

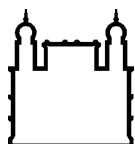
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIIS DE CÉLULAS VERO-E6
INFECTADAS COM SARS-COV-2 E TRATADAS COM MOLÉCULAS
DE AÇÃO ANTIVIRAL

MARCOS ALEXANDRE NUNES DA SILVA

Rio de Janeiro
Dezembro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Marcos Alexandre Nunes da Silva

ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIS DE CÉLULAS VERO-E6 INFECTADAS COM
SARS-COV-2 E TRATADAS COM MOLÉCULAS DE AÇÃO ANTIVIRAL

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Medicina Tropical

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Debora Ferreira Barreto Vieira
Prof^a. Dr^a. Milene Dias Miranda

RIO DE JANEIRO
Dezembro de 2021

Nunes da Silva , Marcos Alexandre .

ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIIS DE CÉLULAS VERO-E6 INFECTADAS
COM SARS-COV-2 E TRATADAS COM MOLÉCULAS DE AÇÃO ANTIVIRAL /
Marcos Alexandre Nunes da Silva . - Rio de Janeiro, 2021.

122 f.

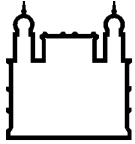
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Medicina Tropical, 2021.

Orientador: Debora Ferreira Barreto Vieira.

Orientador: Milene Dias Miranda.

Bibliografia: f. 01-122

1. SARS-CoV-2. 2. MORFOLOGIA . 3. MORFOGÊNESE. 4.
ULTRAESTRUTURA . 5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: MARCOS ALEXANDRE NUNES DA SILVA

**ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIS DE CÉLULAS VERO-E6 INFECTADAS COM
SARS-COV-2 E TRATADAS COM MOLÉCULAS DE AÇÃO ANTIVIRAL**

**ORIENTADORAS: Prof^a. Dr^a. Debora Ferreira Barreto Vieira
Prof^a. Dr^a. Milene Dias Miranda**

Aprovada em: 01/12/2021

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Victor do Valle Pereira Midlej - Presidente. Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz

Prof^a. Dra. Carmen Baur Vieira – Revisora. Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. José Junior França de Barros - Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz

Prof^a. Dra. Lívia Mello Villar - Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz

Prof^a. Dra. Juliana Lourenço Abrantes - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 01 de dezembro de 2021

Dedico este trabalho a equipe do LMMV, aos meus queridos amigos e a minha família.

AGRADECIMENTOS

À Fiocruz, por existir e construir sonhos em adolescentes que circulam em seus campi, fazer pesquisa e tentar transformar esse país pelo processo de educação em saúde.

À Dra. Debora Ferreira Barreto Vieira pela orientação e tempo dedicados a este trabalho, e por me receber no seu laboratório. Obrigado pelo espaço a mim cedido e por todo carinho ao longo de nossa caminhada juntos.

À Dra. Milene Dias Miranda por ter aceitado minha coorientação, por ter construído parte desse profissional e pela mansidão e calma em consolar esse aluno quando o desespero se instaurava.

Agradeço à Dra. Carmen Baur pelo aceite da revisão dessa dissertação, em um momento tão turbulento. Pelos ensinamentos e pelo carinho que sempre me tratou.

Agradeço ao Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral (LMMV/Fiocruz), ao Laboratório de vírus respiratórios e do Sarampo (LVR/S/ Fiocruz), a Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth, em especial aos doutores Wendel e Roger e ao Rômulo, pelos ensinamentos.

Ao Dr. Bráulio Arcanjo e sua equipe do Núcleo de Laboratórios de Microscopia, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), pelo acolhimento e treinamento.

Aos meus queridos amigos do LMMV, Amanda, Ana, Arthur, Daniel, Fernanda, Gabriela, muito obrigado por abraçarem meus projetos, ideias e loucuras. Vocês são demais! Espero sempre ter vocês ao meu lado! Agradeço especialmente a Dra. Monika Barth pelos ensinamentos e meu despertar pela microscopia.

Tenho profundo respeito e admiração e um sentimento de agradecimento por meus professores do curso de pós-graduação em Medicina Tropical que construíram o profissional que escreve esse texto.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, em especial a secretária Lívia, por todo o suporte dado nesse processo, sempre com muito carinho e paciência, e a coordenadora do curso, Dra. Vanessa de Paula, por todo carinho com que sempre me recebeu em sua sala.

Ao colégio Pedro II que me proporcionou experiências fantásticas, por ter guiado a minha formação como soldado da ciência e por ter me dado os amigos maravilhosos, Antônio, Jessica, Matheus, Vanessa, Pablo e Alexandro. A estes peço um pouco mais de paciência para que continuem a me aturar pelo resto de nossas vidas e agradeço muito por todo o suporte durante todo esse percurso.

À Universidade Federal Fluminense pelos meus parceiros de profissão Vitor, Tiago, Ramon, Carolina e Eloah, que quase sempre me apoiaram, ou pelos menos, estavam ali para me ajudar a levantar depois um tombo.

Meu agradecimento ao Ministério da Educação que desde cedo entrou na minha vida, me tornando um soldado da ciência. Agradeço ao Ministério da Saúde por todo o suporte financeiro, em bolsas de capacitação em saúde e de estágio remunerado na atenção terciária e quaternária de saúde.

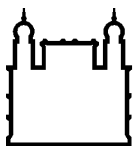
Agradeço ao Ministério da Ciência e Tecnologia por minhas bolsas de iniciação científica. Espero um dia poder retribuir com meu trabalho, empenho e dedicação.

Agradeço a minha família por todo o suporte sentimental e financeiro. Por todos os "colos" e palavras amigas dadas nos momentos mais difíceis, onde a dúvida e a vontade de desistir surgiam. Mãe, obrigado por tudo! Eu amo vocês.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“O mistério da existência humana não é apenas manter-se vivo, mas encontrar algo pelo qual viver.”

Dostoiévski, (1821-1881)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIS DE CÉLULAS VERO-E6 INFECTADAS COM SARS-COV-2 E TRATADAS COM MOLÉCULAS DE AÇÃO ANTIVIRAL **RESUMO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Marcos Alexandre Nunes da Silva

Em dezembro de 2019, um novo coronavírus (SARS-CoV-2) foi identificado em Wuhan, China, e associado a uma infecção respiratória grave, hoje conhecida como COVID-19. Apesar do impacto na saúde pública mundial e de diferentes esforços, até o presente momento não há droga antiviral específica a ser utilizada. Nesse contexto, um sistema *in vitro* padronizado e bem caracterizado para produção de massa viral, para testes de candidatos à fármacos e vacinas contra o novo coronavírus é de extrema importância. Assim, este estudo objetivou: I) avaliar a susceptibilidade e permissividade das células de linhagem de rim de macaco verde africano (Vero-E6) para o SARS-CoV-2 e caracterizar o seu ciclo replicativo por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura de alta resolução (MEV); e II) verificar o impacto na biossíntese do vírus em células Vero-E6 mediante o tratamento com antivirais. Para isso, monocamadas de células Vero-E6 foram inoculadas com MOI (multiplicidade de infecção) 0,01 de SARS-CoV-2 e analisadas por MET e MEV para os estudos de susceptibilidade, permissividade e morfogênese. Para os estudos de inibição da biossíntese viral, as monocamadas infectadas foram tratadas com mefloquina e ao daclatasvir a 10 μ M e, posteriormente, processadas por técnicas padrão para análises por MET. A partir do sobrenadante, o RNA viral foi quantificado por RT-qPCR e o título viral determinado por contagem de placas unidades formadoras de placa (PFU/mL). Diversas alterações ultraestruturais foram observadas nas células infectadas, incluindo intensa ativação celular evidenciada por filopódios, formação de sincícios, acúmulo de corpúsculos lipídicos, proliferação de vesículas de dupla membrana (VDM), degeneração de mitocôndrias, aumento no número de ribossomos elétron-densos e espessamento do retículo endoplasmático rugoso (RER). Com relação à biossíntese viral, observou-se internalização das partículas do SARS-CoV-2 majoritariamente por endocitose, parte da síntese viral

ocorrendo no lúmen das VDMS e liberação da progênie viral por exocitose. O ensaio de qRT-PCR demonstrou aumento da progênie viral em log₂ em 72 horas pós-infecção. Os estudos referentes ao objetivo II revelaram que a mefloquina a 10 µM promoveu inibição da replicação viral em 100%, enquanto o tratamento com daclatasvir inibiu em 80%, porém com este tratamento as células permanecem com viabilidade acima de 90%, enquanto com mefloquina esse número reduz para 9%. Os dados apresentados comprovam em nível ultraestrutural a susceptibilidade e a permissividade das células de linhagem Vero-E6 para o SARS-CoV-2 reforçando a utilização desta linhagem como um sistema *in vitro* para a produção de massa viral e testes pré-clínicos de drogas.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ULTRASTRUCTURAL STUDIES OF VERO-E6 CELLS INFECTED WITH SARS-COV-2 AND TREATED WITH ANTIVIRAL ACTION MOLECULES

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Marcos Alexandre Nunes da Silva

In December 2019, a new coronavirus (SARS-CoV-2) was identified in Wuhan, China, and associated with a severe respiratory infection, now known as COVID-19. Despite the impact on public health worldwide and different efforts, to date there is no specific antiviral drug to be used. In this context, a standardized and well-characterized in vitro system for viral mass production, for testing drug and vaccine candidates against the new coronavirus is extremely important. Thus, this study aimed to: I) evaluate the susceptibility of cells from the African green monkey kidney lineage (Vero-E6) to SARS-CoV-2 and characterize its replicative cycle by transmission electron microscopy (TEM) and scanning high resolution (SEM); and II) verify the impact on virus biosynthesis in Vero-E6 cells by treatment with daclatasvir or mefloquine. For this, Vero-E6 cell monolayers were inoculated with MOI (multiplicity of infection) 0.01 of SARS-CoV-2 and analyzed by MET and SEM for studies of susceptibility and morphogenesis. For viral biosynthesis inhibition studies, the infected monolayers were exposed to mefloquine and daclatasvir at 10 μ M and subsequently processed by standard techniques for TEM analysis. From the supernatant, viral RNA was quantified by RT-qPCR and viral titer determined by plaque count (PFU/mL). Different ultrastructural changes were observed in infected cells, including intense cell activation evidenced by filopodia, syncytia formation, accumulation of lipid bodies, proliferation of double membrane vesicles (DMVs), mitochondrial degeneration, increased number of electron-dense ribosomes, and thickening of the rough endoplasmic reticulum (RER). Regarding viral biosynthesis, internalization of SARS-CoV-2 particles mostly by endocytosis, part of viral synthesis occurring in double membrane vesicles (DMV) lumen and release of viral progeny by exocytosis were observed. The qRT-PCR assay from cell culture supernatants demonstrated an increase in viral progeny by 2 logs in 72 hours post-infection. The studies referring to objective II revealed that mefloquine at 10 μ M promoted inhibition of viral replication by 100%, while treatment with daclatasvir inhibits it by 80%, but with this treatment the cells remain with viability above 90%, while with mefloquine this number reduces to 9%. The data presented at the ultrastructural level confirm the susceptibility and permissiveness of the Vero-E6 lineage cells to SARS-CoV-2, reinforcing the use of this lineage as an in vitro system for the production of viral mass and preclinical drug tests.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	X
INDICE DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico e breve epidemiologia do SARS-CoV-2	1
1.2 Classificação e morfologia	3
1.3 Ciclo replicativo	4
1.4 Mecanismos de controle da dispersão e infecção por SARS-CoV-2.....	6
1.4.1 Vacinas.....	7
1.4.2 Antivirais.....	9
1.5 Microscopia eletrônica aplicada ao estudo do SARS-CoV-2.....	11
1.6 Justificativa	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Considerações éticas.....	15
3.2 Cultura células e massa viral.....	15
3.3 Infecção das monocamadas de células Vero-E6.....	16
3.4 Avaliação do efeito inibitório de fármacos sobre a replicação de SARS-CoV-2.....	16
3.5 Titulação viral.....	16
3.6 Quantificação de RNA viral.....	16
3.7 Teste de citotoxicidade.....	17
3.8 Processamento das monocamadas celulares para análises por MET	17

3.9	Processamento das monocamadas celulares para análises por MEV.....	18
3.10	Reconstrução tridimensional de Células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2.....	18
3.11	Imunofluorescência para detecção da proteína S.....	19
3.12	Análise estatística.....	19
4	RESULTADOS.....	20
4.1	Morfologia e morfogênese de SARS-CoV-2 em células Vero-E6.....	20
4.2	SARS-CoV-2: Caracterização ultraestrutural da morfogênese em um sistema <i>in vitro</i>	27
4.3	Avaliação da ação antiviral do Daclatasvir e da Mefloquina em células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2.....	50
4.3.1	Análises ultraestruturais por MET.....	50
4.3.1.1	Controle da cultura celular.....	50
4.3.1.2	Controle da infecção pelo SARS-CoV-2 da cultura celular.....	54
4.3.1.3	Ação antiviral do Daclatasvir.....	57
4.3.1.4	Ação antiviral da Mefloquina.....	63
4.3.2	Avaliação de citotoxicidade de mefloquina e daclatasvir por MTT.....	70
4.3.3	Titulação viral e quantificação de RNA viral a partir dos sobrenadantes das monocamadas pós-tratamento com daclatasvir e mefloquina	71
5	DISCUSSÃO.....	74
5.1	Morfologia e morfogênese do SARS-CoV-2 em células Vero-E6.....	74
5.2	Antivirais.....	77
6	PERSPECTIVAS.....	80
7	CONCLUSÕES.....	81
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
9	ANEXOS.....	95
9.1	CEP Fiocruz.....	95
9.2	Artigos publicados durante o desenvolvimento da dissertação.....	96

9.2.1 Lipid droplets fuel SARS-CoV replication and production of inflammatory mediators.....	96
9.2.2 Brazilian Dengue Virus Type 2 Associated Involvement in a Murine Model: Outcomes after infection by Two Lineages of the Asian/American Genotype.....	97
9.2.3 Immunocompetent Mice Infected by two lineages of Dengue Virus Type 2: Observations on the pathology of the Lung, Heat and Skeletal muscle.....	98
9.3 Artigos submetidos durante o desenvolvimento da dissertação.....	99
9.3.1 Unlike Chloroquine, mefloquine inhibits SARS-CoV-2 infection in physiological relevant cell and does not induce viral variants.....	99
9.3.2 Inactivation of SARS-CoV-2 by a novel Chitosan/ α -Ag ² WO ₄ Composite Generated by Femtosecond laser irradiation.....	100
9.4 Capítulo de livro em fase de publicação.....	101
9.4.1 Rickettsias latu sensu em quirópteros no Rio de Janeiro: um estudo piloto na estação biológica da Fiocruz mata atlântica (EFMA).....	101
9.5 Participação em eventos.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Esquema ilustrativo da estrutura do SARS-CoV-2 e genoma viral.....	04
Figura 2- Representação esquemática da replicação do SARS-CoV-2.....	06
Figura 3- Células Vero-E6 não infectadas e não tratadas com mefloquina ou daclatasvir coletadas com 48 h de cultivo.....	50
Figura 4- Células Vero-E6 48h p.i. com SARS-CoV-2, MOI de 0,01.....	54
Figura 5- Células Vero-E6 tratadas com Daclatasvir 10µM e coletadas com 48h de cultivo.....	57
Figura 6- Células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2 com MOI 0,01, tratadas com Daclatasvir a 10µM e coletadas com 48h p.i.....	60
Figura 7- Células Vero-E6 não infectadas, tratadas com Mefloquina a 10µM e coletadas com 48h de cultivo.....	63
Figura 8- Células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2 com MOI 0,01, tratadas com Mefloquina a 10µM e coletadas com 48h p.i.....	67
Figura 9- Percentual de células viáveis pós-tratamento com daclatasvir e mefloquina a 10µM.....	70
Figura 10- Titulação viral e quantificação de RNA viral pós-tratamento com antivirais.....	72

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Vacinas aprovadas.....	8
--	----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE2	do inglês “ <i>Angiotensin I-Converting Enzyme-2</i> ”
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BLS3	do inglês “ <i>Biosafety Level 3</i> ”
°C	Graus Celsius
CENABIO	Plataforma Nacional de Bioimageamento
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMV	Citomegalovírus Humano
COVID-19	Doença causada pelo SARS-CoV-2
CO ₂	Dióxido de carbono
CQ	Cloroquina
DCV	Daclatasvir
E	Proteína de envelope
ERGIC	Compartimento intermediário RER-para-Golgi
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FDA	do inglês “ <i>Food and Drug Administration</i> ”
HE	Hemaglutinina-esterase
h	Hora
HCV	Vírus da Hepatite C
HCoV	Coronavírus humano NL63
HCQ	Hidroxicloroquina
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IFN- β	Interferon- β
Kb	Kilobytes
LPV	Lopinavir
LMMV	Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral
LVRS	Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo
μ M	Micrômetros
μ L	Microlitros
mRNA sg	RNA mensageiro sub genômico
M	Proteína de Membrana
M	Molaridade

MERS-CoV	Coronavírus associado à Síndrome Respiratória do Oriente Médio.
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Ministério da Saúde
N	Núcleo
N	Proteína de nucleocapsídeo
NB3	Nível de segurança 3
NS5A	Proteína multifuncional envolvida no ciclo replicativo do HCV
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	do inglês “ <i>phosphate buffered saline</i> ”
PFU	do inglês “ <i>Plaque-Formation Unit</i> ”
PNS	Proteínas não estruturais
p.i.	Pós-infecção
RBD	do inglês “ <i>Receptor Binding Domain</i> ”
RT-qPCR	do inglês “ <i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> ”
RDV	Remdesivir
RTN	Ritonavir
RNA	Ácido ribonucleico
RER	Retículo endoplasmático rugoso
SFB	Soro fetal bovino
S	do inglês “ <i>Spike</i> ”
SARS-CoV-1	Coronavírus 1 associado à Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 associado à Síndrome Respiratória Aguda Grave
SFB	Sofosbuvir
SUS	Sistema Único de Saúde
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VDM	Vesículas de dupla membrana
VMCs	Vesículas de Membranas convolutas
VIs	Vesículas intermediárias

1 INTRODUÇÃO

O coronavírus 2 associado à síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), é o terceiro coronavírus humano (HCoV) responsável por doenças respiratórias graves nas últimas duas décadas. Precedida pela síndrome respiratória aguda grave (SARS) causada pelo SARS-CoV e pela Síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) causada pelo MERS-CoV, a COVID-19 (doença causada pelo SARS-CoV-2) já levou a óbito 5.1 milhões pessoas em todo o mundo (Zhang *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2020; WHO, 2021).

A COVID-19 apresenta um espectro clínico bastante amplo que pode variar de sintomas semelhantes a uma gripe leve até quadros mais complexos, como a SARS. Embora a maioria dos indivíduos infectados apresente sintomas leves e bom prognóstico, há casos que tendem a evoluir para a forma mais grave da doença, complicações em múltiplos órgãos e óbito (Lin *et al.*, 2020).

Como os coronavírus são conhecidos por infectar animais (zoonoses), principalmente, a infecção em humanos resulta do transpassar a barreira interespecies e adquirir capacidade infectiva e disseminadora do vírus em humanos, fatores esses que cada vez mais se vê acontecer, com a quebra de barreiras pelo homem frente aos processos naturais do curso de patógenos circulantes na natureza. Essa quebra sejam elas com o rompimento de nichos ecológicos, entrada do homem em ambientes naturais ainda pouco explorados, ou pelo consumo de espécies exóticas como forma de alimento (Rabaan *et al.*, 2020).

1.1 Histórico e breve epidemiologia do SARS-CoV-2

No final da década de 1960, David Tyrrell, médico britânico, liderava um grupo de virologistas que trabalhava com diferentes cepas de vírus humanos e animais. Suas pesquisas incluíam o vírus da bronquite infecciosa, o vírus da hepatite de camundongo e o vírus da gastroenterite transmissível de suínos, que apresentavam morfologias semelhantes quando analisados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (McIntosh *et al.*, 1968). Em um destes estudos, June de Almeida, uma pesquisadora da equipe, deparou-se com um vírus que

ultraestruturalmente apresentava projeções no envelope viral e que fora então denominado coronavírus, visto que a estrutura das partículas se assemelham à uma coroa. Tempos mais tarde, os coronavírus foram oficialmente aceitos como um novo gênero de vírus (Tyrrell *et al.*, 1975)

Os coronavírus (CoV) foram responsáveis por 3 episódios que chamaram a atenção do sistema de saúde pública mundial. O primeiro em 2002-03 com o isolamento do SARS-CoV (Coronavírus associado à Síndrome Respiratória Aguda Grave) na China, que se disseminou por 26 países, com 8.098 casos confirmados e 774 casos de óbitos. O segundo em 2012 causado pelo MERS-CoV (Coronavírus associado à Síndrome Respiratória do Oriente Médio), responsável por 858 casos de óbito. Já o terceiro, e com maior impacto na saúde pública mundial, ocorreu em 2019 e foi causado pelo SARS-CoV-2, que resultou em 5,1 milhões de óbitos em todo o mundo até o mês de novembro de 2021 (WHO, 2021).

O CoV causador da COVID-19 (SARS-CoV-2) foi identificado pela primeira vez em Wuhan, na província de Hubei, República Popular da China, em 1 de dezembro de 2019, porém só foi reportada às autoridades sanitárias em 31 de dezembro do mesmo ano. Acredita-se que o vírus tenha uma origem zoonótica, porque os primeiros casos confirmados tinham ligação com um mercado atacadista de frutos do mar de Huanan, que também comercializava animais vivos. Desde o isolamento do SARS-CoV-2 em Wuhan, em dezembro de 2019, houve uma rápida disseminação pela China e muitos outros países (Chen *et al.*, 2020; Gorbalenya *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Em 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como a sexta emergência de saúde pública de preocupação internacional e em 11 de março de 2020 elevou a classificação do SARS-CoV-2 para pandemia. No momento do anúncio da OMS, mais de 118 mil pessoas já tinham sido infectadas em 114 países. A pandemia de SARS-CoV-2, ainda em curso, resultou na implementação de quarentena e distanciamento social em todo o mundo (WHO, 2020).

O primeiro caso de COVID-19 no Brasil notificou através do Ministério da Saúde (MS) em 26 de fevereiro de 2020, no Estado de São Paulo, e tratava-se de um paciente do sexo masculino de 61 anos de idade, com histórico de viagem para Itália, região da Lombardia. Atualmente, até a semana epidemiológica 43 (de

24/10/2021 a 30/10/2021) já foram registrados 21,5 milhões de casos, totalizando 605 mil mortes desde a introdução deste vírus no país (Ministério da Saúde, 2021).

1.2 Classificação e morfologia

O SARS-CoV-2 foi classificado em 2020 como gênero *Betacoronavirus*, e família *Coronaviridae* pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV-2019). Amostras apresentam modificações pequenas no genoma viral, que não deslocam sua classificação taxonômica, porém se exibem com grande potencial em medidas de saúde públicas para identificação, prevenção e controle de surtos e clusters de transmissão. Análises filogenéticas revelaram que o SARS-CoV-2 está intimamente relacionado (88-89% de semelhança) a dois coronavírus semelhantes ao SARS que são isolados de morcegos, o bat-SL-CoVZC45 (GenBank no. MG772933.1) e o bat-SL-CoVZXC21 (GenBank no. MG772934.1), e que está mais distante do SARS-CoV (~79% de identidade) e do MERS-CoV (~50% de identidade) (Lu *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2020).

A partícula viral tem entre 50 e 200 nm de diâmetro e o seu genoma é RNA fita simples de polaridade positiva de 29,9 Kb. O RNA viral está associado a proteínas fosforiladas (N), formando o nucleocapsídeo, que é envolto pelo envelope. Este é composto pelas proteínas S (espícula), M (de membrana) e E (de envelope) (Chen *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020) (Figura 1).

Os primeiros estudos sobre modelagem de proteínas, utilizando a proteína S do vírus, sugerem que o SARS-CoV-2 tenha afinidade com os receptores de Enzima Conversora da Angiotensina 2 (ACE2) das células humanas, sendo este o mecanismo de reconhecimento da membrana da célula hospedeira na etapa de adsorção (Xu *et al.*, 2020). Vários estudos têm demonstrado que o SARS-CoV-2 tem uma maior afinidade com a ACE2 humana do que a estirpe de SARS-CoV (Wrapp *et al.*, 2020).

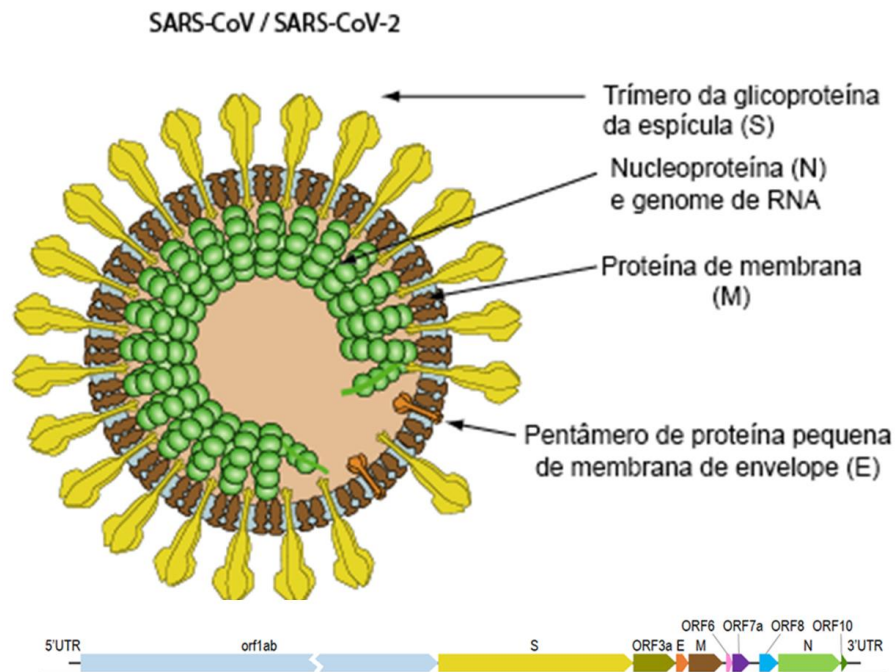


Figura 1: Esquema ilustrativo da estrutura da partícula do SARS-CoV-2 e do genoma viral. Fonte: ViralZone, 2020

1.3 Ciclo replicativo

Estudos *in vitro* sobre o ciclo biológico replicativo dos coronavírus demonstram que a adsorção destes vírus à célula hospedeira ocorre a partir da interação da proteína S com receptores de ACE2 das células humanas (Letko *et al.*, 2020; Knoops *et al.*, 2008; Walls *et al.*, 2020). Na infecção primária em casos humanos pelo SARS-CoV-2 sugere-se um tropismo pelas células epiteliais do trato respiratório superior, levando a um quadro gripal e perda de função do epitélio sensorial olfativo. Decorrente da infecção pode ocorrer uma disseminação do vírus pelas células epiteliais de revestimento do pulmão, gerando o quadro de insuficiência respiratória aguda e edema pulmonar. Numa infecção agravada e posterior disseminação do vírus pelo organismo do hospedeiro sugere-se que o SARS-CoV-2 estabeleça um nicho de replicação viral em células do rim, intestino e do epitélio cardíaco, estas apresentam receptores ACE2 (Monteil *et al.*, 2020).

Estudos ultraestruturais a partir de células em cultura infectadas com o SARS-CoV revelaram que a internalização da partícula viral pode ocorrer por endocitose ou por fusão do envelope do vírus com a membrana citoplasmática da

célula hospedeira (Qinfen *et al.*, 2004). Dada a internalização das partículas virais se observa em ensaios *in vitro* com os vírus SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 o processo de desnudamento do RNA genômico, que é imediatamente traduzido a partir das ORF1a e ORF1b (Figura 2). As poliproteínas pp1a e pp1ab resultantes, são processadas em proteínas não estruturais individuais (PSNS) que formam o complexo de replicação e transcrição viral. A replicação do RNA viral ocorre em estruturas de membrana dupla induzidas pelo vírus e derivadas do retículo endoplasmático rugoso (RER), comumente referidas como vesículas de dupla membrana (VDM), em membranas convolutas (MCVs) e em pequenas esférulas de membrana dupla abertas (VDMs) que criam um microambiente protetor para a replicação de RNA genômico viral e transcrição de mRNAs subgenômicos (mRNAs sg). Este complexo de vesículas está localizado na região perinuclear e rodeado de mitocôndrias (Goldsmith *et al.*, 2004; Snijder *et al.*, 2006; Knoops *et al.*, 2008; V'kovski *et al.*, 2021). As proteínas estruturais traduzidas são transferidas para o retículo endoplasmático (RER) e transitam através do compartimento intermediário (RER-para-Golgi [ERGIC]), onde a interação com RNA genômico N-encapsidado recentemente produzido brota em direção ao lúmen de compartimentos vesiculares secretores. A liberação da progênie viral se dá por exocitose (V'kovski *et al.*, 2021).

Os vírus de genoma de RNA de polaridade positiva induzem a proliferação de compartimentos membranosos intracelulares nas células hospedeiras que abrigam os sítios de síntese viral do RNA. Estas “fábricas de replicação” concentram os componentes da replicase e protegem os intermediários de replicação da defesa imune inata da célula hospedeira (Harak *et al.*, 2015). Arterivírus, picornavírus, e os flavivírus do gênero Hepacivirus, que são vírus de genoma RNA induzem a formação de VDMs (Netherton *et al.*, 2011; Blanchard *et al.*, 2015). Foram observados filamentos de RNA viral no lúmen de VDMs em estudos *in vitro* com SARS-CoV-2, associando estes compartimentos à replicação viral (Klein *et al.*, 2020).

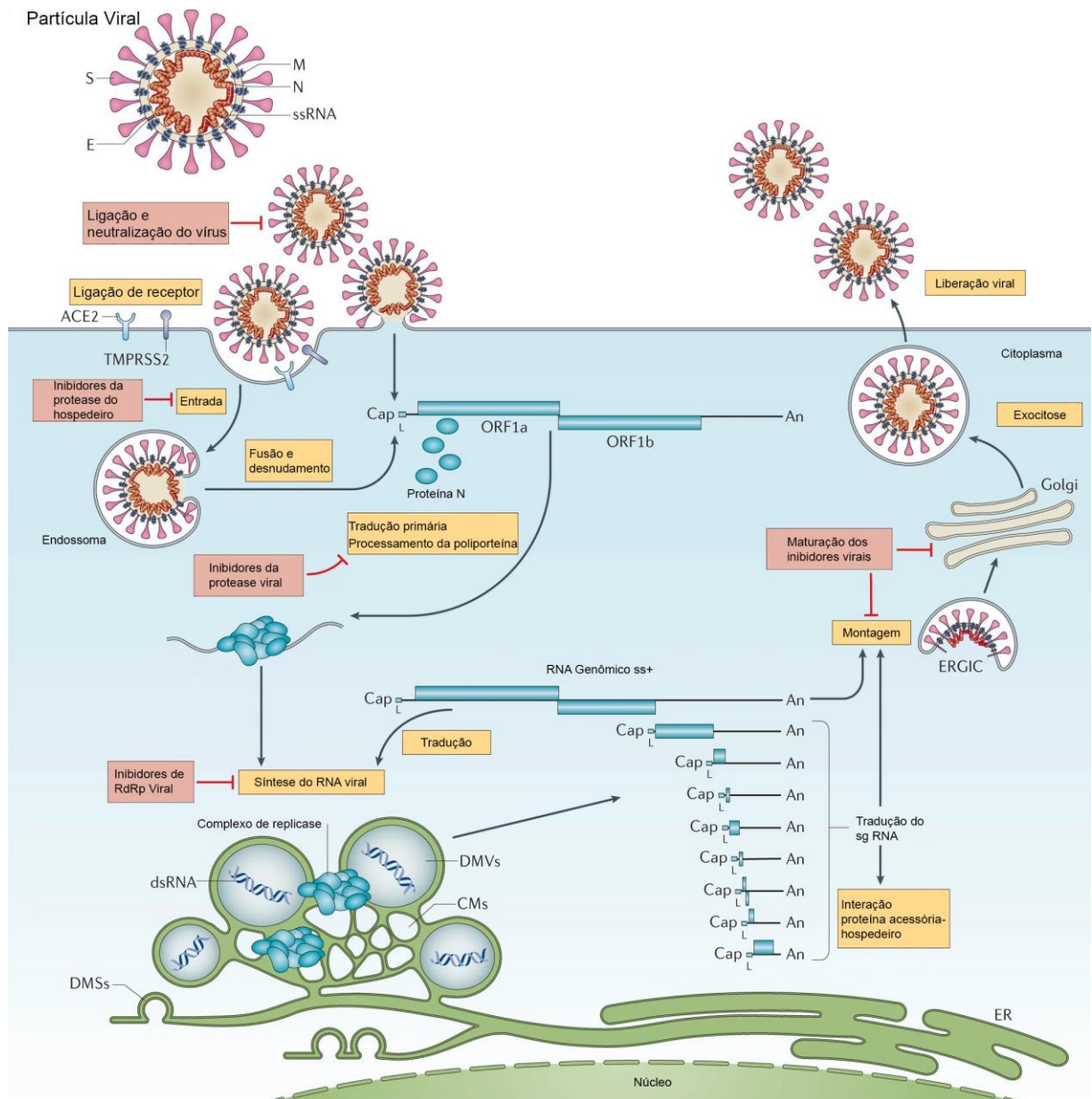


Figura 2: Representação esquemática da replicação do SARS-CoV-2 (Adptado de V'kovski *et al.*, 2021).

1.4 Mecanismos de controle da dispersão e infecção por SARS-CoV-2

Prevenção e Controle são palavras-chave para conter e controlar uma epidemia, um surto, derivados de um patógeno qualquer. Entender que do processo de educação em saúde à pesquisa de desenvolvimento tecnológico, existe a necessidade do público-alvo ser informado, para que haja um processo de aceitação, advindo do sistema de saúde. Não só como uma vacina, para prevenção da disseminação, ou um antiviral, uma terapêutica padronizada, segura e eficaz se

faz necessário, principalmente nos casos onde o quadro da doença se exibe de forma aguda. (Ministério da Saúde, 2021).

1.4.1 Vacinas

Atualmente, 4 vacinas estão licenciadas para uso para o SARS-CoV-2 pela OMS (WHO, 2021). Elas foram desenvolvidas a partir de diferentes plataformas, tais como vacinas inativadas, atenuadas, de DNA e RNA, de vetor viral, de subunidades virais e de partículas virais (Acessado em 16/11/2021 as 14:36: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>).

A OMS vem informando um número crescente de novas vacinas em desenvolvimento contra a COVID-19 em todo o mundo. A participação da proteína Spike do envelope viral do SARS-CoV-2, especialmente da região do domínio de ligação do receptor (do inglês RBD, *Receptor Binding Domain*), responsável pela ligação ao receptor e fusão com a membrana celular, a torna o antígeno mais atraente para a produção de vacinas, alvo de quase todos os fabricantes, exceto para as vacinas inativadas (Dias *et al.*, 2020)

No Brasil, quatro vacinas foram aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e duas outras têm autorização para importação especial (ANVISA, 2021) (Quadro 1). Até 1 de Novembro, o Ministério da Saúde Brasileiro imunizou aproximadamente 60% de sua população com duas doses, e estima que até dezembro do mesmo ano, 90% da população esteja com essa imunização completa (Ministério da Saúde, 2021).

VACINAS APROVADAS

CORONAVAC

Fabricante: BUTANTAN

Tecnologia: vírus inativado

Doses: duas, com intervalo de 28 dias

Faixa etária a ser aplicada: a partir de 18 anos

OXFORD/COVISHIELD (FIOCRUZ E ASTRAZENECA)

Fabricante: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Tecnologia: vetor adenovírus recombinante

Doses: duas, com intervalo entre 4 e 12 semanas

Faixa etária a ser aplicada: a partir de 18 anos

JANSEN CILAG

Fabricante: Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda

Tecnologia: vetor adenovírus recombinante sorotipo 26 (Ad26)

Doses: única

Faixa etária a ser aplicada: a partir de 18 anos

PFIZER-WYETH

Fabricante: Comirnaty

Tecnologia: RNA mensageiro

Doses: duas, com intervalo maior ou igual a 21 dias

Faixa etária a ser aplicada: a partir de 12 anos

VACINAS COM AUTORIZAÇÃO PARA IMPORTAÇÃO EXCEPCIONAL

SPUTINIK

Fabricante: Instituto Gamaleya

Tecnologia: vetor adenovírus recombinante (1º dose Ad26; 2º dose Ad5)

Doses: duas, com intervalo maior ou igual a 21 dias

Faixa etária a ser aplicada: a partir de 18 anos

COVAXIN

Fabricante: Bharat Biotech

Tecnologia: Vírus inativado

Doses: duas, com intervalo maior ou igual a 21 dias

Faixa etária a ser aplicada: a partir de 18 anos

1.4.2 Antivirais

O desenvolvimento de novas terapias antivirais é um processo longo e em geral requer mais de 10 anos desde a pesquisa básica até a finalização de ensaios clínicos. Portanto, o reposicionamento de drogas já utilizadas como medicamentos, em especial de uso contínuo, representa uma das estratégias mais promissoras para a rápida identificação e implantação de tratamentos para doenças infecciosas emergentes, como a COVID-19. Para este fim, as investigações clínicas têm se concentrado na avaliação da eficácia e da segurança de várias farmacoterapias já aprovadas.

A OMS anunciou em 18 de março de 2020 o principal grande ensaio clínico global avaliando quatro opções terapêuticas imediatas a serem avaliadas frente a redução da mortalidade, da necessidade de ventilação mecânica e do tempo de internação promovidos pela infecção por SARS-CoV-2. São eles: 1) Remdesivir (RDV), inibidor da RNA polimerase viral; 2) A combinação de Lopinavir (LPV)/Ritonavir (RTV), inibidores de protease viral, com ou 3) sem Interferon- β (IFN- β); e 4) Cloroquina (CQ)/hidroxicloroquina (HCQ) (aminoquinolinas), antimaláricos com propriedades antivirais e anti-inflamatórias (WHO, 2021). No entanto, em 15 de outubro de 2020, o resultado do ensaio foi divulgado e apontou que essas moléculas apresentaram pouca ou nenhuma eficiência frente a COVID-19. Destes, apenas o RDV recebeu autorização de uso de emergência pelo FDA (do inglês “*Food and Drug Administration*”) para o tratamento de COVID-19, com base em dados de ensaios clínicos que demonstram uma redução no tempo de recuperação do paciente (Riva *et al.*, 2020; CDC, 2020).

Independentemente dos resultados com essas moléculas, os seus prováveis alvos de atuação são importantes para a inibição da replicação viral e a recuperação do indivíduo infectado. Sendo assim, buscar outras moléculas que atuem nestes alvos é uma estratégia interessante do ponto de vista da infecção e sua patogênese

(Ghanbari, 2020; McKee, 2020). Dentre todas as drogas que vêm sendo estudadas, as que vêm apresentando resultados mais promissores são o Daclatasvir, Sofosbuvir, Rendesivir, Ritonavir entre outras drogas que necessitam estudos *in vitro* mais detalhados.

Já foi demonstrado que drogas como o daclatasvir (DCV) e o Sofosbuvir (SFB), utilizadas no tratamento da infecção do vírus da hepatite C (HCV), apresentam potencial terapêutico para a COVID-19 (Sacramento, 2020). O DCV inibe a replicação do HCV ao se ligar ao terminal N da proteína não estrutural 5A (NS5A), proteína multifuncional envolvida no ciclo replicativo e antagonismo das vias de interferon (Smith, 2016). O SARS-CoV-2, que possui um genoma 3 vezes maior que o do HCV, expressa as proteínas não estruturais (pns) 1 a 16, com funções semelhantes às da NS5A do HCV (Gordon, 2020).

Já o SFB inibe a RNA polimerase viral do HCV (NS5B). Além do HCV, ele também é capaz de inibir a replicação dos vírus Zika, febre amarela e Chikungunya (de Freitas, 2019). Estas moléculas estão em fase de estudos clínicos no Egito e no Brasil (ClinicalTrials, NIH, 2020; SUS-Fiocruz, 2020). No Brasil, a fase 1 do estudo foi desenvolvida na Fundação Oswaldo Cruz. Resultados *in vitro* revelam ainda ação sinérgica dessas duas drogas (DCV e SFV) sobre a replicação do SARS-CoV-2 (Sacramento, 2020).

Além da CQ e HCQ, o antimalárico artesunato de mefloquina (MF), molécula da classe das aminoquinolinas, já mostrou promissora atividade anti-SARS-CoV-2 *in vitro* (Gendrot *et al.*, 2020). Estudos *in silico* demonstram que, de todos os antimaláricos disponíveis, a MF é a molécula que apresenta a maior capacidade de interação com a maior protease (Mpro) do SARS-CoV-2, além de ter capacidade de inibir fases iniciais da replicação viral. Entretanto seu uso pode causar efeitos neuropsiquiátricos adversos (Sachdeva *et al.*, 2020). Assim, as aminoquinolinas destacam-se nos estudos anti-SARS-CoV-2 e a busca por novos derivados mais potentes e menos tóxicos é um campo de pesquisa interessante.

1.5 Microscopia eletrônica aplicada aos estudos de vírus

“Com a ajuda do microscópio não há nada tão pequeno que possa escapar às nossas investigações; portanto há um novo e visível mundo descoberto a ser entendido”.

Robert Hookie, 1664

Em 1924, o físico Louis de Broglie, constata que um feixe de elétrons apresenta um comportamento idêntico aos raios luminosos, mas com um comprimento de onda 10.000 vezes menor. Conjuntamente com a teoria do efeito de foco de um campo magnético ou eletrostático sobre um feixe de elétrons, a qual prova que é possível focar um feixe de elétrons com lentes magnéticas cilíndricas. Este microscópio não utiliza elementos ópticos, mas lentes eletrostáticas ou magnéticas, do que resulta uma ampliação e um poder de resolução muito maior, podendo assim visualizar estruturas antes não conhecidas como os vírus. Estavam assim elaboradas as bases teóricas do microscópio eletrônico sendo o primeiro aparelho construído em 1931/1932 por Ernst Ruska e por Max Knoll. Em 1933 o microscópio eletrônico ultrapassava já o limite de resolução do microscópio fotônico (Melo, 2002).

No entanto, só após a Segunda Guerra Mundial o microscópio eletrônico se desenvolveu em plenamente. A microscopia eletrônica teve um rápido desenvolvimento em poucos anos, graças a grandes aperfeiçoamentos técnicos que permitiram não apenas maiores valores de ampliação, mas também aumentos sucessivos da capacidade de resolução e da qualidade das imagens obtidas. Estes progressos foram também tornados possíveis graças ao aperfeiçoamento dos métodos de preparação do material biológico para observação, sendo desenvolvidas várias técnicas, como a de obtenção de cortes ultrafinos e a de fixação de estruturas celulares através do uso de resinas, entre outras (Normanski, 1952).

A Microscopia desde seus primórdios vem elucidando lacunas do conhecimento científico. No início da década de 30 pôde-se utilizar o microscópio eletrônico de transmissão (MET) para caracterizar um agente filtrável que devastava plantações de tabaco; tratava-se do primeiro vírus descrito e fotografado ainda numa chapa rudimentar de vidro revestida com um material fotossensível gelatinoso e que foi nomeado de vírus do Mosaico do Tabaco. O MET mostrou-se uma ferramenta de

extrema importância na descoberta de diferentes agentes causadores de patologias e com grande impacto nos estudos de vírus até o início da era da biologia molecular na década de 80 onde houve um desinteresse da sociedade científica. (Kausche *et al.*, 1939)

No início do ano de 2003, um quadro clínico de uma síndrome respiratória aguda grave e cujo agente causador era desconhecido chamou a atenção dos chineses. Neste evento a microscopia eletrônica de transmissão foi crucial na identificação do agente; tratava-se de um coronavírus. A microscopia eletrônica de transmissão foi não só utilizada para identificação e classificação do agente como também em análises objetivando a caracterização da morfogênese do vírus em sistemas *in vitro* (Qin *et al.*, 2004).

A microscopia eletrônica se mostrou de extrema importância na elucidação de questões relacionadas ao SARS-CoV e que no cenário atual se agigantou visto questões emergenciais relacionadas a biogênese do SARS-CoV-2 que só estudos ultraestruturais podem responder (Knoops *et al.*, 2019).

1.6 Justificativa

Dado impacto na saúde pública mundial causado pela pandemia da COVID-19, que já alcançou mais de 600 mil mortos no Brasil e mais de 5 milhões de óbitos no mundo, há uma corrida para protocolar uma terapêutica eficaz e segura. Entretanto, até o presente momento, não há droga antiviral específica para utilização em larga escala. Para corroborar o desenvolvimento, de um sistema *in vitro* padronizado para produção de massa viral e testes de candidatos à fármacos e vacinas contra o vírus é de grande importância no cenário atual.

Pesquisadores de todo o mundo têm trabalhado fortemente neste sentido e a susceptibilidade de diferentes linhagens celulares para infecção pelo SARS-CoV-2 tem sido demonstrada majoritariamente por técnicas moleculares (Park *et al.*, 2020; Harcourt *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020). Associado a esta técnica, estudos ultraestruturais são fundamentais, uma vez que gera conhecimento não só a respeito do efeito da replicação viral como da ação antiviral de diferentes moléculas sobre os sistemas celulares contribuindo para a descrição de novos alvos terapêuticos.

Logo, entender a biologia do vírus é de grande valia na construção de estratégias para combatê-lo. Neste sentido, e por haver poucos dados na literatura até o presente momento relacionados a morfogênese do SARS-CoV-2 em linhagens celulares, este estudo propõe realizar análises ultraestruturais por microscopias eletrônica de transmissão e de varredura de alta resolução a partir de culturas de células de linhagem Vero-E6, inoculadas com amostra clínica de swab nasofaríngeo de paciente positivo. Além disso é proposto a avaliação do impacto do tratamento com moléculas de ação antiviral tais quais o Daclatasvir e a Mefloquina sobre estruturas celulares importantes para o ciclo replicativo do SARS-CoV-2.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar *in vitro* a Morfogênese do SARS-CoV-2 e avaliar a ação de moléculas com potencial antiviral em nível ultraestrutural.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Descrever a morfologia de células de linhagem de rim de macaco verde africano (Vero-E6) durante a infecção pelo SARS-CoV-2.

- ✓ Caracterizar o ciclo replicativo de SARS-CoV-2 em nível ultraestrutural por microscopias eletrônicas de transmissão (MET) e de varredura de alta resolução (MEV).

- ✓ Avaliar a atividade anti-SARS-CoV-2 do daclatasvir e mefloquina (Aminoquinolina) em células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), em colaboração com o Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo (LVRS), IOC/Fiocruz, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz sob o número 4.128.241 em 01 de julho de 2020 (protocolo em anexo/ anexo 9.1). Todos os ensaios envolvendo os isolados virais foram realizados em ambiente de biossegurança nível 3 (NB3), de acordo com as normas da OMS (WHO, 2020).

3.2. Cultura células e amostra viral

Antes da infecção, as culturas de Vero-E6 foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (1x Pen-Strep) e cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂. Todos os reagentes de cultura de células foram adquiridos da Gibco. Todos os procedimentos foram realizados em laboratório de nível 3 de biossegurança, de acordo com as diretrizes da OMS.

A amostra de SARS-CoV-2 utilizada nos ensaios foi gentilmente cedida pelo LVRS/IOC/Fiocruz. O vírus foi isolado em cultura de células Vero-E6 seguindo protocolos padrão preconizados pela OMS e posteriormente sequenciado. A sequência completa do genoma viral foi depositada no GISAID sob o número GISAID EPI ISL #414045 e o acesso ao patrimônio genético foi registrado no SisGen sob o número ACCF49F.

3.3. Infecção das monocamadas de células Vero-E6

As monocamadas de Células Vero-E6 foram inoculadas com amostra de SARS-CoV-2 com MOI (multiplicidade de infecção) de 0,01 diluída em meio de cultura DMEM não suplementado e incubadas por uma hora para adsorção do vírus. Após esse período, o meio foi substituído por DMEM contendo 2% de SFB e antibióticos (penicilina e estreptomicina, 100U/mL). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ (Szretter *et al.*, 2006) até o momento da coleta (24, 48 e 72 horas [h] pós-infecção [p.i.]). Monocamadas não infectadas foram utilizadas como controles. As monocamadas objetivando análises por MET foram cultivadas em

garrafas de 25 cm² e para MEV de alta resolução foram cultivadas em lamínulas de 13mm em placa de 24 poços utilizando o mesmo MOI.

3.4. Avaliação do efeito inibitório de fármacos sobre a replicação de SARS-CoV-2.

Após 1 hora de infecção, o meio foi trocado por DMEM sem soro (controle infectado) ou DMEM sem soro contendo as moléculas a serem testadas, mefloquina ou daclatasvir (Sigma) a 10 µM na concentração final. Após 48 h da infecção, o sobrenadante total da garrafa de 25 cm³ foi recolhido para titulação viral e quantificação do RNA viral e a monocamada processada para análises por MET.

3.5 Titulação viral

A capacidade replicativa dos vírus no sobrenadante das culturas infectadas com ou sem tratamento foi avaliada pelo ensaio de contagem de unidades formadoras de placa (PFU/mL) (Filtelman *et al.*, 2020). As células Vero-E6 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2,0 x 10⁴ células/poço. No dia seguinte, elas foram expostas a diferentes diluições de base 2 (1:20 a 1:1280) do sobrenadante viral a ser titulado. Após 1 h de infecção, adicionou-se o mesmo volume de meio para ensaio de placa (DMEM 1X, bicarbonato de sódio 0,22%, carboximetilcelulose 2,4%, Pen Strep 1% e SFB 2%). Após 72 h da infecção, o mesmo volume de formalina 10% foi adicionado para fixação das células e inativação viral. Passadas 3 h, todo o meio de cultura foi retirado e a monocamada corada por 1 h com cristal violeta 0,04%, quando a placa é lavada, seca a temperatura ambiente e são evidenciadas as unidades formadoras de placa.

3.6 Quantificação de RNA viral

O RNA viral foi extraído a partir do sobrenadante das culturas celulares utilizando o kit QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden). Ao final do processo, o RNA foi eluído em Tampão TE (pH 8,0) e estocado a -70°C até o momento de uso. O RNA viral foi quantificado utilizando-se protocolo estabelecido pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), com curva padrão, utilizando como alvo o gene que codifica para a proteína de envelope (E), no equipamento 7.500 applied Biosystems (Filtelman *et al.*, 2020; CDC, 2020; WHO, 2020).

3.7 Teste de citotoxicidade

A viabilidade das células tratadas com os fármacos foi determinada pela redução do corante amarelado MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo] em cristais de formazan roxo pela ação de enzimas redutases mitocondriais (Kumar *et al.*, 2018). Para isso, as células foram incubadas com 10 µL de MTT previamente diluído em PBS a 5 mg/mL, e em seguida, a placa foi mantida sob 37°C em estufa de CO₂ por 2h. Após isso, adicionou-se 100 µL de SDS 10% por poço e a placa foi armazenada em temperatura ambiente por 2h. É relevante ressaltar que o ensaio foi realizado na ausência de luz devido a elevada sensibilidade do MTT à luminosidade. Por fim, a quantificação de células viáveis foi obtida pela média da absorbância dos poços analisados através da leitura em espectrofotômetro no filtro de 570nm. O percentual de viabilidade celular foi expresso como média (± erro padrão da média) e a análise estatística foi obtida em comparação ao grupo controle. N=3, *p<0.05

3.8 Processamento das monocamadas celulares para análises por MET e STEM

Para avaliação ultraestrutural das monocamadas, as células foram cultivadas e infectadas como descrito no item 3.3. Dado os tempos de cinética pré-determinados, as monocamadas celulares foram tripsinizadas a 0,25%, por um minuto em estufa 37°C. As células em suspensão foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Uma vez fixadas, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M em sacarose 7% e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em água por quatro horas em geladeira a 4°C. A desidratação se deu em banhos de acetona em concentrações crescentes. Após a etapa de desidratação, as células foram infiltradas com resina epóxi e mantidas em estufa a 60°C por 3 dias para polimerização (Barth *et al.*, 2017; Barreto-Vieira *et al.*, 2010; Sesso, 2007). Secções ultrafinas (30-60nm) foram obtidas com uso de uma navalha de diamante (DiATOME) acoplada ao ultramicrotomo (Reichert-Jung), contrastadas com acetato de uranila 2% em etanol e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e analisadas nos microscópios eletrônicos de transmissão Jeol JEM 1011, Hitachi HT7800 e FEI Titan 80–300. da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth/IOC/Fiocruz e da Plataforma Nacional de Bioimageamento/CENABIO da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Núcleo de Laboratórios de Microscopia, Instituto Nacional de

Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). respectivamente. No microscópio FEI Titan as imagens foram coletadas no modo de microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM) usando um detector de campo escuro anular de alto ângulo (HAADF) trabalhando em alta tensão de 80 kV, ângulo de convergência de 19 mrad e tamanho de sonda em torno de 0,1 nm, feixe de 100 pA corrente, tempo de permanência de 2 a 8 μ s e 2048 \times 2048 pixels por imagem.

3.9 Processamento das monocamadas celulares para análises por MEV

As monocamadas celulares foram cultivadas em lamínulas redondas de 13mm e a infecção ocorreu como descrito no item 3.3. Dado os tempos de cinética pré-determinados, as monocamadas celulares foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Na sequência as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M em sacarose 7% e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 2% por quatro horas em geladeira a 4°C. A desidratação das células se deu por banhos de etanol em concentrações crescentes. As células desidratadas foram submetidas ao ponto crítico para serem estabilizadas e ao evaporador de carvão para que fosse depositada sobre monocamada uma película de 15 nm de carbono para uma melhor condução do feixe de hélio. As células foram analisadas em um microscópio Orion NanoFab Hélio Ion (Zeiss, Baden-Württemberg, Oberkochen, Alemanha), do Núcleo de Laboratórios de Microscopia, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), equipado com uma pistola de inundação e um detector de elétrons secundários Everhart-Thornley, a pistola de inundação é usada para permitir a análise das células sem qualquer revestimento condutor. As imagens foram coletadas em alta tensão de 30 kV, cerca de 0,8 pA de corrente de feixe, média de 32 até 256 linhas, tempo de permanência de 1 μ s, tempo de inundação de 100 μ s e 2048 \times 2048 pixels por imagem.

3.10 Reconstrução tridimensional de células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2

A aquisição da imagem FIB-SEM foi realizada com um microscópio eletrônico de feixe cruzado Zeiss Auriga (Zeiss, Baden-Württemberg, Oberkochen, Alemanha). A amostra (bloco) embutida em epóxido de células Vero-E6 48h pi com SARS-CoV-2 preparada para TEM conforme descrito acima foi montada em um stub de suporte, revestida com uma camada de ouro de 10 nm e transferida para a câmara do microscópio. A amostra foi inclinada 54° em direção à coluna de íons para que a superfície do bloco fosse orientada perpendicularmente ao feixe de íons Ga⁺. A área de interesse foi exposta por fresagem FIB de uma vala em forma de U. As condições de moagem foram tensão de aceleração de 30 kV e uma corrente de feixe de 16 nA (para moagem grossa) e 2 nA para polimento. O fatiamento de FIB foi realizado a 20 nm de espessura com uma corrente de feixe de íons de 1 nA. A imagem da superfície do bloco foi realizada em 1.

As séries de imagens foram alinhadas e as estruturas de interesse foram segmentadas manualmente para a produção de modelos 3D utilizando o software open source IMOD. (Kremer *et al.*, 1996).

3.11 Imunofluorescência para detecção da proteína S

Células Vero-E6 cultivadas em lamínulas e infectadas com SARS-CoV-2 com MOI 0,01 foram fixadas com 48 e 72h de infecção com formaldeído a 3,7%. Na sequência, elas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,1 mM CaCl₂ e 1 mM MgCl₂ (PBS/CM) e permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 mais 0,2% BSA em PBS/CM durante 10 minutos (PBS/CM/TBSA). As células foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-*spike* (#56578 - NOVUSBIO) em uma diluição de 1:250 por uma noite e incubadas com anticorpo de um coelho anti-IgG-Dylight a uma diluição de 1:1000 por 1h. Para marcação dos núcleos, as células foram incubadas por 5 minutos em DAPI (1µg/mL). A análise de deu por microscopia de fluorescência com uma lente objetiva de 100x (Olympus, Tóquio, Japão) (Dias *et al.*, 2020).

3.12. Análise estatística

Os dados gerados foram analisados pelo programa Past (Hammer *et al.*, 2001). e os gráficos feitos por Excel. A determinação da significância entre os diferentes grupos experimentais foi realizada pela média e erro padrão a partir do teste ANOVA com pós teste Tukey. Ressaltamos que todos os experimentos foram realizados ao menos três vezes com replicatas técnicas. Intervalo de confiança de 95%, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. *

4 RESULTADOS

4.1 Morfologia e morfogênese de SARS-CoV-2 em células Vero-E6

Revista: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Resumo

Os coronavírus (CoVs) chamaram a atenção do mundo por causar surtos de síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), na Ásia em 2002-03, e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), em 2012. Em dezembro 2019, mais uma vez, um novo coronavírus (SARS-CoV-2) identificado pela primeira vez em Wuhan, China, foi associado a uma infecção respiratória grave, conhecida hoje como COVID-19. Este novo vírus se espalhou rapidamente pela China e mais 30 países. Como resultado, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elevou o status do surto de COVID-19 de emergência de preocupação internacional para pandemia em 11 de março de 2020. O impacto da COVID-19 na saúde pública e na economia alimentou uma corrida mundial para aprovar um tratamento terapêutico e agentes profiláticos, porém, até o presente momento, o desenvolvimento de sistemas *in vitro* para produção de massa viral e para testes de candidatos a antivirais é uma questão urgente. O objetivo deste trabalho é estudar a morfogênese do SARS-CoV-2 em células Vero-E6 em nível ultraestrutural. Neste estudo, documentamos, por microscopia eletrônica de transmissão e transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), a infecção de células Vero-E6 com amostras de SARS-CoV-2 isoladas de pacientes brasileiros. As células infectadas apresentaram efeito citopático e partículas de SARS-CoV-2 foram observadas aderidas à superfície celular e no lúmen de vesículas citoplasmáticas. A entrada do vírus nas células ocorreu pela via endocítica ou pela fusão do envelope viral com a membrana celular. Nucleocapsídeos foram observados dentro de cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER). A maturação viral parece ocorrer por brotamento das partículas virais do RER para o lúmen de vesículas de membrana lisa. Neste estudo, a suscetibilidade e permissividade das células Vero-E6 à infecção por SARS-CoV-2 foi demonstrada através de análises ultraestruturais.

Morphology and morphogenesis of SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells

Debora Ferreira Barreto-Vieira^{1/+}, Marcos Alexandre Nunes da Silva¹,
Cristiana Couto Garcia², Milene Dias Miranda², Aline da Rocha Matos², Braulia Costa Caetano²,
Paola Cristina Resende², Fernando Couto Motta², Marilda Mendonça Siqueira²,
Wendell Girard-Dias³, Bráulio Soares Archanjo⁴, Ortrud Monika Barth¹

¹Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Plataforma de Microscopia Eletrônica Rüdolph Barth, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Núcleo de Laboratórios de Microscopia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

BACKGROUND The coronaviruses (CoVs) called the attention of the world for causing outbreaks of severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV), in Asia in 2002-03, and respiratory disease in the Middle East (MERS-CoV), in 2012. In December 2019, yet again a new coronavirus (SARS-CoV-2) first identified in Wuhan, China, was associated with a severe respiratory infection, known today as COVID-19. This new virus quickly spread throughout China and 30 additional countries. As result, the World Health Organization (WHO) elevated the status of the COVID-19 outbreak from emergency of international concern to pandemic on March 11, 2020. The impact of COVID-19 on public health and economy fueled a worldwide race to approve therapeutic and prophylactic agents, but so far, there are no specific antiviral drugs or vaccines available. In current scenario, the development of *in vitro* systems for viral mass production and for testing antiviral and vaccine candidates proves to be an urgent matter.

OBJECTIVE The objective of this paper is study the biology of SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells at the ultrastructural level.

METHODS In this study, we documented, by transmission electron microscopy and real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the infection of Vero-E6 cells with SARS-CoV-2 samples isolated from Brazilian patients.

FINDINGS The infected cells presented cytopathic effects and SARS-CoV-2 particles were observed attached to the cell surface and inside cytoplasmic vesicles. The entry of the virus into cells occurred through the endocytic pathway or by fusion of the viral envelope with the cell membrane. Assembled nucleocapsids were verified inside rough endoplasmic reticulum cisterns (RER). Viral maturation seemed to occur by budding of viral particles from the RER into smooth membrane vesicles.

MAIN CONCLUSIONS Therefore, the susceptibility of Vero-E6 cells to SARS-CoV-2 infection and the viral pathway inside the cells were demonstrated by ultrastructural analysis.

Key words: SARS-CoV-2 - Vero-E6 cells - morphology - morphogenesis

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) presents a clinical spectrum ranging from asymptomatic individuals to more complex conditions such as severe acute respiratory syndrome. Although most patients have mild symptoms and good prognosis, an estimate 10-20% of individuals developed the severe forms of illness, and 2-5% may die due complications in multiple organs. The pathogenesis of the disease related to the severe acute respiratory syndrome of coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in humans is still unclear.⁽¹⁾ Among patients with pneumonia, fever was the most common symptom, followed by cough.⁽²⁾ Bilateral pulmonary involvement was the most common finding from chest computed tomography.⁽³⁾ Dissemination of SARS-CoV-2 occurs mainly by person-to-person transmission, through contact with respiratory fluids. It is estimated that the infection has an average incubation period of six days.

COVID-19 was first identified in Wuhan, Hubei Province, Republic of China, on December 1st, 2019, but the initial reports only came out on December 31st of the same year. Since the early stages of the epidemics, several evidences have pointed to a probable zoonotic origin for SARS-CoV-2, in particular, the initial observation that first cluster of infections was linked to a seafood and live animal wholesale market. Since its isolation from Wuhan samples in January 2020,⁽⁴⁾ SARV-CoV-2 has quickly spread in China and many other countries.^(5,6,7,8,9,10) On January 30th 2020, the World Health Organization (WHO) declared COVID-19 as the sixth public health emergency of international concern and, on March 11th 2020, raised the classification of SARS-CoV-2 outbreak to pandemic. By the time of the WHO announcement, more than 118,000 people had already been infected in 114 countries.⁽¹¹⁾

SARS-CoV-2 is an enveloped, positive-sense RNA virus belonging to genus Betacoronavirus.^(4,12,13) Phylogenetic analysis revealed that SARS-CoV-2 is closely related (88-89% similarity) to SARS-like coronaviruses from bats, such as bat-SL-CoVZC45 (GenBank no. MG772933.1) and bat-SL-CoVZXC21 (GenBank no. MG772934.1), and shares lower similarity to SARS-CoV (~79% similarity) and MERS-CoV (~50% similarity).^(4,14,15) SARS-CoV-2 virions (infectious particles) have a

doi: 10.1590/0074-02760200443

Corresponding author: barreto@ioc.fiocruz.br

http://orcid.org/0000-0003-0094-9999

Received 30 August 2020

Accepted 04 January 2021



online | memorias.ioc.fiocruz.br

diameter of approximately 50 to 200 nm. Like in other coronaviruses, the SARS-CoV-2 lipid envelope contains a spike protein (S), a membrane protein (M) and an envelope protein (E). The S protein mediates viral binding to the host cell membrane through interaction with the angiotensin conversion enzyme (ACE2) receptor.⁽¹⁶⁾ The nucleocapsid protein (N) forms the virion core, which encases the viral RNA genome.^(7,17) Currently there are no specific antiviral drugs or vaccines for treating and preventing COVID-19. There are, though, several candidates in different stages of development, with few recently reaching the phases of clinical testing. Standardised *in vitro* systems for viral mass production and infection modeling are essential tools to accelerate the initial steps of drug development, screening and pre-clinical testing. In this sense, several research groups have demonstrated the susceptibility of different cell lines to SARS-CoV-2 through molecular techniques.^(18,19,20) However, studies regarding the morphogenesis of SARS-CoV-2 in cell lineages are scarce in the literature so far. Here, we used a lineage of African green monkey kidney cells (Vero-E6) to isolate SARS-CoV-2 viruses from samples of nasopharyngeal swabs of patients positive for COVID-19. Using transmission electron microscopy, we were able to document the morphology and replication cycle of SARS-CoV-2, and the consequent ultrastructural alterations induced in the host cells.

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples - Nasopharyngeal swabs were collected from patients admitted to the sentinel health units of the national surveillance network for respiratory of the Brazilian Ministry of Health (MoH). Samples were obtained in different regions of the country and referred to the National Influenza Centre (NIC) at Fiocruz, Rio de Janeiro, for SARS-CoV-2 detection, as part of the COVID-19 surveillance program. Total RNA was extracted from clinical samples using the QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen). Viral detection was done by real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with TaqMan primers and probes (IDT) specific for the genes encoding the Envelope protein (E) and the viral RNA-dependent RNA Polymerase (RdRp), as described previously.⁽²¹⁾ Reactions were performed with the Qiagen One Step RT-PCR kit (Qiagen, USA). Synthetic RNA sequences corresponding to E and RdRp targets⁽²¹⁾ were used as positive controls. Positive samples were then used for SARS-CoV-2 isolation in Vero-E6 cells. This research is approved by the Ethics Committee of Instituto Oswaldo Cruz (protocol number 2453470).

Cells and viral isolation - All cell culture reagents were acquired from Gibco. Prior to infection, Vero-E6 (African green monkey kidney) cultures were maintained in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and 100U/mL of penicillin-streptomycin (1x Pen-Strep) and cultured at 37°C and 5% CO₂ (Szretter et al.⁽²²⁾). For infection, monolayers were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and inoculated with a clinical sample diluted in non-supplemented DMEM. Non-infected control cultures (mock) were prepared using pure non-supplemented DMEM as in-

oculum. After incubation for 1 h at 37°C, the viral (and mock) inoculum was removed and cells were cultivated at 37°C in DMEM supplemented with 2% FBS and 1x Pen-Strep. Monolayers were inspected daily under light microscope for development of cytopathic effect (CPE), until 72 h post infection (hpi). All procedures were performed in a biosafety level 3 laboratory, according to WHO guidelines. Whole-genome sequences of isolates evaluated in this study are available in the Global initiative on sharing all influenza data (GISAID) under the accession numbers EPI_ISL_415105, EPI_ISL_414045 e EPI_ISL_427294 (<https://www.gisaid.org/>).

Viral quantification in cell cultures supernatants - Viral quantities in cultures were estimated by determination of the number of copies of the viral gene E per volume (µL) of supernatant. Total RNA was extracted from culture supernatants using the QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen). Quantification of E gene copies was performed by real time RT-PCR using specific TaqMan primers and probes⁽²¹⁾ and the Qiagen one step RT-PCR kit (Qiagen, USA). A standard curve was set using a synthetic RNA control containing the sequence of E gene. The control, with initial concentration from 10⁸ copies/µL, was serially diluted (with factor 10) to obtain a series of 10⁷ copies/µL to 10 copies/µL.

Transmission and high resolution scanning electron microscopies - For analyses in electron transmission microscopy the infected and non-infected control (mock) monolayers were trypsinised at 24, 48 and 72 hpi. Cell suspensions were fixed in 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodilate buffer (0.2 M, pH 7.2), post-fixed in 1% buffered osmium tetroxide, dehydrated in acetone, embedded in epoxy resin and polymerised at 60°C over the course of three days.^(23,24) Ultrathin sections (50-70 nm) were obtained from the resin blocks. The sections were picked up using copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate,⁽²⁵⁾ and observed using Jeol JEM 1011, FEI Titan, FEI Tecnai Spirit, Hitachi HT 7800 transmission electron microscopes. For analyses in high resolution scanning microscopy, infected and non-infected control (mock) monolayers were grown on sterile glass coverslips and fixed at 24, 48 and 72 hpi, in 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodilate buffer (0.2 M, pH 7.2), dehydrated in ethanol and submitted to critical-point-dried. The cells were analysed in Orion NanoFab Helium Ion Microscope.

RESULTS

SARS-CoV-2 quantification from Vero-E6 cell culture supernatants - To evaluate the ability of Vero-E6 cells to produce SARS-CoV-2 progeny, we quantified the number of copies of virus RNA in cell culture supernatants collected one and 72 hpi. The quantitative real time RT-PCR assay demonstrated an increase in the amount of SARS-CoV-2 RNA copies in the supernatant at least two log₁₀ steps within 72 hpi (Table), suggesting production of viral progeny.

Morphological analysis of Vero-E6 cell cultures infected with SARS-CoV-2 - Analysis of cultures under inverted light microscopy demonstrated CPE in infected

TABLE
Virus RNA quantification (copies/mL)

Virus isolate	1 hpi (inoculum)	72 hpi (virus growth)
EPI_ISL_415105	1,2 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁷
EPI_ISL_414045	1,3 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁷
EPI_ISL_427294	4,7 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁷

hpi: hours post infection.

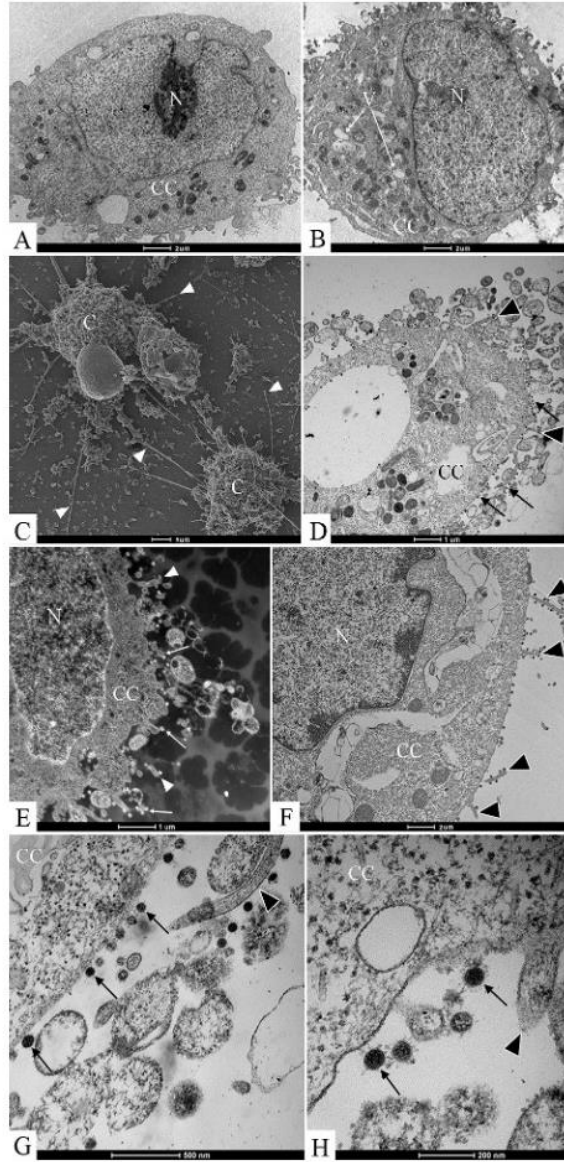


Fig. 1: ultrastructural analyses of Vero-E6 cells by electron microscopy. (A) Uninfected cell presenting no morphological alterations. (B-H) Vero-E6 cell, 72 h post infection (hpi) with severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2), presenting numerous filopodia (head arrow) and vesicles (V). SARS-CoV-2 particles (arrow), nucleus (N), cell cytoplasm (CC).

Vero-E6, which was mostly evident from 48 hpi. The CPE appeared as rounding and detaching of cells and formation of syncytia (data not shown).

Ultrastructural analyses of Vero-E6 cells at 72 hpi by transmission electron microscopy showed that the predominant changes associated to SARS-CoV-2 infection were, as follows: cell activation evidencing strong filopodia presence (Fig. 1B-H), alteration and degenera-

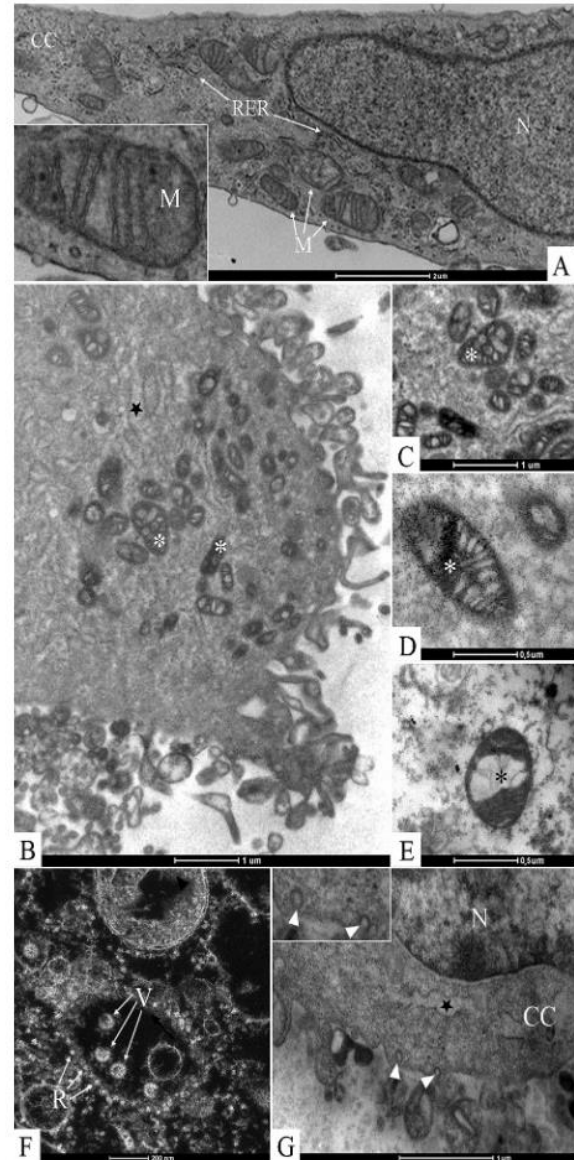


Fig. 2: ultrastructural alterations in Vero-E6 72 h post infection (hpi) with severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2). (A) Uninfected cell presenting no morphological alterations in mitochondria and in rough endoplasmic reticulum cistern (RER). (B-E) Alterations and degeneration of mitochondria (*). (F) Rough endoplasmic reticulum cistern with more electron-dense ribosomes. (B, G) Thickening of the rough endoplasmic reticulum cistern (star). (G) Presence of clathrin-coated vesicles (arrow heads, inset). Nucleus (N), cell cytoplasm (CC).

tion of mitochondria (Fig. 2B-E), an increased number of more electron-dense ribosomes (Fig. 2F), thickening of the nuclear membrane (data not shown) and RER (Fig. 2B, G), presence of clathrin-coated vesicles (Fig. 2G), smooth vesicle proliferation resulting in a severe vacuolisation of the cells (Fig. 3A-D), numerous myelin figures (Fig. 3E), and chromatin profile change in the nucleus (Fig. 4A-C). As compared with the infected cells, no ultrastructural changes were observed in the uninfected Vero cells (Fig. 1A).

Virus particles attached to the cell surface (Fig. 5A-B, E) and envelopes fusing with the cell membrane (Fig. 5B) could be observed. Entry of the SARS-CoV-2 virus particles into the cells was observed through fusion of the virus envelope with the cell membrane (Fig. 5B) or by endocytosis (Fig. 5A, C, D). Nucleocapsids were observed inside in the swollen RER (Fig. 5E). The thickened ribosomes attached to the RER membrane were present at few numbers or disappeared completely (Fig. 5E). Nucleocapsids were rarely observed associated with the nucleus membrane (Fig. 4D). Several virions attached to cell filopodia (Fig. 6A-B) and inside smooth vesicles at the periphery of the cell were observed (Fig. 6C). Smooth vesicles with virions inside with membrane fused with membrane cell were observed, too (Fig. 6D).

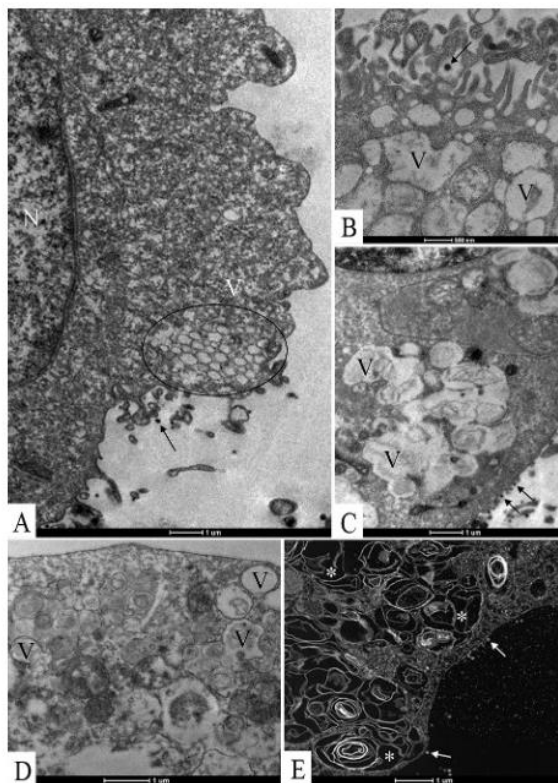


Fig. 3: intense smooth vesicle proliferation (V) in Vero-E6 72 h post infection (hpi) with severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2). (A-D) Vesicle (V) proliferation. Virus particle (B, arrow), nucleus (N). (E) Cell cytoplasm presenting numerous myelin figures (concentric membrane arrays) (*).

Virus particles presented spherical morphology displaying spikes on its surface (Fig. 6E-F), characteristic of viruses belonging to the *Coronaviridae* family and have a diameter between 80 and 100 nm.

DISCUSSION

In the present study, using different parameters, we were able to show that Vero-E6 cells are highly permissive to SARS-CoV-2 replication. We observed a logarithmic increase in the number of viral RNA copies in cell culture supernatants, the display of a characteristic cytopathic effect in cell monolayers, and profound alterations in cell ultrastructure, as well as accumulation of viral components and viral particles in different cell compartments and times after infection. These data corroborate those of Park et al.⁽¹⁸⁾ and Harcourt et al.⁽¹⁹⁾ that described the susceptibility of this cell lineage for SARS-CoV-2 infection. These authors suggest that Vero-E6 cells might be the best choice for amplification and quantification of the virus. Transmission electron microscopy showed that the predominant changes associated to SARS-CoV-2 infection were cell activation, alteration of mitochondria, thickening of the RER and smooth vesicle proliferation, resulting in a severe vacuolisation of the cells. Our findings are corroborated by the studies carried out by Qinfen et al.⁽²⁶⁾ with SARS-CoV, which also observed that, as the infection progresses, the smooth vesicles increased both in number and size. However, while these authors concluded that the smooth vesicles were derived from the Golgi apparatus, our results suggest that they may be related to the RER.

To our knowledge, this is the first ultrastructural characterisation of the morphogenesis of SARS-CoV-2 during viral replication in a cellular model. Our analysis

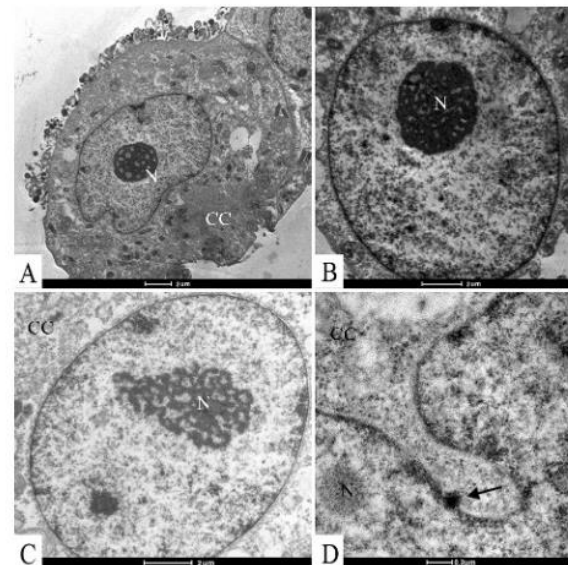


Fig. 4: (A-C) alterations of the nucleus (N) chromatin profile in Vero-E6 72 h post infection (hpi) with severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2). (D) Viral nucleocapsid associated with the nucleus membrane (arrow). Cell cytoplasm (CC).

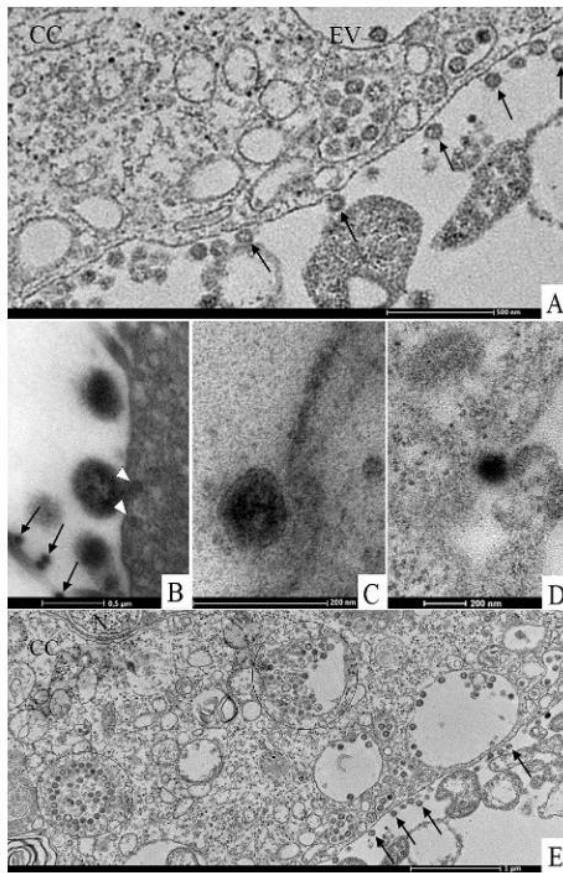


Fig. 5: attachment and entry of severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2) in Ver0-E6 cells 72 h postinfection (hpi). (A, B, E) Several virus particles (arrows) attached to cell membranes were observed. (C, D) Entry of virus particles into cells by the endocytic pathway and by fusion of virus envelopes with cell membranes (head arrows) (B). (E) Nucleocapsids inside swollen rough endoplasmic reticulum cistern (circles). Cell cytoplasm (CC), endocytic vesicles (EV), nucleus (N).

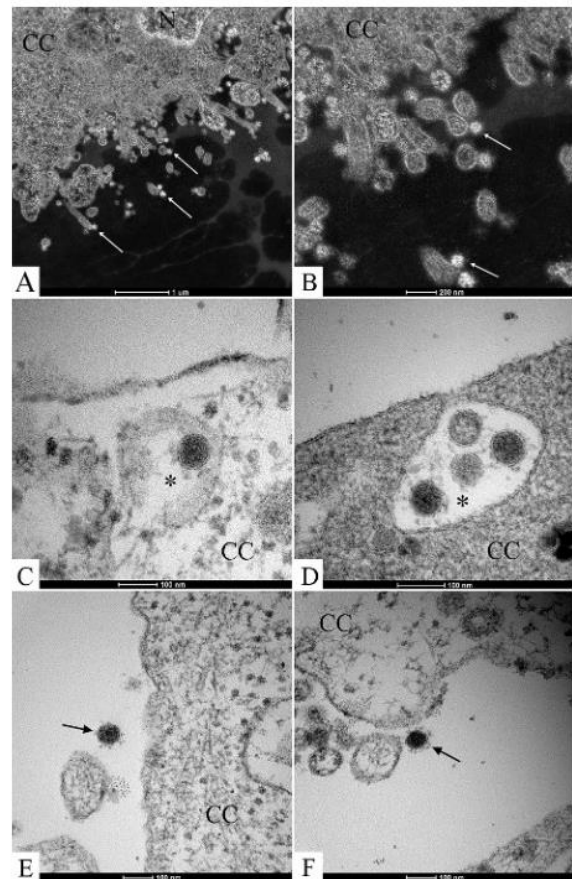


Fig. 6: release of severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2) in Ver0-E6 cells 72 h post infection (hpi). (A-E) Virions (arrow) attached to cell filopodia (arrow) and inside smooth vesicles (asterisk) at the periphery of the cell and with your membrane fused with membrane cell were observed. (E-F) Virus particles presenting spherical morphology, displaying spikes, and a diameter between 80 and 100 nm. Cell cytoplasm (CC), nucleus (N).

suggests that viral entry into the host cell could occur either by endocytosis or by fusion of the viral envelope with the cell membrane. This is consistent with information from literature, in which we could find studies supporting both mechanisms.^(26,27,28) Nucleocapsids were observed inside RER cisterns, which presented thickening with a dense electron matrix and gradual loss of ribosomes; more electron-dense ribosomes were also observed. This indicates that part of the SARS-CoV-2 protein synthesis and assembly may occur in the RER. Studies conducted by Zhang et al.⁽²⁹⁾ and Qinfen et al.⁽²⁶⁾ pointed that the core of SARS-CoV is initially assembled in the RER, where the N protein binds to the genomic RNA and forms the nucleocapsid. The RER gradually loses the ribosomes and swells to become the matrix vesicles that contain the viruses. Qinfen et al.⁽²⁶⁾ observed SARS-CoV-like particles in the nucleus of Ver0-E6 cells at 48 hpi. Moreover, the nucleic membrane, being in connection with the RER, swelled to form blebs that contained nucleocapsids. These blebs were seen to

detach from the nucleic membrane and turn into the virus morphogenesis matrix vesicles.

The presence of virions exclusively inside cytoplasmic smooth vesicles indicates that the particles acquire their envelopes are delivered by budding from the RER directly into smooth vesicles. This process is consistent with those observed with other coronaviruses. Qinfen et al.⁽²⁶⁾ demonstrated that the SARS-CoV viral nucleocapsids sprout during morphogenesis from matrix vesicles into these smooth vesicles. In the last step of viral morphogenesis, we observed the virion filled smooth vesicles accumulating in the periphery of the cytoplasm, close to the cell membrane. Subsequent release of viral progeny occurred through the fusion of smooth vesicles with the cell membrane. Similar release mechanisms were described for SARS-CoV, which was also shown to accumulate inside smooth vesicles that move to the cell periphery and eventually fuse with the cell membrane.⁽²⁶⁾ The mature SARS-CoV-2 virions had a spherical morphology, a diameter between 80 and 100

nm, and presented the characteristic spikes on the envelopes, which is the signature morphological feature of the coronaviruses. Again, our findings are very consistent with previous *in vitro* studies with SARS-CoV⁽²⁶⁾ and SARS-CoV-2, although the last one was reported to present some pleomorphism, and a wider range of virion diameter that varied from 50 to 200 nm.^(7,13,17,18)

Further immunomicroscopy and tomography studies are needed to get a better design of the SARS-CoV-2 replication cycle, to better understand the role of the core of SARS-CoV-2 synthesis. The data presented in the present study are important for use in the development of model systems to evaluate therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Suzana Corte Real (Rudolph Barth Microscopy Platform, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz), NB3 Platform (Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz) and CENABIO, Federal University of Rio de Janeiro.

AUTHORS' CONTRIBUTION

DFB-V - Conceptualization, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, writing - original draft, writing - review and editing; MANS - methodology, writing - review and editing; CCG, MDM, ARM, BCC, PCR and FCM - formal analysis, investigation, methodology, writing - review and editing; MMS - funding acquisition, formal analysis, investigation, methodology, writing - review and editing; WG-D and BSA - methodology; OMB - writing - review and editing.

REFERENCES

- Lin L, Lianfeng Lu, Wei Cao, Taisheng Li. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection - a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9(1): 727-32.
- Sun P, Qie S, Liu Z, Ren J, Li K, Xi J. Clinical characteristics of 50466 hospitalized patients with 2019-nCoV infection. *J Med Virol.* 2020; 92(7): 716-8.
- Lai CC, Tzu-Ping S, Wen-ChienKo HJ, Po-RenHsueh. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 55(3): 105924.
- Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan China: the mystery and the miracle. *J Med Virol.* 2020; 92(4): 401-02.
- Li Q, Xuhua G, Peng W, Xiaoye W, Lei Z, Yeqing T, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med.* 2020; 382(13): 1199-207.
- Gorbalenya AE, Susan CB, Ralph SB, Raoul JG, Christian D, Anastasia AG, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses - a statement of the Coronavirus study. *Nat Microbiol.* 2020; 5: 536-44.
- Chen N, Min Z, Xuan D, Jieming Q, Fengyun G, Yang H, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020; 395: 507-13.
- Huang C, Yeming W, Xingwang L, Lili R, Jianping Z, Yi H, Li Z, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395: 497-506.
- Wang CPW, Horby FG, Hayden GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet.* 2020; 395: 470-3.
- Holshue ML, DeBolt C, Scott L, Kathy HL, John W, Hollianne B, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N Engl J Med.* 2020; 382(10): 929-36.
- WHO - World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID 19) - Situation Report 51. 2020. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10.
- Chan JF, Kin-Hang K, Zheng Z, Hin C, Kai-Wang TK, Shuofeng Y, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9: 221-36.
- Zhu N, Dingyu Z, Wenling W, Xingwang L, Bo Y, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020; 382(8): 723-33.
- Jiang S, Du L, Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9: 275-7.
- Ren LL, Ye-Ming W, Zhi-Qiang W, Zi-Chun X, Li G, Teng X, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J(Engl).* 2020; 133(9): 1015-24.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020; 181(2): 271-80.e8.
- Wu C, Yang L, Yueying Y, Peng Z, Wu Z, Yali W, et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B.* 2020; 10(5): 766-88.
- Park WB, Kwon NJ, Choi SJ, Kang CK, Choe PG, Kim JY, et al. Virus isolation from the first patient with SARS-CoV-2 in Korea. *J Korean Med Sci.* 2020; 35(7): e84.
- Harcourt J, Tamin A, Lu X, Kamili S, Sakthivel SK, Murray J, et al. Severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 from patient with 2019 novel Coronavirus disease, United States. *Emerg Infect Dis.* 2020; 26(6): 1266-73.
- Kim JM, Chung YS, Jo HJ, Lee NJ, Kim MS, Woo SH, et al. Identification of Coronavirus isolated from a patient in Korea with COVID-19. *Osong Public Health Res Perspect.* 2020; 11(1): 3-7.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25(3): 1-8.
- Szretter KJ, Balish AL, Katz JM. Influenza: propagation, quantification, and storage. *Curr Protoc Microbiol.* 2006; Chapter 15: Unit 15G 1.
- Barreto-Vieira DF, Barth-Schatzmayr OM, Schatzmayr HG. Modelo animal experimental para o estudo da patogênese dos vírus dengue sorotipos 1 e 2. Manual de técnicas. Rio de Janeiro: Interciência; 2010. 82 pp.
- Barth OM, da Silva MAN, Barreto-Vieira DF. Low impact to fixed cell processing aiming transmission electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; 111(6): 411-3.
- Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963; 17: 208-12.
- Qinfen Z, Jinming C, Xiaojun H, Huanying Z, Jicheng H, Ling F, et al. The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J Med Virol.* 2004; 73(3): 332-7.
- Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, et al. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses.* 2019; 11(1): 59.
- Ng ML, Tan SH, See EE, Ooi EE, Ling AE. Early events of SARS coronavirus infection in Vero cells. *J Med Virol.* 2003; 71: 323-31.
- Zhang Q, Cui JM, Huang XJ, Lin W, Tan DY, Xu JW, et al. Morphology and morphogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS) - associated virus. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai).* 2003; 35(6): 587-91.

4.2 Artigo 2: SARS-CoV-2: Caracterização ultraestrutural da morfogênese em um sistema *in vitro*

Revista: Viruses (artigo submetido)

Resumo

A pandemia causada pelo novo coronavírus que promove síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) impactou a saúde pública e a economia mundial e alimentou uma corrida mundial para aprovar agentes terapêuticos e profiláticos, porém até o presente momento não existem medicamentos antivirais específicos. A compreensão da biologia do vírus é o primeiro passo na estruturação de estratégias para combatê-lo e, neste contexto, vários estudos foram conduzidos com o objetivo de compreender o mecanismo de replicação do SARS-CoV-2 em sistemas *in vitro*. Neste trabalho, foram realizados estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão e varredura e microscopia eletrônica de reconstrução 3D com o objetivo de caracterizar a morfogênese do SARS-CoV-2 em células Vero-E6. Foram observadas várias alterações ultraestruturais como a formação de sincícios, projeções de membrana citoplasmáticas, acúmulo de corpúsculos lipídicos, proliferação de vesículas de membrana dupla derivadas do retículo endoplasmático rugoso e alteração de mitocôndrias. A entrada do vírus nas células ocorreu através da endocitose. Foram observadas partículas virais ligadas à membrana celular e em vários compartimentos celulares, e a exocitose da progênie viral ocorreu através da exocitose. Estes achados nos permitem inferir que as células Vero-E6 são altamente suscetíveis à infecção pelo SARS-CoV-2 e seu ciclo de replicação é semelhante ao descrito nos modelos *in vitro* do SARS-CoV e MERS-CoV.

Article

SARS-CoV-2: Ultrastructural Characterization of Morphogenesis in an In Vitro System

Debora Ferreira Barreto-Vieira ^{1,*}, Marcos Alexandre Nunes da Silva ¹, Ana Luisa Teixeira de Almeida ¹, Arthur da Costa Rasinhas ¹, Maria Eduarda Monteiro ², Milene Dias Miranda ², Fernando Couto Motta ², Marilda M. Siqueira ², Wendell Girard-Dias ³, Bráulio Soares Archanjo ⁴, Patricia T. Bozza ⁵, Thiago Moreno L. Souza ^{5,6}, Suelen Silva Gomes Dias ⁵, Vinicius Cardoso Soares ^{5,7} and Ortrud Monika Barth ¹



Citation: Barreto-Vieira, D.F.; da Silva, M.A.N.; de Almeida, A.L.T.; Rasinhas, A.d.C.; Monteiro, M.E.; Miranda, M.D.; Motta, F.C.; Siqueira, M.M.; Girard-Dias, W.; Archanjo, B.S.; et al. SARS-CoV-2: Ultrastructural Characterization of Morphogenesis in an In Vitro System. *Viruses* **2022**, *14*, 201. <https://doi.org/10.3390/v14020201>

Academic Editors: Conchetta Castilletti, Luisa Barzon and Francesca Colavita

Received: 18 October 2021

Accepted: 12 January 2022

Published: 20 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil; marquinhosans@gmail.com (M.A.N.d.S.); analuisaprovoc2012@gmail.com (A.L.T.d.A.); tukabr@gmail.com (A.d.C.R.); barth@ioc.fiocruz.br (O.M.B.)
 - ² Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil; monteiro.meduarda@gmail.com (M.E.M.); milenediasmiranda@gmail.com (M.D.M.); fercoutomotta@gmail.com (F.C.M.); marildams@gmail.com (M.M.S.)
 - ³ Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil; wendellbiom@gmail.com
 - ⁴ Núcleo de Laboratórios de Microscopia, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Rio de Janeiro 25250-020, RJ, Brazil; braulioarchanjo@gmail.com
 - ⁵ Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil; pbozza@gmail.com (P.T.B.); souzatml@gmail.com (T.M.L.S.); suelen.sgdias@gmail.com (S.S.G.D.); cardosodante42@gmail.com (V.C.S.)
 - ⁶ Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, National Institute for Science and Technology on Innovation on Diseases of Neglected Populations, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brazil
 - ⁷ Programa de Imunologia e Inflamação, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21941-901, RJ, Brazil
- * Correspondence: barreto@ioc.fiocruz.br

Abstract: The pandemic caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has impacted public health and the world economy and fueled a worldwide race to approve therapeutic and prophylactic agents, but so far there are no specific antiviral drugs. Understanding the biology of the virus is the first step in structuring strategies to combat it, and in this context several studies have been conducted with the aim of understanding the replication mechanism of SARS-CoV-2 in vitro systems. In this work, studies using transmission and scanning electron microscopy and 3D electron microscopy modeling were performed with the goal of characterizing the morphogenesis of SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells. Several ultrastructural changes were observed—such as syncytia formation, cytoplasmic membrane projections, lipid droplets accumulation, proliferation of double-membrane vesicles derived from the rough endoplasmic reticulum, and alteration of mitochondria. The entry of the virus into cells occurred through endocytosis. Viral particles were observed attached to the cell membrane and in various cellular compartments, and extrusion of viral progeny took place by exocytosis. These findings allow us to infer that Vero-E6 cells are highly susceptible to SARS-CoV-2 infection as described in the literature and their replication cycle is similar to that described with SARS-CoV and MERS-CoV in vitro models.

Keywords: SARS-CoV-2; Vero-E6 cells; ultrastructural studies; morphogenesis; transmission electron microscopy; scanning electron microscopy; 3D electron microscopy modeling

1. Introduction

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), that is the causative agent of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic [1], belongs to the *Coronaviridae* family (*Coronavirinae* subfamily) which includes four genera: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, and *Deltacoronavirus*. While *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* exclusively infect mammalian species, *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus* have a wider host range that includes avian species [1,2]. The SARS-CoV-2 is grouped within the *Betacoronavirus* genus together with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) and SARS-CoV, which are both also highly pathogenic, and HCoV-HKU1, HCoV-OC43, which causes seasonal and usually mild respiratory tract infections.

Coronaviruses are enveloped with positive-sense single-stranded RNA genome of 26–32 kb and have the largest genomes among RNA viruses. Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 revealed that is closely related (88–89% similarity) to SARS-like coronaviruses from bats—such as bat-SL-CoVZC45 (GenBank no. MG772933.1) and bat-SL-CoVZXC21 (GenBank no. MG772934.1)—and shares lower identity to SARS-CoV (~79% similarity) and MERS-CoV (~50% similarity) [3–5].

In vitro studies on the morphogenesis of coronaviruses demonstrated that the attached of these viruses to the host cell occurs from the interaction of the virus Spike protein (S protein) with the cellular ACE-2 (angiotensin converting enzyme 2) receptor [6–8]. Internalization of the particle occurs by endocytosis or through fusion between virus envelope and cellular membrane [9]. In SARS-CoV and MERS-CoV, the first moment of replication occurs on virus-induced double-membrane structures derived from the rough endoplasmic reticulum (RER), commonly referred to as ‘double-membrane vesicles’ (DMVs), located mostly in perinuclear areas [7,10,11]. These structures are also generated by other RNA viruses, such as Arteriviruses, Picornaviruses, and the Flaviviruses of genus *Hepacivirus* [12,13]. Viral RNA filaments inside DMVs were observed in studies in vitro with SARS-CoV-2, associating these compartments with viral replication [14].

Viruses with positive-sense single-stranded RNA genome replicate in host cell cytoplasm and induce intracellular membranous compartments harboring the sites of viral RNA synthesis. These replication factories are supposed to concentrate the components of the replicase and to shield replication intermediates from the host cell innate immune defense [15].

Given the fact that there is no therapeutic treatment for SARS-CoV-2 to date, studies in vitro are needed to understand the mechanism of infection and the virus–cell interaction, as well as to design effective strategies to inhibit virus morphogenesis. In this case, electron microscopy becomes an indispensable tool of analysis. The development of effective intervention strategies relies on the knowledge of molecular and cellular mechanisms of coronavirus infections, which highlights the significance of studying virus–host interactions at the molecular level to identify targets for antiviral intervention and to elucidate critical viral and host determinants that are decisive for the development of severe disease [16].

Vero cells, which are widely used in virus studies and in the production of human vaccines, have been shown to be a relevant model for studies of coronaviruses including SARS-CoV, SARS-CoV-2, and MERS-CoV [17–23].

In this work, we characterize the replicative cycle of SARS-CoV-2 from Vero-E6 lineage cells infected with a human clinical sample, using transmission electron microscopy and helium ion microscopy.

2. Materials and Methods

2.1. Virus Sample

A SARS-CoV-2, lineage B.1.1, was isolated from the nasopharyngeal swab from Brazilian patient by the National Influenza Centre (NIC) at Fiocruz, Rio de Janeiro. Total RNA was extracted from clinical sample using the QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen North Rhine-Westphalia, Hilden, Germany). Viral detection was done by real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with TaqMan primers and probes (IDT) specific for the

genes encoding the Envelope protein (E) and the viral RNA-dependent RNA Polymerase (RdRp), as described previously [2]. Reactions were performed with the Qiagen One Step RT-PCR kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). Synthetic RNA sequences corresponding to E and RdRp targets [2] were used as positive controls. Putative coinfections in this sample were discarded by differential diagnosis analysis for other 17 respiratory viral pathogens and *Mycoplasma pneumoniae*, as described previously [24]. Whole-genome sequences of isolate evaluated in this study are available in the Global initiative on sharing all influenza data (GISAID) under the accession numbers EPI_ISL_415105. For the experiments, the virus was amplified in Vero-E6 cells (African green monkey kidney). Virus titers were calculated by the tissue culture infectious dose at 50% (TCID₅₀/mL) and the virus stocks kept in -80°C freezer. All procedures were performed in a biosafety level 3 laboratory, according to WHO guidelines. The access to the genetic patrimony of the virus isolated is registered in Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen ACCF49F). This research is approved by the Ethics Committee of Instituto Oswaldo Cruz (protocol number 2453470).

2.2. Cells and Virus Infection

Prior to infection, Vero-E6 cultures were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 U/mL of penicillin-streptomycin ($1\times$ Pen-Strep) and cultured at 37°C and 5% CO_2 [25]. All cell culture reagents were acquired from Gibco (Waltham, MA, USA). For infection, monolayers were washed twice with phosphate buffered saline (PBS), inoculated with multiplicity of infection of 0.01 diluted in non-supplemented DMEM and incubated for 1 h at 37°C for virus adsorption. After adsorption time, the inoculum was removed and cells were kept at 37°C in DMEM supplemented with 2% FBS and $1\times$ PenStrep. Non-infected control cultures (mock) were prepared using pure non-supplemented DMEM as infected cells. Monolayers were inspected daily under light microscope for observation of cytopathic effect (CPE), until 72 h post infection (pi). All procedures were performed in a biosafety level 3 laboratory, according to WHO guidelines.

2.3. Transmission Electron Microscopy (TEM) and Helium Ion Microscopy (HIM)

For transmission electron microscopy analysis, the infected and non-infected control (mock) monolayers of cells were trypsinized at 48 and 72 h pi. Cell suspensions were fixed in 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (0.2 M, pH 7.2), post-fixed in 1% buffered osmium tetroxide, dehydrated in acetone, embedded in epoxy resin, and polymerized at 60°C over the course of three days [26,27]. Ultrathin sections (50–70 nm) were obtained from the resin blocks. The sections were picked up using copper grids (300 mesh and no coating) and observed using Cs Corrected FEI Titan 80–300 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Hitachi HT 7800 (Hitachi, Tokyo, Japan) transmission electron microscopes. In the FEI Titan images were collected in scanning transmission electron microscopy (STEM) mode using a high-angle annular-dark field detector (HAADF) working at 80 kV high tension, 19 mrad convergence angle and probe size around 0.1 nm, 100 pA beam current, 2 up to 8 μs dwell time, and 2048×2048 pixels per image. For analysis in helium ion microscopy, infected and non-infected control (mock) monolayers were grown on sterile glass coverslips and fixed at 48 and 72 h pi, in 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (0.2 M, pH 7.2), dehydrated in ethanol and submitted to critical-point-drying. The cells were analyzed in an Orion NanoFab Helium Ion microscope (Zeiss, Baden-Württemberg, Oberkochen, Germany) equipped with a flood gun and an Everhart-Thornley secondary electrons detector, flood gun is used to allow analyzing the cells without any conductive coating. Images were collected at 30 kV high tension, around 0.8 pA beam current, 32 up to 256-line average, 1 μs dwell time, 100 μs flood gun time, and 2048×2048 pixels per image.

2.4. Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) and 3D Modeling

FIB-SEM image acquisition was carried out with a Zeiss Auriga crossbeam electron microscope (Zeiss, Baden-Württemberg, Oberkochen, Germany). The epoxide-embedded sample (block) of Vero-E6 cells 48h pi with SARS-CoV-2 prepared for TEM as described above was mounted on a support stub, coated with a 10 nm layer of gold and transferred to the microscope chamber. The sample was tilted 54° towards the ion column in order for the block surface to be oriented perpendicularly to the Ga⁺ ion beam. The area of interest was exposed by FIB milling of a U-shaped trench. Milling conditions were 30 kV acceleration voltage and a beam current of 16 nA (for coarse milling) and 2 nA for polishing. FIB slicing was performed at 20 nm thickness with an ion beam current of 1 nA. Imaging of the block surface was carried out at 1.8 kV using a backscattered electron detector and 5.4 nm pixel size.

The image series were aligned and the structures of interest were manually segmented for 3D models production using the open source software IMOD [28].

2.5. Measurement of Virus Particle Size

The images were collected in a Zeiss Orion Nanofab helium ion microscope. The particle size statistical analysis was performed using ImageJ software. Each virus particle was selected manually and deleted from the images, after thresholding images they were converted into binary and then only virus particles were selected and counted using the command particle analysis from the menu analysis. About 600 virus particles were analyzed and the average size and standard deviation were extracted.

2.6. Immunofluorescence Staining

The cells were stained as previously described [29,30]. In short, Vero-E6 cells were seeded in coverslips and after 48 and 72 h of infection, were fixed using 3.7% formaldehyde. Cells were rinsed three times with PBS containing 0.1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂ (PBS/CM) and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 plus 0.2% BSA in PBS/CM for 10 min (PBS/CM/TBSA). Cells were stained with rabbit polyclonal antibody anti-spike antibody (#56578—NOVUSBIO) at 1:250 dilution for overnight, followed by a rabbit anti-IgG Dylight 550 at 1:1000 dilution for 1 h. The coverslips were mounted in slides using an antifade mounting medium (VECTASHIELD®, Burlingame, CA, USA). Nuclear recognition was based on DAPI staining (1 µg/mL) for 5 min. Fluorescence was analyzed by fluorescence microscopy with an 100× objective lens (Olympus, Tokyo, Japan).

3. Results

Analysis of Vero-E6 cells infected with SARS-CoV-2 under inverted light microscopy demonstrated a CPE, that was mostly evident from 48 h pi. The CPE appeared as rounding and detaching of cells and formation of syncytia (data not shown).

3.1. Ultrastructural Cellular Change Caused by SARS-CoV-2 Infection

Morphological analysis of Vero-E6 cells at 48 and 72 h pi by using of MET and HIM showed changes associated to SARS-CoV-2 infection, including: (I) Cell activation—Cell activation was evidenced by a marked plasmatic membrane projection (filopodia and microvilli) (Figure 1B–F and Figure 2B–F), connection between adjacent cells mediated by these filopodia (Figure 1B–C, Figure 2B–D, and Figure 3B), viral particles associated with filopodia and microvilli (Figure 1B–F, Figure 2B–F, and Figure 3A) and to the cell membrane (Figure 1B–F and Figure 2B–F). Filopodia, as well as any changes in cell topography, were not observed in non-infected Vero-E6 cells at 48 (Figure 1A) or 72 h (Figure 2A) of cultivation. (II) Syncytia—Syncytial formation (multinucleated cells resulting from cell fusion) in Vero-E6 cells monolayer infected with SARS-CoV-2 were commonly observed as shown in the Figure 4A. (III) Lipid droplets (LD) accumulation (Figure 4B). (IV) Proliferation of double membrane vesicles (DMV). These vesicles were observed throughout the cytosol (Figure 4C). (V) Numerous myelin figures (Figure 4B,C). (VI) Thickening of

the RER (Figure 4D), increased number of more electron-dense ribosomes (Figure 4E), and mitochondrial swelling and vacuolation (Figure 4F) were also observed.

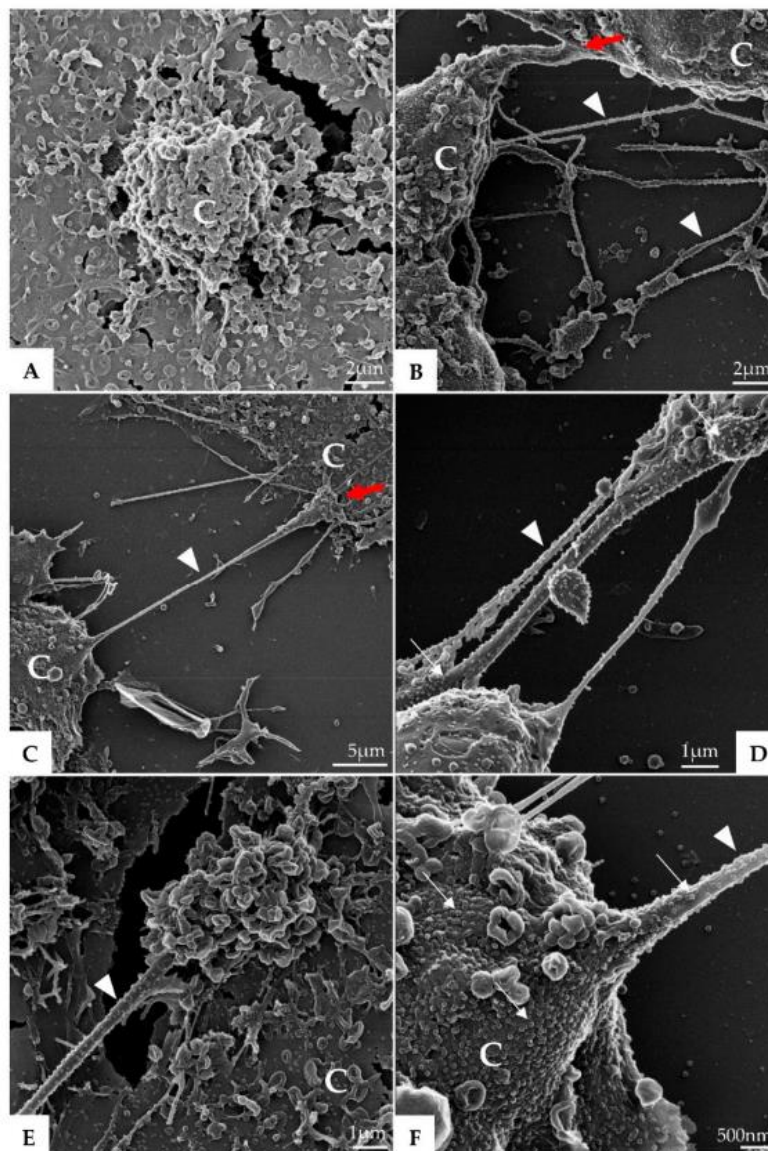


Figure 1. Vero-E6 cells 48 h post-infection with SARS-CoV-2 (HIM images). (A) Uninfected Vero-E6 cell at 48 h of cultivation (cell control). (B–F) Infected cells presenting filopodia (arrowhead); connection (red arrow) between adjacent cells mediated by filopodia was observed. Virus particles (thick arrow) attached to cell filopodia and with cell membrane were observed. Cell (C).

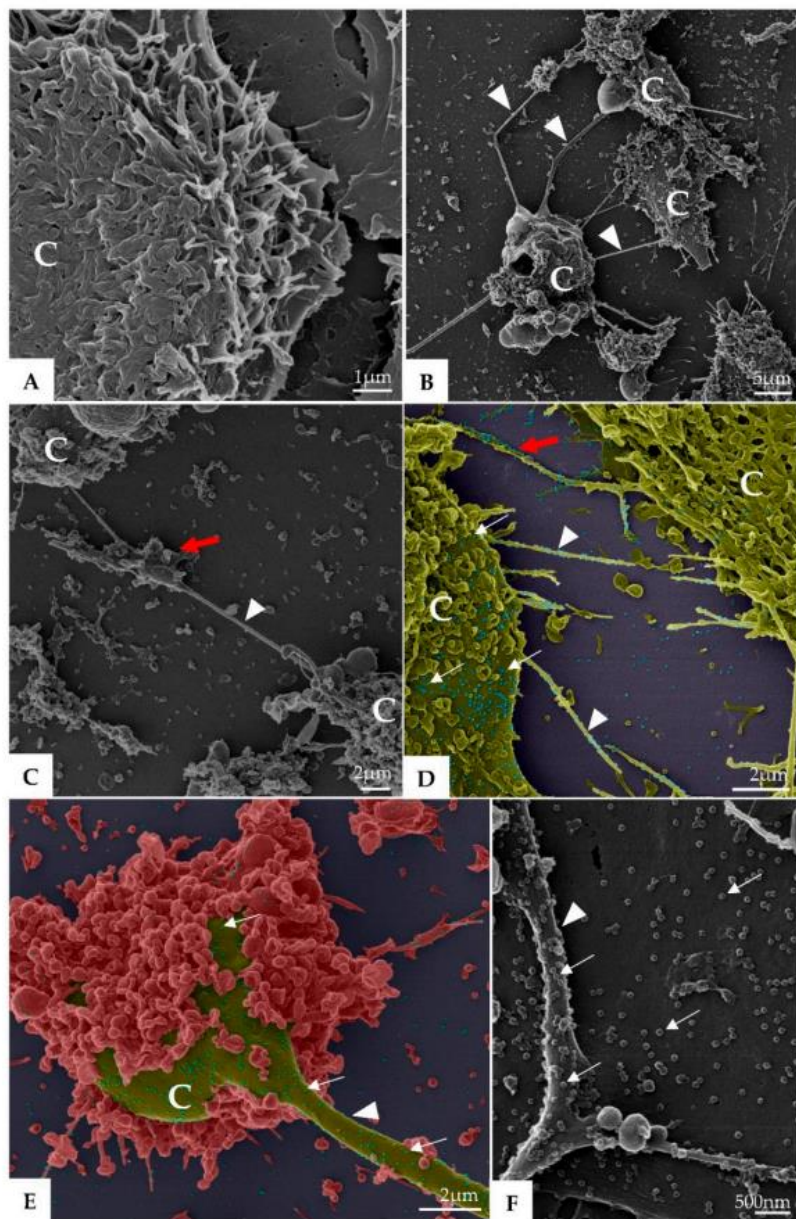


Figure 2. Vero-E6 cells 72 h post-infection with SARS-CoV-2 (HIM images). (A) Uninfected Vero-E6 cell at 72 h of cultivation (cell control). (B–E) Infected Vero-E6 monolayer, connection (red arrow) between cells mediated by filopodia was observed (B–D). Virus particles (thick arrow, blue structures) was detected attached to cell filopodia (green, image (D)) and with cell membrane (green or red, image (D–F)). Cell (C), filopodia (arrowhead). The images (D,E) were colored in Adobe photoshop.

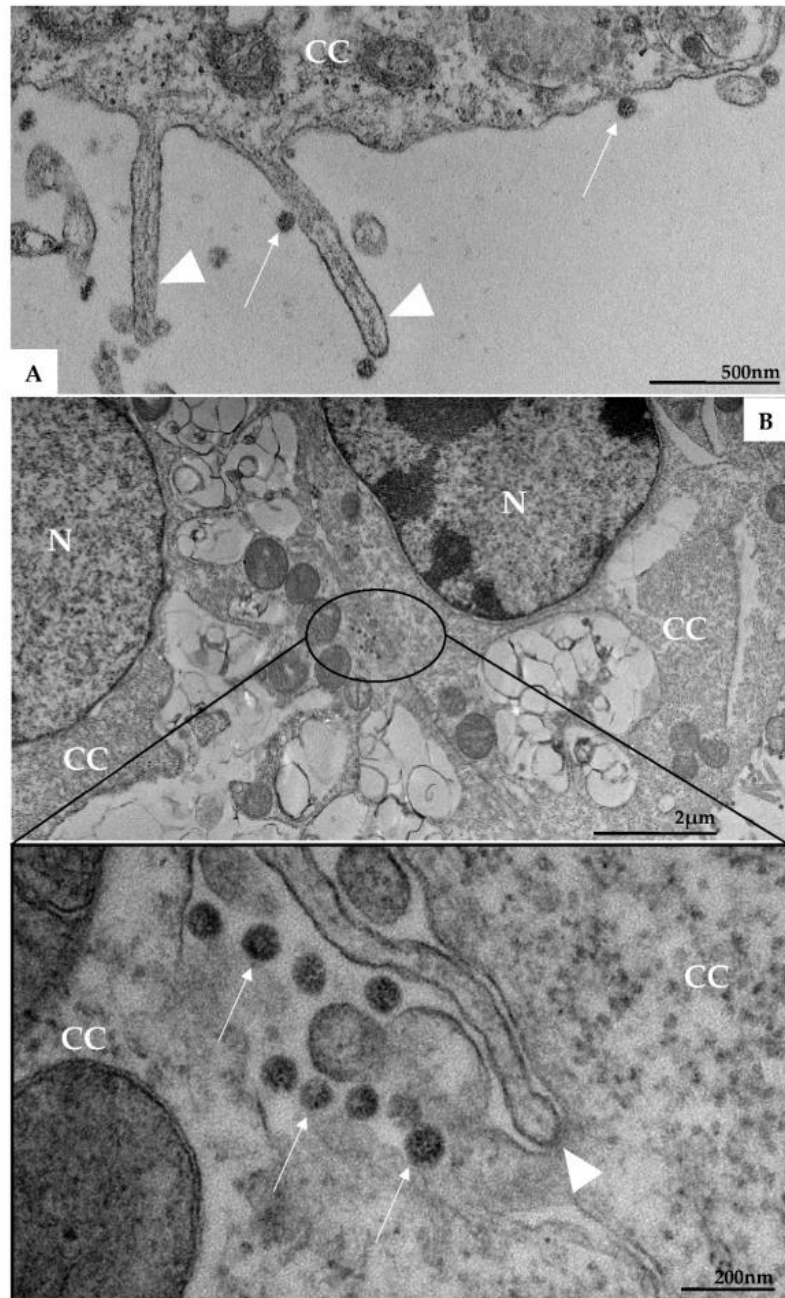


Figure 3. Microvilli in Vero-E6 cells 48 h post-infection with SARS-CoV-2 (TEM images). Microvilli (arrowhead) presenting adsorbed SARS-CoV-2 particles (thick arrow) (A). Interaction between adjacent cells mediated by Microvilli (B). Microvilli (arrowhead), cell cytoplasm (CC), nucleus (N).

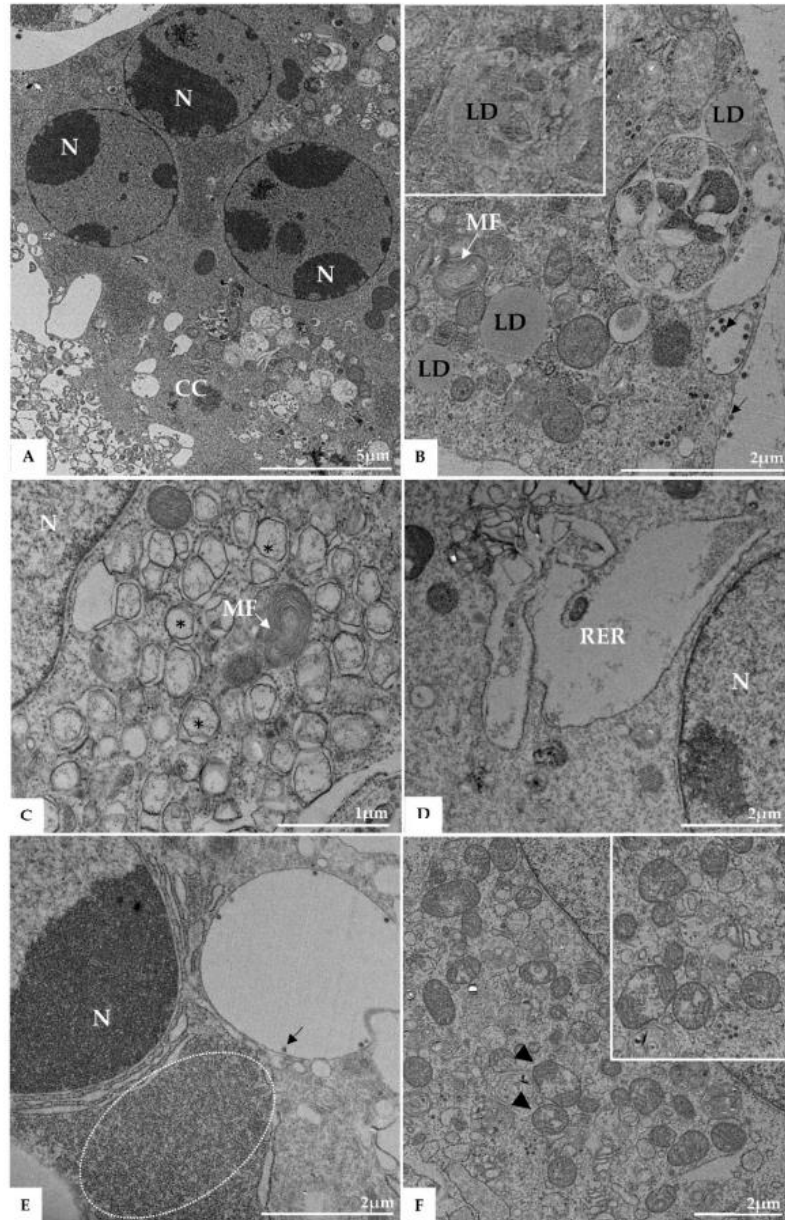


Figure 4. Syncytia formation (A), proliferation of lipid droplets (LD) (B), and double membrane vesicle (*) (C), myelin figures (MF) (B,C), thickening of the rough endoplasmic reticulum (RER) (D), electron-dense ribosomes (marked area) (E), and degeneration of mitochondria (arrowhead) (F) in Vero-E6 cells 48 h post-infection with SARS-CoV-2 (TEM images). Virus particles (arrow), cell cytoplasm (CC), nucleus (N).

3.2. SARS-CoV-2 Particles Diameter and Morphology

Morphometric analysis by helium ion microscopy of SARS-CoV-2 particles attached on the Vero-E6 cell membrane showed that their mean diameter was 76 nanometers (Figure 5). MET showed particles with a spherical morphology exhibiting spikes on their envelopes (Figure 6B).

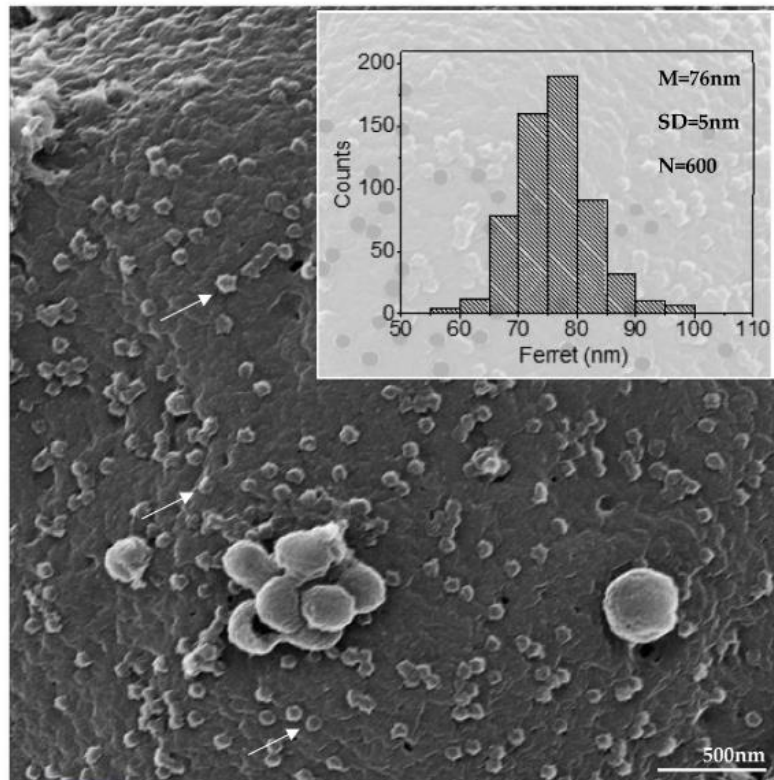


Figure 5. Diameter of SARS-CoV-2 particles attached in cell membrane (arrow) (HIM image). The average diameter of the SARS-CoV-2 particles was around 76 nanometers. Mean (M), standard deviation (SD), number of measured particles (N), virus particles (arrow).

3.3. Morphogenesis of SARS-CoV-2 in Vero-E6 Cell

(I) Virus particle entry—Many virus particles attached to the cell surface (adsorption) (Figure 6A–E) was observed. The entry of the SARS-CoV-2 virus particles into the cells was most commonly realized by clathrin coated endocytic vesicles (Figure 6E), although the fusion of the virus envelope with the cell membrane has been observed also (data not shown).

(II) Assembly of viral particles—Virus particles have been observed inside several cytoplasmic compartments including endosomes, RER, DMVs, intermediate vesicles (IV), and exosomes (Figure 7A,B). FIB-SEM images and three-dimensional (3D) modeling of the Vero-E6 cell, 48h pi, showed the interaction between different cellular compartments (Figure 8A–E see also Video S1).

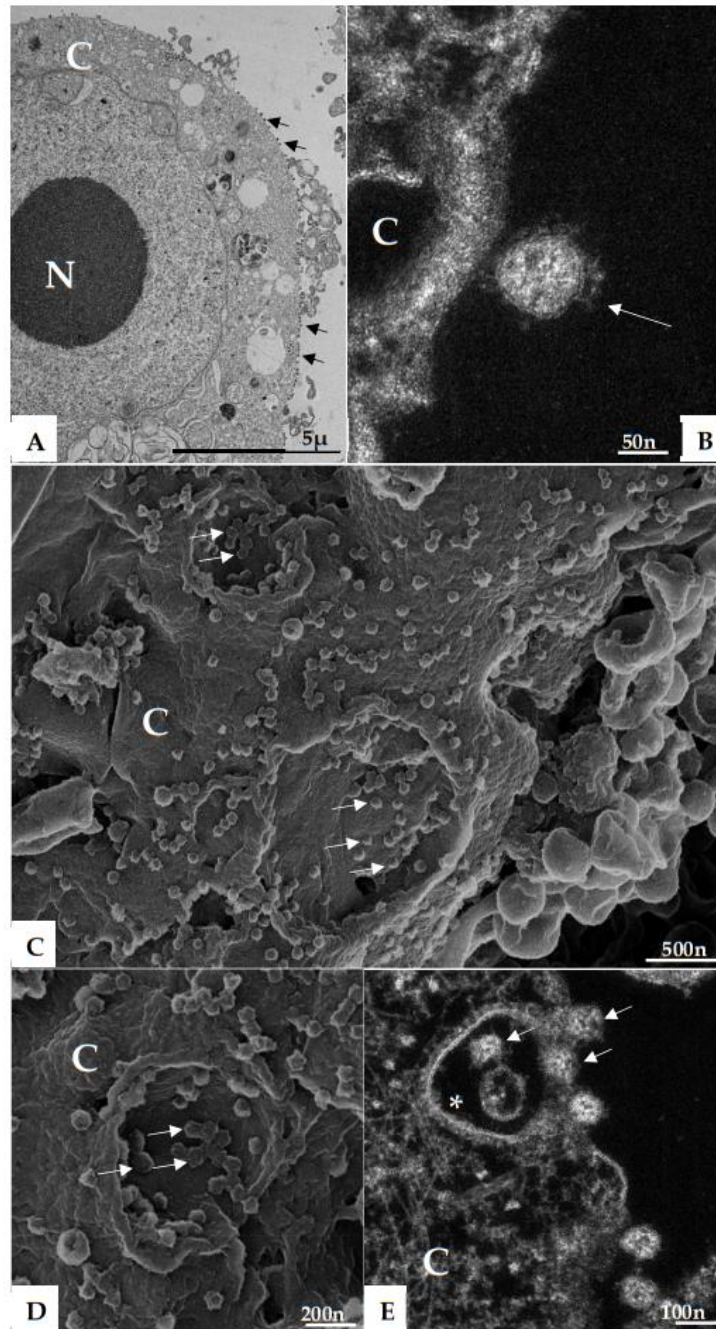


Figure 6. Attachment and endocytosis of SARS-CoV-2 particles (TEM (A), HAADF-STEM (B,E) and HIM (C,D) images). SARS-CoV-2 particles (arrows) attached to the cell membrane (A–D) and being internalized by endocytosis (arrow) (E). Endocytic vesicles coated in clathrin (*) (E). Cell cytoplasm (CC), cell membrane (CM), nucleus (N).

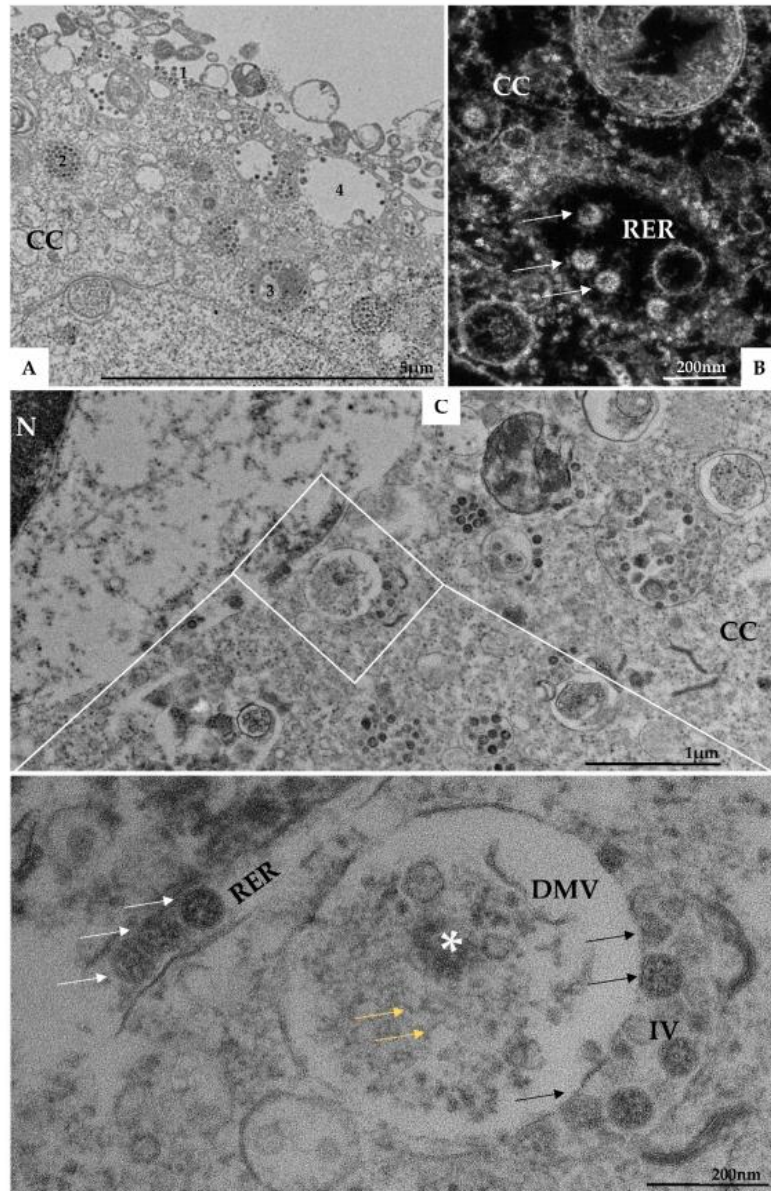


Figure 7. SARS-CoV-2 particles in lumen of several cellular compartments. (A) SARS-CoV-2 particles attached to the cell membrane (1), on endosomes (2), on the rough endoplasmic reticulum (3 and image (B) (arrow)), and being exocytosed via vesicles (4). (C) Presence of double membrane vesicle (DMV) containing in their lumen electron-dense material (*) and RNA-like filaments (yellow arrow). Budding of viral particles (black arrow) from these vesicles to into intermediate vesicles (IV) was observed. Virions were observed in rough endoplasmic reticulum cisterns (white arrow). Cell cytoplasm (CC), nucleus (N), and rough endoplasmic reticulum cisterns (RER). Transmission electron microscopy.

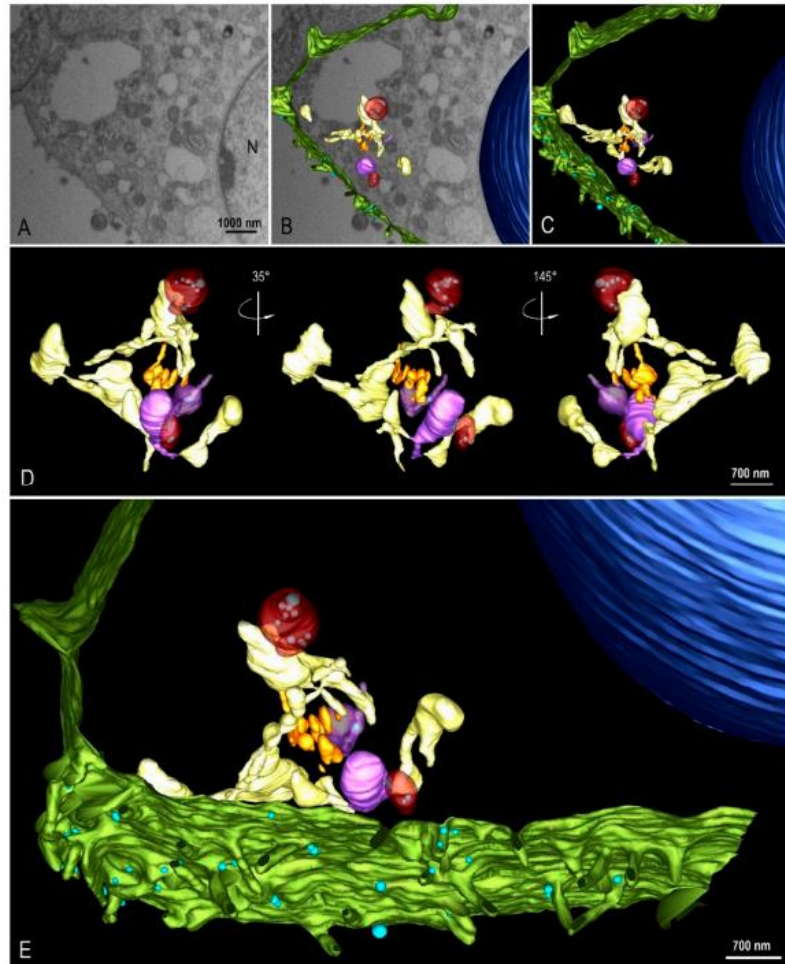


Figure 8. 3D modeling of Vero-E6 48 h post-infection with SARS-CoV-2. (A) FIB-SEM image of the block surface showing an infected cell. (B,C) Combination of a block surface image and the 3D model of structures of interest. (D) Different angle views of a region of interest showing the organization and interaction between different cellular compartments. (E) 3D model showing a global view of the model. Green (cell membrane), light blue (virus particle), dark blue (nucleus), yellow (rough endoplasmic reticulum), orange (Golgi complex), red (double membrane vesicle), purple (intermediate vesicle). See video in Supplementary Material (Video S1).

Using transmission electron microscopy (Figure 7C) and three-dimensional reconstruction (Figure 9A–E) the DMVs were observed located close to the RER, suggesting that DMVs result from remodeling of the RER membranes. Inside the DMVs, accumulation of electron-dense material, RNA-like filaments were observed (Figure 7C). IVs associated with these DMVs were observed as well as the presence of virus particles budding from the DMVs membranes into IVs lumen, suggesting that part of the assembly of viral particles can occur in this location (Figure 7C). The budding of the viral particles from the DMV into IV was also demonstrated in three-dimension reconstruction (Figure 10A–I, see also Video S2).

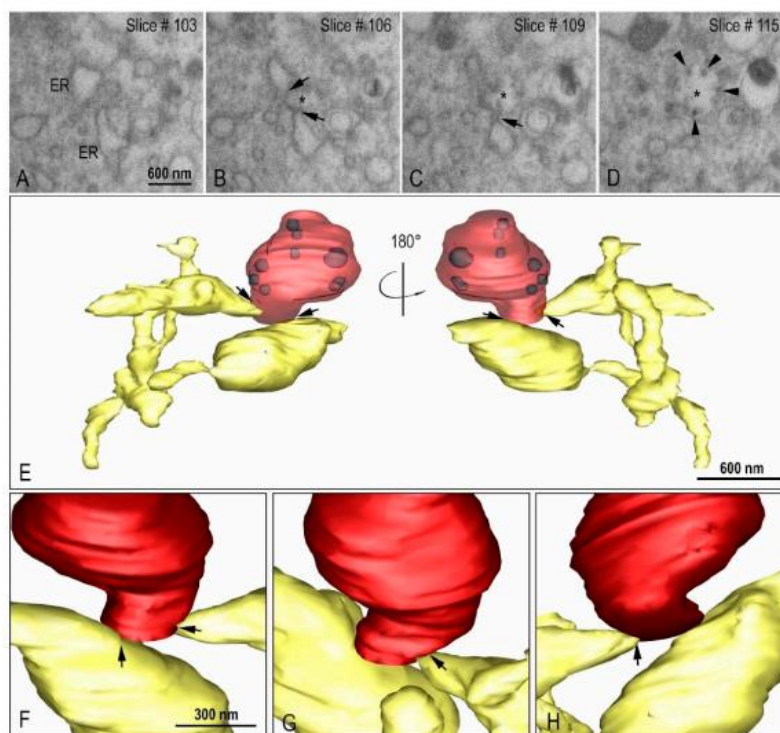


Figure 9. Interaction between the rough endoplasmic reticulum (ER) and double membrane vesicle (DMV). (A–D) FIB-SEM image sequence showing the ER and its connection (arrows) to a DMV (asterisk). Some virus particles can be seen inside the DMV (arrow heads). (E–H) 3D model of the DMV (red), virus particles (purple) inside the DMV and the ER (yellow). The regions of connection of the ER to the DMV are indicated with arrows. Interconnections within the ER network can be observed.

Golgi complex was observed by FIB-SEM image sequence and 3D modeling (Figure 11A–I, see also Video S3) close to the IVs containing virus particles, a fact that allows us to infer a possible relationship between both.

Immunolabeling tests using the immunofluorescence technique of Vero-E6 cells demonstrated the detection of SARS-CoV-2 Spike protein diffused throughout the cytosol both at 48 (Figure 12B,F) and 72 h pi (Figure 12D,H), suggesting viral replication and spreading infection. Detection of Spike protein of SARS-CoV-2 were not observed in the uninfected cells with 48 (Figure 12A,E) and 72 (Figure 12C,G) h of cultivation.

(III) Extrusion of virus particles. Virions were detected in multiple vesicles at the cell periphery and the release of the particles occurred by exocytosis (Figure 13). Fusion of the exocytic vesicle membrane with the cell cytoplasmic membrane was observed.

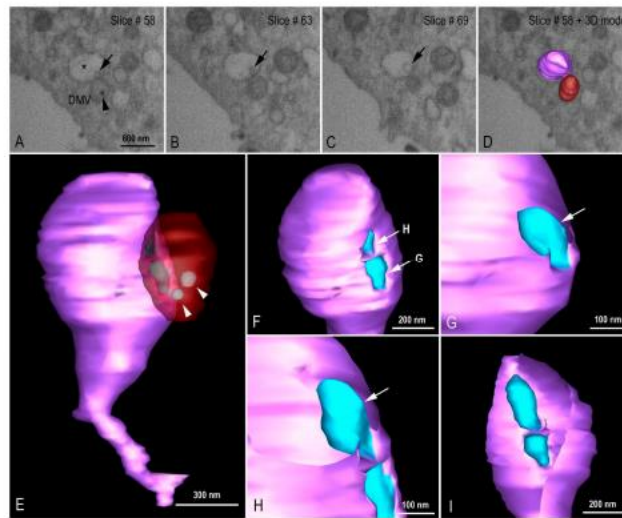


Figure 10. Virion budding events at intermediate vesicle (IV). (A–D) FIB-SEM image sequence exhibiting different virus budding stages (arrows) at IV (asterisk) and the proximity with a double membrane vesicle (DMV). Virus particles can be observed inside the DMV (arrow head). (E–I) 3D model showing the DMV (red with transparency), virus particles (light blue, arrow heads), and the IV (purple). (F) Extra vesicular view of two virus particle budding regions. The arrows indicate the cutting plane showed in G and H. (G) Initial stage of virus particle budding. (H) Final stage of virus particle budding. (I) Intra vesicular view of the virus budding. See video in Supplementary Material (Video S2).

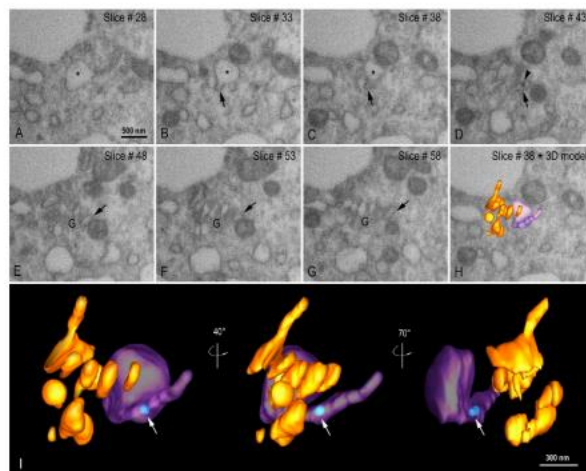


Figure 11. Organization of the Golgi complex (G) and intermediate vesicle (IV). (A–H) FIB-SEM image sequence showing an IV (asterisk) with a tubular region (arrow) in close proximity with to the Golgi complex. A virus particle can be seen inside the tubular region of the IV (arrow head). (I) 3D model of the G (orange), IV (purple in transparency), and a virus particle (light blue, arrow) at different angle views. See video in Supplementary Material (Video S3).

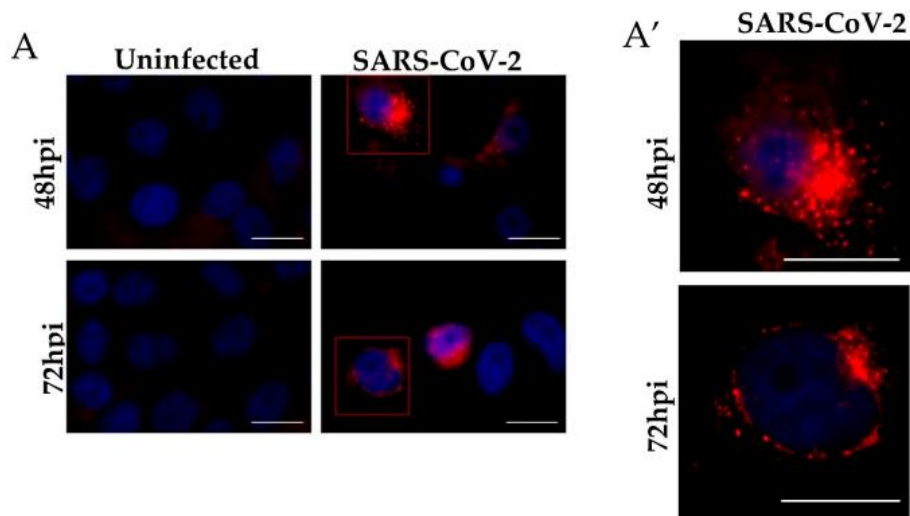


Figure 12. Immunofluorescence analyses of Vero-E6 cells after SARS-CoV-2 infection for 48 and 72 h. (A) Uninfected cells with 48 and 72 h of cultivation. (A') Representative zoom images. The virus was detected by the presence of the spike protein (red) performed by immunofluorescence, and cell nuclei stained with DAPI (blue). Hours post-infection (h pi). Scale bar 20 μ m.

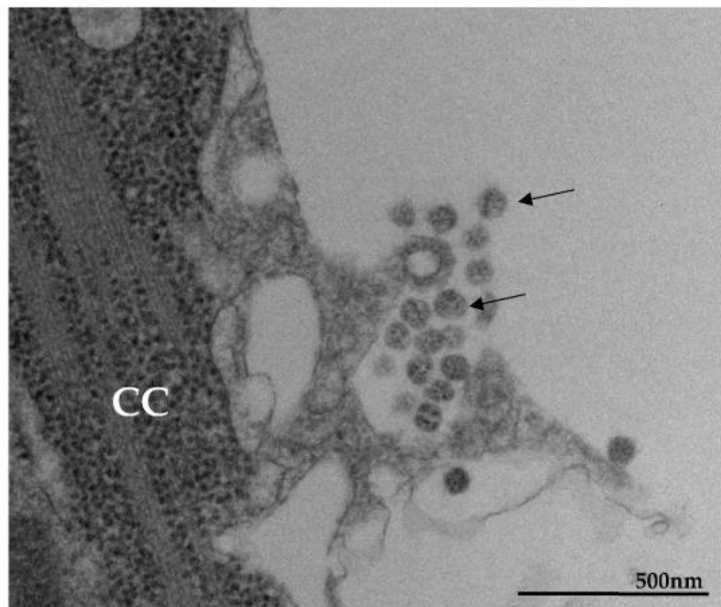


Figure 13. Extrusion of SARS-CoV-2 particles (MET). The particles released by exocytosis. Cell cytoplasm (CC), virus particles (arrow).

4. Discussion

TEM, STEM, HIM, and 3D modeling were used in the present study aiming to characterize the main virus-induced cellular changes as well as the replicative cycle of SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells infected with a Brazilian clinical sample.

We observed topographic changes in Vero-E6 cells at 48 and 72 h pi by SARS-CoV-2 evidenced by a marked cellular activation by the presence of numerous filopodia with associated viral particles. Connection between adjacent cells mediated by these filopodia was also observed. We believe that the role of filopodia in this in vitro model is associated with infection maximization. In vitro studies with Vero cells with SARS-CoV and SARS-CoV-2 corroborate our findings [23,31,32]. Enveloped viruses can spread by two different routes: the cell-free aqueous environment or by cell-to-cell contact [33–35]. Cell-to-cell contact spreading has unique advantages. The transfer speed is greater because the replication cycle of release, transmission, and entry can proceed in a faster manner. Another advantage of cell-to-cell contact is immune evasion because the limited exposure in extracellular space avoids interaction with neutralizing antibodies. Lastly, by exploiting cell-to-cell communication, the physical and immunological barriers can be overcome to spread the infection [34,35]. Viruses can hijack the filopodia system for their own use during the life cycle under the following strategies: viral surfing (the binding of virus to filopodia induced a rapid lateral movement toward the cell body), filopodial retraction (the filopodia on virally infected cells pull the virus inward), and filopodial bridges to assist virus transport between the cells [35,36].

Syncytial formation in Vero-E6 cells monolayer 48 and 72 h pi with SARS-CoV-2 were commonly observed in our analysis. In ultrastructural studies of Vero cells infected with SARS-CoV multinucleated syncytial cells were occasionally seen [37]. Studies with patients with COVID-19 showed lungs contain infected pneumocytes with abnormal morphology and frequent multinucleation [38]. The authors infer that generation of these syncytia results from activation of the SARS-CoV-2 spike protein at the cell plasma membrane level.

Our analysis demonstrated accumulation of LDs in infected cells, which is corroborated by a previous study conducted by our group [29]. In the above-mentioned study, in vitro SARS-CoV-2 infection were seen to modulate pathways of lipid synthesis and uptake as monitored by testing for CD36, SREBP-1, PPAR γ , and DGAT-1 expression in monocytes and triggered LD formation in different human cell lines. Ultrastructural analysis by transmission electron microscopy of Vero-E6 cells infected with SARS-CoV-2 showed viral particles colocalizing with LDs, suggesting that LDs might serve as an assembly platform. Indeed, inhibition of LD formation in Vero-E6 lead to decreased SARS-CoV-2 replication [29]. Our data are also corroborated with the findings of Nardacci et al. (2021) that demonstrated that SARS-CoV-2 infection induce the accumulation of LDs, both in cultured cells and in type II pneumocytes of lung from infected patients. In addition, LDs were often observed in close contact with swollen mitochondria and may participate in mechanisms of cytopathogenesis [39].

SARS-CoV-2 particles attached to the cell surfaces with an average diameter of 76 nanometers and with spherical morphology exhibiting spikes on their envelope, which is characteristic of viruses belonging to the *Coronaviridae* family. This data is very consistent with previous in vitro studies of SARS-CoV [9] and SARS-CoV-2 in which the virion diameter ranged from 60 to 140 nm [14,38,40–42].

We observed that the entry of the SARS-CoV-2 into the host cell occurs most commonly by endocytosis, although the fusion of the virus envelope with the cell membrane has also been observed. This is consistent with our previous ultrastructural studies with SARS-CoV-2 [23] and others from literature with SARS-CoV and MERS-CoV which support both mechanisms [9,43,44].

In the present study, DMVs located close to the RER were observed, suggesting that these vesicles result from remodeling of the RER membranes. Presence of RNA-like filaments and electron-dense material inside the lumen of DMVs was observed. DMVs are induced during the replication of a variety of RNA viruses [45–48] and were identified as the

sole compartment where viral RNA transcription occurs for coronaviruses [49]. Morphological analysis of different cell lines infected with SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2—as well as in our studies—has demonstrated that the DMVs are derived from the RER. In the studies concerning SARS-CoV and MERS-CoV, the nonstructural proteins 3 and 4 were predominantly responsible for orchestrating this process [7,50–52]. In some of these models, the RER lumen constitutes the space between the DMV's inner and outer membrane, while the enclosed space is of cytoplasmic origin and enriched in double-stranded RNA (dsRNA) [14].

Our data corroborates the findings from the SARS-CoV and MERS-CoV studies, as well as the analysis with Vero-E6 and human pulmonary cell lines (Calu3) infected with SARS-CoV-2, in which DMVs containing viral RNA inside were found [14,23,32]. Wolff et al. [47], using cellular cryoelectron microscopy, identified a molecular pore complex spanning both membranes of the DMVs, which interconnects the interior of the vesicles with the cytoplasm and would allow the release of newly synthesized RNA from the DMV interior into the cytoplasm.

We observed IVs associated with DMVs, as well as the presence of virus particles budding from the DMVs membranes into IVs lumen, suggesting that part of the assembly of particles can occur in this localization. Close proximity of IVs with the Golgi complex was observed, a fact that allows us to infer a possible relationship between IVs and the Golgi complex. Knoop et al. [7] and Siu et al. [53] observed large assemblies of convoluted membranes, often in close proximity to DMV clusters in Vero-E6 cells infected with SARS-CoV. The authors suggest that these structures are probably identical to the “reticular inclusions” that were firstly observed in cells infected with mouse hepatitis coronavirus [54] and were later referred to as ‘clusters of tubular cisternal elements’, which may have a connection to the endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment (ERGIC) [55]. The structural proteins membrane (M), nucleocapsid (N), envelope (E), and S—together with the genomic RNA—drive the assembly of new virus particles, which in the case of other coronaviruses bud into ERGIC [56].

We observed virions in multiple smooth vesicles at the cell periphery, close to the cell membrane. Fusion of membrane of the smooth vesicles with the cell membrane resulting in the release of the particles was also observed, too. This mechanism of viral progeny release was detected in our previous studies with SARS-CoV-2 [24], and corroborates data presented by Qian et al. [57] and Qinfen et al. [9] from in vitro studies with alveolar type II cells and Vero-E6 cells infected with SARS-CoV.

In our immunolabeling tests by the immunofluorescence technique, the robust presence of Spike protein was observed in all Vero-E6 cell cytoplasm at both 48 and 72 h pi, proving the high permissiveness of this cell line to SARS-CoV-2 infection, as demonstrated in our ultrastructural studies.

Our analyses demonstrated how essential electron microscopy is when it comes to the analysis of a causative agent of an unknown disease, a situation already experienced in 2003 with SARS-CoV [58], Ebola [59–61], Hendra [62], Nipah [63], and monkeypox [64].

This study showed that the Vero-E6 cell is a good in vitro model for studies of SARS-CoV-2 biogenesis and that it can be used for pre-clinical studies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14020201/s1>, Video S1. Three-dimensional reconstruction of Vero-E6 48 h post-infection with SARS-CoV-2. Combination of a FIB-SEM image sequence and the 3D model presenting different cellular compartments engaged in SARS-CoV-2 replication. Green (cell membrane), light blue (virus particle), dark blue (nucleus), yellow (rough endoplasmic reticulum), orange (Golgi complex), red (double membrane vesicle), purple (intermediate vesicle). Video S2. Three-dimensional reconstruction of SARS-CoV-2 particles budding events at intermediate vesicle. 3D model showing different virus budding stages and the proximity with a double membrane vesicle. Red with transparency (double membrane vesicle), light blue (virus particles), purple (intermediate vesicle). Video S3. Three-dimensional reconstruction of organization of the Golgi complex and intermediate vesicle. Combination FIB-SEM image sequence and the 3D model showing an intermediate vesicle with a tubular region in close proximity with the Golgi complex. A virus particle can be seen inside the tubular region of the intermediate vesicle. Orange (Golgi complex), purple in transparency (intermediate vesicle), light blue (virus particle).

Author Contributions: Conceptualization, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, writing—original draft, writing—review and editing, D.F.B.-V.; Formal analysis, investigation, methodology, writing—review and editing, M.A.N.d.S., A.L.T.d.A., A.d.C.R., W.G.-D., B.S.A., P.T.B., S.S.G.D. and V.C.S.; Funding acquisition, formal analysis, investigation, methodology, writing—review and editing, M.E.M., M.D.M., F.C.M. and M.M.S.; Funding acquisition, writing—review and editing, O.M.B. and T.M.L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz, FIOTEC (grant number IOC-023-FIO-18-2-58), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (grant number: E-27/2021/269465) to D.F.B.-V., Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant number: 301992/2017-7) to O.M.B., Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo, IOC, Fiocruz, FAPERJ (grant number: E-26/210.151/2020), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and CNPq for the student fellowships to M.D.M. T.M.L.S.'s group was supported by CNPq (441019/2020-0, 307162/2017-6), FAPERJ (E-26/210.182/2020, E-26/201.067/2021, E-26/210.112/2020). CAPES, CNPq, and FAPERJ also supported the National Institutes of Science and Technology Program (INCT) on Diseases of Neglected populations (INCT-IDPN, Finance Code 465313/2014-0). Thanks are due to Fiocruz under the auspices of the Inova Program (B3-Bovespa funding, Finance Code VGPDI-032-ARVC-20). The funders had no role in the study design, data collection, analysis, and preparation of or decision to publish the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Human Ethics Committee of Fiocruz, protocol code 2453470.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank IOC for providing us with its technology and facilities during the course of the research, the Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolph Barth, IOC, Fiocruz, the NB3 Platform (IOC, Fiocruz), the CENABIO (Federal University of Rio de Janeiro) and the Willian Ferreira (INMETRO, Rio de Janeiro).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest exists.

References

1. Gorbalenya, A.E.; Baker, S.C.; Baric, R.S.; Groot, R.J.; Drosten, C.; Gulyaeva, A.A.; Haagmans, B.L.; Lauber, C.; Leontovich, A.M.; Neuman, B.W.; et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 536–544.
2. Corman, V.M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D.K.W.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M.L.; et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, 2000045. [[CrossRef](#)]
3. Jiang, S.; Du, L.; Shi, Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: Calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 275–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Lu, H.; Stratton, C.W.; Tang, Y.W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan China: The mystery and the miracle. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 401–402. [[CrossRef](#)]
5. Ren, L.-L.; Wang, Y.-M.; Wu, Z.-Q.; Xiang, Z.-C.; Guo, L.; Xu, T.; Jiang, Y.-Z.; Xiong, Y.; Li, Y.-J.; Li, X.-W.; et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: A descriptive study. *Chin. Med. J.* **2020**, *133*, 1015–1024. [[CrossRef](#)]
6. Letko, M.; Marzi, A.; Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. First functional assessment of the interaction of the SARS-CoV-2 Spike protein receptor binding domain with the cellular receptor ACE2. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 562–569. [[CrossRef](#)]
7. Knoops, K.; Kikkert, M.; Worm, S.H.E.V.D.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; Van Der Meer, Y.; Koster, A.J.; Mommaas, A.M.; Snijder, E.J. SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. *PLoS Biol.* **2008**, *6*, e226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Walls, A.C.; Park, Y.J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Velesler, D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. Recommended resource describing key aspects of SARS-CoV-2 Spike features. *Cell* **2020**, *181*, 281–292.e6. [[CrossRef](#)]
9. Zhang, Q.; Cui, J.; Huang, X.; Zheng, H.; Huang, J.; Fang, L.; Li, K.; Zhang, J. The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J. Med. Virol.* **2004**, *73*, 332–337.
10. Goldsmith, C.S.; Tatti, K.M.; Ksiazek, T.G.; Rollin, P.; Comer, J.A.; Lee, W.W.; Rota, P.A.; Bankamp, B.; Bellini, W.J.; Zaki, S.R. Ultrastructural Characterization of SARS Coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 320–326. [[CrossRef](#)]
11. Snijder, E.J.; van der Meer, Y.; Zevenhoven-Dobbe, J.; Onderwater, J.J.; van der Meulen, J.; Koerten, H.K.; Mommaas, A.M. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J. Virol.* **2006**, *80*, 5927–5940. [[CrossRef](#)]
12. Netherton, C.L.; Wileman, T. Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr. Opin. Virol.* **2011**, *1*, 381–387. [[CrossRef](#)]
13. Blanchard, E.; Roingard, P. Virus-induced double-membrane vesicles. *Cell. Microbiol.* **2015**, *17*, 45–50. [[CrossRef](#)]
14. Klein, S.; Cortese, M.; Winter, S.L.; Wachsmuth-Melm, M.; Neufeldt, C.J.; Cerikan, B.; Stanifer, M.L.; Boulant, S.; Barten-schlager, R.; Chlanda, P. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Harak, C.; Lohmann, V. Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. *Virology* **2015**, *479*, 418–433. [[CrossRef](#)]
16. V'kovski, P.; Kratzel, A.; Steiner, S.; Stalder, H.; Thiel, T. Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 155–170. [[CrossRef](#)]
17. Matsuyama, S.; Nao, N.; Shirato, K.; Kawase, M.; Saito, S.; Takayama, I.; Nagata, N.; Sekizuka, T.; Katoh, H.; Kato, F. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 7001–7003. [[CrossRef](#)]
18. Banerjee, A.; Nasir, J.A.; Budyłowski, P.; Yip, L.; Aftanas, P.; Christie, N.; Ghalami, A.; Baid, K.; Raphenya, A.R.; Hirota, J.A. Isolation, sequence, infectivity and replication kinetics of SARS-CoV-2. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 2054–2063. [[CrossRef](#)]
19. Tseng, C.-T.K.; Tseng, J.; Perrone, L.; Worthy, M.; Popov, V.; Peters, C.J. Apical Entry and Release of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus in Polarized Calu-3 Lung Epithelial Cells. *J. Virol.* **2005**, *79*, 9470–9479. [[CrossRef](#)]
20. Mossel, E.C.; Huang, C.; Narayanan, K.; Makino, S.; Tesh, R.B.; Peters, C.J. Exogenous ACE2 Expression Allows Refractory Cell Lines to Support Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication. *J. Virol.* **2005**, *79*, 3846–3850. [[CrossRef](#)]
21. Kaye, M.; Druce, J.; Tran, T.; Kostecki, R.; Chibo, D.; Morris, J.; Catton, M.; Birch, C. SARS-associated Coronavirus Replication in Cell Lines. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 128–133. [[CrossRef](#)]
22. Ogando, N.S.; Dalebout, T.J.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; Limpens, R.W.; van der Meer, Y.; Caly, L.; Druce, J.; de Vries, J.J.C.; Kikkert, M.; Bárcena, M.; et al. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: Replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J. Gen. Virol.* **2020**, *101*, 925–940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Barreto-Vieira, D.F.; da Silva, M.A.N.; Garcia, C.C.; Miranda, M.D.; Matos, A.D.R.; Caetano, B.C.; Resende, P.C.; Motta, F.C.; Siqueira, M.M.; Wendell Girard, D.; et al. Morphology and morphogenesis of SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2021**, *116*, e200443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Matos, A.D.R.; Motta, F.C.; Caetano, B.C.; Ogrzewalska, M.; Garcia, C.C.; Lopes, J.C.O.; Miranda, M.; Livorati, M.T.F.P.; Abreu, A.; Brown, D.; et al. Identification of SARS-CoV-2 and additional respiratory pathogens cases under the investigation of COVID-19 initial phase in a Brazilian reference laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2020**, *115*, e200232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Szretter, K.J.; Balish, A.L.; Katz, J.M. Influenza: Propagation, quantification, and storage. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2006**, *3*, 15G.1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Barreto-Vieira, D.F.; Barth-Schatzmayr, O.M.; Schatzmayr, H.G. Modelo animal experimental para o estudo da patogênese dos vírus dengue sorotipos 1 e 2. In *Manual de Técnicas; Interciência*: Rio de Janeiro, Brasil, 2010.
27. Barth, O.M.; da Silva, M.A.N.; Barreto-Vieira, D.F. Low impact to fixed cell processing aiming transmission electron microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, *111*, 411–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kremer, J.R.; Mastronarde, D.N.; McIntosh, J.R. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. *J. Struct. Biol.* **1996**, *116*, 71–76. [[CrossRef](#)]

29. Dias, S.S.G.; Soares, V.C.; Ferreira, A.C.; Sacramento, C.Q.; Fintelman-Rodrigues, N.; Temezo, J.R.; Teixeira, L.; Nunes da Silva, M.A.; Barreto, E.; Mattos, M.; et al. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1009127. [[CrossRef](#)]
30. Souza-Moreira, L.; Soares, V.C.; Dias, S.D.S.G.; Bozza, P.T. Adipose-derived Mesenchymal Stromal Cells Modulate Lipid Metabolism and Lipid Droplet Biogenesis via AKT/mTOR–PPAR γ Signalling in Macrophages. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–11. [[CrossRef](#)]
31. Ng, M.L.; Lee, J.W.M.; Leong, M.L.N.; Ling, A.E.; Tan, H.C.; Ooi, E.E. Topographic changes in SARS coronavirus-infected cells at late stages of infection. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 1907–1914. [[CrossRef](#)]
32. Caldas, L.A.; Carneiro, F.A.; Higa, L.M.; Monteiro, F.L.; da Silva, G.P.; da Costa, L.J.; Durigon, E.L.; Tanuri, A.; de Souza, W. Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 16099. [[CrossRef](#)]
33. Sherer, N.M.; Lehmann, M.J.; Jimenez-Soto, L.F.; Horensavitz, C.; Pypaert, M.; Mothers, W. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 310–315. [[CrossRef](#)]
34. Mothes, W.; Sherer, N.M.; Jin, J.; Zhong, P. Virus Cell-to-Cell Transmission. *J. Virol.* **2010**, *84*, 8360–8368. [[CrossRef](#)]
35. Chang, K.; Baginski, J.; Hassan, S.F.; Volin, M.; Shukla, D.; Tiwari, V. Filopodia and Viruses: An Analysis of Membrane Processes in Entry Mechanisms. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 300. [[CrossRef](#)]
36. Tiwari, V.; Tarbuton, M.S.; Shukla, D. Diversity of heparan sulfate and HSV entry: Basic understanding and treatment strategies. *Molecules* **2015**, *20*, 2707–2727. [[CrossRef](#)]
37. Braga, L.; Ali, H.; Secco, I.; Chiavacci, E.; Neves, G.; Goldhill, D.; Penn, R.; Jimenez-Guardeño, J.M.; Ortega-Prieto, A.M.; Bussani, R.; et al. Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 spike-induced syncytia. *Nature* **2021**, *594*, 88–93. [[CrossRef](#)]
38. Zhu, N.; Dingyu, Z.; Wenling, W.; Xingwang, L.; Bo, Y.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 723–733. [[CrossRef](#)]
39. Nardacci, R.; Colavita, F.; Castilletti, C.; Lapa, D.; Matusali, G.; Meschi, S.; Del Nonno, F.; Colombo, D.; Capobianchi, M.R.; Zumla, A.; et al. Evidences for lipid involvement in SARS-CoV-2 cytopathogenesis. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 1–12. [[CrossRef](#)]
40. Laue, M.; Kauter, A.; Hoffmann, T.; Möller, L.; Michel, J.; Nitsche, A. Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3515. [[CrossRef](#)]
41. Werion, A.; Belkhir, L.; Perrot, M.; Schmit, G.; Aydin, S.; Chen, Z.; Penalzoza, A.; De Greef, J.; Yildiz, H.; Pothén, L.; et al. SARS-CoV-2 causes a specific dysfunction of the kidney proximal tubule. *Kidney Int.* **2020**, *98*, 1296–1307. [[CrossRef](#)]
42. Park, W.B.; Kwon, N.J.; Choi, S.J.; Kang, C.K.; Choe, P.G.; Kim, J.Y.; Yun, J.; Lee, G.W.; Seong, M.W.; Kim, N.J.; et al. Virus isolation from the first patient with SARS-CoV-2 in Korea. *J. Korean Med. Sci.* **2020**, *35*, e84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Song, Z.; Xu, Y.; Bao, L.; Zhang, L.; Yu, P.; Qu, Y.; Zhu, H.; Zhao, W.; Han, Y.; Qin, C. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses* **2019**, *11*, 59. [[CrossRef](#)]
44. Ng, M.; Tan, S.; See, E.; Ooi, E.; Ling, A. Early events of SARS coronavirus infection in Vero cells. *J. Med. Virol.* **2003**, *71*, 323–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Paul, D.; Hoppe, S.; Saher, G.; Krijnse-Locker, J.; Bartenschlager, R. Morphological and Biochemical Characterization of the Membranous Hepatitis C Virus Replication Compartment. *J. Virol.* **2013**, *87*, 10612–10627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. De Wilde, A.H.; Raj, V.S.; Oudshoorn, D.; Bestebroer, T.M.; Van Nieuwkoop, S.; Limpens, R.W.A.L.; Posthuma, C.C.; Van Der Meer, Y.; Barcena, M.; Haagmans, B.L.; et al. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon- α treatment. *J. Gen. Virol.* **2013**, *94*, 1749–1760. [[CrossRef](#)]
47. Wolff, G.; Melia, C.E.; Snijder, E.J.; Barcena, M. Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. *Trends Microbiol.* **2020**, *28*, 1022–1033. [[CrossRef](#)]
48. Zhou, X.; Cong, Y.; Veenendaal, T.; Klumperman, J.; Shi, D.; Mari, M.; Reggiori, F. Ultrastructural Characterization of Membrane Rearrangements Induced by Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection. *Viruses* **2017**, *9*, 251. [[CrossRef](#)]
49. Snijder, E.J.; Limpens, R.W.A.L.; de Wilde, A.H.; de Jong, A.W.M.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; Maier, H.J.; Faas, F.F.G.A.; Koster, A.J.; Barcena, M. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol.* **2020**, *18*, e3000715. [[CrossRef](#)]
50. Oudshoorn, D.; Rijs, K.; Limpens, R.W.A.L.; Groen, K.; Koster, A.J.; Snijder, E.R.; Kikkert, M.; Barcena, M. Expression and cleavage of middle east respiratory syndrome coronavirus nsp3-4 polyprotein induce the formation of double-membrane vesicles that mimic those associated with coronaviral RNA replication. *mBio* **2017**, *8*, e01658-17. [[CrossRef](#)]
51. Mendonça, L.; Howe, A.; Gilchrist, J.B.; Sun, D.; Knight, M.L.; Zanetti-Domingues, L.C.; Bateman, B.; Krebs, A.S.; Chen, L.; Radecke, J.; et al. SARS-CoV-2 assembly and egress pathway revealed by correlative multi-modal multi-scale cryo-imaging. *Nat Commun.* **2021**, *30*, 4629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cortese, M.; Lee, J.Y.; Cerikan, B.; Neufeldt, C.J.; Oorschot, V.M.J.; Köhrer, S.; Hennies, J.; Schieber, N.L.; Ronchi, P.; Mizzon, G.; et al. Integrative imaging reveals SARS-CoV-2-induced reshaping of subcellular morphologies. *Cell Host Microbe* **2020**, *28*, 853–866.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Siu, Y.L.; Teoh, K.T.; Chan, C.M.; Kien, F.; Escriou, N.; Tsao, S.W.; Nicholls, J.M.; Altmeyer, R.; Peiris, J.S.M.; Bruzzone, R.; et al. The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *J. Virol.* **2008**, *82*, 11318–11330. [[CrossRef](#)]

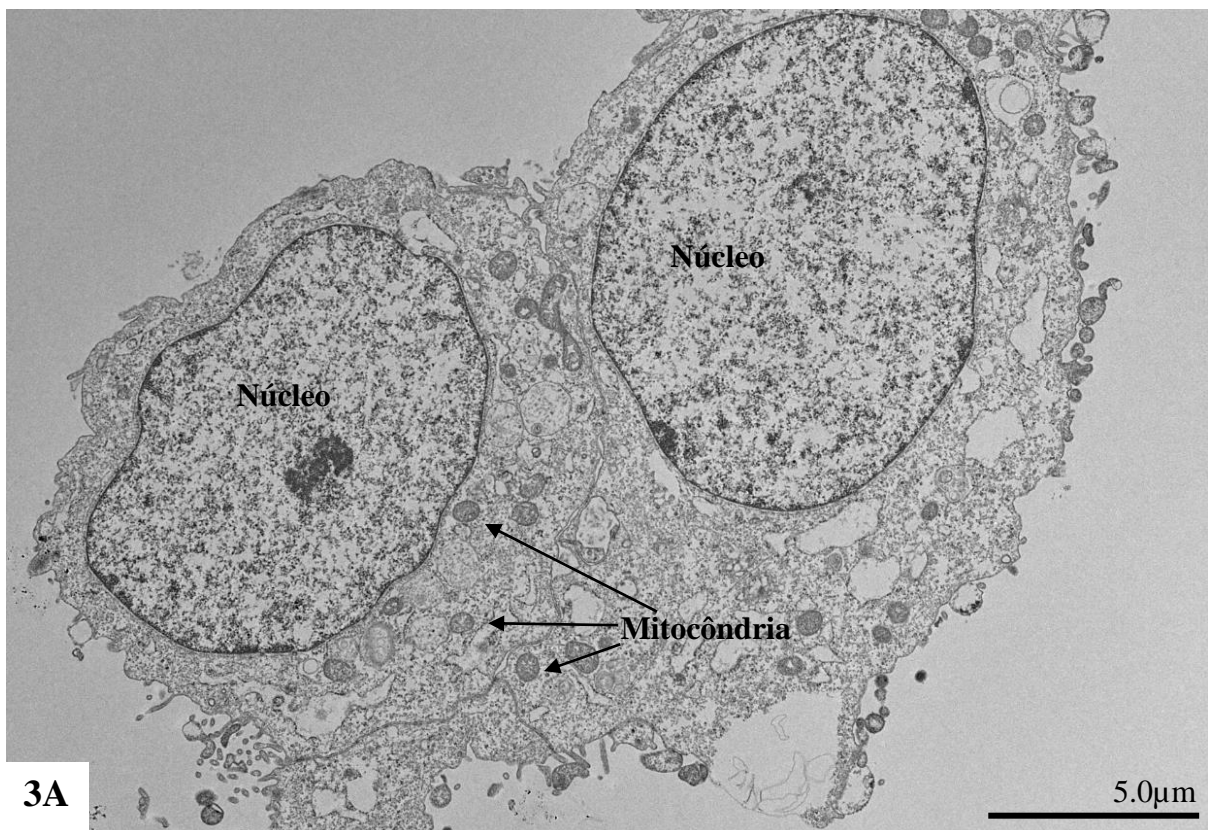
54. David-Ferreira, J.F.; Manaker, R.A. An electron microscope study of the development of a mouse hepatitis virus in tissue culture cells. *J. Cell Biol.* **1965**, *24*, 57–78. [[CrossRef](#)]
55. Krijnse-Locker, J.; Ericsson, M.; Rottier, P.J.M.; Griffiths, G. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: Evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 55–70. [[CrossRef](#)]
56. Perlman, S.; Masters, P.S. *Coronaviridae: The Viruses and Their Replication*, 7th ed.; LWW: New York, NY, USA, 2020; Volume 1.
57. Qian, Z.; Travanty, E.A.; Oko, L.; Edeen, K.; Berglund, A.; Wang, J.; Ito, Y.; Holmes, K.V.; Mason, R.J. Innate immune response of human alveolar type II cells infected with severe acute respiratory syndrome-coronavirus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *48*, 742–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Ksiazek, T.G.; Erdman, D.; Goldsmith, C.S.; Zaki, S.R.; Peret, T.; Emery, S.; Tong, S.; Urbani, C.; Comer, J.A.; Lim, W.; et al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1953–1966. [[CrossRef](#)]
59. Johnson, K.M.; Lange, J.V.; Webb, P.A.; Murphy, F.A. Isolation and partial characterization of a new virus causing acute haemorrhagic fever in zaire. *Lancet* **1977**, *309*, 569–571. [[CrossRef](#)]
60. Bowen, E.T.; Lloyd, G.; Harris, W.J.; Platt, G.S.; Baskerville, A.; Vella, E.E. Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the etiological agent. *Lancet* **1977**, *1*, 571–573. [[CrossRef](#)]
61. Pattyn, S.; Groen, G.; Jacob, W.; Piot, P.; Courteille, G. Isolation of marburg-like virus from a case of haemorrhagic fever in zaire. *Lancet* **1977**, *309*, 573–574. [[CrossRef](#)]
62. Murray, K.; Selleck, P.; Hooper, P.; Hyatt, A.; Gould, A.; Gleeson, L.; Westbury, H.; Hiley, L.; Selvey, L.; Rodwell, B. A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* **1995**, *268*, 94–97. [[CrossRef](#)]
63. Chua, K.B.; Bellini, W.J.; Rota, P.A.; Harcourt, B.H.; Tamin, A.; Lam, S.K.; Ksiazek, T.G.; Rollin, P.E.; Zaki, S.R.; Shieh, W.-J.; et al. Nipah Virus: A Recently Emergent Deadly Paramyxovirus. *Science* **2000**, *288*, 1432–1435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Centers for Disease Control and Prevention Multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* **2003**, *52*, 537–540.

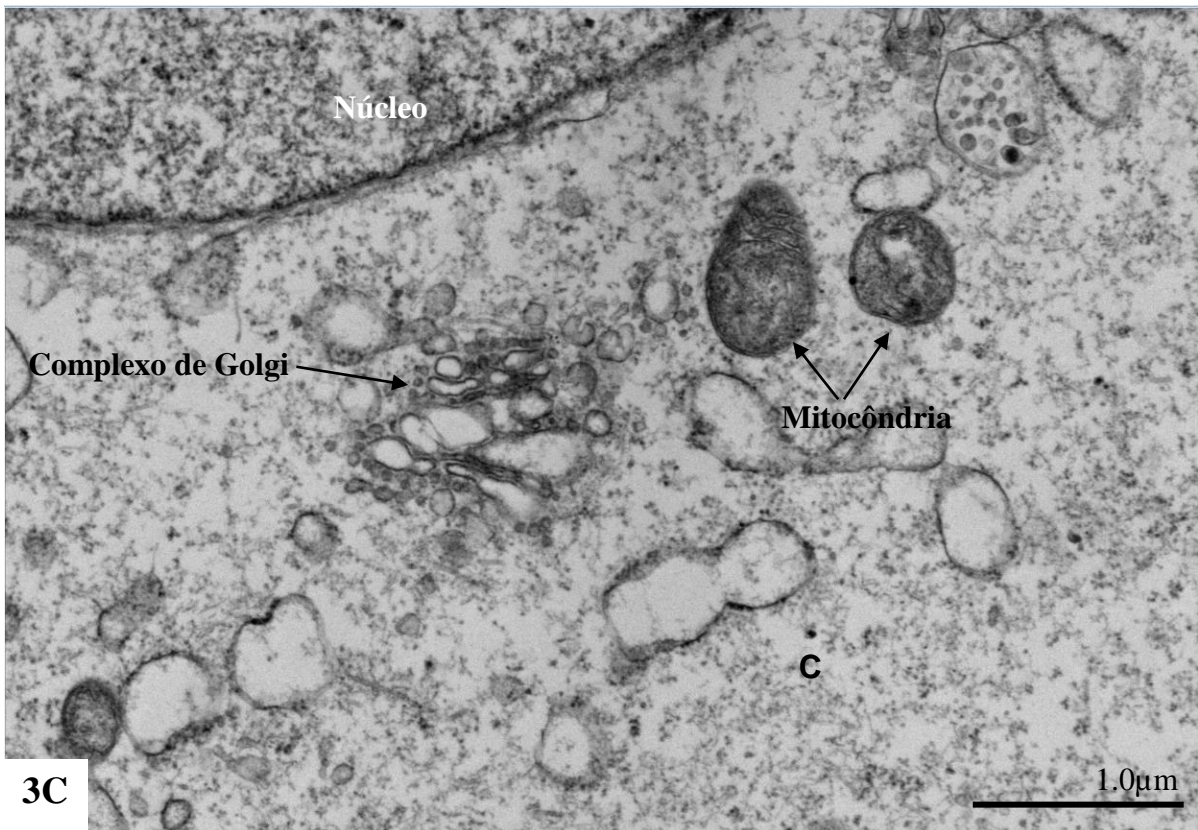
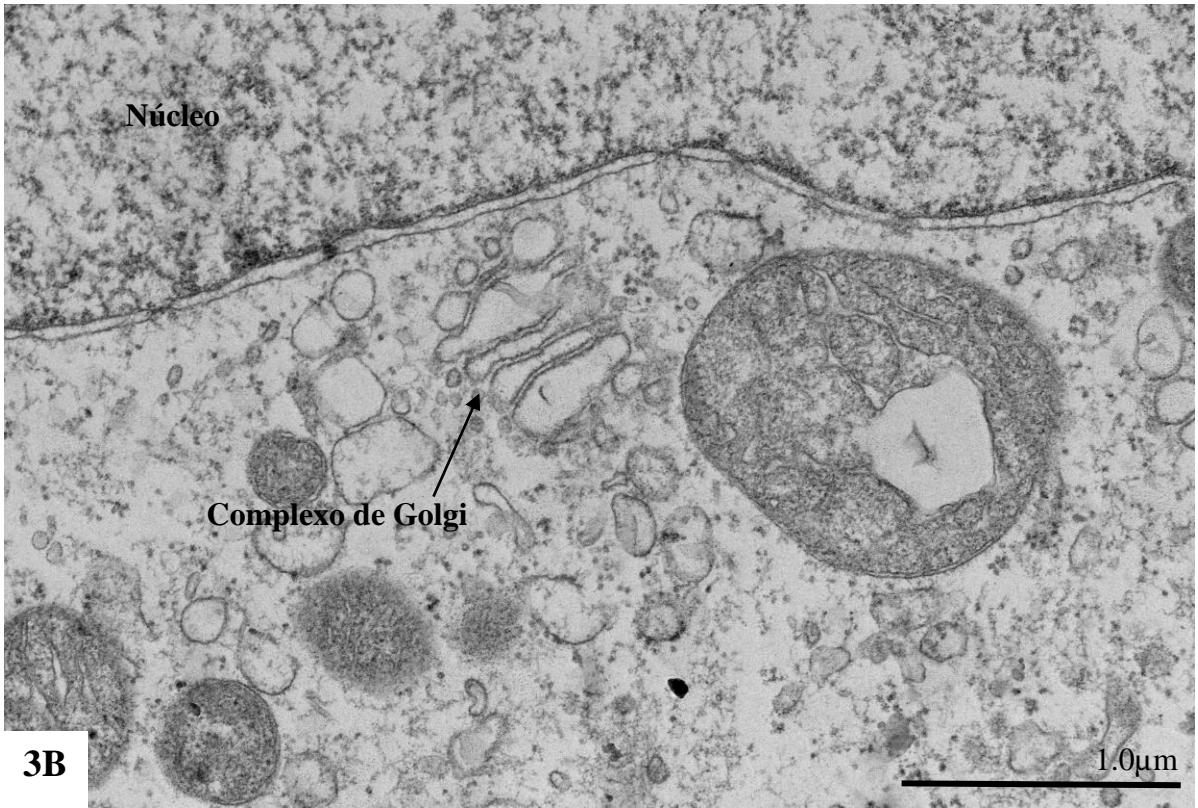
4.3. Avaliação da ação antiviral do daclatasvir e da mefloquina em células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2

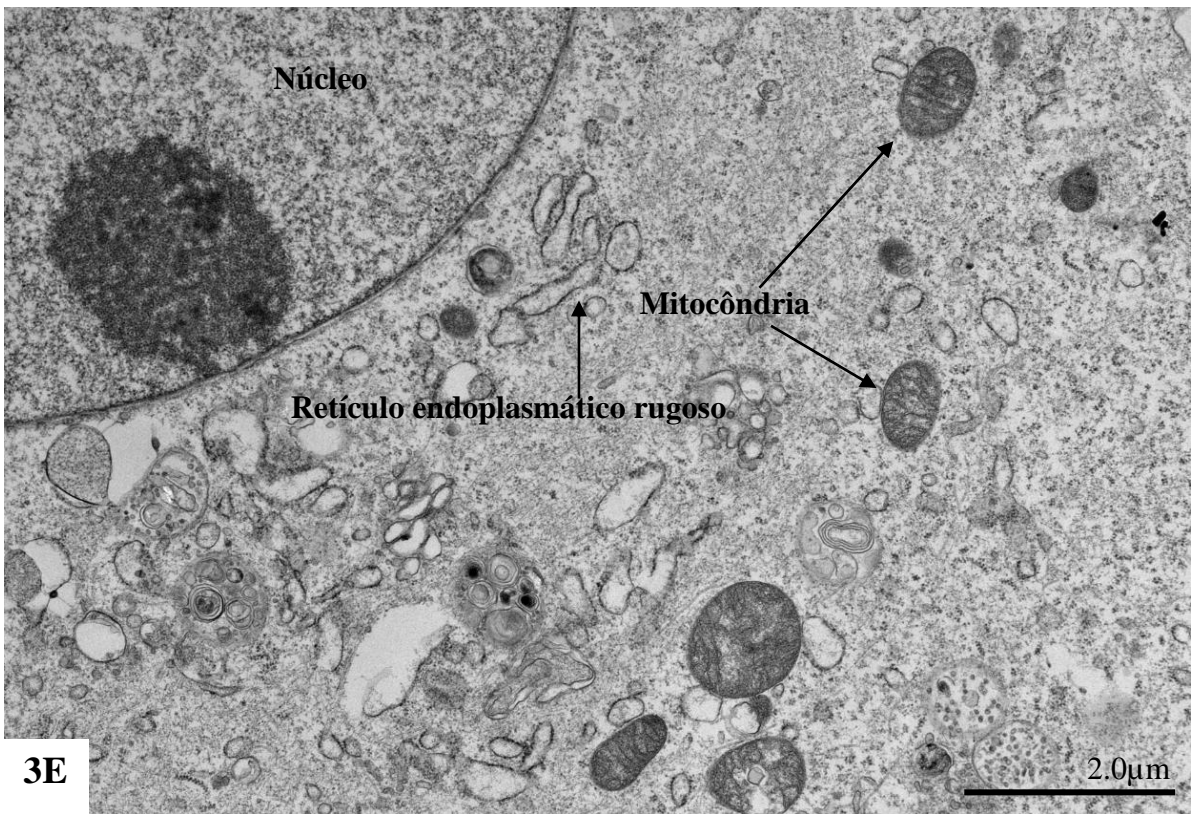
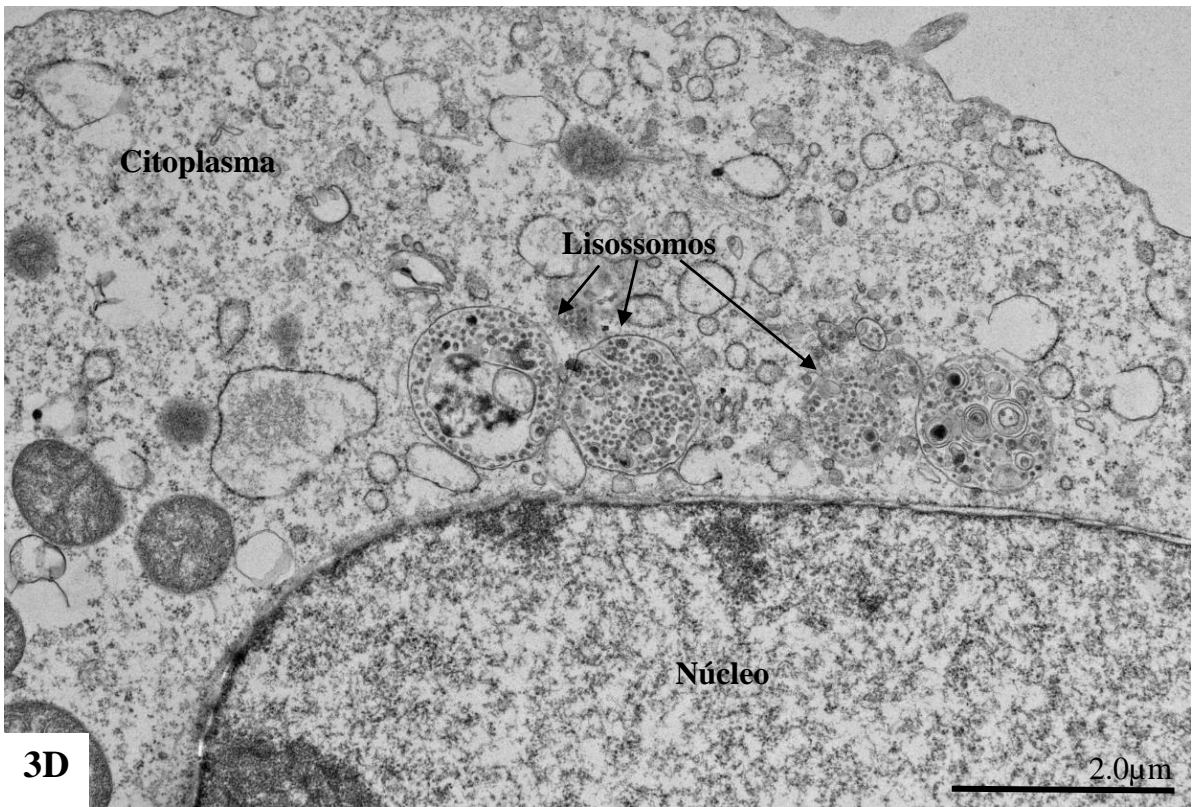
4.3.1. Análises ultraestruturais por MET

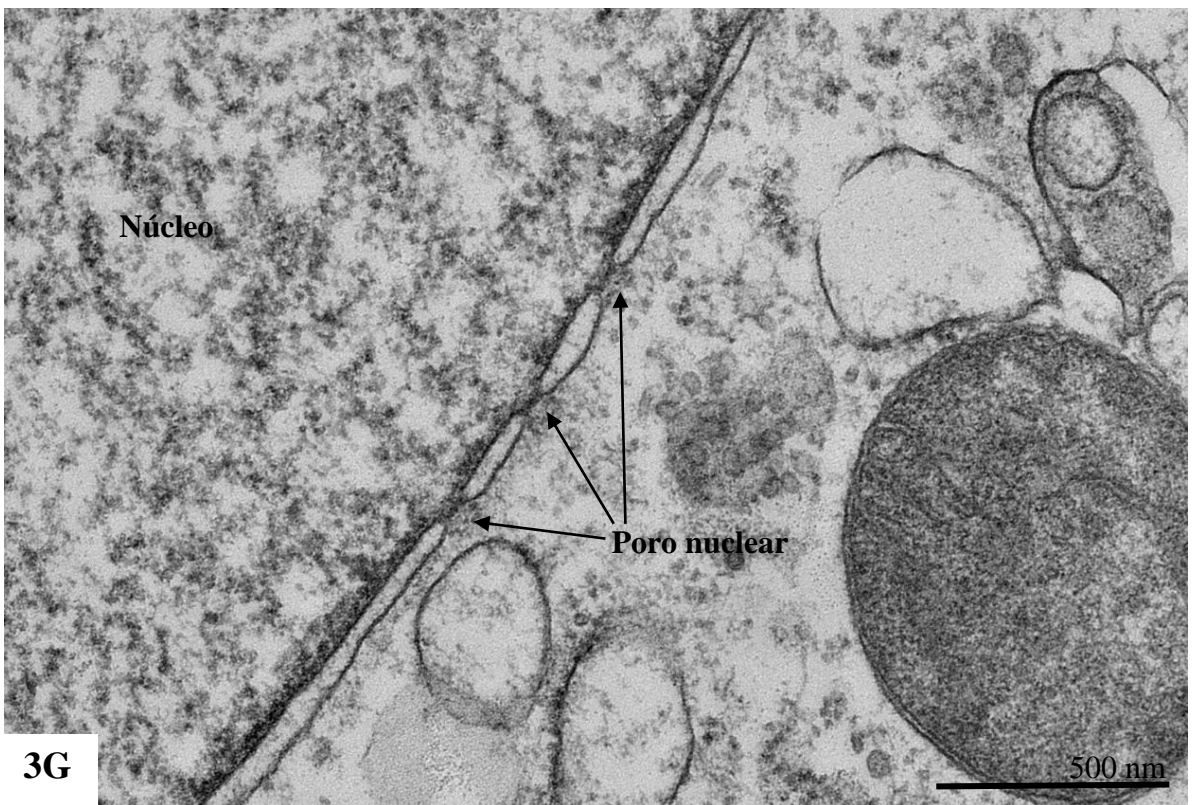
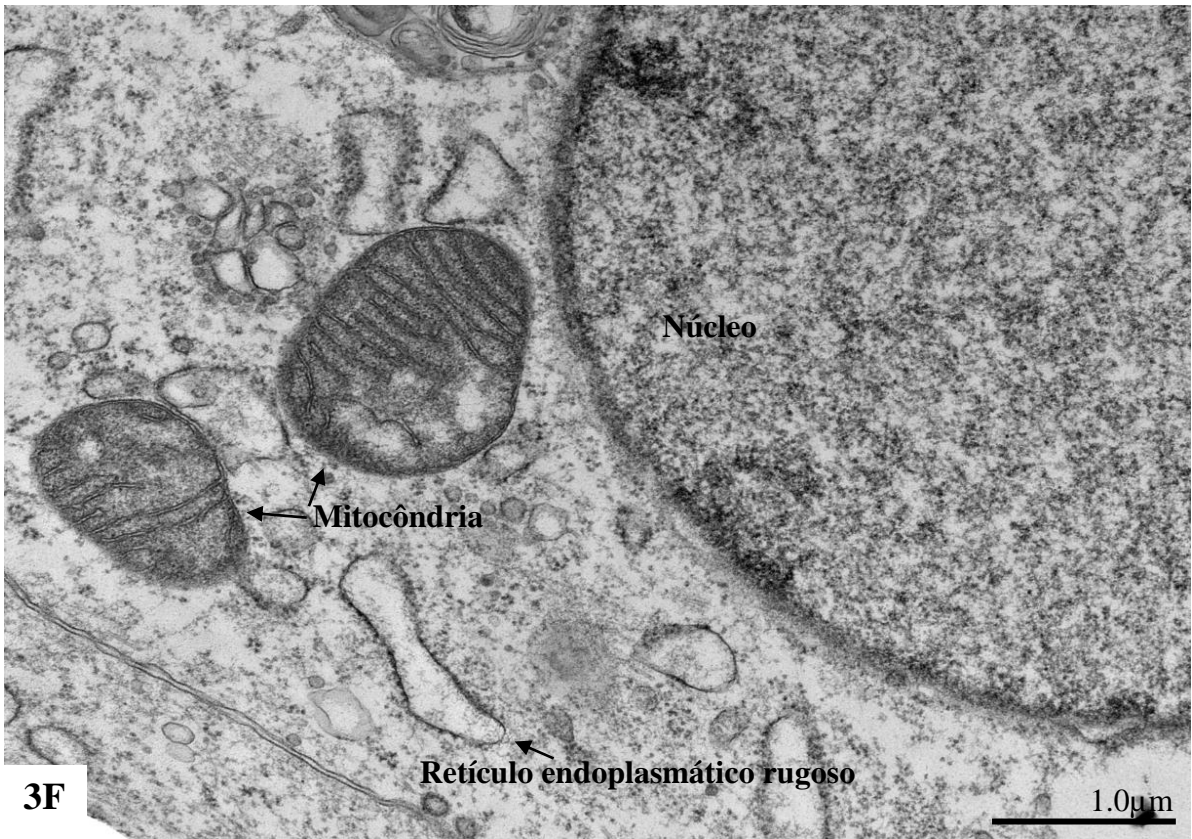
4.3.1.1 Controle da cultura celular

Monocamadas de Células Vero-E6 não infectadas e não tratadas com daclatasvir ou mefloquina foram coletadas com 48 h de cultivo e processadas por técnica padrão para estudos por MET. As análises revelaram células com estrutura preservada, com perfil mitocondrial, padrões de carioteca e cromatina dos núcleos, complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e os lisossomos normais. Poros nucleares apresentaram medidas em torno de 70-100nm e exibiram aparente normalidade da atividade nuclear (Figura 3A-G).





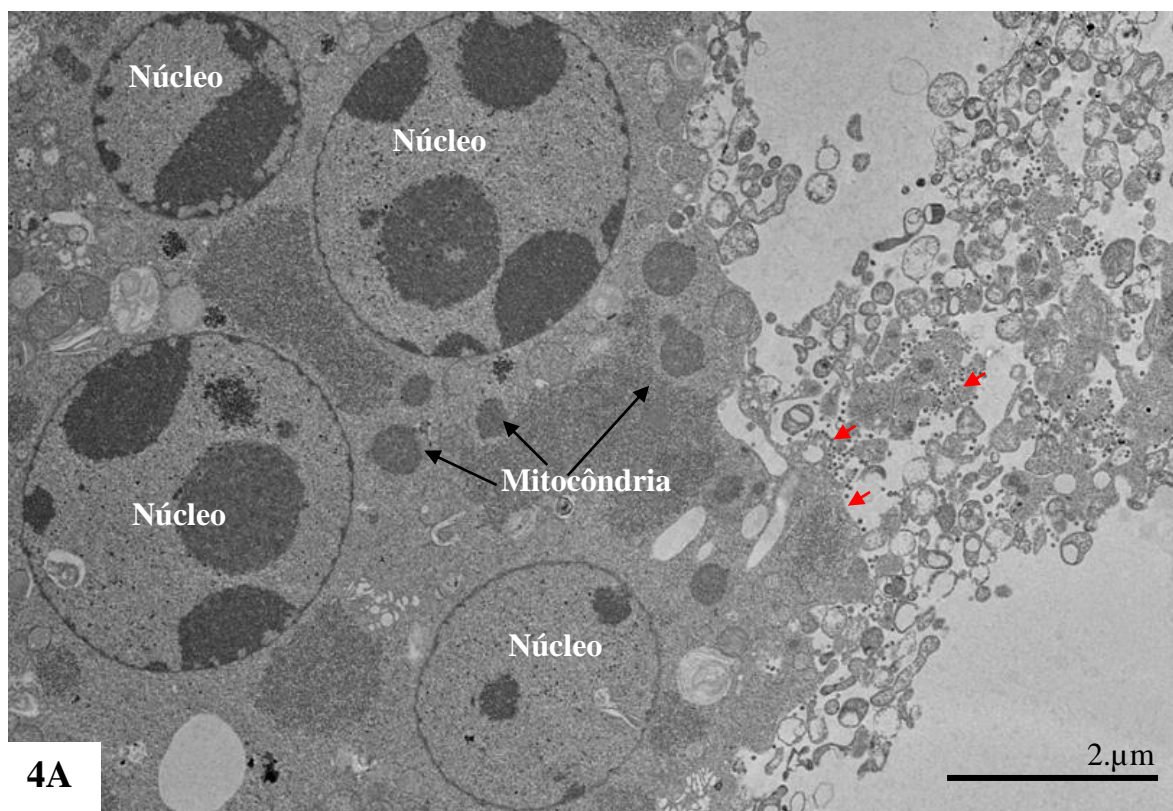


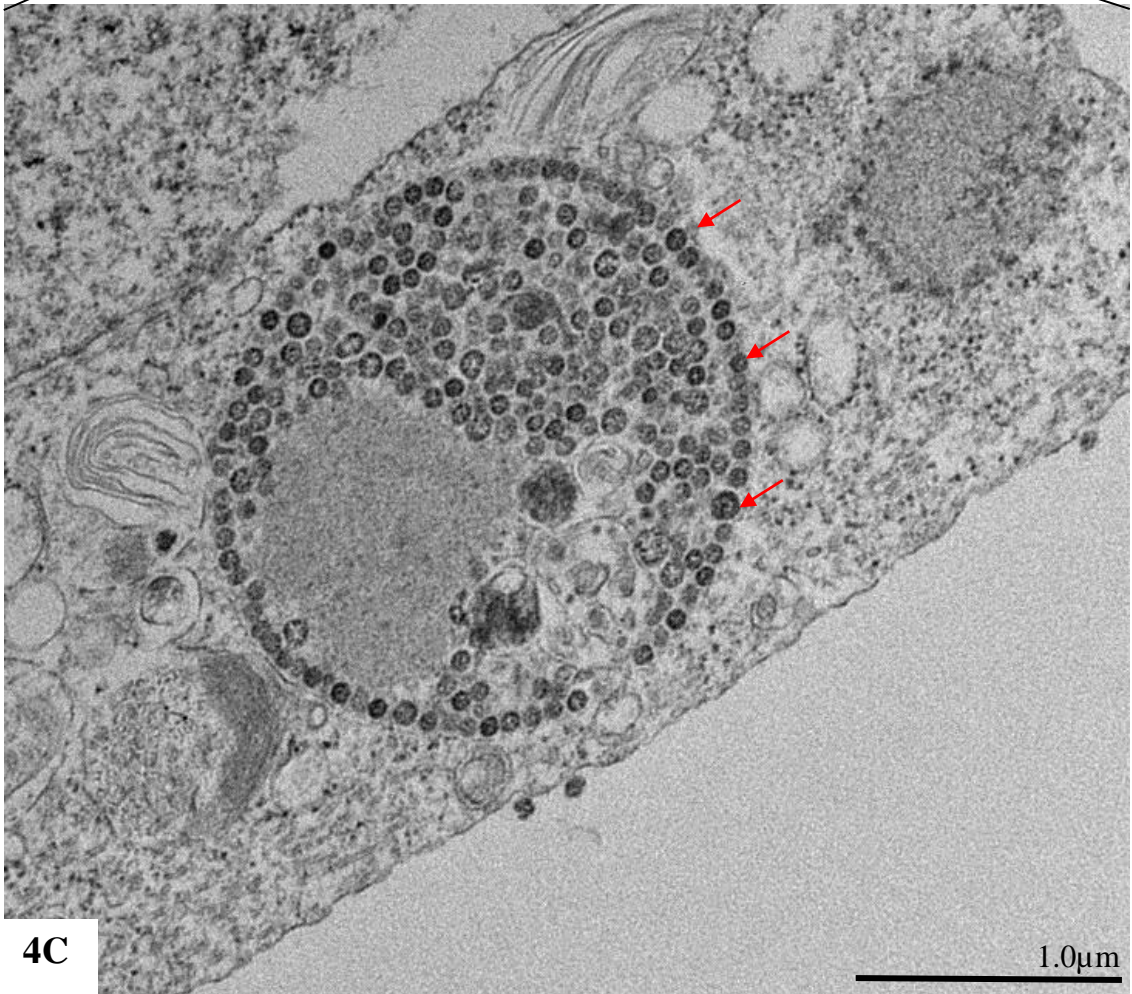
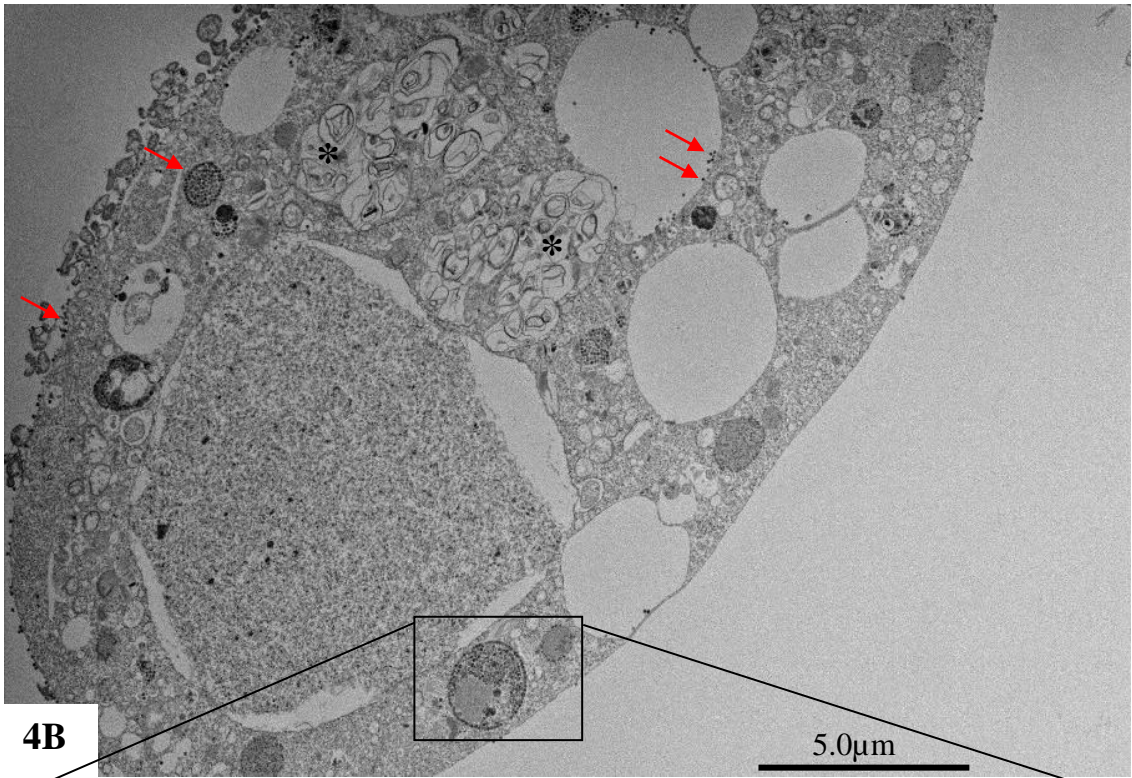


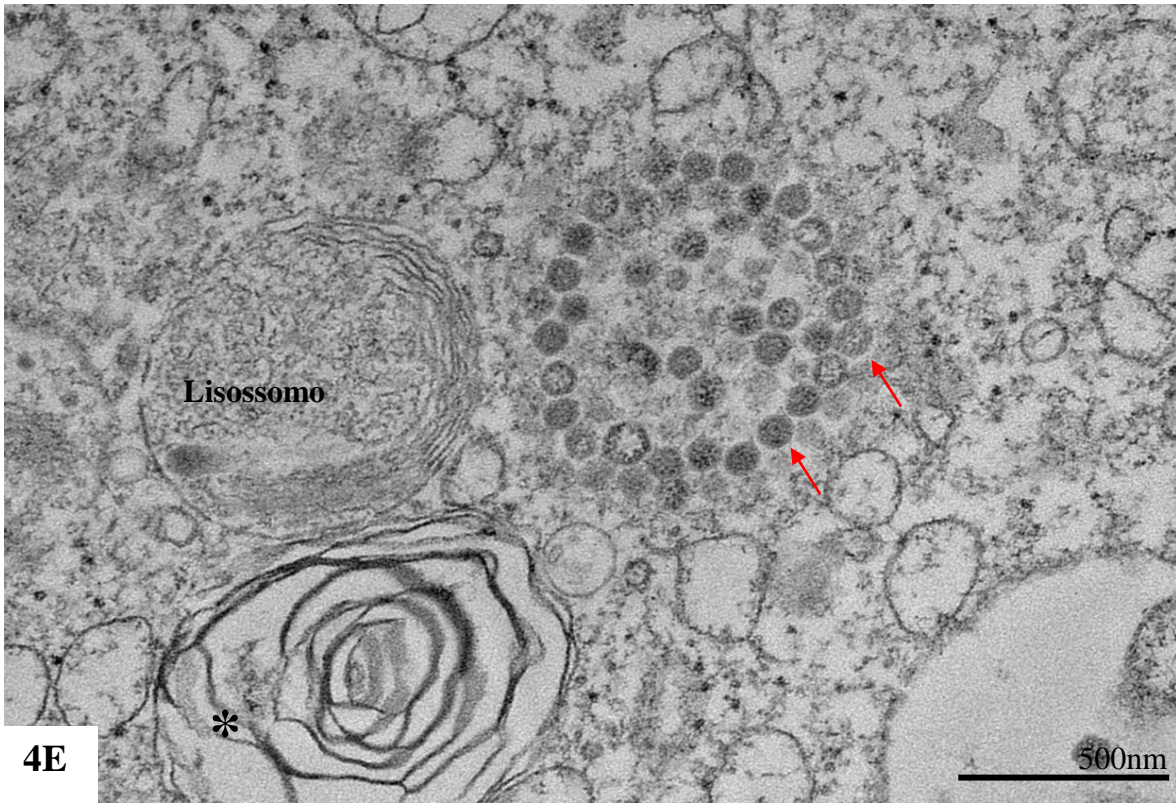
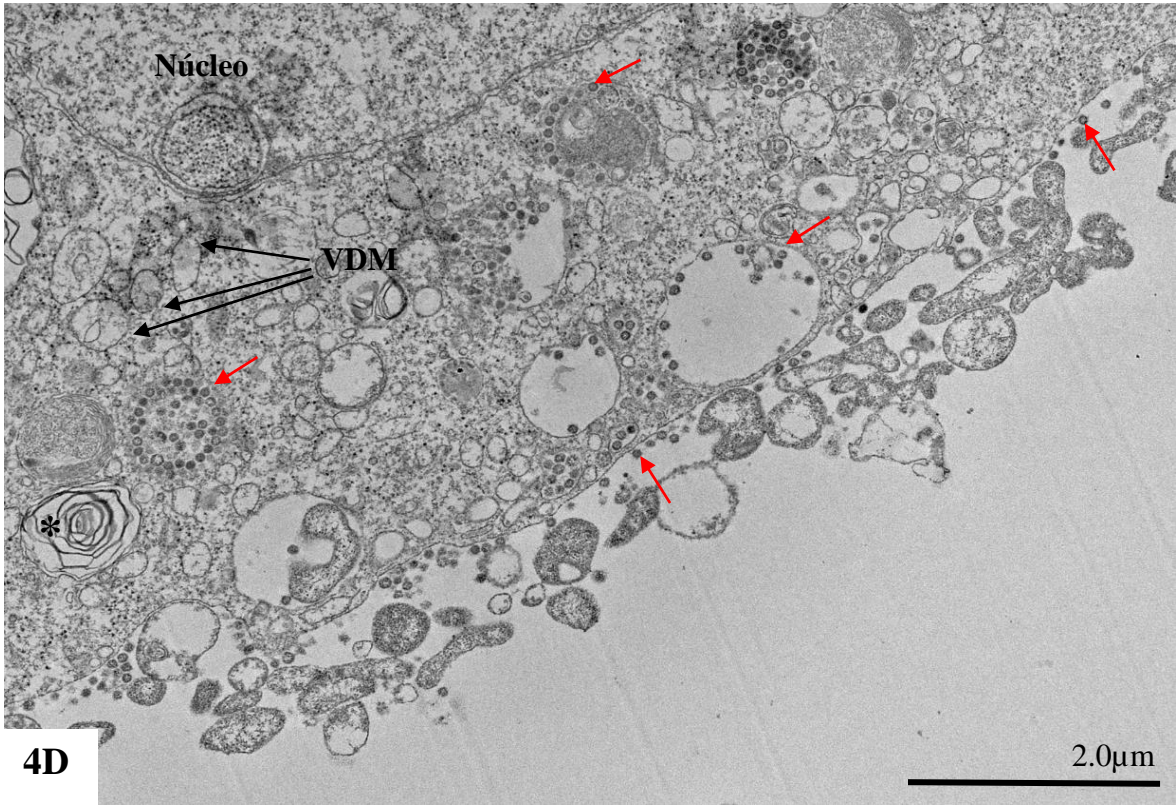
Figuras 3A-G: Células Vero-E6 não infectadas e não tratadas com mefloquina ou daclatasvir coletadas com 48 h de cultivo. Células sem alterações morfológicas (A). Núcleo (A-C, E, G) retículo endoplasmático rugoso (E, F) e complexo de Golgi (B, C) com perfis normais. Mitocôndrias com as cristas dispostas regularmente (E, F), membrana nuclear com um perfil elétron-denso e bem delineada. Núcleo (A-C, E, G) e lisossomos contendo em seu lúmen material com diferentes perfis de elétron-densidade (D). Poros nucleares com as medidas entre 70 e 100nm.

4.3.1.2. Controle da infecção pelo SARS-CoV-2 da cultura celular

Monocamadas de Células Vero-E6 infectadas com MOI de 0,01 e não tratadas com daclatasvir ou mefloquina foram coletadas com 48 h p.i. e processadas por técnica padrão para estudos por MET. As células exibiram diferentes alterações morfológicas tais quais: formação de sincícios, proliferação de vesículas de membrana dupla, figuras de mielina, projeções de membrana citoplasmática (filopódios), perfil mitocondrial alterado, nucléolos muito elétron-densos. Partículas virais foram observadas adsorvidas à membrana citoplasmática e em diferentes compartimentos celulares. As partículas virais observadas apresentaram diâmetro entre 80 e 120 nm (Figura 4A-E).



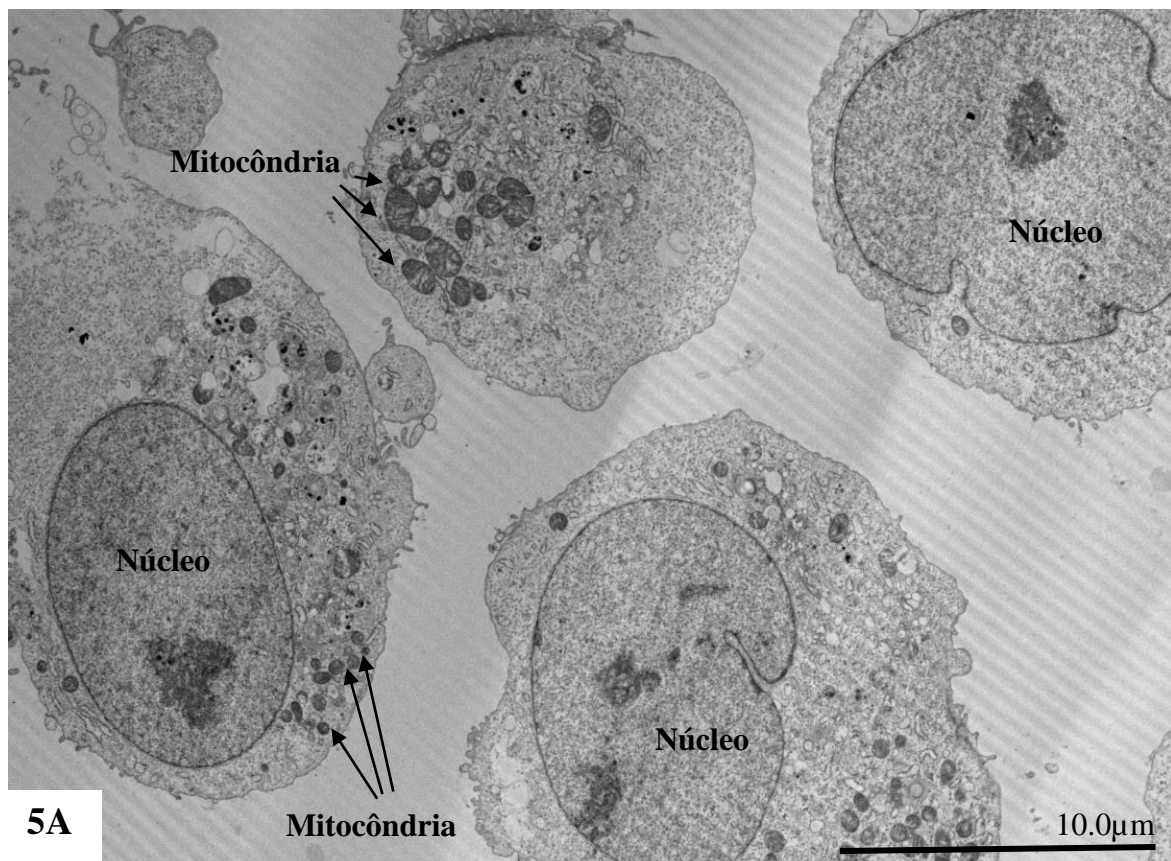


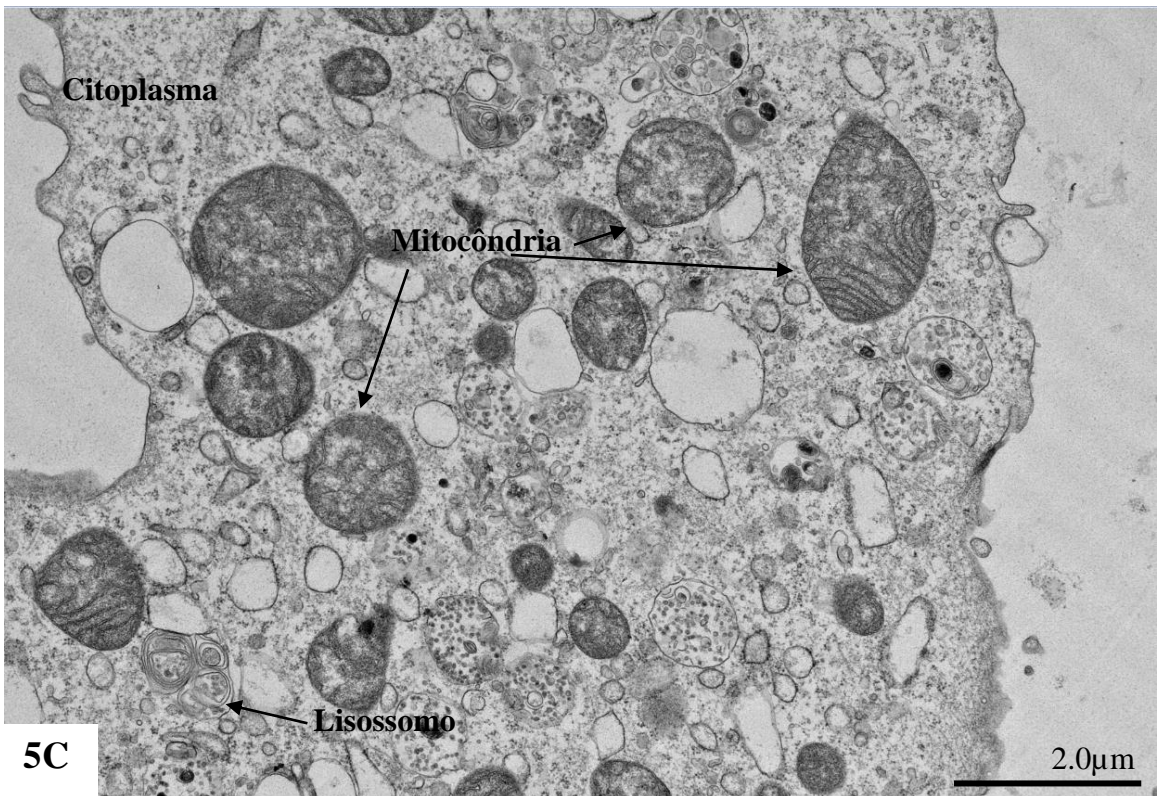
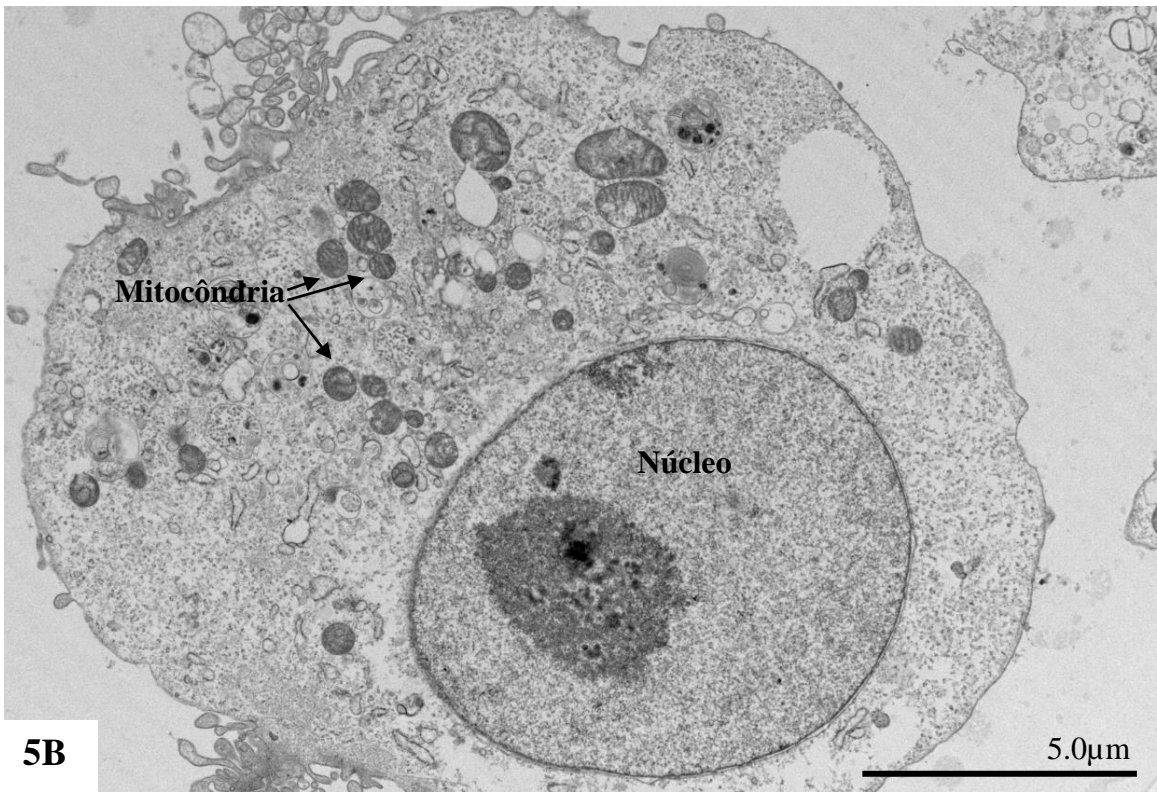


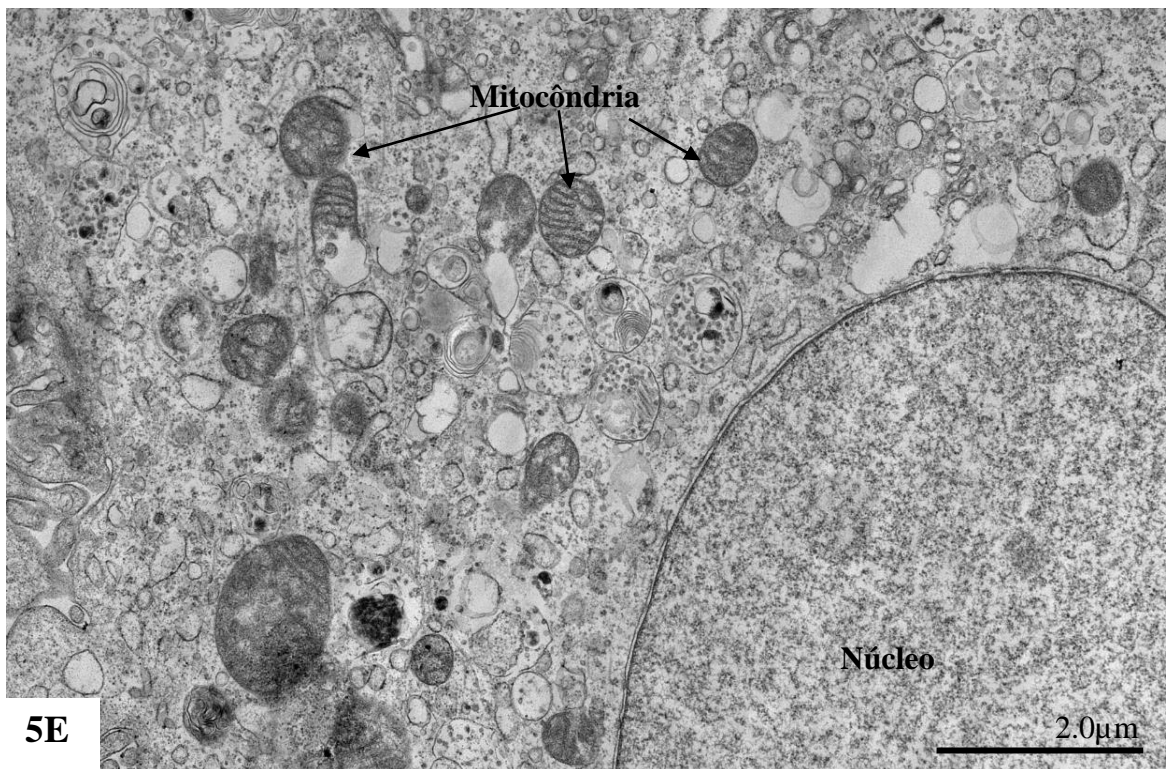
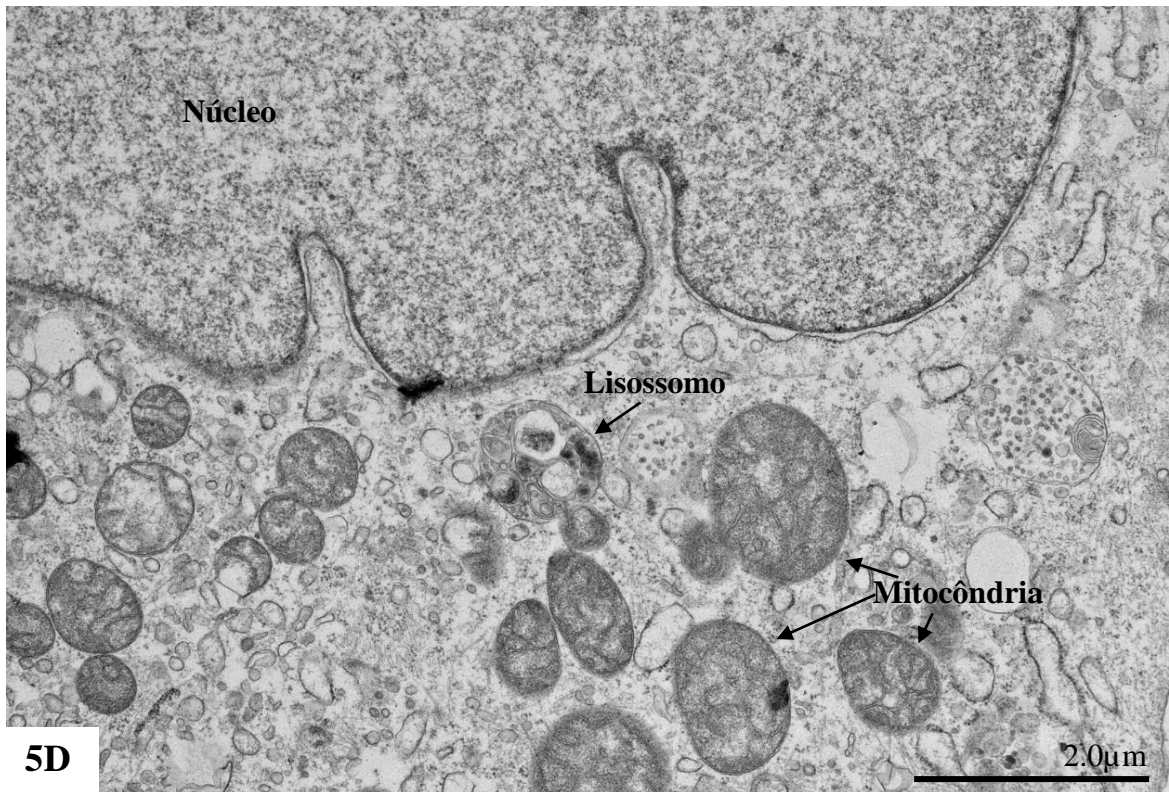
Figuras 4A-E: Células Vero-E6 48h p.i. com SARS-CoV-2, MOI de 0,01. Formação de sincícios e alterações no perfil das mitocôndrias, figuras de mielina (asterisco) (B, D) e proliferação de vesículas de dupla membrana (VDM) (D). Partículas virais (setas vermelhas) (A-E) adsorvidas à membrana citoplasmática e em diferentes compartimentos celulares.

4.3.1.3 Ação antiviral do Daclatasvir

Para avaliar a citotoxicidade do daclatasvir, monocamadas de células Vero-E6 não infectadas tratadas e coletadas com 48h de cultivo foram processadas por técnicas padrão e analisadas por MET. As análises revelaram perfis mitocondrial e nuclear normais. Os compartimentos celulares apresentaram-se dispostos de forma regular; por raras vezes foram observadas projeções da membrana citoplasmática e retículo endoplasmático rugoso espessado (Figura 5A-E).



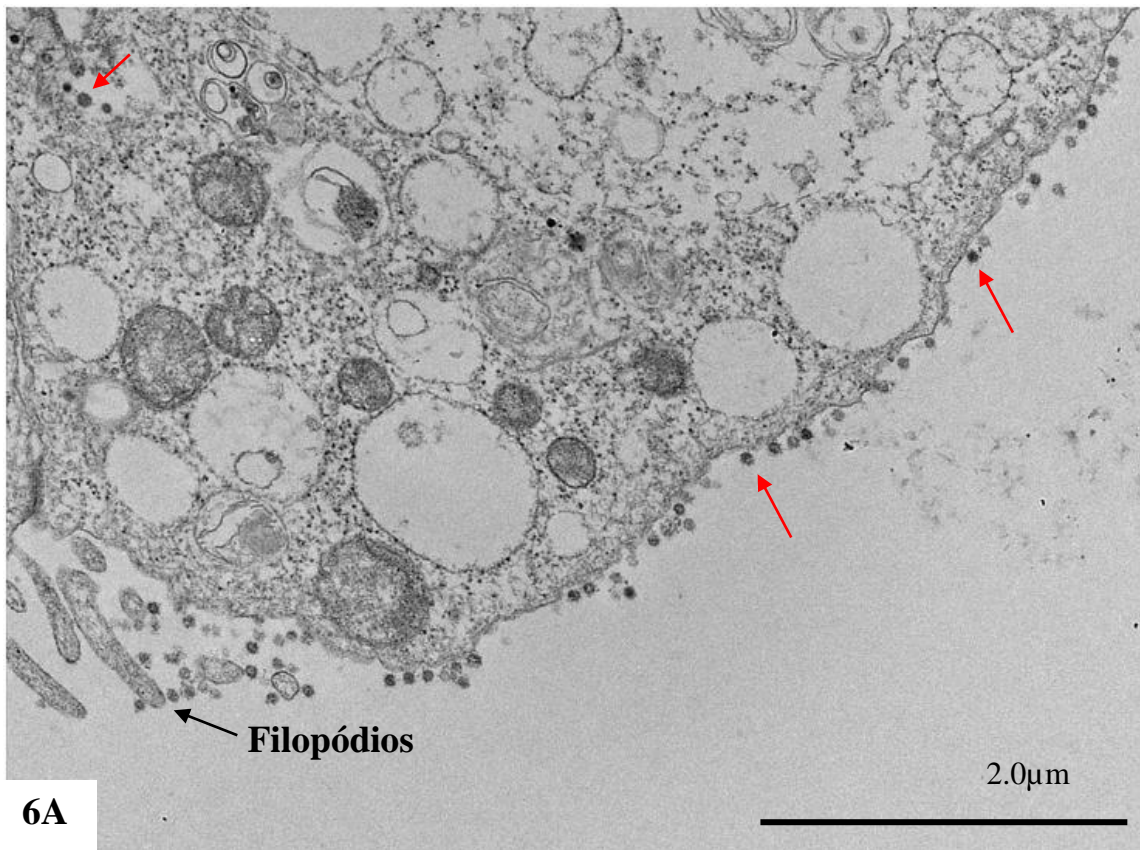


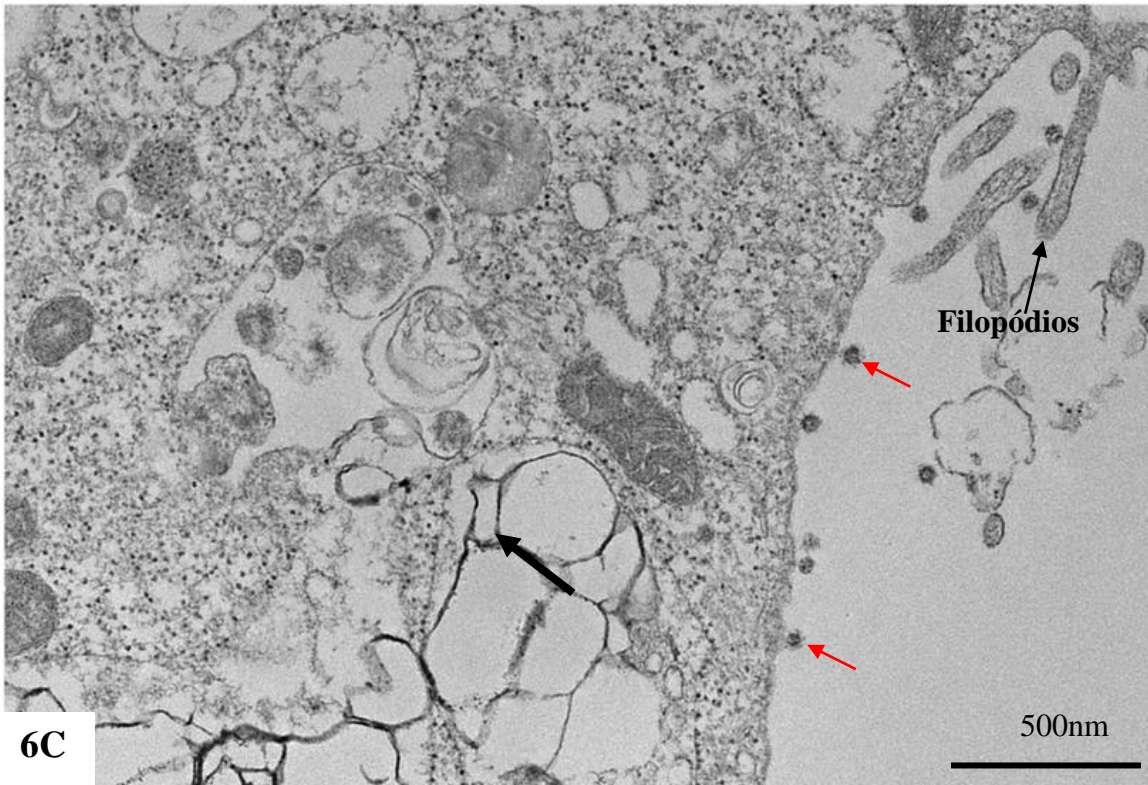
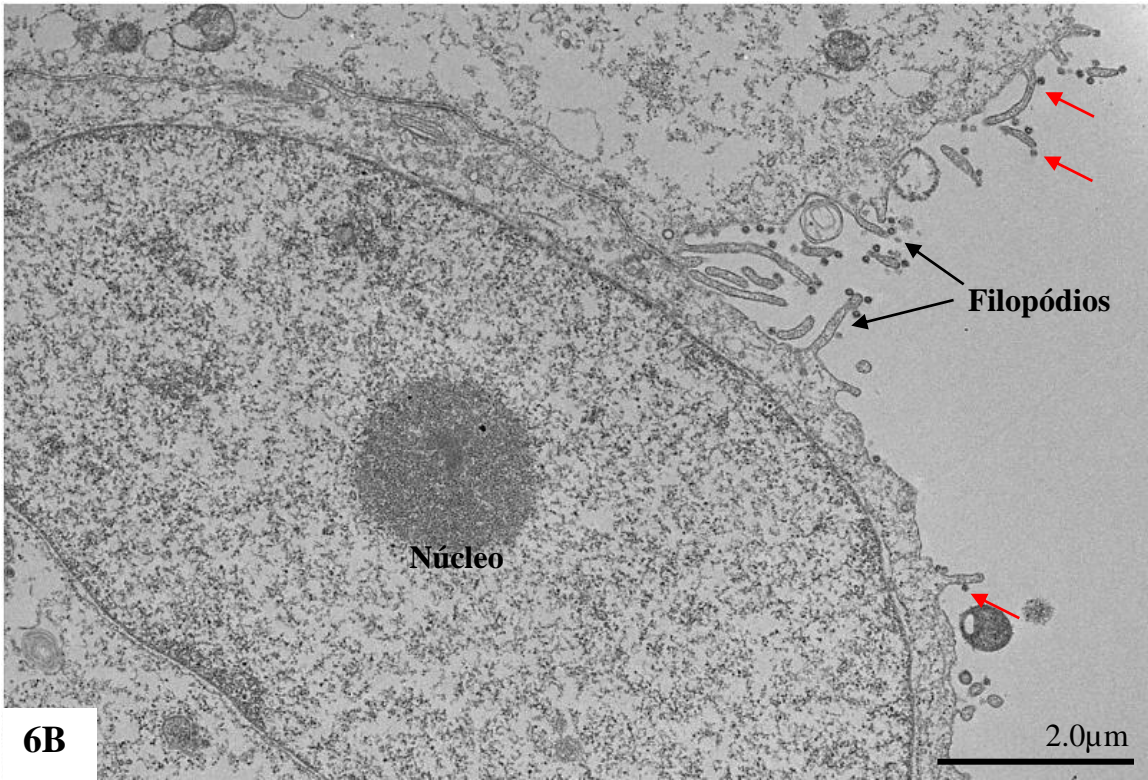


Figuras 5A-E: Células Vero-E6 tratadas com Daclatasvir 10μM e coletadas com 48h de cultivo. Núcleos apresentando suas membranas bem delimitadas e de morfologia preservada (A, B, D, E). Mitocôndrias normais (A-E). Algumas poucas mitocôndrias apresentaram rompimento da membrana (E).

Após avaliação da citotoxicidade, foi avaliada a ação antiviral do Daclatasvir 10 μM em células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2.

Células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2 com MOI 0,01, tratadas com Daclatasvir a 10 μM e coletadas com 48h p.i., exibiram perfil mitocondrial normal assim como os núcleos e lisossomos. As alterações morfológicas observadas foram: alteração no complexo de Golgi, presença frequente de vacúolos e de figuras de mielina, proliferação de vesículas de dupla membrana, projeções de membrana citoplasmática (filopódios) e espessamento de retículo endoplasmático rugoso. Raras partículas virais foram observadas no citosol e adsorvidas aos filopódios (Figura 6A-E).





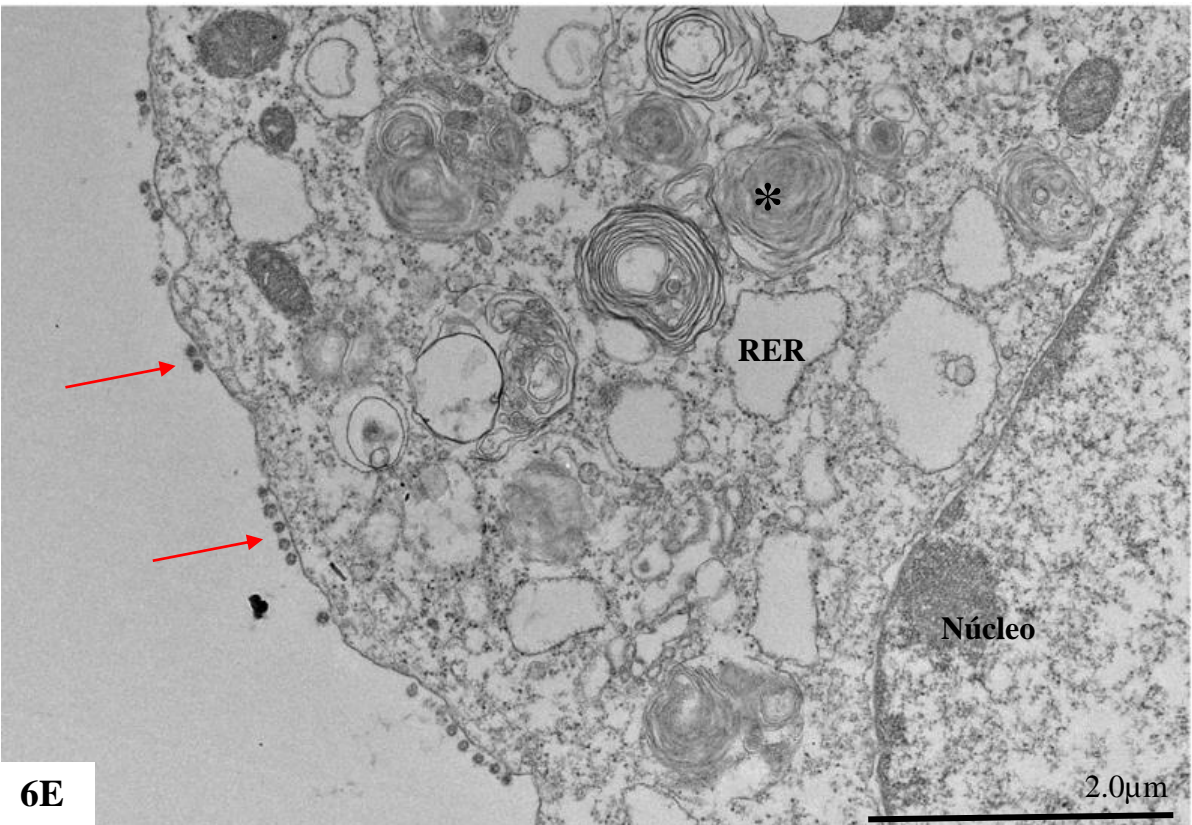
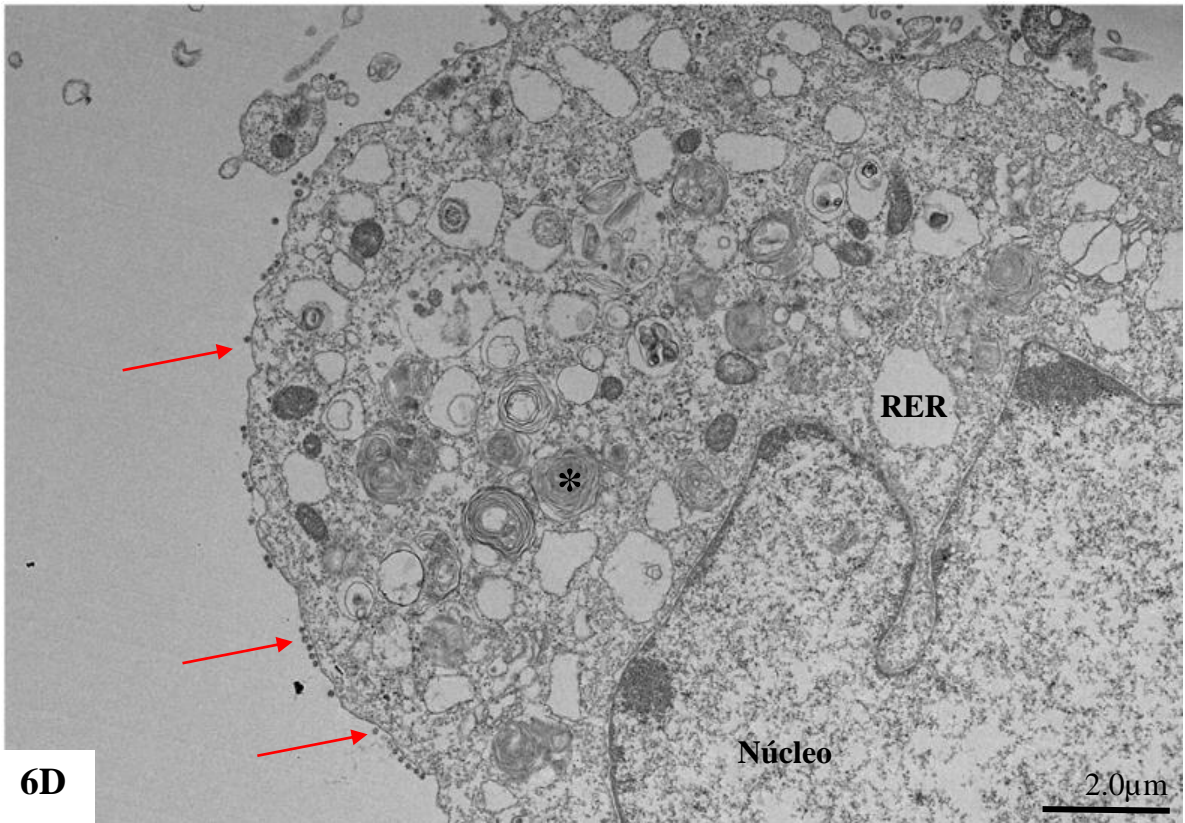
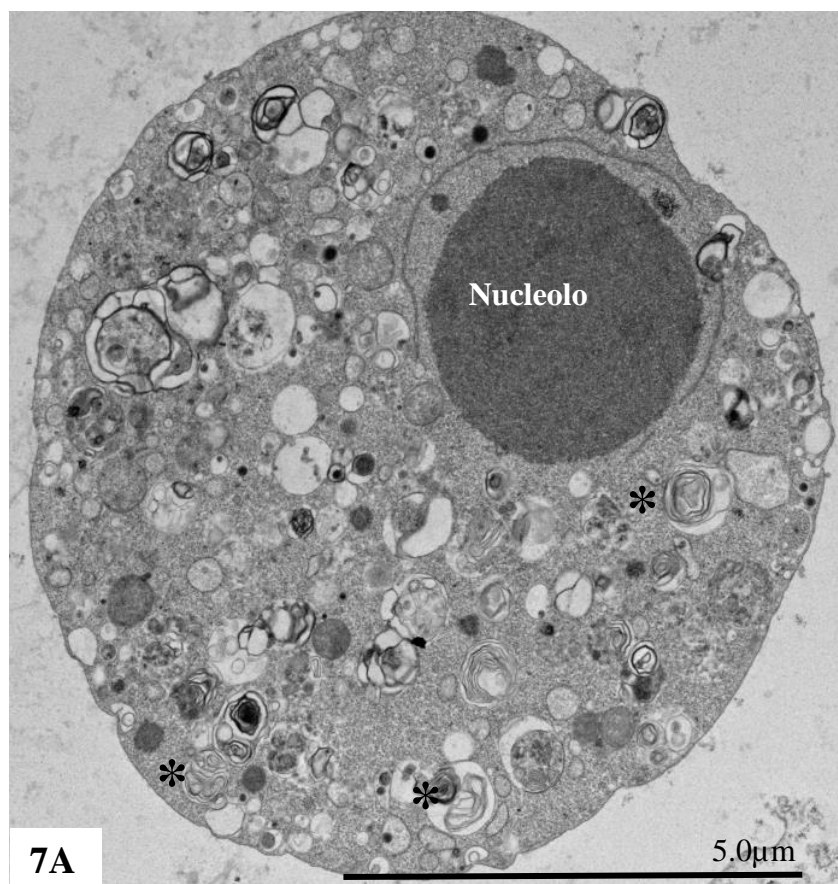
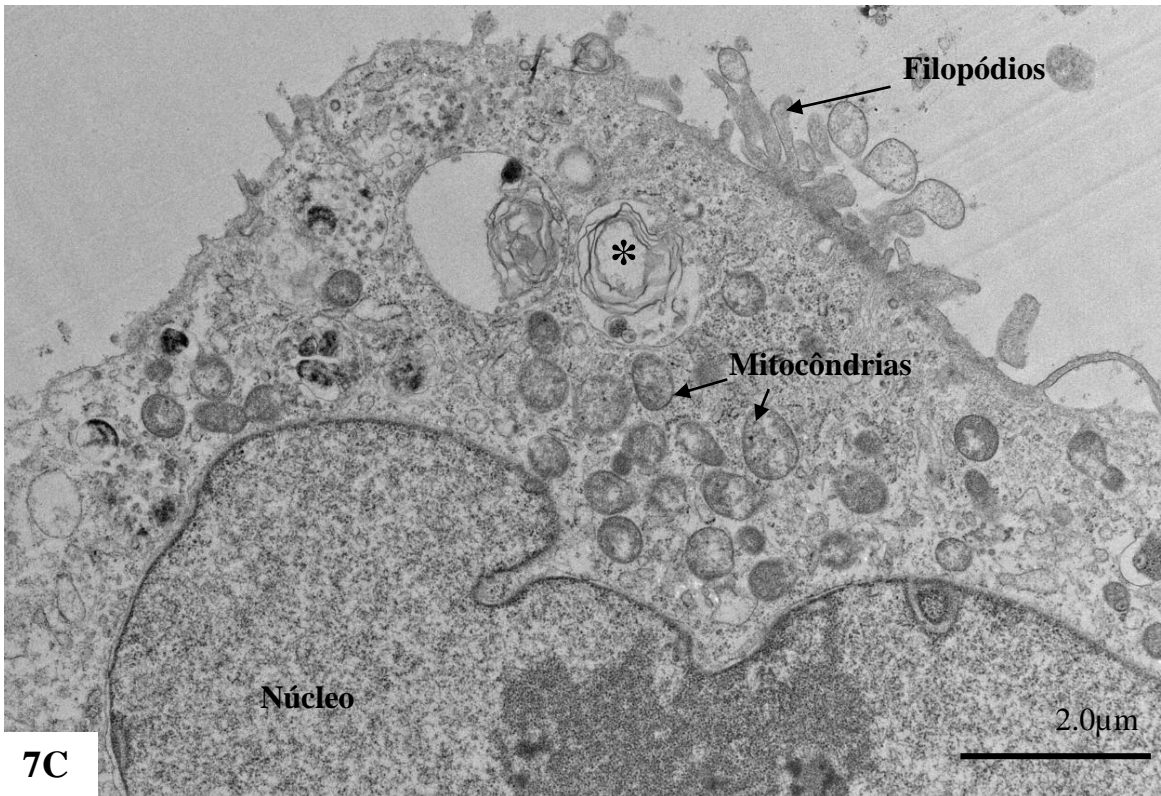
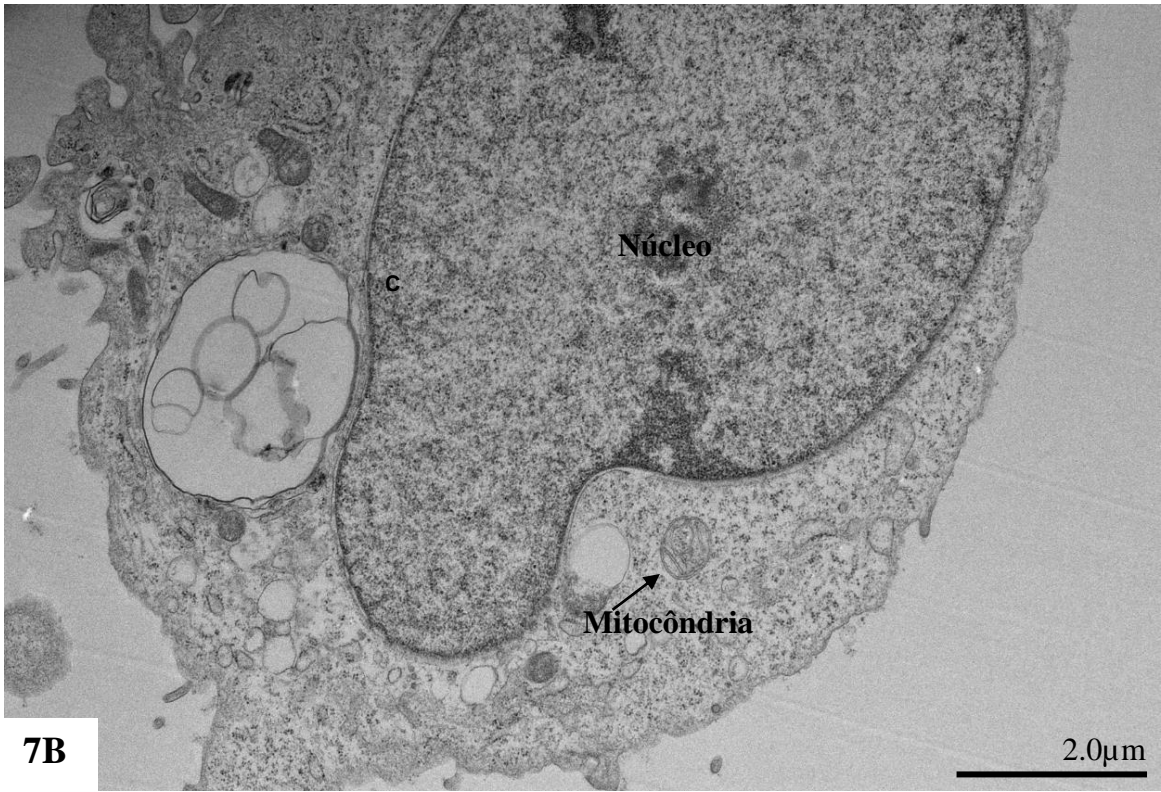


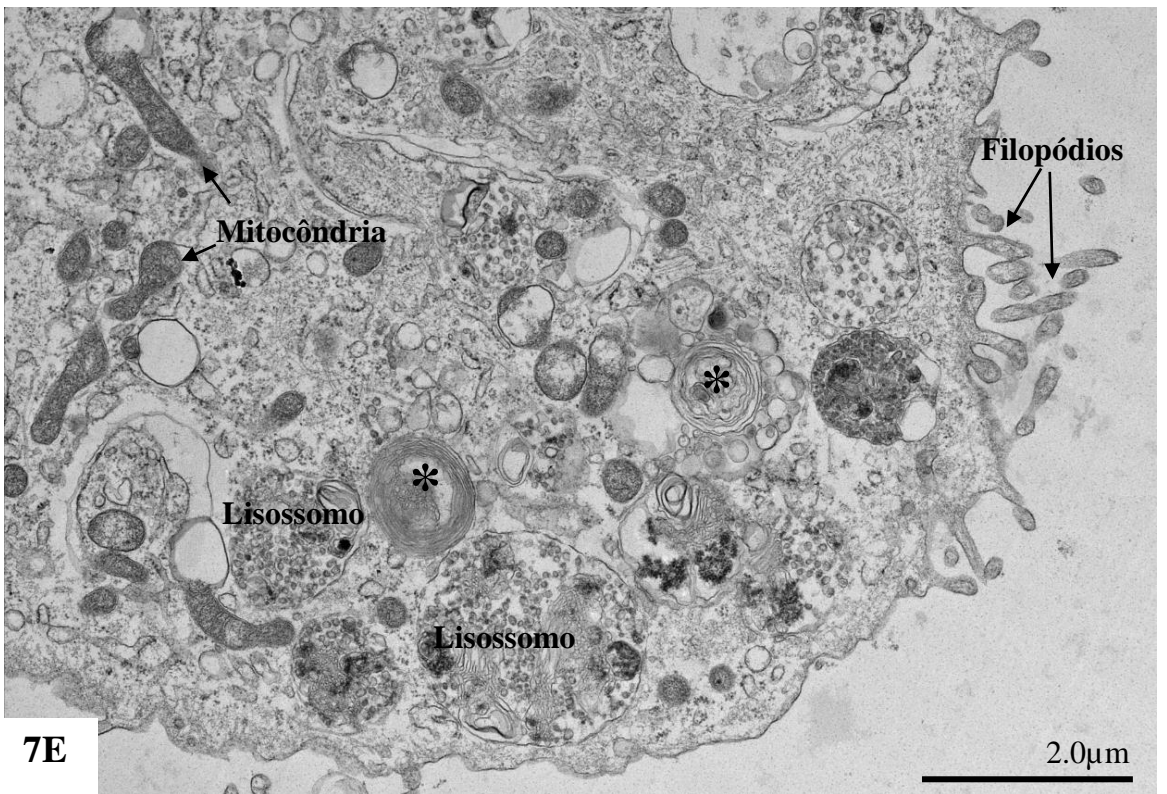
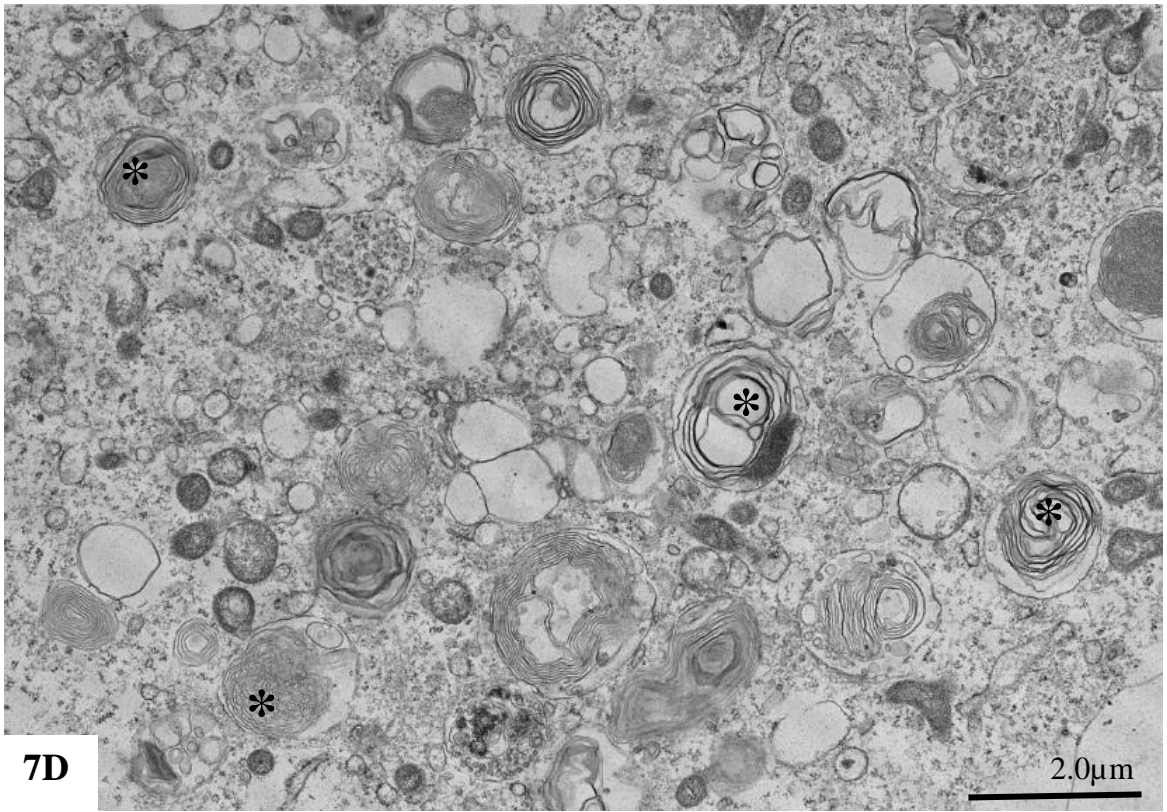
Figura 6D-E: Células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2 com MOI 0,01, tratadas com Daclatasvir a 10 μ M e coletadas com 48h p.i. Partículas virais (seta vermelha) adsorvidas à membrana citoplasmática (A, C, D, E) e à filopódios (A, B, C); raras partículas em vesículas no citosol (A). Retículo endoplasmático espessado (RER) (D, E) e figuras de mielina (asterisco) (D, E).

4.3.1.4 Ação antiviral da Mefloquina

Para avaliar a citotoxicidade da mefloquina, monocamadas de células Vero-E6 não infectadas tratadas e coletadas com 48h de cultivo foram processadas por técnicas padrão e analisadas por MET. Nos *pellets* recolhidos havia um número bastante diminuído de células e as análises ultraestruturais revelaram diferentes alterações morfológicas, tais como: perfil mitocondrial anormal, núcleos apresentando carioteca espessada e desconectada dos corpos de cromatina, presença frequente de figuras de mielina, espessamento de ribossomos, vacúolos e corpúsculos amorfos elétrondensos e espessamento das cisternas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso. Por raras vezes foram observadas projeções da membrana citoplasmática (Figura 7A-G).







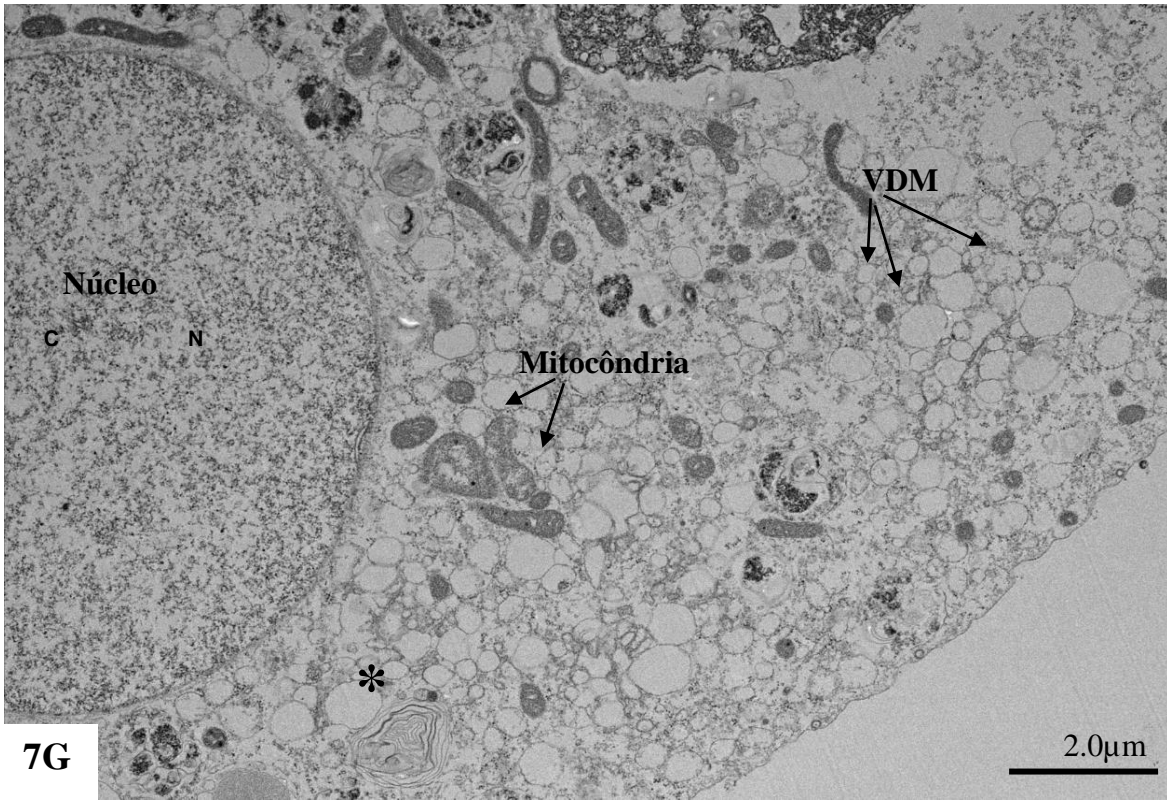
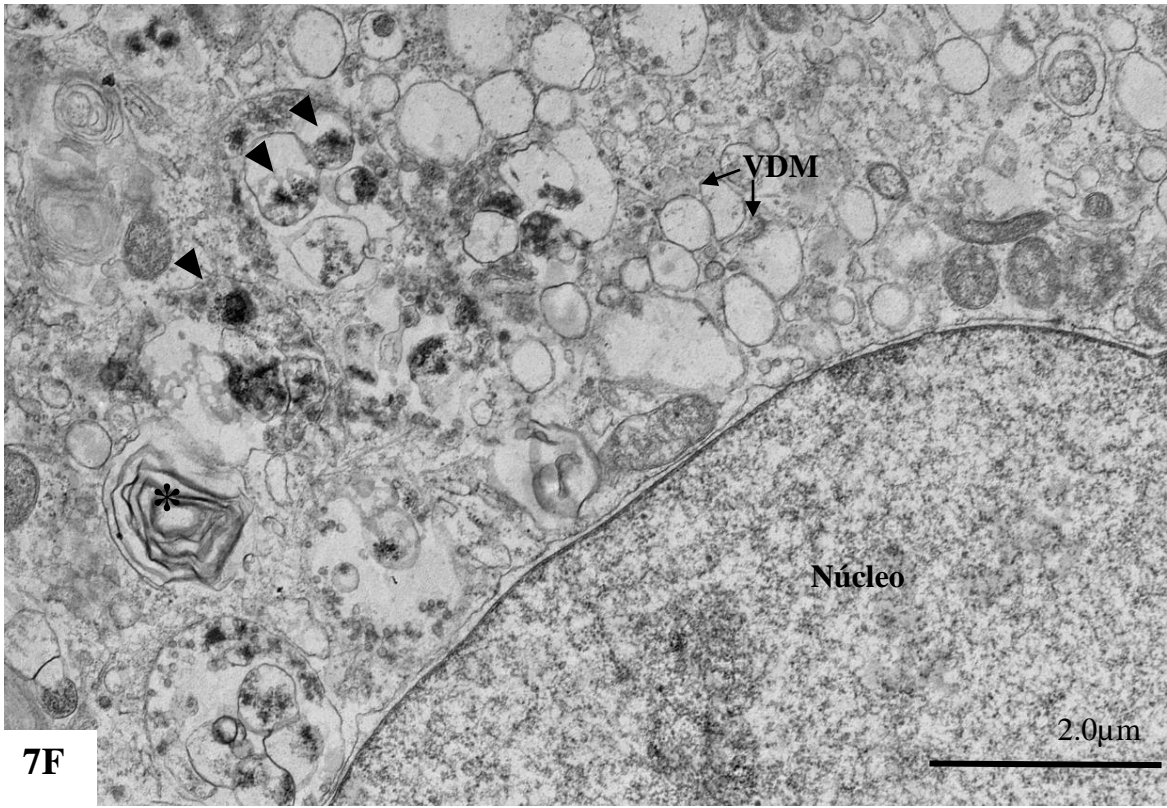
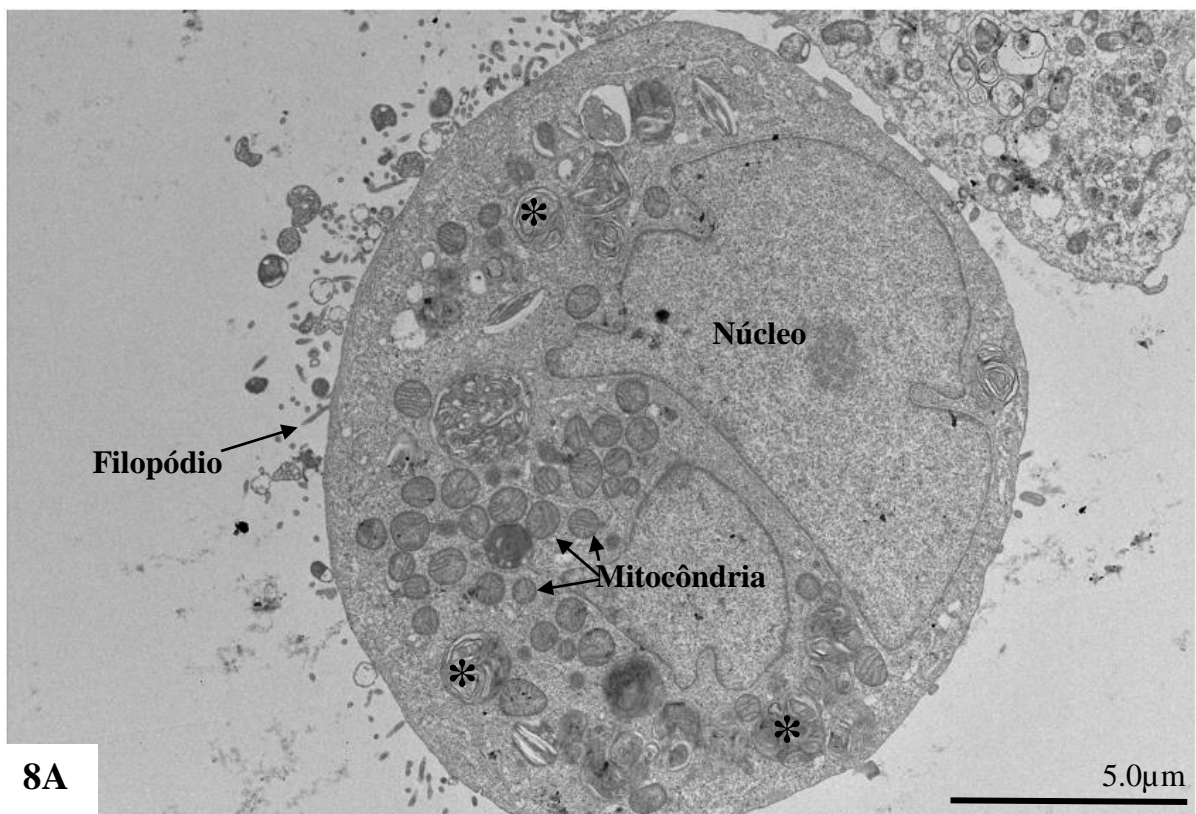
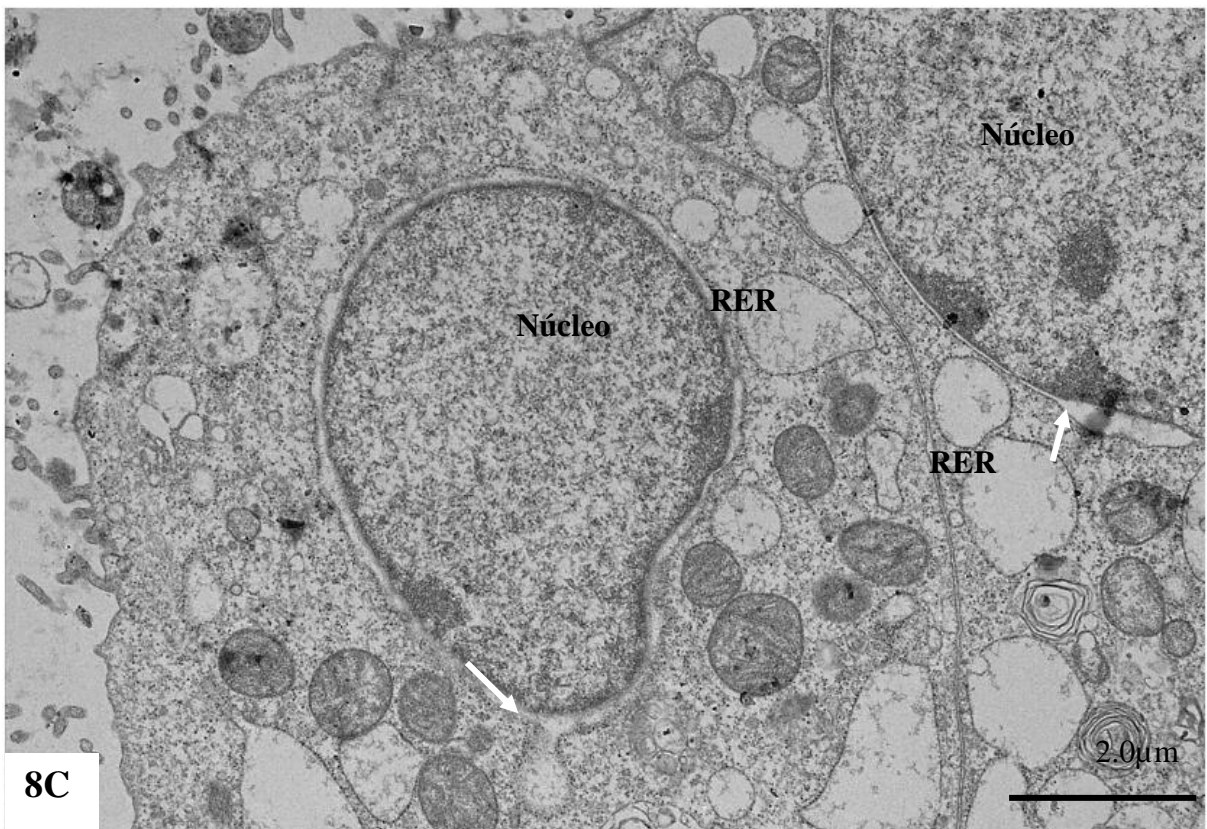
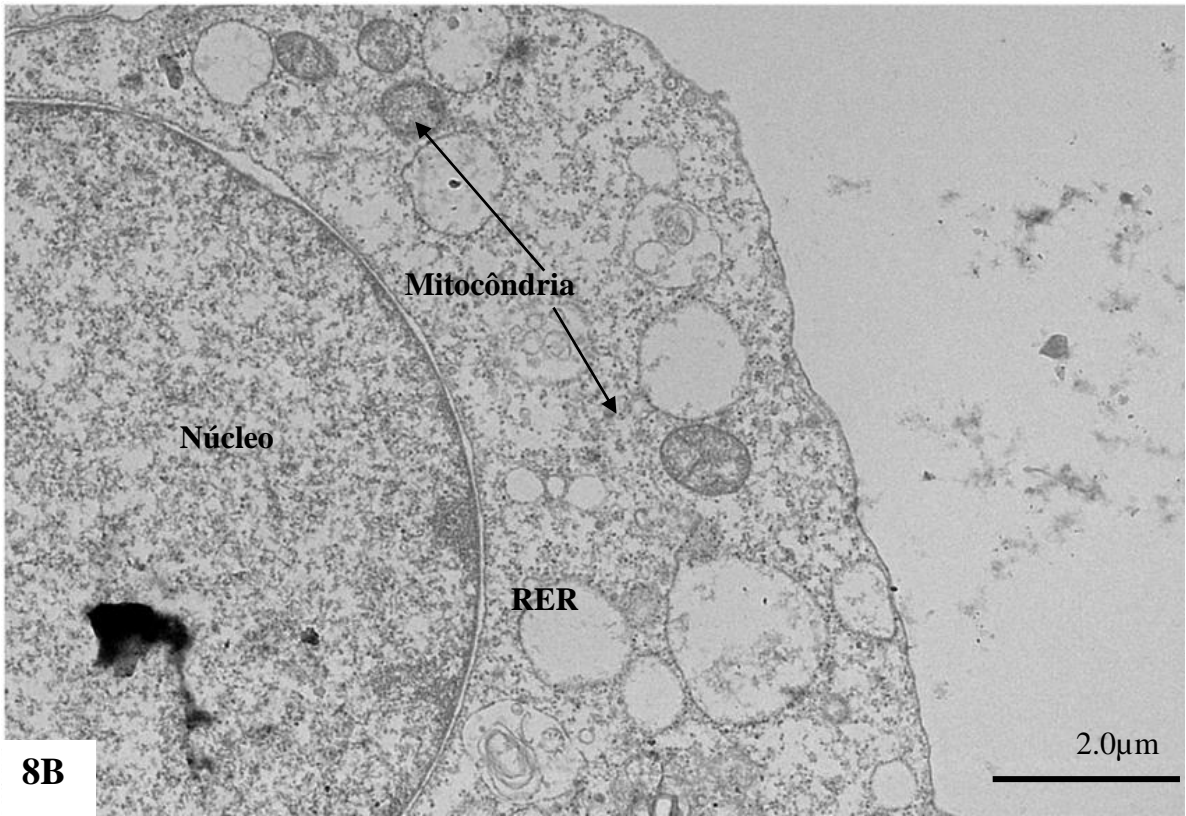


Figura 7A-G: Células Vero-E6 não infectadas, tratadas com Mefloquina a 10µM e coletadas com 48h de cultivo. Note ribossomos e nucléolo espessado (A), mitocôndrias alteradas (B, E, G), proliferação de vesículas de dupla membrana (VDM) (F), lisossomos com material amorfo elétron-denso em seu lúmen (cabeça de seta) (F) e inúmeras figuras de mielina (asterisco) (A, C, D, E, F, G). Membrana citoplasmática apresentando projeções de membrana (filopódios) (C, E).

Após avaliação da citotoxicidade, foi avaliada a ação antiviral da mefloquina 10 µM em células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2

Células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2 com MOI 0,01, tratadas com Mefloquina a 10µM e coletadas com 48h p.i., exibiram alterações morfológicas como as observadas nas monocamadas tratadas não infectadas: perfil mitocondrial anormal, núcleos apresentando carioteca espessada e desconectada dos corpos de cromatina, presença frequente de figuras de mielina, espessamento de ribossomos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso, presença de corpúsculos amorfos elétron-densos e filopódios. Não foram observadas partículas virais adsorvidas à membrana citoplasmática e no citosol (Figura 8A-E).





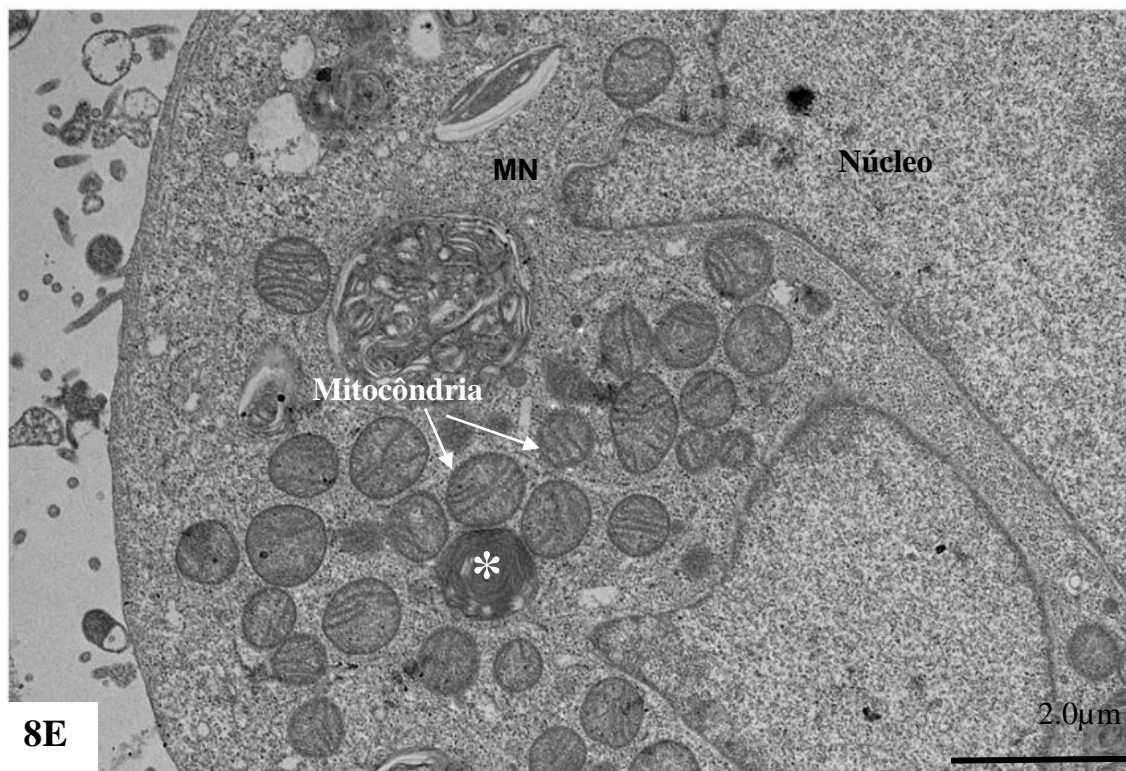
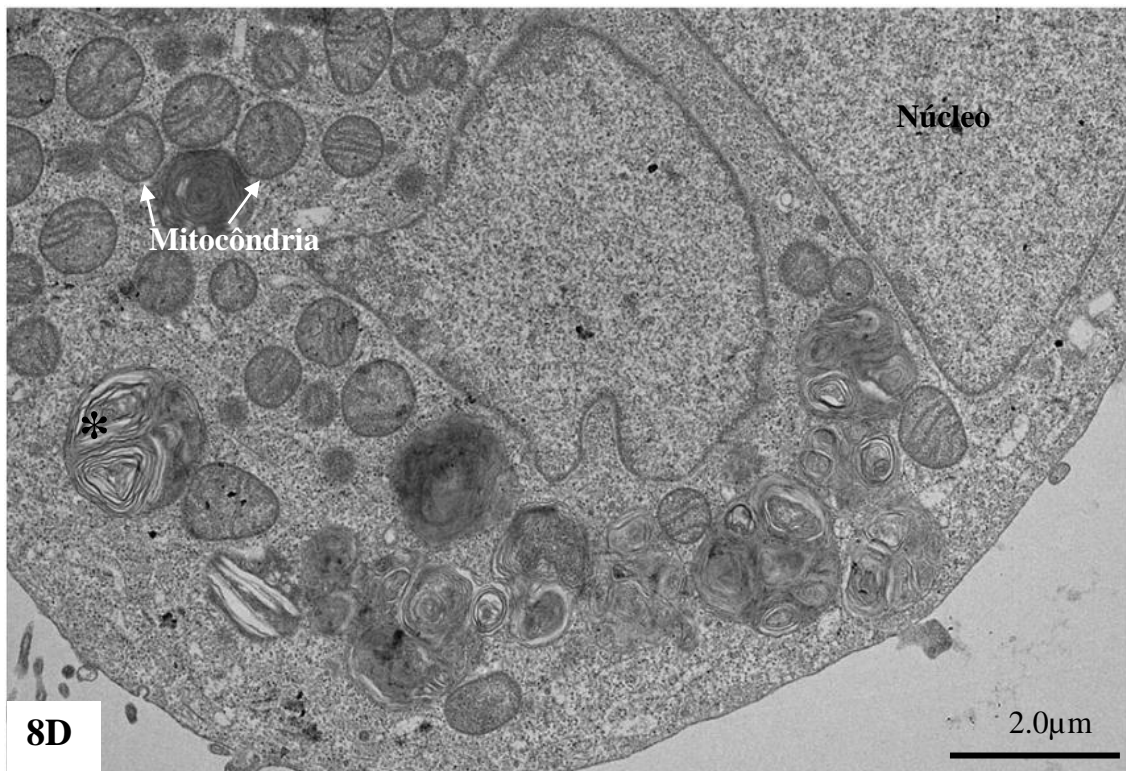


Figura 8D-E: Células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2 com MOI 0,01, tratadas com Mefloquina a 10µM e coletadas com 48h p.i. Note ribossomos (A, D, E) e

retículo endoplasmático rugoso (RER) (B, C) espessados, perfil mitocondrial alterado (A, B, D, E), presença de figuras de mielina (asterisco) (E), membrana nuclear espessada (seta branca) (C), projeções de membrana citoplasmática (filopódios) (A).

4.3.2 Avaliação de citotoxicidade da mefloquina e daclatasvir por MTT

A análise de células metabolicamente ativas foi realizada pelo teste colorimétrico MTT. O tratamento da linhagem celular Vero-E6 com os fármacos candidatos a reposicionamento daclatasvir e mefloquina por 48h a 37°C demonstrou distinto perfil citotóxico destes compostos. Os dados obtidos revelaram o percentual de viabilidade celular média de $94,27 \pm 4,14$ e $8,95 \pm 2,45$, respectivamente, para a concentração de $10\mu\text{M}$ dos compostos previamente citados. Os valores referentes à viabilidade celular foram normalizados a partir da média das células controle, expostas a DMSO, usado para ressuspender as moléculas, na mesma concentração que nas células tratadas, e revelaram elevada sensibilidade apenas nas células submetidas ao tratamento com a mefloquina (Figura 9).

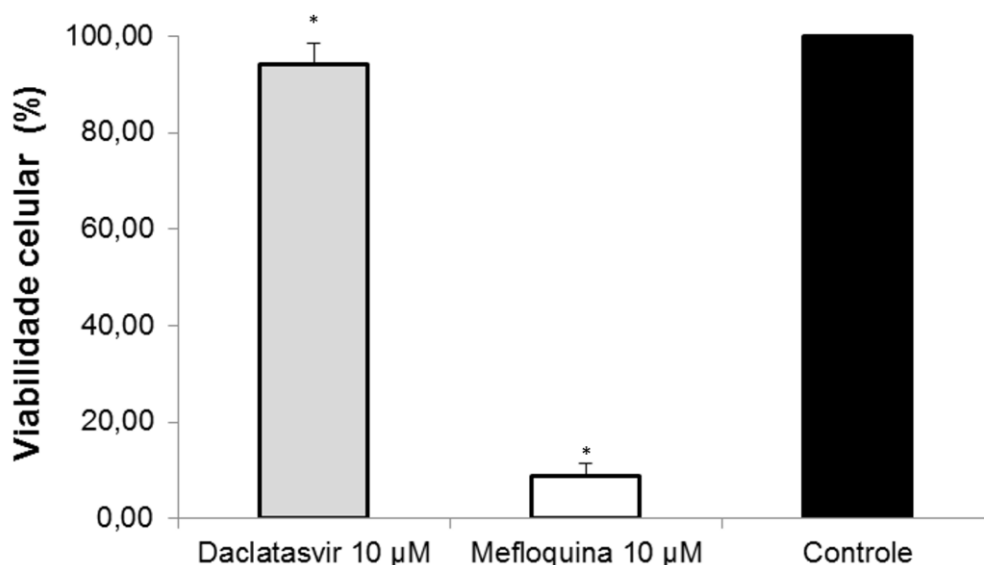


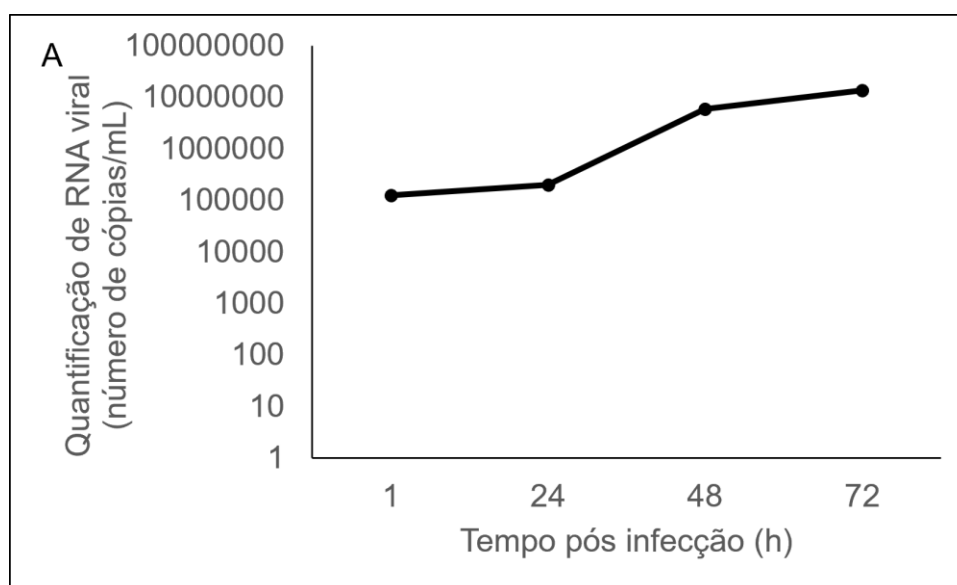
Figura 9: Percentual de células viáveis pós-tratamento com daclatasvir e mefloquina a $10\mu\text{M}$. Células Vero-E6 incubadas por 48h com mefloquina apresentaram elevado efeito citotóxico, contrastando com as células tratadas com daclastavir que apresentaram citotoxicidade reduzida e bastante similar grupo ao controle.

4.3.3 Titulação viral e quantificação de RNA viral a partir dos sobrenadantes das monocamadas pós-tratamento com daclatasvir e mefloquina

A titulação viral e a quantificação de RNA viral foram realizadas, respectivamente, por contagem de placas e qRT-PCR, após os ensaios de infecção viral em células Vero-E6.

Para avaliar o melhor momento para a quantificação viral, foram realizadas coletas sucessivas do sobrenadante de células infectadas e quantificamos o RNA viral diferentes tempos pós-infecção (Figura 11A). Decidimos manter a infecção por até 48 horas, antes de nossas análises, pois nesse tempo temos o aumento de quase 2 logs na quantificação de RNA viral, além de evitarmos muitos ciclos de replicação, com a possível síntese de partículas defectivas, devido a sucessivos *rounds* de infecção.

O tratamento da linhagem celular com os fármacos candidatos a reposicionamento Daclatasvir e mefloquina por 48h a 37°C demonstrou que estas moléculas foram capazes de inibir a replicação viral. Através do ensaio de contagem de placas, os dados obtidos revelaram o percentual de inibição média de 100% e 80%, respectivamente. Os valores referentes à inibição da replicação viral foram comparados com a média dos valores encontrados nos sobrenadantes das células controle, apenas submetidas a infecção sem nenhum tratamento (Figura 11B). A titulação viral por ensaio de placa mostra a capacidade de replicação viral após os tratamentos e a inibição observada se refletiu na análise da quantificação de RNA viral, uma vez que ambas foram reduzidas na presença dos fármacos (Figura 11C).



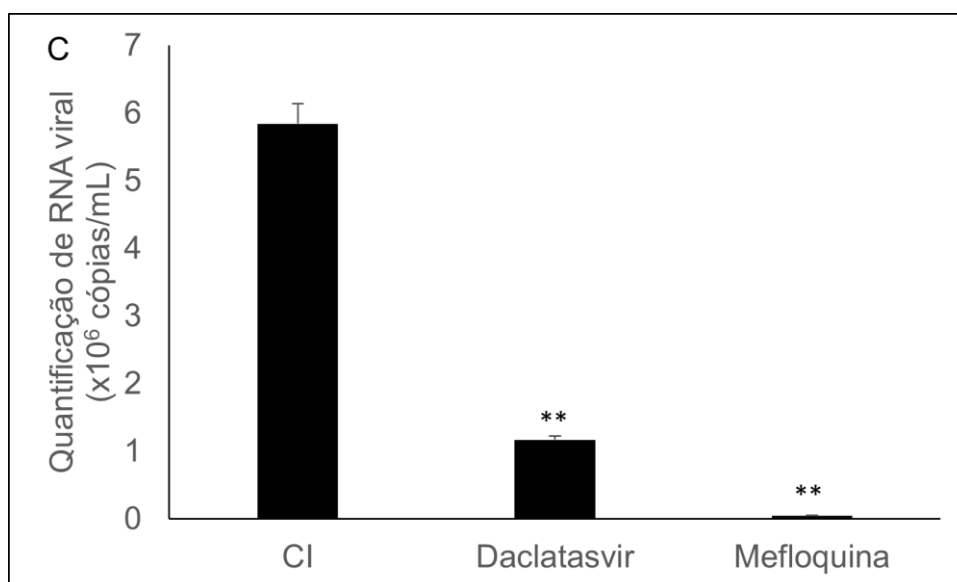
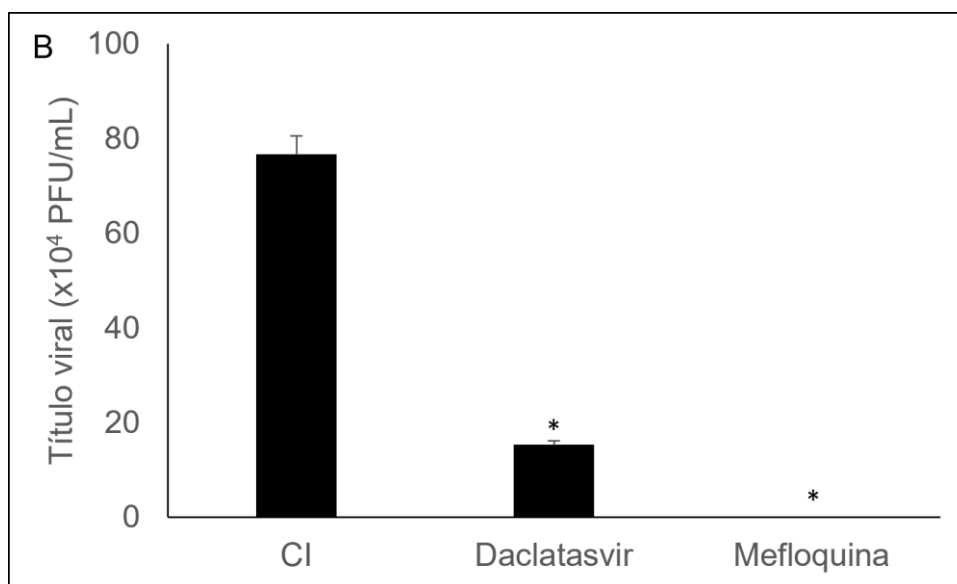


Figura 10: Titulação viral e quantificação de RNA viral pós-tratamento com antivirais. Inicialmente, realizamos uma curva quantificando RNA viral no sobrenadante de células infectadas. Para tal, células Vero-E6 foram infectadas com SARS-CoV-2 no MOI de 0,01 por 1h a 37°C. Após esse período o meio de cultura foi trocado por outro e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -70°C nos tempos de 1, 24, 48 e 72 h pi, quando o RNA viral foi quantificado por qRT-PCR (número de cópias de RNA/mL) **(A)**. Posteriormente, o mesmo ensaio de infecção foi realizado, porém após 1h de infecção o meio adicionado estava suplementado com as moléculas a serem testadas (daclatasvir e mefloquina a 10µM), e passadas 48h da

infecção, o sobrenadante viral foi recolhido e armazenado a -70°C , para então ser realizada a análise da progênie viral por ensaio de placa (PFU/mL), para quantificar a capacidade replicativa viral **(B)** e por qRT-PCR, para quantificar o RNA viral **(C)**. A análise estatística foi obtida em comparação ao grupo controle. $N=3$, $*p<0.05$, $**p<0.5$. (CI-Controle Infectado)

5 DISCUSSÃO

5.1 Morfologia e morfogênese do SARS-CoV-2 em células Vero-E6

Microscopias eletrônicas de transmissão e de varredura de alta resolução e a reconstrução tridimensional foram utilizadas no presente estudo com o objetivo de verificar a morfologia e morfogênese da biossíntese do SARS-CoV-2 em culturas de células Vero-E6 quando infectadas com o SARS-CoV-2, caracterizar as principais alterações celulares induzidas pela infecção, bem como o ciclo replicativo do vírus.

Em células Vero-E6 diferentes alterações morfológicas foram observadas em 48 e 72h p.i. dentre as quais, a ativação celular que foi evidenciada por uma marcante alteração da topografia da membrana citoplasmática representada pela presença de numerosos filopódios com partículas virais associadas. A conexão entre as células adjacentes mediada por esses filopódios também foi observada. Acreditamos que o papel dos filopódios neste modelo *in vitro* esteja associado à potencialização da infecção. Estudos anteriores *in vitro* com células Vero infectadas com SARS-CoV e SARS-CoV-2 corroboram nossos achados (Ng *et al.*, 2003; Caldas *et al.*, 2020; Barreto-Vieira *et al.*, 2020). Os vírus envelopados podem se disseminar por duas rotas diferentes: livre em ambiente aquoso ou pelo contato célula a célula (Sherer *et al.*, 2007; Mothes *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2016). A propagação viral através do contato célula a célula tem vantagens exclusivas: a velocidade da transferência das partículas é maior podendo então resultar em ciclos replicativos mais rápidos, e a evasão do sistema imune, pois a exposição limitada no espaço extracelular evita a interação com anticorpos neutralizantes. Por último, ao explorar a comunicação célula a célula, as barreiras físicas e imunológicas podem ser superadas para disseminar a infecção (Chang *et al.*, 2016, Tiwari *et al.*, 2015).

Os vírus podem sequestrar o sistema de filopódios para seu próprio uso durante o ciclo viral sob as seguintes estratégias: “*surfing viral*” (os filopódios funcionam como trilhos que carregam as partículas virais em direção ao citosol), retração filopodial (os filopódios contendo partículas virais aderidas se retraem em direção ao citosol) e pontes filopodiais (comunicação entre células adjacentes via filopódios objetivando a transferência de partículas virais) (Tiwari *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2016).

A formação de sincícios em monocamadas das células Vero-E6 48 e 72h p.i. com SARS-CoV-2 foi comumente observada em nossas análises, como formação de figuras de mielina indicando autofagia celular. Estudos ultraestruturais anteriores demonstraram a ocorrência ocasional de células sinciciais multinucleadas quando células Vero foram infectadas com SARS-CoV (Goldsmith *et al.*, 2004). Nossa análise demonstrou acúmulo de corpúsculos lipídicos em células infectadas, o que é corroborado por um estudo anterior conduzido pelo nosso grupo (Dias *et al.*, 2020). No estudo mencionado, a infecção *in vitro* por SARS-CoV-2 modulou as vias de síntese e captação de lipídios, conforme monitorado por testes de expressão de CD36, SREBP-1, PPAR γ e DGAT-1 em monócitos e desencadeou a formação de corpúsculos lipídicos em diferentes linhagens de células humanas. A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV-2, detectou partículas virais co-localizadas com os corpúsculos lipídicos, sugerindo que estes podem servir como uma plataforma de montagem das partículas. A inibição da formação de corpúsculos lipídicos em Vero-E6 resultou na diminuição da replicação de SARS-CoV-2 (Dias *et al.*, 2020). Nossos dados também são corroborados com os achados de Nardacci *et al.* (2021) que demonstrou que a infecção por SARS-CoV-2 induz o acúmulo de corpúsculos lipídicos, tanto em estudos *in vitro* quanto em pneumócitos do tipo II de pulmão de pacientes infectados. Além disso, os corpúsculos lipídicos foram frequentemente observados em contato próximo com mitocôndrias espessadas e podem participar de mecanismos de citopatogênese (Nardacci *et al.*, 2021).

Partículas de SARS-CoV-2 aderidas à membrana citoplasmática com diâmetro médio de 66 nanômetros, e morfologia esférica exibindo projeções em seu envelope, característica de vírus pertencentes à família *Coronaviridae*, foram mostradas no presente estudo. Estes dados são muito consistentes com estudos anteriores *in vitro* com SARS-CoV (Qin *et al.*, 2004) e SARS-CoV-2 em que o diâmetro do vírion variou de 50 a 200 nm (Chen *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020; Wu, *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2020). Nossos estudos demonstram que a internalização do SARS-CoV-2 em Vero-E6 ocorre mais comumente por endocitose, embora a fusão do envelope do vírus com a membrana celular também tenha sido observada. Estes dados são consistentes com nossos estudos anteriores com SARS-CoV-2 (Barreto-Vieira *et al.*, 2020) e com os da literatura no que diz respeito à estudos com o SARS-

CoV e MERS-CoV que suportam ambos os mecanismos (Qin *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2019; Ng *et al.*; 2003).

Observamos a formação de VDMs localizadas próximo ao RER, sugerindo que essas vesículas resultam da remodelação das membranas do RER. Foi observada a presença de filamentos semelhantes a RNA e material elétron-denso no lúmen das VDMs. VDMs são induzidas durante a replicação de uma variedade de vírus de genoma RNA (Paul *et al.*, 2013; Wolff *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020) e foram identificados como o único compartimento onde ocorre a transcrição do RNA viral para coronavírus (Snijder *et al.*, 2020). Análises morfológicas de diferentes linhagens celulares infectadas com SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, demonstram que as VDMs são derivadas do RER. Estudos sobre SARS-CoV e MERS-CoV demonstram que as proteínas não estruturais 3 e 4 do vírus foram predominantemente responsáveis por orquestrar o processo de formação das VDMs (Oudshoorn *et al.*, 2017; Knoops *et al.*, 2008; Mendonça *et al.*, 2020; Cortese *et al.*, 2020). Em alguns desses modelos, o lúmen RER constitui o espaço entre a membrana interna e externa da VDM, enquanto o espaço fechado é de origem citoplasmática e enriquecido em RNA de fita dupla (RNAd) (Klein *et al.*, 2020). Nossos dados corroboram os achados dos estudos SARS-CoV e MERS-CoV, bem como a análise com Vero-E6 e linhagens de células pulmonares humanas (Calu3) infectadas com SARS-CoV-2, nas quais foram encontrados VDMs contendo RNA viral em seu lúmen (Klein *et al.*, 2020; Barreto-Vieira *et al.*, 2020; Caldas *et al.*, 2020; Wolff *et al.*, 2020). Um estudo utilizando criomicroscopia eletrônica para análises de células infectadas com SARS-CoV-2 identificou um complexo de poros moleculares abrangendo ambas as membranas das VDMs, que seria responsável em interconectar o interior das vesículas com o citoplasma o que permitiria a liberação de RNA recém-sintetizado do interior da VDM para o citoplasma (Klein *et al.*, 2020)

Observamos vesículas intermediárias (VIs) associadas à VDMs, bem como a presença de partículas virais brotando das membranas das VDMs para o lúmen das VIs, sugerindo que parte da montagem das partículas pode ocorrer nesta local. Observou-se a proximidade das VIs com o complexo de Golgi, fato que nos permite inferir uma possível relação entre as VIs e o complexo de Golgi. Knoops *et al.* (2008) observaram formação de membranas convolutas, frequentemente em estreita proximidade com aglomerados de VDMs em células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV. Os autores sugerem que essas estruturas são provavelmente idênticas às

"inclusões reticulares" que foram observadas pela primeira vez em células infectadas com vírus da hepatite de camundongos (David-Ferreira *et al.*, 1965) e que foram posteriormente referidas como 'grupos de cisternas tubulares', que podem ter uma conexão com o compartimento intermediário do retículo endoplasmático-Golgi (ERGIG) (Krijnse-Locker *et al.*, 1994). As proteínas estruturais M, N, E e S, juntamente com o RNA genômico, conduzem a montagem de novas partículas de vírus, que no caso de outros coronavírus ocorrem no ERGIG (Perlman, 2020), este achado é corroborado em nosso estudo.

Observamos vírions em múltiplas vesículas lisas na periferia da célula, próximo à membrana celular. A fusão da membrana das vesículas lisas com a membrana celular resultando na liberação das partículas também foi observada. O mecanismo de liberação de progênie viral por exocitose foi detectado em nossos estudos anteriores com SARS-CoV-2 (Barreto-Vieira *et al.*, 2020) e corroborados por resultados apresentados por Qian *et al.* (2013) em estudos *in vitro* com linhagens de pneumócitos do tipo II infectadas com SARS-CoV, nos quais os vírions foram encontrados em vesículas secretoras de paredes lisas expandidas no citoplasma das células e por Qinfen *et al.* (2004) que mostrou em células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV, partículas de vírus dentro de vesículas lisas na periferia da célula e eventualmente fundidas com a membrana celular.

5.2 Antivirais

Nosso estudo avaliou não só a permissividade das células Vero-E6 a infecção pelo SARS-CoV-2, como também sua susceptibilidade a ação de moléculas já apontadas como capazes de inibir a replicação deste vírus *in vitro* (Zhou *et al.*, 2020; WHO, 2020).

Avaliamos a ação do daclatasvir sobre a infecção, e nossos dados são corroborados por outros já publicados por Sacramento *et al.* (2020), que testou dois inibidores da replicação do HCV, sofosbuvir e daclatasvir, sobre a replicação do SARS-CoV-2, sugerindo o reposicionamento destas moléculas. Seus dados mostram que o daclatasvir e o sofosbuvir atuam em sinergia e são capazes de inibir a replicação do SARS-CoV-2 em linhagens celulares relevantes, como os pneumócitos tipo II (Calu-3). Nossos resultados revelaram que em células Vero-E6 a

ação do daclatasvir em isolado foi expressivo contra a replicação do SARS-CoV-2 sem grandes danos a integridade celular.

Estudos clínicos já foram iniciados no Egito e no Brasil (Ministério da Saúde, 2020) para avaliar a eficácia do Daclatasvir e Mefloquina, que já vêm se mostrando promissoras para o tratamento da COVID-19.

Além do reposicionamento de antivirais, moléculas com ação frente a outros patógenos também já foram indicadas como inibidoras do SARS-CoV-2, por exemplo as aminoquinolinas, que são conhecidas por sua ação antimalárica. A cloroquina e a hidroxicloroquina fizeram parte do primeiro grande estudo clínico realizado pela OMS, o *Solidarity*, que não apontou essas duas moléculas como promissoras. No entanto, outra aminoquinolina, a mefloquina, já apresentou relevante efeito inibitório sobre coronavírus. Os dados de Fan *et al.* (2020) sobre a ação antiviral da mefloquina frente o coronavírus de pangolim (GX_P2V/pangolin/2017/Guangxi) corroboram nossos achados em relação ao SARS-CoV-2, uma vez que também observamos inibição total da replicação viral com a mefloquina a 10 μ M.

Fan *et al.* (2020) mostraram por diferentes técnicas a modulação de efeito antiviral que a cloroquina e a mefloquina geraram em monocamadas de células derivadas de pneumócitos humanos, assim como observamos em nossos estudos utilizando células Vero-E6, que também corroboraram o efeito inibitório da replicação. Além disso, em nosso trabalho e no de Fan *et al.* (2020), a microscopia eletrônica de transmissão demonstrou um estresse (e morte) celular interessante, refletido em uma diminuição do pellet gerado, em comparação com outros compostos testados.

Até então entendia-se que os coronavírus utilizavam da maquinaria do complexo de Golgi para sua maturação e liberação para o meio extracelular, e que a cloroquina atuava na alcalinização do meio intracelular impedindo o complexo de Golgi de desempenhar sua função na replicação viral. Um estudo conduzido por Tooze *et al.* (1987) utilizando linhagem celular de tumor de glândula pituitária de camundongos (Att20) tratada com cloroquina a 200 μ M e infectada com coronavírus (MHV A59) demonstrou a contínua maturação de partículas elétron-densas. Os autores relataram que os agregados proteicos associados as DMV's e VI's deixaram de ser observados por MET. Nosso trabalho diferencia-se do previamente citado em tempo de infecção, concentração do fármaco testado e linhagem celular, e em

resultado, visto que nosso tratamento foi capaz de inibir a replicação viral em células Vero-E6.

Nessa dissertação, além de demonstrarmos a alta susceptibilidade das células Vero-E6 quando infectadas com SARS-CoV-2 e caracterizarmos a morfogênese do SARS-CoV-2 nesta linhagem celular, demonstramos também como a microscopia eletrônica é essencial para a análise de um agente causador de uma doença desconhecida, situação já vivida em 2003 com a SARS-CoV (Ksiazek *et al.*, 2003), Ebola (Johnson *et al.*, 1977; Bowen *et al.*, 1977, Pattyn *et al.*, 1977), Hendra (Murray *et al.*, 2000), Nipah (Chua *et al.*, 2000), e monkeypox (CDC, 2003). Os dados apresentados neste estudo são importantes para uso no desenvolvimento de sistemas modelo para avaliar abordagens terapêuticas.

6 PERSPECTIVAS

- Publicação de um artigo sobre os protocolos de processamento das amostras para análises por microscopia eletrônica de transmissão;
- Publicação dos dados referentes às análises da ação antiviral do daclatasvir e da mefloquina em células Vero-E6 infectadas com o SARS-CoV-2;
- Confecção e submissão de projeto para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Fiocruz, objetivando a utilização de amostras provenientes de casos humanos de COVID-19 que evoluíram para óbitos, visando estudos morfológicos e ultraestruturais de diferentes tecidos.

7 CONCLUSÕES

As células Vero-E6 são susceptíveis e permissivas ao vírus SARS-CoV-2 e bom modelo para produção de massa viral para estudos da replicação viral *in vitro*;

Que a metodologia de MET e outras podem ser utilizadas para avaliar mudanças na estruturas das partículas virais e das células infectadas e das mesmas tratadas com antivirais, avaliando os sítios de inibição da replicação viral;

Nosso estudo tem importância para validação do modelo celular para testes pré-clínicos de antivirais, uma vez que observamos a inibição da replicação viral, assim como outros grupos já observaram com os mesmos fármacos;

Nossas observações ultraestruturais acrescentam no conhecimento básico e translacional do estudo com antivirais com potencial para uso clínico para o tratamento da COVID-19

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altenburg BC, Graham DY, Estes MK. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J Gen Virol.* 1980; Jan;46(1):75-85.

Barreto-Vieira DF, Barth-Schatzmayr OM, Schatzmayr HG. Modelo animal experimental para o estudo da patogênese dos vírus dengue sorotipos 1 e 2, manual de técnicas. Interciência, Rio de Janeiro, 2010; 82. p.

Barreto-Vieira DF, Barth OM, Silva MA, Santos CC, Santos Ada S, F JB Filho, Filippis AM. Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 2016; Aug;111(8):532-4.

Barth OM, da Silva MAN, Barreto-Vieira DF. Low impact to fixed cell processing aiming transmission electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2016; 111(6): 411-3.

Blanchard, E., Roingard, P. Virus-induced double-membrane vesicles. *Cell Microbiol.* 2015;17(1):45–50.

Beck BR, Shin B, Choi Y et al. Predicting commercially available antiviral drugs that may act on the novel coronavirus (SARS-CoV-2) through a drugtarget interaction deep learning model. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020; 18: 784-90.

Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE et al. Remdesivir for the treatment of Covid-19— final report. *N Engl J Med* 2020; 383: 1813–26.

Bowen, E. T., Lloyd, G., Harris, W. J., Platt, G. S., Baskerville, A., Vella, E. E. Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent. *Lancet.* 1977;1(8011):571–3.

Caldas, L. A., Carneiro, F. A., Higa, L. M., Monteiro, F. L., da Silva, G. P., da Costa, L. J., Durigon, E. L., Tanuri, A., de Souza, W. Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. *Sci Rep.* 2020;10(1):16099.

Centers for Disease Control and Prevention Multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003;52(23):537–540

CDC. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Centers for Disease Control and Prevention <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>. 2020.

Chang, K., Baginski, J., Hassan, S. F., Volin, M., Shukla, D., Tiwari, V. Filopodia and Viruses: An Analysis of Membrane Processes in Entry Mechanisms. *Front Microbiol.* 2016; 7: 300.

Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y, Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y, Wei, Y. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223): 507-513.

Chua, K. B., Bellini, W. J., Rota, P. A., Harcourt, B. H., Tamin, A., Lam, S. K., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Zaki, S. R., Shieh, W. et al. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science.* 2000;288(5470):1432–5.

Cortese, M., Lee, J. Y., Cerikan, B., Neufeldt, C. J., Oorschot, V. M. J., Köhrer, S., Hennies, J., Schieber, N. L., Ronchi, P., Mizzon, G., Romero-Brey, I. et al. Integrative imaging reveals SARS-CoV-2-induced reshaping of subcellular morphologies. *Cell Host Microbe.* 2020;28(6):853–866.e5.

David-Ferreira, J. F., Manaker, R. A. An electron microscope study of the development of a mouse hepatitis virus in tissue culture cells. *J Cell Biol.* 1965;24(1):57–78.

de Freitas CS, Higa LM, Sacramento CQ et al. Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019; 13: e0007072.

Dias, S. S. G, Soares, V. C., Ferreira, A. C., Sacramento, C. Q., Fintelman-Rodrigues, N., Temerozo, J. R., Teixeira, L., Nunes da Silva, M. A., Barreto, E., Mattos, M. et al. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. 2020;16(12):e1009127.

Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis*, 2020; 20: 533–4.

Eslami G, Mousaviasl S, Radmanesh E, Jelvay S, Bitaraf S, Simmons B, Wentzel H, Hill A, Sadeghi A, Freeman J, Salmanzadeh S, Esmaeilian H, Mobarak M, Tabibi R, Jafari Kashi AH, Lotfi Z, Talebzadeh SM, Wickramatillake A, Momtazan M, Hajizadeh Farsani M, Marjani S, Mobarak S. The impact of sofosbuvir/daclatasvir or ribavirin in patients with severe COVID-19. *J Antimicrob Chemother.*, 2020; 1;75(11):3366-3372.

Fan HH, Wang LQ, Liu WL, et al. Repurposing of clinically approved drugs for treatment of coronavirus disease 2019 in a 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) related coronavirus model. *Chin Med J* 2020;(133):1051–6.

Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, Ribeiro Lima C, Souza da Silva F, Ferreira AC, Mattos M, et al. Atazanavir, Alone or in Combination with Ritonavir, Inhibits SARS-CoV-2 Replication and Proinflammatory Cytokine Production. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2020 Sep 21;64(10).

Harcourt J, Tamin A, Lu X, Kamili S, Sakthivel SK, Murray J, et al. Severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 from patient with 2019 novel Coronavirus disease, United States. *Emerg Infect Dis*,2020; 26(6): 1266-73.

Gendrot M, Duflot I, Boxberger M, Delandre O, Jardot P, Le Bideau M, Andreani J, Fonta I, Mosnier J, Rolland C, Hutter S, La Scola B, Pradines B. Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa: In vitro inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate, 2020; *Int J Infect Dis*.

Ghanbari R, Teimoori A, Sadeghi A, Mohamadkhani A, Rezasoltani S, Asadi E, Jouyban A, & Sumner SC, 2020; *Future Microbiol* 15, 1747-1758.

Goldman JD, Lye DCB, Hui DS et al. Remdesivir for 5 or 10 days in patients with severe Covid-19. *N Engl J Med*, 2020; 383: 1827–37.

Gorbalenya A.E., S.C. Baker, R.S. Baric, R.J. de Groot, C. Drosten, A.A. Gulyaeva, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study. Group bioRxiv, 2020; Feb 11.

Goldsmith, C. S., Tatti, K. M., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Comer, J. A., Lee, W. W., Rota, P. A., Bankamp, B., Bellini, W. J., Zaki, S. R. Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(2): 320–326.

Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M et al. A SARS-CoV-2-human proteinprotein interaction map reveals drug targets and potential drug-repurposing. bioRxiv, 2020.

Gupta, N., Agrawal, S. & Ish, P. Chloroquine in COVID-19: the evidence. *Monaldi Arch Chest Dis* 90, 2020.

Hammer, David A.T. Harper & Ryan, P. D. Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4 (2001).

Harak, C., Lohmann, V. Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. *Virology*. 2015.

Harcourt J, Tamin A, Lu X, Kamili S, Sakthivel SK, Murray J, Queen K, Tao Y, Paden CR, Zhang J, Li Y, Uehara A, Wang H, Goldsmith C, Bullock HA, Wang L, Whitaker B, Lynch B, Gautam R, Schindewolf C, Lokugamage KG, Scharton D, Plante JA, Mirchandani D, Widen SG, Narayanan K, Makino S, Ksiazek TG, Plante KS, Weaver SC, Lindstrom S, Tong S, Menachery VD, Thornburg NJ. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Patient with 2019 Novel Coronavirus Disease, United States. *Emerg Infect Dis.* 2020; Mar 11;26(6).

Holshue M.L., C. DeBolt, S. Lindquist, K.H. Lofy, J. Wiesman, H. Bruce, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N Engl J Med*; 2020; Jan 31.

Huang C., Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395, 2020, pp. 497-506.

Jiang S, L. Du, Z. Shi A. emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerg Microbes Infect*, 9, 2020; pp. 275-277.

Johnson, K. M., Lange, J. V., Webb, P. A., Murphy, F. A. Isolation, and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet*. 1977;(8011)1:569–71.

Kausche GA, Ankuch PF, Ruska H. Die Sichtbarmachung von PF lanzlichem Virus in Ubermikroskop. *Naturwissenschaften* 1939; 27:292-299.

Kim JM, Chung YS, Jo HJ, Lee NJ, Kim MS, Woo SH, Park S, Kim JW, Kim HM, Han MG. Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19. *Osong Public Health Res Perspect.* 2020 Feb;11(1):3-7.

Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh

WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ; SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003 May 15;348(20):1953-66.

Klein, S., Cortese, M., Winter, S. L., Wachsmuth-Melm, M., Neufeldt, C. J., Cerikan, B., Stanifer, M. L., Boulant, S., Bartenschlager, R., Chlanda, P. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun.* 2020;11(1):5885.

Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S. H., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Koster, A. J., Mommaas, A. M., Snijder, E. J. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* 2008; 16;6(9):e226.

Kremer, J. R., Mastronarde, D. N., McIntosh, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct 800 Biol.* 1996;116(1):71–6

Kumar P., Nagarajan A., D Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018.

Krijnse-Locker, J., Ericsson, M., Rottier, P. J. M., Griffiths, G. Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J Cell Biol.* 1994;124(1-2):55–70.

Letko, M., Marzi, A., Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS- CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. First functional assessment of the interaction of the SARS- CoV-2 Spike protein receptor binding domain with the cellular receptor ACE2. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(4):562–569.

Li H, Liu L, Zhang D et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet* 2020; 395: 1517–20.

Li Q., X. Guan, P. Wu, X. Wang, L. Zhou, Y. Tong, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*, 2020; Jan 29.

Lin L, Lu L, Cao W et al. Hypothesis for potential pathogenesis of SARSCoV-2 infection-a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg Microbes Infect*, 2020; 9: 727–32.

Lu H., C.W. Stratton, Y.W. Tang. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan China: the mystery and the miracle. *J Med Virol*, 2020; Jan 16.

Lu R., X. Zhao, J. Li, P. Niu, B. Yang, H. Wu, et al. Genomic characterisation, and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020; Jan 30.

McIntosh K, Becker WB, Chanock RM. Growth in suckling-mouse brain of “IBV-like” viruses from patients with upper respiratory tract disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967;58:2268 –2273. 6. Witte KH, Tajima M, Easterday BC. Morphologic characteristics and nucleic acid type of transmissible gastroenteritis virus of pigs. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1968;23:53–70.

McKee DL, Sternberg A, Stange U, Laufer S, Naujokat C. Candidate drugs against SARS-CoV-2 and COVID-19. *Pharmacol Res*, 2020; Apr 29.

Mendonça, L., Howe, A., Gilchrist, J.B., Sun, D., Knight, M.L., Zanetti-Domingues, L.C., Bateman, B., Krebs, A.S., Chen, L., Radecke, J. et al. SARS-CoV-2 assembly and egress pathway revealed by correlative multi-modal multi-scale cryo-imaging. *bioRxiv*. 2020.

Ministerio da Saúde do Brasil, Agencia Saúde Coronavírus. Disponível no link: (<https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/46435-brasil-confirma-primeiro-caso-de-novo-coronavirus>), acessado em 17/05/2021.

Mothes, W., Sherer, N. M., Jin, J., Zhong, P. Virus Cell-to-cell transmission. *J Virol*. 2010;84(17):8360–8368.

Monteil V, Kwon H, Prado P, Hagelkrüys A, Wimmer RA, Stahl M, Leopoldi A, Garreta E, Hurtado Del Pozo C, Prosper F, Romero JP, Wirnsberger G, Zhang H, Slutsky AS, Conder R, Montserrat N, Mirazimi A, Penninger JM. Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell*. 2020 May 14;181(4):905-913.e7.

Murray, K., Selleck, P., Hooper, P., Hyatt, A., Gould, A., Gleeson, L., Westbury, H, Hiley, L, Selvey, L, Rodwell, B. A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science*. 1995;268(5207):94–7.

Nardacci, R., Colavita, F., Castilletti, C., Lapa, D., Matusali, G., Meschi, S., Del Nonno, F., Colombo, D., Capobianchi, M.R., Zumla, A., Ippolito, G., Piacentini, M., Falasca, L. Evidences for lipid involvement in SARS-CoV-2 cytopathogenesis. *Cell Death Dis*. 2021 Mar 12;12(3):263.

Netherton CL, Wileman T. Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr Opin Virol*, 2011; 1:381–387.

Park, WB, Kwon, NJ, Choi, SJ, Kang, CK, Choe, PG, Kim, JY, et al. Virus isolation from the first patient with SARS-CoV-2 in Korea. *J Korean Med Sci*. 2020; 35(7): e84.

Ng ML, Tan SH, See EE, Ooi EE, Ling AE. Early events of SARS coronavirus infection in Vero cells. *J Med Virol*,. 2003; 71: 323-31.

Oudshoorn, D., Rijs, K., Limpens, R. W. A. L., Groen, K., Koster, A. J., Snijder, E. R., Kikkert, M., Bárcena, M. Expression and cleavage of middle east respiratory syndrome coronavirus nsp3-4 polyprotein induce the formation of double-membrane vesicles that mimic those associated with coronaviral RNA replication. *mBio*. 2017;8(6):e01658-17.

Park, W. B., Kwon, N. J., Choi, S. J., Kang, C. K., Choe, P. G., Kim, J. Y., Yun, J., Lee, G. W., Seong, M. W., Kim, N. J. et al. Virus isolation from the first patient with SARS-CoV-2 in Korea. *J Korean Med Sci.* 2020;35(7): e84.

Pattyn, S., van der Groen, G., Courteille, G., Jacob, W., Piot, P. Isolation of Marburg-like virus from a case of haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet.* 1977;1(8011):573–4.

Paul, D., Hoppe, S., Saher, G., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R. Morphological and Biochemical Characterization of the Membranous Hepatitis C Virus Replication Compartment. *J Virol.* 2013;87(19):10612-27.

Perlman S., Masters P. S. 7th Edition. Vol. 1. 2020. (Coronaviridae: The viruses and their replication).

Qian, Z., Travanty, E. A., Oko, L., Edeen, K., Berglund, A., Wang, J., Ito, Y., Holmes, K. V., Mason, R. J. Innate immune response of human alveolar type II cells infected with severe acute respiratory syndrome-coronavirus. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;48(6):742-8.

Qinfen, Z., Jinming, C., Xiaojun, H., Huanying, Z., Jicheng, H., Ling, F., Kunpeng, L., Jingqiang, Z. The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J Med Virol.* 2004; 73(3):332-7.

Rangan R, Zheludev IN, Hagey RJ et al. RNA genome conservation and secondary structure in SARS-CoV-2 and SARS-related viruses: a first look. *RNA* 2020; 26: 937–59

Ren L.L., Y.M. Wang, Z.Q. Wu, Z.C. Xiang, L. Guo, T. Xu, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J Engl*, 2020; Jan 30.

Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963; 17: 208-12

Riva, L., Yuan, S., Yin, X. et al. Descoberta de drogas antivirais SARS-CoV-2 por meio de reaproveitamento de compostos em larga escala. *Nature* 586, 113-119 (2020).

Sacramento CQ, Fintelman-Rodrigues N et al. The in vitro antiviral activity of the anti-hepatitis C virus (HCV) drugs daclatasvir and sofosbuvir against SARS-CoV-2. *BioArxiv* 2020.

Sachdeva C, Wadhwa A, Kumari A, Hussain F, Jha P, Kaushik NK. In silico Potential of Approved Antimalarial Drugs for Repurposing Against COVID-19. *OMICS.* 2020 Oct;24(10):568-580.

Sesso A.. Fixação de sistemas biológicos. In de Souza W, *Manual Sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica. Vol. I. Técnicas Básicas. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro, 2007; p. 13–21.*

Sherer, N. M., Lehmann, M. J., Jimenez-Soto, L. F, Horensavitz, C., Pypaert, M., Mothers, W. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat Cell. Biol.* 2007;9(3):310–315.

Smith, MA, Regal, RE, Mohammad, RA. Daclatasvir: a NS5A replication complex inhibitor for hepatitis C infection. *Ann Pharmacother* 2016; 50: 39–46.

Snijder, E. J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J. J., van der Meulen, J., Koerten, H. K., Mommaas, A.M. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J Virol.* 2006;80(12):5927–40.

Snijder, E. J., Limpens, R. W. A. L., de Wilde, A. H., de Jong, A. W. M., Zevenhoven-Dobbe, J. C., Maier, H. J., Faas, F. F. G. A., Koster, A. J., Bárcena, M.

A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol.* 2020;18(6):1-25.

Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, et al. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses.* 2019; 11(1): 59.

Szretter, K.J., Balish, A.L. & Katz, J.M. Influenza: propagation, quantification, and storage. *Curr Protoc Microbiol Chapter*, 2006;15, Unit 15G 1.

Tiwari, V., Tarbutton, M. S., Shukla, D. Diversity of heparan sulfate and hsv entry: basic understanding and treatment strategies. *Molecules.* 2015;20(2):2707–27.

Tooze J, Tooze SA, Fuller SD. Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells. *J Cell Biol.* 1987 Sep;105(3):1215-26

Tyrrell DA, Almeida JD, Cunningham CH, et al. Coronaviridae. *Intervirology.* 1975;5:76 – 82.

V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Mar;19(3):155-170.

Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A, Wall, A., McGuire, A. T., Veessler, D. Structure, function, and antigenicity of the SARS CoV-2 spike glycoprotein. Recommended resource describing key aspects of SARS- CoV-2 Spike features. *Cell.* 2020; 181(2):281–292.e6.

Wang C, P.W. Horby, F.G. Hayden, G.F. Gao. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*, 2020; 395, pp. 470-473.

Wang D., B. Hu, C. Hu, F. Zhu, X. Liu, J. Zhang, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020; Feb).

World Health Organization. (2020). Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19): interim guidance, 12 February 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331138>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim Guid [Internet]. 2020;(March):1–7. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>

Wolff, G., Melia, C. E., Snijder, E. J., Bárcena, M. Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. *Trends Microbiol.* 2020;28(12):1022-1033.

Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020; Mar 13;367(6483):1260-1263.

Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., Wang, Q., Xu, Y., Li, M., Li, X. et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B*. 2020;10(5):766-788.

Wulan, W.N., Heydet, D., Walker, E.J., Gahan, M.E. and Ghildyal, R. Nucleocytoplasmic transport of nucleocapsid proteins of enveloped R.N.A. viruses. *Front. Microbiol.* 2015;6, 553.

Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, Zhong W, Hao P. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci.* 2020; Mar;63(3):457-460.

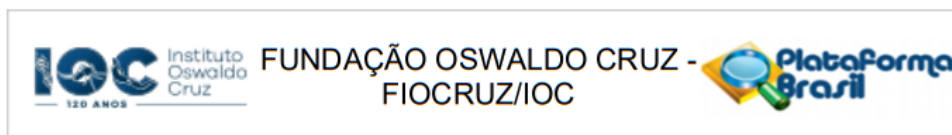
Zhu N. , D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med, 2020; Jan 24.

Zhang Q, Cui JM, Huang XJ, Lin W, Tan DY, Xu JW, et al. Morphology and morphogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS) - associated virus. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai). 2003; 35(6): 587-91.

Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course, and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. The Lancet. 28 de março de 2020;395(10229):1054–62.

9 ANEXOS

9.1 CEP Fiocruz



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudos virológicos e imunológicos de infecções respiratórias e exantemáticas na rede de vigilância do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo: Fatores virais e imunes na progressão da Covid-19

Pesquisador: Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 68118417.6.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
CNPQ
Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.128.241

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda ao projeto "Estudos virológicos e imunológicos de infecções respiratórias e exantemáticas na rede de vigilância do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo"

As informações elencadas nos campos: "Apresentação do projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento gerado na Plataforma Brasil: "PB INFORMAÇÕES BÁSICAS 1551591_E3.

Segundo a pesquisadora principal "Tendo em vista a emergência da pandemia de COVID-19, foi necessário atualizar o projeto previamente aprovado do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo. Nessa adequação, foi incluída a possibilidade de recrutar voluntários com suspeita de COVID-19 para diagnóstico, bem como estudos sobre imunidade, diversidade viral e marcadores de gravidade. Adicionalmente, o n aprovado da emenda anterior foi ajustado. Além disso, foi incluído o Hospital Nossa Senhora da Conceição-RS como Trata-se de uma Emenda ao projeto "Estudos virológicos e imunológicos de infecções respiratórias e exantemáticas na rede de vigilância do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo"

As informações elencadas nos campos: "Apresentação do projeto", "Objetivo da Pesquisa" e

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

9.2 Artigos publicados durante o desenvolvimento da dissertação

9.2.1 Lipid droplets fuel SARS-CoV replication and production of inflammatory mediators

PLOS PATHOGENS

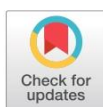
RESEARCH ARTICLE

Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators

Suelen Silva Gomes Dias¹, Vinicius Cardoso Soares^{1,2}, André C. Ferreira^{1,3,4}, Carolina Q. Sacramento^{1,3}, Natalia Fintelman-Rodrigues^{1,3}, Jairo R. Temerozo⁵, Lívia Teixeira¹, Marcos Alexandre Nunes da Silva⁶, Ester Barreto¹, Mayara Mattos^{1,3}, Caroline S. de Freitas^{1,3}, Isaclaudia G. Azevedo-Quintanilha¹, Pedro Paulo A. Manso⁷, Milene D. Miranda⁸, Marilda Mendonça Siqueira⁸, Eugenio D. Hottz^{1,9}, Camila R. R. Pão¹, Dumith C. Bou-Habib⁵, Debora F. Barreto-Vieira⁶, Fernando A. Bozza^{10,11}, Thiago M. L. Souza^{1,3}, Patricia T. Bozza^{1*}

1 Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Programa de Imunologia e Inflamação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Centro De Desenvolvimento Tecnológico Em Saúde (CDTS) and National Institute for Science and Technology on Innovation on Diseases of Neglected Populations (INCT/DNP), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Universidade Iguacu, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Laboratório de Pesquisas sobre o Timo and Instituto Nacional de Ciencia e Tecnologia em Neuroimunomodulação (INCT/NIM), Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **6** Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **7** Laboratorio de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **8** Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **9** Laboratório de Imunotrombose, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, **10** Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **11** Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR), Rio de Janeiro, Brazil

© These authors contributed equally to this work.
* pbozza@ioc.fiocruz.br, pbozza@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Dias SSG, Soares VC, Ferreira AC, Sacramento CQ, Fintelman-Rodrigues N, Temerozo JR, et al. (2020) Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathog* 16(12): e1009127. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009127>

Editor: Ron A. M. Fouchier, Erasmus Medical Center, NETHERLANDS

Received: November 4, 2020

Accepted: November 10, 2020

Published: December 16, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009127>

Copyright: © 2020 Dias et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Abstract

Viruses are obligate intracellular parasites that make use of the host metabolic machineries to meet their biosynthetic needs. Thus, identifying the host pathways essential for the virus replication may lead to potential targets for therapeutic intervention. The mechanisms and pathways explored by SARS-CoV-2 to support its replication within host cells are not fully known. Lipid droplets (LD) are organelles with major functions in lipid metabolism, energy homeostasis and intracellular transport, and have multiple roles in infections and inflammation. Here we described that monocytes from COVID-19 patients have an increased LD accumulation compared to SARS-CoV-2 negative donors. *In vitro*, SARS-CoV-2 infection were seen to modulate pathways of lipid synthesis and uptake as monitored by testing for CD36, SREBP-1, PPAR γ , and DGAT-1 expression in monocytes and triggered LD formation in different human cell lines. LDs were found in close apposition with SARS-CoV-2 proteins and double-stranded (ds)-RNA in infected Vero cells. Electron microscopy (EM) analysis of SARS-CoV-2 infected Vero cells show viral particles colocalizing with LDs, suggestive that LDs might serve as an assembly platform. Pharmacological modulation of LD formation by inhibition of DGAT-1 with A922500 significantly inhibited SARS-CoV-2 replication as well as reduced production of mediators pro-inflammatory response. Taken together, we demonstrate the essential role of lipid metabolic reprogramming and LD formation in

9.2.2 Brazilian Dengue Virus Type 2 Associated Involvement in a Murine Model: Outcomes after Infection by Two Lineages of the Asian/American Genotype



Article

Brazilian Dengue Virus Type 2-Associated Renal Involvement in a Murine Model: Outcomes after Infection by Two Lineages of the Asian/American Genotype

Fernanda Cunha Jacome ^{1,*}, Gabriela Cardoso Caldas ¹, Arthur da Costa Rasinhas ¹, Ana Luisa Teixeira de Almeida ¹, Daniel Dias Coutinho de Souza ¹, Amanda Carlos Paulino ¹, Marcos Alexandre Nunes da Silva ¹, Ortrud Monika Barth ², Flávia Barreto dos Santos ² and Debora Ferreira Barreto-Vieira ¹

- ¹ Laboratory of Viral Morphology and Morphogenesis, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro 2104-90, RJ, Brazil; gabrielacardosocaldas@gmail.com (G.C.C.); rasinhas@protonmail.com (A.d.C.R.); almeida.analuisa98@gmail.com (A.L.T.d.A.); dcoutinho@id.ufr.br (D.D.C.d.S.); amandacarlos.bio@gmail.com (A.C.P.); marquinhoas@hotmail.com (M.A.N.d.S.); monikabarth@gmail.com (O.M.B.); barreto@ioc.fiocruz.br (D.F.B.-V.)
- ² Laboratory of Viral Immunology, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro 2104-90, RJ, Brazil; flavia.barretod1@gmail.com
- * Correspondence: fernandacunhajacome@gmail.com



Citation: Jacome, F.C.; Caldas, G.C.; Rasinhas, A.d.C.; de Almeida, A.L.T.; de Souza, D.D.C.; Paulino, A.C.; da Silva, M.A.N.; Barth, O.M.; dos Santos, F.B.; Barreto-Vieira, D.F. Brazilian Dengue Virus Type 2-Associated Renal Involvement in a Murine Model: Outcomes after Infection by Two Lineages of the Asian/American Genotype. *Pathogens* **2021**, *10*, 1084. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091084>

Academic Editor: Juan Carlos Sánchez Quaresima

Received: 30 June 2021
Accepted: 29 July 2021
Published: 26 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Dengue virus type 2 (DENV-2) is, traditionally, the most studied serotype due to its association with explosive outbreaks and severe cases. In Brazil, almost 20 years after the first introduction in the 1990s, a new lineage (Lineage II) of the DENV-2 Asian/American genotype emerged and caused an epidemic with severe cases and hospitalizations. Severe dengue includes multiple organ failure, and renal involvement can be potentially related to increased mortality. In order to better understand the role of DENV infection in renal injury, here we aimed to investigate the outcomes of infection with two distinct lineages of DENV-2 Asian/American genotype in the kidney of a murine model. BALB/c mice were infected with Lineages I and II and tissues were submitted to histopathology, immunohistochemistry, histomorphometry and ultrastructural analysis. Blood urea nitrogen (BUN) was detected in blood sample accessed by cardiac puncture. A tendency in kidney weight increase was observed in mice infected with both lineages, but urea levels, on average, were increased only in mice infected with Lineage II. The DENV antigen was detected in the tissue of mice infected with Lineage II and morphological changes were similar to those observed in human dengue cases. Furthermore, the parameters such as organ weight, urea levels and morphometric analysis, showed significant differences between the two lineages in the infected BALB/c, which was demonstrated to be a suitable experimental model for dengue pathophysiology studies in kidneys.

Keywords: dengue 2; Asian/American lineages; BALB/c mice; kidney; histopathology and transmission electron microscopy

1. Introduction

Dengue virus serotypes 1 to 4 (DENV-1–4) are arboviruses belonging to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae* [1]. Transmission occurs in over 125 countries and around 4 billion people are at risk of infection annually [2]. Dengue poses a major threat to urban populations in Asia and Latin America, mainly due to its increased incidence in the last 50 years [3–5]. In Brazil, Lineage I of DENV-2 Asian/American genotype has been circulating since the 1990s [6], when the first cases of dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome (DHF/DSS) were reported [7]. After 17 years, the emergence of Lineage II of DENV-2 Asian/American genotype was associated with increased disease

9.2.3 Immunocompetent Mice Infected by two lineages of Dengue Virus Type 2: Observations on the Pathology of the lung, Heart and Skeletal muscle



microorganisms



Article

Immunocompetent Mice Infected by Two Lineages of Dengue Virus Type 2: Observations on the Pathology of the Lung, Heart and Skeletal Muscle

Fernanda Cunha Jácome ^{1,*}, Gabriela Cardoso Caldas ¹, Arthur da Costa Rasinhas ¹, Ana Luisa Teixeira de Almeida ¹, Daniel Dias Coutinho de Souza ¹, Amanda Carlos Paulino ¹, Marcos Alexandre Nunes da Silva ¹, Derick Mendes Bandeira ¹, Ortrud Monika Barth ¹, Flavia Barreto dos Santos ^{2,†} and Debora Ferreira Barreto-Vieira ^{1,†}

¹ Laboratory of Viral Morphology and Morphogenesis, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, Brazil; gabrielacardosocaldas@gmail.com (G.C.C.); rasinhas@protonmail.com (A.d.C.R.); almeida.analuisa98@gmail.com (A.L.T.d.A.); dcoutinho@id.uff.br (D.D.C.d.S.); amandacarlos.bio@gmail.com (A.C.P.); marquinhosans@hotmail.com (M.A.N.d.S.); derick_mendes@live.com (D.M.B.); monikabarth@gmail.com (O.M.B.); barreto@ioc.fiocruz.br (D.F.B.-V.)

² Laboratory of Viral Immunology, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, Brazil; flaviabarretod1@gmail.com

Citation: Jácome, F.C.; Caldas, G.C.; Rasinhas, A.d.C.; de Almeida, A.L.T.;

* Correspondence: fernadacunhajacome@gmail.com

† Those authors contributed equally to the work.

9.3 Artigos submetidos durante o desenvolvimento da dissertação

9.3.1. Unlike Chloroquine, mefloquine inhibits SARS-CoV-2 infection in physiological relevant cell and does not induce viral variants

Title: Unlike Chloroquine, mefloquine inhibits SARS-CoV-2 infection in physiologically relevant cells and does not induce viral variants

Short title: SARS-CoV-2 is susceptible to mefloquine in type II pneumocytes and monocytes.

Carolina Q. Sacramento^{1,7##}, Natalia Fintelman-Rodrigues^{1,7#}, Suelen S. G. Dias¹, Jairo R. Temerozo^{2,3}, Aline de Paula D. Da Silva^{1,7}, Carine S. da Silva^{1,7}, André C. Ferreira^{1,4,7}, Mayara Mattos^{1,7}, Vinicius C. Soares^{1,5}, Filipe Pereira-Dutra¹, Milene D. Miranda⁶, Debora F. Barreto-Vieira⁸, Marcos Alexandre N. da Silva⁸, Suzana S. Santos⁹, Mateo Torres⁹, Rajith K R Rajoli¹⁰, Alberto Paccanaro^{9,11}, Andrew Owen¹⁰, Dumith Chequer Bou-Habib^{2,3}, Patrícia T. Bozza¹, Thiago Moreno L. Souza^{1,7*}

- These authors contributed equally to this work

1 – Laboratório de Imunofarmacologia, Oswaldo Cruz Institute, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

2 – National Institute for Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT/NIM), Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

3 – Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

4 - Universidade Iguaçu, Nova Iguaçu, RJ, Brazil.

5 – Program of Immunology and Inflammation, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

6 – Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

7 - National Institute for Science and Technology on Innovation in Diseases of Neglected Populations (INCT/IDPN), Center for Technological Development in Health (CDTS), Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

8 - Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

9 - School of Applied Mathematics, Fundação Getulio Vargas, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

10 - Centre of Excellence in Long acting Therapeutics (CELT), Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Liverpool, Liverpool, UK

11- Department of Computer Science, Royal Holloway, University of London, Egham, United Kingdom

***Corresponding authors:**

Carolina Q. Sacramento, PhD, ORCID ID: 0000-0003-3952-7099

9.3.2.: Inactivation of SARS-CoV-2 by a novel Chitosan/ α -Ag₂WO₄ Composite Generated by Femtosecond laser irradiation

Electronic Supporting Information (ESI) for:

Inactivation of SARS-CoV-2 by a Novel Chitosan/ α -Ag₂WO₄ Composite Generated by Femtosecond Laser Irradiation

Paula Fabiana Santos Pereira,^a Ana Carolina Alves de Paula e Silva,^b Bruna Natália Alves da Silva Pimentel,^b Ivo Mateus Pinatti,^{c,h} Alexandre Zipoli Simões,^c Carlos Eduardo Vergani,^b Débora Ferreira Barreto-Vieira,^d Marcos Alexandre Nunes da Silva,^d Milene Dias Miranda,^e Maria Eduarda Santos Monteiro,^e Amanda Tucci,^e Carlos Doñate-Buendía,^{f,g} Gladys Mínguez-Vega,^f Juan Andrés,^h and Elson Longo^a

^a CDMF, LIEC, Department of Chemistry, Federal University of São Carlos (UFSCar), P.O. Box 676, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil.

^b Department of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araraquara, São Paulo, Brazil. 1680 Humaitá Street. 14801-903.

^c Faculty of Engineering of Guaratinguetá, São Paulo State University (UNESP), 12516-410, Guaratinguetá, SP, Brazil.

^d Laboratory of Viral Morphology and Morphogenesis, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Avenida Brasil, Rio de Janeiro, Brazil.

^e Laboratory of Respiratory Viruses and Measles, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Avenida Brasil, Rio de Janeiro, Brazil

^f GROC UJI, Institute of New Imaging Technologies, Universitat Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, Castellón de la Plana, 12071, Spain.

^g Materials Science and Additive Manufacturing, University of Wuppertal, Gaußstr. 20, 42119 Wuppertal, Germany

^h Department of Physical and Analytical Chemistry, University Jaume I (UJI), Castelló 12071, Spain.

9.4 Capítulo de livro em fase de publicação:

9.4.1 *Rickettsias latu sensu* em quirópteros no Rio de Janeiro: um estudo piloto na Estação Biológica da Fiocruz Mata Atlântica (EFMA)

Título: *Rickettsias lato sensu* em quirópteros no Rio de Janeiro: um estudo piloto na Estação Biológica da Fiocruz Mata Atlântica (EFMA)

Autores: Michelle Ferreira^{1,2}, Jorlan Fernandes¹, Alexandro Guterres¹, Marcos Alexandre Nunes da Silva³, Debora Ferreira Barreto Vieira³, Elba Regina Sampaio de Lemos^{1,*}

Afiliação:

1 - Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses - Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz

2 - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

3 - Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral – Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

/Fiocruz

9.5 Participação em eventos



CERTIFICADO

Certifico que **Marcos Alexandre Nunes da Silva** participou da temática "*Especialistas Respondem: Questões sobre vacinação e virologia*" no **VI Simpósio Avançado de Virologia Hermann Schatzmayr**, realizado no dia 11 de maio de 2021, na modalidade on-line, com transmissão para o Canal IOC no Youtube.



Elba Regina Sampaio de Lemos
Coordenadora do VI Simpósio Avançado
de Virologia Hermann Schatzmayr
IOC/Fiocruz

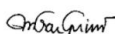


on-line
28º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA
DE MICROSCOPIA E MICROANÁLISE
12 a 15 JUL 2021

50th SBMM
anos

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho nº **PT.LS.28** intitulado "**Ultrastructural Studies of Vero-E6 Cells Infected with SARS-CoV-2 and Treated with Antiviral Molecules**" de autoria de **Silva MAN, Monteiro ME, Miranda MD, Barreto-Vieira DF, Barreto-Vieira DF**, foi apresentado como Pôster no 28º Congresso Brasileiro de Microscopia e Microanálise, realizado de 12 a 15 de julho de 2021.



Marco Cunegundes Guimarães
Presidente da Sociedade Brasileira
de Microscopia e Microanálise





on-line
28º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA
DE MICROSCOPIA E MICROANÁLISE
12 a 15 JUL 2021

50 SBMM
anos

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho nº **PT.LS.40** intitulado “ **Cell infection by the Ilheus virus: unraveling the morphogenesis of a neglected arbovirus**” de autoria de **Caldas GC, Dias HG, Silva MAN, Campos VTMG, Santos FB, Pauvolid-Corrêa A, Filippis AMB, Barreto-Vieira DF**, foi apresentado como Pôster no 28º Congresso Brasileiro de Microscopia e Microanálise, realizado de 12 a 15 de julho de 2021.

Marco Cunegundes Guimarães
Presidente da Sociedade Brasileira
de Microscopia e Microanálise

