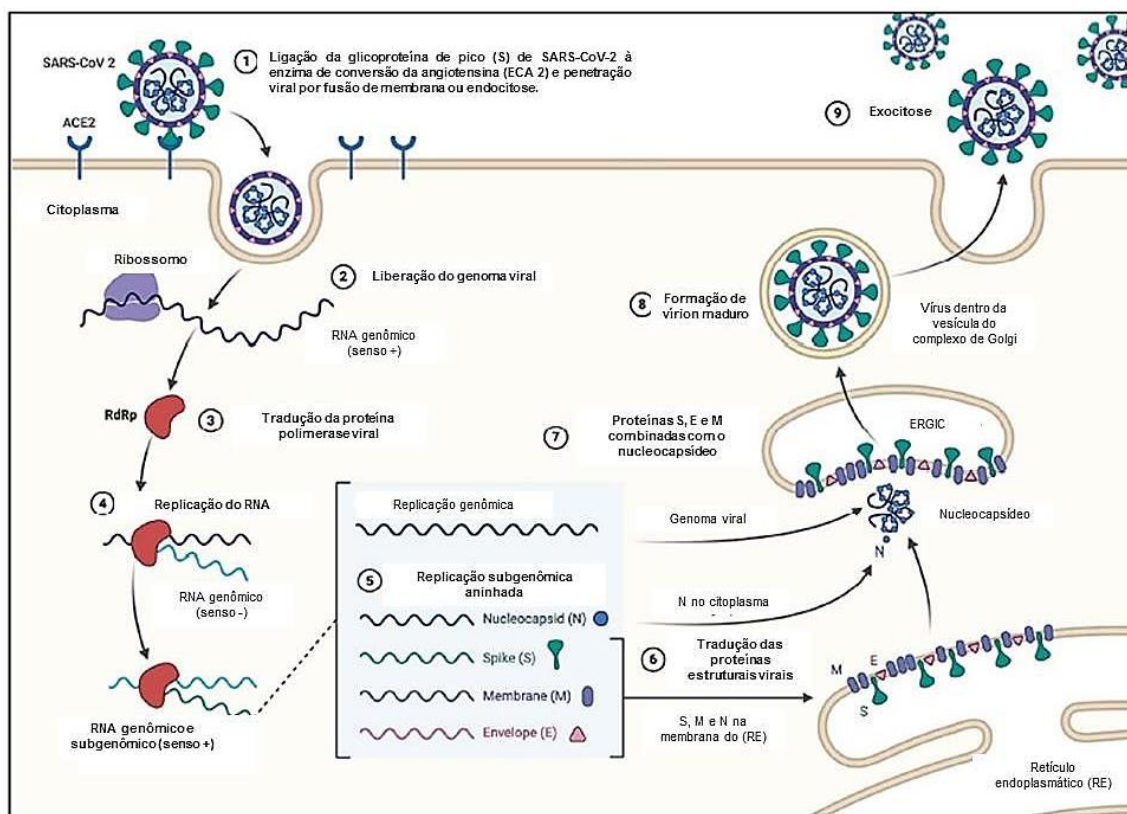


Figura 5. O ciclo de multiplicação de SARS-CoV-2 na célula hospedeira. As glicoproteínas S do vírion ligam-se à enzima conversora de angiotensina II (ACE2) do receptor celular do hospedeiro e penetram nas células alvo através de uma via endossômica. Após a entrada do vírus na célula hospedeira, o RNA viral é exposto no citoplasma, posteriormente ao desnudamento do vírus. ORF1a e ORF1ab são traduzidos para produzir poliproteínas pp1a e pp1ab, que são clivadas pelas proteases do RTC. Durante a replicação, o RTC direciona as cópias de RNA de comprimento total (-) do genoma e é usado como modelo para os genomas de RNA de comprimento total (+). Durante a transcrição, um conjunto aninhado de RNAs subgenômicos (sgRNAs) é produzido de maneira a transcrição descontínua (transcrição fragmentada). Mesmo que esses sgRNAs possam ter vários quadros de leitura abertos (ORFs), apenas o ORF mais próximo (até o extremo 5') será traduzido. Após a produção das proteínas estruturais SARS-CoV-2, os nucleocapsídeos são montados no citoplasma e seguidos de brotamento no lúmen do compartimento intermediário do retículo endoplasmático (ER)-Golgi. Os vírus são liberados da célula infectada por exocitose. Fonte: Adaptado ALANAGREH, ALZOUGHLOOL, ATOUM, 2020.

2.1.5 Origem e transmissão de SARS-CoV-2

Os coronavírus humanos exibem uma possível origem zoonótica, sendo os morcegos os prováveis hospedeiros naturais dos α -CoV e β -CoV descritos até o momento. Coronavírus humanos zoonóticos emergentes, como o SARS-CoV e MERS-CoV, por exemplo, muito possivelmente tiveram uma origem em morcegos através de mutação sequencial seguida de recombinação com coronavírus de morcego, sofrendo mutações adicionais durante o transbordamento para hospedeiros intermediários, civetas e camelos, respectivamente; o que culminou com a capacidade de infectar hospedeiros humanos (VIJAYKRISHNA et al, 2007;

WOO et al, 2012; CUI, LI e SHI, 2019; FUNG e LIU, 2020; JIN et al, 2020; WROBEL et al, 2020).

A origem de SARS-CoV-2 ainda não está totalmente compreendida. Entretanto, dois mecanismos foram levantados como hipótese: 1) seleção em um hospedeiro animal antes da transferência zoonótica (possivelmente através de um hospedeiro intermediário) ou 2) seleção natural em humanos após a transmissão zoonótica direta de morcegos (ANDERSEN et al, 2020; WROBEL et al, 2020).

Nesse aspecto, SARS-CoV-2 demonstrou uma alta identidade de sequência genômica para o CoV do “morcego-ferradura” (*Rhinolophus affinis*), Bat-CoVRaTG13, apresentando 96% de similaridade genômica (ZHOU et al, 2020); enquanto possui baixa similaridade com SARS-CoV (cerca de 79%) ou MERS-CoV (aproximadamente 50%) (LU et al, 2020; TANG et al, 2020). Além disso, foi relatado que um coronavírus identificado a partir de um pangolim malaio (*Manis javanica*), pangolin-CoV, possui cerca de 99% de semelhança na sequência de aminoácidos com o RBD de SARS-CoV-2, possuindo apenas uma diferença de aminoácido no domínio de ligação do receptor (LAM et al, 2020; LIU et al, 2020; SHANG et al, 2020; XIAO et al, 2020; BONI et al, 2020).

Esses dados sugerem que SARS-CoV-2 se originou pela recombinação do pangolin-Cov e Bat-CoVRaTG13, atuando os morcegos como hospedeiros naturais e o pangolim como possível hospedeiro intermediário, chegando até os humanos através de transmissão zoonótica. É importante ressaltar que cobras, martas e tartarugas também estão sendo investigadas como potenciais hospedeiros intermediários. A figura 6 demonstra a possível origem de SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 (CUI, LI e SHI, 2019; LIU, CHEN, CHEN, 2019; ANDERSEN et al, 2020; LI et al, 2020; LIU et al, 2020; NADEEM et al, 2020; WROBEL et al, 2020; XIAO et al, 2020).

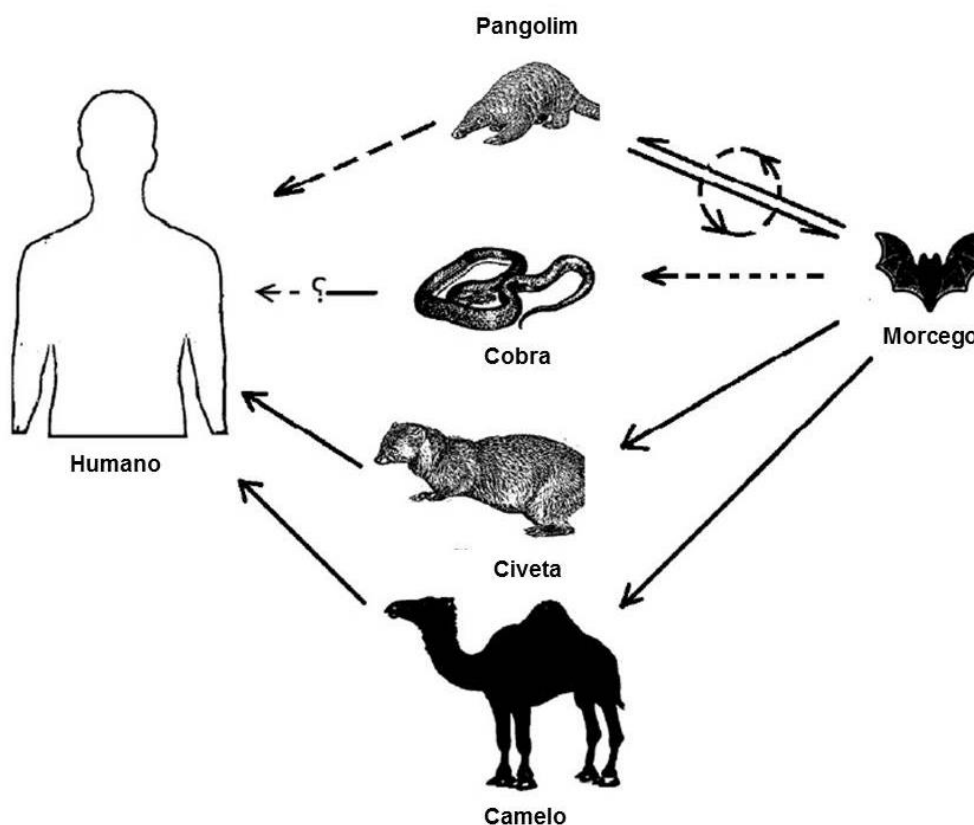


Figura 6. Possível origem de SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2. Hospedeiro intermediário para o vírus SARS-CoV (civeta) e MERS-CoV (camelo). Possíveis hospedeiros intermediários de SARS-CoV-2 (pangolim ou cobra). As linhas pontilhadas indicam hospedeiros intermediários sob investigação (Adaptado de NADEEM et al, 2020).

Contudo, ainda que seja possível que os pangolins, ou outra espécie até então desconhecida, possam ter atuado como um hospedeiro intermediário facilitando a transmissão para os humanos, as evidências atuais apoiam uma evolução de SARS-CoV-2 em morcegos, o que resultou em sarbecovírus de morcego que podem se multiplicar no trato respiratório superior tanto de humanos quanto de pangolins (BONI et al, 2020).

2.1.6 COVID-19

Sabe-se que os α -CoV e β -CoV são responsáveis por provocarem doenças respiratórias em humanos e gastroenterite em animais. Até o presente momento existem sete CoVs capazes de infectar humanos. Os coronavírus humanos HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 ou HCoV-HKU1 são responsáveis por induzirem somente doenças respiratórias superiores leves em hospedeiros imunocompetentes. Já o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o coronavírus

da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), surgidos em 2002 e 2012, respectivamente, são altamente patogênicos e possuem uma mortalidade relativamente alta (ZONG et al, 2003; MASTERS e PERLMAN, 2013; SU et al, 2016; FORNI et al, 2017; CUI, LI e SHI, 2018; CHEN et al, 2020; WU et al, 2020).

O surto de síndrome respiratória aguda grave (SARS) entre 2002 e 2003, causado pelo SARS-CoV e surgido inicialmente na província de Guangdong na China, teve uma taxa de mortalidade de aproximadamente 10% com mais de 8 mil casos confirmados e cerca de 770 mortes, sendo disseminado em 29 países. Uma década depois, com detecção inicial em cidadãos da Arábia Saudita, a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) originada do MERS-CoV, vitimou cerca de 860 pessoas de um total de mais 2.500 infectados em 27 países, entre 2012 e 2019. Comparado a SARS-CoV e MERS-CoV, o SARS-CoV-2 apresenta maior transmissibilidade e infecciosidade, embora com uma letalidade inferior (WHO, 2019; ALANAGREH, ALZOUGHLOOL, ATOUM, 2020; SHEREEN et al, 2020; YANG et al, 2020; WANG et al, 2020).

No final de dezembro de 2019, um surto de pneumonia de etiologia desconhecida foi relatado em Wuhan, província de Hubei, China. Suas características clínicas eram muito semelhantes às de uma pneumonia viral e após análises de amostras do trato respiratório, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças da China identificou a nova pneumonia como originária do novo coronavírus, SARS-CoV-2. A OMS nomeou oficialmente a enfermidade de doença do coronavírus 2019 (COVID-19) (ALANAGREH, ALZOUGHLOOL e ATOUM, 2020; JIN et al, 2020; LAI et al, 2020; SHEREEN et al, 2020; SOHRABI et al, 2020; WANG et al, 2020; YUKI, FUJIOGI e KOUTSOGIANNAKI, 2020). SARS-CoV-2 é a sétima cepa de coronavírus e a quarta dos β -CoVs, até o momento a infectar seres humanos (WU et al, 2020).

2.1.7 Manifestações clínicas e fisiopatologia

O SARS-CoV-2, assim como outros coronavírus respiratórios, apresenta uma rota de transmissão aérea, através do contato com gotículas respiratórias ou aerossóis de pessoas infectadas. A via de transmissão fecal-oral também é possível, mas ainda não foi comprovada. Além disso, existe a possibilidade de transmissão por contato via fômites. Isto porque estudos recentes demonstraram a viabilidade de

SARS-CoV-2 por horas em diferentes tipos de superfície, como aço inoxidável, plástico, vidro, papelão e outros (FAM et al, 2020; JIN et al, 2020; LI et al, 2020; LI, QIAO e ZHANG, 2020; LIU et al, 2020; NADEEM et al, 2020; TAY et al, 2020; WANG et al, 2020).

É relevante ressaltar que os portadores assintomáticos e/ou aqueles em período de incubação da doença, também podem ser fontes potenciais de infecção (HOEHL et al, 2020). O número reprodutivo (R_0), ou o número de casos secundários gerados diretamente a partir de cada caso foi estimado entre 2 e 3 (LI et al, 2020; RICHARD et al, 2020; RIOU e ALTHAUS, 2020; WU, LEUNG e LEUNG, 2020).

Presume-se que a multiplicação viral primária ocorra no epitélio da mucosa do trato respiratório superior e na mucosa gastrointestinal (XIAO et al, 2020), dando origem a uma viremia leve (JIN et al, 2020; TAY et al, 2020). Na infecção, o período médio de incubação é de aproximadamente 4 a 5 dias antes do início dos sintomas, com a maioria dos pacientes sintomáticos desenvolvendo-os entre 11 e 12 dias (GUAN et al, 2020; LAUER et al, 2020; LI et al, 2020; PUNG et al, 2020). Os pacientes com COVID-19 geralmente apresentam febre e tosse seca; menos comumente têm dispnéia, dores musculares e/ou articulares, dor de cabeça/tontura, diarreia, náusea e tosse sanguinolenta (CHAN et al, 2020; CHEN et al, 2020; COPERCHINI et al, 2020; HUANG et al, 2020; LIU et al, 2020; PHAN et al, 2020; PAN et al, 2020; ROCKYX et al, 2020; TAY et al, 2020; WANG et al, 2020).

A fisiopatologia da infecção por SARS-CoV-2 é semelhante à da infecção por SARS-CoV, à qual inclui respostas inflamatórias exacerbadas fortemente envolvidas no dano resultante às vias aéreas. A resposta imune disfuncional desencadeia uma “tempestade de citocinas” que medeia à inflamação pulmonar generalizada (WONG et al, 2004). Logo, a gravidade da doença é originada não apenas da infecção pelo vírus, mas também da resposta imune do hospedeiro (TAY et al, 2020).

Casos graves de COVID-19 progridem para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), aproximadamente entre 8 e 9 dias após o início dos sintomas. A SDRA é caracterizada como uma condição pulmonar que gera insuficiência respiratória e baixo nível de oxigênio no sangue (JIN et al, 2020; THOMPSON, CHAMBERS e LIU, 2017; ZHANG et al, 2020). A consequência disso, é que alguns pacientes podem sucumbir a infecções secundárias por bactérias e fungos (CHEN et al, 2020). A SDRA pode gerar diretamente a insuficiência respiratória, que é a causa da morte em 70% dos casos fatais de COVID-19.

Adicionalmente, a enorme quantidade de citocinas desprendidas pelo sistema imunológico em resposta à infecção viral e/ou infecções secundárias pode resultar em uma “tempestade de citocinas” e sintomas de sepse, que são a causa da morte em 28% dos casos fatais de COVID-19. Nesses casos, a inflamação descontrolada causa dano de múltiplos órgãos, o que culmina com a falência de órgãos, especialmente dos sistemas cardíaco, hepático e renal (TAY et al 2020; ZHANG et al, 2020).

A infecção por SARS-CoV-2 também reduz a expressão de ACE2 nas células pulmonares. Como a perda da função pulmonar da ACE2 está associada à lesão pulmonar aguda, a regulação negativa da ACE2 induzida por vírus pode ser importante para a patologia da doença. Foi demonstrado que a ACE2 regula o sistema renina-angiotensina (SRA) (IMAI et al, 2005; KUBA et al, 2005; KUBA, IMAI e PENNINGER, 2006; IMAI, KUBA e PENNINGER, 2008). Logo, uma redução na função da ACE2 após a infecção pelo vírus pode resultar em uma disfunção do SRA, que por sua vez, influencia a pressão sanguínea e o equilíbrio líquido/eletrólito, além de melhorar a inflamação e a permeabilidade vascular nas vias aéreas (TAY et al, 2020).

O aumento dependente de anticorpos (ADE) também foi proposto como um dos fatores envolvidos na inflamação intensa causada por SARS-CoV-2 (JIN et al, 2020). O ADE é um fenômeno virológico bem conhecido, sendo confirmado em múltiplas infecções virais. O ADE pode promover a captação celular viral de complexos infecciosos vírus-anticorpo após sua interação com os receptores Fc (FcR) ou outros receptores, o que resulta em infecção aprimorada das células-alvo (TAKADA e KAWAOKA, 2003). A interação de FcR com o complexo vírus-anticorpos anti-neutralizantes da proteína S (anti-S-IgG) pode facilitar as respostas inflamatórias e a replicação viral persistente nos pulmões dos pacientes (JIN et al, 2020).

Cerca de 80% dos pacientes infectados desenvolvem apenas sintomas leves, com pneumonia leve ou sem pneumonia, e aproximadamente 5% são de estado grave e crítico, respectivamente (WIT et al, 2016; WU e MCGOOGAN, 2020; CHEN et al, 2020). Estudos epidemiológicos mostraram que a gravidade da doença varia em diferentes faixas etárias, com uma mortalidade mais prevalente nos idosos. Na população pediátrica a incidência é relativamente menor e os sintomas geralmente são mais brandos, apresentando um prognóstico mais favorável do que os adultos

(LU et al, 2020; QIU et al, 2020; SU et al, 2020; YUKI, FUJIOGI e KOUTSOGIANNAKI, 2020; ZHOU et al, 2020). Além disso, pacientes com comorbidades estão associados a piores prognósticos (CHEN et al, 2020).

Ressalta-se que a COVID-19 mostra uma diferença na taxa de mortalidade entre homens (2,8%) e mulheres (1,7%). Como o gene da ACE2 está localizado no cromossomo X, pode haver alelos que conferem resistência à doença, o que pode explicar a menor taxa de mortalidade em mulheres. Alternativamente, os hormônios sexuais estrogênio e testosterona têm funções imunorregulatórias diferentes, que podem estar envolvidos com a proteção imunológica ou a gravidade da doença (TAY et al, 2020).

2.1.8 Epidemiologia

Uma investigação epidemiológica inicial sugeriu que o surto dos casos de COVID-19 estaria associado a uma exposição prévia ao Mercado Atacadista de Frutos do Mar de Huanan. Neste eram comercializados não apenas frutos do mar, mas também muitos outros tipos de animais selvagens vivos (ALANAGREH, ALZOUGHOOOL e ATOUM, 2020; LAI et al, 2020; SOHRABI et al, 2020; TAY et al, 2020; WU et al, 2020; YUKI, FUJIOGI, KOUTSOGIANNAKI, 2020). Contudo, devido à identificação de pacientes sem exposição direta ao mercado, a transmissão entre humanos foi comprovada (CHANG et al, 2020; CHAN et al, 2020; SHEREEN et al, 2020; WANG et al, 2020).

Após o surto na China, o SARS-CoV-2 foi disseminado rapidamente pelo mundo e, no dia 30 de janeiro de 2020, a OMS declarou oficialmente a epidemia da COVID-19 como a sexta emergência de saúde pública de interesse internacional (GUO et al, 2020; LAI et al, 2020; SOHRABI et al, 2020; YUKI, FUJIOGI, KOUTSOGIANNAKI, 2020). Os primeiros casos sintomáticos foram relatados antes do final de fevereiro em vários países da União Europeia, incluindo Itália, Espanha, Alemanha e, poucas semanas após, Reino Unido. Nesse contexto, a Itália foi um dos primeiros e mais atingidos países da Europa, com mais de 219.000 casos e 30.5000 mortes relatadas, na época (CHEN et al, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 uma pandemia no dia 11 de março de 2020, dada sua sintomatologia distinta e velocidade de propagação. Até o dia 6 de janeiro de 2023, a OMS registrou mais de

657 milhões de casos de COVID-19 distribuídos em todo o mundo e aproximadamente 6,7 milhões de óbitos desde o início do surto. Além disso, até o dia 22 de dezembro de 2022, mais de 13 bilhões de doses de vacinas foram administradas; sendo a maior parte delas aplicada na região do Pacífico Ocidental. Na mesma data, a região da Europa era a detentora do maior número de casos confirmados de COVID-19, embora o continente americano apresentasse o maior número de óbitos. Adicionalmente, no mesmo período, Estados Unidos e Índia lideravam o ranking mundial de casos de COVID-19 por país, seguidos por França, Alemanha e Brasil, respectivamente. A figura 7 ilustra, graficamente, o número de casos de COVID-19 relatados por região da OMS, entre 30 de dezembro 2019 e 2 de janeiro de 2023. Ainda, a figura 8 demonstra a distribuição do número de casos de COVID-19 por território, região ou país representado por escala de cores (WHO, 2023).

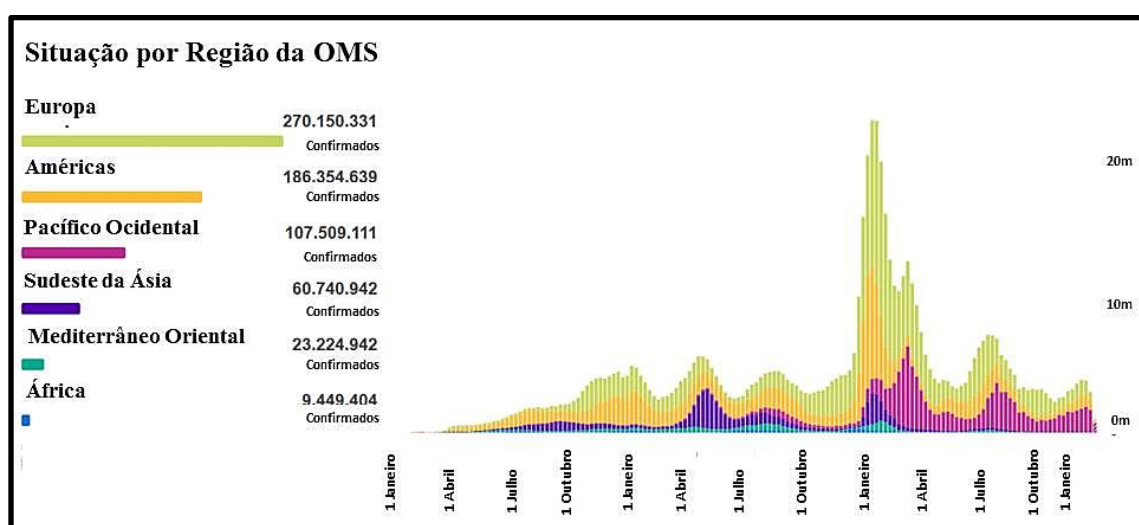


Figura 7. Número de casos de COVID-19 relatados por região, pela OMS. Período relatado entre de 30 de dezembro de 2019 a 2 de janeiro de 2023. Fonte: Adaptado de WHO, 2023.

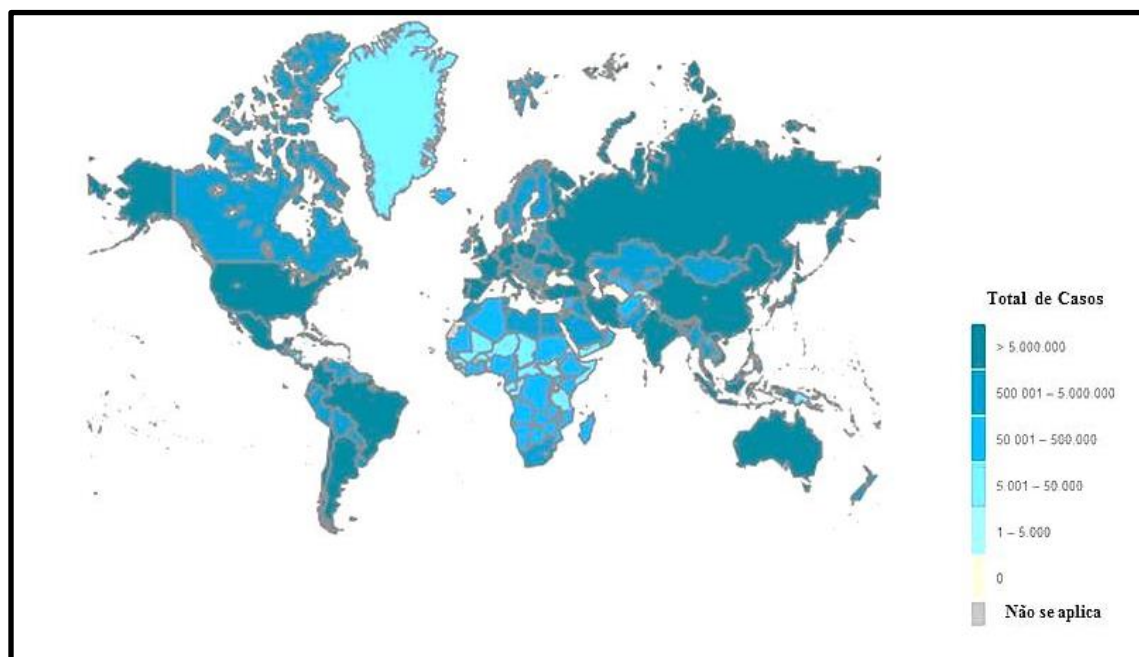


Figura 8. Distribuição do número de casos de COVID-19 por território, região ou país representado por escala de cores. Fonte: Adaptado de WHO, 2022.

O primeiro caso de COVID-19 na América Latina foi confirmado pelo Ministério da Saúde do Brasil, no dia 26 de fevereiro de 2020 na cidade de São Paulo. O paciente era do sexo masculino, tinha 61 anos e havia retornado recentemente de uma viagem à Lombardia, norte da Itália, onde permaneceu entre os dias 9 e 20 de fevereiro e apresentou sintomas respiratórios leves (BRASIL, 2020; CUPERTINO et al, 2020; RODRIGUEZ-MORALES et al, 2020).

No dia 5 de março de 2020, o Brasil registrou os dois primeiros casos de transmissão local, sendo diagnosticados mais uma vez na cidade de São Paulo. Os dois pacientes não tinham precedentes de viagens recentes, porém ambos tiveram contato direto e indireto com o paciente zero. Alguns dias após a notificação desses casos foram relatados casos de transmissão comunitária da COVID-19 nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, onde uma fonte não identificada se tornou um vetor na sua comunidade (BRASIL, 2020; CUPERTINO et al, 2020).

Desde então o número de casos de COVID-19 tem crescido continuamente no Brasil. Até o dia 4 de janeiro de 2023, o país apresentava mais de 36,4 milhões de casos confirmados e quase 700 mil óbitos com uma taxa de letalidade total de 1,9%, segundo o Ministério da Saúde. A tabela 1 sintetiza o boletim epidemiológico da COVID-19 no Brasil, por região, atualizado no dia 4 de janeiro de 2023. A figura 9

representa, graficamente, o número de casos acumulados por data de notificação, com destaque para os estados mais atingidos (BRASIL, 2023).

Tabela 1. Síntese do número de casos, óbitos, incidência e mortalidade da COVID-19 por região brasileira.

Síntese de Casos, Óbitos, Incidência e Mortalidade				
	Casos	Óbitos	Incidência/100mil hab.	Mortalidade/100mil hab.
Brasil	36.423.138	694.411	17332,2	330,4
Sudeste	14.441.208	333.600	16341,5	377,5
Sul	7.737.001	109.922	25810,7	366,7
Nordeste	7.219.303	133.908	12649,5	234,6
Centro-Oeste	4.181.755	65.594	25659,5	402,5
Norte	2.843.871	51.387	15429,8	278,8

Fonte: O autor, com base em dados do boletim epidemiológico da COVID-19 fornecido pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS) do Brasil (BRASIL, 2023).

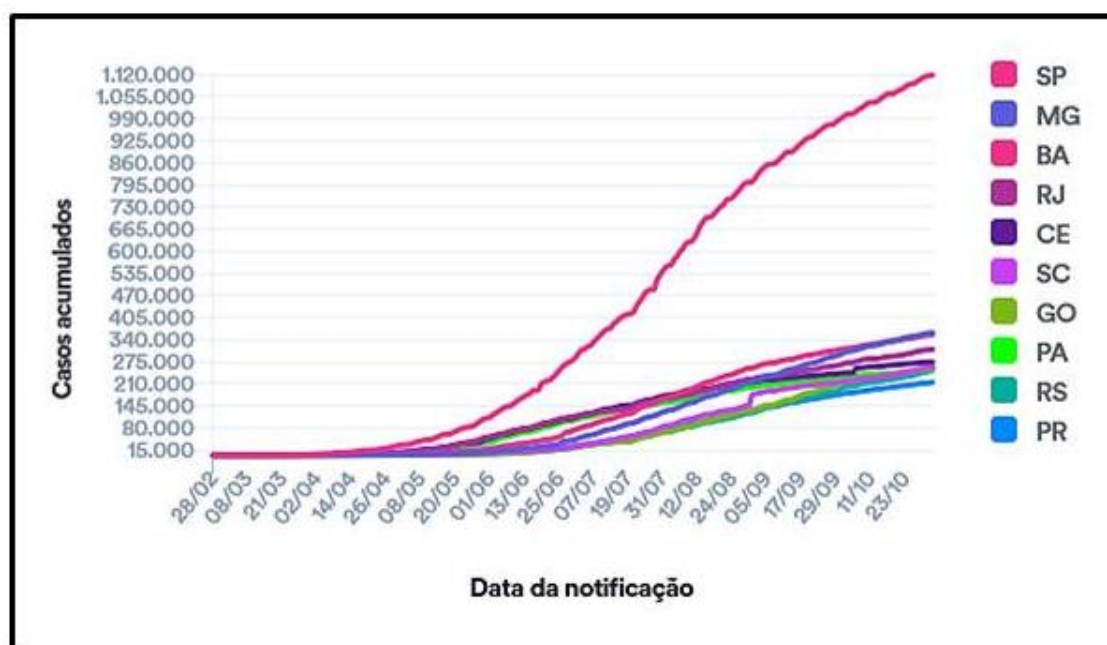


Figura 9. Número de casos acumulados de COVID-19 por data de notificação, com destaque para os estados com os maiores números de casos. Fonte: BRASIL, 2023.

2.1.9 Modelos animais

Os modelos animais são demonstrados como um componente imprescindível na pesquisa da COVID-19. Ainda que os modelos *in vitro*, *ex-vivo* e organoides tenham permitido revelar as principais características biológicas do SARS-CoV-2, os modelos animais que reproduzam as características clínicas e patológicas da COVID-19 em humanos, são essenciais para estudos sobre patogênese viral, transmissão, agentes terapêuticos e vacinas (PANDAMOOZ et al, 2022).

Ainda, insights sobre patogênese e interações vírus-hospedeiro com base em evidências *in vitro* requerem validação em modelos animais para confirmar sua relevância fisiológica. Adicionalmente, novos agentes antivirais devem ser avaliados em modelos animais, uma vez que propriedades como biodisponibilidade, concentração sérica e meia-vida, além de acessibilidade tecidual, só podem ser avaliadas *in vivo*; da mesma maneira os estudos de transmissão e vacinas (CHU, CHAN e YUEN, 2022). Assim, os modelos animais têm um papel fundamental para avaliar a virulência, transmissão e fuga imune das variantes de preocupação (VOC's) (MUÑOZ-FONTELA et al, 2022).

A suscetibilidade exibida por uma célula hospedeira é crucial no processo de infecção celular, sendo esta característica a responsável pela faixa de hospedeiros exibida por um vírus. Nesse contexto, a enzima conversora de angiotensina II humana (hACE2), atua como um receptor para o vírus na etapa de adsorção do seu ciclo de multiplicação. O domínio de ligação do receptor (RBD) da proteína S viral de SARS-CoV e SARS-CoV-2 interage com a hACE2 permitindo a penetração do vírus na célula alvo (YUAN et al, 2020).

Nesse sentido, diferentes animais que são naturalmente suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2 têm sido propostos como modelos experimentais, dentre eles: hamster dourado ou sírio (*Mesocricetus auratus*), furão (*Mustela putorius furo*) e modelos de primatas não humanos (NHP's), como macacos rhesus (*Macaca mulata*), saguis comuns (*Callithrix jacchus*), macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) e babuínos (*Papio hamadryas*) (CHAN et al, 2020; KIM et al, 2020; SHI et al, 2020; SUN et al, 2020; YU et al, 2020).

Hamsters dourados ou sírios (*Mesocricetus auratus*) são naturalmente suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2, devido ao alto grau de semelhança entre a ACE2 do hamster e a ACE2 de humano. A infecção por SARS-CoV-2 em hamsters

dourados não é letal. No geral, o modelo de hamster dourado imita as características clínicas, virológicas, histopatológicas e imunológicas da COVID-19, leve e moderada em humanos. Além das patologias próprias de SARS-CoV-2, a transmissão do SARS-CoV-2 é altamente eficiente entre hamsters por contato direto e aerossóis, em comparação com a transmissão via fômites (CHU, CHAN e YUEN, 2022).

Os furões (*Mustela putorius furo*) também são naturalmente suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2. Uma doença geral leve é observada em furões infectados com SARS-CoV-2. A atividade reduzida é observada entre 2 e 6 dias após a infecção, com tosse ocasional e nenhuma perda de peso corporal detectável ou fatalidades (CHU, CHAN e YUEN, 2022).

Espécies de primatas não humanos (NHP's) incluindo macacos rhesus (*Macaca mulata*), saguis comuns (*Callithrix jacchus*), macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) e babuínos (*Papio hamadryas*) são suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2. A infecção de primatas não humanos pelo vírus geralmente resulta em manifestações respiratórias leves a moderadas. Embora os conhecimentos necessários e as instalações de nível 3 de biossegurança para lidar com primatas não humanos sejam relativamente escassos, esses modelos são indispensáveis e são plataformas importantes para a avaliação de agentes terapêuticos e vacinas para COVID-19 antes de iniciarem os ensaios clínicos (CHU, CHAN e YUEN, 2022).

Cada modelo animal possui vantagens e limitações (CHU, CHAN e YUEN, 2022). Nesse aspecto, modelos de pequenos animais, como os camundongos (*Mus musculus*) têm sido amplamente utilizados para estudar vírus emergentes, incluindo o SARS-CoV-2 (JOHANSEN et al, 2020). Contudo, essa espécie animal não é naturalmente suscetível à infecção pelo vírus, já que a enzima conversora de angiotensina 2 de camundongo (mACE2) não interage com o receptor do vírus (SUN et al, 2020; BI et al, 2021; CHU, CHAN e YUEN, 2022; JOHANSEN et al, 2022; MUÑOZ-FONTELA et al, 2022; PANDAMOOZ et al, 2022).

Sendo assim, como alternativa para superar a barreira de especificidade de espécies, os camundongos podem ser sensibilizados à infecção por SARS-CoV-2 através de diferentes estratégias, dentre as quais, se destaca a introdução da expressão de hACE2 através da transdução de vetor viral (SUN et al, 2020). Estudos utilizando adenovírus expressando hACE2 (Ad-hACE2) demonstraram alta expressão de hACE2 no epitélio alveolar e expressão ocasional no epitélio das vias

aéreas em camundongos (SUN et al, 2020; BI et al, 2021; HAN, BLAIR e IWANAGA, 2021).

Este modelo também possui suas limitações (SUN et al, 2020), o que sugere a introdução de novos modelos de infecção por transdução viral, incluindo a utilização de poxvírus vírus recombinantes.

2.2 FAMÍLIA POXVIRIDAE

2.2.1 Relações filogenéticas

A família *Poxviridae* compreende grandes vírus de DNA de fita dupla com um ciclo de multiplicação que ocorre completamente no citoplasma das células hospedeiras. Por isso são também denominados de vírus de DNA nucleocitoplasmático (NCLDV) (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013; OLIVEIRA et al, 2017).

Atualmente a família é dividida em duas subfamílias. *Entomopoxvirinae* inclui os poxvírus que infectam insetos e engloba três gêneros, *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* e *Gammaentomopoxvirus*. Já a subfamília *Chordopoxvirinae* é representada por poxvírus com hospedeiros vertebrados e abrange 10 gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Centapoxvirus* e *Cervidpoxvirus*. Além disso, existem duas espécies virais sem classificação em cada subfamília (ICTV, 2017).

2.2.2 Estrutura genômica

Os poxvírus possuem um extenso genoma de DNA linear dupla fita, fechada covalentemente, que varia entre 128 (*Parapoxvirus*) e 365 kbp (*Avipoxvirus*) e codifica mais de 200 genes (TULMAN et al, 2004; LEFKOWITZ, WANG e UPTON, 2006; HUGHES, IRAUSQUIN e FRIEDMAN, 2010; GUNTHER et al, 2017).

O genoma de DNA linear dupla fita inclui sequências repetidas invertidas terminais e em gancho, que compreendem inúmeras ORF's espaçadas (MOSS, 2001). Destas, no mínimo 90 são altamente conservadas entre as várias espécies de poxvírus e são fundamentais para a replicação dos poxvírus e sua morfogênese.

O restante é mais divergente, devido às variações na evolução adaptativa entre os vários integrantes dos poxvírus (UPTON et al, 2003; MCLYSAGHT, BALDI e GAUT, 2003; GUBSER et al, 2004). O repertório específico dos genes não conservados confere a cada poxvírus características exclusivas da sua gama de hospedeiros, imunomodulação e patogênese (SEET et al, 2003). Via de regra, os genes de poxvírus não essenciais para o ciclo de vida, mas que interferem no perfil patológico do vírus em um hospedeiro infectado são denominados genes de virulência (MCFADDEN, 2005; HALLER, PENG e MCFADDEN, 2014; OLIVEIRA et al, 2017; HURISA et al, 2019).

Atualmente, os genes conhecidos da gama de hospedeiros de poxvírus estão reunidos em 12 classes distintas, algumas das quais têm apenas um gene, como por exemplo, K3L, E3L, K1L, etc; e outros que exibem uma variedade de membros (serpinas, família C7L, família TNFR2 e outros) (MCFADDEN, 2005; BRATKE, MCLYSAGHT e ROTHENBURG, 2013; HALLER, PENG e MCFADDEN, 2014; OLIVEIRA et al, 2017; HURISA et al, 2019).

Provavelmente o genoma evoluiu por meio de ganho e perda de genes, principalmente através da duplicação de genes e transferência gênica horizontal (HGT) (MCLYSAGHT, BALDI e GAUT, 2003; BRATKE e MCLYSAGHT, 2008; OLIVEIRA et al, 2017). Este fenômeno contribuiu para o grande número de genes expressos pelos poxvírus. Pelo menos 34 genes presentes na família *Poxviridae* parecem ter sido adquiridos por TGH a partir de seus hospedeiros, incluindo genes envolvidos na resposta imune, como o Complexo de Histocompatibilidade Classe I, Interleucinas 10 e 24, receptor de Interferon-Gama e receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNF) (HUGHES e FRIEDMAN, 2005).

2.2.3 Partícula viral

Os poxvírus são vírus relativamente grandes quando comparados a outros vírus de animais. Apresenta partículas ovóides ou em formato semelhante a um “tijolo” arredondado e possuem um tamanho que varia de 200 a 400 nm de comprimento (MCFADDEN, 2005; HUGHES, IRAUSQUIN e FRIEDMAN, 2010). A superfície externa é estriada em filas paralelamente alinhadas, às vezes dispostas em hélice. Os *vírions* geralmente são envelopados (*vírion* envelopado externo – EEV). A forma do vírus intracelular maduro (IMV) contém um envelope distinto e é

igualmente infecciosa. As estruturas internas dos poxvírus possuem o formato de cápsulas e/ou barris achatados, lentes ou comprimidos. As partículas são extremamente complexas e contêm mais de 100 proteínas distintas (HURISA et al, 2019). A figura 10 ilustra a morfologia e estrutura de alguns poxvírus (FENNER, 1989).

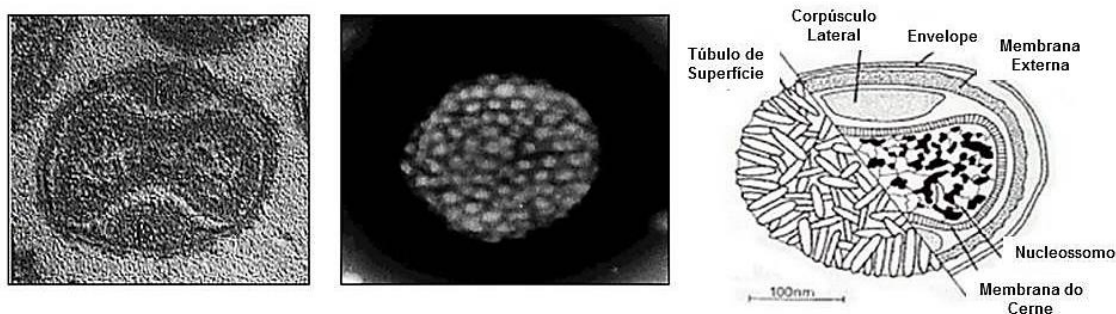


Figura 10. Morfologia e estrutura de poxvírus. À direita, eletromicrografia de seção longitudinal de *Vaccinia virus* (VACV). Ao centro, uma eletromicrografia em contraste negativo de *Variola virus* (VARV). À direita representação esquemática de um poxvírus. Fonte: Modificado de FENNER, 1989.

2.2.4 Ciclo de multiplicação dos poxvírus

Ao contrário da maioria dos outros vírus de DNA, os poxvírus se multiplicam no citoplasma da célula hospedeira (MOSS, 2001; MOSS, 2005; MOSS, 2013). A característica única dos poxvírus é que eles utilizam maquinaria própria para a transcrição do genoma, sendo a enzima RNA polimerase DNA dependente a responsável pela transcrição dos mRNAs virais (HURISA et al, 2019).

O ciclo de multiplicação dos poxvírus é uma complexa sequência de eventos que é iniciada a partir da interação do vírus com a superfície celular e sua subsequente fusão com a membrana celular do hospedeiro. Até o momento, diversas proteínas virais se mostraram cruciais para a ligação do vírus à superfície celular, mas é provável que os receptores do poxvírus sejam glicosaminocíclanos (GAGs) expressos de maneira ubíqua ou componentes da matriz extracelular (HSIAO, CHUNG e CHANG, 1999; LIN et al, 2000; MOSS, 2005; HURISA et al, 2019). Adicionalmente, embora nenhum receptor celular específico tenha sido descrito, há evidências de que a ligação e/ou penetração do vírus esteja associada a eventos de sinalização rápida em várias cascatas de proteína quinase do hospedeiro, e provavelmente esses eventos de sinalização podem influenciar os

estágios de replicação subsequente (LOCKER et al, 2000; MASTERS et al, 2001; MAGALHÃES et al, 2001; ANDRADE et al, 2004; MOSS, 2005).

Posteriormente à fase de adsorção, o vírus penetra no citoplasma e o desnudamento viral ocorre. Durante o ciclo de multiplicação, duas fases de desnudamento e duas fases de expressão gênica são relatadas. No primeiro estágio de desnudamento, logo após a penetração do vírus na célula hospedeira, a membrana externa é removida e fundida à membrana celular, o que leva à liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (HURISA et al, 2019). Posteriormente, a RNA polimerase endógena e os fatores de transcrição encapsidados que compõem o transcriptossoma viral iniciam a primeira cascata de expressão dos genes precoces virais, que sintetiza o mRNA do vírus sob o controle de promotores virais iniciais (MOSS, 2001; BROYLES, 2003; MCFADDEN, 2005).

Logo após, por um processo pouco elucidado denominado de remoção do nucleocapsídeo ou segundo estágio, ocorre à dissolução da estrutura do nucleocapsídeo induzida por fatores virais e do hospedeiro. Esta etapa é o desnudamento viral propriamente dito, uma vez que libera o DNA do vírus no citoplasma, onde funcionará como molde para a etapa de biossíntese ou replicação do DNA e as etapas subsequentes de transcrição intermediária e tardia. Esses dois últimos estágios de transcrição requerem colaboração de fatores de transcrição derivados do hospedeiro (SANZ e MOSS, 1998; WRIGHT et al, 1998; BROYLES et al, 1999; KATSAFANAS e MOSS, 2004; MCFADDEN, 2005).

De maneira concomitante ao acúmulo de produtos gênicos virais tardios ocorre à morfogênese progressiva e montagem das partículas virais infecciosas, inicialmente como vírions IMV, que se agrupam e migram através de tráfego mediado por microtúbulos e envolvimento com membranas derivadas do complexo de Golgi para formar vírus envelopado intracelular (IEV) (MCFADDEN, 2005). A forma IEV perde um de seus invólucros de membrana externa à medida que se funde com a membrana celular para formar o vírus com envelope associado à célula (CEV), que é impulsionado em direção às células vizinhas através da polimerização da cauda-actina sob o vírion, ou é liberado diretamente como partículas EEV livres. É possível que as formas CEV e EEV sejam particularmente relevantes para a ligeira disseminação célula-célula in vivo, enquanto que a forma IMV pode contribuir para a disseminação do vírus apenas após a morte celular tardia e lise da membrana. A

figura 11 ilustra o ciclo de multiplicação dos poxvirus (SMITH, MURPHY e LAW, 2003; SMITH e LAW, 2004; MCFADDEN, 2005).

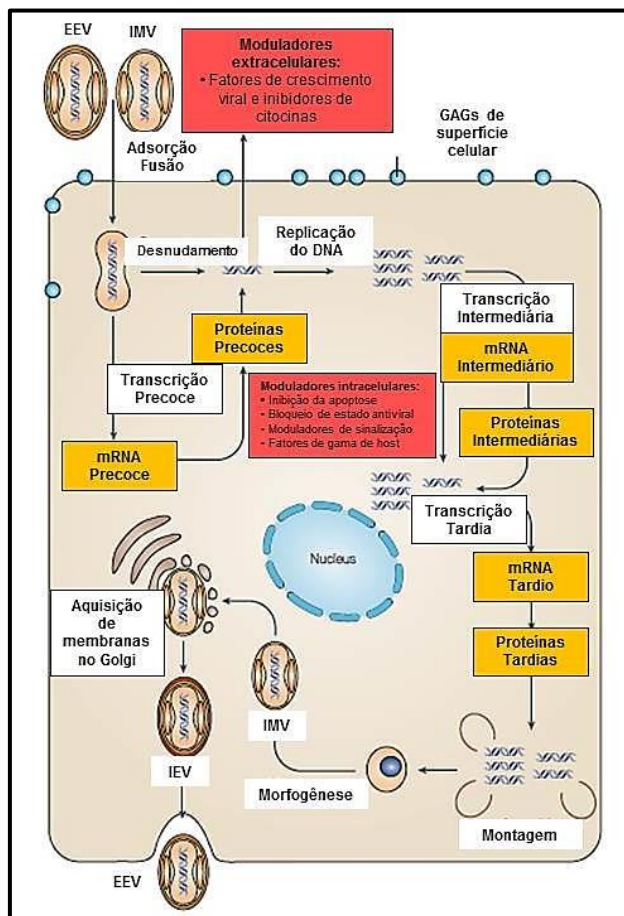


Figura 11. Ilustração do Ciclo de Multiplicação dos Poxvirus. Todos os poxvirus se replicam no citoplasma das células infectadas por uma via morfogênica complexa, mas amplamente conservada. Duas partículas virais infecciosas distintas - o vírus intracelular maduro (IMV) e o vírus extracelular com envelope (EEV) - podem iniciar a infecção. Os vírions IMV e EEV diferem em suas glicoproteínas de superfície e no número de membranas envoltórias. A adsorção do vírion é determinada por várias proteínas do vírion e por glicosaminoglicanos (GAGs) na superfície da célula alvo ou por componentes da matriz extracelular. A multiplicação viral bem sucedida ou permissiva é caracterizada por três ondas de mRNA viral e síntese de proteínas (conhecidas como precoce, intermediária e tardia), que são seguidas pela morfogênese de partículas infecciosas. O vírus intracelular maduro inicial (IMV) é transportado por microtúbulos (não mostrado na figura) e é envolvido por uma membrana derivada de Golgi, posteriormente referido como um vírus com envelope intracelular (IEV). O IEV se funde à membrana da superfície celular para formar vírus com envelope associado à célula (CEV; não mostrado), que é extrudado para longe da célula por polimerização de cauda de actina (não mostrado) ou é liberado para formar EEV livre. EEV também pode ser formado por brotamento direto de IMV, portanto, contornando a forma IEV. Os poxvirus também expressam uma gama de moduladores extracelulares e intracelulares, alguns dos quais são definidos como fatores de gama do hospedeiro que são necessários para completar o ciclo de replicação viral. Os poxvirus podem ser marcadamente diversos em seu portfólio de moduladores específicos e fatores de gama de hospedeiros, que determinam o tropismo e a gama de hospedeiros. As infecções não permissivas dos poxvirus geralmente abortam em um ponto a jusante da etapa de ligação / fusão (Modificado de MCFADDEN, 2005).

2.2.5 Poxvírus como vetores virais e o vírus *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA)

Dentre os cordopoxvírus existem duas espécies bem conhecidas: o agente causador da varíola (VARV – *Variola virus*) e o vírus *Vaccinia* (VACV – *Vaccinia virus*). VARV é o poxvírus responsável por ter gerado grandes problemas à população mundial durante várias décadas, até que a OMS declarou a varíola erradicada em 1980, após uma campanha global de vacinação e vigilância bem-sucedida (FENNER et al, 1988; HERDERSON, 2011; THÈVES, BIAGINI e CRUBÉZY, 2014).

A principal ferramenta utilizada para a erradicação da varíola foi uma vacina viva baseada no *Vaccinia virus*, um poxvírus de origem desconhecida (provavelmente isolado de cavalos) (WARNOCK, DAIGRE e AL-RUBEAI, 2011; LUKASHEV e ZAMYATNIN, 2016). A expressão de um gene recombinante utilizando poxvírus como vetor foi realizada pela primeira vez em 1982 e foi um dos primeiros vírus animais a ser usado como um vetor de expressão gênica (MACKETT, SMITH e MOSS, 1982; PANICALI e PAOLETTI, 1982; TARTAGLIA et al, 1992).

Pouco antes do final do programa global de imunização, novas variantes de poxvírus atenuados foram geradas. Uma das variantes obtidas e muito bem sucedida foi o vírus *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA) (SÁNCHEZ-SAMPEDRO et al, 2015). O desenvolvimento histórico e o uso do MVA como vacina contra a varíola permitiram estabelecer um refinado perfil de segurança (SUTTER e STAIB, 2003; KREMER et al, 2012; VOLZ e SUTTER, 2017).

O MVA é um poxvírus altamente atenuado e frequentemente utilizado como vetor viral (VERHEUST et al, 2012; ALTENBURG et al, 2017). Ele foi derivado de uma cepa de vacina contra varíola turca (Ancara) que, após mais de 570 passagens do vírus *Vaccinia Chorioallantois Ankara* (CVA) em fibroblastos primários de embrião de galinha (CEF) (MCFADDEN, 2005; VERHEUST et al, 2012; SEBASTIAN e GILBERT, 2015; LUKASHEV e ZAMYATNIN, 2016; ALTENBURG et al, 2014; ALTENBURG et al, 2017; VOLZ e SUTTER, 2017), tornou-se defeituoso para multiplicação em células humanas e avirulento em animais de teste. Assim o MVA pode ser manipulado em condições de biossegurança nível 1, desde que sequências de genes heterólogos inócuos sejam expressos (SUTTER e STAIB, 2003;

MCFADDEN, 2005; KREMER et al, 2012; ALTENBURG et al, 2017; VOLZ e SUTTER, 2017).

Estudos genômicos revelaram que, como resultado dessas passagens de longo prazo, o MVA perdeu aproximadamente 15% de seu genoma, o que corresponde a quase 30 kb, em comparação com a cepa parental de CVA (MCFADDEN, 2005; SEBASTIAN e GILBERT, 2015; LUKASHEV e ZAMYATNIN, 2016; ALTENBURG et al, 2017; VOLZ e SUTTER, 2017). Deleções e mutações no genoma do MVA formam a provável base genética para a avirulência e restrição da célula hospedeira, já que interferiram em genes virais considerados relevantes para a regulação da interação vírus-hospedeiro (MCFADDEN, 2005; MEYER, SUTTER e MAYR, 1991; ANTOINE et al, 1998; SANCHO et al, 2002; GALLEGO-GÓMEZ et al, 2003; SUTTER e STAIB, 2003; MEISINGER-HENSCHER et al, 2010; ALTENBURG et al, 2017).

O MVA foi utilizado em regimes de vacinação na Alemanha, entre 1968 a 1980, contra a varíola e testado em diversos ensaios clínicos, o que resultou na imunização de mais de 100.000 pessoas sem complicações secundárias relatadas (SUTTER e STAIB, 2003; MCCURDY et al, 2004; MCFADDEN, 2005; VERHEUST et al, 2012; SÁNCHEZ-SAMPEDRO et al, 2015; LUKASHEV e ZAMYATNIN, 2016; ALTENBURG et al, 2017). Diante do sucesso de segurança e juntamente com a capacidade de codificar genes de interesse de até 10 kb de tamanho, o MVA torna-se um excelente candidato como vetor de vacina (ALTENBURG et al, 2017).

A versatilidade da plataforma de vacina de vetor MVA pode ser facilmente demonstrada pelo rápido desenvolvimento de vacinas experimentais para imunização contra infecções emergentes, como para MERS-CoV, por exemplo. Avanços recentes incluem resultados promissores de testes clínicos de antígenos produtores de MVA recombinantes do vírus da influenza aviária H5N1 ou do vírus Ebola altamente patogênico (VOLZ e SUTTER, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

O SARS-CoV-2 é o agente causador da COVID-19. O vírus permanece emergindo desde seu primeiro relato no final de 2019, adquirindo rapidamente mutações que podem modular a patogenicidade, transmissão e evasão a anticorpos. A partir desse contexto, a resposta global à COVID-19 agora enfrenta novos desafios, acima de tudo no tocante ao surgimento das variantes de SARS-CoV-2, sejam elas variantes de interesse (VOI's) ou variantes de preocupação (VOC's) (MUÑOZ-FONTELA et al, 2022). Vacinas altamente eficazes e agentes antivirais que podem fornecer proteção ideal contra variantes de evolução rápida, como as variantes Ômicron recentemente surgidas (BA.1 e BA.2), ainda são necessárias (CHU, CHAN e YUEN, 2022). Sendo assim modelos pré-clínicos, particularmente os modelos animais, são essenciais também para investigar a patogênese das VOC's, vacinas correlatas de proteção e terapias pós-exposição (MUÑOZ-FONTELA et al, 2022).

Os vírus *Vaccinia* recombinantes têm sido relatados como eficazes ferramentas de pesquisa, que encontram uma ampla gama de aplicações em diferentes campos, incluindo biologia celular, ciências de proteínas, virologia, imunologia e medicina (MOSS, 1996; KREMER et al, 2012). Uma das aplicações bem sucedida dos poxvírus como vetores virais consiste na eficácia da expressão de genes heterólogos para a síntese de proteínas recombinantes (SUTTER e STAIB, 2003).

Várias características tornam os poxvírus atrativos para aplicação como vetores virais. O atributo mais relevante consiste em sua alta capacidade de inserção de vários genes exógenos; mais de 25 kpb de DNA podem ser integrados de forma estável no genoma do vírus (WALTHER e STEIN, 2000; LUNDSTROM, 2018). Além disso, ocorre uma expressão precisa de DNA recombinante regulada por um promotor forte de poxvírus; há uma falta de persistência ou integração genômica no hospedeiro devido à sua replicação citoplasmática; existe uma alta imunogenicidade e eficácia como vacina e também apresentam uma facilidade de produção, tanto para vetores como para vacinas (DREXLER, STAIB e SUTTER, 2004; GOMEZ et al, 2008; VERHEUST et al, 2012; VOLZ e SUTTER, 2017).

Dentre os principais poxvírus atenuados em uso como vetores virais destaca-se o MVA, que apresenta distintas vantagens: (i) métodos de síntese e manipulação

genética são relativamente simples, baseados principalmente no fenômeno da recombinação homóloga, o que é particularmente interessante uma vez que o processo ocorre naturalmente durante a multiplicação dos poxvírus; (ii) o MVA é capaz de infectar uma ampla faixa de tipos celulares de maneira eficiente; (iii) a expressão de proteínas recombinantes ocorre naturalmente no citoplasma, o que é vantajoso já que elimina requerimentos especiais para processamento nuclear e transporte de RNA; (iv) as proteínas sintetizadas são processadas e transportadas da mesma forma que ocorre nas células de origem do gene estudado, de tal forma que as proteínas resultantes são biologicamente ativas; (v) a síntese proteica ocorre em níveis relativamente altos, além do perfil de segurança já relatado (MOSS, 1996; FLEXNER e MOSS, 1997; MASTRANGELO et al, 2000).

É interessante que haja uma nova proposta de geração de MVAs, já que a etapa de purificação em placa tem sido relatada como demorada e desgastante; até mesmo para facilitar a produção em larga escala.

O Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LVBA) explorou com sucesso a versatilidade do vírus MVA recombinante como vetor. Isto porque, diferentes estudos foram conduzidos, desde a expressão de proteínas heterólogas, como a expressão da proteína GFP (DAIAN e SILVA, 2008), por exemplo; até o desenvolvimento de vacinas contra patógenos intracelulares, como o vírus da imunodeficiência felina (FIV – *Feline immunodeficiency virus*), circovírus suíno tipo II, *Parainfluenza 5* (ANDRADE, 2016; DAIAN e SILVA, 2013; DAIAN e SILVA, 2017) e contra o vírus da dengue (OLIVEIRA, 2019).

No que diz respeito ao emprego do MVA recombinante como plataforma de transdução de vetor viral para construção de um modelo animal, o presente trabalho é pioneiro em nosso grupo de pesquisa e no Brasil.

Dessa forma, o presente estudo consistiu na construção de um vírus *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA) recombinante expressando a enzima conversora de angiotensina II humana (hACE2), propondo ajuste de técnica, para a criação de um modelo de infecção experimental para o SARS-CoV-2.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um vetor viral recombinante utilizando um *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA) que expresse a enzima conversora de angiotensina II (ACE 2) humana.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Transfectar células BHK-21 infectadas com MVA-WT com plasmídeo de transferência pLW44-hACE2.
- Selecionar clones de MVA recombinantes (rMVA-hACE2) por meio de purificação de placa.
- Selecionar clones de MVA recombinantes (rMVA-hACE2) através de *Cell sorting*
- Detectar a presença do cDNA de hACE2 através de PCR e sequenciamento com iniciadores específicos.
- Detectar a expressão de hACE2 em rMVA-hACE2 através de ensaios de *Western Blot* e citometria de fluxo.
- Amplificar, purificar e titular rMVA-hACE2.

5 METODOLOGIA

5.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE TRANSFERÊNCIA – PLASMÍDEO pLW44-hACE2

A construção do vírus MVA recombinante expressando a enzima conversora de angiotensina II humana (hACE2), rMVA-hACE2, envolve um vetor de transferência; nesse caso, o plasmídeo pLW44. Isto porque, a integração de sequências de genes exógenos no genoma do MVA pode ser convenientemente dirigida por recombinação homóloga utilizando plasmídeos de transferências que contêm fragmentos de DNA de MVA homólogos às sequências de DNA que flanqueiam o local de inserção direcionado.

A construção do plasmídeo de transferência (pLW44-hACE2), bem como, sua testagem e validação, foi realizada pelos colaboradores Dr. Alexandre Machado e Dr. Daniel Doro (Instituto René Rachou - dados não apresentados), sendo o construto gentilmente cedido para uso no presente estudo.

Na figura 12 é possível observar a estrutura do vetor de transferência (pLW44-hACE2) utilizado na transfecção de células BHK-21 infectadas com MVA selvagem (MVA-WT).

O vetor de transporte, pLW44-hACE2 possui em sua composição:

- Sequências homólogas, que guiaram a recombinação homóloga com o vírus MVA-WT; na figura representada em roxo: **MVA FLANK 1** e **MVA FLANK 2**;
- Promotor p11, no esquema representado em branco e à jusante do gene repórter (eGFP): Forte/Tardio
- Gene repórter, representado em verde (**eGFP**) sob regulação do promotor 11;
- Promotor mh5, na figura representativa também representada em branco: Precoce/Tardio
- Sítio de clonagem: localizado entre os sítios de restrição (representado em laranja): **SmaI**, **BamHI**, **Sall**, **PstI**. Nesse contexto, o gene de interesse foi inserido entre esses sítios.
- Gene de resistência representado em um tom de verde mais claro: **AmpR** (resistência à ampicilina). Confere à bactéria competente, uma resistência contra o antibiótico no meio, permitindo, então, a seleção dos clones.

- Origem de replicação (representado em amarelo): **Ori** – sequência que permite à bactéria replicar o plasmídeo.
- Em azul o cDNA da enzima conversora de angiotensina II humana (hACE2). O inserto possui 2428 pb.
- O plasmídeo gerado possui um total de 7441 pb.

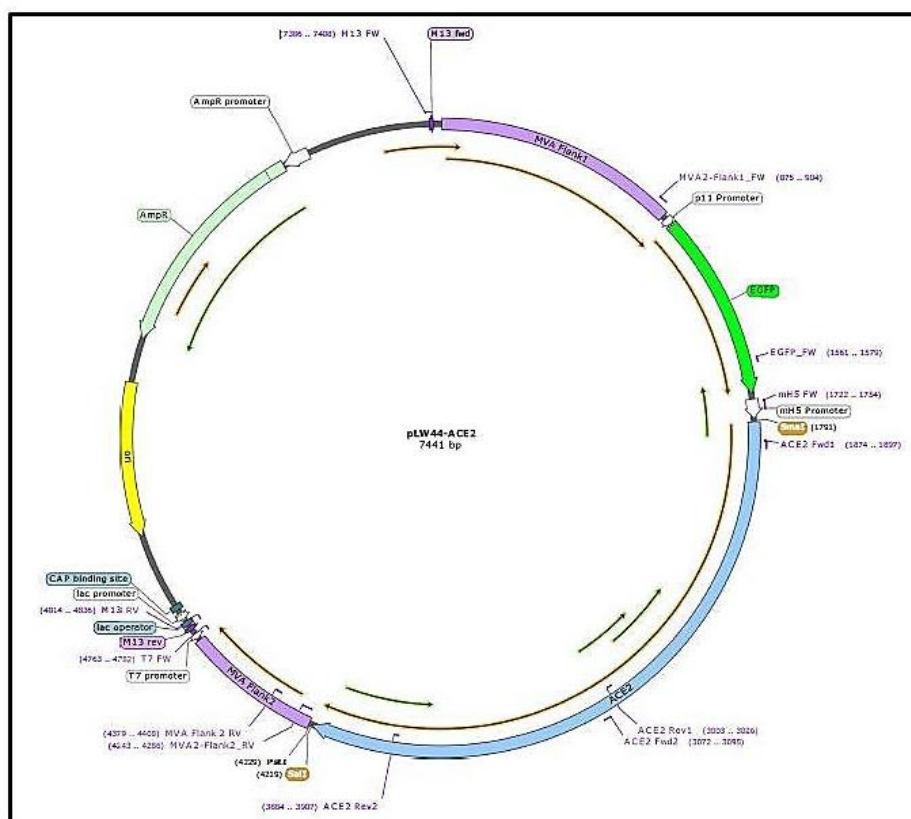


Figura 12. Representação esquemática do vetor de transferência pLW44-hACE2. Em destaque: as regiões de flanco, MVA Flank 1 e MVA Flank 2 (em roxo); o promotor p11 (em branco); o gene eGFP (verde fluorescente); o promotor m5 (em branco); o cDNA de interesse (em azul); a origem de replicação (em amarelo); gene de resistência à ampicilina (verde claro). No centro do plasmídeo recombinante (pLW44-hACE2), está destacado o seu tamanho em pares de bases (7441 pb).

Na figura 13 é possível observar a sequência de bases nitrogenadas presentes na estrutura do plasmídeo de transferência (pLW44-hACE2). Em destaque: as regiões de bases correspondem às regiões de flanco (em roxo), que guiaram a recombinação homóloga durante o processo de transfecção; as bases correspondentes ao gene da proteína verde fluorescente (GFP), que permitiu a triagem dos vírus recombinantes após a transfecção bem sucedida; o cDNA da enzima conversora de angiotensina II humana (hACE2), inserto de interesse; as

Medium - Sigma®), suplementado (NaHCO₃ a 0,37%, penicilina [100 U/mL], estreptomicina [100 µg/mL], fungizona [250 ng/mL] e soro fetal bovino [SFB - Sigma®] 5-10%) e incubadas a 37°C, em uma estufa (Thermo Scientific – Modelo 3111) de 5% de CO₂.

Atingido o estado adequado de confluência dessas células, entre 90-100% (~ 10-12 x 10⁶), o subcultivo das mesmas era realizado, sendo utilizado para tal finalidade, solução salina tamponada – (Phosphate buffered saline) PBS 1X e solução de tripsina/EDTA 0,25% (GIBCO).

5.3 AMOSTRAS DE VÍRUS

5.3.1 Vírus MVA selvagem

5.3.1.1 *Origem e multiplicação*

O vírus MVA selvagem, utilizado na geração dos vírus recombinantes e como controle em alguns ensaios, gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Moss (Laboratory of Viral Diseases, NIAID, National Institutes of Health – NIH, EUA), na passagem de número 581, foi multiplicado em garrafas de cultura de área no valor de 150 cm² (Sarstedt) contendo, aproximadamente, 3 x 10⁷ células de BHK-21. As células foram infectadas com uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 1, na qual foi esperada a adsorção em tempo aproximado de 1 h, a uma temperatura de 37°C, para um volume final de 5 mL de meio DMEM 2,5 % SFB. Logo após, a monocamada de células BHK-21 foi lavada com PBS 1X e submetida a um acréscimo de 25 mL de DMEM 2,5% SFB. A garrafa foi então novamente incubada por cerca de 48 h, a 37°C, em estufa (Thermo Scientific – Modelo 3111) a uma atmosfera de 5% de CO₂. Passado o período de incubação, a monocamada de células foi então raspada, sendo a suspensão celular centrifugada por 10 min a 2500 rpm (Centrífuga Nuve NF 800R). Posteriormente o sedimento foi armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C para purificação viral.

5.3.1.2 *Purificação*

Para a realização da etapa de purificação viral, aproximadamente 20 garrafas de área calculada em 150 cm² (Cell Scraper - Sarstedt), às quais continham cerca de 3×10^7 células de BHK-21 cada foram infectadas com MVA selvagem. O sedimento resultante foi suspenso em 8 mL de Tris-HCL 10 mM em pH igual 8,0, para posterior homogeneização e centrifugação por cerca de 15 min a 4°C a 2500 rpm (Centrífuga Nuve NF 800R). O sobrenadante resultante foi coletado e armazenado em banho de gelo. Já o sedimento foi suspenso em 10 mL de solução de lise (1 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl) e mantido em banho de gelo por um tempo aproximado de 10 min. Posteriormente, o sedimento foi transferido para um douncer e homogeneizado lentamente por 80 vezes, em banho de gelo. Em seguida, o conteúdo foi vertido em um tubo Falcon e centrifugado por 15 min a 4°C a 2500 rpm (Centrífuga Nuve NF 800R), onde o sobrenadante foi coletado e adicionado ao anterior. As etapas realizadas para o primeiro sedimento foram repetidas para o novo sedimento, com a ressalva de que foi utilizada 8 mL de tampão de lise. Quando da união dos sobrenadantes 26 mL de suspensão viral foi obtida. Essa suspensão foi então centrifugada em colchão de sacarose a 36%, por 2h, a 4°C, a 14.000 rpm (ultracentrífuga Sorvall OTD-Combi rotor AH629). Logo após, o sobrenadante e a sacarose foram desprezados de maneira cuidadosa e o sedimento, com as partículas virais, foi suspenso em 1 mL de 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a – 80°C para titulação e uso em tempo oportuno.

5.3.1.3 *Titulação*

Para a etapa de titulação a suspensão viral purificada foi diluída em série em meio DMEM 2,5 % SFB, sendo utilizados 500 µL para cada diluição para posterior infecção das respectivas monocamadas de BHK-21 em uma placa de cultura celular de 6 poços. Um poço da placa foi reservado para o controle de células, no qual foi acrescentado 500 µL de DMEM 2,5% SFB. A adsorção foi realizada por homogeneização constante durante 1 h, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, foram acrescentados 2 mL de DMEM 2,5% SFB em cada um dos seis poços. A placa foi então incubada por 24 h, em uma temperatura de 37°C,

em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Logo após esse período, as células foram fixadas por 24 h em uma solução de metanol e acetona (1:1). Em seguida a solução foi retirada e o poço lavado por três vezes com PBS 1X. Após o procedimento, as células foram incubadas por 1 h com o anticorpo anti-VACV na proporção de 1:5000 e lavadas três vezes com PBS 1X após o tempo de incubação. As células foram reincubadas com o anticorpo secundário (proteína conjugada com peroxidase) em PBS contendo 3% SFB. Em seguida, as células foram lavadas três vezes antes de passarem pela coloração. Posteriormente a um tempo estimado entre 24 a 48 h os focos fluorescentes foram contados no microscópio de fluorescência (EVOS Life technologies – Modelo AMF4300). O cálculo do título viral foi realizado através da contagem do número de placas virais detectadas, multiplicado pelo inverso da diluição.

5.3.2 Vírus MVA-GFP

O vírus MVA-GFP, previamente produzido no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LVBA), pela Dra. Danielle Soares de Oliveira Daian e Silva (DAIAN e SILVA, 2019), no Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFMG, foi multiplicado, purificado e titulado em BHK-21 semelhante ao descrito no tópico 5.3.1.2. Para a etapa de titulação, as placas verdes fluorescentes, resultado da expressão do gene GFP, foram contadas ao microscópio de fluorescência (EVOS Life technologies – Modelo AMF4300).

5.3.3 Vírus recombinante rMVA-hACE2

5.3.3.1 Transfecção de células

A construção dos vírus recombinantes foi baseada no processo de recombinação homóloga. Sendo assim, o pLW44-hACE2 foi transfectado em células BHK-21 infectadas com MVA selvagem (MVA-WT), o que resultou na recombinação entre fragmentos de DNA homólogos.

Nesse aspecto, inicialmente, uma placa de 6 poços com monocamada de BHK-21 com uma quantidade aproximada entre $1,5 \times 10^6$ células/cavidade foram infectadas com o vírus MVA (m.o.i. = 0,5 ou 1), onde um poço da placa foi separado

para o controle de células, sendo adicionado 500 µL de DMEM 2,5% SFB, e outro poço para controle de vírus, no qual a transfecção foi realizada com o plasmídeo pLW44 vazio. Para ocasionar a adsorção, a placa foi incubada por 1h, a 37°C, em uma estufa (Thermo Scientific – Modelo 3111) com atmosfera de 5% de CO₂. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas com meio Opti-MEM® I (GIBCO, EUA) e, em seguida, foi realizada a transfecção com o pLW44-hACE2.

Para essa etapa, uma solução de 2,62 µg do plasmídeo de transferência e Opti-MEM (qsp 50 µL) foi homogeneizada com uma segunda solução com 10 µL de lipofetamina (Lipofectamine 2000, Invitrogen, EUA) e 45 µL de Opti-MEM. Posteriormente a um período de incubação de 30 min, o volume da mistura foi ajustado para 1 mL com Opti-MEM e foi adicionado a cada poço da placa. Então, as células cobertas por essa solução passaram por uma incubação durante 5 h, a 37°C (Thermo Scientific – Modelo 3111), em uma atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente a esse período, o meio das células foi substituído por 2 mL DMEM 5% SFB em cada cavidade da placa. Esta foi então incubada por 48 h, a uma temperatura de 37 °C (Thermo Scientific – Modelo 3111), em uma atmosfera contendo 5% de CO₂, ocasionando a recombinação homóloga entre o genoma do vírus e o plasmídeo de transferência. Logo após, as monocamadas de células foram raspadas com o auxílio de raspadores de silicone (cell scraper – Sarstedt) e as soluções resultantes foram centrifugadas por 2 min a 2.500 rpm (Microcentrífuga Eppendorf 5415C). Os sedimentos foram então suspensos com 500 µL de DMEM 5% SFB e tal suspensão foi congelada e descongelada em nitrogênio líquido por três vezes, permitindo a lise das células infectadas, e conseqüentemente a liberação das partículas virais. Posteriormente, a suspensão foi armazenada em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a – 80°C para a etapa de seleção dos vírus recombinantes: purificação em placa.

5.3.3.2 *Seleção de vírus recombinante*

5.3.3.2.1 Purificação em Placa e triagem por microscopia de fluorescência

O vírus recombinante, rMVA-hACE2, foi selecionado através de sucessivos ensaios de purificação de placa. A recorrência do ensaio é necessária, pois promove a expansão do vírus recombinante por diminuição competitiva do número de

partículas virais de MVA-WT. Para cada ensaio, foram realizadas diluições seriadas da suspensão viral obtida na etapa anterior. Logo após, foi utilizado 500 µL de cada diluição para infectar as respectivas monocamadas de BKH-21 em placas de 6 poços ($\sim 1,5 \times 10^6$ células/cavidade), sendo reservado um poço da placa para o controle de células. Após a etapa de adsorção das células, realizada sob homogeneização constante durante 2 h em estufa a 37°C a uma atmosfera de 5% de CO₂ (Thermo Scientific – Modelo 3111), as monocamadas de células foram lavadas. Para tanto, foi adicionado PBS 1X e acrescentado uma mistura com solução de agarose a 2% e meio MEM 2X (GIBCO®) suplementado com SFB ente 5 e 10%, além de antibióticos e antifúngico. Logo após, as placas foram reincubadas por um período de tempo entre 48 e 72 h, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ (Thermo Scientific – Modelo 3111). Passado o período de infecção, as células foram observadas ao microscópio de fluorescência (EVOS Life technologies – Modelo AMF4300) e as placas verdes fluorescentes (focos de fluorescência ou clones de vírus), devido à expressão do gene para a proteína GFP, foram coletadas e transferidas para microtubos com 500 µL de DMEM 10% SFB. A suspensão foi então congelada e descongelada em nitrogênio líquido, processo repetido três vezes, e sonicada (BRANSON 1510) por 30 segundos com intervalo em gelo por 30 segundos, de forma a permitir a ruptura das células infectadas e, posteriormente, armazenada em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C para repetição do ensaio.

5.3.3.2.2 *Cell sorting*

O resultado dos ensaios de transfecção e de multiplicação também foram submetidos à técnica de *Cell sorting*. Essa técnica é realizada em citômetro de fluxo específico para avaliação da emissão de fluorescência das células (FACS – Fluorescence Activated Cell Sorter), possibilitando que células específicas, marcadas com fluorocromos, sejam classificadas eletrostaticamente, e separadas das demais (BERTHO, 2015).

Para isso, as células BHK-21 transfectadas e/ou infectadas com o vírus recombinante pós-transfecção, seja em placa de 6 poços ou garrafas A25 cm² foram raspadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS 1X e lidas em citômetro FACS. O aparelho foi calibrado utilizando células não infectadas (sem fluorescência) e células

infectadas com MVA-GFP (Controle positivo da fluorescência). Após a leitura das amostras, as células que apresentavam fluorescência eram separadas das demais pelo citômetro, que as dispensavam ainda viáveis em um novo tubo estéril. As células fluorescentes foram lisadas e o sobrenadante utilizado para uma nova infecção de BHK-21.

5.3.3.3 *Amplificação e purificação*

A amplificação foi realizada de forma gradativa: placa 24 poços, placa 12 poços, placa 6 poços, garrafa A25 cm², garrafa A75 cm² e garrafa A150 cm².

A suspensão viral obtida com clone eleito na etapa de purificação de placa foi congelada e descongelada em nitrogênio líquido por três vezes consecutivas e sonicada (BRANSON 1510) por 30 segundos com intervalo em gelo por 30 segundos, para permitir o rompimento das células infectadas e liberar as partículas virais.

Feito isso, inicialmente, uma placa de 24 poços, com uma quantidade aproximada de $3,7 \times 10^4$ células de BHK-21 foi infectada com o vírus rMVA-hACE2. As células foram infectadas com 250 µL de suspensão viral que foi coletada na última rodada de seleção à qual foi acrescentada 250 µL de DMEM 5% SFB e incubadas por 1 h (para adsorção com homogeneização constante), a 37°C, em uma atmosfera de CO₂ a 5% (Thermo Scientific – Modelo 3111). Posteriormente, a placa foi novamente incubada sob as mesmas condições e a fluorescência observada (EVOS Life technologies – Modelo AMF4300) após 24 h. Passado esse intervalo as células foram coletadas, centrifugadas por 2 min a 1500 rpm em microcentrífuga (Microcentrífuga Eppendorf 5415C), sendo o sedimento ressuspendido em 500 µL de DMEM 5% SFB e armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C.

A suspensão viral obtida na primeira etapa de amplificação foi congelada e descongelada em nitrogênio líquido por três vezes consecutivas e sonicada (BRANSON 1510) por 30 segundos com intervalo em gelo por 30 segundos, para permitir o rompimento das células infectadas e liberar as partículas virais.

De forma sucessiva, uma placa de 12 poços com uma quantidade aproximada de $7,5 \times 10^5$ células BHK-21 foi infectada com o vírus rMVA-hACE2 anteriormente amplificado em placa 24 well. As células foram infectadas com 400 µL e 600 µL de

DMEM 5% SFB, sendo incubadas por 1 h (para adsorção com homogeneização constante), a 37°C, em uma atmosfera de CO₂ a 5% (Thermo Scientific – Modelo 3111). Posteriormente, a placa foi novamente incubada sob as mesmas condições e a fluorescência observada (EVOS Life technologies – Modelo AMF4300) após 24 h. Passado esse intervalo as células foram coletadas, centrifugadas por 2 min a 1500 rpm em microcentrífuga (Microcentrífuga Eppendorf 5415C), sendo o sedimento ressuspensionado em 500 µL de DMEM 5% SFB e armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C.

A suspensão viral obtida na segunda etapa de amplificação gradativa foi congelada e descongelada em nitrogênio líquido por três vezes consecutivas e sonicada (BRANSON 1510) por 30 segundos com intervalo em gelo por 30 segundos, para permitir o rompimento das células infectadas e liberar as partículas virais para infecção da placa de 6 poços.

Sendo assim, uma placa de 6 cavidades contendo cerca de $1,5 \times 10^6$ células BHK-21 foi infectada com 400 µL da suspensão viral coletada da última amplificação em placa de 12 poços + 1600 µL de DMEM 5% SFB, sendo incubada por 1 h (para adsorção com homogeneização constante), a 37°C, em uma atmosfera de CO₂ a 5% (Thermo Scientific – Modelo 3111). Posteriormente, a placa foi novamente incubada sob as mesmas condições e a fluorescência observada (EVOS Life technologies – Modelo AMF4300) após 24 h. Passado esse intervalo as células foram coletadas, centrifugadas por 2 min a 1500 rpm em microcentrífuga (Microcentrífuga Eppendorf 5415C), sendo o sedimento ressuspensionado em 500 µL de DMEM 5% SFB e armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C.

A suspensão viral obtida a com amplificação na placa de 6 poços, foi congelada e descongelada em nitrogênio líquido por três vezes consecutivas e sonicada (BRANSON 1510) por 30 segundos com intervalo em gelo por 30 segundos, para permitir o rompimento das células infectadas e liberar as partículas virais para infecção de uma garrafa de cultura de A25 cm².

O último experimento foi realizado em triplicata, sendo uma placa reservada para extração de DNA, uma para extração de RNA e uma para prosseguir com os ensaios de multiplicação.

Sendo assim, uma garrafa de cultura de A25 cm² contendo cerca de $3,0 \times 10^6$ células BHK-21 foi infectada com 400 µL da suspensão viral coletada da última

amplificação em placa de 6 poços + 600 µL de DMEM 5% SFB , sendo incubada por 1 h (para adsorção com homogeneização constante), a 37°C, em uma atmosfera de CO₂ a 5% (Thermo Scientific – Modelo 3111). Posteriormente, foram adicionados 4 mL de meio DMEM 5% SFB e a garrafa, foi novamente incubada sob as mesmas condições e a fluorescência observada (EVOS Life technologies – Modelo AMF4300) após 24 h. Após o período de incubação, a monocamada de células foi raspada, com o auxílio de raspadores de silicone (Cell Scraper - Sarstedt), e o extrato celular centrifugado por 2 min a 1500 rpm em centrífuga (Nuve NF 800R), sendo o sedimento ressuspensionado em 500 µL de DMEM 5% SFB e armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C.

A suspensão viral obtida com a multiplicação na garrafa de cultura de A25 cm², foi congelada e descongelada em nitrogênio líquido por três vezes consecutivas e sonicada (BRANSON 1510) por 30 segundos com intervalo em gelo por 30 segundos, para permitir o rompimento das células infectadas e liberar as partículas virais para infecção de uma garrafa de cultura de A75 cm².

Sendo assim, uma garrafa de cultura de A75 cm² contendo cerca de 10×10^6 células BHK-21 foi infectada com 400 µL da suspensão viral coletada da multiplicação em garrafa + A25 cm² 2600 µL de DMEM 5% SFB, sendo incubada por 1 h (para adsorção com homogeneização constante), a 37°C, em uma atmosfera de CO₂ a 5% (Thermo Scientific – Modelo 3111). Posteriormente, foram adicionados mais 12 mL de meio DMEM 5% SFB e a garrafa, foi novamente incubada sob as mesmas condições e a fluorescência observada (EVOS Life technologies – Modelo AMF4300) após 24 h. Após o período de incubação, a monocamada de células foi raspada, com o auxílio de raspadores de silicone (Cell Scraper - Sarstedt), e o extrato celular centrifugado por 2 min a 1500 rpm em centrífuga (Nuve NF 800R), sendo o sedimento ressuspensionado em 1000 µL de DMEM 5% SFB e armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C.

O último experimento foi realizado em duplicata, sendo cada uma das garrafas utilizada para expandir o vírus em 10 garrafas A150 cm². Sendo assim, ao final, foi obtida uma suspensão viral única, expandida de 20 garrafas A150 cm² para a etapa de purificação viral.

Finalmente, a suspensão viral obtida com a multiplicação na garrafa de cultura de A75 cm², foi congelada e descongelada em nitrogênio líquido por três vezes consecutivas e sonicada (BRANSON 1510) por 30 segundos com intervalo

em gelo por 30 segundos, para permitir o rompimento das células infectadas e liberar as partículas virais para infecção de 20 garrafas de cultura de A150 cm².

Sendo assim, 20 garrafas de cultura de A150 cm² contendo cerca de 20×10^6 células BHK-21 foram infectadas com 100 μ L da suspensão viral coletada da multiplicação em garrafa A75 cm² + 9,9 mL de DMEM 5% SFB, sendo incubada por 1 h (para adsorção com homogeneização constante), a 37°C, em uma atmosfera de CO₂ a 5% (Thermo Scientific – Modelo 3111). Posteriormente, foram adicionados mais 15 mL de meio DMEM 5% SFB e a garrafa, foi novamente incubada sob as mesmas condições e a fluorescência observada (EVOS Life technologies – Modelo AMF4300) após 24 h. Após o período de incubação, a monocamada de células foi raspada, com o auxílio de raspadores de silicone (Cell Scraper - Sarstedt), e o extrato celular centrifugado por 2 min a 1500 rpm em centrífuga (Nuve NF 800R), sendo o pellet armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C para posterior purificação viral.

A purificação viral ocorreu de acordo com o protocolo descrito anteriormente no tópico 5.3.1.2.

5.3.3.4 *Titulação e Estoque Viral*

Para a titulação viral, a suspensão de vírus purificada na etapa anterior, foi sonicada (BRANSON 1510) por 30 segundos com intervalo em gelo por 30 segundos e diluída em série, em meio DMEM 2,5 % SFB, e 500 μ L de cada diluição foram utilizados para as respectivas monocamadas de células BHK-21 em uma placa de cultura celular de 6 cavidades ($\sim 1,5 \times 10^6$ células/cavidade). Um poço da placa foi reservado para controle, onde foi acrescentado 500 μ L de DMEM 2,5 % SFB. Para permitir a adsorção foi realizada uma homogeneização constante durante 1 h, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Logo após, foram acrescentados 2 mL de DMEM 2,5% em cada cavidade. A placa foi incubada a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Após um período de incubação de 48 h os focos fluorescentes foram contados no microscópio de fluorescência. Para a realização do cálculo de título viral foi realizado a contagem do número de placas virais detectadas, multiplicado pelo inverso da diluição.

Para a produção de estoque do vírus recombinante rMVA-hACE2 o vírus purificado foi diluído a uma m.o.i 0,5 em meio DMEM 2% SFB e utilizado para

infecção de células BHK-21, que foram cultivadas em garrafas de cultura celular de área de 150 cm². Após a adição do inóculo as células foram incubadas por 1h, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, para que ocorra a adsorção viral. Na garrafa, ainda, foi adicionado 15 mL de DMEM 5% de SFB. Após um período de 24 h de infecção as células foram observadas e analisadas quanto ao aparecimento da fluorescência característica. O sobrenadante foi então descartado, a monocamada raspada, lavada com DMEM não suplementado; o sedimento ressuspensionado, aliquotado e armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C para utilização em momento oportuno.

5.4 CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DOS VÍRUS RECOMBINANTES

5.4.1 Extração de material genético e Verificação da Presença do Inseto no vírus recombinante

O vírus rMVA-hACE2 teve seu DNA extraído através do kit de extração DNeasy Blood and Tissue da QIAGEN, segundo instruções do fabricante. Para tal, a partir do extrato celular infectado obtido foram aliquotados cerca de 200 µL de amostra. Após centrifugação a 5 minutos, 13.000 rpm (microcentrífuga MicroCI-17R, Thermo Scientific), o sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de PBS 1X. A solução recebeu 20 µL de proteinase K, 200 µL do tampão AL, foi homogeneizada durante 5-10 segundos e então incubada a 56 °C por 10 minutos. Foram adicionados 200 µL de etanol 96% à amostra que foi homogeneizada e então transferida para uma coluna DNeasy mini spin. A coluna foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto e o tubo de coleta descartado. A coluna foi acoplada a um novo tubo de coleta, lavada com 500 µL do tampão AW1 e centrifugada por 1 minuto a 8.000 rpm (microcentrífuga MicroCI-17R, Thermo Scientific). Este último passo foi repetido com tampão AW2 e centrifugação de 3 minutos a 13.300 rpm (microcentrífuga MicroCI-17R, Thermo Scientific). A coluna foi então finalmente acoplada a um tubo novo de 1.5 mL, onde foram adicionados 100 µL de H₂O ultrapura e, após incubação de 1 minuto, centrifugada a 8.000 rpm também por 1 minuto (microcentrífuga MicroCI-17R, Thermo Scientific).

O DNA extraído das culturas celulares foi armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C e será submetido a ensaios de PCR

para verificação da presença do gene de interesse, assim como utilizado nos ensaios de sequenciamento. Ambos os ensaios serão realizados com iniciadores externos senso e anti-senso do plasmídeo pLW44, bem como, iniciadores internos específicos para o gene de interesse.

O RNA total das células infectadas com rMVA-hACE2 foi extraído através do kit de extração de RNA viral da PHONEUTRIA, segundo instruções do fabricante, para posterior transcrição reversa e avaliação da transcrição do mRNA codificador da proteína recombinante de interesse.

A partir do extrato celular infectado obtido foram aliqüotados cerca de 100 µL de amostra. Inicialmente a proteinase K (PK) foi liofilizada com 100 µL de tampão de reconstituição. Logo após, foi pipetado 100 µL de amostra no tubo de lise e 2 µL de PK. A mistura foi então homogeneizada suavemente e incubada por um período de tempo entre 30 e 60 segundos. Após esse tempo, foi adicionado 400 µL de solução de lise e a mistura foi passada no vórtex (velocidade máxima) por 5 segundos. Logo após, a mistura também foi centrifugada rapidamente, por spin, (AJX-1008). Logo após esse processo, foi adicionado 250 µL de etanol ao tubo de lise contendo a amostra e a solução de lise. O conjunto foi então homogeneizado com o auxílio de uma pipeta de volume apropriado para passar todo o volume da amostra (~750 µL) para uma coluna com tubo coletor identificado. O tubo foi fechado e logo em seguida, centrifugado por 2 minutos a 6000g (microcentrífuga MicroCI-17R, Thermo Scientific), a 4°C. Posteriormente, a coluna contendo a amostra foi transferida para um novo tubo coletor, sendo o tubo coletor com o filtrado descartado. Sendo assim, o RNA ficou ligado na coluna. Logo após, foram adicionados 350 microlitros da solução A na coluna, sendo a tampa fechada e uma nova centrifugação foi realizada por 30 segundos a 10.000g (microcentrífuga MicroCI-17R, Thermo Scientific), a 4°C. Em seguida, foram adicionados 400 µL de solução B na coluna e esta, com a tampa fechada, foi novamente centrifugada por 30 segundos a 10.000g (microcentrífuga MicroCI-17R, Thermo Scientific), a 4°C. Logo após, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e centrifugada a 3 minutos por 10.000g (microcentrífuga MicroCI-17R, Thermo Scientific), a 4°C, sendo o tubo coletor anterior descartado. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um tubo de eluição com tampa (microtubo de 2,0 ml). O RNA ainda permaneceu ligado à coluna nessa etapa. Em seguida, foi adicionado à coluna de 25 a 50 µL de tampão de eluição livre de RNase/DNase, dispensados diretamente no centro da membrana e a mistura foi

incubada por 1 minuto. Após esse período, uma nova centrifugação foi realizada por 3 minutos a 10.000g (microcentrífuga MicroCl-17R, Thermo Scientific), a 4°C, mantendo a tampa da coluna fechada. Em seguida a coluna foi descartada, já que nesse momento o RNA saiu da coluna e ficou disponível em solução. A qualidade e a concentração do RNA foram dosadas em Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Posteriormente o RNA foi armazenado em ultrafreezer (Thermo SCIENTIFIC 700 SERIES) a -80°C.

5.4.2 Avaliação da expressão da proteína hACE2

Nessa etapa foi realizada uma imunofenotipagem através da utilização de anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos. A marcação da proteína foi feita com um anticorpo anti-ace2 [EPR4435] (anticorpo primário) de coelho e um anticorpo anti-IgG de coelho [anti-rabbit DNK pAb to Rb IgG] (anticorpo secundário) contendo o fluoróforo ficoeritrina (PE).

Sendo assim, células BHK-21 foram semeadas em garrafas de cultura (A75 - 80 cm² Sarstedt) e incubadas até a monocamada atingir uma confluência de aproximadamente 95% (A75 – 11 x 10⁶ células/poço). Após a monocamada atingir a confluência desejada as células foram infectadas, em uma garrafa, com o rMVA-hACE2, m.o.i. 1, e em outra garrafa, com o controle de vírus, MVA-GFP (m.o.i 1) por 24h em estufa, a 37°C, a 5% de CO₂ (Thermo Scientific – Modelo 3111). Para a infecção o vírus foi previamente sonificado (BRANSON 1510) por três ciclos com intervalos de 30 segundos no gelo, e as células lavadas com PBS 1X aquecido em banho Maria (MARCONI MA 127) a 36°C. Após sonificar os vírus, uma garrafa de células foi infectada com 30 µL do rMVA-hACE2 e completada com 14,7 mL de meio DMEM 2,5% SFB; e outra garrafa com 2 µL do vírus controle (MVA-GFP) e completada com 14,98 mL de meio DMEM 2,5% SFB. Posteriormente ao intervalo de infecção, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBS 1X, tripsinizadas e ressuspensas em 1mL de DMEM 2,5% SFB. Logo após, as células foram coletadas em tubo Falcon de 50 mL e o volume centrifugado por 5 min à 1500 rpm (Centrífuga Nuve NF 800R), a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet novamente ressuspensado em 1 mL de DMEM 2,5% SFB. As células viáveis foram contadas em uma câmara de Neubauer e ajustadas para a quantidade de 1 x 10⁷ células/mL. Utilizando uma placa de 96 cavidades foi

adicionado 1×10^6 células/cavidade. Então a placa foi centrifugada a 2100 rpm por 3 minutos (Centrífuga Nuve NF 800R) a 4°C. O sobrenadante foi descartado vertendo-se a placa. Logo após o pellet foi homogeneizado cuidadosamente por aproximadamente 10X e as células ressuspensas em 100 µL do corante live/dead, seguido de um período de 15 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente.

Posteriormente ao período de incubação, as células foram lavadas com PBS wash e em seguida, centrifugadas (Centrífuga Nuve NF 800R) a 2100 rpm, por 3 minutos a 4°C. Após a centrifugação 50 µl anticorpo primário anti-Flag (Sigma – F3165) ou anti-ACE2 antibody [EPR4435(2)] ab108252 (diluição 1: 1000) foi adicionado e a placa passada cuidadosamente no vórtex (DAIGGER Vortex Genie 2TM – G22220). Em seguida a placa foi encoberta em papel alumínio e incubada à 37°C em estufa por um período de 30 minutos (Thermo Scientific – Modelo 3111). Seguido o período de incubação, foi adicionado 150 µL de PBS wash e a placa foi então novamente centrifugada a 2.100 rpm por 3 minutos (Centrífuga Nuve NF 800R) a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, a placa novamente passada no vórtex (DAIGGER Vortex Genie 2TM – G22220) e o pellet ressuspensado em 50 µL do anticorpo secundário anti-mouse IgG TRITC (Sigma) ou DNK pAb t α Rb IgG (PE). Em seguida a placa passou por um novo período de incubação à 37°C por 30 minutos (Thermo Scientific – Modelo 3111). Logo após foi adicionado 150 µL de PBS wash e a placa foi novamente centrifugada a 2100 rpm, por 3 minutos (Centrífuga Nuve NF 800R) a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado, a placa novamente passada no vórtex (DAIGGER Vortex Genie 2TM – G22220) e o pellet ressuspensado em 50 µL de paraformaldeído (PFA) 1% no escuro. Em seguida a placa foi incubada à temperatura ambiente, no escuro, por 20 minutos. Passado esse período foi adicionado 150 µL de PBS wash e a placa foi centrifugada por 2100 rpm, por 3 minutos (Centrífuga Nuve NF 800R) a 4°C. Logo após, o sobrenadante foi descartado e a placa passada novamente no vórtex (DAIGGER Vortex Genie 2TM – G22220). As células foram então lavadas mais uma vez com 150 µL de PBS wash e a placa foi centrifugada por 2100 rpm, por 3 minutos (Centrífuga Nuve NF 800R) a 4°C, descartando o sobrenadante e vortexando (DAIGGER Vortex Genie 2TM – G22220) a placa. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS wash e transferidas para tubos de citometria, os

quais foram utilizados para leitura das amostras em citômetro de fluxo. Um total de 50.000 eventos foram lidos.

6 RESULTADOS

6.1 CONSTRUÇÃO DO VÍRUS rMVA-hACE2

6.1.1 Transfecção

O vírus rMVA-hACE2 foi originado a partir da transfecção de 2 µg do plasmídeo de transferência (m.o.i 1) com MVA selvagem em cultura de células BHK-21, com confluência entre 80-90%, em placa de 6 poços, com 48h de infecção. Uma quantidade de 250 µl da transfecção foi coletada e submetida à técnica de separação por *Cell sorting*. A observância de fluorescência, resultante da recombinação homóloga bem sucedida entre o vetor de transferência (pLW44-hACE2) e o vírus MVA-WT, indicou a presença dos vírus recombinantes rMVA-hACE2.

Sendo assim, as figuras 14.A e 14.B mostram células não transfectadas ou controle de células, visualizadas sob microscopia de transmissão óptica e microscopia de fluorescência, respectivamente. O resultado da transfecção não submetida ao processo de *Cell sorting* é mostrado na figura 14.D, e a transfecção submetida à técnica de *Cell sorting* na figura 14.E; ambas visualizadas sob microscopia de fluorescência.

Por sua vez, a figura 14.C mostra células transfectadas visualizadas sob microscopia de transmissão óptica. Nesse aspecto, embora o MVA não forme placas de lise em cultivos celulares, é possível observar, em comparação com as células não transfectadas (figura 14.A), que há uma alteração na morfologia das células, com uma tendência ao arredondamento das células infectadas; o que também sugere infecção pelo vírus.

Ainda, é possível observar que na transfecção submetida ao processo de *Cell sorting* (figura 14.E) houve uma separação mais eficiente das células infectadas com o rMVA-hACE2, após a recombinação homóloga; uma vez que houve um aumento da quantidade de focos de fluorescência, quando comparado com a transfecção não submetida à técnica de *Cell sorting* (figura 14.D).

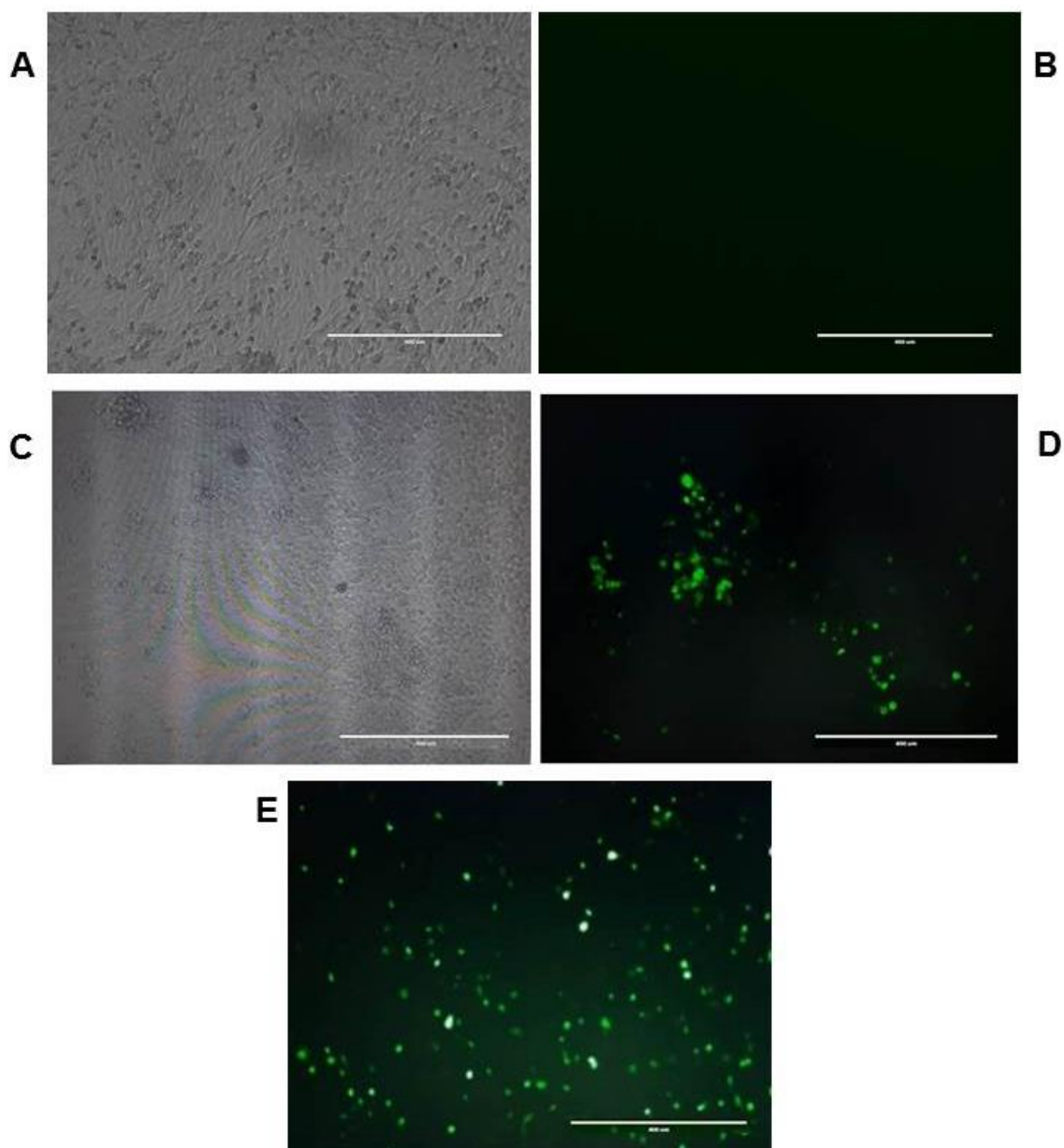


Figura 14. Geração de vírus recombinantes (rMVA-hACE2) em cultura de células BHK-21. Transfecção de cultura de células infectadas com vírus MVA-WT em placa de 6 poços com o plasmídeo de transferência pLW44-hACE2 (aumento 400x). A) Controle de Células - células BHK-21 sob microscopia óptica; B) Controle de Células - células BHK-21 sob microscopia de fluorescência; C) Células BHK-21 infectadas com MVA-WT e transfectadas com pLW44-hACE2 (m.o.i 1) sob microscopia de transmissão óptica. Transfecção não submetida à técnica de *Cell sorting*; D) Células BHK-21 transfectadas realizada com pLW44-hACE2 (m.o.i 1) sob microscopia de fluorescência. Transfecção não submetida ao processo de *Cell sorting*; E) Células BHK-21 transfectadas com pLW44-hACE2 (m.o.i 1) sob microscopia de fluorescência. Transfecção submetida ao processo de *Cell sorting*. Aumento (400x).

6.1.2 Seleção clonal – Purificação em placa x *Cell sorting*

Os vírus recombinantes oriundos da transfecção foram submetidos a sucessivas rodadas de infecção (purificação em placa), em gel de agarose 2%, em culturas de células BHK-21 com confluência satisfatória (80-90%), em placa 6 de poços, com 72h de infecção, para segregar o vírus rMVA-hACE2 e eliminar o MVA selvagem. A triagem dos focos de infecção foi baseada na observação de agregados de células infectadas sob luz fluorescente. Em paralelo, o produto da transfecção também foi submetido à técnica de *Cell sorting*.

Na figura 15 está representado o esquema de seleção clonal dos vírus recombinantes (rMVA-hACE2) obtidos com a transfecção não submetida à técnica de *Cell sorting*. Logo abaixo do título estão esquematizadas as rodadas sequenciais de seleção em agarose: da esquerda para a direita (1^a, 2^a, 3^a e 4^a rodadas). Abaixo de cada rodada é possível observar o número de clones obtidos, com seta(s) azul (is) entre cada rodada indicando a progressão (representada pelo número do clone) ou não (representada pelo símbolo Ø) de cada clone para a rodada seguinte. O(s) clone(s) elegível (eis), quando mais de um disponível, está (ão) destacado(s) com um asterisco vermelho.

Na figura 15, é possível observar que uma mínima quantidade de clones rMVA-hACE2, aproximadamente entre 4 e 5, é obtida em cada rodada de seleção. Além disso, os clones não progridem da terceira passagem seriada em gel de agarose 2%.

À direita na figura 15, é possível observar, ressaltadas por uma chave (em azul), as fotos (sob microscopia de fluorescência) do clone 4 e seus sucessores (4.1 e 4.1.3), destacados em vermelho, em cada uma das rodadas de seleção, 1^a, 2^a e 3^a, respectivamente. A letra X, destacada em vermelho, representa a não progressão do clone para a 4^a rodada.

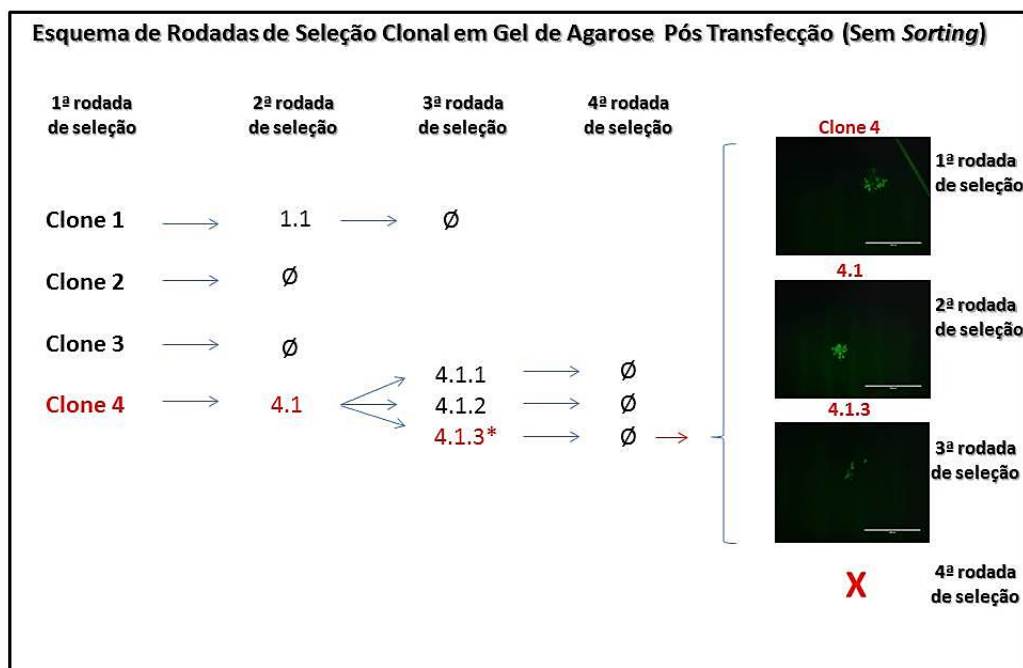


Figura 15. Esquema de rodadas de seleção clonal em gel de agarose com transfecção não submetida ao *Cell sorting*. Logo abaixo do título, da esquerda para direita, estão representadas as rodadas de seleção em agarose: 1ª, 2ª e 3ª, respectivamente. Embaixo de cada rodada de seleção está discriminada a quantidade de clones obtidos (representada por números). A progressão de cada um deles nas demais passagens está indicada por setas azuis (entre cada uma das rodadas). A não progressão do clone é indicada pelo símbolo de vazio (∅). À direita da figura e destacada por uma chave azul estão discriminadas as fotos do clone 4 e seus sucessores (4.1; 4.1.3) na 1ª, 2ª e 3ª rodadas de seleção, respectivamente. A letra X (destacada em vermelho) indica a não progressão do clone para a 4ª rodada.

Na figura 16 está representado o esquema de seleção clonal dos vírus recombinantes (rMVA-hACE2) obtidos com a transfecção submetida à técnica de *Cell sorting*. Logo abaixo do título estão esquematizadas as rodadas sequenciais de seleção em agarose: da esquerda para a direita (1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª e 6ª rodadas). Abaixo de cada rodada é possível observar o número de clones obtidos, com seta(s) azul (is) entre cada rodada indicando a progressão (representada pelo número do clone) ou não (representada pelo símbolo de vazio “∅”) de cada clone para a rodada seguinte. O(s) clone(s) elegível(s), quando mais de um disponível, está (ão) destacado(s) com um asterisco vermelho.

É possível observar que com o emprego do *Cell sorting* uma quantidade superior de clones pode ser recuperada: 47. Conseqüentemente, uma quantidade satisfatória de clones progride nas passagens seriadas, sendo que o clone eleito para amplificação (25.3.1) seguiu até a sexta passagem em gel de agarose 2%.

Um primeiro destaque na figura 16 é dado ao clone de número 25 (em vermelho). Pelas características desejáveis apresentadas (dado não mostrado), este

clone foi eleito para prosseguir nas passagens seriadas. Na segunda rodada de seleção do clone 25, dentre os quatro clones selecionados e coletados (25.1; 25.2; 25.3; 25.4), o clone 25.3* (destacado em vermelho e com asterisco) foi eleito para prosseguir na terceira rodada de seleção. Nesta rodada, o clone 25.3.1* (destacado em vermelho e com asterisco), dentre outros coletados (25.3.1; 25.3.2; 25.3.3), foi eleito para seguir nas demais passagens seriadas.

Também é possível observar na figura 16, ressaltadas por uma chave (em azul) as fotos (sob microscopia de fluorescência) do clone 25.3.1 e seus sucessores (25.3.1.1; 25.3.1.1.4; 25.3.1.1.4.1), destacados em vermelho, em cada uma das rodadas de seleção, 3^a, 4^a, 5^a e 6^a rodada, respectivamente. A partir da 6^a passagem em meio semissólido foi possível iniciar a amplificação viral.

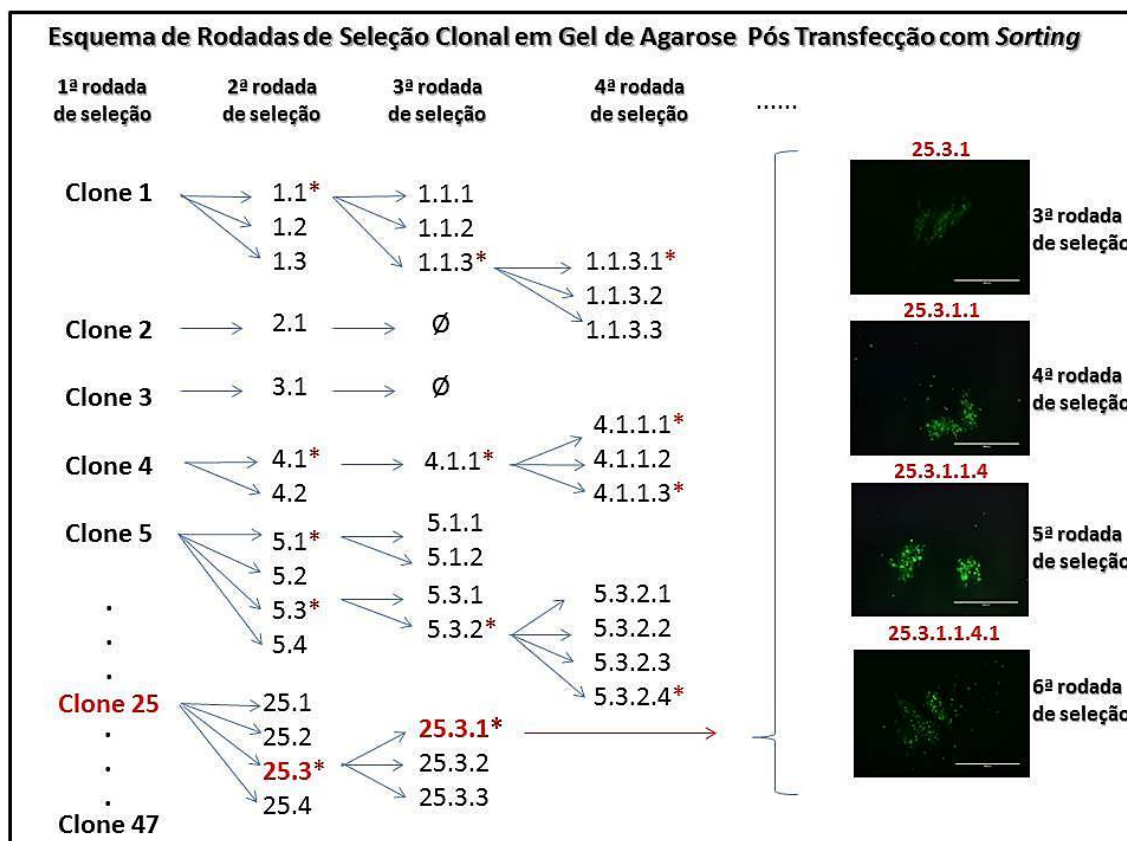


Figura 16. Esquema de rodadas de seleção clonal em gel de agarose com transfecção submetida ao *Cell sorting*. Logo abaixo do título, da esquerda para direita, estão representadas as rodadas de seleção em agarose: 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª e 6ª respectivamente. Embaixo de cada rodada de seleção está discriminada a quantidade de clones obtidos (representada por números). A progressão de cada um deles nas demais passagens está indicada por setas azuis (entre cada uma das rodadas). A não progressão do clone é indicada pelo símbolo de vazio (\emptyset). À direita da figura e destacadas por uma chave azul estão discriminadas as fotos dos clones 25.3.1; 25.3.1.1; 25.3.1.1.4; 25.3.1.1.4.1 na 3ª, 4ª, 5ª e 6ª rodada de seleção, respectivamente.

Na figura 17 é possível observar e comparar a robustez dos clones obtidos de acordo com a quantidade de rodadas de *Cell sorting*, em monocamada de células BHK-21 com confluência satisfatória (80-90%), em placa de 6 poços, em gel de agarose 2%, com 72h de infecção.

Na figura 17.A é possível observar o controle de células (BHK-21) sob microscopia de transmissão óptica, com a monocamada íntegra e as células com sua morfologia usual. Em 17.B é possível observar o controle de células sob microscopia de fluorescência. A não observância de fluorescência no controle de células indica a ausência de vírus recombinantes. Em 17.C, foto sob microscopia de transmissão óptica de uma monocamada infectada com um clone na 6ª rodada de seleção após uma primeira rodada de *Cell sorting*, e em 17.E foto sob microscopia

de transmissão óptica de um clone na 2ª rodada de seleção após a segunda rodada de *Cell sorting*. Em ambas as fotos, quase não é possível observar a tímida alteração na morfologia das células nos focos de infecção dos clones, em comparação com o controle. Isto porque, o MVA não forma placas de lise em culturas de células. Sendo assim, a visualização precisa e inequívoca dos clones só é possível sob microscopia de fluorescência, através da expressão da proteína GFP pelo vírus.

Em 17.D, é possível visualizar o clone da foto C sob microscopia de fluorescência, assim como em 17.F é possível à visualização do clone em 17.E. O clone mostrado em 17.F, obtido com uma segunda rodada de *Cell sorting*, se apresenta maior, uma vez que ambos são visualizados com aumento de 400x, e mais robusto; quando comparado com o clone da foto D, obtido com somente uma rodada de *Cell sorting*. Sendo assim, a robustez dos clones demonstrou superioridade com a implementação da segunda rodada de *Cell sorting*.

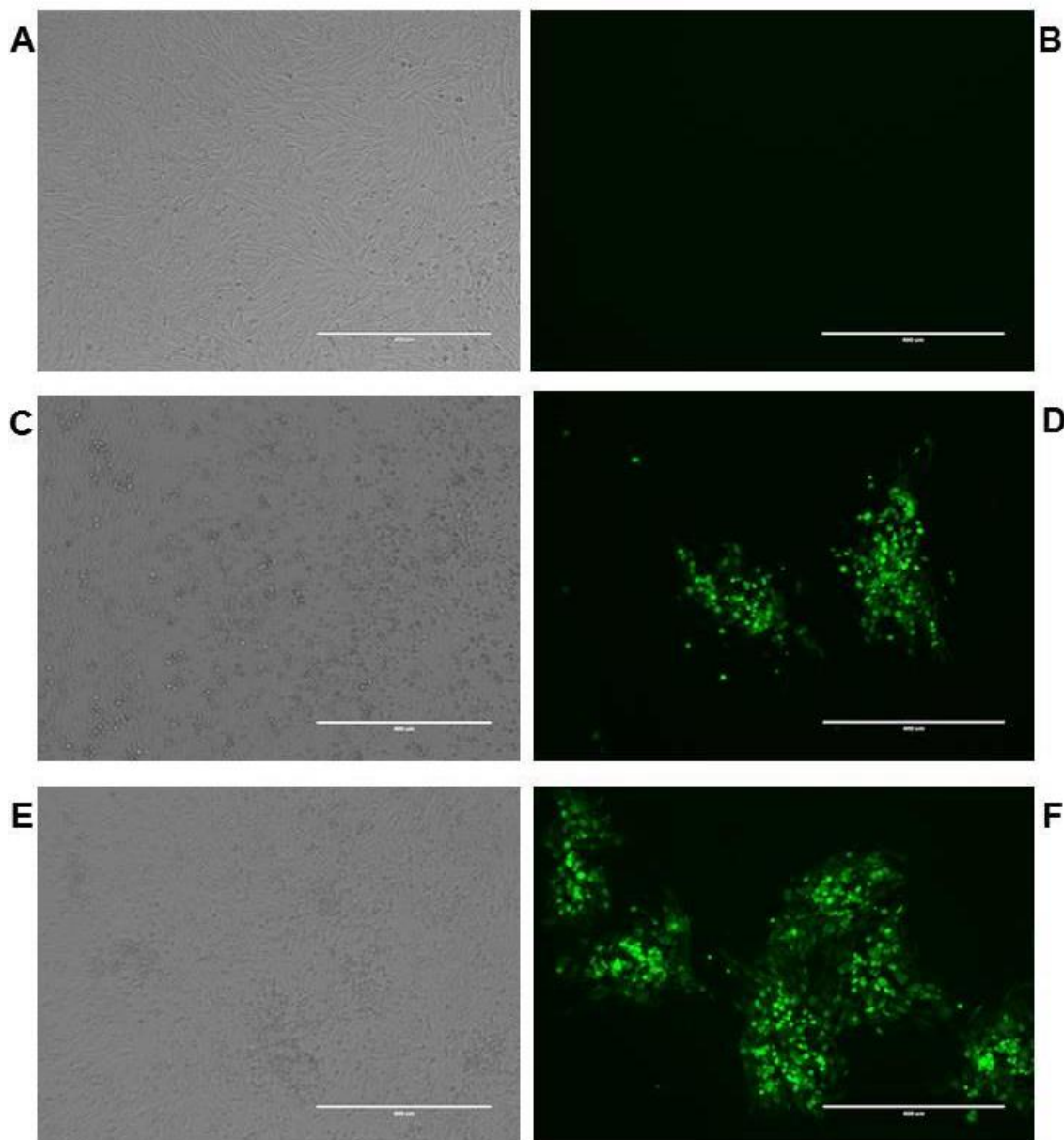


Figura 17. Purificação em placa – Comparação da robustez de clones recombinantes (rMVA-hACE2) em cultura de células BHK-21 (Agarose com 1ª rodada de *Cell sorting* X Agarose com 2ª rodada de *Cell sorting*). Infecção de cultura de células em placa de 6 poços, em agarose 2%, com vírus recombinantes rMVA-hACE2). A) Controle de Células - células BHK-21 sob microscopia óptica; B) Controle de Células - células BHK-21 sob microscopia de fluorescência; C) Clone de rMVA-hACE2 oriundo da primeira rodada de *Cell sorting* na 6ª rodada de seleção em gel de agarose, em monocamada de células BHK-21, sob microscopia óptica. D) Clone de rMVA-hACE2 oriundo da primeira rodada de *Cell sorting* na 6ª rodada de seleção em gel de agarose, em monocamada de células BHK-21, sob microscopia de fluorescência. E) Clone de rMVA-hACE2 oriundo da segunda rodada de *Cell sorting* na 2ª rodada de seleção em gel de agarose, em monocamada de células BHK-21, sob microscopia óptica. F) Clone de rMVA-hACE2 oriundo da segunda rodada de *Cell sorting* na 2ª rodada de seleção em gel de agarose, em monocamada de células BHK-21, sob .microscopia de fluorescência. Aumento de 400x.

Na figura 18 é possível comparar a eficiência dos métodos de purificação em placa (agarose sem *Cell sorting*, agarose com uma rodada de *Cell sorting* e agarose com duas rodadas de *Cell sorting*), em clones crescidos em monocamada de células BHK-21 com confluência satisfatória (80-90%), em placa de 6 poços, em gel de agarose 2%, com 72h de infecção.

Da esquerda para direita, está descrito a seleção de clones em três momentos: seleção clonal sem o emprego do *Cell sorting* (clones obtidos a partir de transfecção não submetida ao método); seleção clonal após a primeira rodada de *Cell sorting* (clones obtidos a partir de transfecção submetida ao método) e seleção clonal após a segunda rodada de *Cell sorting* (clones obtidos a partir de amplificação submetida ao método).

De cima para baixo (à esquerda) legendas discriminando o número da passagem (rodada de seleção) à qual os clones pertencem. Sendo assim: 1ª passagem (clones A1, A2 e A3), 2ª passagem (clones B1, B2 e B3), 3ª passagem (clones C1, C2 e C3) e na 6ª passagem (abaixo e ao centro) o clone D1.

A letra X (destacada em vermelho e no lado esquerdo da figura) indica a não progressão do clone para a próxima passagem seriada. A reticência vertical (em preto e ao centro, abaixo do clone C2) indica um salto entre a 3ª e a 6ª passagem.

A primeira coluna (do lado direito da figura) de clones (A1, B1 e C1) remete à seleção sem o emprego de *Cell sorting* (transfecção não submetida ao método), cada um deles em suas respectivas passagens (A1 – 1ª passagem; B1 – 2ª passagem; C1 – 3ª passagem). Nesse contexto, é possível observar que a seleção clonal sem *Cell sorting* não demonstra eficiência para amplificação do vírus, já que os clones não progredem da terceira passagem; resultado, dentre outras características, de uma robustez não satisfatória.

A segunda coluna (ao centro da figura) de clones (A2, B2 e C2) remete à seleção com a primeira rodada de *Cell sorting* (transfecção submetida ao método), cada um deles em suas respectivas passagens (A2 – 1ª passagem; B2 – 2ª passagem; C2 – 3ª passagem; D2 – 6ª passagem). Nesse contexto, é possível observar que a seleção clonal após a primeira rodada de *Cell sorting* demonstra eficiência para amplificação do vírus, já que os clones além de progredirem até a sexta passagem (clone D2), viabilizaram os ensaios de amplificação viral. Também é possível observar que os clones ficam mais robustos, ganhando força, a cada passagem seriada. Adicionalmente, na 6ª passagem, o clone D2 apresenta uma

tendência ao isolamento dos vírus, o que demonstra que está apto para amplificação; esta última, demonstrada na figura E2 da segunda coluna. Apesar de o método permitir a amplificação, esta se demonstrou insatisfatória, a julgar pela robustez e demora, uma vez que foram necessárias seis rodadas de seleção para viabilizá-la.

A terceira coluna (do lado direito da figura) de clones (A3 e B3) remete à seleção com a segunda rodada de *Cell sorting* (amplificação submetida ao método), cada um deles em suas respectivas passagens (A3 – 1ª passagem; B3 – 2ª passagem; C3 – 3ª passagem/amplificação). Nesse aspecto, é possível observar que a seleção clonal após a segunda rodada de *Cell sorting* demonstra superior eficiência, tanto no que diz respeito à amplificação do vírus, quanto no tocante ao número de passagens em agarose necessária para a amplificação. É possível observar que o método não apenas viabilizou a amplificação, como esta se demonstrou mais robusta, com uma maior quantidade de células infectadas, observada pela intensidade de fluorescência; quando comparada com a amplificação da seleção clonal com apenas uma rodada de *Cell sorting*. Além disso, foram necessárias apenas duas rodadas de seleção em agarose (clones A3 e B3), com a amplificação já ocorrendo no que seria a terceira passagem seriada (figura C3).

Os dados demonstram a assertividade e eficiência do emprego de duas rodadas de *Cell sorting* como ajuste de protocolo para obtenção de vírus recombinantes.

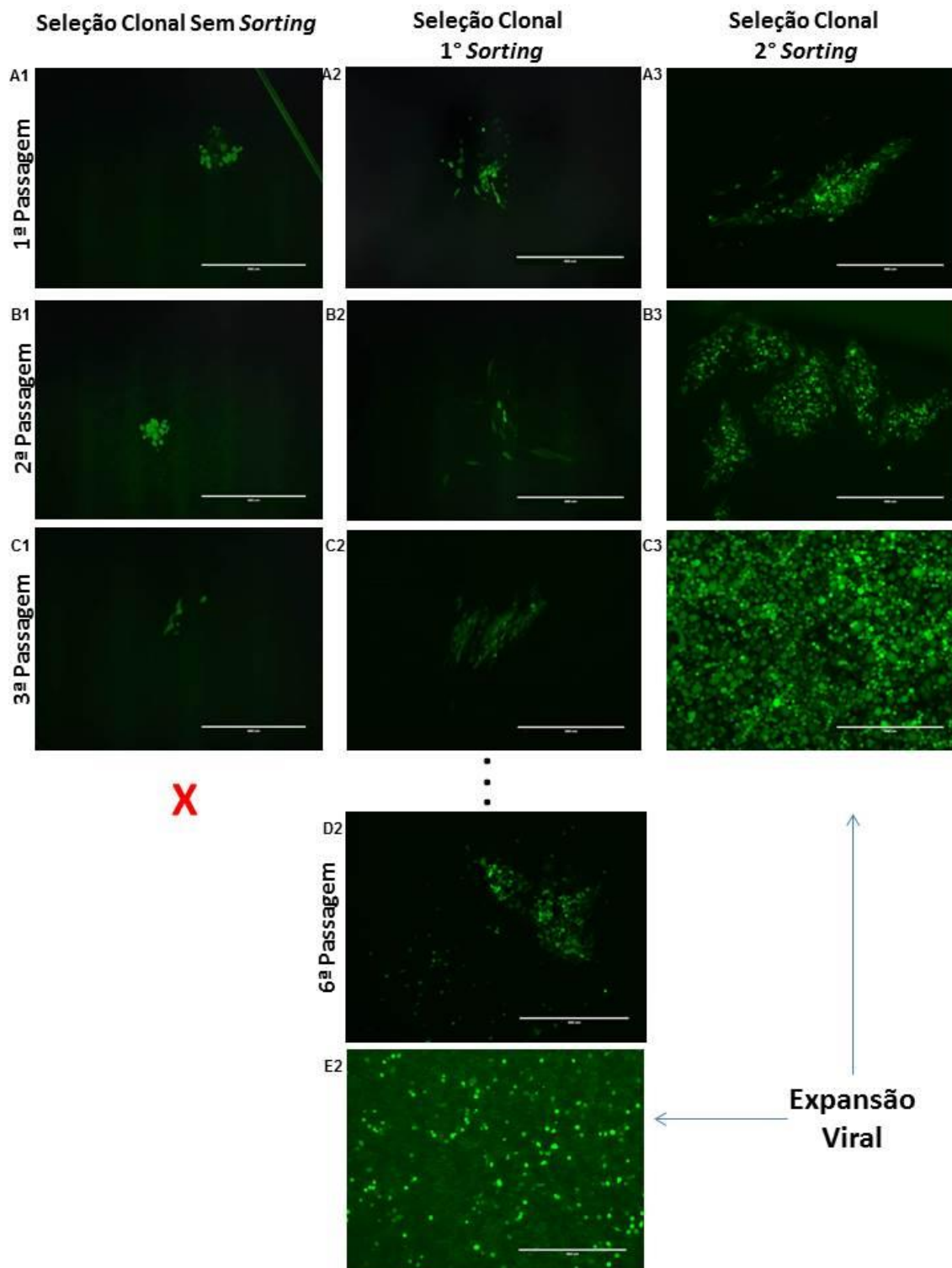


Figura 18. Eficiência dos métodos de purificação em placa (agarose x 1º *Cell sorting* x 2º *Cell sorting*) para amplificação. Da esquerda para direita, como indicado nas legendas (parte superior da figura) está descrito a seleção de clones em três momentos: seleção clonal sem o emprego do *Cell sorting* (clones obtidos a partir de transfecção não submetida ao método); seleção clonal após a primeira rodada de *Cell sorting* (clones obtidos a partir de transfecção submetida ao método) e seleção clonal após a segunda rodada de *Cell sorting* (clones obtidos a partir de amplificação submetida ao método). De cima para baixo (à esquerda) legendas discriminando o número da passagem (rodada de seleção) à qual os clones pertencem: 1ª passagem (clones A1, A2 e A3), 2ª passagem (clones B1, B2 e B3), 3ª passagem (clones C1 e C2) e na 6ª passagem (abaixo e ao centro) o clone D1. As figuras indicadas por (E2 e C3) indicam a amplificação viral, com uma rodada de *Cell sorting* e com duas rodadas de *Cell sorting*, respectivamente. A letra X (destacada em

vermelho e no lado esquerdo da figura) indica a não progressão do clone para a próxima passagem seriada. A reticência vertical (em preto e ao centro, abaixo do clone C2) indica um salto entre a 3ª e a 6ª passagem. As setas em azul indicam a amplificação em E2 (seta horizontal) e em C3 (seta vertical). Figura produzida pela autora.

6.1.3 Amplificação viral

Na figura 19 é possível comparar a robustez de amplificação em relação à quantidade de rodadas de *Cell sorting* aplicadas: com uma rodada de *Cell sorting* e com duas rodadas de *Cell sorting*. A amplificação ocorreu de forma gradativa (placa 24 poços, placa 12 poços, placa 6 poços, garrafa A25 cm², garrafa A75 cm² e garrafa A150 cm²), em monocamada de células BHK-21, com confluência satisfatória (80-90%), em meio DMEM 2,5% de soro fetal bovino, com aproximadamente 24h de infecção.

Em A é possível observar o controle de células (BHK-21) sob microscopia de transmissão óptica, com a monocamada íntegra e as células com sua morfologia usual. Em B é possível observar o controle de células sob microscopia de fluorescência. A não observância de fluorescência no controle de células indica a ausência de vírus recombinantes. Em C, foto sob microscopia de transmissão óptica de uma monocamada infectada com vírus após a primeira rodada de *Cell sorting*, e em E foto sob microscopia de transmissão óptica de uma monocamada infectada com vírus amplificados após a segunda rodada de *Cell sorting*. Em ambas as fotos, é possível observar alteração na morfologia das células e uma monocamada quase e/ou completamente desintegrada, em comparação com o controle. Isto porque com a amplificação há um aumento da quantidade de vírus recombinantes. Logo, é possível presumir o sucesso da infecção pelos vírus recombinantes quando da observação sob microscopia de transmissão óptica; diferente da etapa de purificação em placa.

Em D é possível visualizar a amplificação com apenas uma rodada de *Cell sorting*, sob microscopia de fluorescência. Da mesma forma, em F é possível à visualização da amplificação com duas rodadas de *Cell sorting*, sob microscopia de fluorescência. Nesse aspecto, a amplificação visualizada em F foi mais robusta quando comparada com a amplificação em D. Sendo assim, o emprego da segunda rodada de *Cell sorting* demonstrou eficiência e superioridade também para a amplificação viral.

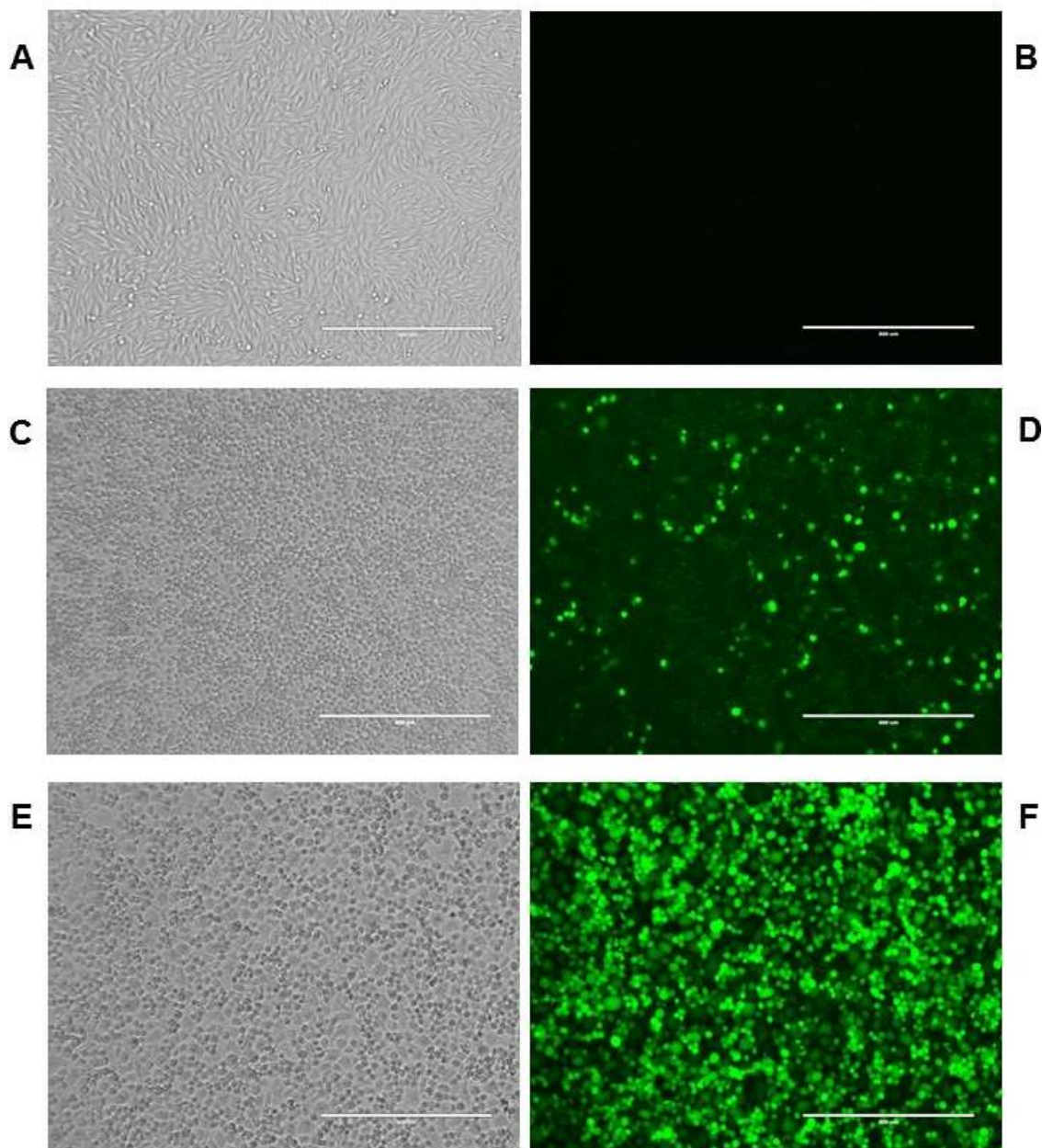


Figura 19. Amplificação de vírus recombinantes (rMVA-hACE2) em cultura de células BHK-21. Comparação da robustez de amplificação (Antes do 2º *Cell sorting* X Após o 2º *Cell sorting*). Infecção de vírus recombinantes rMVA-hACE2 em células BHK-21 em garrafa de cultura de células A 75 cm². A) Controle de Células - células BHK-21 sob microscopia óptica; B) Controle de Células - células BHK-21 sob microscopia de fluorescência; C) Vírus recombinantes amplificados em garrafa A 75 cm², sob microscopia óptica. Vírus amplificados com uma rodada de *Cell sorting*. D) Vírus recombinantes amplificados em garrafa A 75 cm², sob microscopia de fluorescência. Vírus amplificados com uma rodada de *Cell sorting*. E) Vírus recombinantes amplificados em garrafa A 75 cm², sob microscopia óptica. Vírus amplificados com duas rodadas de *Cell sorting*. F) Vírus recombinantes amplificados em garrafa A 75 cm², sob microscopia de fluorescência. Vírus amplificados com duas rodadas de *Cell sorting*. Aumento 400x.

Na figura 20 é possível comparar a progressão e eficiência de amplificação em relação à quantidade de rodadas de *Cell sorting* aplicadas: com uma rodada de *Cell sorting* e com duas rodadas de *Cell sorting*. A amplificação ocorreu de forma gradativa (placa 24 poços, placa 12 poços, placa 6 poços, garrafa A25 cm², garrafa A75 cm² e garrafa A150 cm²), em monocamada de células BHK-21, com confluência satisfatória (80-90%), em meio DMEM 2,5% de soro fetal bovino, com aproximadamente 24h de infecção.

A coluna de fotos à esquerda (A1, B1, C1 e D1) representa a amplificação viral com apenas uma rodada de *Cell sorting*. A coluna de fotos à direita (A2, B2, C2 e D2) representa a amplificação viral após duas rodadas de *Cell sorting*.

No lado esquerdo da figura estão representadas as fases de amplificação gradativa para cada uma das figuras: placa 24 poços (A1 e A2), placa 12 poços (B1 e B2), placa 6 poços (C1 e C2) e garrafa A25 cm² (D1 e D2).

Na amplificação gradativa submetida a apenas uma rodada de *Cell sorting* (coluna à esquerda), é possível observar que com a progressão de amplificação (fotos A1, B1, C1 e D1, respectivamente) a intensidade de fluorescência diminui até quase desaparecer por completo. Isto sugeriu que ainda havia uma considerável quantidade de vírus MVA-WT interferindo negativamente na viabilidade dos vírus recombinantes e conseqüentemente, na expressão da proteína hACE2. Ou seja, não houve uma amplificação eficiente com apenas uma rodada de *Cell sorting*.

Na amplificação gradativa submetida a apenas uma rodada de *Cell sorting* (coluna à direita), é possível observar que com a progressão de amplificação (fotos A2, B2, C2 e D2, respectivamente) a intensidade de fluorescência aumenta, indicando uma amplificação eficiente e robusta de rMVA-hACE2 com duas rodadas de *Cell sorting*.

Após a seleção dos clones de interesse estes foram amplificados e purificados conforme metodologia descrita anteriormente. Unidades formadoras de placa (PFU) foram determinadas para os estoques de vírus em células BHK-21 infectadas em duplicata com o rMVA-hACE2, em diluições seriadas de 10 vezes. O cálculo do título do vírus pode ser medido na diluição 10⁻⁵, resultando em um título final de 3,36 x 10⁷.

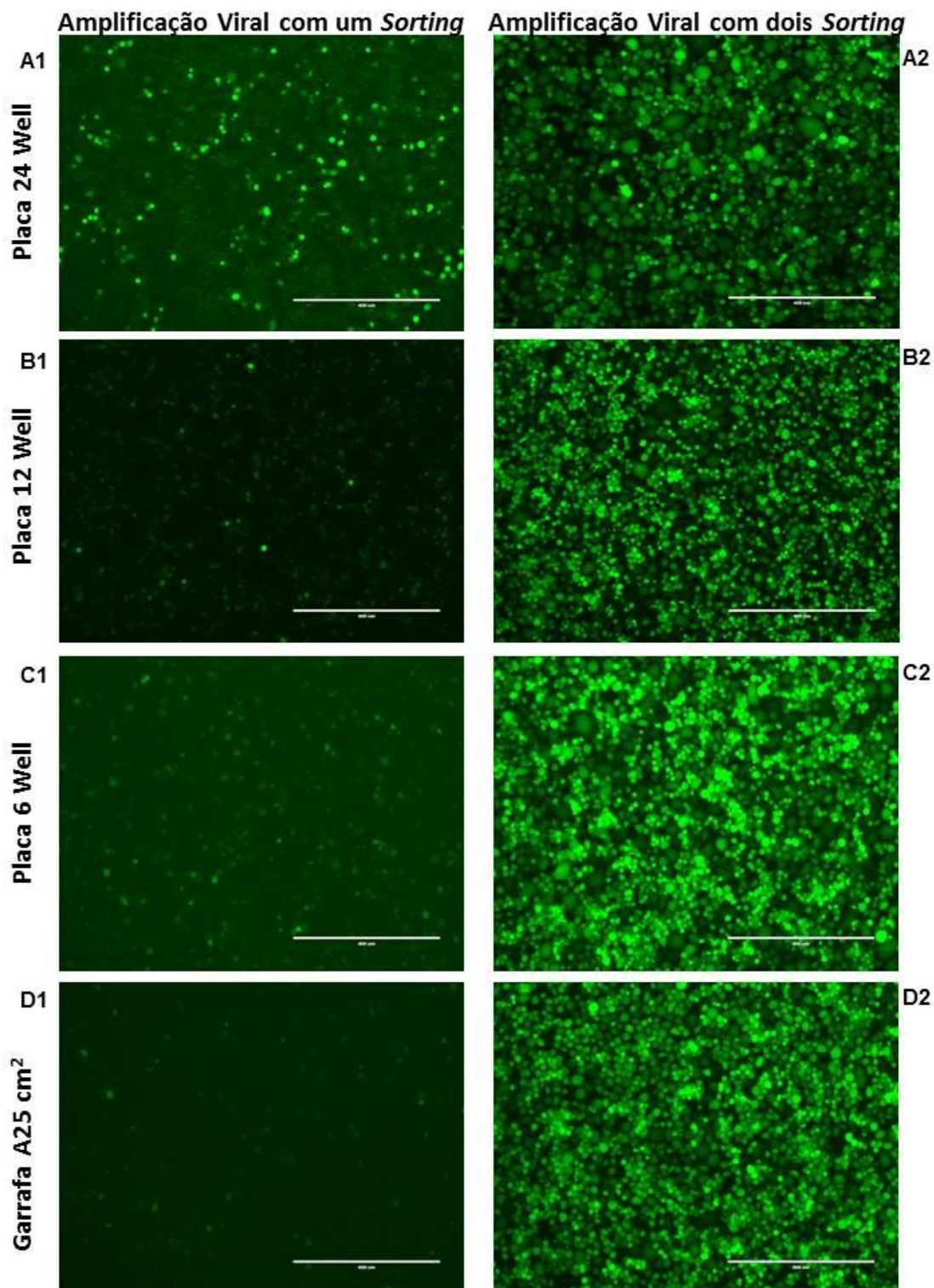


Figura 20. Amplificação gradativa de vírus recombinantes (rMVA-hACE2) em cultura de células BHK-21. Progressão e eficiência de amplificação (antes do 2º *Cell sorting* x após 2º *Cell sorting*). A coluna de fotos à esquerda (A1, B1, C1 e D1) representa a amplificação viral com apenas uma rodada de *Cell sorting* (como escrito no topo da coluna, parte superior esquerda da figura). A coluna de fotos à direita (A2, B2, C2 e D2) representa a amplificação viral após duas rodadas de *Cell sorting* (como escrito no topo da coluna, parte superior direita da figura). No lado esquerdo da figura estão representadas as fases de amplificação gradativa para cada uma das figuras: placa 24 well (A1 e A2), placa 12 well (B1 e B2), placa de 6 poços (C1 e C2) e garrafa A25 cm² (D1 e D2). Fotos sob microscopia de fluorescência e aumento 400x.

6.2 Confirmação da expressão da proteína hACE2

Para a confirmação da expressão da proteína hACE2 pelo vírus recombinante, rMVA-hACE2 foi realizada a técnica de citometria de fluxo, que confirmou com êxito sua expressão.

A marcação da proteína foi feita com um anticorpo anti-ace2 [EPR4435] (anticorpo primário) de coelho (1:1000) e um anticorpo anti-IgG de coelho [anti-rabbit DNK pAb to Rb IgG] (anticorpo secundário) (1:100) contendo o fluoróforo ficoeritrina (PE).

No primeiro gráfico abaixo (figura 21.A), representativo da estratégia de *gating*, foi possível observar a expressão da proteína em todos os subconjuntos avaliados (baixo médio e alto). A expressão foi similar em todos os subconjuntos de células, mesmo sendo esperado que exista certa diferença de expressão porque, já que estima-se que são células em diferentes etapas do ciclo celular que foram separadas por tamanho e granulosidade.

No segundo gráfico (figura 21.B), histograma demonstrando a porcentagem de células BHK-21 PE+ em GFP+ (eixo Y) em cada um dos subconjuntos (eixo X), é possível observar que a expressão de proteína de GFP e a expressão da proteína ACE2 foi confirmada por citometria em comparação com o controle MVA-GFP.

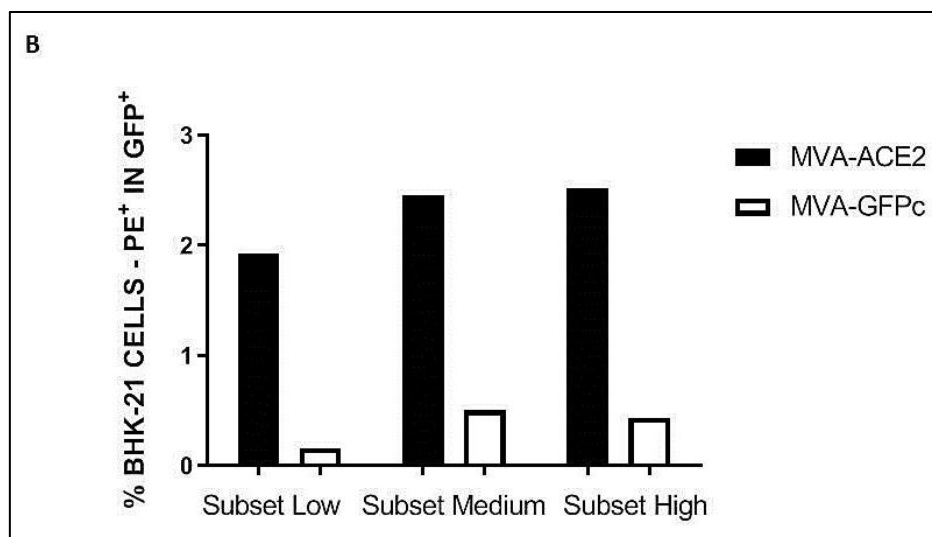
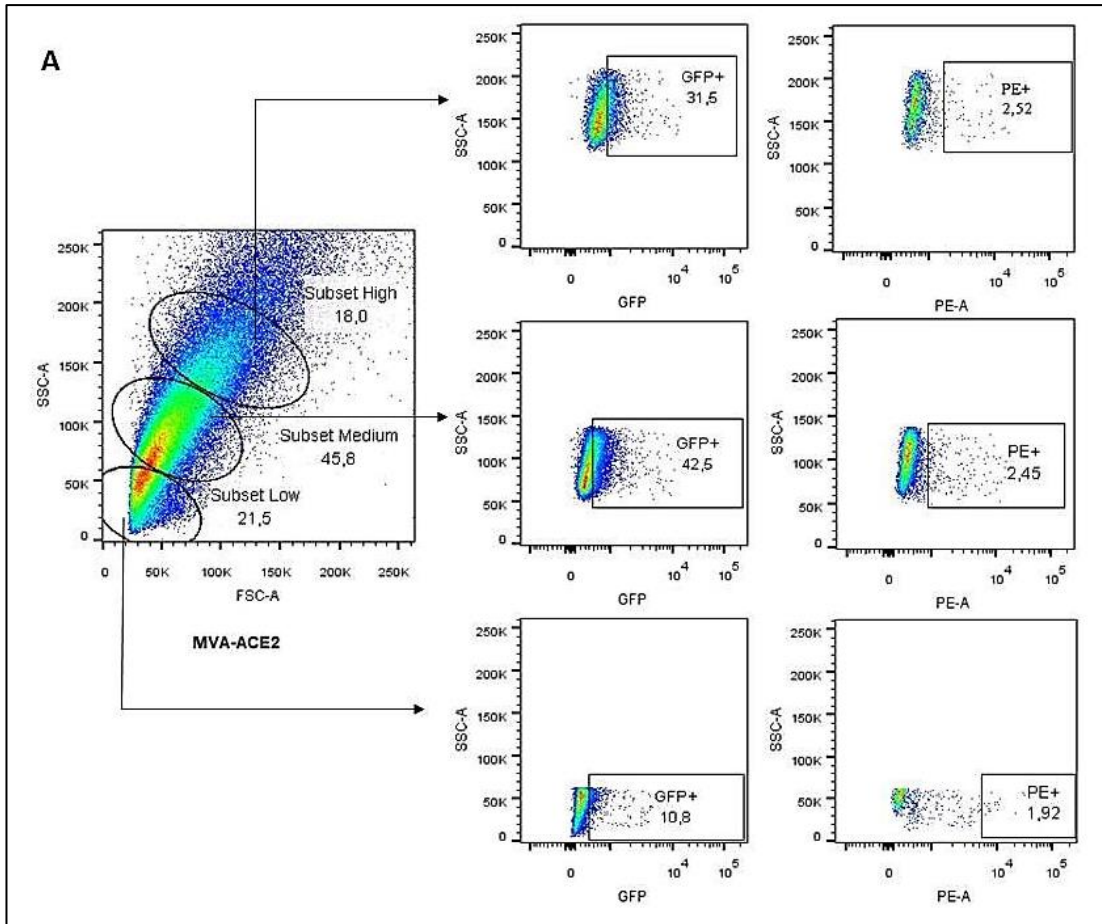


Figura 21. Análise da expressão da proteína ACE2 pelo vetor MVA recombinante.

A) Gráfico representativo da estratégia de gating (acima). Subconjuntos baixo (subset low), médio (subset medium) e alto (subset high) de acordo com o tamanho (FSC) e granulidade da célula (SSC). **B)** Histograma (abaixo) demonstrando a porcentagem de células BHK-21 PE+ em GFP+ (eixo Y) em cada um dos subconjuntos (eixo X) - Em preto: Vírus MVA-ACE2/Clone 2; Em branco: Controle MVA-GFPc. Proteína ACE2 marcada com anti-ACE2 [EPR4435(2)] ab108252 (primário) e anti-rabbit DNK pAb to Rb IgG (PE). (secundário).

7 DISCUSSÃO

O potencial pandêmico do SARS-CoV-2, causador da COVID-19, permanece e o vírus continua emergindo e adquirindo mutações que resultam no surgimento de múltiplas variantes, acima de tudo, as VOCs; às quais dentre outros aspectos podem estar associadas a uma maior transmissibilidade e virulência. Sendo assim, e diante do impacto global e continuado da COVID-19, a pesquisa sobre esta doença ocorre em um ritmo acelerado, e ainda há um grande número de questões a serem respondidas: incluindo a origem do vírus, a razão de sua elevada transmissibilidade, mecanismos subjacentes ao seu amplo espectro de manifestações clínicas, dentre outras (CHU, CHAN e YUEN, 2022).

Dessa forma, o presente estudo consistiu na construção de um vírus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) recombinante expressando a enzima conversora de angiotensina II humana (hACE2) para a criação de um modelo de infecção experimental para o SARS-CoV-2.

A molécula de escolha, hACE2, atua como um receptor para o vírus na etapa de adsorção do seu ciclo de multiplicação. O domínio de ligação do receptor (RBD) da proteína S viral de SARS-CoV e SARS-CoV-2 interage com a hACE2 permitindo a penetração do vírus na célula alvo (YUAN et al, 2020).

Os camundongos não são naturalmente suscetíveis à infecção prototípica por SARS-CoV-2, devido às substituições de aminoácidos que estão presentes na ACE2 do camundongo (mACE2) em comparação com a hACE2 na interface de ligação ACE2-spike (CHU, CHAN e YUEN, 2022). Ou seja, mACE2 não sensibiliza as células para infecção do vírus (SUN et al, 2020; ZHOU et al, 2020). Nesse sentido, os camundongos podem ser sensibilizados à infecção por SARS-CoV-2 a partir da introdução da expressão de hACE2 através de estratégias transgênicas, knock-in, transdução de vetor viral ou adaptação de vírus (BAO et al, 2020; HASSAN et al, 2020; SUN et al, 2020; SUN et al, 2020; WINKLER et al, 2020; WANG et al, 2020; HUANG et al, 2021; ZHANG et al, 2021; DONG et al, 2022).

Entre esses modelos, o modelo K18-hACE2 – originalmente construído para avaliação in vivo de SARS-CoV – é atualmente um dos modelos de camundongos mais usados para investigações de SARS-CoV-2 devido à sua disponibilidade. Nos camundongos K18-hACE2, a expressão de hACE2 é conduzida pelo gene 18 da citoqueratina humana para expressão de alto nível hACE2 em células epiteliais

(MCCRAY et al, 2007). Ainda, é importante ressaltar que K18-hACE2 e outros camundongos transgênicos hACE2 são usados para comparar a patogenicidade de diferentes variantes de SARS-CoV-2 (CHU, CHAN e YUEN, 2022).

A tecnologia knock-in CRISPR/Cas9 também foi utilizada para gerar camundongos suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2 resultando em camundongos hACE2 com multiplicações virais robustas em órgãos do pulmão, traqueia e cérebro (SUN et al, 2020; YE et al, 2021).

Embora as metodologias de transgenia e knock-in tenham gerado modelos experimentais úteis, essas técnicas apresentam desvantagens. Por exemplo, vários modelos de camundongos transgênicos podem oferecer suporte a medições de sobrevivência, mas a expressão ectópica de hACE2 resulta em nível e localização alterados do receptor (SHUAI et al, 2021). Além disso, um tempo demasiadamente longo (meses a anos) pode ser necessário para desenvolver e criar números suficientes de camundongos hACE2-transgênicos ou hACE2-knockin. Períodos de tempo superiores são necessários para cruzar e modificar geneticamente esses camundongos para estudar a patogênese da COVID-19 (SUN et al, 2020).

No tocante à sensibilização de camundongos por transdução de vetor, sistemas baseados em vetores de adenovírus podem ser usados para inserir receptores humanos em genomas de camundongos e têm sido relatados como valiosas ferramentas para uso com camundongos já deficientes em fatores ou transgênicos (JOHANSEN et al, 2020). Essa abordagem, em comparação com as duas anteriores, é mais vantajosa uma vez que é rápida (permite a geração de um modelo murino facilmente reproduzível em 2-3 semanas) e eficiente, já que permite a sensibilização de todas as cepas de camundongos e todos os camundongos geneticamente modificados (SUN et al, 2020).

O MERS-CoV, assim como o SARS-CoV-2 não infecta naturalmente camundongos. Assim, foram utilizados vetores de adenovírus com defeito de multiplicação para fornecer o receptor humano utilizado pelo vírus, dipeptidil peptidase-4 (hDDP4) em camundongos WT, tornando-os suscetíveis à infecção por MERS-CoV (ZHAO et al, 2014).

Sun e colaboradores (2020) desenvolveram um modelo de infecção eficiente para a patogênese, vacinação e tratamento da COVID-19 pela entrega heteróloga da hACE2 com um adenovírus deficiente em multiplicação (Ad5-hACE2). Os camundongos sensibilizados com o Ad5-hACE2 permitiram avaliações rápidas de

uma vacina candidata, de plasma convalescente humano e de duas terapias antivirais (poli I:C e Remdesivir). Adicionalmente e consistente com os resultados de Sun e colaboradores, o grupo de pesquisa de Hassan e colaboradores (2020) também transduziram analogamente camundongos com Ad5-hACE2 e geraram com sucesso um modelo de infecção e de doença pulmonar para SARS-CoV-2 (HASSAN et al, 2020).

Entretanto, os camundongos transduzidos com Ad5-hACE2 apresentaram algumas limitações. Isto porque, dentre outras questões não desenvolveram a forma grave da doença e também não desenvolveram as manifestações extrapulmonares da doença. Estudos de patogênese, acima de tudo a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), exigirão o desenvolvimento de modelos de infecção que incluam COVID-19 leve e grave (SUN et al, 2020).

Diante das vantagens e limitações dos camundongos transduzidos com Ad5-hACE2 se faz necessário o aprimoramento da técnica de introdução de hACE2 por transdução de vetor. Portanto, a plataforma de vírus MVAs recombinantes se apresenta como uma alternativa promissora, dada à versatilidade desses vírus.

A expressão de proteínas utilizando Vaccínia vírus recombinantes como plataforma tem sido largamente utilizada para expressar genes heterólogos em células de mamíferos, onde modificações pós-traducionais, como a glicosilação, podem ocorrer e levar ao dobramento correto das proteínas exógenas (MOSS e EARL, 2001; BLECKWENN et al, 2003). Essa tecnologia está em uso desde 1984 (MACKETT et al, 1984) e comprovou ser uma abordagem refinada e segura para expressão de proteínas heterólogas (MOSS, 1996; TERAJIMA et al, 2002).

No presente estudo, para a síntese do vírus recombinante (rMVA-hACE2), foi utilizado o método da recombinação homóloga utilizando-se um vetor de transferência em células infectadas por um vírus parental; nesse caso, o MVA-WT. Nesse aspecto, tradicionalmente, a síntese de MVAs recombinantes têm sido fundamentada nesse método baseado em marcadores (DREXLER, STAIB e SUTTER, 2004; WANG et al, 2010). Basicamente, um vetor de transferência abriga o gene de interesse juntamente com um gene repórter inseridos à jusante de um promotor. Em células infectadas com o vírus selvagem, o gene repórter e o gene de interesse são introduzidos no genoma do vírus por recombinação homóloga (KUGLER et al, 2019). Sendo assim, a presença de fluorescência indica o sucesso do processo (WELSH e KAY, 1997; POPOV et al, 2009).

Como vetor de transferência do vírus MVA-WT foi utilizado o plasmídeo pLW44 contendo o gene repórter da proteína verde fluorescente (Green Fluorescence Protein [GFP]) e o gene de interesse (hACE2). Nosso grupo já demonstrou que a expressão de GFP em modelo murino, a partir do vetor MVA, não causa nenhum efeito inflamatório ou patogênico indesejável (DAIAN e SILVA et al, 2019). Esse plasmídeo pLW44 possui um sítio de clonagem a jusante do promotor viral H5 modificado (mH5). Este é um forte promotor do vírus Vaccinia que superexpressa antígenos em doses altas durante a fase inicial e tardia da infecção viral. Ou seja, a expressão do gene de interesse ocorre durante todo o ciclo infectivo do vírus, como relatado por Kugler e colaboradores (2019). Além disso, esse promotor melhora a estabilidade dos genes de inserção durante passagens estendidas quando comparado com alguns outros promotores fortes, como pSyn I ou II (WANG et al, 2010).

A construção do vírus recombinante iniciou-se com o processo de transfecção do plasmídeo recombinante em células infectadas com o MVA selvagem e/ou parental (MVA-WT). Para a manipulação in vitro foram utilizadas as células de linhagem contínua *Baby Hamster Kidney* (BHK-21), sendo estas suscetíveis e permissivas à multiplicação do MVA, assim como, as células de cultivo primário, *Chicken Embryo Fibroblasts* (CEF), como relatado por Meiser e colaboradores (2003). Da mesma maneira, Oliveira (2019) demonstrou similar eficiência de multiplicação em CEF's e em BHK-21 na construção de MVAs recombinantes expressando a proteína E de Dengue vírus. Tal fato é de grande valia uma vez que as células de cultivo primário apresentam uma produção trabalhosa, onerosa e são mais suscetíveis à contaminação, problema de alta complexidade no contexto de uma pandemia.

A simples expressão de GFP sugeriu diferenciar os vírus recombinantes (rMVA-hACE2) dos vírus selvagens remanescentes (MVA-WT), como também relatado por Popov e colaboradores (2009); já que o MVA não forma placas de lise em cultivos celulares (EARL e MOSS, 1991); sendo esta a técnica inicialmente de escolha para a triagem dos clones recombinantes.

Após a transfecção, os clones recombinantes foram selecionados através do método de purificação em placa, sendo a triagem dos clones de interesse realizada por meio de microscopia de fluorescência, e posteriormente por *Cell sorting*. Nesse aspecto, a seleção em placa tem sido relatada como um dos pontos mais críticos na

construção de rMVAs uma vez que a taxa de recombinação homóloga é considerada baixa (SÁNCHEZ-PUIG e BLACO, 2005) o que torna a recuperação de clones recombinantes uma etapa demorada e enfadonha que envolve muitas rodadas de seleção (BARBIERI et al, 2018; KUGLER et al, 2019; ANTOSHKINA et al, 2022).

Sendo assim, a geração de MVAs recombinantes vem sendo aperfeiçoada e diversas metodologias alternativas e/ou auxiliares têm sido projetadas e propostas (MACCKETT et al, 1984; FALKNER e MOSS, 1988; SUTTER et al, 1994; STAIB et al, 2000; HORNEMANN et al, 2003; STAIB et al, 2003; STAIB et al, 2004; HOLZER et al, 2005; BARBIERI et al, 2018; KUGLER et al, 2019; ANTOSHKINA et al, 2022). Uma destas abordagens de triagem de alto rendimento consiste na citometria de fluxo usando GFP que eleva extensivamente o número total de células rastreadas. Através desta metodologia milhões de células são analisadas ao mesmo tempo e células, bem como, subpopulações com diferentes níveis de expressão podem ser separadas (YANG et al, 2012).

Dessa maneira, o *Cell sorting* foi testado e verificado como método auxiliar para a seleção dos clones rMVA-hACE2. O uso da metodologia resultou em uma recuperação de clones recombinantes nove vezes superior àquela alcançada apenas com o método baseado em marcadores. Similarmente, Raigani e colaboradores (2022) similarmente relataram uma recuperação de 33 clones de células recombinantes expressando um novo ativador de plasminogênio tecidual quimérico mutante, após aplicação da técnica de citometria para rastrear células de maior produção e com propriedades de crescimento aprimoradas (RAIGANI et al, 2022).

A citometria também foi aplicada por Di Lullo e colaboradores (2010) e o método descrito foi considerado confiável e rápido, já que segundo os pesquisadores reduziu consideravelmente o tempo de produção do vírus. O mesmo resultado foi alcançado em estudo desenvolvido por Popov e colaboradores (2009) o qual utilizou a proteína GFP como marcador de seleção para isolar células portadoras de vírus recombinantes e as selecionou por citometria de fluxo, reduzindo substancialmente o tempo de obtenção de vírus recombinantes. Portanto, a citometria usando GFP ou outros marcadores pode ser usada com eficiência para isolamento rápido das células desejadas (RAIGANI et al, 2022). Esses achados estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que, após o

emprego do *Cell sorting* apenas duas purificações em placa foram necessárias para obtenção de vírus rMVA-hACE2 amplificados.

Ainda, Kugler e colaboradores (2019) relatou um tempo de infecção entre 48-72 horas para a seleção de clones recombinantes. Esse dado é particularmente importante, uma vez, que para o presente estudo o mesmo tempo impactou positivamente na robustez dos clones coletados, que por sua vez apresentaram maior aptidão para seguir nas passagens seriadas.

Para avaliação da expressão da proteína, ACE2, pelo rMVA-hACE2 foi utilizada a citometria de fluxo. Nesse contexto, embora tradicionalmente o Western Blotting seja empregado como um método eficaz e padrão para a verificação da expressão de proteínas em construções de vírus recombinantes, a citometria de fluxo tem se mostrado uma técnica igualmente eficiente e ainda mais robusta na identificação de tipos de celulares usando marcadores fenotípicos específicos.

Comparações quantitativas quanto aos níveis relativos das proteínas medidos pelos dois métodos apresentaram excelente concordância. Além disso, a citometria de fluxo demonstra maior reprodutibilidade em comparação com o Western blotting, o que corrobora o fato de que ambas as metodologias são eficientes para confirmação e quantificação de proteínas (HE e FOX, 1996).

8 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A construção do vírus rMVA-hACE2 ocorreu de forma eficiente e segura.
- A metodologia de seleção clonal por *Cell sorting* se mostrou vantajosa em relação ao tradicional método de purificação de placa, levando a uma rápida obtenção de clones mais robustos.
- A metodologia de citometria de fluxo se mostrou muito eficiente para avaliação da expressão da proteína in vitro.
- O título viral obtido foi considerado satisfatório para resultados futuros.

Os dados apresentados sugerem que embora a geração de MVAs recombinantes baseada em sistemas tradicionais seja robusto, o emprego de técnicas substitutivas e/ou auxiliares que possibilitem celeridade, refinamento e industrialização do processo se faz necessário.

9 PERSPECTIVAS

- Confirmar a presença do cDNA de hACE2 através de PCR e sequenciamento com iniciadores específicos.
- Detectar a expressão de hACE2 através de Western Blot.
- Construir um modelo de infecção experimental para SARS-CoV-2 utilizando o construto de rMVA-hACE2, segundo protocolo descrito por WONG e colaboradores (2020).
- Avaliar a construção do modelo de infecção experimental baseado no vírus de MVA.

10 REFERÊNCIAS

- A BRATKE, Kirsten; MCLYSAGHT, Aoife. Identification of multiple independent horizontal gene transfers into poxviruses using a comparative genomics approach. **Bmc Evolutionary Biology**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 67, 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-8-67>.
- ACRES, Bruce; BONNEFOY, Jean-Yves. Clinical development of MVA-based therapeutic cancer vaccines. **Expert Review Of Vaccines**, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 889-893, set. 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/14760584.7.7.889>.
- AGRAWAL, Anurodh Shankar et al. Generation of a Transgenic Mouse Model of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection and Disease. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 89, n. 7, p. 3659-3670, 14 jan. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.03427-14>.
- ALAGAILI, Abdulaziz N. et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Dromedary Camels in Saudi Arabia. **Mbio**, [S.L.], v. 5, n. 2, 25 fev. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00884-14>.
- ALANAGREH, Lo'ai; ALZOUGHLOOL, Foad; ATOUM, Manar. The Human Coronavirus Disease COVID-19: its origin, characteristics, and insights into potential drugs and its mechanisms. **Pathogens**, [s.l.], v. 9, n. 5, p. 331, 29 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9050331>.
- ALTENBURG, Arwen et al. Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) as Production Platform for Vaccines against Influenza and Other Viral Respiratory Diseases. **Viruses**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 2735-2761, 17 jul. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v6072735>.
- ALTENBURG, Arwen F. et al. Modified Vaccinia Virus Ankara Preferentially Targets Antigen Presenting Cells In Vitro, Ex Vivo and In Vivo. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, 17 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08719-y>.
- ANDERSEN, Kristian G. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 450-452, 17 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>.
- ANDRADE, Anderson A. et al. The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 381, n. 2, p. 437-446, 6 jul. 2004. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20031375>.
- ANTOINE, G. et al. The Complete Genomic Sequence of the Modified Vaccinia Ankara Strain: comparison with other orthopoxviruses. **Virology**, [S.L.], v. 244, n. 2, p. 365-396, maio 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1998.9123>.
- ANTOSHKINA, Irina V.; GLAZKOVA, Dina V.; URUSOV, Felix A.; BOGOSLOVSKAYA, Elena V.; SHIPULIN, German A.. Comparison of Recombinant MVA Selection Methods Based on F13L, D4R and K1L Genes. **Viruses**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 528, 4 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v14030528>.
- BAO, Linlin; DENG, Wei; HUANG, Baoying; GAO, Hong; LIU, Jiangning; REN, Lili; WEI, Qiang; YU, Pin; XU, Yanfeng; QI, Feifei. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in

hACE2 transgenic mice. **Nature**, [S.L.], v. 583, n. 7818, p. 830-833, 7 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>.

BERTHO, A. L. In: Apostila de Citometria de fluxo. Disponível em: <http://picf.ioc.fiocruz.br/apostila.doc>. Acesso em: 09 jan. 2023

BI, Zhenfei; HONG, Weiqi; YANG, Jingyun; LU, Shuaiyao; PENG, Xiaozhong. Animal models for SARS-CoV-2 infection and pathology. **Medcomm**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 548-568, 16 nov. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mco2.98>.

BISHT, H. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 101, n. 17, p. 6641-6646, 19 abr. 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401939101>.

BLASCO, R; SISLER, J R; MOSS, B. Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the a34r gene.. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 67, n. 6, p. 3319-3325, 1993. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.67.6.3319-3325.1993>

BONI, Maciej F. et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. **Nature Microbiology**, [S.L.], 28 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0771-4>.

BOSCH, B. J. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 101, n. 22, p. 8455-8460, 18 maio 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400576101>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: < <https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 6 de janeiro de 2023.

BRATKE, Kirsten A.; MCLYSAGHT, Aoife; ROTHENBURG, Stefan. A survey of host range genes in poxvirus genomes. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 14, p. 406-425, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.002>.

BROYLES, Steven S. et al. Transcription Factor YY1 Is a Vaccinia Virus Late Promoter Activator. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 274, n. 50, p. 35662-35667, 10 dez. 1999. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.50.35662>.

BROYLES, Steven S. Vaccinia virus transcription. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 84, n. 9, p. 2293-2303, 1 set. 2003. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.18942-0>.

CARROLL, Miles W; MOSS, Bernard. Host Range and Cytopathogenicity of the Highly Attenuated MVA Strain of Vaccinia Virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. **Virology**, [S.L.], v. 238, n. 2, p. 198-211, nov. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1997.8845>.

CHAN, Jasper Fuk-Woo et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The Lancet**, [S.L.], v. 395, n. 10223, p. 514-523, fev. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30154-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30154-9).

CHAN, Jasper Fuk-Woo; ZHANG, Anna Jinxia; YUAN, Shuofeng; POON, Vincent Kwok-Man; CHAN, Chris Chung-Sing; LEE, Andrew Chak-Yiu; CHAN, Wan-Mui; FAN, Zhimeng; TSOI, Hoi-Wah; WEN, Lei. Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], p. 1, 26 mar. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa325>.

CHANG et al. Epidemiologic and Clinical Characteristics of Novel Coronavirus Infections Involving 13 Patients Outside Wuhan, China. **Jama**, [s.l.], v. 323, n. 11, p. 1092-1093, 17 mar. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.1623>.

CHEN, Bin et al. Overview of lethal human coronaviruses. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-16, 10 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0190-2>.

CHEN, Dabiao et al. Recurrence of positive SARS-CoV-2 RNA in COVID-19: a case report. **International Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 93, p. 297-299, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.003>.

CHEN, Guang et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 130, n. 5, p. 2620-2629, 13 abr. 2020. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci137244>.

CHEN, Jun et al. Clinical progression of patients with COVID-19 in Shanghai, China. **Journal Of Infection**, [S.L.], v. 80, n. 5, p. 1-6, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.004>.

CHEN, Jun et al. COVID-19 infection: the china and italy perspectives. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1-17, jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-2603-0>.

CHEN, Nanshan et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, [S.L.], v. 395, n. 10223, p. 507-513, fev. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30211-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30211-7).

CHEN, Yun et al. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 525, n. 1, p. 135-140, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.071>.

CHEN, Zhiwei et al. Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing the Spike Glycoprotein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Induces Protective Neutralizing Antibodies Primarily Targeting the Receptor Binding Region. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 79, n. 5, p. 2678-2688, 1 mar. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.79.5.2678-2688.2005>.

CHOU, Tom. Stochastic Entry of Enveloped Viruses: fusion versus endocytosis. **Biophysical Journal**, [S.L.], v. 93, n. 4, p. 1116-1123, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.106708>.

CHU, Hin; CHAN, Jasper Fuk-Woo; YUEN, Kwok-Yung. Animal models in SARS-CoV-2 research. **Nature Methods**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 392-394, abr. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41592-022-01447-w>.

CHUNG, Che-Sheng; HSIAO, Jye-Chian; CHANG, Yuan-Shau; CHANG, Wen. A27L Protein Mediates Vaccinia Virus Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 1577-1585, 1 fev. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.72.2.1577-1585.1998>.

Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-ncov and naming it sars-cov-2. Nature Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 536-544, 2 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.

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**, [S.L.], v. 176, p. 104742, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>.

CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 181-192, 10 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.

CUI, Lei et al. The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 89, n. 17, p. 9029-9043, 17 jun. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01331-15>.

Daian E Silva DSO, Pinho TMG, Rachid MA, Barbosa-Stancioli DF, Da Fonseca FG. The Perennial Use of the Green Fluorescent Protein Marker in a Live Vaccinia Virus Ankara Recombinant Platform Shows No Acute Adverse Effects in Mice. **Braz J Microbiol.** 2019 Apr;50(2):347-355. doi: 10.1007/s42770-019-00067-5.

DEDIEGO, Marta L. et al. A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 81, n. 4, p. 1701-1713, 15 nov. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01467-06>.

DEMOGINES, A.; FARZAN, M.; SAWYER, S. L.. Evidence for ACE2-Utilizing Coronaviruses (CoVs) Related to Severe Acute Respiratory Syndrome CoV in Bats. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 86, n. 11, p. 6350-6353, 21 mar. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00311-12>.

DINNON, Kenneth H.; LEIST, Sarah R.; SCHÄFER, Alexandra; EDWARDS, Caitlin E.; MARTINEZ, David R.; MONTGOMERY, Stephanie A.; WEST, Ande; YOUNT, Boyd L.; HOU, Yixuan J.; ADAMS, Lily E.. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. **Nature**, [S.L.], v. 586, n. 7830, p. 560-566, 27 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2708-8>.

DONG, Wenjuan; MEAD, Heather; TIAN, Lei; PARK, Jun-Gyu; GARCIA, Juan I.; JARAMILLO, Sierra; BARR, Tasha; KOLLATH, Daniel S.; COYNE, Vanessa K.; STONE, Nathan E.. The K18-Human ACE2 Transgenic Mouse Model Recapitulates Non-severe and Severe COVID-19 in Response to an Infectious Dose of the SARS-CoV-2 Virus. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 96, n. 1, e0096421, 12 jan. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00964-21>.

DREXLER, I et al. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 79, n. 2, p. 347-352, 1 fev. 1998. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-79-2-347>.

DREXLER, Ingo; STAIB, Caroline; SUTTER, Gerd. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?. **Current Opinion In Biotechnology**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 506-512, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2004.09.001>.

FALKNER, F G; MOSS, B. Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 62, n. 6, p. 1849-1854, jun. 1988. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.62.6.1849-1854.1988>.

FAM, Bibiana S.O. et al. ACE2 diversity in placental mammals reveals the evolutionary strategy of SARS-CoV-2. **Genetics And Molecular Biology**, [S.L.], v. 43, n. 2, e20200104, abr. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2020-0104>.

FENNER, F. et al. Smallpox and Its Eradication, 1st ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1988; pp. 1371–1409.

FENNER, F., WITTEK, R. & DUMBELL, K.R. (1989). The Orthopoxvirus. 1^a ed. Academic Press. San Diego, Califórnia, 432p.

FLEXNER, C. & MOSS, B. (1997). Vaccinia virus as a live vector for expression of immunogens In Levine M. M., Woodrow G. C., Kaper J. B., Cobon, G. S. (Ed), New Generation Vaccines. Marcel Dekker, Inc. New York, NY.

FORNI, Diego et al. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 35-48, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001>.

FUKUSHI, M. et al. Monitoring of S Protein Maturation in the Endoplasmic Reticulum by Calnexin Is Important for the Infectivity of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 86, n. 21, p. 11745-11753, 22 ago. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01250-12>.

FUNG, To Sing; LIU, Ding Xiang. Human Coronavirus: host-pathogen interaction. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 529-557, 8 set. 2019. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759>.

FUNG, To Sing; LIU, Ding Xiang. Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and function. **Future Virology**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 405-430, jun. 2018. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fvl-2018-0008>.

GALLEGO-GÓMEZ, Juan Carlos et al. Differences in Virus-Induced Cell Morphology and in Virus Maturation between MVA and Other Strains (WR, Ankara, and NYCBH) of Vaccinia Virus in Infected Human Cells. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 77, n. 19, p. 10606-10622, 1 out. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.77.19.10606-10622.2003>.

GAO, Yong et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 92, n. 7, p. 791-796, 10 abr. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25770>.

GE, Xing-Yi et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. **Nature**, [S.L.], v. 503, n. 7477, p. 535-538, 30 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12711>.

GOMEZ, Carmen et al. The Poxvirus Vectors MVA and NYVAC as Gene Delivery Systems for Vaccination Against Infectious Diseases and Cancer. **Current Gene Therapy**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 97-120, 1 abr. 2008. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/156652308784049363>.

GU, Hongjing; CHEN, Qi; YANG, Guan; HE, Lei; FAN, Hang; DENG, Yong-Qiang; WANG, Yanxiao; TENG, Yue; ZHAO, Zhongpeng; CUI, Yujun. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. **Science**, [S.L.], v. 369, n. 6511, p. 1603-1607, 25 set. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abc4730>.

GUAN, Wei-Jie et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 382, n. 18, p. 1708-1720, 30 abr. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2002032>.

GUAN, Y.. Isolation and Characterization of Viruses Related to the SARS Coronavirus from Animals in Southern China. **Science**, [S.L.], v. 302, n. 5643, p. 276-278, 10 out. 2003. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1087139>.

GUBSER, Caroline et al. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 85, n. 1, p. 105-117, 1 jan. 2004. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.19565-0>.

GUNASINGHE, Sajeevani K.; HUBBS, Alan E.; WRIGHT, Cynthia F.. A Vaccinia Virus Late Transcription Factor with Biochemical and Molecular Identity to a Human Cellular Protein. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 273, n. 42, p. 27524-27530, 16 out. 1998. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.42.27524>.

GÜNTHER, Thomas et al. Recovery of the first full-length genome sequence of a parapoxvirus directly from a clinical sample. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, 16 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-03997-y>.

HALLER, Sherry L. et al. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 21, p. 15-40, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.014>.

HAMMING, I. et al. The emerging role of ACE2 in physiology and disease. **The Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 212, n. 1, p. 1-11, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.2162>.

HAMMING, I. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **The Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 203, n. 2, p. 631-637, 7 maio 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1570>.

HAN, Kun; BLAIR, Robert V.; IWANAGA, Naoki; LIU, Fengming; RUSSELL-LODRIGUE, Kasi E.; QIN, Zhongnan; MIDKIFF, Cecily C.; GOLDEN, Nadia A.; DOYLE-MEYERS, Lara A.; KABIR, Mohammad E.. Lung Expression of Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 Sensitizes the Mouse to SARS-CoV-2 Infection. **American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology**, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 79-88, jan. 2021. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2020-0354oc>.

HARAPAN, Harapan et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a literature review. **Journal Of Infection And Public Health**, [s.l.], v. 13, n. 5, p. 667-673, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2020.03.019>.

HASSAN, Ahmed O.; CASE, James Brett; WINKLER, Emma S.; THACKRAY, Larissa B.; KAFAI, Natasha M.; BAILEY, Adam L.; MCCUNE, Broc T.; FOX, Julie M.; CHEN, Rita E.; ALSOUSSI, Wafaa B.. A SARS-CoV-2 Infection Model in Mice Demonstrates Protection by Neutralizing Antibodies. **Cell**, [S.L.], v. 182, n. 3, p. 744-753.e4, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.011>.

HE, Liusheng; FOX, Michael H.. Comparison of flow cytometry and Western blotting to measure Hsp70. **Cytometry**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 280-286, 1 nov. 1996. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(19961101\)25:33.0.co;2-j](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19961101)25:33.0.co;2-j).

HENDERSON, Donald A.. The eradication of smallpox – An overview of the past, present, and future. **Vaccine**, [S.L.], v. 29, p. D7-D, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.080>.

HOEHL, Sebastian et al. Evidence of SARS-CoV-2 Infection in Returning Travelers from Wuhan, China. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 382, n. 13, p. 1278-1280, 26 mar. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmc2001899>.

HOFFMANN, Markus et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, [S.L.], v. 181, n. 2, p. 271-280, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.

HOGUE, Brenda G.; MACHAMER, Carolyn E.. Coronavirus Structural Proteins and Virus Assembly. **Nidoviruses**, [S.L.], p. 179-200, 1 jan. 2008. American Society of Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/9781555815790.ch12>.

HSIAO, Jye-Chian; CHUNG, Che-Sheng; CHANG, Wen. Cell Surface Proteoglycans Are Necessary for A27L Protein-Mediated Cell Fusion: identification of the n-terminal region of a27l protein as the glycosaminoglycan-binding domain. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 72, n. 10, p. 8374-8379, 1 out. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.72.10.8374-8379.1998>.

HSIAO, Jye-Chian; CHUNG, Che-Sheng; CHANG, Wen. Vaccinia Virus Envelope D8L Protein Binds to Cell Surface Chondroitin Sulfate and Mediates the Adsorption of Intracellular Mature Virions to Cells. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 73, n. 10, p. 8750-8761, 1 out. 1999. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.73.10.8750-8761.1999>.

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, [S.L.], v. 395, n. 10223, p. 497-506, fev. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5).

HUANG, Kun; ZHANG, Yufei; HUI, Xianfeng; ZHAO, Ya; GONG, Wenxiao; WANG, Ting; ZHANG, Shaoran; YANG, Yong; DENG, Fei; ZHANG, Qiang. Q493K and Q498H substitutions in Spike promote adaptation of SARS-CoV-2 in mice. **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 67, p. 103381, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103381>.

HUGHES, Austin L.; FRIEDMAN, Robert. Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 186-195, abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2004.12.008>.

HUGHES, Austin L.; IRAUSQUIN, Stephanie; FRIEDMAN, Robert. The evolutionary biology of poxviruses. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 50-59, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.10.001>.

HURISA, Takele Tesgera et al. Methodical Review on Poxvirus Replication, Genes Responsible for the Development of Infection and Host Immune Response Against the Disease. **Archives Of Microbiology & Immunology**, [S.L.], v. 03, n. 02, 2019. Fortune Journals. <http://dx.doi.org/10.26502/ami.93650024>.

HUSSAIN, Mushtaq; JABEEN, Nusrat; RAZA, Fozia; SHABBIR, Sanya; BAIG, Ayesha A.; AMANULLAH, Anusha; AZIZ, Basma. Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], p. 1-7, 15 abr. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25832>.

IMAI, Yumiko et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. **Nature**, [S.L.], v. 436, n. 7047, p. 112-116, jul. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03712>.

IMAI, Yumiko; KUBA, Keiji; PENNINGER, Josef M.. The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. **Experimental Physiology**, [S.L.], v. 93, n. 5, p. 543-548, 25 abr. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2007.040048>.

IWATA-YOSHIKAWA, Naoko et al. Acute Respiratory Infection in Human Dipeptidyl Peptidase 4-Transgenic Mice Infected with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 93, n. 6, p. 1-2, 9 jan. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01818-18>.

JIANG, Ren-Di; LIU, Mei-Qin; CHEN, Ying; SHAN, Chao; ZHOU, Yi-Wu; SHEN, Xu-Rui; LI, Qian; ZHANG, Lei; ZHU, Yan; SI, Hao-Rui. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2. **Cell**, [S.L.], v. 182, n. 1, p. 50-58.e8, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.027>.

JIN, Yuefei et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 372-389, 27 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v12040372>.

JOHANSEN, M. D.; IRVING, A.; MONTAGUTELLI, X.; TATE, M. D.; RUDLOFF, I.; NOLD, M. F.; HANSBRO, N. G.; KIM, R. Y.; DONOVAN, C.; LIU, G.. Animal and translational models of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. **Mucosal Immunology**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 877-891, 20 ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/s41385-020-00340-z>.

JUURLINK, David N.. Safety considerations with chloroquine, hydroxychloroquine and azithromycin in the management of SARS-CoV-2 infection. **Canadian Medical Association Journal**, [S.L.], v. 192, n. 17, p. 450-453, 8 abr. 2020. Joule Inc.. <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.200528>.

KATSAFANAS, George C.; MOSS, Bernard. Vaccinia Virus Intermediate Stage Transcription Is Complemented by Ras-GTPase-activating Protein SH3 Domain-binding Protein (G3BP) and Cytoplasmic Activation/Proliferation-associated Protein (p137) Individually or as a Heterodimer. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 279, n. 50, p. 52210-52217, 6 out. 2004. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m411033200>.

KIM, Young-Il; KIM, Seong-Gyu; KIM, Se-Mi; KIM, Eun-Ha; PARK, Su-Jin; YU, Kwang-Min; CHANG, Jae-Hyung; KIM, Eun Ji; LEE, Seunghun; CASEL, Mark Anthony B.. Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 704-709, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>.

KIRCHDOERFER, Robert N. et al. Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, 24 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-34171-7>.

KLUMPERMAN, J. et al. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 68, n. 10, p. 6523-6534, 1994. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.68.10.6523-6534.1994>.

KREMER, Melanie et al. Easy and Efficient Protocols for Working with Recombinant Vaccinia Virus MVA. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 59-92, 2012. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-876-4_4.

KUBA, K; IMAI, Y; PENNINGER, J. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. **Current Opinion In Pharmacology**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 271-276, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2006.03.001>.

KUBA, Keiji et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 875-879, 10 jul. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1267>.

KUGLER, Franziska; DREXLER, Ingo; PROTZER, Ulrike; HOFFMANN, Dieter; MOEINI, Hassan. Generation of recombinant MVA-norovirus: a comparison study of bacterial artificial chromosome- and marker-based systems. **Virology Journal**, [S.L.],

v. 16, n. 1, p. 1, 9 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-019-1212-y>.

LAI, Chih-cheng et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 55, n. 3, p. 105924, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>.

LAM, Tommy Tsan-Yuk et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature**, [S.L.], v. 583, n. 7815, p. 282-285, 26 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0>.

LAUER, Stephen A. et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: estimation and application. **Annals Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 172, n. 9, p. 577-582, 5 maio 2020. American College of Physicians. <http://dx.doi.org/10.7326/m20-0504>.

LEE, Nelson et al. A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 348, n. 20, p. 1986-1994, 15 maio 2003. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa030685>.

LEFKOWITZ, E.J.; WANG, C.; UPTON, C.. Poxviruses: past, present and future. **Virus Research**, [S.L.], v. 117, n. 1, p. 105-118, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.016>.

LEIST, Sarah R.; DINNON, Kenneth H.; SCHÄFER, Alexandra; TSE, Longping V.; OKUDA, Kenichi; HOU, Yixuan J.; WEST, Ande; EDWARDS, Caitlin E.; SANDERS, Wes; FRITCH, Ethan J.. A Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Induces Acute Lung Injury and Mortality in Standard Laboratory Mice. **Cell**, [S.L.], v. 183, n. 4, p. 1070-1085.e12, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.050>.

LETKO, Michael; MARZI, Andrea; MUNSTER, Vincent. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 562-569, 24 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>.

LI, Guangdi; CLERCQ, Erik de. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 149-150, 10 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/d41573-020-00016-0>.

LI, Kun et al. Mouse-adapted MERS coronavirus causes lethal lung disease in human DPP4 knockin mice. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 114, n. 15, p. E3119-E3128, 27 mar. 2017. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1619109114>.

LI, Qun et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 382, n. 13, p. 1199-1207, 26 mar. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2001316>.

LI, Rui; QIAO, Songlin; ZHANG, Gaiping. Analysis of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) from different species sheds some light on cross-species receptor usage of a novel coronavirus 2019-nCoV. **Journal Of Infection**, [S.L.], v. 80, n. 4, p. 469-496, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.013>.

LI, Wenhui et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, [S.L.], v. 426, n. 6965, p. 450-454, nov. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02145>.

LI, Xingguang et al. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 92, n. 6, p. 602-611, 11 mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25731>.

LIM, K. P.; LIU, D. X.. The Missing Link in Coronavirus Assembly. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 276, n. 20, p. 17515-17523, 8 fev. 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m009731200>.

LIN, Chi-Long et al. Vaccinia Virus Envelope H3L Protein Binds to Cell Surface Heparan Sulfate and Is Important for Intracellular Mature Virion Morphogenesis and Virus Infection In Vitro and In Vivo. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 74, n. 7, p. 3353-3365, 1 abr. 2000. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.74.7.3353-3365.2000>.

LIU, D.X.; INGLIS, S.C.. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. **Virology**, [S.L.], v. 185, n. 2, p. 911-917, dez. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90572-s](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(91)90572-s).

LIU, Ping et al. Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 1008421-1008422, 14 maio 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008421>.

LIU, Ping; CHEN, Wu; CHEN, Jin-Ping. Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins (*Manis javanica*). **Viruses**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 979, 24 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v11110979>.

LIU, Shuwen et al. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. **The Lancet**, [S.L.], v. 363, n. 9413, p. 938-947, mar. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)15788-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(04)15788-7).

LIU, Y. et al. Aerodynamic Characteristics and RNA Concentration of SARS-CoV-2 Aerosol in Wuhan Hospitals during COVID-19 Outbreak. **BioRxiv** **2020**.

LIU, Yingxia et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. **Science China Life Sciences**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 364-374, 9 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11427-020-1643-8>.

LIU, Zhixin et al. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 92, n. 6, p. 595-601, 11 mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25726>.

LIVINGSTON, Edward; BUCHER, Karen. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Italy. **Jama**, [S.L.], v. 323, n. 14, p. 1335-1336, 14 abr. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.4344>.

LOCKER, Jacomine Krijnse et al. Entry of the Two Infectious Forms of Vaccinia Virus at the Plasma Membrane Is Signaling-Dependent for the IMV but Not the EEV.

Molecular Biology Of The Cell, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 2497-2511, jul. 2000. American Society for Cell Biology (ASCB). <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.11.7.2497>.

LU, Cheng-Wei; LIU, Xiu-Fen; JIA, Zhi-Fang. 2019-nCoV transmission through the ocular surface must not be ignored. **The Lancet**, [S.L.], v. 395, n. 10224, p. e39, fev. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30313-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30313-5).

LU, Hongzhou; STRATTON, Charles W.; TANG, Yi-Wei. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: the mystery and the miracle. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 92, n. 4, p. 401-402, 12 fev. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25678>.

LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, [S.L.], v. 395, n. 10224, p. 565-574, fev. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30251-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30251-8).

LU, Xiaoxia et al. SARS-CoV-2 Infection in Children. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 382, n. 17, p. 1663-1665, 23 abr. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmc2005073>.

LUAN, Junwen et al. Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 526, n. 1, p. 165-169, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.047>.

LUKASHEV, A. N.; ZAMYATNIN, A. A.. Viral vectors for gene therapy: current state and clinical perspectives. **Biochemistry (Moscow)**, [S.L.], v. 81, n. 7, p. 700-708, jul. 2016. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0006297916070063>.

LULLO, Giulia di; SOPRANA, Elisa; PANIGADA, Maddalena; PALINI, Alessio; AGRESTI, Alessandra; COMUNIAN, Claudio; MILANI, Adelaide; CAPUA, Ilaria; ERFLE, Volker; SICCARDI, Antonio G.. The combination of marker gene swapping and fluorescence-activated cell *Cell sorting* improves the efficiency of recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine production for human use. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 163, n. 2, p. 195-204, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.09.016>.

LULLO, Giulia di; SOPRANA, Elisa; PANIGADA, Maddalena; PALINI, Alessio; ERFLE, Volker; STAIB, Caroline; SUTTER, Gerd; SICCARDI, Antonio G.. Marker gene swapping facilitates recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara production by host-range selection. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 156, n. 1-2, p. 37-43, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.10.026>.

LUNDSTROM, Kenneth. Viral Vectors in Gene Therapy. **Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 42, 21 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/diseases6020042>.

MACKETT, M.; SMITH, G. L.; MOSS, B.. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 79, n. 23, p. 7415-7419, 1 dez. 1982. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.79.23.7415>.

MAGALHÃES, José C. de et al. A Mitogenic Signal Triggered at an Early Stage of Vaccinia Virus Infection. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 276, n. 42, p.

38353-38360, 17 jul. 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m100183200>.

MASTERS, Jennefer et al. Poxvirus Infection Rapidly Activates Tyrosine Kinase Signal Transduction. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 276, n. 51, p. 48371-48375, 8 out. 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m108019200>.

MASTERS, P. S. & PERLMAN, S. in *Fields Virology* Vol. 2 (eds Knipe, D. M. & Howley, P. M.) 825–858 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).

MASTERS, Paul S.. The Molecular Biology of Coronaviruses. **Advances In Virus Research**, [S.L.], p. 193-292, 2006. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527\(06\)66005-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527(06)66005-3).

MASTRANGELO, Michael J.; EISENLOHR, Laurence C.; GOMELLA, Leonard; LATTIME, Edmund C.. Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 105, n. 8, p. 1031-1034, 15 abr. 2000. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci9819>.

MCCRAY, Paul B et al. Lethal Infection of K18-hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 81, n. 2, p. 813-821, 1 nov. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02012-06>.

MCCRAY, Paul B.; PEWE, Lecia; WOHLFORD-LENANE, Christine; HICKEY, Melissa; MANZEL, Lori; SHI, Lei; NETLAND, Jason; JIA, Hong Peng; HALABI, Carmen; SIGMUND, Curt D.. Lethal Infection of K18- hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 81, n. 2, p. 813-821, 15 jan. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02012-06>.

MCCURDY, L. H et al. Modified Vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 38, n. 12, p. 1749-1753, 15 jun. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/421266>.

MCFADDEN, Grant. Poxvirus tropism. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 201-213, mar. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1099>.

MCFADDEN, Grant. Poxvirus tropism. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 201-213, mar. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1099>.

MCLYSAGHT, A.; BALDI, P. F.; GAUT, B. S.. Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 100, n. 26, p. 15655-15660, 5 dez. 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2136653100>.

MEISINGER-HENSCHER, Christine et al. Introduction of the Six Major Genomic Deletions of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) into the Parental Vaccinia Virus Is Not Sufficient To Reproduce an MVA-Like Phenotype in Cell Culture and in Mice. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 84, n. 19, p. 9907-9919, 28 jul. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00756-10>.

MEMISH, Ziad A. et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bats, Saudi Arabia. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 1-2, nov. 2013. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1911.131172>.

MEYER, H.; SUTTER, G.; MAYR, A.. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 72, n. 5, p. 1031-1038, 1 maio 1991. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-72-5-1031>.

MOLINA, J.M et al. No evidence of rapid antiviral clearance or clinical benefit with the combination of hydroxychloroquine and azithromycin in patients with severe COVID-19 infection. **Médecine Et Maladies Infectieuses**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 384-386, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2020.03.006>.

MOOS, B. (2001) Poxviridae: The viruse and their replication in FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. & GRIFFIN, D.E. Fields virology, 4th edn (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins). 2849-2883.

MOSS, B. (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination and, safety. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:11341-11348.

MOSS, B.. Poxvirus DNA Replication. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 5, n. 9, p. a010199-a010199, 9 jul. 2013. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a010199>.

MUÑOZ-FONTELA, César; WIDERSPICK, Lina; ALBRECHT, Randy A.; BEER, Martin; CARROLL, Miles W.; WIT, Emmie de; DIAMOND, Michael S.; DOWLING, William E.; FUNNELL, Simon G. P.; GARCÍA-SASTRE, Adolfo. Advances and gaps in SARS-CoV-2 infection models. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. e1010161, 13 jan. 2022. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1010161>.

NADEEM, Muhammad Shahid et al. Origin, Potential Therapeutic Targets and Treatment for Coronavirus Disease (COVID-19). **Pathogens**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 307, 22 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9040307>.

NEUMAN, Benjamin W. et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **Journal Of Structural Biology**, [S.L.], v. 174, n. 1, p. 11-22, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.021>.

OLIVEIRA, Grazielle et al. Poxvirus Host Range Genes and Virus–Host Spectrum: a critical review. **Viruses**, [S.L.], v. 9, n. 11, p. 331, 7 nov. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v9110331>.

ONDER, Graziano; REZZA, Giovanni; BRUSAFERRO, Silvio. Case-Fatality Rate and Characteristics of Patients Dying in Relation to COVID-19 in Italy. **Jama**, [S.L.], 23 mar. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.4683>.

ONG, Sean Wei Xiang et al. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient. **Jama**, [S.L.], v. 323, n. 16, p. 1610-1611, 28 abr. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.3227>.

OU, Xiuyuan et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, [S.L.], v. 11, n. 1, 27 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>.

PAN, Yang et al. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 411-412, abr. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30113-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30113-4).

PANDAMOOZ, Sareh; JUREK, Benjamin; MEINUNG, Carl-Philipp; BAHARVAND, Zahra; SHAHEM-ABADI, Alireza Sahebi; HAERTEIS, Silke; MIYAN, Jaleel A.; DOWNING, James; DIANATPOUR, Mehdi; BORHANI-HAGHIGHI, Afshin. Experimental Models of SARS-CoV-2 Infection: possible platforms to study covid-19 pathogenesis and potential treatments. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 62, n. 1, p. 25-53, 6 jan. 2022. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-121120-012309>.

PANICALI, D.; PAOLETTI, E.. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the dna of infectious vaccinia virus.. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 79, n. 16, p. 4927-4931, 1 ago. 1982. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.79.16.4927>.

PEIRIS, J s M. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. **The Lancet**, [S.L.], v. 361, n. 9366, p. 1319-1325, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13077-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13077-2).

PEIRIS, J s M; GUAN, Y; YUEN, K y. Severe acute respiratory syndrome. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. S88-S97, 30 nov. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1143>.

PERLMAN, Stanley; NETLAND, Jason. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 439-450, 11 maio 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2147>.

PHAN, Lan T. et al. Importation and Human-to-Human Transmission of a Novel Coronavirus in Vietnam. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 382, n. 9, p. 872-874, 27 fev. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmc2001272>.

POPOV, Sergei; MIRSHAHIDI, Saied; ESSONO, Sosthène; SONG, Ruijiang; WANG, Xiaowei; RUPRECHT, Ruth M.. Generation of Recombinant Vaccinia Viruses via Green Fluorescent Protein Selection. **Dna And Cell Biology**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 103-108, mar. 2009. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2008.0792>.

PUNG, Rachael et al. Investigation of three clusters of COVID-19 in Singapore: implications for surveillance and response measures. **The Lancet**, [S.L.], v. 395, n. 10229, p. 1039-1046, mar. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30528-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30528-6).

QIU, Haiyan et al. Clinical and epidemiological features of 36 children with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Zhejiang, China: an observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 20, n. 6, p. 689-696, jun. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30198-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30198-5).

RAIGANI, Mozghan; BARKHORDARI, Farzaneh; MOAZZAMI, Reza; DAVAMI, Fatemeh; MAHBOUDI, Fereidoun. Optimization of expression yield in a stable cell line expressing a novel mutated chimeric tissue plasminogen activator (mt-PA). **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 58, p. 1, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902022e19692>.

RICHARD, Mathilde et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. **Nature Communications**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-6, 8 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17367-2>.

RIMMELZWAAN, Guus F; SUTTER, Gerd. Candidate influenza vaccines based on recombinant modified vaccinia virus Ankara. **Expert Review Of Vaccines**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 447-454, abr. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/erv.09.4>.

RIOU, Julien; ALTHAUS, Christian L.. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. **Eurosurveillance**, [S.L.], v. 25, n. 4, 30 jan. 2020. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.4.2000058>.

ROBACK, John D.; GUARNER, Jeannette. Convalescent Plasma to Treat COVID-19. **Jama**, [S.L.], v. 323, n. 16, p. 1561-1562, 28 abr. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.4940>.

ROCKX, Barry et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. **Science**, [S.L.], v. 368, n. 6494, p. 1012-1015, 17 abr. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abb7314>.

RODRIGUEZ, J F; PAEZ, E; ESTEBAN, M. A 14,000-Mr envelope protein of vaccinia virus is involved in cell fusion and forms covalently linked trimers. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 61, n. 2, p. 395-404, jun. 1987. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.61.2.395-404.1987>.

ROSALES, R.; SUTTER, G.; MOSS, B.. A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 91, n. 9, p. 3794-3798, 26 abr. 1994. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.9.3794>.

SÁNCHEZ-PUIG, Juana M.; BLASCO, Rafael. Isolation of vaccinia MVA recombinants using the viral F13L gene as the selective marker. **Biotechniques**, [S.L.], v. 39, n. 5, p. 665-674, nov. 2005. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.2144/000112012>.

SÁNCHEZ-SAMPEDRO, Lucas et al. The Evolution of Poxvirus Vaccines. **Viruses**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 1726-1803, 7 abr. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v7041726>.

SANCHO, M. Carmen et al. The Block in Assembly of Modified Vaccinia Virus Ankara in HeLa Cells Reveals New Insights into Vaccinia Virus Morphogenesis. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 76, n. 16, p. 8318-8334, 15 ago. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.76.16.8318-8334.2002>.

SANZ, Patrick; MOSS, Bernard. A New Vaccinia Virus Intermediate Transcription Factor. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 72, n. 8, p. 6880-6883, 1 ago. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.72.8.6880-6883.1998>.

SEBASTIAN, Sarah; GILBERT, Sarah C. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based malaria vaccines. **Expert Review Of Vaccines**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 91-103, 29 out. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/14760584.2016.1106319>.

SEET, Bruce T. et al. POXVIRUSES AND IMMUNE EVASION. **Annual Review Of Immunology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 377-423, abr. 2003. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141049>.

SHANG, Jian et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, [S.L.], v. 581, n. 7807, p. 221-224, 30 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>.

SHEREEN, Muhammad Adnan et al. COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal Of Advanced Research**, [s.l.], v. 24, p. 91-98, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>.

SHI, Heshui et al. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 425-434, abr. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30086-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30086-4).

SHI, Jianzhong; WEN, Zhiyuan; ZHONG, Gongxun; YANG, Huanliang; WANG, Chong; HUANG, Baoying; LIU, Renqiang; HE, Xijun; SHUAI, Lei; SUN, Ziruo. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. **Science**, [S.L.], v. 368, n. 6494, p. 1016-1020, 29 maio 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abb7015>.

SHUAI, Huiping; CHAN, Jasper Fuk-Woo; YUEN, Terrence Tsz-Tai; YOON, Chaemin; HU, Jing-Chu; WEN, Lei; HU, Bingjie; YANG, Dong; WANG, Yixin; HOU, Yuxin. Emerging SARS-CoV-2 variants expand species tropism to murines. **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 73, p. 103643, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103643>.

SIDDELL, Stuart G. et al. Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 164, n. 3, p. 943-946, 20 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-018-04136-2>.

SIMMONS, G. et al. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 102, n. 33, p. 11876-11881, 4 ago. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0505577102>.

SIVARAMAN, Hariharan et al. Structural Basis of the SARS-CoV-2/SARS-CoV Receptor Binding and Small-Molecule Blockers as Potential Therapeutics. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 1-45, 23 jun. 2020. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-061220-093932>.

SMITH, Geoffrey L.; LAW, Mansun. The exit of Vaccinia virus from infected cells. **Virus Research**, [S.L.], v. 106, n. 2, p. 189-197, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2004.08.015>.

SMITH, Geoffrey L.; MURPHY, Brendan J.; LAW, Mansun. Vaccinia Virus Motility. **Annual Review Of Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 323-342, out. 2003. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091037>.

SOHRABI, Catrin et al. World Health Organization declares global emergency: a review of the 2019 novel coronavirus (covid-19). **International Journal Of Surgery**, [s.l.], v. 76, p. 71-76, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijsu.2020.02.034>.

SONG, F. et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Delivered by Modified Vaccinia Virus Ankara Efficiently Induces Virus-Neutralizing Antibodies. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 87, n. 21, p. 11950-11954, 28 ago. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01672-13>.

SRINIVASAN, Suhas et al. Structural Genomics of SARS-CoV-2 Indicates Evolutionary Conserved Functional Regions of Viral Proteins. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 360, 25 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v12040360>.

STAIB, C.; DREXLER, I.; OHLMANN, M.; WINTERSPERGER, S.; ERFLE, V.; SUTTER, G.. Transient Host Range Selection for Genetic Engineering of Modified Vaccinia Virus Ankara. **Biotechniques**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 1137-1148, jun. 2000. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.2144/00286st04>.

SU, Liang et al. The different clinical characteristics of corona virus disease cases between children and their families in China – the character of children with COVID-19. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 707-713, 1 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2020.1744483>.

SU, Shuo et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 490-502, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>.

SUN, Jing; ZHUANG, Zhen; ZHENG, Jian; LI, Kun; WONG, Roy Lok-Yin; LIU, Donglan; HUANG, Jicheng; HE, Jiangping; ZHU, Airu; ZHAO, Jingxian. Generation of a Broadly Useful Model for COVID-19 Pathogenesis, Vaccination, and Treatment. **Cell**, [S.L.], v. 182, n. 3, p. 734-743.e5, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.010>.

SUN, Shi-Hui; CHEN, Qi; GU, Hong-Jing; YANG, Guan; WANG, Yan-Xiao; HUANG, Xing-Yao; LIU, Su-Su; ZHANG, Na-Na; LI, Xiao-Feng; XIONG, Rui. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 124-133.e4, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>.

SUTTER, Gerd; STAIB, Caroline. Vaccinia Vectors as Candidate Vaccines: the development of modified vaccinia virus ankara for antigen delivery. **Current Drug Target -Infectious Disorders**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 263-271, 1 set. 2003. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568005033481123>.

SWEARENGEN, James R.. Choosing the right animal model for infectious disease research. **Animal Models And Experimental Medicine**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 100-108, jun. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ame2.12020>.

TAKADA, Ayato; KAWAOKA, Yoshihiro. Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications. **Reviews In Medical Virology**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 387-398, 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.405>.

TANG, Xiaolu et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. **National Science Review**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 1012-1023, 3 mar. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>.

TARTAGLIA, James et al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. **Virology**, [S.L.], v. 188, n. 1, p. 217-232, maio 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90752-b](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(92)90752-b).

TAY, Matthew Zirui; POH, Chek Meng; RÉNIA, Laurent; MACARY, Paul A.; NG, Lisa F. P.. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 20, n. 6, p. 363-374, 28 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>.

THÈVES, C.; BIAGINI, P.; CRUBÉZY, E.. The rediscovery of smallpox. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 210-218, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12536>.

THOMPSON, B. Taylor; CHAMBERS, Rachel C.; LIU, Kathleen D.. Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 377, n. 6, p. 562-572, 10 ago. 2017. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1608077>.

TSENG, Chien-Te K. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection of Mice Transgenic for the Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 Virus Receptor. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 81, n. 3, p. 1162-1173, 15 nov. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01702-06>.

TULMAN, E. R. et al. The Genome of Canarypox Virus. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 353-366, 1 jan. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.78.1.353-366.2004>.

UPTON, Chris et al. Poxvirus Orthologous Clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 77, n. 13, p. 7590-7600, 1 jul. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.77.13.7590-7600.2003>.

VAN DOREMALEN, Neeltje et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 382, n. 16, p. 1564-1567, 16 abr. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmc2004973>.

VERHEUST, Céline et al. Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination. **Vaccine**, [S.L.], v. 30, n. 16, p. 2623-2632, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.016>.

VIJAYKRISHNA, D. et al. Evolutionary Insights into the Ecology of Coronaviruses. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 81, n. 8, p. 4012-4020, 31 jan. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02605-06>.

VOLZ, A.; SUTTER, G.. Modified Vaccinia Virus Ankara. **Advances In Virus Research**, [S.L.], p. 187-243, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.07.001>.

WALLS, Alexandra C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, [S.L.], v. 181, n. 2, p. 281-292.e6, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.

WALTHER, Wolfgang; STEIN, Ulrike. Viral Vectors for Gene Transfer. **Drugs**, [S.L.], v. 60, n. 2, p. 249-271, ago. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-200060020-00002>.

WAN, Yushun et al. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of sars coronavirus. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 94, n. 7, 29 jan. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00127-20>.

WANG, Dawei et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **Jama**, [S.L.], v. 323, n. 11, p. 1061, 17 mar. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.1585>.

WANG, Jinliang; SHUAI, Lei; WANG, Chong; LIU, Renqiang; HE, Xijun; ZHANG, Xianfeng; SUN, Ziruo; SHAN, Dan; GE, Jinying; WANG, Xijun. Mouse-adapted SARS-CoV-2 replicates efficiently in the upper and lower respiratory tract of BALB/c and C57BL/6J mice. **Protein & Cell**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 776-782, 4 ago. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1007/s13238-020-00767-x>.

WANG, Lisheng et al. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 55, n. 6, p. 105948, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105948>.

WANG, Zhongde; MARTINEZ, Joy; ZHOU, Wendi; LAROSA, Corinna; SRIVASTAVA, Tumul; DASGUPTA, Anindya; RAWAL, Ravindra; LI, Zhongqui; BRITT, William J.; DIAMOND, Don. Modified H5 promoter improves stability of insert genes while maintaining immunogenicity during extended passage of genetically engineered MVA vaccines. **Vaccine**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 1547-1557, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.056>.

WARNOCK, James N.; DAIGRE, Claire; AL-RUBEAI, Mohamed. Introduction to Viral Vectors. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 1-25, 2011. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-095-9_1.

WELSH, Stephen; KAY, Steve A. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 617-622, 1997.

WEN, Wen; CHEN, Chen; TANG, Jiake; WANG, Chunyi; ZHOU, Mengyun; CHENG, Yongran; ZHOU, Xiang; WU, Qi; ZHANG, Xingwei; FENG, Zhanhui. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, flvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. **Annals Of Medicine**, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 516-523, 4 fev. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07853890.2022.2034936>.

WHO COVID-19 Dashboard. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2020. Disponível online: Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 6 de janeiro de 2023.

WHO COVID-19 Dashboard. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2020. Disponível online: Disponível em: < <https://covid19.who.int/table>>. Acesso em: 6 de janeiro de 2023.

WHO, World Health Organization. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Weekly Epidemiological Update. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200831-weekly-epi-update-3.pdf?sfvrsn=d7032a2a_4 > Acesso em 25 de agosto de 2020.

WINKLER, Emma S.; BAILEY, Adam L.; KAFAI, Natasha M.; NAIR, Sharmila; MCCUNE, Broc T.; YU, Jinsheng; FOX, Julie M.; CHEN, Rita E.; EARNEST, James T.; KEELER, Shamus P.. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. **Nature Immunology**, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 1327-1335, 24 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-020-0778-2>.

WIT, Emmie de et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 523-534, 27 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>.

WOLF, Yuri I. et al. Origins and Evolution of the Global RNA Virome. **Mbio**, [S.L.], v. 9, n. 6, 27 nov. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.02329-18>.

WONG, C. K. et al. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. **Clinical & Experimental Immunology**, [S.L.], v. 136, n. 1, p. 95-103, abr. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x>.

WONG, Lok-Yin Roy; LI, Kun; SUN, Jing; ZHUANG, Zhen; ZHAO, Jincun; MCCRAY, Paul B.; PERLMAN, Stanley. Sensitization of Non-permissive Laboratory Mice to SARS-CoV-2 with a Replication-Deficient Adenovirus Expressing Human ACE2. **Star Protocols**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 100169, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100169>.

WOO, P. C. Y. 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. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 86, n. 7, p. 3995-4008, 25 jan. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.06540-11>.

WRAPP, Daniel et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, [S.L.], v. 367, n. 6483, p. 1260-1263, 19 fev. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abb2507>.

WRIGHT, Cynthia F. et al. A Vaccinia Virus Late Transcription Factor Copurifies with a Factor That Binds to a Viral Late Promoter and Is Complemented by Extracts from Uninfected HeLa Cells. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 1446-1451, 1 fev. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.72.2.1446-1451.1998>.

WROBEL, Antoni G. et al. SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. **Nature Structural & Molecular Biology**, [S.L.], 9 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-020-0468-7>.

WU, F. et al. Complete genome characterisation of a novel coronavirus associated with severe human respiratory disease in Wuhan, China. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.01.24.919183> (2020).

WU, Fan et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, [S.L.], v. 579, n. 7798, p. 265-269, 3 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>.

WU, Joseph T; LEUNG, Kathy; LEUNG, Gabriel M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. **The Lancet**, [S.L.], v. 395, n. 10225, p. 689-697, fev. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30260-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30260-9).

WU, K et al. A Virus-Binding Hot Spot on Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 Is Critical for Binding of Two Different Coronaviruses. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 85, n. 11, p. 5331-5337, 16 mar. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02274-10>.

WU, Kailang et al. Mechanisms of Host Receptor Adaptation by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 287, n. 12, p. 8904-8911, 30 jan. 2012. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.325803>.

WU, Zunyou; MCGOOGAN, Jennifer M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **Jama**, [S.L.], v. 323, n. 13, p. 1239-1240, 7 abr. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.2648>.

XIAO, Fei; TANG, Meiwen; ZHENG, Xiaobin; LIU, Ye; LI, Xiaofeng; SHAN, Hong. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 158, n. 6, p. 1831-1833.e3, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>.

XIAO, Kangpeng et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. **Nature**, [S.L.], v. 583, n. 7815, p. 286-289, 7 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2313-x>.

XIONG, C. et al. Evolution and variation of 2019-novel coronavirus. bioRxiv **2020**.

XU, Hao et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International Journal Of Oral Science**, [S.L.], v. 12, n. 1, 24 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>.

XU, Zhe et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 420-422, abr. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30076-x](http://dx.doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30076-x).

YAN, Renhong et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. **Science**, [S.L.], v. 367, n. 6485, p. 1444-1448, 4 mar. 2020.

American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abb2762>.

YANG XH et al. Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection. **Comp Med**, v. 57, n. 5, p. 450–459, out 2007.

YANG, Yongshi et al. The deadly coronaviruses: the 2003 sars pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in china. **Journal Of Autoimmunity**, [s.l.], v. 109, p. 102434, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102434>.

YANG; WANG; ZANG; TANG. Cell-Based Assays in High-Throughput Screening for Drug Discovery. **International Journal Of Biotechnology For Wellness Industries**, [S.L.], p. 1, 2012. Lifescience Global. <http://dx.doi.org/10.6000/1927-3037.2012.01.01.02>.

YE, Qing; ZHOU, Jia; HE, Qi; LI, Rui-Ting; YANG, Guan; ZHANG, Yao; WU, Shu-Jia; CHEN, Qi; SHI, Jia-Hui; ZHANG, Rong-Rong. SARS-CoV-2 infection in the mouse olfactory system. **Cell Discovery**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1, 6 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41421-021-00290-1>.

YOSHIKAWA, Naoko et al. Differential Virological and Immunological Outcome of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Susceptible and Resistant Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 83, n. 11, p. 5451-5465, 18 mar. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02272-08>.

YU, Pin; QI, Feifei; XU, Yanfeng; LI, Fengdi; LIU, Peipei; LIU, Jiayi; BAO, Linlin; DENG, Wei; GAO, Hong; XIANG, Zhiguang. Age-related rhesus macaque models of COVID-19. **Animal Models And Experimental Medicine**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 93-97, mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ame2.12108>.

YUAN, Lunzhi; TANG, Qiyi; CHENG, Tong; XIA, Ningshao. Animal models for emerging coronavirus: progress and new insights. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 949-961, 1 jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2020.1764871>.

YUAN, Yuan et al. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. **Nature Communications**, [S.L.], v. 8, n. 1, abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15092>.

YUKI, Koichi; FUJIOGI, Miho; KOUTSOGIANNAKI, Sophia. COVID-19 pathophysiology: a review. **Clinical Immunology**, [s.l.], v. 215, p. 108427, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2020.108427>.

ZAKI, Ali M. et al. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 367, n. 19, p. 1814-1820, 8 nov. 2012. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1211721>.

ZHANG, B. et al. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. Preprint at *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028191> (2020).

ZHANG, Haibo et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. **Intensive Care**

Medicine, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 586-590, 3 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>.

ZHANG, Hong et al. Collectrin, a Collecting Duct-specific Transmembrane Glycoprotein, Is a Novel Homolog of ACE2 and Is Developmentally Regulated in Embryonic Kidneys. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 276, n. 20, p. 17132-17139, 31 jan. 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m006723200>.

ZHANG, Juanjuan et al. Evolving epidemiology and transmission dynamics of coronavirus disease 2019 outside Hubei province, China: a descriptive and modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 20, n. 7, p. 793-802, jul. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30230-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30230-9).

ZHANG, Lei; LIU, Yunhui. Potential interventions for novel coronavirus in China: a systematic review. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 92, n. 5, p. 479-490, maio 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25707>.

ZHANG, Yufei; HUANG, Kun; WANG, Ting; DENG, Fei; GONG, Wenxiao; HUI, Xianfeng; ZHAO, Ya; HE, Xinlin; LI, Chengfei; ZHANG, Qiang. SARS-CoV-2 Rapidly Adapts in Aged BALB/c Mice and Induces Typical Pneumonia. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 95, n. 11, 10 maio 2021. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02477-20>.

ZHAO, Jincun; LI, Kun; WOHLFORD-LENANE, Christine; AGNIHOTHRAM, Sudhakar S.; FETT, Craig; ZHAO, Jingxian; GALE, Michael J.; BARIC, Ralph S.; ENJUANES, Luis; GALLAGHER, Tom. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 111, n. 13, p. 4970-4975, 5 mar. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1323279111>.

ZHAO, Y. et al. Single-cell RNA expression profiling of ACE2, the putative receptor of Wuhan 2019-nCov. Preprint at *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.01.26.919985> (2020).

ZHENG, Jie et al. Identification of N-linked glycosylation sites in the spike protein and their functional impact on the replication and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cell culture. **Virology**, [S.L.], v. 513, p. 65-74, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2017.10.003>.

ZHENG, Meijuan et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular & Molecular Immunology**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 533-535, 19 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>.

ZHONG, Ns. Et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. **The Lancet**, [S.L.], v. 362, n. 9393, p. 1353-1358, out. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14630-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14630-2).

ZHOU, Fei et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, [S.L.], v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, mar. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30566-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30566-3).

ZHOU, Peng et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, [S.L.], v. 579, n. 7798, p. 270-273, 3 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.

ZHU, Na et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 382, n. 8, p. 727-733, 20 fev. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2001017>.

ZIEBUHR, J. et al. *Proposal 2017.013S. A.v1*. Reorganization of the family Coronaviridae into two families, Coronaviridae (including the current subfamily Coronavirinae and the new subfamily Letovirinae) and the new family Tobaniviridae (accommodating the current subfamily Torovirinae and three other subfamilies), revision of the genus rank structure and introduction of a new subgenus rank. (ICTV, 2017); <https://ictv.global/proposal/2017.Nidovirales/>.

ZIEBUHR, J. et al. *Proposal 2019.021S.Ac.v1*. Create ten new species and a new genus in the subfamily Orthocoronavirinae of the family Coronaviridae and five new species and a new genus in the subfamily Serpentovirinae of the family Tobaniviridae. (ICTV, 2019); <https://ictv.global/proposal/2019.Nidovirales/>.

ZOU, Xin et al. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. **Frontiers Of Medicine**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 185-192, 12 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>.

11 GLOSSÁRIO

Clone robusto: Aglomerado de células infectadas com vírus recombinantes (verde fluorescente). Quanto maior é a quantidade de células infectadas, mais robusto e puro é o clone (com pouco ou nenhum resquício de vírus parental); e conseqüentemente, mais eficaz é a sua expressão. A robustez pode ser visualizada por um aumento na intensidade de fluorescência.