

Diversidade dos coronavírus, origem e evolução do SARS-CoV-2

Tiago Gräf¹

-
- ¹ Doutor pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e, atualmente, é pesquisador em saúde pública no Instituto Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Suas principais linhas de pesquisa são na área de evolução e epidemiologia molecular de vírus.

GRÄF, T. Diversidade dos coronavírus, origem e evolução do SARS-COV-2. In: BARRAL-NETTO, M.; BARRETO, M. L.; PINTO JUNIOR, E. P.; ARAGÃO, E. (org.). *Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais*. Salvador: Edufba, 2020. v. 1. DOI: <https://doi.org/10.9771/9786556300443.001>.

A diversidade natural dos coronavírus e os eventos de transmissão zoonótica

Os coronavírus compõem a família mais diversa dentro da ordem *Nidovirales*. Quarenta e seis espécies já foram descritas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV)² e estima-se que, apenas em morcegos, existam mais de 3 mil espécies de coronavírus. (ANTHONY et al., 2017) A ocorrência dos coronavírus entre animais de importância veterinária já é estudada desde o final da década de 1930 e muitas das espécies descritas são altamente patogênicas, como o Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV)³ em aves e o Vírus da Diarreia Epidêmica dos suínos (PEDV), ambos causadores de perdas anuais no setor agropecuário. (COLVERO et al., 2015; SCHULZ; TONSOR, 2015) Entre humanos, o primeiro isolado de coronavírus ocorreu na década de 1960 e durante muito tempo eles foram associados apenas a quadros gripais leves. (HAMRE; PROCKNOW, 1966) Foi apenas após o surgimento da SARS, em 2002, que os coronavírus entraram para a lista de potenciais ameaças à saúde humana mundial.

² Ver: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.

³ Em alguns casos, ao longo deste texto, as siglas serão grafadas respeitando o ordenamento de disposição das palavras de seu idioma de origem - o inglês.

Os coronavírus são divididos em duas subfamílias – *Letovirinae* e *Orthocoronavirinae* –, sendo esta última dividida em quatro gêneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. (ICTV) *Alfacoronavírus* e *Betacoronavírus* infectam apenas mamíferos, enquanto *Gammacoronavírus* e *Deltacoronavírus* são encontrados principalmente em aves, embora alguns também infectem mamíferos. A organização gênica dos diferentes gêneros de coronavírus pode variar bastante, principalmente na região contendo os genes das proteínas acessórias que possuem também funções hospedeiro-específicas. (CUI; LI; SHI, 2019) Em humanos, *Alfacoronavírus* e *Betacoronavírus* geralmente causam doenças respiratórias, enquanto, em animais, uma patologia gastrointestinal é mais comum.

Existem seis espécies de coronavírus identificadas como infecciosas ao ser humano, quatro delas pertencem ao gênero *Betacoronavírus* e duas ao gênero *Alfacoronavírus*. O SARS-CoV-2 é a segunda estirpe dentro da espécie *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (GORBALENYA et al., 2020) a causar uma epidemia humana e, assim como os outros Coronavírus Humanos (HCoV), ele provavelmente teve origem de transmissão de um animal reservatório – evento conhecido como transmissão zoonótica. Após o SARS-CoV,⁴ surgido no final de 2002 e considerado erradicado em meados de 2003 (POON et al., 2004), o MERS-CoV – coronavírus causador da síndrome respiratória do Oriente Médio – emergiu em humanos em 2012. (ZAKI et al., 2012) Com uma taxa de mortalidade de cerca de 35% dos infectados, esse vírus tem causado pequenos surtos todos os anos, principalmente na península arábica, levando a uma soma atual de 2442 casos confirmados até meados de 2019. (DONNELLY et al., 2019) Dromedários

⁴ Ver capítulo 2 “SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão” deste livro.

são reservatórios naturais para o MERS-CoV – a soroprevalência varia de 70% a 100% (MÜLLER et al., 2014; REUSKEN et al., 2014) – e a maioria dos casos humanos ocorre em indivíduos que tiveram contato direto com dromedários ou produtos derivados desses animais. (CONZADE et al., 2018) Análises evolutivas de genomas do MERS-CoV sugerem que os surtos são principalmente causados por novas introduções a partir do reservatório animal e que a transmissão entre humanos é reduzida – com consequente taxa reprodutiva < 1 . (COTTEN et al., 2013) Embora os dromedários sejam considerados os reservatórios primários para a transmissão ao ser humano, há fortes evidências que os morcegos sejam o reservatório ancestral do MERS-CoV e tenham transmitido o vírus aos dromedários há mais de 40 anos, uma vez que soroinquéritos encontraram anticorpos contra o MERS-CoV em amostras de camelídeos do início da década de 1980. (MÜLLER et al., 2014)

Além dos altamente patogênicos SARS-CoV, SARS-CoV-2 e MERS-CoV, os seres humanos também são acometidos por outros quatro coronavírus causadores de síndromes gripais leves: HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 e HCoV-229E. (CUI; LI; SHI, 2019) Estudos filogenéticos desses HCoVs indicam que todos os quatro são resultados de uma transmissão zoonótica, com alguns deles envolvendo espécies de morcegos. O HCoV-NL63, por exemplo, só foi descoberto em 2004, após o grande interesse nos coronavírus despertado pelo surgimento da SARS. (VAN DER HOEK et al., 2004) Desde então, observou-se que ele é um dos mais comuns agentes etiológicos de resfriados, com uma sazonalidade anual e disperso pelo mundo todo. (ABDUL-RASOOL et al., 2010) Estima-se que este HCoV circule na população humana há centenas de anos e possua um ancestral comum com coronavírus de morcegos, que pode ter existido há mais de 500 anos. (HUYNH et al., 2012) O papel de um hospedeiro intermediário na história evolutiva do HCoV-NL63 é provável, porém, ainda desconhecido.

O HCoV-229E também possui uma história evolutiva interessante e que exemplifica a capacidade de adaptação dos coronavírus a novos hospedeiros. Esse HCoV foi isolado e identificado em meados da década de 1960, a partir de pessoas com sintomas respiratórios nos Estados Unidos. (HAMRE; PROCKNOW, 1966) Apenas nos anos 2000 é que alguns vírus semelhantes ao HCoV-229E foram encontrados em morcegos africanos e em alpacas americanas mantidas em cativeiro. Análises evolutivas apontaram a alpaca como hospedeiro intermediário em uma história de transmissão envolvendo vários eventos de recombinação entre os vírus dos três hospedeiros. (CORMAN et al., 2015; CROSSLEY et al., 2012) A questão das alpacas americanas dificilmente terem entrado em contato com morcegos africanos foi resolvida por um estudo que encontrou vírus relacionados ao HCoV-229E em vários camelídeos africanos – dromedários e camelos –, que mostraram-se filogeneticamente muito próximos ao vírus isolado das alpacas. (CORMAN et al., 2016) A explicação mais plausível é que as alpacas tenham entrado em contato com camelídeos africanos compartilhando o mesmo cativeiro – em um zoológico por exemplo – e foram apenas hospedeiras acidentais. O provável animal reservatório e transmissor para o ser humano é o camelo ou dromedário.

Como podemos observar, eventos de transmissão zoonótica são comuns nos coronavírus. Entretanto, os mecanismos que permitem a essa família ter grande plasticidade de adaptação a novos hospedeiros ainda não são bem entendidos, mas provavelmente a alta taxa de recombinação viral – podendo chegar a 25% de todo o genoma – facilita a transposição da barreira entre as espécies. (BANERJEE et al., 2019) Como abordado no capítulo “SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão” deste livro, morcegos são hospedeiros ideais para coronavírus e possuem organismos permissivos à replicação viral. Um estudo avaliando

a diversidade global de coronavírus testou quase 20 mil amostras de animais e humanos e encontrou: i) alta taxa de positividade em morcegos; ii) correlação entre a taxa de diversidade genética dos coronavírus e a taxa de diversidade de espécies de morcegos presentes na região estudada; iii) maior frequência de eventos de transmissão entre espécies distantes – pertencentes a gêneros ou famílias diferentes – na Ásia e África. (ANTHONY et al., 2017) Tais achados reforçam o papel dos morcegos na evolução de coronavírus, similarmente ao que ocorre com porcos e aves para o vírus influenza, e destaca as regiões de maior risco para o surgimento de viroses emergentes. Importante lembrar que fatores antropogênicos, e não apenas a capacidade do vírus de adaptar-se a novos hospedeiros, são também determinantes na emergência de novas zoonoses. (JONES et al., 2008; KARESH et al., 2012)

A origem do SARS-CoV-2

Apesar do SARS-CoV e SARS-CoV-2 pertencerem à mesma espécie dentro do gênero *Betacoronavirus* (GORBALENYA et al., 2020), eles possuem uma identidade de nucleotídeos em seu genoma de apenas 79,5%. (ZHOU, P. et al., 2020) Um grande número de coronavírus relacionados à espécie *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* já foi identificado em morcegos e todos eles são evolutivamente próximos, pertencendo a um grupo taxonômico chamado sarbecovírus. Entre esses, o mais similar ao genoma do SARS-CoV-2 é chamado RaTG13 e foi isolado de morcegos na província chinesa de Yunnan, possuindo 94,6% de identidade. (ZHOU, P. et al., 2020) Ainda que muito distante para ser considerado a origem direta do SARS-CoV-2, essa foi a primeira evidência apontando para uma origem enzoótica e redesenhou o mesmo cenário da emergência do SARS-CoV em 2002, quando o contato próximo

entre humanos e animais exóticos em um mercado tradicional chinês promoveu a transmissão entre espécies. (POON et al., 2004)

Um candidato a hospedeiro intermediário entre morcegos e humanos na história evolutiva do SARS-CoV-2 surgiu de estudos que investigaram a presença de coronavírus em pangolins (LAM et al., 2020; XIAO et al., 2020; ZHANG; WU; ZHANG, 2020), um mamífero da ordem *Pholidota* ilegalmente vendido nos mercados chineses para uso na gastronomia e medicina tradicional. Análises filogenéticas dos genomas de coronavírus encontrados em pangolins mostraram uma grande proximidade com o SARS-CoV-2, entretanto com uma identidade ainda menor que o RaTG13, variando entre 85,5% e 92,4%. (LAM et al., 2020) Uma análise detalhada dos aminoácidos da região *Receptor-Binding Domain* (RBD) da proteína S, responsável pela ligação do vírus ao receptor ACE2 celular, mostrou que o coronavírus de pangolins possui 97,4% de similaridade com o SARS-CoV-2, enquanto o RaTG13 possui apenas 89,2% nessa região. Além disso, os seis resíduos de aminoácidos do RBD do SARS-CoV-2 identificados como responsáveis pela grande afinidade do vírus ao ACE2 humano estão presentes no coronavírus de pangolim, enquanto apenas um deles está presente no genoma do RaTG13. (ANDERSEN et al., 2020) Essa observação é consistente com a similaridade dos receptores ACE2, que é maior entre ser humano e pangolim, do que entre ser humano e morcego.

A relação evolutiva entre SARS-CoV-2 com os coronavírus de pangolins e morcegos levanta a hipótese de um possível evento de recombinação, em que a região RBD poderia ter uma origem distinta do resto do genoma. De fato, eventos de recombinação são frequentes entre os coronavírus (BANERJEE et al., 2019) e a história evolutiva dos sarbecovírus é marcada por várias dessas trocas de material genético. (BONI et al., 2020) Entretanto, até o momento da redação deste capítulo, estudos não encontraram sinais de recombinação recente entre o SARS-CoV-2 e os vírus

mais proximamente correlacionados (exemplo: RaTG13 e coronavírus de pangolins).

A última e talvez mais intrigante parte desse quebra-cabeça genético está relacionada a quatro aminoácidos presentes na região de ligação das subunidades S1/S2 da proteína S do SARS-CoV-2. A inserção dos aminoácidos prolina, arginina, arginina, alanina forma um Sítio de Clivagem Polibásico com uma arginina adjacente no genoma do SARS-CoV-2 e é alvo da protease celular furina. A pré-clivagem no sítio S1/S2 catalisado pela furina promove a difusão do vírus através da fusão celular e é necessária para uma efetiva entrada do vírus em células pulmonares. (HOFFMANN; KLEINE-WEBER; PÖHLMANN, 2020) A aquisição – através de mutações – de um sítio de clivagem polibásico na hemaglutinina do vírus da influenza aviária é um importante fator de virulência, promovendo a disseminação sistêmica do vírus no hospedeiro e levando a taxas de mortalidades de mais de 75%. (LUCZO et al., 2015) Em coronavírus, esse mecanismo está também presente no MERS-CoV, HCoV-OC43 e HCoV-HKU1, mas não havia ainda sido descrito entre os sarbecovírus, ou seja, nem o RaTG13 e nem o coronavírus de pangolins possuem um sítio de clivagem polibásico.

As características únicas do SARS-CoV-2, como a alta afinidade pelo ACE2 – maior inclusive que o SARS-CoV – e a presença de sítios de clivagem polibásico – com potencial aumento da sua virulência – geraram uma grande discussão sobre uma possível origem artificial do vírus. Essa hipótese considera que o vírus possa ter escapado de um laboratório no qual experimentos com passagens celulares ou infecção em modelos animais teria selecionado uma cepa com as características atuais. (ANDERSEN et al., 2020) Casos de cientistas se infectando acidentalmente com vírus em laboratórios já ocorreram em outras ocasiões (LIM et al., 2004), e experimentos que promovem aumento de virulência ou

adaptação a novas células hospedeiras são rotineiros em vários laboratórios do mundo. Entretanto, até o momento, nenhuma evidência científica em favor da origem artificial do vírus foi encontrada, enquanto um corpo crescente de estudos tem mostrado que um evento de transmissão zoonótica é o cenário mais plausível para a origem do SARS-CoV-2.

O mais recente deles, ao explorar a diversidade de coronavírus em morcegos, encontrou um exemplar do grupo dos sarbecovírus – nomeado RmYN02 – que possui a maior similaridade com o SARS-CoV-2 na região da ORF1ab e também possui inserções de aminoácidos no sítio S1/S2 da proteína S. (ZHOU, H. et al., 2020) Apesar de, no caso do RmYN02, essas inserções não formarem um sítio de clivagem polibásico, esse genoma é uma evidência da ocorrência natural de inserções nessa região do genoma dos coronavírus. Importante ressaltar que poucos vírus similares ao SARS-CoV-2 foram identificados e novos estudos explorando a diversidade viral em animais poderão revelar um “parente” mais próximo. De fato, estimativas apontam que o ancestral comum entre SARS-CoV-2 e RaTG13 data de 40 a 70 anos atrás (BONI et al., 2020), evidenciando que uma grande parte da história evolutiva só poderá ser revelada se novos coronavírus forem encontrados.

Vigilância genômica do SARS-CoV-2

Embebido no genoma dos seres vivos está toda a informação acumulada ao longo de sua evolução. A partir do estudo das sequências de DNA e RNA, pode-se reconstruir o passado de qualquer organismo para entender sua origem com base nas semelhanças entre seu genoma e o de outras espécies. Na seção anterior, foi discutido como a busca por vírus similares na natureza, especialmente entre morcegos, pode revelar o caminho percorrido pelo SARS-CoV-2 até chegar aos seres humanos. Entretanto, a mesma abordagem

utilizada para se entender a origem desse vírus pode ser aplicada no monitoramento da disseminação entre os seres humanos, o que é conhecido como vigilância (ou epidemiologia) genômica.

Essa forma de estudar a disseminação de epidemias só é possível para organismos com altas taxas de mutação, ou seja, cujos genomas acumulam mudanças rapidamente, em uma taxa mais veloz que o curso de duração do surto epidêmico. (CAMPBELL et al., 2018) Devido a fatores como a baixa fidelidade das enzimas replicadoras de RNA, os vírus de RNA apresentam altas taxas de mutação por ciclo replicativo. Um vírus mutante pode então ser transmitido a um novo hospedeiro e assim sucessivamente, gerando a fixação dessa mutação na população e permitindo que a rota de disseminação seja rastreável. A frequência com que mutações são fixadas na população se chama “taxa de substituição” – às vezes também chamada de “taxa evolutiva” – e muitos vírus de RNA possuem taxas próximas a 1×10^{-3} substituições por sítio por ano. Considerando que muitos vírus de RNA possuem genomas de aproximadamente 10 mil nucleotídeos, em um ano, se acumulariam 10 novas substituições. (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008)

Com o advento de novas tecnologias de sequenciamento e a consequente diminuição dos custos dessas técnicas, estudos em vigilância genômica têm sido capazes de explorar a diversidade genética de vírus epidêmicos em grandes grupos amostrais. Isso foi feito de forma muito eficaz para epidemias de Ebola entre 2014 e 2015 no oeste de África (DUDAS et al., 2017) e de Zika nas Américas em 2015 e 2016 (FARIA et al., 2017), revelando, em um curto período de tempo, questões cruciais de dispersão da epidemia. A pandemia de COVID-19, por sua vez, tem mobilizado laboratórios do mundo inteiro para o monitoramento em tempo real das formas genéticas do SARS-CoV-2, gerando genomas em uma velocidade e quantidade sem precedentes na história da saúde pública. O primeiro genoma de SARS-CoV-2 foi publicado

em 5 de janeiro de 2020 (WU et al., 2020), apenas cinco dias após a Organização Mundial da Saúde (OMS) ser notificada sobre o surto de pneumonia de etiologia desconhecida na cidade de Wuhan na China. Desde então, mais de 35 mil genomas do vírus foram depositados em bancos de dados públicos, informando sobre a epidemia em quase 100 países diferentes e disponíveis para serem analisados por grupos de pesquisa do mundo inteiro.

Com essa grande quantidade de dados genéticos do SARS-CoV-2, estudos estimaram uma taxa de substituição média de 1×10^{-3} substituições/sítio/ano, concordando com o que já era conhecido sobre outros coronavírus, como o MERS-CoV e SARS-CoV, e dentro do esperado para um vírus de RNA. (DUCHENE et al., 2020; TAIAROA et al., 2020) Com a taxa de substituição definida, foi possível então estimar que o início da pandemia ocorreu por volta do final de novembro de 2019, na China, e que o vírus teria circulado sem ser notado por aproximadamente um mês.

Mesmo com uma das mais rápidas taxas evolutivas da natureza, é necessário tempo para que se acumulem mudanças nos genomas dos vírus de RNA. Em surtos epidêmicos de origem recente e rápida dispersão, há pouca diversidade genética acumulada, o que significa pouca informação para aplicação de métodos filogenéticos. Em outras palavras, o início de uma epidemia pode ser marcado por taxas de transmissão mais rápidas que as taxas evolutivas e genomas virais idênticos são observados em diversos indivíduos. Esse tem sido um dos obstáculos para a vigilância genômica do SARS-CoV-2 e, portanto, muita cautela é necessária ao se tentar reconstruir rotas de dispersão apenas pela interpretação de árvores filogenéticas. (VILLABONA-ARENAS; HANAGE; TULLY, et al., 2020) Dados epidemiológicos, como a distribuição temporal do número de casos, ou dados do paciente, como histórico de viagens, devem ser analisados em conjunto aos dados genéticos.

Tendo em mente essas limitações, grupos de pesquisa de diversos países têm buscado entender a história de transmissão local do SARS-CoV-2. Lu e colaboradores (2020) investigaram a epidemia em Guangdong e observaram que as redes de transmissão local eram resultado de introduções com origem em outras províncias chinesas. A duração dessas redes de transmissão locais foi curta, evidenciando a eficácia das medidas de contenção. Em Nova Iorque, por outro lado, as restrições de viagens impostas não foram suficientes para conter os múltiplos eventos de importação de linhagens virais vindos principalmente da Europa. (GONZALEZ-REICHE et al., 2020) O estudo também mostrou que casos sintomáticos diagnosticados logo após a chegada na cidade não geraram infecções secundárias, ressaltando a importância das medidas de quarentena. Por fim, Worobey e demais autores (2020) investigaram a disseminação inicial na Europa e no estado de Washington nos Estados Unidos da América (EUA), refutando observações de estudos prévios que ligavam a ignição da transmissão comunitária a dois casos pontuais de viajantes vindos da China. Assim como ocorreu em Nova Iorque, múltiplas introduções não detectadas foram responsáveis pelo início da epidemia nessas localidades e os casos de importação detectados foram contidos e não colaboraram efetivamente com a transmissão local. Os autores ainda reforçam a importância de se interpretar as árvores filogenéticas do SARS-CoV-2 com máxima cautela, uma vez que genomas idênticos são encontrados em diferentes indivíduos e localidades.

O estudo de genomas de vírus epidêmicos através de métodos filogenéticos tem ganhado importância nos últimos anos, levando até a denominações de novas áreas do conhecimento, como é o caso da vigilância/epidemiologia genômica. Nesse sentido, uma grande quantidade de dados genéticos tem sido gerada para o SARS-CoV-2, mas a urgência de se obter respostas pode levar

a conclusões precipitadas. (MACLEAN et al., 2020) Por exemplo, o surgimento de novos tipos virais, com maior potencial patogênico ou de transmissibilidade, não pode ser estimado apenas com base no surgimento de mutações e aumento de sua frequência na população. Em uma epidemia, disseminando-se rapidamente por uma população sem exposição prévia e de alta mobilidade, novas variantes podem ser introduzidas a qualquer momento e o aumento da sua frequência é estocástico. Dessa forma, estudos que visem medir o impacto biológico de novas mutações devem ser complementados com análises de dados clínicos, ensaios *in vitro* e/ou modelagens *in silico*. Até a data de redação deste capítulo, linhagens do SARS-CoV-2 haviam sido definidas apenas com intuito de classificação e organização da diversidade genética do vírus (RAMBAUT et al., 2020) e nenhuma evidência de diversificação para novos fenótipos havia sido apresentada. Dessa forma, o impacto funcional de mutações e a ação da seleção positiva são temas a serem elucidados por estudos futuros.

Referências

ABDUL-RASOOL, S.; FIELDING, B. C. Understanding Human Coronavirus HCoV-NL63. *The Open Virology Journal*, [Sharjah], v. 4, p. 76-84, May 2010. DOI: 10.2174/1874357901004010076. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20700397>. Acesso em: 30 maio 2020.

ANDERSEN, K. G. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, New York, v. 26, n. 4, p. 450-452, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0820-9>. Acesso em: 30 maio 2020.

ANTHONY, S. J. et al. Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evolution*, Oxford, v. 3, n. 1, p. 1-15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ve/vex012>. Acesso em: 30 maio 2020.

BANERJEE, A. *et al.* Bats and coronaviruses. *Viruses*, Basel, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v11010041>. Acesso em: 30 maio 2020.

BONI, M. F. *et al.* Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *BioRxiv*, [s. l.], p. 1-25, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.015008>. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.30.015008v1>. Acesso em: 30 maio 2020.

CAMPBELL, F. *et al.* When are pathogen genome sequences informative of transmission events? *PLoS Pathogens*, California, v. 14, n. 2, p. 1-21, Feb. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006885>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006885>. Acesso em: 30 maio 2020.

COLVERO, L. P. *et al.* Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil. *Revue Scientifique et Technique*, Paris, v. 34, n. 3, p. 993-999, Dec. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27044167>. Acesso em: 30 maio 2020.

CONZADE, R. *et al.* Reported Direct and Indirect Contact with Dromedary Camels among Laboratory-Confirmed MERS-CoV Cases. *Viruses*, Basel, v. 10, n. 8, Aug. 2018. DOI: 10.3390/v10080425. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30104551>. Acesso em: 30 maio 2020.

CORMAN, V. M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveillanc*e : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 1-8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>. Disponível em: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>. Acesso em: 30 maio 2020.

CORMAN, V. M. *et al.* Evidence for an Ancestral Association of Human Coronavirus 229E with Bats. *Journal of Virology*, Washington, v. 89, n. 23, p. 11858-11870, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01755-15>. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/89/23/11858>. Acesso em: 30 maio 2020.

CORMAN, V. M. *et al.* Link of a ubiquitous human coronavirus to dromedary camels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 113, n. 35, p. 9864-9869, Aug. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27528677>. DOI: 10.1073/pnas.1604472113. Acesso em: 30 maio 2020.

COTTEN, M. *et al.* Transmission and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus in Saudi Arabia: a descriptive genomic study. *The Lancet*, London, v. 382, n. 9909, p. 1993-2002, Dec. 2013. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61887-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61887-5). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(13\)61887-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(13)61887-5/fulltext). Acesso em: 1 jun. 2020.

CROSSLEY, B. M. *et al.* Identification and characterization of a novel alpaca respiratory coronavirus most closely related to the human coronavirus 229E. *Viruses*, Basel, v. 4, n. 12, p. 3689-700, Dec. 2012. DOI: 10.3390/v4123689. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23235471>. Acesso em: 30 maio 2020.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0118-9>. Acesso em: 30 maio 2020.

DONNELLY, C. A. *et al.* Worldwide reduction in MERS cases and deaths since 2016. *Emerging Infectious Diseases*, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 1758-1760, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2509.190143>. Acesso em: 30 maio 2020.

DUCHENE, S. *et al.* Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2. *BioRxiv*, [s. l.], 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.077735>. Disponível em: Acesso em: 8 jul. 2020.

DUDAS, G. *et al.* Virus genomes reveal factors that spread and sustained the Ebola epidemic. *Nature*, [s. l.], v. 544, n. 7650, p. 309-315, Apr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature22040>. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.04.077735v1.full.pdf+html>. Acesso em: 30 maio 2020.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, London, v. 9, n. 4, p. 267-276, Apr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2323>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg2323>. Acesso em: 30 maio 2020.

FARIA, N. R. *et al.* Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*, [s. l.], v. 546, n. 7658, p. 406-410, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature22401>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature22401>. Acesso em: 30 maio 2020.

GONZALEZ-REICHE, A. S. *et al.* Introductions and early spread of SARS-CoV-2 in the New York City area. *Science*, [s. l.], v. 369, n. 6051, p. 297-301, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abc1917>. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/369/6501/297>. Acesso em: 30 maio 2020.

GORBALENYA, A. E. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, [London], v. 5, n. 4, p. 536-544, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>. Acesso em: 28 maio 2020.

HAMRE, D.; PROCKNOW, J. J. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Malden, v. 121, n. 1, p. 190-193, Jan. 1966. DOI: 10.3181/00379727-121-30734. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4285768>. Acesso em: 30 maio 2020.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; PÖHLMANN, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell*, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 779-784, May 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>. Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-cell/pdf/S1097-2765\(20\)30264-1.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276520302641%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/molecular-cell/pdf/S1097-2765(20)30264-1.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1097276520302641%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 30 maio 2020.

HUYNH, J. *et al.* Evidence supporting a zoonotic origin of human coronavirus strain NL63. *Journal of Virology*, Washington, v. 86, n. 23, p. 12816-12825, Dec. 2012. DOI: 10.1128/JVI.00906-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993147>. Acesso em: 30 maio 2020.

JONES, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, London, v. 451, n. 7181, p. 990-9933, Feb. 2008. DOI: 10.1038/nature06536. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288193>. Acesso em: 30 maio 2020.

KARESH, W. B. *et al.* Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *The Lancet*, London, v. 380, n. 9857, p. 1936-1945, Dec. 2012. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61678-X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23200502>. Acesso em: 30 maio 2020.

LAM, T. T. Y. *et al.* Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, [s. l.], v. 583, p. 282-285, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2169-0>. Acesso em: 30 maio 2020.

LIM, P. L. *et al.* Laboratory-acquired severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, Boston, v. 350, n. 17, p. 1740-5, Apr. 2004. DOI: 10.1056/NEJMoa032565. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15103000>. Acesso em: 30 maio 2020.

LU, J. *et al.* Genomic Epidemiology of SARS-CoV-2 in Guangdong Province, China. *Cell*, [s. l.], 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.023>. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(20\)30486-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867420304864%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(20)30486-4?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867420304864%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 30 maio 2020.

LUCZO, J. M. *et al.* Molecular pathogenesis of H5 highly pathogenic avian influenza: The role of the haemagglutinin cleavage site motif. *Reviews in Medical Virology*, [New York], v. 25, n. 6, p. 406-430, Nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.1846>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rmv.1846>. Acesso em: 30 maio 2020.

MACLEAN, O. A. *et al.* No evidence for distinct types in the evolution of SARS-CoV-2. *Virus Evolution*, Oxford, v. 6, n. 1, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/ve/veaa034>. Disponível em: Acesso em: 30 maio 2020.

MÜLLER, M. A. *et al.* MERS coronavirus neutralizing antibodies in camels, Eastern Africa, 1983-1997. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 20, n. 12, p. 2093-2095, Dec. 2014. DOI: 10.3201/eid2012.141026. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25425139>. Acesso em: 30 maio 2020.

POON, L. L. M. *et al.* The aetiology, origins, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Infectious Diseases*, [London], v. 4, n. 11, p. 663-671, Nov. 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01172-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01172-7). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(04\)01172-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(04)01172-7/fulltext). Acesso em: 30 maio 2020.

RAMBAUT, A. *et al.* A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 to assist genomic epidemiology. *BioRxiv*, [s. l.], 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.046086>. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.17.046086v1>. Acesso em: 30 maio 2020.

REUSKEN, C. B. *et al.* Geographic distribution of MERS coronavirus among dromedary camels, Africa. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 20, n. 8, p. 1370-4, Aug. 2014. DOI: 10.3201/eid2008.140590. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25062254>. Acesso em: 30 maio 2020.

SCHULZ, L. L.; TONSOR, G. T. Assessment of the economic impacts of porcine epidemic diarrhea virus in the United States. *Journal of Animal Science*, Champaign, IL, v. 93, n. 11, p. 5111-5118, Nov. 2015. DOI: 10.2527/jas.2015-9136. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26641031>. Acesso em: 30 maio 2020.

TAIAROA, G. *et al.* Direct RNA sequencing and early evolution of SARS-CoV-2. *BioRxiv*, [s. l.], v. 2, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.03.05.976167>. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.05.976167v2>. Acesso em: 30 maio 2020.

VAN DER HOEK, L. *et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine*, New York, v. 10, n. 4, p. 368-373, Apr. 2004. DOI: 10.1038/nm1024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034574>. Acesso em: 30 maio 2020.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; HANAGE, W. P.; TULLY, D. C. Phylogenetic interpretation during outbreaks requires caution. *Nature Microbiology*, [London], v. 5, n. 7, p. 876-877, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0738-5>. Disponível em: Acesso em: 30 maio 2020.

WOROBAY, M. *et al.* The emergence of SARS-CoV-2 in Europe and the US. *BioRxiv*, [s. l.], p. 2020.05.21.109322, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.109322>. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.21.109322v1.full.pdf+html>. Acesso em: 30 maio 2020.

WU, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, [s. l.], v. 579, n. 7798, p. 265-269, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2008-3>. Acesso em: 30 maio 2020.

XIAO, K. *et al.* Isolation and Characterization of 2019-nCoV-like Coronavirus from Malayan Pangolins. *BioRxiv*, [s. l.], 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.951335>. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.17.951335v1>. Acesso em: 30 maio 2020.

ZAKI, A. M. *et al.* Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England journal of Medicine*, Boston, v. 367, n. 19, p. 1814-1820, Nov. 2012. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075143>. Acesso em: 30 maio 2020.

ZHANG, T.; WU, Q.; ZHANG, Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Current Biology*, London, v. 30, n. 7, p. 1346-1351, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022>. Disponível em: [https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822\(20\)30360-2.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982220303602%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822(20)30360-2.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982220303602%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 30 maio 2020.

ZHOU, H. *et al.* A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Current Biology*, London, v. 30, n. 11, p. 2196-2203, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.023>. Acesso em: 28 maio. 2020.

ZHOU, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, [s. l.], v. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2012-7>. Acesso em: 30 maio 2020.