



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos de alfavírus (CHIKV e MAYV)

ANNA FERNANDA PINHEIRO DE VASCONCELLOS
BRUM DE SOUZA

Orientador: Dr. Renato de Oliveira Resende

Brasília, 2019



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos de alfavírus (CHIKV e MAYV)

ANNA FERNANDA PINHEIRO DE VASCONCELLOS

BRUM DE SOUZA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Renato de Oliveira Resende

Brasília, 2019

ANNA FERNANDA PINHEIRO DE VASCONCELLOS

BRUM DE SOUZA

Estudos genômicos, filogenéticos e
proteômicos de alfavírus (CHIKV e MAYV)

Banca examinadora

Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende (Orientador) (CEL – UnB)

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro (CEL - UnB)

Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau (CEL - UnB)

‘Always pass on what you have learned.’

- Master Yoda



RESUMO

Os arbovírus são vírus que necessitam de um vetor artrópode para serem transmitidos. Entre eles, estão o *Chikungunya virus* (CHIKV) e o *Mayaro virus* (MAYV), dois integrantes do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*. Ambos são arbovírus artritogênicos que apresentam genoma de RNA fita simples senso positivo de aproximados 12kb. O CHIKV é amplamente distribuído e, apesar de já ter causado graves epidemias no Brasil, há poucos isolados brasileiros com genoma completo sequenciado. Por outro lado, o MAYV possui distribuição quase restrita à América do Sul, sendo um vírus historicamente negligenciado. Apesar de ser transmitido principalmente por *Haemagogus spp.*, o MAYV também pode ser transmitido por mosquitos de outros gêneros, como o *Aedes aegypti*. Assim, no Capítulo 2 do presente trabalho, foram realizados o sequenciamento de alto desempenho do genoma completo e um estudo de filogenia de seis isolados de CHIKV do Centro-Oeste brasileiro. Esses isolados, os primeiros a serem publicados de tal região, apresentaram sequências de 11.811 nucleotídeos. Nenhum deles possui as mutações A226V (E1) ou L210Q (E2), presentes em isolados transmitidos por *Aedes albopictus*, sendo provavelmente transmitidos pelo vetor urbano principal *A. aegypti*. A análise filogenética mostrou que os isolados de CHIKV do Centro-Oeste pertencem à linhagem *East-Central-South Africa*. Já o Capítulo 3 focou na análise proteômica qualitativa de cultura de células Aag-2 de *A. aegypti* durante infecção por MAYV, visto que as proteínas são as principais mediadoras da comunicação intracelular. Após espectrometria de massas, foram identificadas 191 proteínas estatisticamente significativas. Ao longo das 48h de infecção, as proteínas da célula hospedeira, em geral, tiveram sua abundância reduzida. Já as proteínas virais foram super expressas. As proteínas de *A. aegypti* que foram super expressas mostraram-se importantes para a replicação viral, como a proibitina, a enolase fosfatase e1, chaperonas, uma sinaptobrevina e o fator de transcrição HCFC1. Tais proteínas já foram também identificadas como super expressas em estudos envolvendo outros arbovírus. Além do mais, vias de secreção clássicas de proteínas foram menos utilizadas durante a infecção, enquanto vias não convencionais foram ativadas. Juntos, esses dados auxiliam na compreensão da evolução e da dispersão de CHIKV, assim como elucidam componentes que são essenciais para a infecção por MAYV, sendo possivelmente importantes para a relação arbovírus-vetor em geral.

Palavras-chave: CHIKV, genoma completo, filogenia, *A. aegypti*, MAYV, proteômica.

ABSTRACT

Arboviruses are viruses that require an arthropod vector to be transmitted. Among them are *Chikungunya virus* (CHIKV) and *Mayaro virus* (MAYV), two members of the genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*. Both of them are arthritogenic arboviruses that have a single-strand positive sense RNA genome of approximately 12kb. CHIKV is widely distributed and, although it has already caused serious epidemics in Brazil, there are few Brazilian isolates with sequenced complete genome. On the other hand, the MAYV is distributed almost exclusively to South America, being a virus historically neglected. Although being transmitted mainly by *Haemagogus spp.*, MAYV can also be transmitted by mosquitoes of other genera, such as *Aedes aegypti*. Thus, in Chapter 2 of the present work, high-throughput sequencing of the complete genome and a phylogeny study of six CHIKV isolates from the Brazilian Midwest were performed. These isolates, the first ones to be published from this region, had sequences of 11,811 nucleotides. None of them has the mutations A226V (E1) or L210Q (E2), which were detected in isolates transmitted by *Aedes albopictus*, being probably transmitted by the main urban vector *A. aegypti*. Phylogenetic analysis showed that the Midwest CHIKV isolates belong to the East-Central-South Africa lineage. Chapter 3 focused on the qualitative proteomic analysis of *A. aegypti* Aag-2 cell culture during MAYV infection, given proteins are the main mediators of intracellular communication. After mass spectrometry, we identified 191 statistically significant proteins. Over the 48 hours of infection, the host cell proteins had their abundance reduced in general. Viral proteins, in contrary, were upregulated. Upregulated *A. aegypti* proteins have proven to be important for viral replication, such as prohibitin, enolase phosphatase e1, chaperones, synaptobrevins and the transcription factor HCFC1. Such proteins have also been identified as upregulated in studies involving other arboviruses. In addition, classical protein secretion pathways were less used during infection, while non-conventional pathways were activated. Together, these data assist in understanding the evolution and dispersion of CHIKV, as well as elucidating components that are essential for MAYV infection, possibly being important for the arbovirus-vector relationship in general.

Key-words: CHIKV, complete genome, phylogeny, *A. aegypti*, MAYV, proteomics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1. Arbovírus e <i>Aedes aegypti</i>	8
1.2. Interação vírus-vetor	11
1.3. <i>Alphavirus</i> (<i>Chikungunya virus</i> e <i>Mayaro virus</i>)	13
1.4. Cultura celular	18
1.5. Sequenciamento e estudos de filogenia	19
1.6. Análise proteômica	21
1.7. Proteômica aplicada à interação arbovírus-vetor	24
1.8. Esboço e objetivos da dissertação	25
2. GENÔMICA E FILOGENIA DE ISOLADOS DE CHIKV CIRCULANDO NO CENTRO-OESTE	26
2.1. Resumo / <i>Abstract</i>	26
2.2. Introdução	28
2.3. Objetivos	29
2.4. Materiais e Métodos	30
2.5. Resultados e Discussão	34
2.6. Conclusões	37
3. MODIFICAÇÃO DO PROTEOMA DE CÉLULAS DE <i>Aedes aegypti</i> DURANTE INFECÇÃO POR MAYV	39
3.1. Resumo / <i>Abstract</i>	39
3.2. Introdução	41
3.3. Objetivos	42
3.4. Materiais e Métodos	43
3.5. Resultados e Discussão.....	50
3.6. Conclusões	64
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
LISTA DE FIGURAS	79
LISTA DE TABELAS	81
ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	82
ANEXO 1	85
AGRADECIMENTOS	91

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Arbovírus e *Aedes aegypti*

No século XIX, o termo vírus, do Latim, ‘veneno’, era utilizado para descrever qualquer agente que causasse uma doença infecciosa (Smith, 2012). Após estudos nas áreas de Microbiologia e Imunologia de cientistas como Louis Pasteur e Robert Koch, começou-se a diferenciar os microrganismos de acordo com a sua capacidade de ser retido ou não nos filtros de Chamberland (Horzinek, 1997). Aqueles ‘venenos’ que eram retidos foram chamados de bactérias, enquanto os que passavam pelos filtros ficaram conhecidos como vírus (Smith, 2012).

Atualmente, os vírus são compreendidos como um agente infeccioso muito pequeno que atua como parasita intracelular obrigatório. Fora das células essas partículas são inertes, mas dentro, utilizando a maquinaria do hospedeiro, conseguem se replicar e produzir novas partículas (Gelderblom, 1996). Os vírus possuem apenas seu material genético envolto por um capsídeo proteico que pode ou não ser envolvido por uma membrana lipídica denominada envelope. Os vírus conseguem infectar todos os tipos de seres vivos conhecidos. Bactérias, *archeas*, fungos, plantas e animais (Koonin *et al.*, 2006). Podem também, dependendo dos organismos que infectam, ser transmitidos de diversas formas. Os vírus que causam doenças em humanos podem ser transmitidos de forma indireta, como por fluidos corporais ou por vetores animais, e de forma direta, como pelo contato com pele ou objetos perfurantes contaminados (<http://pandemsim.com/methods.html>).

Dentre os vírus humanos transmitidos por vetores, estão os arbovírus. O termo arbovírus (do inglês, *arthropod-borne virus*) não possui valor taxonômico, indicando apenas a necessidade de um vetor artrópode no ciclo de transmissão do vírus entre vertebrados, sendo muitos deles zoonóticos (Brown & Hernandez, 2012). Até o momento, com exceção do *African swine fever virus* (ASFV), que possui genoma de DNA, todos os outros arbovírus possuem genoma de RNA e pertencem em sua maioria às famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyavirales* e *Reoviridae* (Hernandez *et al.*, 2014). Podem causar febre, dores no corpo, hemorragias, doenças artríticas e encefalíticas e até a morte nos vertebrados. Em contraste, seus vetores artrópodes permanecem assintomáticos em infecção persistente (Liang *et al.*, 2015).

Os arbovírus desenvolveram dois ciclos replicativos contínuos e interligados (**Figura 1.1**): o selvático, no qual ocorre transmissão dos vírus entre o vetor artrópode e outros vertebrados não humanos, e o urbano, cuja transmissão viral se dá entre vetor e humanos, o principal reservatório (Galán-Huerta *et al.*, 2015). Assim, tais vírus foram evolutivamente adaptados à exposição tanto ao sistema imune do invertebrado quanto do vertebrado (McFarlane *et al.*, 2014), sendo capaz de infectar e se replicar em hospedeiros de filos diferentes, além de uma série de células em cultura (Lyski, 2013). Certos vírus não possuem a capacidade de produzir uma viremia suficientemente alta no homem para que o vetor artrópode seja infectado ao picá-lo. Já os vírus que possuem tal capacidade acabam sendo os patógenos que causam maior preocupação como, por exemplo, o *Dengue virus* (DENV) (Weaver, 2013).

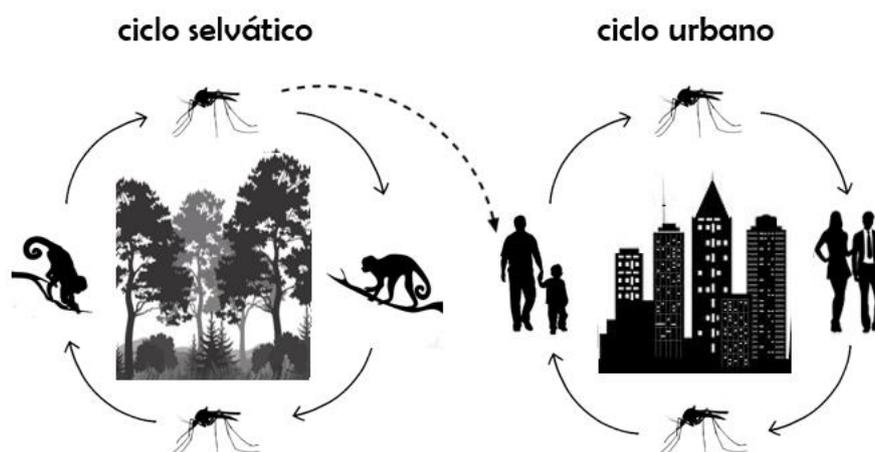


Figura 1.1 Representação dos ciclos selvático e urbano de um arbovírus.

De acordo com Hernandez e colaboradores (2014), há indícios de que alguns arbovírus tenham evoluído de vírus de plantas que se adaptaram à replicação nos artrópodes e que, posteriormente, insetos hematófagos adquiriram a habilidade de infectar vertebrados. Acredita-se que tamanha capacidade de diversificação esteja relacionada à natureza *error-prone* das RNA polimerases dependentes de RNA (RdRp) virais.

Originalmente a maioria dos arbovírus eram apenas zoonóticos na natureza, circulando entre animais selvagens e infectando pessoas ocasionalmente (Weaver, 2013). Tal processo aconteceu por muitos séculos e a diferenciação entre os ciclos selvático e urbano

possivelmente se deu a partir da expansão da população humana e suas mudanças de hábitos, as quais aumentaram a exposição a infecções (Weaver, 2013). De acordo com McBride *et al.* (2014), o hábito de se alimentar de sangue é extremamente raro em insetos, sendo que das 1-10 milhões de espécies de insetos existentes, apenas 10,000 se alimentam de sangue e apenas cerca de 100 espécies preferem o sangue humano. Contudo, quando tal preferência é desenvolvida, os insetos podem disseminar doenças de forma muito eficiente.

Na busca de ferro-hemoglobina para a maturação e desenvolvimento completo dos seus ovos, o mosquito fêmea, ao se alimentar de sangue infectado (<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>), recebe vírions em seu intestino, os quais encontram uma barreira natural contra infecção e transmissão viral formada por células epiteliais. Apenas parte dos vírions consegue se replicar nas células epiteliais intestinais. Ao serem levados pela hemolinfa, eventualmente atingem tecidos secundários como a glândula salivar, onde se reproduzem e podem ser transmitidos a um novo hospedeiro vertebrado pela picada (Lyski, 2013). Nesse ciclo, vírus humanos não causam sintomas no mosquito vetor, apesar de se replicar dentro dele. Nos vertebrados, por outro lado, os arbovírus são injetados diretamente na corrente sanguínea. Apesar de poderem ter tropismo por células diferentes, os arbovírus humanos têm em comum a característica de causar doença em seu hospedeiro (Franz *et al.*, 2015).

Entre alguns dos vetores virais amplamente conhecidos está o mosquito *Aedes aegypti*. Ele foi descrito cientificamente pela primeira vez em 1762, quando foi denominado *Culex aegypti*. O nome definitivo, *A. aegypti*, foi estabelecido em 1818 após a descrição do gênero *Aedes* (<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>). Esse vetor arboviral é um díptero da família *Culicidae* que se apresenta em duas subespécies (**Figura 1.2**): *A. aegypti formosus*, o tipo selvagem original da África, e o *A. aegypti*, a forma urbana existente em quase todo o planeta (<https://www.vectorbase.org/organisms/aedes-aegypti>). De acordo com estudos realizados por McBride e colaboradores (2014), o *A. aegypti formosus* se alimenta preferencialmente do sangue de vertebrados não-humanos. Já o *A. aegypti aegypti* tem preferência por humanos devido ao odorante volátil sulcatona. O *A. aegypti aegypti* receptor olfativo específico para cheiro humano *AaegOr4*, o qual se tornou mais desenvolvido ao longo da evolução. Tendo se adaptado não somente a viver nas cidades, como também a se alimentar do sangue humano, o *A. aegypti aegypti* se tornou o principal vetor urbano de uma série de arboviroses (McBride *et al.*, 2014). Dessa forma, todas as

referências ao mosquito *A. aegypti* neste trabalho são relativas a tal subespécie. Em 1955, o Brasil chegou a erradicar o *A. aegypti* como resultado de medidas para controle da febre amarela. Contudo, já no final da década de 1960, o relaxamento das medidas adotadas levou à reintrodução do vetor em território nacional. Hoje, o mosquito é encontrado em todos os Estados brasileiros (<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>).

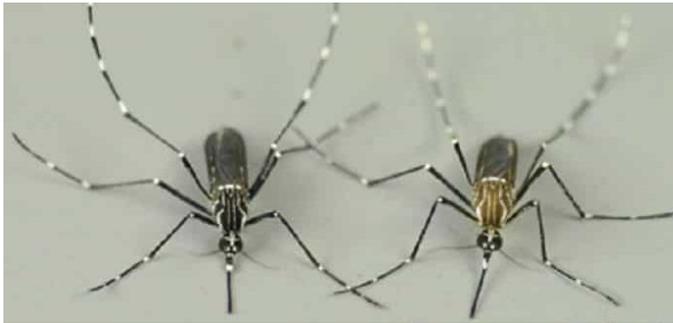


Figura 1.2. À esquerda, *A. aegypti formosus*. À direita, *A. aegypti*. Fonte: McBride *et al.* (2014).

Arbovírus infectam centenas de milhares de pessoas anualmente, causando doenças muitas vezes debilitantes e um número de mortes elevado. Muitas doenças arbovirais têm mostrado um aumento na incidência nas últimas décadas, principalmente em áreas previamente não endêmicas devido à ampla distribuição geográfica de vetores como *A. aegypti* e *A. albopictus* (Walker *et al.* 2014), além da crescente circulação de pessoas entre continentes. Infelizmente vacinas humanas estão disponíveis para um número muito limitado de arbovírus (Franz *et al.*, 2015). A soma desses fatores levou a um rápido aumento de epidemias na última década. Como resultado, autoridades de saúde pública nos países tropicais ficam sobrecarregadas com o aumento de tarefas e responsabilidades ligadas a doenças arbovirais, ao mesmo tempo em que a população não se previne de forma eficaz (Cheng *et al.*, 2017).

1.2. Interação vírus-vetor

A interação vírus-vetor possui características que a diferenciam substancialmente da interação vírus-hospedeiro. Nos vertebrados, as arboviroses, em geral, são agudas e autolimitadas. Já no mosquito a infecção sistêmica persiste por toda a sua vida sem que ele apresente sintomas da doença, apesar de produzir altos níveis de partículas infecciosas. Assim, o mosquito pode transmitir o vírus de forma muito eficiente (Franz *et al.*, 2015). Outra diferença é que, ao invés de entrarem diretamente na corrente sanguínea, os vírus são

ingeridos pelos mosquitos juntamente com o sangue, acionando dessa forma outras vias e estratégias de imunidade. Entre elas, a via de RNA interferente, as vias JAK-STAT, Imd e Toll (McFarlane *et al.*, 2014). Assim como outros invertebrados, os mosquitos contam apenas com a imunidade inata para se proteger contra patógenos, já que não apresentam os mecanismos de imunidade adquirida dos mamíferos (Cheng *et al.*, 2017).

Ao ingerir sangue de um vertebrado infectado com arbovírus (**Figura 1.3**), os mosquitos proporcionam aos vírus acesso à camada única de células epiteliais do intestino médio, local em que entram pelas microvilosidades e lá se replicam (Franz *et al.*, 2015). Caso o patógeno não consiga ser reconhecido pelas células intestinais, a combinação vírus-vetor não é compatível e o vírus é excretado. Se a combinação vírus-vetor for compatível, ainda assim apenas uma pequena parcela das células intestinais é infectada, porém, o suficiente para que o vírus atinja o sistema circulatório do mosquito via hemolinfa após se replicar nas células epiteliais. A hemolinfa serve como um veículo para que partículas virais sejam levadas para diversas partes do corpo, atingindo geralmente músculos, gordura, glândulas salivares e tecido nervoso (Franz *et al.*, 2015). Assim que a infecção se torna persistente, vírions podem ser encontrados nas glândulas salivares, o que torna o mosquito competente para transmitir a doença a um novo vertebrado por meio de sua saliva, podendo fazê-lo pelo resto de sua vida. (McFarlane *et al.*, 2014).

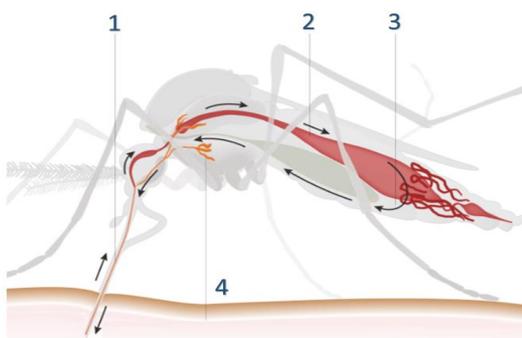


Figura 1.3. Caminho que os vírus percorrem dentro do mosquito até estarem disponíveis para infectar outro hospedeiro. 1) O mosquito se alimenta de sangue infectado; 2) o alimento atinge o intestino médio; 3) partículas virais atingem o sistema circulatório via hemolinfa; 4) os vírus atingem as glândulas salivares. Adaptado de: Almkhatar & Gröndahl (2016).

Para a relação de persistência entre vírus e mosquitos, estratégias antivirais sistêmicas e tecido-específicas foram desenvolvidas pelos vetores ao longo do tempo para evitar que a replicação viral atinja níveis patogênicos. Algumas vias de imunidade antiviral foram estudadas em *Drosophila*, mas como foram identificados componentes ortólogos nos mosquitos, há a hipótese de que essas vias possam ser conservadas. Contudo, como *Drosophila* não é transmissora de arbovírus, pode ser que as respostas imunes dos mosquitos não sejam as mesmas (Cheng *et al.*, 2017).

1.3. *Alphavirus (Chikungunya virus e Mayaro virus)*

Pertencentes ao Grupo IV da classificação de Baltimore (**Figura 1.4**), os arbovírus da família *Togaviridae* se agrupam em dois gêneros. O gênero que abriga tanto patógenos humanos quanto zoonóticos é o *Alphavirus*, que reúne vírus como o *Salmon pancreatic disease virus* (SPDV), *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), *Mayaro virus* (MAYV) e *Chikungunya virus* (CHIKV), entre muitos outros. Já o gênero *Rubivirus* conta apenas com a participação do *Rubella vírus* (RV), causador da rubéola. (<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/rubeola-sintomas-transmissao-e-prevencao>). Os alfavírus podem também ser classificados em vírus do Velho Mundo, que são artritogênicos como CHIKV e MAYV, e vírus do Novo Mundo, aqueles que causam encefalites como o EEEV (Lee & Chu, 2015; Tsetsarkin *et al.*, 2011).

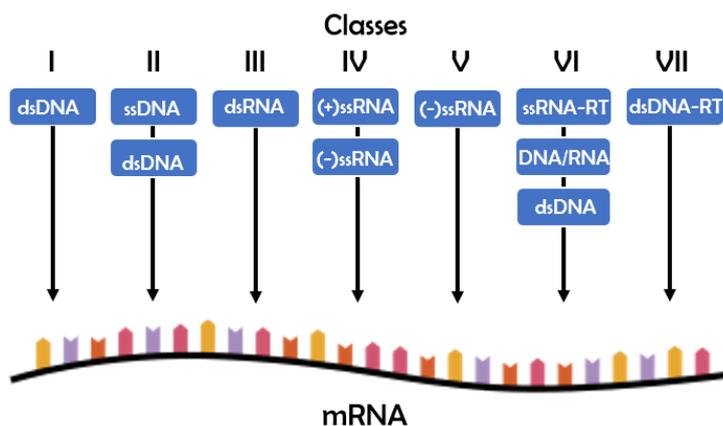


Figura 1.4. Classificação de Baltimore. Os vírus são agrupados de acordo com o seu material genético e a forma como produzem o mRNA.

Esses arbovírus possuem um genoma de RNA fita simples positivo de aproximados 12kb com Cap 5' e cauda poliA (**Figura 1.5**). Uma poliproteína não-estrutural é codificada diretamente (senso positivo), enquanto a poliproteína estrutural é produzida a partir de um RNA subgenômico sob comando de um promotor interno (Hernandez *et al.*, 2014). Ambas as poliproteínas são clivadas por proteases virais e do hospedeiro ao longo da infecção, gerando as proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K, E1) e não-estruturais (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) (Oliveira Mota *et al.*, 2015).

As partículas de alfavírus são compostas por cópias das glicoproteínas de membrana E1 e E2 associadas ao *core* formado por proteínas do capsídeo (C). Além disso, E1 e E2 ficam conectadas à bicamada lipídica interna e formam uma rede icosaédrica de geometria T=4,

com E1 dando a forma icosaédrica e E2 sendo visto como espículas (Brown & Hernandez, 2012). E2 estaria supostamente envolvida no reconhecimento e ligação da partícula viral às células intestinais do mosquito, já as proteínas não-estruturais apresentam funções enzimáticas diversas como a protease nsP2 ou a RdRp nsP4, além de formarem o complexo replicativo (Franz *et al.*, 2015). É bem aceito que alfavírus penetrem nas células hospedeiras por endocitose e alguns receptores de membrana como sulfato de heparano, lamininas e integrinas já foram relacionadas a esse processo, apesar de ainda não se saber o seu papel exato (Oliveira Mota *et al.*, 2015). Em relação ao *Chikungunya*, a proibitina já foi identificada como um de seus receptores (Wintachai *et al.*, 2012).

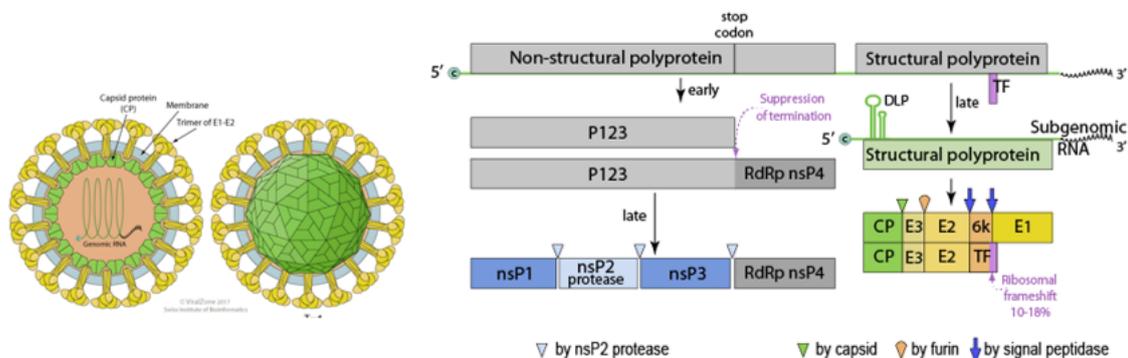


Figura 1.5. Vírion e organização genômica dos vírus da família *Togaviridae*.

Fonte: expasy.com / Viral Zone 2010 Swiss Institute of Bioinformatics.

Após entrada na célula hospedeira, a liberação do genoma viral se dá pela mudança conformacional da partícula quando os endossomos são acidificados por ATPases e novamente retornam a um pH neutro (**Figura 1.6**). Essa diminuição de pH seguida pelo retorno ao inicial provoca fusão da membrana viral com a membrana da célula. É possível que cada alfavírus tenha um pH ideal para desmontagem de seus vírions no endossomo (Brown & Hernandez, 2012).

A replicação dos alfavírus é citoplasmática. As proteínas não-estruturais traduzidas diretamente do genoma viral formam o complexo de replicação, o qual sintetiza um RNA intermediário senso negativo que servirá de molde (*template*) para a síntese dos RNAs subgenômicos 26S e 49S (Galán-Huerta *et al.*, 2015). Tais RNAs codificam as proteínas estruturais. As glicoproteínas passam pelo retículo endoplasmático e pelo aparato de Golgi para maturação, promovendo, em seguida, a montagem de novas partículas virais juntamente com o nucleocapsídeo e o RNA viral (Brown & Hernandez, 2012). O brotamento de novos

vírions envelopados ocorre na membrana plasmática das células de mamíferos, mas em células de mosquitos os vírions são formados em vacúolos e maturados por vias exocíticas. Assim, na natureza esses vírus são híbridos, adquirindo lipídeos, carboidratos e outras modificações da célula hospedeira (Akhrymuk *et al.*, 2012; Hernandez *et al.*, 2014).

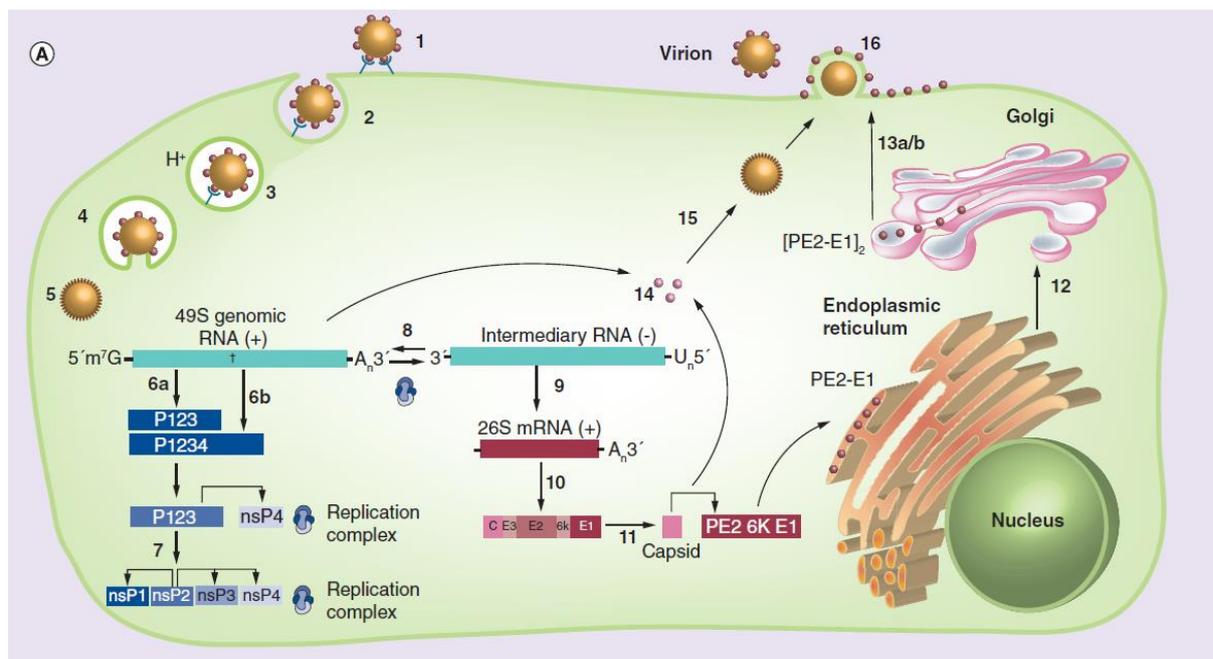


Figura 1.6. Ciclo replicativo dos alfavírus. 1: ligação ao receptor de membrana. 2: endocitose. 3: acidificação do vacúolo. 4: fusão de membranas. 5: desmontagem do *core*. 6: tradução. 7: processamento. 8 e 9: transcrição. 10: tradução. 11: processamento. 12: processamento de maturação de glicoproteínas. 13: transporte de glicoproteínas processadas e ativação por furina. 14: empacotamento do genoma viral. 15: montagem do nucleocapsídeo. 16: brotamento de novas partículas virais. Modelo de replicação em células de vertebrado e invertebrado. Fonte: Oliveira Mota *et al.* (2015).

Chikungunya virus

O CHIKV foi isolado pela primeira vez em 1952 na Tanzânia, perto da divisa com Moçambique. Durante os séculos XVIII e XIX, foi provavelmente transportado até cidades portuárias do mundo por navios veleiros (Weaver, 2013). Ele foi introduzido na América do Sul vindo de ilhas do Caribe no final de 2013 e alcançou o Brasil em 2014. Atualmente, a transmissão local de CHIKV já foi detectada em mais de 110 países e territórios, tropicais e subtropicais em sua maioria (**Figura 1.7**), tendo reemergido historicamente em intervalos de 5 a 20 anos (Chia *et al.*, 2010). Já foram identificadas um total de quatro linhagens distintas

de CHIKV pelo mundo, sendo duas reportadas circulando no Brasil, a *East-Central-South African* (ECSA) e a linhagem asiática (Nunes *et al.*, 2015).

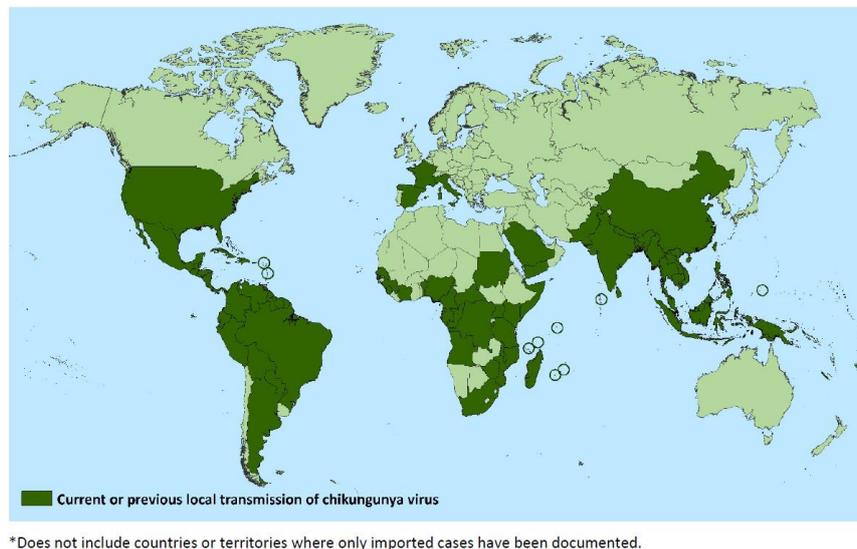


Figura 1.7. Países e territórios onde casos de infecção por CHIKV foram notificados até março de 2018. Casos importados não foram considerados, apenas transmissões locais. Fonte: NIAID, <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>.

Em Kimakonde, uma língua Bantu falada pelo grupo étnico Makonde no sudeste da Tanzânia, a palavra “chikungunya” significa “com o corpo contorcido”. Tal palavra faz alusão às fortes dores nas articulações causadas pela infecção por CHIKV, as quais impedem movimentos mais amplos (Chia *et al.*, 2010). Os principais sintomas de uma pessoa que adquire uma infecção aguda por CHIKV geralmente aparecem entre 2 a 12 dias pós infecção e variam de febre abrupta, erupção cutânea, dores musculares e até poliartralgia. Esse último sintoma pode fazer parte também de uma infecção crônica e persistente, podendo ser uma doença altamente dolorosa e debilitante por meses e até anos (Galán-Huerta *et al.*, 2015). Em 2016 o CHIKV foi listado pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos (NIAID) como um patógeno de prioridade categoria “C” por apresentar facilidade de reprodução e disseminação e alto potencial de morbidez e mortalidade (Singh *et al.*, 2018).

Epidemias recentes têm sido facilitadas por mutações nas glicoproteínas de envelope que resultaram em populações de CHIKV mais adaptadas para transmissão por *A. albopictus* em locais onde, por vezes, o *A. aegypti* não está presente (Weaver, 2013). O vetor secundário

A. albopictus sobrevive até nos invernos frios europeus, aumentando assim a disseminação viral em regiões temperadas, além dos *hot-spots* tropicais (Puttamallesh *et al.*, 2013).

Mayaro virus

O MAYV foi identificado pela primeira vez na comarca de Mayaro na ilha caribenha de Trindade em 1954, tendo seu primeiro caso reportado no Brasil em 1955 (Cavalheiro *et al.*, 2016). Atinge predominantemente a América do Sul (**Figura 1.8**), sobretudo populações rurais ou que vivem próximas a florestas. Por esse motivo, a febre causada pelo MAYV é historicamente uma doença negligenciada (Oliveira Mota *et al.*, 2015). Esse vírus já foi responsável por epidemias na Bolívia, Peru e também no Brasil, onde vem se disseminando (Lavergne *et al.*, 2006). Três linhagens de MAYV, denominadas D, L e N, já foram identificadas, sendo a L somente reportada no território nacional até o momento (Esposito & Fonseca, 2017; Acosta-Ampudia *et al.*, 2018).

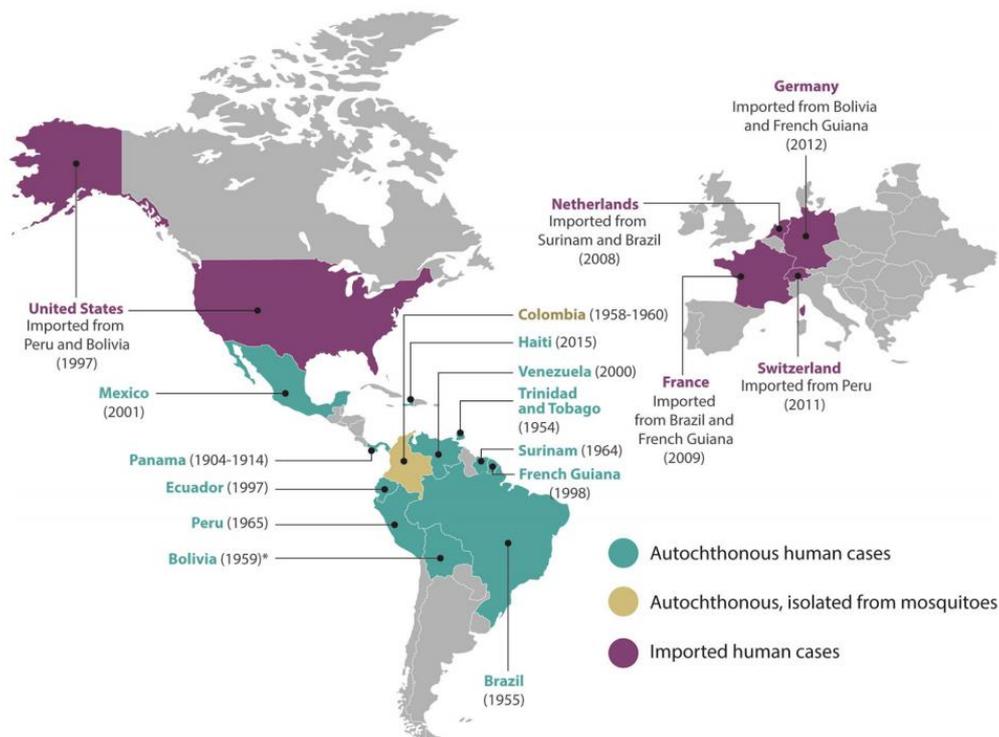


Figura 1.8. Área de distribuição do MAYV. Em roxo estão destacados países em que foram documentados casos humanos apenas importados. Em verde, países em que foram detectados casos autóctones em humanos e em bege, autóctones, porém isolados de mosquitos. Fonte: Acosta-Ampudia *et al.* (2018).

Os sintomas da fase aguda da infecção por MAYV são comumente confundidos com os sintomas causados por DENV. Assim, estima-se que 1% dos casos diagnosticados como DENV na região Norte da América do Sul tenham sido causados, na realidade, por MAYV (Oliveira Mota *et al.*, 2016). Além de febre, também são característicos sintomas como dor abdominal, fotofobia, vertigem e artralgia debilitante, visto que a dor bilateral das articulações pode durar por meses. O MAYV tem tropismo por macrófagos e induz a produção de citocinas inflamatórias levando à artrite, assim como o CHIKV (Cavalheiro *et al.*, 2016). Ainda não há nenhum tratamento específico ou vacina para prevenir essas doenças.

Apesar do MAYV ser transmitido principalmente por *Haemagogus spp.* em ambientes silvestres, nas cidades ele também pode ser transmitido pelo *A. aegypti* e alguns outros vetores (Napoleão-Pego *et al.*, 2014), sendo assim uma ameaça à saúde nos centros urbanos no Brasil. De dezembro de 2014 a janeiro de 2016, mais de 340 casos suspeitos foram notificados como resultado de infecção por MAYV no país (Esposito & Fonseca, 2017).

1.4. Cultura celular

Quando não há a possibilidade ou a necessidade de usar animais de experimentação, a cultura de células se trata da melhor opção para o estudo de vírus animais (Alves & Guimarães, 2013). O cultivo desses vírus, entretanto, é limitado à permissibilidade e suscetibilidade das células em questão, possibilitando, respectivamente, a entrada do vírus via receptores específicos e sua replicação. Visto que os arbovírus possuem um ciclo híbrido de replicação, envolvendo tanto animais vertebrados quanto mosquitos, o estudo desses vírus em laboratório pode demandar mais de um tipo celular. Apesar de não reproduzir com exatidão o ambiente que o vírus encontra no mosquito, as culturas contínuas de células de inseto são mais facilmente reprodutíveis, mais homogêneas e mais sensíveis que os organismos das quais foram originadas (Barletta *et al.*, 2012). Conhecer previamente as características de temperatura, concentração de CO₂, necessidades nutricionais específicas, o tempo adequado para passagem, necessidade de adição de antibióticos ou antifúngicos, assim como as possibilidades de uso de cada célula, é essencial para o sucesso no estabelecimento de uma cultura celular.

As células Vero (do rim do macaco-verde africano *Cercopithecus aethiops*) e C6/36 (de larva do mosquito *A. albopictus*) são comumente usadas para a recuperação e amplificação viral, devido a uma maior suscetibilidade (Walker *et al.*, 2014). A linhagem C6/36 possui um defeito na maquinaria de RNA interferente (deleção única que origina uma Dicer2 defectiva) e produz títulos virais bem maiores que células RNAi competentes (Blair & Olson, 2015). Este tipo celular é útil para recuperação viral, mas não deve ser utilizado como modelo para estudo de interações mosquito-arbovírus de acordo com Brackney e colaboradores (2010). A linhagem Vero possui uma falha na produção de *interferon*, diminuindo assim as defesas imunológicas dessas células contra patógenos. Além disso, apresenta um efeito citopático aparente, o que permite a diferenciação visual entre um grupo de células infectadas e não infectadas durante uma titulação viral. Diferentes vírus podem causar diferentes efeitos citopáticos em cultura, como a formação de sincícios ou a liberação das células do fundo da garrafa, com seu arredondamento. Já o estudo de *A. aegypti* por meio de cultura celular pode se dar com o uso das células Aag-2, originalmente extraídas de embriões desse mosquito (Walker *et al.*, 2014). As células Aag-2 foram validadas como modelo para estudos de imunidade em insetos por Barletta e colaboradores (2012) ao apresentar perfil imunológico similar ao do mosquito *A. aegypti* inteiro.

1.5. Sequenciamento e estudos de filogenia

O primeiro registro que se tem de arbovírus atingindo as Américas data do século XVI, quando foram introduzidos os vírus DENV e *Yellow fever virus* (YFV) (Liang *et al.*, 2015). A rápida urbanização das novas colônias, com comunidades urbanas densamente povoadas e cercadas por áreas de reprodução dos mosquitos, facilitou o estabelecimento da endemicidade (Simmons *et al.*, 2012). As constantes mudanças comportamentais das sociedades, incluindo a crescente movimentação de produtos, assim como a movimentação de pessoas em viremia, fizeram com que a área de alcance dos arbovírus fosse significativamente ampliada nas últimas décadas (Weaver, 2013). Dessa forma, surgiu a necessidade de acompanhar as rotas de transmissão viral, assim como de compreender a evolução desses vírus.

Atualmente, a maioria dos estudos que reconstroem relações evolutivas entre entidades biológicas são inferidos a partir de dados moleculares, dada a hereditariedade do material genético, a facilidade e a confiabilidade das novas técnicas de sequenciamento

(<https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-phylogenetics>). Ao se tratar de vírus, os quais não são facilmente visualizados e dependem de uma célula hospedeira para se replicar, um estudo filogenético tradicional baseado em características morfológicas seria muito mais difícil e inacurado.

Entre as técnicas de sequenciamento de alto desempenho está a plataforma Illumina[®], a qual realiza sequenciamento por síntese de amostras tanto de DNA quanto de RNA. No caso de RNA, após a preparação de uma biblioteca de cDNA, o processo de sequenciamento passa por quatro etapas (https://www.illumina.com/documents/productstechspotlights/techspotlight_sequencing.pdf). Primeiro, (I) ocorre a preparação da amostra com adição de adaptadores; (II) a formação de *clusters* por meio de oligonucleotídeos complementares aos adaptadores que mediam a amplificação clonal das fitas por pontes duplas de material genético; (III) o sequenciamento das fitas *forward* e *reverse* separadamente por síntese com nucleotídeos marcados com fluorescência e, finalmente, (IV) a análise de dados para a formação de *contigs* a partir dos *reads* originados com auxílio de diversos *softwares* (**Figura 1.9**).

Após a montagem dos genomas, uma série de análises pode ser feita para o estudo de relações evolutivas levando em consideração diferentes genes e até mesmo regiões não codificadoras, dependendo do seu objetivo e da sua hipótese. A árvore filogenética é uma explicação visual de como as sequências de interesse evoluíram até então (<https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-phylogenetics>), quais caminhos de transmissão de informação genética as levaram a ser da forma em que se encontram atualmente. Ela pode ser construída por máxima parcimônia, máxima verossimilhança ou por inferência bayesiana. A análise por máxima verossimilhança, que será utilizada no presente trabalho, por meio de técnicas estatísticas e um modelo de evolução, resulta em um valor chamado probabilidade das sequências observadas. Entre as possíveis árvores, a escolhida é a que possui mais sequências prováveis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/NAWBIS/Modules/Phylogenetics/phylo15.html>).

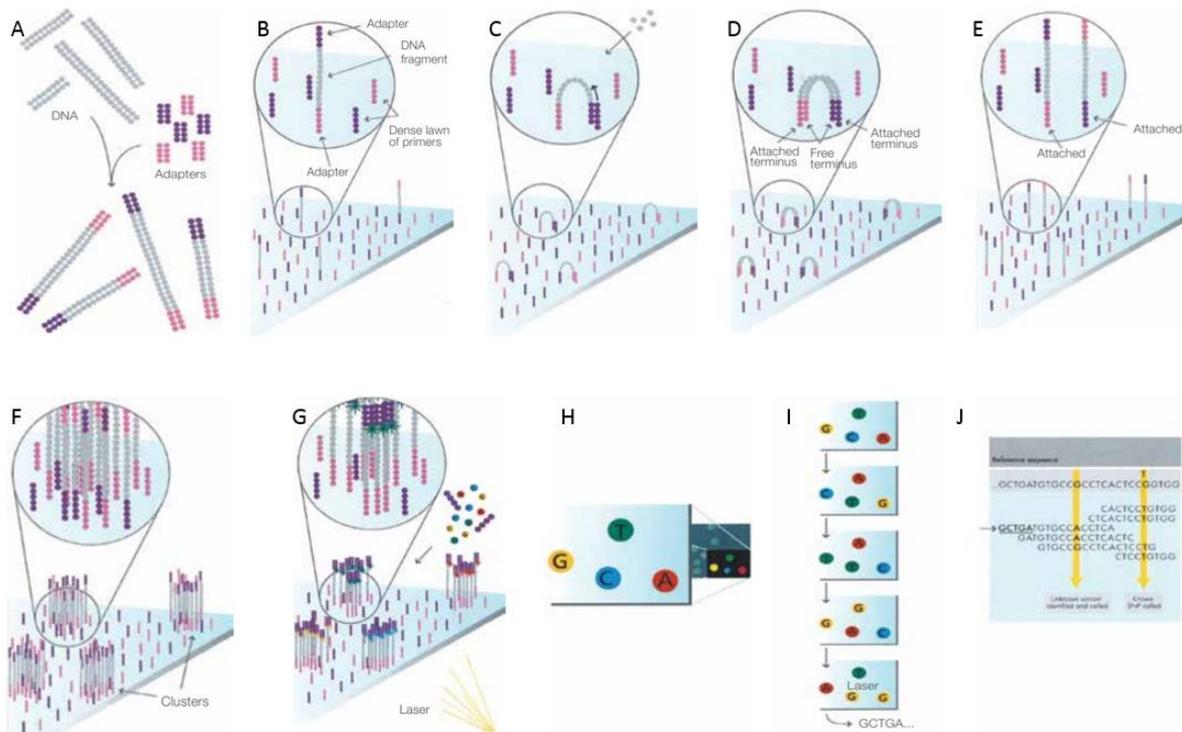


Figura 1.9. Fluxo de trabalho do sequenciamento por síntese Illumina®. **A:** o DNA é fragmentado de forma randômica e recebe adaptadores nas suas duas extremidades. **B:** fragmentos fita simples se ligam na superfície interior dos canais. **C:** é iniciada a amplificação em ponte com nucleotídeos não marcados. **D:** a enzima incorpora nucleotídeos para construir uma ponta dupla em substrato sólido. **E:** as pontes são desnaturadas, fazendo com que apenas fitas simples fiquem fixas ao substrato. **F:** milhões de *clusters* são formados. **G:** diversos ciclos de sequenciamento são realizados pela adição de nucleotídeos marcados com fluorescência. **H:** após excitação por laser, a fluorescência emitida por cada *cluster* é capturada e as bases são identificadas. **I:** os ciclos de sequenciamento são repetidos para determinar a sequência de bases em um fragmento. **J:** os dados são alinhados e comparados a uma referência. Adaptado de: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf.

Estratégias falhas de controle do vetor associadas a um intenso e contínuo fluxo viral pelo mundo fazem com que a disseminação de patógenos como os arbovírus seja elevada e difícil de ser acompanhada, por vezes resultando em epidemias graves. Nesse quesito, bancos de dados e estudos de filogenia auxiliam a traçar um mapa da movimentação viral pelo mundo, a compreender a evolução de genes, genomas e espécies e a determinar a quais riscos certas regiões estão expostas, assim como fazer previsões de como os vírus podem mudar no futuro (<https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-phylogenetics>).

1.6. Análise proteômica

O termo proteoma, cunhado pelo geneticista Mark Wilkins em 1994, surgiu como uma união das palavras “proteína” e “genoma”, apesar de seu campo de estudo já vir sendo trabalhado certo tempo antes (Roepstorff, 2012). Designa o conjunto de proteínas que podem ser produzidos a partir de um determinado genoma, incluindo as geradas por meio de *splicing* alternativo do RNA mensageiro e modificações pós-traducionais (Parker *et al.*, 2010). Já o termo proteômica se refere ao estudo das proteínas de uma célula, tecido ou organismo sob uma série de condições específicas e definidas, assim como da sua dinâmica, interações entre elas, seu papel e sua influência no metabolismo (Yu *et al.*, 2010).

O proteoma pode sofrer modulação de acordo com o tempo, resposta a sinais ambientais, estresse, ou infecções, como as virais. Durante a infecção, os vírus modulam mecanismos da célula hospedeira para facilitar a sua replicação. Há na literatura estudos de proteômica quantitativa como o de Xin *et al.* (2017) que compara o proteoma de células C6/36 antes e depois da infecção por Zika vírus. Nayyar *et al.* (2017) compararam o proteoma de células de Lepidoptera Sf21 antes e depois de infecção por baculovírus. Tais estudos trouxeram novos focos e perspectivas no estudo da interação vírus-vetor, identificando proteínas e vias metabólicas da célula hospedeira que estão envolvidas no processo de replicação viral.

O estudo proteômico faz uso de diversas técnicas, equipamentos e *softwares* integrados que permitem separar, identificar, quantificar e caracterizar proteínas, possibilitando assim o estudo tanto de aspectos qualitativos quanto quantitativos (Pitt, 2009). Os três pilares básicos de uma análise proteômica compreendem (I) o fracionamento da mistura de proteínas ou peptídeos, (II) espectrometria de massas para a aquisição dos dados necessários para a identificação das proteínas e (III) a análise de bioinformática, que é a parte crítica do processamento dos espectros obtidos em dados proteicos (Yu *et al.*, 2010).

A análise proteômica qualitativa, ao contrário da quantitativa, que utiliza marcação química ou metabólica, é *label-free*. Além da identificação das proteínas, é possível também uma quantificação da abundância relativa das proteínas (Asara *et al.*, 2008). Existem dois tipos de estratégias para a identificação e caracterização de proteínas por espectrometria de massas: *bottom up* e *top down* (Kelleher *et al.*, 1999). No tipo de análise *bottom up*, também chamada *shotgun*, peptídeos são separados e injetadas no espectrômetro de massas (MS) após as proteínas serem digeridas com tripsina. Já no *top down*, as proteínas intactas são

analisadas. Uma das formas de separação é a cromatografia líquida (LC) por fase reversa, que separa os peptídeos em frações com diferentes tempos de retenção na fase estacionária de acordo com sua hidrofobicidade (Pitt, 2009). Antes de entrar no analisador de massas, os analitos precisam passar por uma fonte de íons, existindo técnicas de ionização como *electrospray ionization* (ESI) e *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI) (<http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/mass-spectrometry-ionization.html>).

O ESI pode ser acoplado a um cromatógrafo líquido e possui uma fonte de alta tensão que remove elétrons do solvente eletricamente neutro dos analitos (**Figura 1.10**), os quais são acelerados de tal forma que as microgotas evaporam e as cargas se depositam sobre os peptídeos. Quando a tensão superficial se iguala à repulsão de Coulomb, as gotas se dividem em partes cada vez menores até que as cargas se depositem diretamente sobre os peptídeos, os quais se inserem no analisador de massas (Kebarle & Verkerk, 2009).

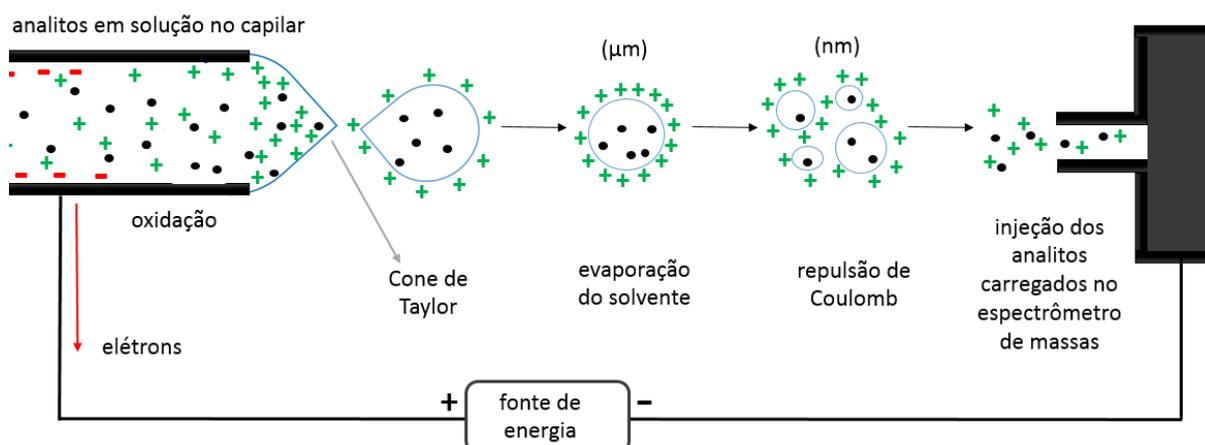


Figura 1.10. Esquema do funcionamento de uma fonte ESI. Os analitos em solução aquosa são carregados positivamente e têm sua trajetória deslocada para o Cone de Taylor. As partículas iniciais carregadas são aceleradas por um gradiente de potencial elétrico, sofrendo rápida evaporação. Após a fissão de Coulomb, passam para o estado gasoso, podendo assim entrar no analisador de massas.

Dentro do analisador de massa os íons carregados são classificados e separados baseando-se na sua razão massa/carga (m/z). Há diversos tipos de analisadores de massas, entre eles, os quadrupolos, o *time of flight* (TOF), o *fourier-transforma ion cyclotron resonance* (FTICR) e o Orbitrap (<https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/several-types-of-mass-analyzer/>). O Orbitrap (**Figura 1.11**) é um equipamento de alta resolução em que os íons são direcionados a um *ion trap* por meio de um campo eletrostático, movendo-se em padrões espirais complexos. Tais oscilações podem ser detectadas como

imagens. Uma transformada de Fourier é então empregada para obter frequências de oscilação para íons com diferentes massas, resultando em uma leitura precisa de suas razões m/z . Já no detector, a abundância relativa dos íons é identificada (Scigelova & Marakov, 2006).

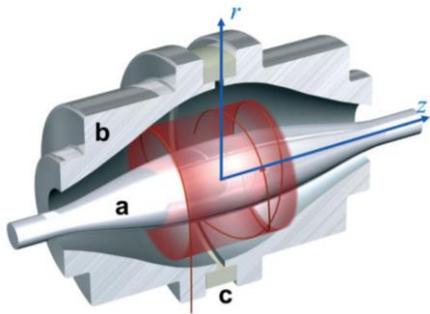


Figura 1.11. Modelo de um analisador de massa do tipo Orbitrap. A: íons em movimento ao redor de um eletrodo central. B: eletrodo externo dividido ao meio. C: anel isolante de cerâmica. Fonte: Scigelova & Marakov (2006).

No tipo de análise proteômica baseada em LC-MS, a identificação de proteínas é realizada com base na fragmentação dos peptídeos e na comparação dos espectros obtidos experimentalmente com espectros teóricos gerados a partir de bancos de dados (Roepstorff, 2012). Existem vários *softwares* para processar os dados brutos do MS e inferir a abundância das proteínas. Cada *software* inclui um conjunto de algoritmos exclusivos para as diferentes tarefas do fluxo de trabalho do processamento de dados do MS. Uma série de fatores de restringência e análises estatísticas também aumentam a confiabilidade dos dados obtidos por bioinformática (Välíkangas *et al.*, 2017).

1.7. Proteômica aplicada à interação arbovírus-vetor

Um aspecto importante na análise proteômica de cultura de células infectadas com vírus é a multiplicidade de infecção (MOI) utilizada. O MOI indica a razão entre partículas virais infecciosas e o número de células que serão infectadas, e não a quantidade total de partículas presentes, visto que nem todo vírion é infectivo (Thomas, 2001). A habilidade de ajustar essa proporção, além de ser importante para garantir a padronização das triplicatas biológicas necessárias ao experimento, também permite a comparação das condições do experimento com as condições de viremia encontradas no corpo do mosquito ou da pessoa infectada no ambiente. Entre as formas de mensurar a quantidade de partículas infecciosas em um estoque viral estão o *Plaque Assay*, que oferece seu resultado em *plaque forming units* (PFU), e a titulação por *End-Point Dilution Assay*, cujo resultado se dá em *tissue culture*

infectious dose (TCID50) e representa a quantidade de vírus necessária para infectar metade das células presentes (www.ijmm.org/documents/virologymanual.doc).

Estudos proteômicos aplicados à interação vírus-vetor podem ajudar a desvendar aspectos negligenciados da mudança gradual do proteoma em células de mosquito. Segundo Cheng e colaboradores (2017), apesar de o conhecimento a respeito da imunidade de mosquitos ter avançado bastante na última década, o conhecimento sobre mecanismos antivirais ainda é extremamente limitado. Identificar centenas de proteínas, suas diferenças de abundância ao longo dos tempos de infecção e em quais processos estão envolvidas (Parker *et al.*, 2010) pode melhorar também a compreensão das diferenças entre células de invertebrados e células de mamíferos infectadas (Lee & Chu, 2015). Visto que as proteínas medeiam a maioria dos processos intracelulares e comunicação entre células (Anderson *et al.*, 2016), um estudo dinâmico comparativo do proteoma de células de *A. aegypti* (Aag-2) infectadas e não infectadas com arbovírus pode esclarecer alguns aspectos da interação vírus-vetor e ajudar a desenvolver estratégias para bloquear a amplificação viral, limitando a transmissão do vírus dentro do seu próprio vetor (Nayyar *et al.*, 2017).

1.8. Esboço e objetivos da dissertação

Neste trabalho, estudos “ômicos” foram realizados com estirpes de CHIKV e MAYV circulantes no Brasil. No Capítulo 2 foi realizado sequenciamento de alto desempenho do genoma completo de seis isolados de CHIKV do Mato Grosso. Tais sequências de CHIKV foram as primeiras do Centro-Oeste a serem publicadas (**Anexo 1**). Posteriormente foi realizado um estudo de filogenia comparando esses isolados com diversas outras sequências de CHIKV que representam as quatro linhagens até então identificadas. No Capítulo 3 foi utilizado um isolado de MAYV do Rio de Janeiro para infectar cultura de células Aag-2 de *A. aegypti*. Foram coletadas células não-infectadas e células infectadas com diferentes horas de infecção para análise proteômica *label-free* por espectrometria de massas. Assim, foi possível acompanhar a variação do proteoma das células Aag-2 e dar início à compreensão de como o MAYV modula a célula hospedeira em seu favor. O Capítulo 4 reúne considerações finais sobre os dois capítulos experimentais e os conecta de forma a propor perspectivas para os próximos estudos com arbovírus.

2. GENÔMICA E FILOGENIA DE CHIKV CIRCULANDO NO CENTRO-OESTE

2.1. Resumo

O *Chikungunya virus* (CHIKV) é um arbovírus artritogênico classificado no gênero *Alphavirus* que foi reportado e isolado pela primeira vez em 1952 na Tanzânia. Possui genoma de RNA fita simples senso positivo de aproximados 12kb, o qual codifica uma poliproteína estrutural e uma poliproteína não-estrutural que são clivadas por proteases ao longo do ciclo replicativo. Há quatro linhagens de CHIKV circulando pelo mundo, infectando pessoas em mais de 110 países e territórios, tendo alcançado a América Central em 2013 e o Brasil em 2014. Devido à crescente movimentação de pessoas em viremia, a área de alcance de arbovírus foi significativamente ampliada nas últimas décadas. Dessa forma, surgiu a necessidade de acompanhar as rotas de transmissão viral, assim como compreender a evolução desses vírus. Neste estudo, a partir de sequenciamento de alto desempenho, RNA de seis isolados de CHIKV circulando no estado do Mato Grosso foram sequenciados. Os seis genomas completos apresentaram tamanho esperado de 11.811 nucleotídeos e foram depositados no banco de dados GenBank com os números de acesso MH823663 a MH823668. Nenhum dos isolados apresentou as mutações A226V (E1) ou L210Q (E2) que aumentam a transmissibilidade do vírus pelo vetor secundário *A. albopictus*. Essa observação indica que esses isolados encontrados no Centro-Oeste brasileiro são transmitidos, preferencialmente, por *A. aegypti*. Além disso, estudos filogenéticos incluíram esses mesmos isolados como pertencentes à linhagem ECSA, compartilhando maior identidade nucleotídica com isolados identificados no estado da Bahia.

Palavras-chave: CHIKV, Centro-Oeste, sequenciamento de alto desempenho, genoma completo, *A. aegypti*, linhagem ECSA.

Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is an arthritogenic arbovirus belonging to the genus *Alphavirus* that was first reported and isolated in 1952 at Tanzania. It has an approximately 12kb positive sense single strand RNA genome that encodes a structural and a non-structural polyproteins which are cleaved by proteases throughout the replicative virus cycle. There are four CHIKV lineages circulating around the world and more than 110 countries have been identified with cases of CHIKV infection. It reached the Americas in 2013 and in 2014 the first case was diagnosed in Brazil. The increasing number of travelers in viremia lead to a significant expansion of the arbovirus reach area during the last decade. In this way, the need to follow the routes of viral transmission appeared, as well as the need to understand the evolution of these viruses. The present study aimed to perform a high throughput sequencing of the six CHIKV isolates RNA that were circulating in the Mato Grosso state. The six complete genomes showed an expected size of 11,811 nucleotides and they were deposited in the GenBank database under the accession numbers MH823663 to MH823668. None of the isolates showed the A226V (E1) or the L210Q (E2) mutations that increase CHIKV transmissibility by the secondary vector *A. albopictus*. This observation indicates that CHIKV is predominantly transmitted by *A. aegypti* in Midwestern Brazil. Moreover, phylogenetics identified our isolates as belonging to the ECSA lineage, sharing a larger nucleotide identity with the isolates from the state of Bahia.

Key-words: CHIKV, midwestern, high throughput sequencing, complete genome, *A. aegypti*, ECSA lineage.

2.2. Introdução

“Chikungunya” é uma palavra da língua Bantu, na Tanzânia, que significa “com o corpo contorcido”. O *Chikungunya virus* (CHIKV), um arbovírus isolado e caracterizado primeiramente nesse país africano, possui esse nome por causar fortes dores nas articulações, impedindo movimentos mais amplos (Chia *et al.*, 2010). Além de sintomas como febre e trombocitopenia, a poliartralgia pode debilitar uma pessoa infectada por CHIKV por um longo período de tempo (Galán-Huerta *et al.*, 2015).

Pertencente ao gênero *Alphavirus* (Família *Togaviridae*), o CHIKV possui um genoma de RNA fita simples senso positivo de aproximados 12kb (Lee & Chu, 2015). Uma poliproteína estrutural e uma poliproteína não-estrutural são codificadas pelo genoma viral. As proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) e as não-estruturais (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) são formadas após clivagem proteolítica (Oliveira Mota *et al.*, 2015). Entre as epidemias recentes provocadas por CHIKV, algumas têm sido associadas a mutações nas glicoproteínas de envelope E1 e E2. Foi verificado que tais mutações resultaram em populações de CHIKV com maior transmissibilidade por *Aedes albopictus*, sem, contudo, afetar sua transmissão pelo vetor principal *Aedes aegypti* (Weaver, 2013). Assim, a transmissão de CHIKV se tornou possível em locais onde o vetor urbano principal *A. aegypti* não está presente.

Apesar de ter sido isolado pela primeira vez em 1952 na Tanzânia, o CHIKV foi introduzido na América do Sul apenas em 2013, vindo de ilhas do Caribe. A partir de então, rapidamente se espalhou pelas Américas, alcançando o Brasil em 2014 (Weaver, 2013). Quatro linhagens distintas de CHIKV já foram identificadas, sendo que no Brasil apenas duas foram reportadas: a linhagem ECSA (do inglês, *East-Central-South African*) e a linhagem asiática (Nunes *et al.*, 2015). Devido a uma maior circulação de produtos e pessoas, nos últimos anos a área de alcance dos arbovírus foi significativamente ampliada (Weaver, 2013). O crescente número de casos associados a arbovírus, assim como a crescente preocupação da saúde pública a respeito de arboviroses, nos mostram a necessidade de acompanhar as rotas de transmissão viral e de compreender a evolução desses vírus.

A filogenia, área que se dedica ao estudo das relações evolutivas entre entidades biológicas, passou a se basear amplamente em dados moleculares como sequências de nucleotídeos e aminoácidos após a modernização dos métodos de sequenciamento

(<https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-phylogenetics>). A plataforma Illumina® está entre uma das técnicas de sequenciamento de alto desempenho amplamente utilizadas (https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf). A partir da montagem dos genomas, que podem ser completos ou parciais, várias abordagens podem ser utilizadas para estudar relações evolutivas entre organismos ou grupos. As conexões evolutivas entre os grupos de organismos considerados podem ser representadas por uma árvore filogenética (<https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-phylogenetics>). Máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana são métodos que permitem a construção de uma árvore filogenética. Na análise por máxima verossimilhança, são atribuídos valores chamados de probabilidades às sequências observadas, sendo escolhida a representação que possuir maior número de sequências prováveis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/NAWBIS/Modules/Phylogenetics/phylo15.html>).

A dificuldade em acompanhar a movimentação viral pelo mundo, somada a epidemias e a estratégias falhas de controle do vetor *A. aegypti*, ressalta a importância de estudos de filogenia para compreender a evolução de genes, genomas e espécies virais, assim como para se determinar que riscos enfrentam determinadas regiões geográficas (<https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-phylogenetics>). Devido ao fato de, até o presente momento, não haver dados disponíveis de genoma completo de isolados de CHIKV circulando no Centro-Oeste brasileiro, o presente estudo se dedica à genômica e à filogenia de isolados dessa região.

2.3. Objetivos

Objetivo Geral

→ Avaliar a diversidade genética de isolados de CHIKV a partir de amostras de soro de pacientes residentes na região Centro-Oeste.

Objetivos Específicos

- Recuperar os isolados de CHIKV por meio de infecção de cultura celular a partir de soro de pacientes infetados.
- Sequenciamento de alto desempenho e caracterização dos genomas dos vírus isolados.
- Filogenia dos isolados de CHIKV do Centro-Oeste brasileiro.

2.4. Materiais e métodos

Estabelecimento de cultura celular: Células Vero (rim do macaco-verde africano *Cercopithecus aethiops*) foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (Sigma) com 10% de soro fetal bovino (FBS: *fetal bovine serum*) e 10% penicilina + streptomina 100U/ml (PenStrep) a 37°C e suprimento de CO₂ a 5%. As células Aag-2 (embrião de *A. aegypti*) foram mantidas em meio de cultura Schneider's *Drosophila* Medium (Gibco by Life Technologies) com 10% FBS e PenStrep 100U/ml. Já a linhagem C6/36 (larva de *A. albopictus* com deficiência na maquinaria de iRNA) foi cultivada em meio TC100 10% FBS (Vitrocell Embriolife). Ambas as células de mosquito foram cultivadas a 28°C. Nas passagens de célula de mamífero, foi realizada lavagem PBS1 e as células foram desaderidas com Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma) a 37°C.

Isolamento viral em cultura de células de mamífero (Vero): Em placas de 24 poços, 500µl de células Vero em meio DMEM 10% FBS 10% PenStrep e ácido 4 - (2-hidroxi)etil - 1 - piperazinoetanossulfônico (HEPES) 25mM foram incubadas com 50µl das amostras de soro de pacientes de Cuiabá, Mato Grosso (2017) diagnosticados pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) como positivos para CHIKV. Em células infectadas, HEPES foi adicionado ao meio para carbonação e manutenção do pH. Três dias depois, o sobrenadante de cada poço foi coletado e armazenado a -80°C para futuras infecções e as células foram ressuspensas com 1ml de TRIzol (Invitrogen™) para a extração de RNA.

Extração de RNA para posterior detecção de CHIKV por RT-PCR: A extração de RNA das células infectadas seguiu as recomendações do fabricante conforme descrito a seguir. As células ressuspensas em 1ml de TRIzol foram incubadas por 5min à temperatura ambiente. Um volume de 200 µl de clorofórmio foi adicionado por microtubo para separação das fases. Os tubos foram agitados com vigor, deixados por 2min à temperatura ambiente e centrifugados a 12.000g durante 15min a 4°C. Após recuperação da fase superior, 500µl de isopropanol foram adicionados e os tubos, encubados a temperatura ambiente por 10min e centrifugados a 12.000g durante 10min a 4°C. Após remoção do isopropanol, o precipitado foi lavado com 1ml de etanol 75% gelado e centrifugado a 7.500g por 5min a 4°C. Após remoção do etanol, o precipitado (RNA) foi ressuspendido com 30µl de água estéril e armazenado a -80°C. A quantificação do RNA foi feita com o espectrofotômetro NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

Transcrição reversa para síntese de cDNA: Para síntese da primeira fita de cDNA, foi adicionado em um microtubo (de 200µl) 1µl de *primers* randômicos, 3µl de RNA, 1µl de desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP) e 7µl de água estéril, incubados a 65°C por 5min e no gelo por 1min. Em seguida, foram adicionados 4µl do *Buffer First Strand* (Invitrogen™), 2µl de ditioneitol (DTT) e 1µl de inibidor de RNase. Após adição de 1µl da enzima M-MLV (Invitrogen™), os tubos foram incubados a 25°C por 10min, 37°C por 50min e 70°C por 10min.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Em um volume final de 25µl de reação, foram adicionados 2,5µl Buffer 10x, 0,5µl MgCl₂, 0,5µl dNTP, 0,5µl *primer Forward*, 0,5µl *primer Reverse*, 1µl do cDNA produzido na etapa anterior, 0,125µl Taq DNA polimerase e 17,4µl de água estéril. O ciclo de amplificação encontra-se na **Tabela 2.1**. As sequências dos pares oligonucleotídeos específicos para amplificação da região E2-E3 do Envelope do CHIKV estão listadas na **Tabela 2.2**. Os produtos de PCR com tamanho estimado de 1,5kb foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Tabela 2.1. Ciclo para amplificação da região E2-E3 do gene do Envelope de CHIKV.

Etapa	Temperatura	Tempo
35x { Desnaturação Inicial Desnaturação Anelamento Extensão Extensão Final <i>hold</i>	94°C	3 min
	94°C	30 seg
	T_m*	30 seg
	72°C	1min 45seg
	72°C	10 min
	12°C	∞

Tabela 2.2. Oligonucleotídeos específicos usados para amplificação parcial do genoma do vírus CHIKV.

Identificação	Sequência 5'-3'	T de anelamento	Sequências base (NCBI)
ChikE F	CGA AGA GTG GAG TCT KGC CAT YCC AG	65°C	KP 164569 KP164571
ChikE R	GCC TCY TGG TAT GTG GCC GCT TTA GC	67°C	KP164572
* R= A ou G (<i>puRine</i>), Y= C ou T (<i>pYrimidine</i>), K= G ou T (<i>Keto</i>). Fonte: IUPAC.			

Propagação viral em células C6/36: Os vírus isolados em células Vero foram propagados em células C6/36 para posterior enriquecimento de partículas virais. Dessa maneira, 5 frascos T75 cultivados com células C6/36 em 12ml de meio TC100+10%FBS foram infectadas com 450µl do estoque viral (sobrenadante de células Vero infectadas) de cada isolado de CHIKV (1, 2, 3, 5, 7, e 9). As garrafas foram encubadas a 28°C por 72h e o sobrenadante foi coletado, totalizando 60ml de sobrenadante para cada isolado de CHIKV.

Enriquecimento de partículas virais: O sobrenadante das células infectadas foi centrifugado a 5.000g por 10min para clarificação. Em seguida, 30ml do sobrenadante clarificado foi adicionado sobre 3ml de solução de sacarose 20% em 5mM NaCl 10mM

EDTA. Os tubos foram ultracentrifugados a 22.000rpm (rotor SW 28) por 2h a 8°C. Devido ao volume inicial de sobrenadante, o processo foi repetido duas vezes, utilizando o mesmo tubo plástico para determinado isolado. Os precipitados foram ressuspensos em 150µl de água livre de RNAses e armazenados a -80°C.

Extração do RNA enriquecido para sequenciamento de alto desempenho: Após enriquecimento por ultracentrifugação, o RNA viral foi extraído com o *kit* QIAmp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen). O procedimento seguiu as recomendações do fabricante, excluindo a adição do RNA carreador. Para cada 140µl de sobrenadante foram adicionados 560µl do Buffer AVL em um microtubo de 1,5ml. Depois de agitados vigorosamente, os microtubos foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 560µl de etanol 96-100%, agitação vigorosa por 15 segundos e centrifugação breve para remoção das bolhas. A solução foi transferida para uma de sílica encaixada em um microtubo coletor de 2ml e centrifugada a 9.000g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e o passo anterior, repetido. Um volume de 500µl do Buffer AW1 foi adicionado na coluna, a qual foi centrifugada a 9.000g por 1 minuto. Após descarte do filtrado, 500µl do Buffer AW2 foram adicionados na coluna, seguido de centrifugação a 17.000g por 3 minutos. Uma vez que o filtrado foi descartado, os tubos foram centrifugados a velocidade máxima por 1 minuto. A coluna foi adicionada a um novo tubo de 1,5ml e o RNA foi eluído com 30µl de água livre de RNAses após centrifugação a 6.000g por 1 minuto. A etapa de eluição foi repetida com mais 30µl de água. A quantificação das amostras de RNA foi realizada com o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences) e visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% com TBE RNase *free* em cuba previamente limpada com RNase Zap™ (Invitrogen™).

Sequenciamento de alto desempenho: As amostras de RNA foram diluídas em RNASTable (Sigma-Aldrich®), secadas a vácuo e enviadas para sequenciamento na empresa Macrogen Inc.® (Seul, Coreia do Sul). Após controle de qualidade para checagem da integridade do RNA, o sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina - Shotgun com biblioteca de cDNA construída a partir do *kit* Illumina TruSeq RNA.

Montagem dos genomas completos dos isolados de CHIKV: A qualidade das sequências recebidas foi analisada com o programa FastQC (Andrews *et al.*, 2018). Sequências de adaptadores e as de baixa qualidade foram removidas com o programa BBDuk do pacote BBTools v38.20 (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>). A montagem *de novo* foi realizada com o programa MEGAHIT v1.1.3 (Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Para garantir uma alta qualidade das sequências genômicas dos isolados de CHIKV, os *reads* foram remapeados nos *contigs* usando o programa BWA v0.7.17 (Li, 2013) e o arquivo Sam resultante foi processado com programa SAMtools v1.8 (Li, 2009). Essa análise revelou a presença de artefatos de reads quiméricos nas extremidades 5' e 3' de todos os genomas, o que provavelmente é o resultado da atividade *template switch* das enzimas de transcrição reversa (Görzer *et al.*, 2010). Tais *reads* foram então removidos e as sequências das extremidades 5' e 3' do genoma de CHIKV foram determinadas baseando-se em genomas de CHIKV publicamente disponíveis (GenBank) que foram sequenciados pelo método Sanger.

Árvore filogenética: A árvore filogenética foi baseada nas ORFs concatenadas de CHIKV e foi construída por máxima verossimilhança com o programa PhyML v3.0 (Guindon *et al.*, 2010). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi selecionado com o jModelTest v2.1.10 (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012). Afim de compreender as relações filogenéticas dos isolados de CHIKV do Centro-Oeste brasileiro, uma árvore foi construída com isolados de CHIKV que representam as quatro linhagens evolutivas desse vírus. Portanto, essa análise incluiu isolados do Brasil, Caribe, países asiáticos e africanos cujas sequências tiveram seus números de acesso extraídos de Nunes *et al.* (2015).

2.5. Resultados e discussão

Infecção de cultura de célula com soro de pacientes e confirmação viral

Para o estudo da diversidade de CHIKV circulantes no Centro-Oeste, amostras de soro de pacientes infectados foram fornecidas pelo LACEN-DF. No total, após infecção de

células Vero, foram isolados seis CHIKV entre as nove amostras analisadas. A presença de infecção foi confirmada por RT-PCR com *primers* específicos, o que resultou na amplificação de produtos de PCR com tamanho de 1,5kb (**Figura 2.1**). Esses seis isolados foram propagados em células de mosquito C6/36 (**Figura 2.2**) para enriquecimento viral, extração de RNA e sequenciamento de alto desempenho.

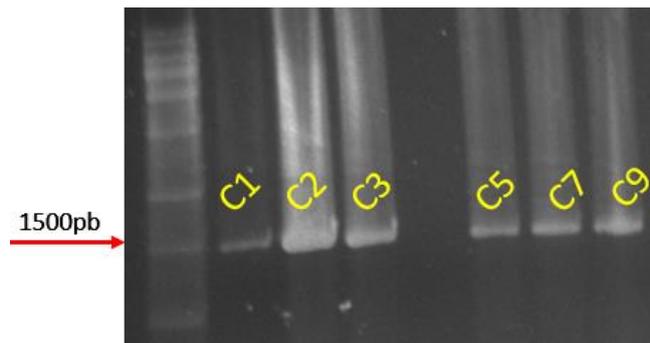


Figura 2.1. Eletroforese em gel de agarose da amplificação de isolados de CHIKV a partir do RNA extraído de células Vero. Foram utilizados *primers* específicos para amplificação do gene do Envelope viral (E3-E2). Marcador de DNA: Ladder 1kb (Ludwig), primeira coluna.

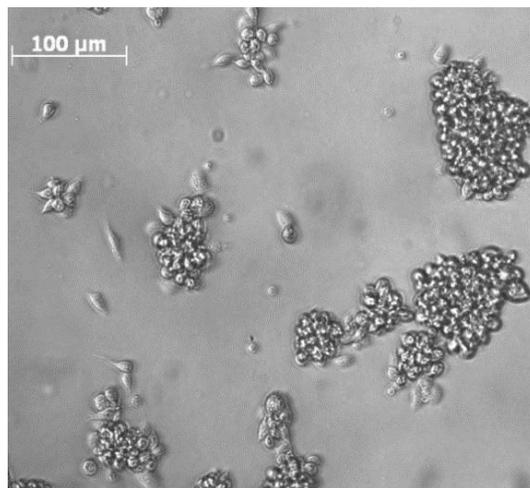


Figura 2.2. Microscopia ótica de cultura de células C6/36 infectadas com CHIKV em formação de sincícios com 3 dias de infecção.

Montagem dos genomas de CHIKV isolados no Mato Grosso

A montagem *de novo* resultou em sequências genômicas de 11.811 nucleotídeos que compartilham entre si identidade de 99,9%. As *open reading frames* (ORFs) das poliproteínas não-estrutural e estrutural preditas possuem 7.425 e 3.474 nucleotídeos, respectivamente. As sequências dos genomas completos dos 6 isolados do Mato Grosso nomeadas MT01 a MT06,

foram depositadas no GenBank com os seguintes números de acesso: MT01 - MH823663, MT02 - MH823664, MT03 - MH823665, MT04 - MH823666, MT05 - MH823667 e MT06 - MH823668.

Nenhum dos isolados sequenciados possui as mutações A226V na glicoproteína de envelope E1 ou L210Q na glicoproteína de envelope E2. Tais substituições são responsáveis por aumentar a transmissibilidade do CHIKV pelo vetor *A. albopictus*, contribuindo substancialmente com as epidemias de CHIKV ao redor do mundo na última década, principalmente em locais onde o *A. aegypti* não é encontrado (Tsetsarkin & Weaver, 2011). A mutação A226V já surgiu quatro vezes ao longo da evolução de formas independentes, demonstrando uma evolução convergente de diferentes linhagens de CHIKV. Na epidemia de 2013 no território francês de La Réunion, ilha na qual o *A. aegypti* não é encontrado, sendo assim o *A. albopictus* o transmissor do CHIKV, foram identificadas as mutações citadas nos isolados sequenciados (Azevedo *et al.*, 2015). Tal fato pode sugerir que os isolados de CHIKV do Mato Grosso caracterizados nesse trabalho são transmitidos predominantemente por mosquitos *A. aegypti*. É possível que a abundância de *A. aegypti* no território brasileiro não tenha exercido pressão evolutiva para que o CHIKV se adaptasse a um segundo vetor como o *A. albopictus*, o qual não é tão disseminado.

O vetor *A. albopictus* tem características morfológicas semelhantes e a mesma capacidade de proliferação do *A. aegypti*. Contudo, o *A. albopictus* é nativo de florestas do sudeste asiático e sua entrada no Brasil é relativamente recente, datando da década de 80 (Pessoa *et al.*, 2013). Enquanto o *A. aegypti* tem preferência por lugares urbanos, *A. albopictus* é mais adaptado a ambientes com cobertura vegetal, conseguindo transitar bem entre territórios urbanos e rurais e representando um risco de levar doenças típicas de um ambiente para o outro (Pessoa *et al.*, 2013).

Análise filogenética

Das quatro linhagens de CHIKV existentes no mundo, apenas duas foram até então encontradas no Brasil: a linhagem asiática e a linhagem da África do Leste, Central e do Sul (ECSA) (Higgs & Vanlandingham, 2015). A linhagem asiática foi possivelmente implementada na América em 2013 via países das ilhas do Caribe e trazida para o Brasil em 2014 por viajantes e militares que voltavam da Missão das Nações Unidas para Estabilização

do Haiti, sendo primeiramente identificado na cidade de Oiapoque, Amapá (Nunes *et al.*, 2015). Já a linhagem ECSA teve seu primeiro caso registrado em 2014 em Feira de Santana, Bahia, sendo, provavelmente, essa única importação responsável por espalhar a linhagem em vários estados do território brasileiro (Nunes *et al.*, 2015).

Os seis genomas completos de CHIKV do Mato Grosso compartilharam grande semelhança com os isolados do Nordeste Brasileiro, sendo agrupados com os isolados da Bahia. Infere-se assim que tais isolados pertençam à linhagem ECSA (**Figura 2.3**). Além do mais, os isolados do Mato Grosso formam um grupo monofilético com elevado valor de suporte, indicando que eles possuam a mesma origem evolutiva. Todavia, devido ao número amostral, não é possível afirmar que não existam outras linhagens de CHIKV circulando na região Centro-Oeste.

Nunes e colaboradores (2015) fizeram uma predição do risco de isolados de CHIKV das linhagens asiática e ECSA se espalharem para outros locais do Brasil a partir dos estados do Amapá e da Bahia, respectivamente. Conclui-se que o risco da cidade de Cuiabá receber CHIKV da linhagem ECSA era igualmente alto ao risco de importar a linhagem asiática. Assim, supõe-se que a importação da linhagem ECSA tenha ocorrido de forma randômica por viajantes que tenham circulado entre os estados da Bahia e do Mato Grosso.

2.6. Conclusões

O sequenciamento de alto desempenho do genoma completo de isolados de CHIKV do Centro-Oeste brasileiro originou sequências de tamanho esperado (11.811 nucleotídeos) e mostrou que eles não possuem as mutações A226V (glicoproteína E1) ou L210Q (glicoproteína E2). Como tais mutações favorecem a transmissibilidade pelo vetor secundário *A. albopictus*, é provável que o CHIKV no Centro-Oeste seja transmitido pelo principal vetor urbano, o *A. aegypti*. A análise filogenética com isolados representantes das quatro linhagens de CHIKV mostrou que os isolados do Centro-Oeste pertencem à linhagem africana ECSA, compartilhando maior identidade com isolados da Bahia. Os genomas completos dos seis isolados do Centro-Oeste brasileiro foram os primeiros dessa região a serem publicados (**Anexo 1**).

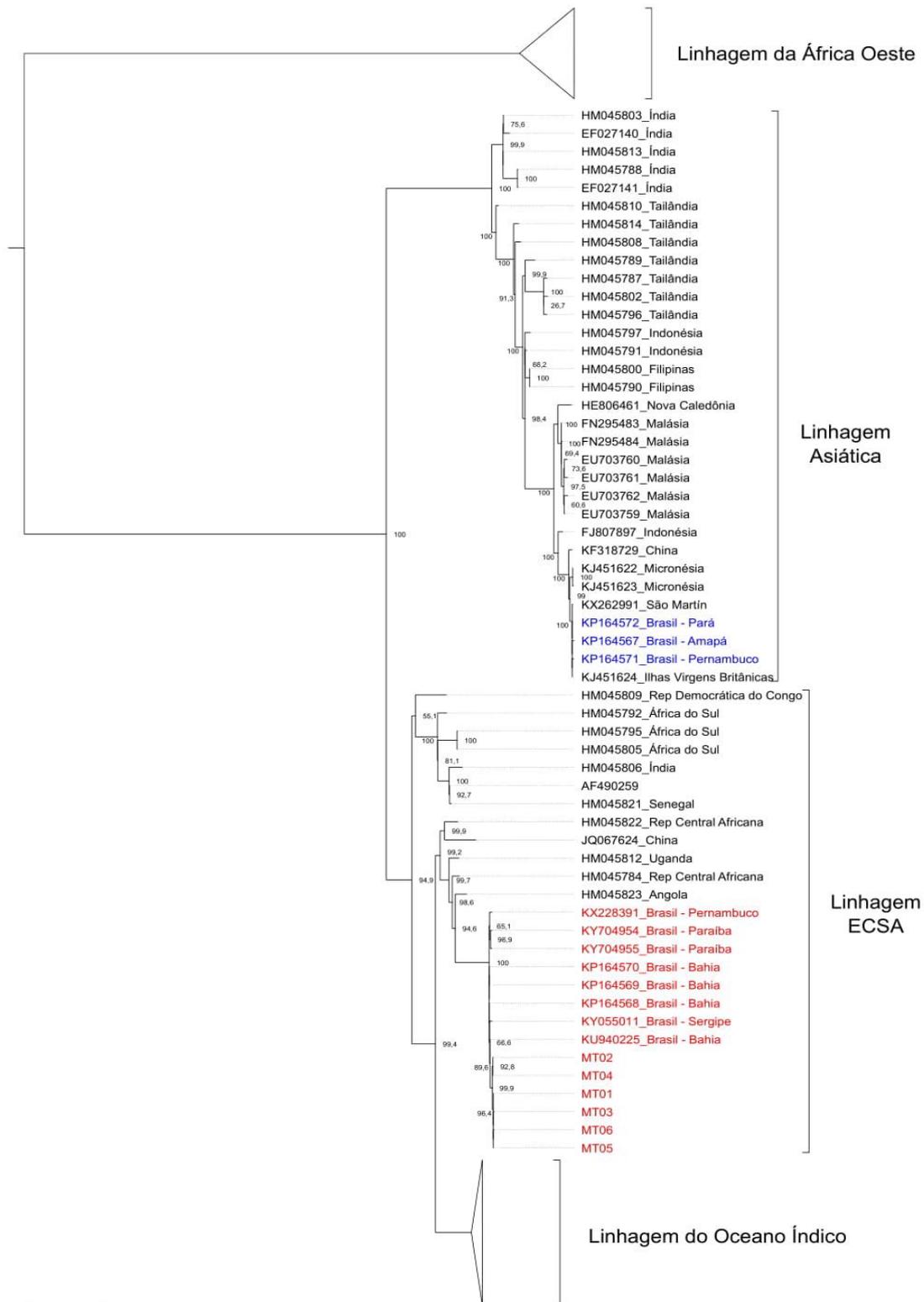


Figura 2.3. Árvore filogenética baseada nas ORFs concatenadas de isolados de CHIKV. As quatro linhagens de CHIKV estão indicadas nos colchetes. Os isolados CHIKV do Brasil pertencentes à linhagem ECSA estão em vermelho, enquanto os da linhagem asiática, mas em circulação no Brasil, estão em azul.

3. MODIFICAÇÃO DO PROTEOMA DE CÉLULAS DE *Aedes aegypti* DURANTE INFECÇÃO POR MAYV

3.1. RESUMO

O *Mayaro virus* (MAYV) é um arbovírus pertencente ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*. O MAYV atualmente possui circulação quase restrita à América Latina, contudo, além de ser transmitido por *Haemagogus spp.*, mosquitos de outros gêneros também são eficientes na sua transmissão. Entre eles, está o *Aedes aegypti*, que, assim, o MAYV eleva o potencial de disseminação do MAYV. Estratégias ineficientes no controle dos vetores de arboviroses levaram à necessidade de melhor compreender os aspectos moleculares da interação vírus-vetor na tentativa de desenvolver ferramentas para impedir a disseminação viral. Como as proteínas são as principais mediadoras da comunicação entre processos celulares, uma análise proteômica de células Aag-2 de *A. aegypti* durante infecção por MAYV foi realizada nesse capítulo a fim de elucidar aspectos fundamentais da interação vírus-vetor para a replicação viral. Após espectrometria de massas de células infectadas e não-infectadas, foi identificada uma diminuição na abundância de proteínas da célula hospedeira. Todos os componentes celulares, funções moleculares e processos biológicos seguiram esse mesmo padrão. Por outro lado, a quantidade de proteínas de MAYV aumentou no decorrer das 48h de infecção. As proteínas de *A. aegypti* que sofreram regulação positiva se mostraram importantes para a replicação viral. Entre elas, estão o fator de transcrição HCFC1, chaperonas, sinaptobrevinas, enolase fosfatase e1, ATP sintase, entre outras. Os dados do presente estudo são coerentes com dados de estudos proteômicos prévios sobre arbovírus como *Dengue virus* e *Chikungunya virus* e seus vetores. Além de sugerir um padrão entre as proteínas essenciais para replicação de diferentes arbovírus, esses dados apontam proteínas candidatas para futuros experimentos de validação biológica.

Palavras-chave: *A. aegypti*, MAYV, espectrometria de massas, proteínas reguladas.

Abstract

Mayaro virus (MAYV) is an arbovirus belonging to the genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*. MAYV currently has almost restricted circulation to Latin America, however, in addition to being transmitted by *Haemagogus spp.*, other mosquitoes genera are also efficient in its transmission. *Aedes aegypti* is one of them, what enhances MAYV potential for distribution. Inefficient strategies to control arbovirus vectors have led to the need to better understand the molecular aspects of virus-vector interaction in an attempt to develop tools to prevent viral spread. Since proteins are the main mediators of communication between cellular processes, a proteomic analysis of *A. aegypti* Aag-2 cells during MAYV infection was performed in this chapter in order to elucidate fundamental aspects of the virus-vector interaction for viral replication. After mass spectrometry of infected and uninfected cells, a decrease in host cells proteins was identified. All cellular components, molecular functions and biological processes showed this same pattern. On the other hand, the amount of MAYV proteins increased during the 48 hours of infection. The *A. aegypti* proteins that underwent positive regulation proved to be important for viral replication. Among them are the host cell factor C1, chaperones, synaptobrevins, enolase phosphatase e1, ATP synthase and others. Data from the present study are consistent with data from previous proteomic studies on arboviruses such as *Dengue virus*, *Chikungunya virus* and their vectors. In addition to pointing out a certain pattern among the essential proteins for different arboviruses replication, these data indicates candidate proteins for future biological validation experiments.

Key-words: *A. aegypti*, MAYV, mass spectrometry, regulated proteins.

3.2. INTRODUÇÃO

O *Mayaro virus* (MAYV) é um arbovírus classificado no gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae* (Napoleão-Pego *et al.*, 2014). O vírus foi primeiramente identificado em 1954 na ilha de Trindade, na América Central, e infecta predominantemente pessoas na América Latina. Assim, o MAYV causa uma doença que é historicamente negligenciada, apesar de já ter causado epidemias em diferentes países, inclusive o Brasil (Oliveira Mota *et al.*, 2016). Apesar de ser transmitido predominantemente por mosquitos *Haemagogus spp.*, o MAYV também pode ser transmitido por mosquitos de outros gêneros, como o *Aedes aegypti* (Esposito & Fonseca, 2017). Por ter se mostrado um vetor muito competente de transmissão de diversos vírus e por ser abundante em todo o território brasileiro, o *A. aegypti* é uma ameaça à saúde pública (Franz *et al.*, 2015).

Assim como os outros alfavírus, o MAYV possui genoma de RNA fita simples senso positivo de aproximados 12kb que codifica uma poliproteína estrutural e uma poliproteína não-estrutural. Ambas sofrem clivagem ao longo da infecção por proteases virais e do hospedeiro, produzindo assim as proteínas estruturais e não-estruturais (Napoleão-Pego *et al.*, 2014).

O MAYV causa sintomas muito semelhantes aos do flavivírus Dengue, com cerca de 1% dos casos clinicamente diagnosticados como Dengue no Norte da América do Sul podendo ter sido causados, na realidade, por MAYV (Napoleão-Pego *et al.*, 2015). Além da artralgia, sintoma característico de alfavírus artritogênicos, já foram reportados sintomas como febre, dor abdominal, fotofobia e vertigem em pessoas infectadas por MAYV (Oliveira Mota *et al.*, 2016).

No estudo de arbovírus, culturas celulares são amplamente utilizadas para estudar aspectos moleculares da interação vírus-vetor (Alves & Guimarães, 2013). Extraída originalmente de embriões de *A. aegypti*, a linhagem celular Aag-2 representa um bom modelo para estudo desse vetor (Walker *et al.*, 2014). Além de culturas celulares serem facilmente reprodutíveis e homogêneas, as células Aag-2 apresentam perfil imunológico similar ao do mosquito *A. aegypti* inteiro (Barletta *et al.*, 2012).

Durante a infecção, a maquinaria da célula hospedeira é utilizada para permitir a replicação viral. Dessa forma, o proteoma das células pode sofrer modificações significativas ao longo do tempo (Roepstorff, 2012). Por serem as principais mediadoras de processos metabólicos e de comunicação, as proteínas são um alvo adequado para estudos moleculares da interação vírus-vetor (Anderson *et al.*, 2016). A espectrometria de massas, nos últimos anos, tem se tornado uma metodologia fundamental no estudo de proteomas. As três principais etapas de uma análise no espectrômetro de massas incluem, além da preparação da amostra biológica, o fracionamento da mistura de proteínas (*bottom up*) ou peptídeos (*top down*), a espectrometria de massas e a análise bioinformática (Yu *et al.*, 2010). Na análise proteômica *label-free*, é possível a identificação e uma quantificação relativa da abundância das proteínas (Asara *et al.*, 2008).

Uma série de estudos focados na interação vírus-vetor que utilizam espectrometria de massas já foram publicados, como o que compara a expressão proteica de células de *A. albopictus* C6/36 durante infecção por *Zika virus* (Xin *et al.*, 2017). Contudo, até então, não há estudos envolvendo uma análise dinâmica do proteoma de células Aag-2 de *A. aegypti* durante infecção por MAYV. Tal estudo pode auxiliar a esclarecer alguns aspectos moleculares únicos da interação vírus-vetor, visto que, no vetor artrópode, os arbovírus permanecem em infecção persistente sem causar doença (Cheng *et al.*, 2017). Identificar a nível molecular os componentes da interação vírus-vetor na durante replicação pode auxiliar a desenvolver novas estratégias para bloquear a amplificação viral, assim como a disseminação de doenças causadas por alfavírus.

3.3. OBJETIVOS

Objetivo geral

→ Elucidar aspectos moleculares da interação arbovírus-vetor por meio da detecção de proteínas diferencialmente abundantes em células de *A. aegypti* (Aag-2) durante a infecção por MAYV.

Objetivos específicos

→ Infectar células Aag-2 com MAYV para extração de proteínas total, assim como em células não infectadas.

→ Realizar espectrometria de massas *label-free* de células Aag-2 durante infecção por MAYV.

→ Identificar proteínas de *A. aegypti* que sejam positivamente ou negativamente reguladas e que estejam potencialmente envolvidas na replicação e na transmissão do MAYV.

3.4. MATERIAIS E MÉTODOS

Estabelecimento de cultura celular: Células Vero (rim do macaco-verde africano *Cercopithecus aethiops*) foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) High Glucose (Sigma) com 10% de soro fetal bovino (FBS: *fetal bovine serum*) e 10% penicilina + streptomina 100U/ml (PenStrep) a 37°C e suprimento de CO₂ a 5%. Nas células Vero infectadas foi adicionado ácido 4 - (2 - hidroxietil) - 1 - piperazinoetanossulfônico (HEPES) a 25mM. As células Aag-2 (embrião de *A. aegypti*) foram mantidas em meio de cultura Schneider's *Drosophila* Medium (Gibco by Life Technologies) com 10% FBS e PenStrep 100U/ml. Já a linhagem C6/36 (larva de *A. albopictus* com deficiência na maquinaria de iRNA) foi cultivada em meio TC100 10% FBS (Vitrocell Embriolife). Ambas as células de mosquito foram cultivadas a 28°C. Nas passagens de célula de mamífero, foi realizada lavagem com tampão fosfato salino (PBS) 1X e as células foram desaderidas com Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma) a 37°C. Quando necessário, as células foram contadas com o *Countess Automated Cell Counter* (Invitrogen™).

Confirmação da infectividade de MAYV em células de mamífero (Vero): Células Vero em frascos T25 foram infectadas com 100µl da amostra de MAYV da cidade de Campos (RJ -

2015) cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC- Fiocruz- RJ). Três dias depois, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para futuras infecções. As células foram ressuspensas com 1ml de TRIzol (Invitrogen™) para a extração de RNA.

Extração de RNA para posterior detecção de MAYV por RT-PCR: A extração de RNA das células infectadas seguiu as recomendações do fabricante conforme descrito a seguir. As células ressuspensas em TRIzol foram incubadas por 5min à temperatura ambiente. Um volume de 200 μl de clorofórmio foi adicionado por microtubo para separação das fases. Os tubos foram agitados com vigor, deixados por 2min à temperatura ambiente e centrifugados a 12.000g durante 15min a 4°C . Após remoção do isopropanol, o precipitado foi lavado com 1ml de etanol 75% gelado e centrifugado a 7.500g por 5min a 4°C . Após remoção do etanol, o precipitado (RNA) foi ressuspendido com 30 μl de água estéril e armazenado a -80°C . A quantificação do RNA foi feita com o espectrofotômetro NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

Transcrição reversa para síntese de cDNA: Para síntese da primeira fita de cDNA, foi adicionado em um microtubo (de 200 μl) 1 μl de *primers* randômicos, 3 μl de RNA, 1 μl de desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP) e 7 μl de água estéril, incubados a 65°C por 5min e no gelo por 1min. Em seguida, foram adicionados 4 μl do *Buffer First Strand* (Invitrogen™), 2 μl de ditiotretitol (DTT) e 1 μl de inibidor de RNase. Após adição de 1 μl da enzima M-MLV (Invitrogen™), os tubos foram incubados a 25°C por 10min, 37°C por 50min e 70°C por 10min.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Em um volume final de 25 μl de reação, foram adicionados 2,5 μl Buffer 10x, 0,5 μl MgCl_2 , 0,5 μl dNTP, 0,5 μl *primer Forward*, 0,5 μl *primer Reverse*, 1 μl do cDNA produzido na etapa anterior, 0,125 μl Taq DNA polimerase e 17,4 μl de água estéril. O ciclo de amplificação encontra-se na **Tabela 3.1**. As sequências dos pares oligonucleotídeos específicos para amplificação da região E2-E3 do Envelope do MAYV estão listadas na **Tabela 3.2**. Os produtos de PCR com tamanho estimado de 1,5kb foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Tabela 3.1. Ciclo para amplificação da região E2-E3 do gene do Envelope de MAYV.

	Etapa	Temperatura	Tempo
35x	Desnaturação Inicial	94°C	3 min
	Desnaturação	94°C	30 seg
	Anelamento	T _m *	30 seg
	Extensão	72°C	1min 45seg
	Extensão Final	72°C	10 min
	<i>hold</i>	12°C	∞

Tabela 3.2. Oligonucleotídeos específicos usados para amplificação parcial do genoma do vírus MAYV.

Identificação	Sequência 5'-3'	T de anelamento	Sequências base (NCBI)
MayE F	GCR GCY YCG ACA GTG ACA GCY AT	69°C	KM400591 AF237947
MayE R	TGC ATG YGC TTT CGG TGC RC	65°C	KT 818520
* R= A ou G (<i>puRine</i>), Y= C ou T (<i>pyrimidine</i>) , K= G ou T (<i>Keto</i>). Fonte: IUPAC.			

T de anelamento= temperatura de anelamento.

Propagação viral em células C6/36: Após confirmação da infectividade do isolado de MAYV em células Vero, os vírus foram propagados em células C6/36 para posterior titulação viral. Frascos T75 com células C6/36 em 15ml de meio foram infectados com 450µl de sobrenadante de célula Vero previamente infectado. Após 3, os sobrenadantes foram então coletados, centrifugados a 5000rpm por 10min e armazenados a -80°C. O estoque de MAYV já havia

sofrido 2 passagens em células Vero, resultando ainda em amostras virais com baixo número de passagens n= 3. Amostras do sobrenadante infectado foram coletadas para titulação.

Titulação viral por End-Point Dilution Assay: Primeiramente, as amostras foram diluídas serialmente 9 vezes em 90µl de meio DMEM high glucose 10% FBS 10% PenStrep HEPES 25mM. Após passar por lavagem e tripsinização de um frasco T25 confluyente com células Vero, 14ml de meio DMEM high glucose 10% FBS 10% PenStrep HEPES 25mM foram adicionados. Em cada diluição viral foram acrescentados 90µl de células Vero em suspensão. Em microplaca do tipo Terasaki com 60 poços (Greiner Bio-One), foram adicionados 10µl de cada diluição ao longo dos 6 poços de cada fileira. As placas Terasaki foram incubadas a 37°C por três dias. O efeito citopático nas células Vero infectadas com MAYV foi observado sob microscópio de luz. Para o cálculo do TCID₅₀, foi utilizado o TCID₅₀ Calculator (V2.1 – 20.01.2017_MB) adaptado por Marco Binder (<https://www.coursehero.com/file/32643536/TCID50Calculatorxls/>).

Cinética de crescimento para escolha do MOI e dos pontos de coleta das células: Para avaliar a dinâmica da produção de partículas virais de MAYV pelas células Aag-2, placas para cultura de células com 12 poços (Kasvi) contendo 10⁵ células em cada poço em meio Schneider's a 28°C foram infectadas com MAYV nos MOI= 0,1 e 1. O *seeding* das células se deu 16h antes da infecção e, 90min pós infecção, o meio de cultura foi trocado. Com 24hpi, 48hpi e 72hpi o sobrenadante foi coletado para titulação viral, a qual foi realizada por *End-Point Dilution Assay*. Ao final das titulações, foi escolhido MOI = 1 para MAYV com coleta final de 48hpi.

Infecção de células Aag-2 com MAYV: Após definição do MOI e dos tempos de coletas, seis frascos T25 contendo 2,2x10⁶ células Aag-2 foram infectados com MAYV em MOI=1, enquanto três frascos permaneceram não infectados (**Tabela 3.3**). Após 90min de infecção, o sobrenadante foi recolhido e foram adicionados 5ml de meio de cultura novo. As coletas foram realizadas em 0h, 12h e 48h pós-infecção, todas em triplicata biológica.

Tabela 3.3. Tempos de coleta das células Aag-2 para espectrometria de massas. Foram utilizadas 2×10^6 células Aag-2 em cada triplicata biológica.

MAYV (MOI=1)
Primeira coleta, t=0h : células não-infectadas (triplicata)
Segunda coleta, t=12hpi : células infectadas (triplicata)
Terceira coleta, t= 48hpi : células infectadas (triplicata)

Extração de proteínas totais das células coletadas: As células coletadas de cada frasco foram então ressuspensas em 5ml de PBS 1x e centrifugadas a 3000rpm por 5min. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* foi lavado com PBS1x, seguido por duas centrifugações a 3000rpm por 5min. Por último, as células foram vortexadas em 500µl de ureia 8M com inibidores de proteases. As amostras foram armazenadas a -80°C em microtubos *low binding*.

Preparação das amostras para espectrometria de massas: Para espectrometria de massas *top-down label-free*, as amostras devem passar por 5 etapas de processamento, além da quantificação final. São essas etapas: **1) sonicação** - as células ressuspensas em ureia foram submetidas a seis etapas de sonicação de 10seg com intervalos de 10seg para quebrar as moléculas de DNA. Em seguida, as amostras devem sofrer **2) redução** - para que as pontes dissulfeto das proteínas sejam desfeitas, ditioneitol (DTT - Sigma Aldrich) 25mM diluído em bicarbonato de trietilamônio (TEAB – Sigma Aldrich) deve ser adicionado às amostras e incubado a 48°C por 90min. A fim de evitar que tal processo seja naturalmente revertido, é necessária uma etapa de **3) alquilação** - iodoacetamida 100mM diluída em TEAB foi adicionada em cada amostra e incubada no escuro por 1h. Para a **4) digestão triptica** - das proteínas extraídas foi utilizada a *Sequencing Grade Modified Trypsin* (Promega) na proporção de 1µg de enzima para cada 50µg de substrato. Após 24h, as amostras foram então secas a vácuo e ressuspensas em 200µl de tampão *loading* (ácido trifluoroacético - TFA1%). **5) Dessalinização:** nesse processo, seis pequenas camadas de membrana C18 foram colocadas em uma ponteira de 200µl. A ponteira foi colocada dentro de um microtubo para centrifugação a velocidade máxima até que todo o *flow through* fosse descartado. Foram adicionados 100µl de metanol na ponteira com a membrana C18, a qual foi centrifugada por 1000g até que a totalidade do líquido passasse pela membrana. O passo foi repetido. O mesmo

procedimento foi realizado para 100µl de tampão D (80% acetonitrila 0,5% ácido acético v/v) e 100µl de tampão A (0,5% ácido acético v/v). As amostras foram então ressuspensas em tampão *loading* e aplicadas na membrana C18. Uma centrifugação a 900g foi realizada até que todo o líquido passasse pela membrana. Em seguida, as amostras foram lavadas com 100µl de tampão A e centrifugadas a 1000g até que o líquido todo passe pela membrana, sendo esse passo realizado duas vezes. Nas etapas de eluição, foram utilizados microtubos *low binding* para coletar a amostra. Na eluição sequencial, todas as centrifugações foram feitas a 600g até que todo o tampão passasse pela membrana. Foram adicionados, sequencialmente e intercalados com centrifugações, 20µl de tampão B (acetonitrila 25% v/v, 0,5% ácido acético v/v), 20µl de tampão C (acetonitrila 250% v/v, 0,5% ácido acético v/v), 20µl de tampão D (acetonitrila 80% v/v, 0,5% ácido acético v/v) e 20µl de acetonitrila 100% v/v. Os tampões de eluição seguem um gradiente de hidrofobicidade para que peptídeos com características diversas sejam liberados da membrana. Todas as soluções devem ter grau de pureza LC. As amostras foram então armazenadas a -80°C e quantificadas. **6) Quantificação** - os peptídeos foram secos a vácuo e ressuspensos em 25µl de ácido fórmico 0,1% (v/v) em água MilliQ para quantificação no Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™) com o *kit* Qubit® Protein Assay.

Espectrometria de massas *label-free*: A análise das amostras se deu no sistema de cromatografia líquida nano-UPLC-Dionex 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado online com um espectrômetro de massas Orbitrap Elite™ (Thermo Scientific). Para a análise qualitativa *label-free* foram utilizados 4µg de peptídeos digeridos em 8µl de ácido fórmico 0,1% (v/v), os quais foram inseridos no cromatógrafo equipado com uma coluna tipo *trap* de C18 (100µm x 3cm com partículas de 5 µm/100Å) e uma coluna C18 analítica (75µm x 35cm com partículas de 3µm/100Å). Os peptídeos foram eluídos da coluna analítica diretamente para o espectrômetro de massas sob ionização ESI. A corrida teve uma duração de 50min com gradiente de 2% a 35% de solvente B (0,1% (v/v) ácido fórmico em acetonitrila). Os espectros de massa molecular foram adquiridos no modo *Data-Dependent Acquisition* (DDA) e controlados pelo *software* Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific). O ciclo de aquisição DDA possui um alcance de razão massa/carga (*m/z*) de 350 a 1650 e resolução de 120.000 para o MS1 (primeiro estágio de análise de massas). Os íons precursores mais abundantes foram então fragmentados por colisão induzida por dissociação (CID) com exclusão dinâmica de 90s e energia de colisão normalizada para 35%. Os fragmentos resultantes foram detectados por meio de um sistema *ion trap*.

Quantificação relativa, identificação das proteínas e seu contexto biológico: a análise proteômica qualitativa foi realizada com três grupos de células: não infectado, com 12h de infecção e com 48h de infecção, todos em triplicata biológica. A quantificação relativa das proteínas foi realizada com o *software* Progenesis QI Proteomics *software* (versão 1.0; Non-Linear Dynamics). Os espectros foram alinhados e quantificados com base na alta acurácia de massas dos eventos MS1. Mudanças relativas nos níveis de expressão foram calculadas para cada peptídeo identificado comparando as áreas dos picos, usando os íons obtidos do cromatograma. Para identificação dos peptídeos, os espectros MS/MS com p-valor abaixo de 0,05 no teste estatístico ANOVA foram exportados como arquivos genéricos Mascot (.mgf) e pesquisados com o *software* PEAKS Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions) usando um banco de proteínas de *A. aegypti* e MAYV obtidos no UniProt (acessado em 02/12/ 2018). Os parâmetros utilizados foram tolerância de massa de peptídeo de 10ppm, tolerância de fragmento de massa de 0,5Da e duas clivagens perdidas permitidas. Oxidação de metionina e acetilação proteica N-terminal foram especificadas como modificações variáveis, enquanto carbamidometilação de cisteínas foi tomada como modificação fixada. Os peptídeos e proteínas diferencialmente expressos foram os que possuíram taxa de falso descobrimento (FDR) menor que 1%. As identificações foram novamente importadas para o *software* Progenesis QI para quantificação proteica. Apenas proteínas com no mínimo um peptídeo único foram consideradas para as análises subsequentes. Peptídeos com conflitos foram deletados automaticamente e manualmente validados de acordo com o seu *score*, *peptide score* e perfil de abundância. Após essa etapa, os peptídeos que permaneceram com conflitos foram excluídos da quantificação. A análise de componente principal (PCA) foi realizada tanto a nível peptídico quanto proteico para avaliar se o agrupamento das triplicatas era mais evidente do que o agrupamento das condições, como também para detectar a presença de eventuais *outliers*. As triplicatas foram mensuradas para todas as condições para verificar a reproducibilidade do experimento. Após as identificações pelo PEAKS, as sequências de aminoácidos das proteínas foram submetidas ao Blast2GO e ao BlastKOALA (<http://www.kegg.jp/blastkoala/>), ferramenta do programa KEGG. Assim, foi possível a visualização das proteínas em seus contextos biológicos. Para análise da modulação viral sobre as proteínas secretadas por vias clássicas e não clássicas em células Aag-2, foram utilizados, respectivamente, os *softwares* SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>). O Metaboanalyst foi utilizado para normalização e clusterização dos dados, assim como para a análise de componente principal e o heatmap. A análise STRING de interações proteína-proteína foi realizada com o programa STRING v. 11.0 (<https://string-db.org/>).

3.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Infectividade e cinética de crescimento de MAYV em células Aag-2 (*A. aegypti*)

Por apresentar efeito citopático de fácil visualização, células Vero foram primeiramente infectadas com o isolado de MAYV recebido a fim de confirmar sua infectividade. Após extração do RNA total das células infectadas, uma RT-PCR foi realizada para confirmação do vírus. Foi gerada uma banda de 1,5kb correspondente à região E2-E3 do gene do envelope viral (**Figura 3.1**). O MAYV foi propagado em células C6/36 para gerar títulos mais altos de partículas infecciosas.

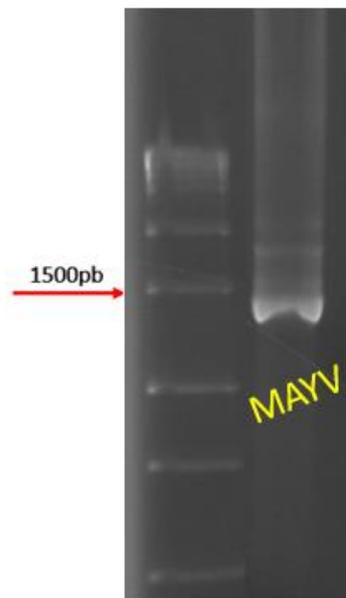
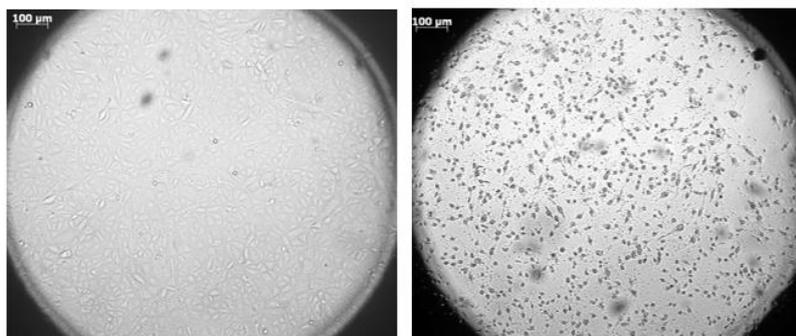


Figura 3.1. Eletroforese em gel de agarose da amplificação do Envelope de MAYV a partir do RNA extraído de células Vero. Marcador de DNA: Ladder 1kb (Ludwig), primeira coluna.

Para vírus animais, a razão entre partículas não-infecciosas e infecciosas pode ser muito alta (Brown & Hernandez, 2012). Assim, saber o número total de partículas que têm a capacidade de gerar uma infecção produtiva é importante. Após infecção de células C6/36 com sobrenadante infectado de células Vero, a titulação viral foi realizada (**Figura 3.2**).

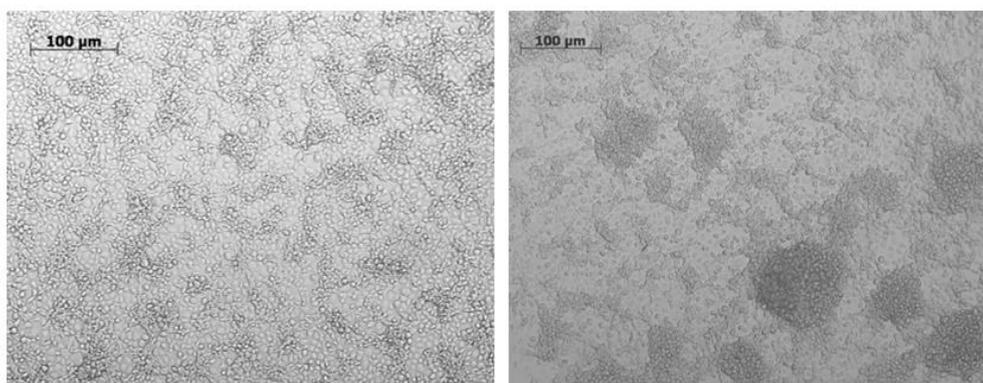


A. não-infectado

B. MAYV

Figura 3.2. Efeito citopático do MAYV em célula Vero. Imagens obtidas por microscopia de luz de placas do tipo Terasaki contendo células Vero não-infectados (A) e infectadas (B) com MAYV. Objetivas 20x.

Em seguida, na cinética de crescimento, foi avaliada a capacidade de células Aag-2 de *A. aegypti* em produzir novas partículas de MAYV. Foram testados para infecção os MOI 0,1 e 1, com tempos de coleta 24hpi, 48hpi e 72hpi para titulação. Nas células infectadas com MOI=1, houve formação de sincícios com 3dpi (**Figura 3.3**).



A. não-infectado

B. MAYV

Figura 3.3. Células Aag-2 mock (A) e infectadas com MAYV em formação de sincícios com 3dpi (B).

O tempo ideal de coleta pós-infecção das células Aag-2 para espectrometria de massas corresponde às horas pós-infecção (hpi) com elevada produção de partículas virais combinada com menor efeito citopático aparente. Os resultados da cinética de crescimento

são apresentados nos gráficos a seguir (**Figura 3.4**). Após cinética de crescimento, foi observado que o pico da produção de partículas virais infecciosas ocorre em 48hpi. Nesse sentido, os pontos de coleta para a análise proteômica foram escolhidos dentro do intervalo 0 – 48hpi. Foram definidos então os tempos 0h (não-infectado), 12hpi 48hpi, para que fosse possível uma observação da mudança gradual no proteoma. As amostras referentes a cada condição foram preparadas em triplicata.

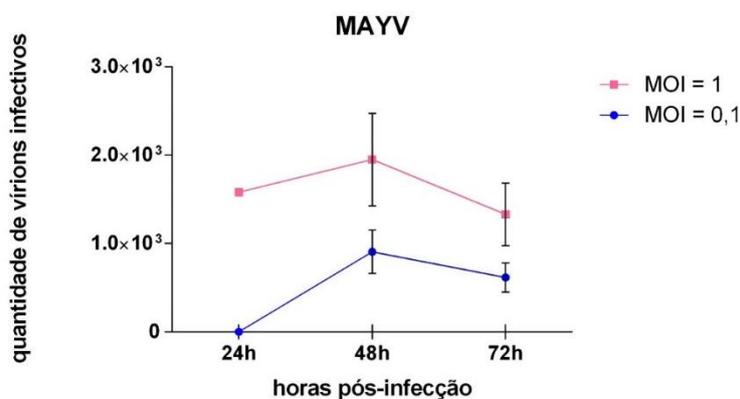


Figura 3.4. Cinética de crescimento de MAYV em células Aag-2. Gráfico feito com o *software* GraphPad Prism 6.

O fato da célula Aag-2 ter amplificado o MAYV já é um ponto a ser considerado. De acordo com Roberts e colaboradores (2017), que estudaram a replicação do alfavírus CHIKV em uma série de linhagens celulares de mamíferos e de mosquitos, a linhagem Aag-2 não seria apropriada para esse vírus. Por outro lado, Göertz *et al.* (2017) conduziu seu experimento com cultura de Aag-2 co-infectada com *Zika virus* (ZIKV) e CHIKV. No presente trabalho, as células Aag-2 produziram um título de MAYV semelhante ao de Göertz *et al.* (2017), porém, utilizando um MOI 10x maior. Contudo, é de se esperar que Aag-2 realmente não produza títulos altos já que, além de possuir uma relação de persistência com o vírus, não possui deficiências na maquinaria de RNAi como a linhagem C6/36. Além disso, ambos os estudos citados utilizaram em seus experimentos clones infecciosos de CHIKV e não um isolado viral, o que pode causar uma diferença na produção de vírions.

Análise bioinformática dos dados da espectrometria de massas

Após espectrometria de massas, uma análise de componente principal (PCA) foi realizada tanto a nível peptídico quanto a nível proteico para avaliar a qualidade do agrupamento das triplicatas biológicas. Pode-se observar no gráfico que as amostras formam grupos coerentes dentro de cada condição (**Figura 3.5**).

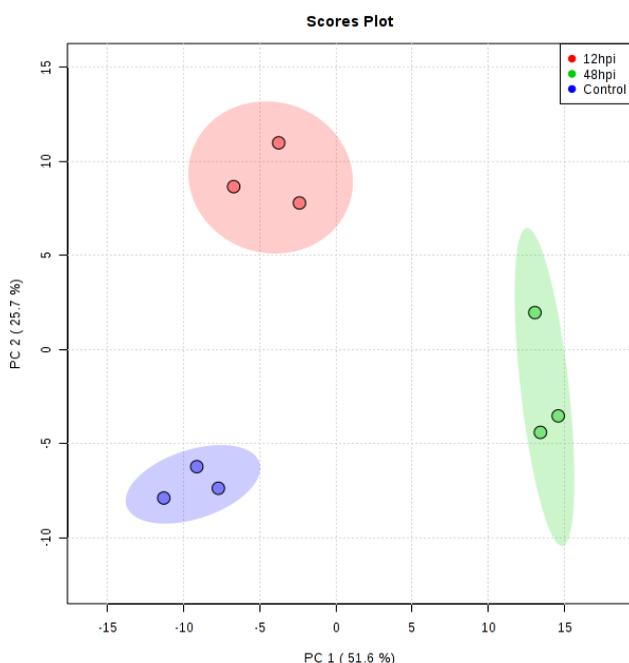


Figura 3.5. PCA do agrupamento das triplicatas de células Aag-2 dentro de cada condição do experimento. A sombra lilás engloba as células coletadas 0hpi (não-infectadas). Em vermelho e verde, respectivamente, as células coletadas 12hpi e 48hpi.

O número total de proteínas de *A. aegypti* identificadas cai com o passar do tempo de infecção, ao passo que a quantidade de proteínas virais aumenta (**Figura 3.6**). O resultado era esperado, visto que as células hospedeiras são manipuladas para facilitar a replicação viral e muitas delas morrem nesse processo, tendo assim suas proteínas degradadas. Após análises estatísticas para filtragem das proteínas candidatas com baixa confiabilidade, foram identificadas 191 proteínas diferencialmente abundantes e significativas (ANOVA com p -valor $< 0,05$) ao longo dos três tempos de coleta do experimento (**Material Suplementar**).

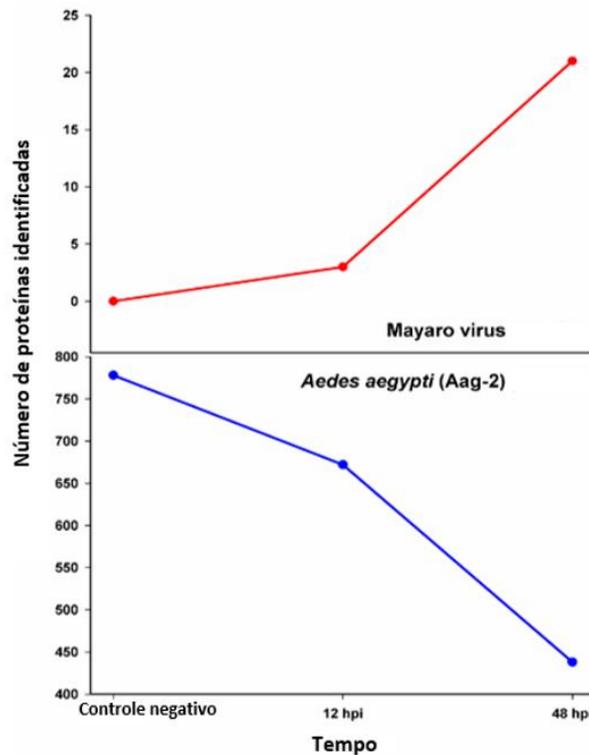


Figura 3.6. Número total de proteínas identificadas do MAYV (vermelho) e de células Aag-2 (azul) ao longo dos tempos de infecção.

Uma vez identificadas, as proteínas de *A. aegypti* foram classificadas de acordo com sua função molecular, componente celular e processo biológico a que pertencem (**Figura 3.7**). Pode-se verificar, de acordo com o número total de identificações, que o número total de proteínas pertencentes a cada subdivisão também é decrescente durante a infecção por MAYV, com exceção de componentes celulares mitocondriais internos. Assim, com a morte das células, todos os componentes, processos e funções da célula sofrem degradação. Contudo, há algumas proteínas que foram super expressas ao longo da infecção (**Material Suplementar**), sugerindo que elas tenham importante participação na dinâmica viral. Assim, as proteínas que serão discutidas a seguir seguem padrão de abundância, estando mais abundante nos tempos de infecção do que no controle não-infectado.

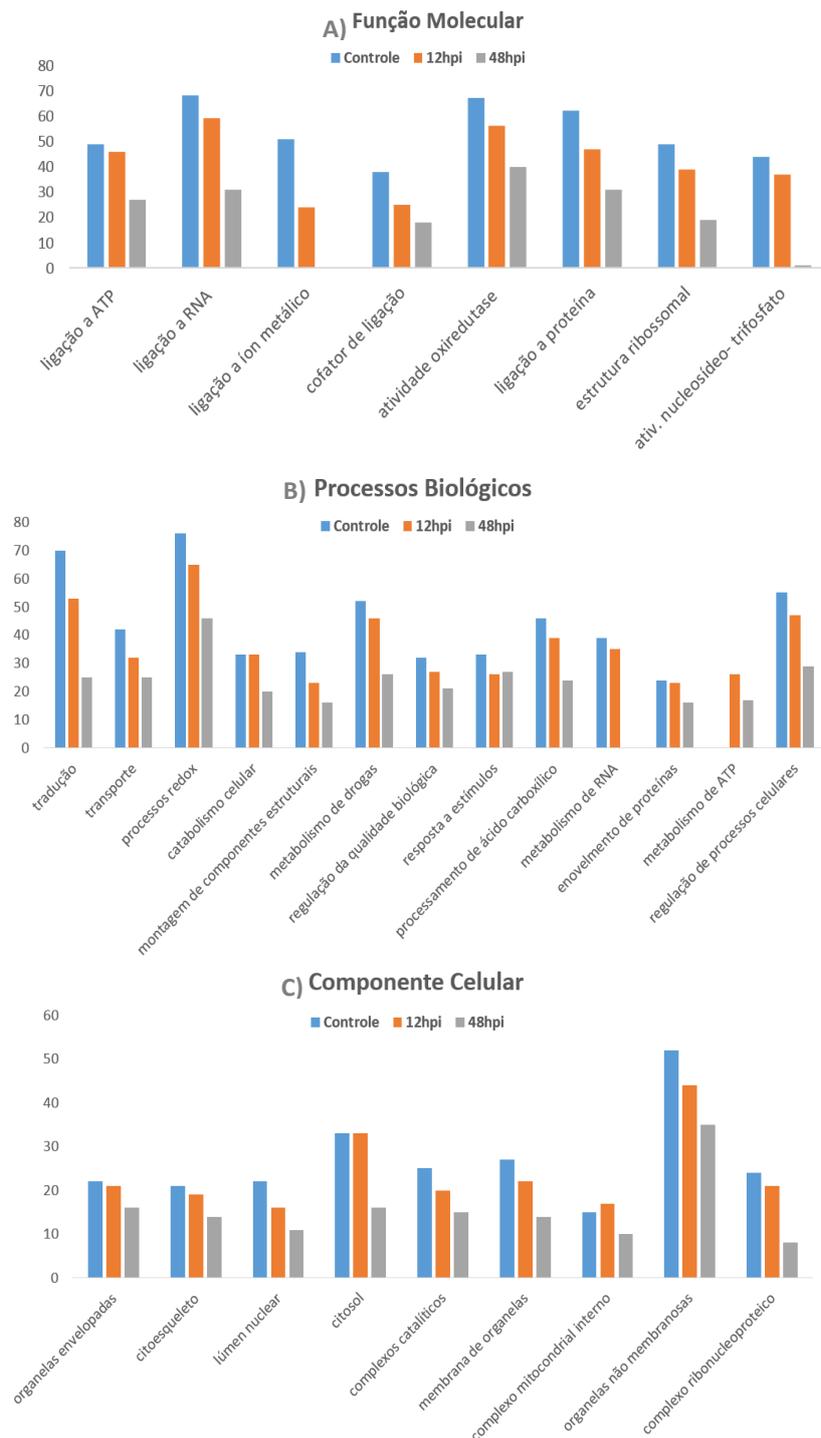


Figura 3.7. Número total de proteínas identificadas de células Aag-2 ao longo dos tempos de infecção por MAYV, de acordo com suas funções moleculares (A), processos biológicos (B) e componentes celulares (C) a que pertencem. O eixo x indica as subdivisões de cada classificação e o eixo y, o número de identificações.

- **Tempo de replicação viral**

De acordo com o *heatmap* da abundância de proteínas de *A. aegypti* ao longo dos tempos de infecção (**Figura 3.8**), pode-se notar que o padrão de abundância no tempo de 12h assemelha-se mais ao padrão do controle (não-infectado) do que ao padrão de 48hpi. Sabe-se que o ciclo citoplasmático de replicação dos alfavírus é rápido, durando cerca de 4h (Oliveira Mota *et al.*, 2015). Apesar de alterações terem sido observadas já em 12hpi, uma maior mudança no perfil proteico foi mais claramente identificada após longos períodos de infecção (48h). Tal resultado é esperado, já que tanto a redução ou o aumento da abundância de proteínas, em geral, torna-se acumulativo durante o processo infectivo.

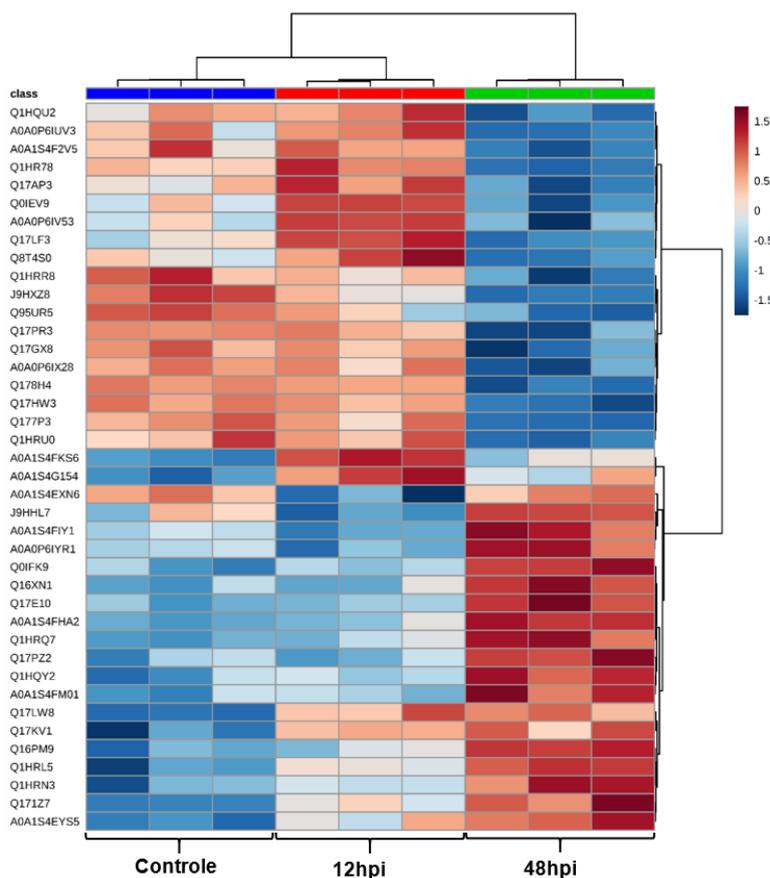


Figura 3.8. Proteínas diferencialmente abundantes nos três tempos de coleta das células Aag-2 infectadas com MAYV. Apenas as 40 proteínas com os menores p-valor no teste ANOVA estão representadas. A escala de abundância varia entre azul (menos abundante) e vermelho (mais abundante). *Fold change*: -1,5 → 1,5.

- **Proibitina**

Sabe-se que vírus como o MAYV conseguem infectar culturas de células de mamífero e de mosquito, evidenciando que os receptores podem ser estruturas comuns a esses tipos de animais (Brown & Hernandez, 2012). Além da endocitose mediada por clatrina, alguns

receptores de membrana também já foram identificados como importantes para a endocitose de partículas de alfavírus (Oliveira Mota *et al.*, 2015). No presente estudo, a proibitina está entre as proteínas de células Aag-2 que foram identificadas como mais abundantes no tempo de 48h pós infecção (código do UniProt Q1HR13). Essa proteína foi caracterizada como receptor e mediador da entrada do vírus da Dengue (sorotipo 2) em células de *A. aegypti* e de *A. albopictus* (CCL-125 e C6/36, respectivamente) (Kuadikitkan *et al.*, 2010). Além disso, experimentos mostraram a proibitina como um dos mediadores da internalização de partículas de CHIKV em diferentes linhagens de células de mamífero, apesar de ainda não se saber o seu papel exato nesse contexto (Wintachai *et al.*, 2012). Afirma-se também que tal receptor poderia mediar a internalização de múltiplos vírus (Wintachai *et al.*, 2012). Assim, supõe-se que a proibitina também seja um mediador da internalização de MAYV em células Aag-2 de *A. aegypti*.

Por serem utilizados para a internalização dos vírus, os receptores de membrana, assim como sua distribuição no organismo, determinam o tropismo dos vírus por diferentes tipos celulares (Nathanson, 2014). A existência de múltiplos receptores, assim como de co-receptores, pode dificultar a identificação de um padrão de tropismo. Em relação ao MAYV, já foi identificado tropismo por macrófagos (Cavalheiro *et al.*, 2016). Baseando-se nos sintomas de febre, artralgia e erupção cutânea da infecção por MAYV, não se pode descartar a hipótese de que ele apresente tropismo por outros tipos celulares, assim como diferentes receptores e mecanismos de internalização.

- **Sinaptobrevinas e vias alternativas de secreção**

Entre as proteínas de Aag-2 mais abundantes no tempo de 48hpi, está uma proteína da família das sinaptobrevinas (código do UniProt Q1HQY2), ou VAMPs (do inglês, *vesicle-associated membrane proteins*). As VAMPs são componentes integrais de membrana que medeiam a secreção de vesículas (Bhattacharya *et al.*, 2002). No processo de maturação de partículas, os alfavírus são montados em vacúolos de via exocítica em células de mosquito (Gliedman *et al.*, 1975). De fato, Jose e colaboradores (2017) mostraram que o brotamento de alfavírus ocorre tanto na membrana plasmática quanto em vesículas internas. Assim, o *budding* de novas partículas virais por vias exocíticas pode explicar uma crescente expressão de VAMPs com 12h e com 48h pós infecção. De acordo com a cinética de crescimento, no

tempo de 48h foi observada a maior produção de partículas virais infecciosas, o que pode justificar o pico de abundância da VAMP em 48hpi.

Além do mais, ao avaliar as vias de secreção utilizadas pelas células de *A. aegypti* ao longo dos tempos de infecção, observou-se que as vias de secreção não convencionais vão sendo ativadas em detrimento das vias clássicas (**Figura 3.9**). Em células eucarióticas, são consideradas proteínas secretadas por vias clássicas aquelas que possuem um peptídeo sinal N-terminal que as direcionam para um sítio de translocação no retículo endoplasmático (Nickel, 2003). Essas proteínas são então transportadas por vesículas até o complexo de Golgi antes de chegarem à membrana citoplasmática e serem secretadas. Já as vias secretórias não convencionais, ou não clássicas, envolvem proteínas que não possuem um peptídeo sinal para direcionamento ao Golgi, representando alguns mecanismos diferentes de secreção (Nickel, 2010). Dessa forma, é sugerido que durante a infecção, as células Aag-2 deixem de conduzir o seu metabolismo normal para trabalhar em função das proteínas virais, as quais podem ser secretadas por vias alternativas.

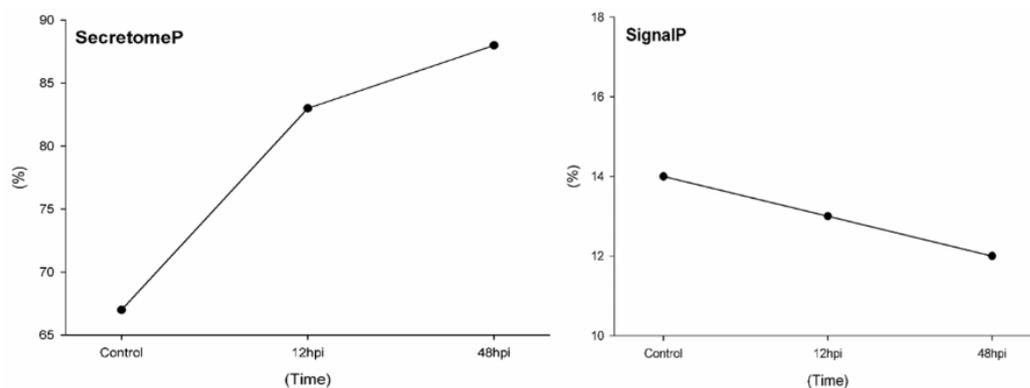


Figura 3.9. Abundância relativa de proteínas preditas de células Aag-2 secretadas por vias não convencionais (SecretomeP) e por vias clássicas (SignalP) ao longo dos tempos de infecção por MAYV.

- ***Host cell factor C1***

Em 12hpi, foi encontrado super expresso o fator de transcrição *Host cell factor C1* (HCFC1, código do UniProt A0A1S4FKS6). Em humanos, o HCFC1 está envolvido na transcrição de genes imediatos do *Herpes simplex virus*, pertencente à família *Herpesviridae* (Vogel & Kristie, 2013). Esse vírus possui material genético de DNA e replicação nuclear (Copeland *et al.*, 2009). Nesse contexto, o HCFC1 humano forma um complexo proteico com

o DNA viral ainda no citoplasma mediado pela proteína viral VP16 e o direciona para o núcleo, comandando a expressão das proteínas imediatas (Vogel & Kristie, 2013). De acordo com Freiman & Herr (1997), tal associação VP16-HCFC1 também acontece em invertebrados, sugerindo que seja uma interação evolutivamente conservada. Dessa forma, supõe-se que o HCFC1 de *A. aegypti* possa exercer também uma função de ligação a outro tipo de material genético. É possível também que ele apresente outras funções além carreamento para o núcleo, apesar de não se saber ao certo qual.

- **Enolase fosfatase e1**

A enolase fosfatase e1 (ENOPHE1), outra proteína super expressa ao longo da infecção por MAYV (código do UniProt A0A2K7P685), é uma enzima envolvida na via de salvação da metionina. Tal processo catalisa a conversão da metiladenosina de volta a L-metionina (Nozaki *et al.*, 20015). Um dos resultados dessa via é a produção de poliamina, uma proteína essencial para o desenvolvimento e para o bom funcionamento celular (Ge *et al.*, 2008). A super expressão dessa enzima já foi encontrada em cultura de células de *A. albopictus* infectadas com DENV e com CHIKV (Patramool *et al.*, 2011; Lee & Chu, 2015). Entretanto, ao realizar o nocaute do gene da ENOPHE1, Lee & Chu (2015) observaram aumento na titulação de CHIKV. Tal fato sugere que, além de ser importante para a célula, possivelmente como um mecanismo anti estresse, a ENOPHE 1 pode ser importante para a condução da replicação viral pela célula hospedeira.

- **Demanda energética**

Entre as 191 proteínas estatisticamente significativas da espectrometria de massas, 9 estão associadas à produção de energia pela via glicolítica. Dessas, 4 foram positivamente reguladas ao final de 48hpi: a frutose-bifosfato aldolase, a triose-fosfato isomerase, a gliceraldeído-trifosfato desidrogenase e a enolase. Por outro lado, a triose-fosfato isomerase, a fosfoglicerato quinase e a fosfoglicerato mutase foram menos abundantes ao longo da infecção (**Figura 3.10**). Para infecção causada por *Influenzavirus*, já foi identificado que o aumento na atividade glicolítica seria causado pelo rompimento da membrana

mitocondrial (Ritter *et al.*, 2010). Assim, a concentração de ATP cai e a célula precisa ativar a via de sinalização da glicólise para repor energia. De fato, a subunidade alfa da ATP sintase de *A. aegypti* (código do UniProt Q1HRQ7) foi encontrada super expressa ao longo da infecção por MAYV. Da mesma forma, foi anteriormente identificado que a subunidade beta da ATP sintase é também super expressa em células de *A. albopictus* infectadas com o alfavírus CHIKV (Lee & Chu, 2015). Tem sido notado que, durante uma infecção viral, as células hospedeiras têm o seu metabolismo de glicose perturbado (Ritter *et al.*, 2010). Tal perturbação pode ter levado a uma não-uniformidade no padrão de abundância encontrado para as enzimas de *A. aegypti* envolvidas na via glicolítica.

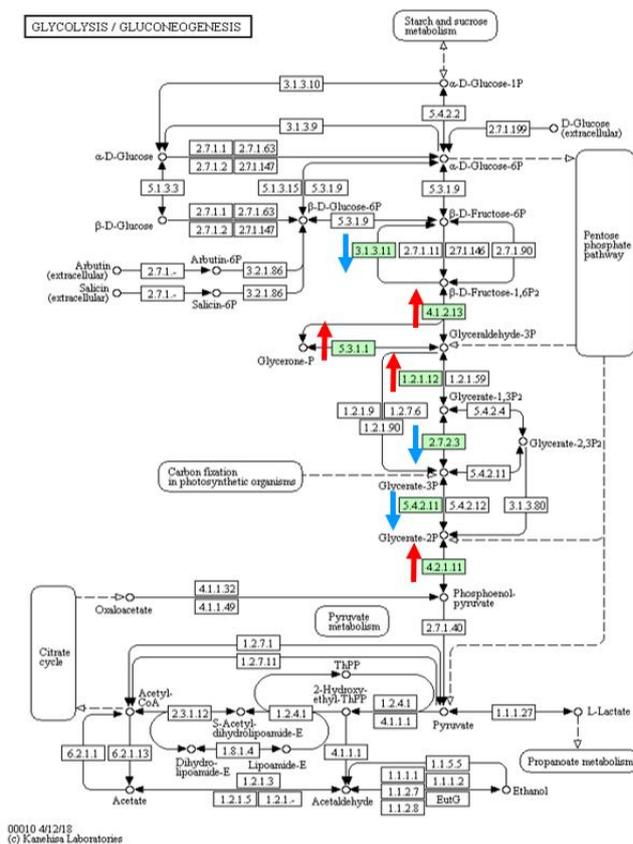


Figura 3.10. Proteínas diferencialmente abundantes associadas às vias de sinalização da glicólise e da gluconeogênese.

Os retângulos em verde indicam as proteínas de células de *A. aegypti* reguladas positivamente (setas vermelhas) ou negativamente (setas azuis) comparando o controle com a coleta 48hpi por MAYV. Códigos do UniProt: 3.1.3.11 - Q17M22, 4.1.2.13 - Q178U8, 5.3.1.1 - Q17HW3, 1.2.1.12 - J9HYM2, 2.7.2.3 - Q95UR5, 5.4.2.11 - Q177P3, 4.2.1.11 - Q17KK5. As proteínas individuais foram inseridas nas vias KEGG (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) com o programa BLASTKOALA utilizando o banco de dados "family_eukariotes" (<http://www.kegg.jp/kegg/kegg1.html>).

- **Heat shock proteins**

Heat shock proteins (HSPs), também denominadas chaperonas, formam uma família de proteínas amplamente abundantes e evolutivamente conservadas que auxiliam na homeostase

celular, principalmente em resposta a condições de estresse (Gething & Sambrook, 1992). Elas atuam no correto enovelamento, montagem e tráfego de proteínas e complexos proteicos. A regulação positiva da expressão das chaperonas, em geral, pode ser ativada por estímulos como elevadas temperaturas, escassez de nutrientes ou infecções, como as virais (Young, 1990). Estudos sobre a ativação de chaperonas durante infecção viral identificaram o envolvimento do retículo endoplasmático, local em que proteínas não enoveladas ou com conformação inadequada são retidas, ativando assim respostas antiestresse (Yoshida, 2009; Patramool *et al.*, 2011).

No presente trabalho, as proteínas HSP-20 e HSP-60 (códigos do UniProt Q16JF9 e Q16PM9, respectivamente) de células Aag-2 apresentaram crescente abundância ao longo dos tempos de infecção. De acordo com da Costa Carvalho & Fournier (1991), ao aumentar a temperatura de incubação de células C6/36 de *A. albopictus* infectadas com MAYV, a indução de HSPs foi induzida e a replicação viral foi fortemente inibida. Mais recentemente, células C6/36 infectadas com o alfavírus CHIKV também induziram a super expressão da HSP-60 durante a infecção (Lee & Chu, 2015). Após nocaute dessa chaperona mediado por siRNA, as células apresentaram um aumento na titulação viral. Além do mais, análises transcriptômicas de cultura de células S2 de *Drosophila* evidenciaram indução de chaperonas quando infectadas com vírus de RNA (Merkling *et al.*, 2015). Juntos, esses dados apontam um mecanismo antiviral conservado e corroboram que as chaperonas são importantes na defesa contra MAYV em células de *A. aegypti*.

- **HSC 70-5**

A proteína cognata 5 de HSP-70 (HSC 70-5, código do UniProt A0A0P6IU3), foi identificada como super expressa no tempo de 12hpi, contudo, teve uma queda na abundância em 48hpi. A HSC 70-5 é uma proteína de localização mitocondrial que possui funções de chaperona, no enovelamento correto de proteínas, assim na autofagia seletiva de componentes mitocondriais (<https://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/hsc70-a-chaperone-protein-with-diverse-cellular-functions>). Tal proteína também teve sua expressão induzida em *Litopenaeus vannamei* quando infectado com o vírus *White spot syndrome virus* (WSSV) (Yuan *et al.*, 2017). A regulação negativa dessa proteína aumentou a mortalidade dos animais infectados pelo acúmulo de proteínas com enovelamento incorreto, sendo a HSC

70-5 relacionada à tolerância ao WSSV (Yuan *et al.*, 2017). Sugere-se assim que a HSC 70-5 possa exercer algum papel na relação de tolerância durante a infecção persistente por MAYV em células de *A. aegypti*, talvez impedindo que a célula morra nos tempos iniciais de infecção. Contudo, na fase mais tardia de infecção, quando a produção de partículas virais é máxima, sugere-se uma sub expressão da HSC 70-5, o que poderia aumentar as taxas de mortalidade de células Aag-se, liberando assim novos vírions no meio extracelular.

- **Rede de associação funcional entre proteínas (STRING)**

A análise STRING (do inglês, *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) resulta em uma rede de associação funcional, revelando assim interações proteína-proteína entre as proteínas de *A. aegypti* identificadas por espectrometria de massas (**Figura 3.11**). Elas são agrupadas de acordo com os processos metabólicos ou componentes celulares aos quais pertencem. As proteínas evidenciadas na rede STRING destacaram, com interações fortes, dois processos metabólicos em células Aag-2 no contexto da infecção viral: a produção de energia e a tradução de proteínas. Ambos retomam a necessidade de uma maior obtenção de energia pela célula enquanto as proteínas virais são traduzidas pela maquinaria hospedeira.

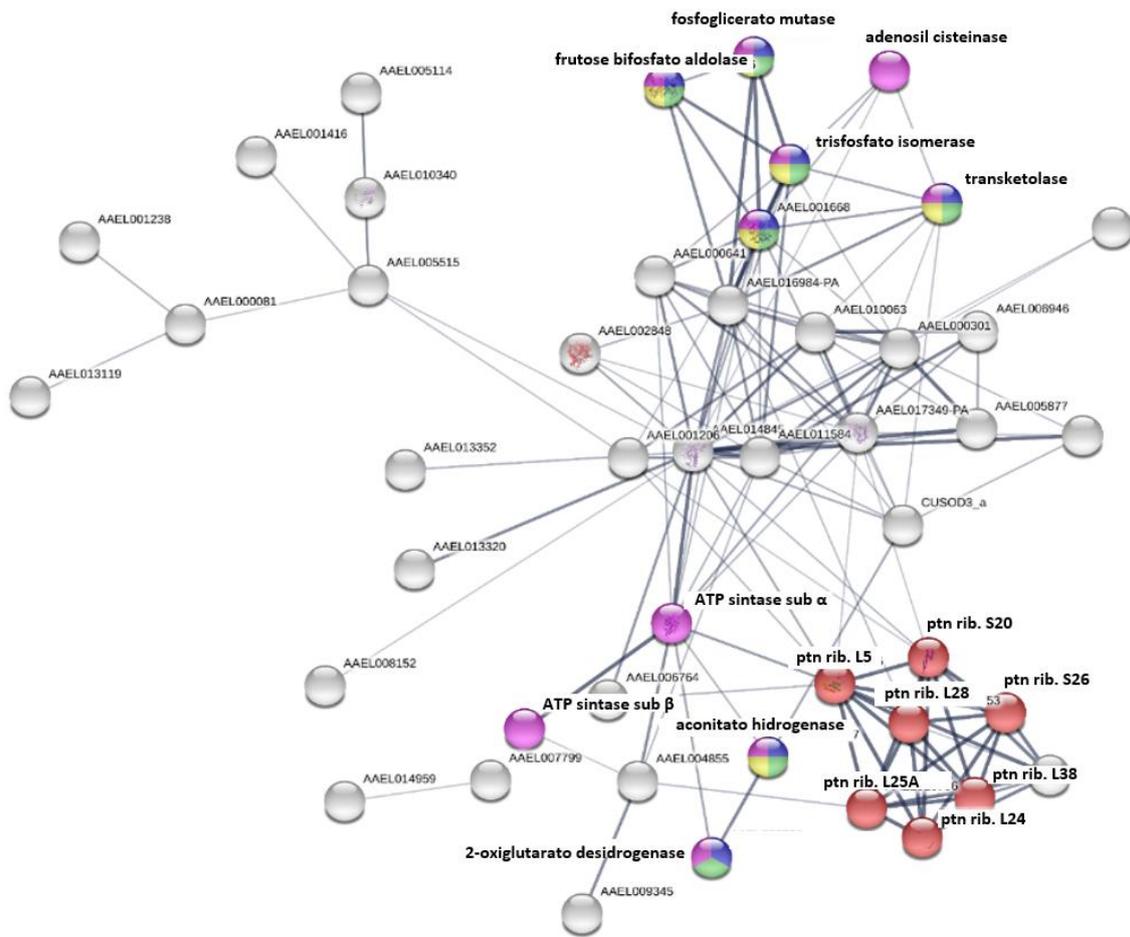


Figura 3.11. Análise STRING das interações proteína-proteína entre as proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massas de células Aag-2 infectadas com MAYV. A espessura das linhas representa a força das associações. Em azul estão as proteínas envolvidas no metabolismo de carbono. As cores dentro de cada esfera indicam a associação dessas proteínas com determinadas funções biológicas. Verde: metabolismo microbiano. Amarelo: biossíntese de aminoácidos. Vermelho: ribossomos. Rosa: vias metabólicas. Azul: metabolismo de carbono. As funções das proteínas foram obtidos no Vector Base (<https://www.vectorbase.org/>).

Esses resultados, apesar de ainda estarem em processo de análise, mostraram-se coerentes com estudos prévios a respeito da interação vírus-vetor. Tais estudos utilizaram diferentes arbovírus e culturas celulares, corroborando assim com um padrão de proteínas essenciais para a replicação viral. É possível, dessa forma, contribuir para o entendimento da relação *A. aegypti* - MAYV a nível molecular e apontar potenciais alvos para futuros estudos de alfavírus e seus vetores, assim como para o desenvolvimento de novas estratégias de combate à transmissão viral.

3.6. Conclusões

De acordo com os ensaios de titulação e cinética de crescimento, pode-se observar que o MAYV causa efeito citopático tanto em célula de mamífero quanto de mosquito, tendo induzido a formação de sincícios facilmente observáveis nessas últimas com 3dpi. Após espectrometria de massas, 191 proteínas diferencialmente abundantes foram identificadas. De um modo geral, as proteínas da célula hospedeira foram negativamente reguladas devido à morte das células, enquanto as proteínas do MAYV tiveram crescente abundância. Contudo, algumas proteínas hospedeiras foram positivamente reguladas ao longo da infecção. Sendo assim, supõe-se que elas tenham um papel importante na replicação viral. Entre elas, estão a proibitina, sinaptobrevinas, o fator de transcrição HCFC1, HSPs e a enolase fosfatase e1. Foi observado também que as vias clássicas de secreção de proteínas são menos utilizadas durante infecção por MAYV, enquanto vias alternativas foram ativadas. Tal fato pode ser explicado pelo brotamento de partículas virais em vesículas internas. Além do mais, nossos dados são coerentes com dados de outros estudos proteômicos que envolvem células de *A. albopictus* e *A. aegypti* durante infecção por arbovírus, elucidando, assim, componentes que são essenciais na replicação dos arbovírus em geral, e não apenas para alfavírus.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O controle da disseminação de arbovírus pelo mundo tem sido um grande desafio relacionado à saúde pública. Diversas técnicas para tentativa de controle dos vetores mosquitos já foram implementadas em diferentes países. No Panamá, a liberação na natureza de mosquitos machos estéreis de *A. aegypti* geneticamente modificados acabou aumentando a incidência de *A. albopictus* (Miller & Loaiza, 2015). As experiências de contenção da transmissão do vírus da Dengue (DENV) indicam que o controle do vetor *A. aegypti* raramente foi efetivo, ainda que em países com muitos recursos (Tsetsarkin *et al.*, 2012). Dessa forma, o presente estudo focou em compreender a evolução e a disseminação viral, assim como em elucidar aspectos moleculares da relação vírus-vetor.

Assim como nos casos de infecção por DENV e *Zika virus* (ZIKV), os casos de *Chikungunya virus* (CHIKV) estão presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública. De acordo com o Boletim Epidemiológico da Semana 7 de 2018 da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, a região Centro-Oeste apresentou o maior número de casos suspeitos de CHIKV em relação ao total do país. Dentro dessa região, o estado com maior incidência da doença foi Mato Grosso, com 104,7 casos a cada 100 mil habitantes (<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/06/2018-008-Publicacao.pdf>). Esses dados evidenciam a necessidade de intensificar estudos epidemiológicos, genômicos, filogenéticos e moleculares com isolados virais da região. Assim, políticas públicas de combate ao CHIKV poderão ser mais eficazes. As sequências até então disponíveis em banco de dados de genoma completo de CHIKV são de isolados majoritariamente do Nordeste e do Sudeste brasileiros. As seis sequências de genoma completo de CHIKV circulantes no Centro-Oeste foram as primeiras de tal região a serem publicadas (**Anexo I e Capítulo 2**). Mais genomas virais devem ser sequenciados para que se possa compreender o processo evolutivo dos vírus. Além de aumentar o número de estados amostrados no Brasil, o presente estudo facilita também a realização de futuras análises de filogenia mais robustas, com conclusões mais confiáveis a respeito da introdução, da evolução e da disseminação do CHIKV no Brasil e nas Américas.

Ao contrário do CHIKV, o *Mayaro virus* (MAYV) ainda hoje é quase restrito à América do Sul, sendo historicamente negligenciado (Oliveira Mota *et al.*, 2015). Além de

não existirem vacinas nem técnicas comerciais para diagnóstico desse vírus (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018), a preocupação com o MAYV também se deve pelo fato de ele ser transmitido por uma série de mosquitos de gêneros diferentes. São exemplos: *Culex spp.*, *Sabethes spp.* e *Aedes spp.*, conferindo assim um grande potencial de distribuição ao MAYV (Costa *et al.*, 2017). Nesse contexto, o estudo a nível molecular da interação vírus-vetor pode nos apresentar componentes fundamentais da replicação do MAYV no mosquito *A. aegypti*. Já foi observado em estudos proteômicos envolvendo diferentes arbovírus, incluindo o presente trabalho (**Capítulo 3**), que há proteínas em comum super expressas ao longo da infecção. Entre elas, estão as chaperonas, a enolase fosfatase e1, a ATP sintase e a proibitina. Assim, possivelmente pode-se estender parte das descobertas relativas à interação MAYV-*A. aegypti* a outros vetores desse vírus. É possível que, no futuro, ferramentas de genética molecular sejam desenvolvidas para modular a competência dos mosquitos para transmissão de certos vírus. As perspectivas para estudos proteômicos da interação alfavírus - *A. aegypti* incluem análise proteômica com marcação isobárica e enriquecimento de fosfopeptídeos, assim como a identificação das proteínas que se ligam a RNA (RBP, do inglês *RNA binding proteins*) durante os tempos iniciais de infecção. Possíveis experimentos de validação biológica para os dados de espectrometria processados no presente estudo envolvem nocaute de proteínas específicas, construção de clones infecciosos mutantes ou mesmo marcação de proteínas alvo por imunofluorescência.

Nas últimas décadas, a virologia tem se expandido rapidamente com os avanços das tecnologias de sequenciamento de genomas e *screening* proteômico (Zheng *et al.*, 2012). Juntos, os resultados obtidos nesse trabalho auxiliam a esclarecer aspectos da evolução viral e características dos vírus que circulam pelo Brasil, assim como da interação vírus-vetor. Além de ajudar na compreensão dos mecanismos de infecção por outros vírus, esses dados apontam novas direções e novos alvos a serem estudados nos próximos anos a respeito dos arbovírus e seus vetores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Ampudia, Y; Monsalve, D. M; Rodríguez, Y; Pacheco, Y; Anaya, J.M; Ramírez-Santana, C. 2018. Mayaro: an emerging viral threat? *Emerging Microbes and Infections*.
- Almukhtar, S; Gröndahl, M. 2016. Zika Virus. *Research Communications*.
- Alves, E. A; Guimarães, A. C. R. 2013. Capítulo 5: Cultivo Celular. Em: Molinaro, E. M; Caputo, L. F. G; Amendoeira, M. A. R. Rio de Janeiro, EPSJV, IOC. Em: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde.
- Anderson, J. D; Johansson, H. J; Graham, C. S; Vesterlund, M; Pham, M. T; Bramlett, C. S; Montgomery, E. N; Mellema, M. S; Bardini, L. R; Contreras, Z; Hoon, M; Bauer, G; Fink, K. D; Fury, B; Hendrix, K. J; Chedin, F; EL-Andaloussi, S; Hwang, B; Mulligan, M. S; Lethiö, J; Nolte, J. A. 2016. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear Factor-KappaB signalling. *Stem Cells*.
- Andrews, S; Krueger, F; Segonds-Pichon, A; Biggins, L; Krueger, C; Wingett, S. Babraham Bioinformatics. 2018. Disponível em <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acessado em 08/07/2018.
- Akhrymuk, I; Kulemzin; S. V; Frolova, E. I. 2012. Evasion of the innate immune response: the Old World Alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. *Journal of Virology*.
- Asara, J. M; Christofk, H. R; Freemark, L. M; Cantley, L. C. 2008. A label-free quantification method by MS/MS TIC compared to SILAC and spectral counting in a proteomics screen. *Proteomics*.
- Azevedo, R. S. S; Oliveira, C. S; Vasconcelos, P. F. C. 2015. Chikungunya risk for Brazil. *Revista de Saúde Pública*.

Barletta, A. B. F; Silva, M. C. N; Sorgine, M. H. F. 2012. Validation of *Aedes aegypti* Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasites and Vectors*.

Bhattacharya, S; Stewart, B. A; Niemeyer, B. A; Burgess, R. W; McCabe, B. D; Lin, P; Boulianne, G; O'Kane, C. J; Schwarz, T. L. 2002. Members of the synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) family in *Drosophila* are functionally interchangeable in vivo for neurotransmitter release and cell viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Bio-Manguinhos, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Rubéola: sintomas, transmissão e prevenção. Disponível em <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/rubeola-sintomas-transmissao-e-prevencao>>. Acesso em 04/01/2019.

Blair, C. D; Olson, K. E. 2015. The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses*.

BlastKOALA – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Disponível em <<https://www.kegg.jp/blastkoala/>>. Acesso em 04/12/2018.

Boletim Epidemiológico 9. 2018. Secretaria de Vigilância em Saúde, **Ministério da Saúde**. Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/06/2018-008-Publicacao.pdf>>. Acesso em 09/11/2018.

Brackney, D. E; Scott, J. C; Sagawa, F; Woodward, J. E; Miller, N. A; Schilkey, F. D; Mudge, J; Wilusz, J; Olson, K. E; Blair, C. D; Ebel, G. D. 2010. C6/36 *Aedes albopictus* Cells Have a Dysfunctional Antiviral RNA Interference Response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Brown, D. T; Hernandez, R. 2012. Infection of cells by alphaviruses. In: Brown, D. T; Hernandez, R. Viral Molecular Machines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.

Brown, J. R; Doolittle, W, F. 1997. Archea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.

Cavalheiro, M. G; Costa, L. S; Campos, H. S; Alves, L. E; Assunção-Miranda, I; Poian, A. T. 2016. Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*.

Cheng, G; Liu, Y; Wang, P; Xiao, X. 2017. Mosquito defense strategies against viral infection. *Trends in Parasitology*.

Chia, P.Y; Ng, M. N.L; Chu, J. J. H. 2010. Chikungunya fever: a review of a re-emerging mosquito-borne infectious disease and the current status. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*.

Copeland, A. M; Newcomb, W. W; Brown, J C. 2009. Herpes Simplex Virus Replication: Roles of Viral Proteins and Nucleoporins in Capsid-Nucleus Attachment. *Journal of Virology*.

Costa, V. G; Féres, C. R; Saivish, M. V; Gimaque, J. B. L; Moreli, M. L. 2017. Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans and Central Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*.

Da Costa Carvalho, M. G; Fournier, M. V. 1991. Effect of heat shock on gene expression of *Aedes albopictus* cells infected with Mayaro virus. *Research in Virology*.

Darriba, D; Taboada, G. L; Doallo, R; Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*.

Dengue: Vírus e Vetor. IOC Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em < <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>>. Acesso em 20/12/2018.

Emory College of Arts and Science: Mass Spectrometry Ionization Methods. Disponível em <<http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/mass-spectrometry-ionization.html>>. Acesso em 04/01/2019.

European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Phylogenetics: na Introduction. Disponível em <<https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/introduction-phylogenetics>>. Acesso em 26/12/2018.

Esposito, D. L. A; Fonseca, B. A. L; 2017. Will Mayaro vírus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *Brazilian Journal of Intefctious Diseases*.

Galán-Huerta, K. A; Rivas-Estilla, A. M; Fernández-Salas, I; Farfan-Ale, J. A; Ramos-Jiménez, J. 2015. Chikungunya virus: a general overview. *Medicina Universitaria*.

Ge, C; Wan, D; Wang, Z; Ding, Y; Wang, Y. 2008. A proteomic analysis of rive seedlings responding to 1,2,3,4-trichlorobenzene stress. *Journal of Environmental Sciences*.

Freiman, R. N; Herr, W. 1997. Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. *Genes & Development*.

Franz, A. W. E; Kantor, A. M; Passarelli, A. L; Clem, R. J. 2015. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses*.

Gelderblom, H. R. 2016. Capítulo 41: Structure and classification of viruses. Em Baron, S. *Medical Microbiology*.

Gething, M. J; Sambrook, J. 1992. Proten folding in the cell. *Nature Publishing Group*.

Gliedman, J. B; Smith, J. F; Brown, D. T. 1975. Morphogenesis of Sindbis virus in cultures Aedes albopictus cells. *Journal of Virology*.

Göertz, G. P; Vogels, C. B. F; Geertsema, C; Koenraadt, C. J. M; Pijlman, G, P. 2017. Mosquito co-infection with Zika and Chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Görzer, I; Guelly, C; Trajanoski, S; Puchhammer-Stöckl, E. 2010. The impact of PCR-generated recombination on diversity estimation of mixed viral populations by deep sequencing. *Journal of Virological Methods*.

Guindon, S; Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*.

Guindon, S; Dufayard, J. F; Lefort, V; Anisimova, M; Hordijk, W; Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*.

Hernandez, R; Brown, D. T; Paredes, A. 2014. Structural differences observed in arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus genera. *Advances in Virology*.

Higgs, S; Vanlandingham, D. 2015. Chikungunya virus and its mosquito vectors. *Vector Borne Zoonotic Diseases*.

Horzinek, M. C. 1997. The birth of virology. *Kluwer Academic Publishers*.

Illumina Sequencing Technology: Highest data accuracy, simple workflow and a broad range of applications. Disponível em <https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf>. Acesso em 26/12/2018.

Jaattela, M. 1999. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of Medicine*.

Jose, J; Taylor, A. B; Kuhna, R. J. 2017. Spatial and Temporal Analysis of Alphavirus Replication and Assembly in Mammalian and Mosquito Cells. *American Society for Microbiology*.

Kebarle, P; Verkerk, U. H. 2009. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrometry Reviews*.

Kelleher, N. L; Lin, H. Y; Valaskovic, G. A; Aaserud, D. J; Fridriksson, E. K; McLafferty, F. W. 199. Top Down versus Bottom Up characterization by tandem high-resolution mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*.

Kim, M. Y; Oglesbee, M. 2012. Virus-Heat Shock Protein Interaction and a Novel Axis for Innate Antiviral Immunity. *Cells*.

Koonin, E. V; Senkevich, T. G; Dolja, V. V. 2006. The ancient virus world and the evolution of cell. *BioMed Central*.

Kuadkitkan, A; Wikan, P; Fongsaran, C; Smith, D. 2010. Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology*.

Lavergne, A; Thoisy, B; Lacoste, V; Pascalis, H; Pouliquen, J.F; Mercier, V; Tolou, H; Dussart, P; Morvan, J; Talarmin, A; Kazanji, M. 2006. Mayaro virus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Research*.

Lee, R. C. H; Chu, J. J. H. 2015. Proteomics profiling of Chikungunya-infected *Aedes albopictus* C6/36 cells reveal important mosquito cell factors in virus replication. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Li, D; Liu, C. M; Luo, R; Sadakane, K; Lam, T. W. 2015. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*.

Li, D; Luo, R; Liu, C.M; Leung, C.M; Ting, H. F; Sadakane, K; Yamashita, H; Lam, T.W. 2016. MEGAHIT v1.0: A Fast and Scalable Metagenome Assembler driven by Advanced Methodologies and Community Practices. *Methods*.

Li, H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:1303.3997v2 [q-bio.GN].

Li, H; Handsaker, B; Wysoker, A; Fennell, T; Ruan, J; Homer, N; Marth, G; Abecasis, G; Durbin, R. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*.

Liang, G; Gao, X; Gould, E. A. 2015. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Nature Emerging Microbes and Infections*.

Lyski, Z. L. 2013. Arbovirus persistence and selection of persistent variants following chronic infection in aedine mosquitoes: a comparative study between *A. aegypti* and *A. albopictus* 30 days post infection with Sindibs Virus. *University of North Florida*.

McBride, C. S; Baier, F; Omondi, A. B; Spitzer, S. A; Lutomiah, J; Sang, R; Ignell, R; Vosshall, L. B. 2014. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature*.

McFarlane, M; Arias-Goeta, C; Martin, E; O'Hara, Z. 2014. Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Merkling, S. H; Gijs, J; Overheul; van Mierlo, J. T; Arends, D; Gilissen, C; van Rij, R. P. 2015. The heat shock response restricts virus infection in *Drosophila*. *Scientific Reports*.

Miller, M. J; Loaiza, J. R. 2015. Geographic expansion of the evasive mosquito *Aedes albopictus* across Panama – implications for control of Dengue and Chikungunya viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Napoleão-Pego, P; Gomes, L. P; Provance-Jr, D. W; De-Simone, S. D. 2014. Mayaro virus disease. *Journal of Human Virology and Retrovirology*.

Nayyar, N; Kaur, I; Malhotra, P; Bhatnagar, R. K. 2017. Quantitative proteomics of Sf21 cells during Baculovirus infection reveals progressive host proteome changes and its regulation by viral miRNA. *Nature Scientific Reports*.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). 2018. Emerging infectious diseases/pathogens. Disponível em <<https://www.niaid.nih.gov/research/emerging-infectious-diseases-pathogens>>. Acesso em 06/06/2018.

Nathanson, N. 2014. Capítulo 17: Viral neuropathogenesis. Em: Tselis, A; Booss, J. Handbook of Clinical Neurology. *Elsevier*.

NCBI Phylogenetic Resources: Maximum Likelihood. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/NAWBIS/Modules/Phylogenetics/phylo15.html>>. Acesso em 27/12/2018.

Nickel, W. 2003. The mystery of non-classical protein secretion: A current view on cargo proteins and potential export routes. *European Journal of Biochemistry*.

Nickel, W. 2010. Pathways of unconventional protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology*.

Novus Biologicals, a biotechne brand. HSC 70: a chaperone protein with diverse cellular functions. Disponível em <<https://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/hsc70-a-chaperone-protein-with-diverse-cellular-functions>>. Acesso em 20/02/2019.

Nozaki, T; Ali, V; Tokoro, M. 2005. Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Advances in Parasitology*.

Nunes, M. R. T; Faria, N. R; Vasconcelos, J M; Golding, N; Kraemer, M. U. G; Oliveira, L. F; Azevedo, R. S. S; Silva, D. E. A; Silva, E. V. P; Silva, S. P; Carvalho, V. L; Coelho, G. E; Cruz, A. C. R; Rodrigues, S. G; Vianez Jr, J. L. S. G; Nunes, B. T. D; Cardoso, J. F; Tesh, R. B; Hay, S. I; Pybus, O. G; Vasconcelos, P. F. C. 2015. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BioMed Central Medicine*.

Oliveira Mota, M. T; Ribeiro, M. R; Vedovello, D; Nogueira, M. L. 2015. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. *Future Virology*.

Oliveira Mota, M. T; Terzian, A. C; Silva, M. L. C. R; Estofolete, C; Nogueira, M. L. 2016. Mosquito-transmitted viruses: the great Brazilian challenge. *Brazilian Journal of Microbiology*.

PANDEM-SIM. Disease transmission methods. Disponível em <<http://pandemsim.com/methods.html>>. Acesso em 09/01/2019.

Parker, C.E; Warren, M.R; Mocanu, V. 2010. Capítulo 5: Mass Spectrometry for Proteomics. Em: Alzate, O. Editor. Neuroproteomics. Boca Raton (FL): *CRC Press/Taylor & Francis*.

Patramool, S; Surasombatpattana, P; Luplertlop, N; Seveno, M; Choumet, V. 2011. Proteomic analysis of an *Aedes albopictus* cell line infected with Dengue serotypes 1 and 3 viruses. *Parasites and Vectors*.

Pessoa, V. E; Silveira, D. A; Cavalcante, I. L; Florindo, M. I. 2013. *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da Dengue. *Entomotropica*.

Pitt, J. J. 2009. Principles and applications of liquid chromatography- mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clinical Biochemistry Reviews*.

Puttamalles, V. N; Sreenivasamurthy, S. K; Singh, P. K; Harsha, H. C; Ganjiwale, A; Broor, S; Pandey A; Narayana, J; Prasad, T. S. K. 2013. Proteomic profiling of serum samples from chikungunya-infected patients provides insights into host response. *Clinical Proteomics*.

Ravi, V; Desai, A; Madhusudana, S. N. Virology Manual of the Department of Neurovirology of Nimhans, Bangalore. Disponível em <www.ijmm.org/documents/virologymanual.doc>. Acesso em 04/01/2019.

Ritter, J. B; Wahl, A. S; Freund, S; Genzel, Y; Reichl, U. 2010. Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular metabolite profiling. *BMC Systems Biology*.

Roberts, G. C; Zothner, C; Remenyi, R; Merits, A; Stonehouse, N. J; Harris, M. 2017. Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in Chikungunya virus research. *Scientific Reports*.

Roepstorff, P. 2012. Mass spectrometry based proteomics, background, status and future needs. *Protein & Cell*.

Scigelova, M; Marakov, A. 2006. Orbitrap mass analyzer – overview and applications in proteomics. *Practical Proteomics*.

SecretomeP 2.0 Server. Department of Bio and Health Informatics. DTU Bioinformatics. Disponível em <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>>. Acesso em 25/10/2018.

Several types of mass analyzer – Creative Proteomics. Disponível em <<https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/several-types-of-mass-analyzer/>>. Acesso em 04/08/2018.

SignalP 4.1 Server. Department of Bio and Health Informatics. DTU Bioinformatics. Disponível em <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>>. Acesso em 25/10/2018.

Singh, A; Kumar, A; Yadav, R; Uversky, V. N; Giri, R. 2018. Deciphering the dark proteome of Chikungunya vírus. *Scientific Reports*.

Simmons, C. P; Farrar, J. J; Chau, N. V; Wills, B. 2012. Dengue. *New England Journal of Medicine*.

Smith, K. A. 2012. Louis Pasteur, the father of Immunology? *Frontiers in Immunology*.

SourceForge: BBMap. Disponível em <<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>>. Acesso em 06/06/2018.

TCIDCalculator.xls – TCID 50 Calculator Marcos Binder. Disponível em <<https://www.coursehero.com/file/32643536/TCID50Calculatorxls/>>. Acesso em 13/02/2018.

Theodorakis, N. G; Morimoto, R. I. 1987. Posttranscriptional regulation of hsp70 expression in human cells: Effects of heat shock, inhibition of protein synthesis, and adenovirus infection on translation and mRNA stability. *Molecular and Cellular Biology*.

Thomas, E. 2001. Em: Brenner, S; Miller, J. H. Encyclopedia of Genetics. *Elsevier Science Inc*.

Tsetsarkin, K. A; Chen, R; Sherman, M. B; Weaver, S. C. 2011. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Current Opinion in Virology*.

Tsetsarkin, K.A; Weaver, S.C. 2011. Sequential Adaptive Mutations Enhance Efficient Vector Switching by Chikungunya Virus and Its Epidemic Emergence. *PLoS Pathogens*.

Välakangas, T; Suomi, T; Elo, L. L. 2017. A comprehensive evaluation of popular proteomics software workflows for label-free proteomic quantification and imputation. *Briefings in Bioinformatics*.

Vector Base. Bioinformatics Resource for Invertebrate Vectors of Human Pathogens. *Aedes aegypti*. Disponível em <<https://www.vectorbase.org/organisms/aedes-aegypti>>. Acesso em 20/06/2018.

Viral Zone: SIB *Swiss Institute of Bioinformatics*. Disponível em <www.Expasy.org/viralzone>. Acesso em 15/06/2018.

Vogel, J. L; Kristie, T. M. 2013. The Dynamics of HCF-1 Modulation of Herpes Simplex Virus Chromatin during Initiation of Infection. *Viruses*.

Walker, T; Jeffries, C. L; Mansfield, K. L; Johnson, N. 2014. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasites and Vectors*.

Wang, W; Li, K; Chen, Y; Lai, F; Fu, Q. 2015. Identification and Function Analysis of *enolase* Gene *NlEno1* from *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera : Delphacidae). *Journal of Insect Science*.

Weaver, S. C. 2013. Urbanization and geographical expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies to prevent. *Trends in Microbiology*.

Wintachai, P; Wikan, N; Kuadkitkan, A; Jaimipuk, T; Ubol, S; Pulmanausahakul, R; Auewarakul, P; Kasinrerak, W; Weng, W; Panyasrivanit, M; Paemanee, A; Kittisenachai, S; Roytrakul, S; Smith, D. 2012. Identification of prohibitin as Chikungunya virus receptor protein. *Journal of Medical Virology*.

Xin, Q.L; Deng, C.L; Chen, X; Wang, J; Wang, S.B; Wang, W; Deng, F; Zhang, B; Xiao, G; Zhanga, L.K. 2017. Quantitative proteomic analysis of mosquito C6/36 Cells reveals host proteins involved in Zika virus infection. *Journal of Virology*.

Yoshida, H. 2009. ER stress response, peroxisome proliferation, mitochondrial unfolded protein response and Golgi stress response. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*.

Young, R. A. 1990 Stress proteins and immunology. *Annual Review of Immunology*.

Yu, L. R; Stewart, N. A; Veenstra, T, D. 2010. Capítulo 8 - Proteomics: The Deciphering of the Functional Genome. Em: Essentials of genomic and personalized medicine. Editado por: Gingsburg, G. S. Willard, H. F. *Elsevier*.

Yuan, K., Yuan, F.-H., He, H.-H., Bi, H.-T., Weng, S.-P., He, J.-G., Chen, Y.-H. 2017. Heat shock 70 kDa protein cognate 5 involved in WSSV toleration of *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*.

Zheng, J; Tan, B. H; Sugrue, R; Tang, K. 2012. Current approaches on viral infection: proteomics and functional validations. *Frontiers in Microbiology*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Representação dos ciclos selvático e urbano de um arbovírus.	9
Figura 1.2. À esquerda, <i>A. aegypti formosus</i> . À direita, <i>A. aegypti</i>	11
Figura 1.3. Caminho que os vírus percorrem dentro do mosquito até estarem disponíveis para infectar outro hospedeiro.	12
Figura 1.4. Classificação de Baltimore.	13
Figura 1.5. Vírion e organização genômica dos vírus da família <i>Togaviridae</i>	14
Figura 1.6. Ciclo replicativo dos alfavírus.	15
Figura 1.7. Países e territórios onde casos de infecção por CHIKV foram notificados até março de 2018.	16
Figura 1.8. Área de distribuição do MAYV.	17
Figura 1.9. Fluxo de trabalho do sequenciamento por síntese Illumina®.	21
Figura 1.10. Esquema do funcionamento de uma fonte ESI.	23
Figura 1.11. Modelo de um analisador de massa do tipo Orbitrap.	24
Figura 2.1. Eletroforese em gel de agarose da amplificação de isolados de CHIKV a partir do RNA extraído de células Vero	35
Figura 2.2. Microscopia ótica de cultura de células C6/36 infectadas em formação de sincícios	35
Figura 2.3. Árvore filogenética baseada nas ORFs concatenadas de isolados CHIKV	38
Figura 3.1. Eletroforese em gel de agarose da amplificação do Envelope de MAYV a partir do RNA extraído de células Vero.	50
Figura 3.2. Efeito citopático do MAYV em célula Vero.	51
Figura 3.3. Células Aag-2 <i>mock</i> (A) e infectadas com MAYV em formação de sincícios com 3dpi (B).	51

Figura 3.4. Cinética de crescimento de MAYV em células Aag-2.	52
Figura 3.5. PCA do agrupamento das triplicatas de células Aag-2 dentro de cada condição do experimento.	53
Figura 3.6. Número total de proteínas identificadas do MAYV (vermelho) e de células Aag-2 (azul) ao longo dos tempos de infecção.	54
Figura 3.7. Número total de proteínas identificadas de células Aag-2 ao longo dos tempos de infecção por MAYV de acordo com suas funções moleculares (A), processos biológicos (B) e componentes celulares (C) a que pertencem.	55
Figura 3.8. Proteínas diferencialmente abundantes nos três tempos de coleta das células Aag-2 infectadas por MAYV.	56
Figura 3.9. Abundância relativa de proteínas preditas de células Aag-2 secretadas por vias não convencionais (SecretomeP) e por vias clássicas (SignalP) ao longo dos tempos de infecção por MAYV.	58
Figura 3.10. Proteínas diferencialmente abundantes associadas às vias de sinalização da glicólise e da gliconeogênese.	60
Figura 3.11. Análise STRING das interações proteína-proteína entre as proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massas de células Aag-2 infectadas por MAYV.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Ciclo para amplificação da região E2-E3 do gene do Envelope de CHIKV.....	32
Tabela 2.2. Oligonucleotídeos específicos usados para amplificação parcial do genoma do vírus CHIKV.	32
Tabela 3.1. Ciclo para amplificação da região E2-E3 do gene do Envelope de MAYV.	45
Tabela 3.2. Oligonucleotídeos específicos usados para amplificação parcial do genoma do vírus MAYV.	45
Tabela 3.3. Tempos de coleta das células Aag-2 para espectrometria de massas.	47

SÍMBOLOS E ABREVIÇÕES

°C	graus <i>Celsius</i>
µg	micrograma
µl	microlitro
6K	proteína viral estrutural
Å	angstrom
<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>A. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
A226V	mutação de substituição da alanina no nucleotídeo 226 por uma valina
<i>AaegOr4</i>	receptor olfativo específico para cheiro humano
Aag-2	linhagem celular de <i>Aedes aegypti</i>
ASFV	<i>African swine fever virus</i>
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	enzima produtora de ATP
C	proteína viral do capsídeo
C6/36	linhagem celular de <i>Aedes albopictus</i>
Cap 5'	estrutura que protege o RNA mensageiro
cauda poliA	série de adeninas no final do RNA mensageiro
cDNA	DNA sintetizado a partir de uma única fita de RNA
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CO ₂	dióxido de carbono
D, L e N	<i>linhagens do Mayaro virus</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
Dicer2	enzima envolvida na via de RNA interferente
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleosídeo
dpi	dias pós-infecção
DTT	ditiotreitol
E1, 2, 3	proteínas virais de envelope
ECSA	linhagem de <i>Chikungunya virus</i> , <i>East-Central-South African</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EEEV	<i>Eastern equine encephalitis virus</i>
ENOPHE1	enolase fosfatase e1
ESI	do inglês, <i>electrospray ionization</i>

<i>et al</i>	do latim, <i>et alii</i>
FBS	do inglês, <i>fetal bovine serum</i>
FTICR	do inglês, <i>fourier-transforma ion cyclotron resonance</i>
g	gravidade
h	hora
HCFC1	fator de transcrição do hospedeiro C1
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
hpi	horas pós-infecção
HSP	do inglês, <i>heat shock protein</i>
IOC-Fiocruz	Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz
kb	quilobase
KEGG	do inglês, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
L210Q	mutação de substituição da leucina no nucleotídeo 210 por uma glutamina
LACEN-DF	Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
LC	cromatografia líquida
<i>m/z</i>	razão massa/carga
MALDI	do inglês, <i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
MAYV	<i>Mayaro virus</i>
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
M-MLV	transcriptase reversa
MOI	do inglês, <i>multiplicity of infection</i>
MS/MS	espectrometria de massas <i>in tandem</i>
MS1	primeiro estágio de análise de massas na espectrometria
NCBI	do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
nsP	proteína viral não-estrutural
ORF	do inglês, <i>open reading frame</i>
PBS	tampão fosfato salino
PCA	análise de componente principal
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PenStrep	penicilina e streptomina
PFU	do inglês, <i>plaque forming units</i>
pH	potencial hidrogeniônico
primer	oligonucleotídeo
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA

RNA	ácido ribonucleico
RNAi	via de RNA interferente
RNase	enzima que cliva moléculas de RNA
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	do inglês, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RV	<i>Rubella virus</i>
seg	segundo
SPDV	<i>Salmon pancreatic disease virus</i>
spp.	espécies
STRING	do inglês, <i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
T 25	frasco com capacidade de 25 cm ²
T 75	frasco com capacidade de 75 cm ²
TCID50	do inglês, <i>tissue culture infectious dose</i> (para infectar 50% das células)
TEAB	bicarbonato de trietilamônio
Tm	temperatura de anelamento
TOF	do inglês, <i>time of flight</i>
U/ml	unidade por mililitro
UniProt	banco de dados de proteínas
v.	versão
VAMP	do inglês, <i>vesicle-associated protein</i>
VP16	proteína viral
YFV	<i>Yellow fever virus</i>

ANEXO 1

- AUTHOR MANUSCRIPT -

Archives of Virology

Annotated Sequence Records

Authors

A. F. Vasconcellos¹; J. M. F. Silva¹; A. S. de Oliveira¹; P. S. Prado²; T. Nagata¹; R. O. Resende¹ (✉)

¹Departamento de Biologia Celular, Bloco K Térreo, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília Campus Darcy Ribeiro. CEP: 70910-970. Brasília, DF, Brazil.

²Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). Setor de Grandes Áreas Norte, Quadras 601, Blocos Oe P. CEP: 70830-010. Brasília, DF, Brazil.

Email: rresende@unb.br

Phone: 55 - 61 - 98162 9797

Genome sequences of Chikungunya virus isolates circulating in midwestern Brazil

Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is a reemerging arbovirus of the family *Togaviridae* that causes the CHIKV fever, a disease that can extend from weeks to years depending on the clinical signs of arthralgia. CHIKV is mainly transmitted by *Aedes aegypti*, having possibly reached the Americas in 2013 and causing an outbreak in Brazil in 2015. So far, two CHIKV evolutionary lineages have been reported in Brazil: the Asian and the East-Central-South African (ECSA) lineages. In this study, six CHIKV isolates circulating in midwestern Brazil (Mato Grosso state) were isolated from patient sera and had their complete genomes sequenced by a high-throughput sequencing platform. All of these isolates shared high nucleotide identity with CHIKV isolates from the northeastern Brazil and belong to the ECSA lineage. Additionally, our CHIKV isolates do not contain the A22V or the L210Q mutations that increase CHIKV transmissibility by *A. albopictus*, suggesting that CHIKV isolates circulating in midwestern Brazil are predominantly transmitted by *A. aegypti*.

Text

Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus that belongs to the arthritic group of viruses from genus *Alphavirus* in the family *Togaviridae* [1]. CHIKV fever can cause symptoms such as rash, fever and a severe joint pain that can last weeks to years [2, 3, 4]. Its main vector in the urban cycle is *Aedes aegypti*, which is adapted to bite preferentially humans and it is well established in all Brazilian states [5, 6].

CHIKV has a positive ssRNA genome with 5' cap and poly A tail. This viral genome is about 12kb long and encodes two polyproteins that, are cleaved to structural (CP, E3, E2, 6k, E1) and non-structural proteins (nsP1- nsP4) by viral and host proteases in addition to autocatalytic capsid cleavage [7]. While the non-structural proteins are directly translated, the structural proteins are produced from a sub-genomic RNA [2].

An autochthonous transmission of CHIKV in the Americas was first reported in the Caribbean Islands, 2013 [5]. In Brazil, a severe CHIKV outbreak occurred in 2015, with more than a million cases distributed throughout the major part of the country [8]. Upon phylogenetic studies, two evolutionary lineages of CHIKV have been identified in Brazil, the Asian and the East-Central-South African (ECSA) lineages [9]. The Asian lineage has probably reached northern Brazil by travelers from the Caribbean, while the ESCA lineage was first identified in the Northeast [8]. The majority of CHIKV isolates from Brazil with genomes available belong to these regions.

In this study, we sequenced the genome of six CHIKV isolates from Cuiabá, Mato Grosso state, Brazil. This is the first report of complete genome of CHIKV isolates circulating in midwestern Brazil. These viruses were isolated from patient sera stored in the Central Public Health Laboratory of the Federal District. These six serum samples were collected in 2017 and were diagnosed as positive for CHIKV by RT-PCR. An amount of 50µl of each patient serum was used to infect 500µl of Vero cells in DMEM medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 10% FBS, penicillin/streptomycin 100 U/ml and HEPES 25mM at 37°C. To confirm the presence of CHIKV, total RNA of Vero cells was extracted using TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) followed by RT-PCR with the primers CGAAGAGTGGAGTCTKGCATYCCAG and GCCTCYTGGTATGTGGCCGCTTTAGC that amplified the E3-E2 genes (about 1,5kb). In parallel, 3 days post infection (dpi) and observation of cytopathic effects, the supernatants were collected and used to infect C6/36 cells in T75 flasks with TC100 medium 10%FBS at 28°C. For semi-purification of CHIKV, the C6/36 supernatants were collected at 3dpi and centrifuged at 22,000 rpm for 2 hours on a 25% sucrose cushion. Then, total RNA was extracted with the QIAmp® Viral RNA Mini Kit and sent for Illumina – Shotgun sequencing using the Truseq RNA Library Preparation kit at Macrogen Inc.® (Seoul, South Korea).

Quality evaluation of the sequence data was performed with FastQC [10]. Adapter and low quality sequences were trimmed with the program BBDuk from the BBTools package v38.20 [11]. *De novo* assembly was performed with MEGAHIT v1.1.3 [12, 13]. To ensure the high quality of CHIKV genome sequences, reads were aligned to the assembled contigs with BWA v0.7.17 [14] and the resulting SAM file processed with SAMtools v1.8

[15]. This analysis revealed the presence of artifactual chimeric reads at the 5' and 3' ends of all genome sequences, which are very likely to be the result of template switch activity of the RT enzymes [16]. These reads were then removed, and the 5' and 3' end sequences of the CHIKV genome were assembled based on the publicly available CHIKV genomes (GenBank) sequenced by the Sanger method.

The genomes of the six CHIKV isolates were 11,811 nt long and shared 99.9% identity. Their predicted non-structural and structural polyprotein open reading frames (ORFs) were 7,425 and 3,474 nt long, respectively. None of them contains the A226V or the L210Q mutations that increase CHIKV transmissibility by *A. albopictus* without impairing *A. aegypti* vector competence [9]. This can suggest that CHIKV isolates characterized in this work are transmitted predominantly by *A. aegypti* in the Mato Grosso state. The CHIKV genome sequences, named MT01 to MT06, were deposited on GenBank under accession numbers MH823663 to MH823668, sequentially.

To better understand the phylogenetic relationship of CHIKV isolates in midwestern Brazil, a tree was built with selected CHIKV isolates that represent the four major lineages (**Figure 1**). Thus, this analysis includes isolates from Brazil, Caribbean Islands and other African and Asian countries whose sequences had their accession number extracted from Nunes *et al* (2015). The tree was based on the concatenated CHIKV ORFs and was built by maximum likelihood with the program PhyML v3.0 [17]. The best-fit nucleotide substitution model was selected with jModelTest v2.1.10 [18, 19]. Our CHIKV isolates clustered with CHIKV from northeastern Brazil, most likely the entrance spot of the ESCA lineage in Brazil [4]. Moreover, all six isolates from Mato Grosso form a monophyletic group, indicating that they have the same origin. We cannot rule out, however, the absence of other CHIKV lineages circulating in this region.

Ethical approval: ‘Evolução molecular dos vírus Zika, Dengue e Chikungunya.’
Certificate of Presentation for Ethical Appreciation number: 56459616.5.0000.0029.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial support: CAPES, CNPq, FAP-DF.

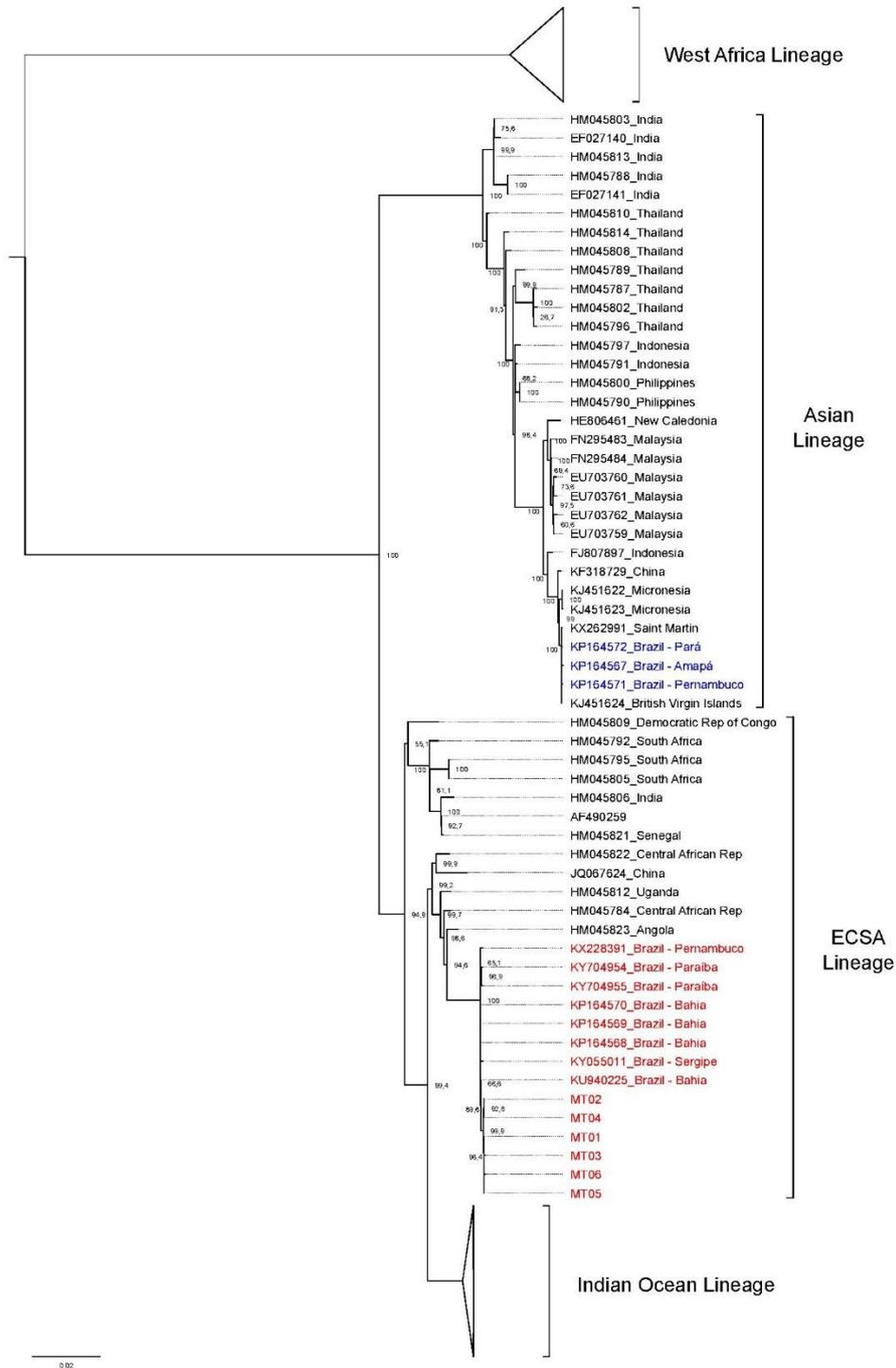


Figure 1. Phylogenetic tree based on the concatenated ORFs of CHIKV isolates. The four main CHIKV lineages are indicated by brackets. CHIKV isolates from Brazil belonging to the ECSA lineage are written in red, while those from the Asian lineage, but circulating in Brazil, are written in blue.

References

1. Chia, P.Y; Ng, M. N.L; Chu, J. J. H. 2010. Chikungunya fever: a review of a re-emerging mosquito-borne infectious disease and the current status. ***Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.***
2. Galán-Huerta, K. A; Rivas-Estilla, A. M; Fernández-Salas, I; Farfan-Ale, J. A; Ramos-Jiménez, J. 2015. Chikungunya virus: a general overview. ***Medicina Universitaria.***
3. Hawman, D. W; Stoermer, K A; Montgomery, S. A; Pal, P; Oko, L; Diamond, M. S. Morrison, T. E. 2013. Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response. ***Journal of Virology.***
4. Puttamalles, V. N; Sreenivasamurthy, S. K; Singh, P. K; Harsha, H. C; Ganjiwale, A; Broor, S; Pandey A; Narayana, J; Prasad, T. S. K. 2013. Proteomic profiling of serum samples from chikungunya-infected patients provides insights into host response. ***Clinical Proteomics.***
5. Azevedo, R. S. S; Oliveira, C. S; Vasconcelos, P. F. C. 2015. Chikungunya risk for Brazil. ***Revista de Saúde Pública.***
6. McBride, C. S; Baier, F; Omondi, A. B; Spitzer, S. A; Lutomia, J; Sang, R; Ignell, R; Vosshall, L. B. 2014. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. ***Nature.***
7. Solignat, M; Gay, B; Higgs, S; Briant, L; Devaux, C. 2009. Replication cycle of Chikungunya: a re-emerging arbovirus. ***Virology.***
8. Figueiredo, L. T. M. 2017. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.***
9. Nunes, M. R. T; Faria, N. R; Vasconcelos, J M; Golding, N; Kraemer, M. U. G; Oliveira, L. F; Azevedo, R. S. S; Silva, D. E. A; Silva, E. V. P; Silva, S. P; Carvalho, V. L; Coelho, G. E; Cruz, A. C. R; Rodrigues, S. G; Vianez Jr, J. L. S. G; Nunes, B. T. D; Cardoso, J. F; Tesh, R. B; Hay, S. I; Pybus, O. G; Vasconcelos, P. F. C. 2015. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. ***BioMed Central Medicine.***

10. Andrews, S; Krueger, F; Segonds-Pichon, A; Biggins, L; Krueger, C; Wingett, S. Babraham Bioinformatics. 2018. Retrieved from <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
11. SourceForge: BBMap. Retrieved from <https://sourceforge.net/projects/bbmap/>.
12. Li, D; Liu, C. M; Luo, R; Sadakane, K; Lam, T. W. 2015. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*.
13. Li, D; Luo, R; Liu, C.M; Leung, C.M; Ting, H. F; Sadakane, K; Yamashita, H; Lam, T.W. 2016. MEGAHIT v1.0: A Fast and Scalable Metagenome Assembler driven by Advanced Methodologies and Community Practices. *Methods*.
14. Li, H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:1303.3997v2 [q-bio.GN].
15. Li, H; Handsaker, B; Wysoker, A; Fennell, T; Ruan, J; Homer, N; Marth, G; Abecasis, G; Durbin, R. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*.
16. Görzer, I; Guelly, C; Trajanoski, S; Puchhammer-Stöckl, E. 2010. The impact of PCR-generated recombination on diversity estimation of mixed viral populations by deep sequencing. *Journal of Virological Methods*.
17. Guindon, S; Dufayard, J. F; Lefort, V; Anisimova, M; Hordijk, W; Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*.
18. Guindon, S; Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*.
19. Darriba, D; Taboada, G. L; Doallo, R; Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr Renato Resende, pela oportunidade, pela confiança e por todo o apoio durante o trabalho, ainda que em épocas de erros e resultados negativos. Agradeço por esses 8 anos de orientação, desde o primeiro PIBIC.

Aos meus pais, Valéria e Antonio Carlos, pela dedicação para a minha formação como indivíduo, pelo amor, pelo apoio moral e material ao longo desses anos para que eu pudesse alcançar os meus objetivos. Aos meus irmãos, Victor Hugo e Anna Clara, que nunca souberam com o que eu estava trabalhando, mas estavam sempre disponíveis para conversar, ver um filme e aliviar o cansaço. A todos os familiares que se importaram com essa jornada.

À minha namorada, Giovanna, que inúmeras vezes ouviu minhas reclamações, me acalmou em momentos de desespero, que foi meu suporte técnico, minha carona, que foi companhia. Aos amigos de apartamento, Jorge, Felipe e Sara, pelas conversas sérias, pelas conversas jogadas fora, pelas latinhas amigas, pelo apoio e companheirismo. Aos amigos Giulianna e Stevan, que também tiveram que escutar alguma notícia boa ou reclamação do laboratório.

A todos os meus BioAmigos (todos mesmo), porque o que a Biologia, os churrascos dos calouros, as festas, os Interbios, as saídas de campo, os almoços de domingo, os bares de litrão barato, o desespero com a vida acadêmica, os intercâmbios, as decepções amorosas e os recomeços uniram, ninguém separa. Em especial: Rafaela, Igor, Larissa, Isabel, Camila, Yasmin, Vinícius, Vanessa, Marcela, Marina, Lucas, Cristiana, Letícia, Lorrane e Victor.

Aos meus orientadores do dia-a-dia, Athos, Fabrício e Leonardo, pela paciência e pelos ensinamentos. Aos meus parceiros de trabalho, João Marcos e Samuel, por toda a colaboração tanto com o trabalho quanto pelo meu crescimento como cientista. Aos professores da UnB Tatsuya Nagata, Bergmann Morais, Sébastien Charneau, Wagner Fontes, Marcelo Valle e Anamélia Bocca pelo apoio nos projetos, pela disponibilização de equipamentos e também de um tempinho para tirar dúvidas. A todas as “Renatetes” e colegas de outros laboratórios, pelo apoio e companhia diária. Karina, Rayane, Jamile, Mariana, Letícia, Isabela, Suzane, Jefferson e Roberto. Aos colegas do novo laboratório, Lucão, Renata, Marcos e Reynaldo. Ao LACEN-DF e ao IOC- Fiocruz –RJ, pelas amostras virais cedidas e, ao pesquisador Gorben Pijlman da Wageningen University and Research, pelas células.

Ao CNPq, à CAPES, à FAP-DF, à Finep e à UnB pelos recursos financeiros, materiais, laboratórios e equipamentos disponíveis para a realização do meu projeto.

