



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLÉCULAR

**Produção de *Virus Like Particles* do vírus da febre amarela e
do vírus Mayaro em células de inseto**

Bruno Milhomem Pilati Rodrigues

Brasília

2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLÉCULAR

**Produção de *Virus Like Particles* do vírus da febre amarela e do
vírus Mayaro em células de inseto**

Bruno Milhomem Pilati Rodrigues

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular

Orientador: Bergmann Morais Ribeiro

Coorientador: Fabricio da Silva Morgado

Brasília

2020

Resumo

Baculovírus são um grupo de vírus extensamente estudados utilizados como controle biológico de pragas agrícolas, e como ferramenta biotecnológica para expressão de proteínas heterólogas. O vírus infecta naturalmente e exclusivamente insetos, sendo a sua manipulação laboratorial extremamente segura. Sua utilização como vetor para expressão em células de inseto apresenta diversas vantagens, como a capacidade do genoma viral de comportar a inserção de grandes segmentos de DNA de interesse, assim como a ocorrência de modificações pós-traducionais mais complexas ocorridas nas células eucarióticas. Essa tecnologia possui ampla utilização na indústria para produção de proteínas antigênicas de diversos patógenos, com aplicações vacinais e de diagnóstico. Uma estratégia atualmente muito promissora para desenvolvimento de vacinas é a produção e utilização de VLPs (“*Virus like particles*”). VLPs são partículas que utilizam da capacidade de automontagem de proteínas estruturais de vírus para formação de estruturas que se assemelham a estrutura de partículas virais, porém não possuem material genético e, conseqüentemente, não são capazes de ocasionar infecção. O sistema de expressão usando baculovírus em células de inseto já foi utilizado para produção de VLPs de diversos vírus, o que resultou no desenvolvimento de vacinas comerciais contra o papiloma vírus humano. Neste trabalho, foram construídos baculovírus recombinantes como ferramentas para expressão de proteínas, e produção de VLPs de dois vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus): vírus da febre amarela (“*Yellow fever virus*” – YFV), membro do gênero *flavivirus*, e do vírus Mayaro (MAYV), membro do gênero *alphavirus*. No capítulo 1 é descrita a construção de baculovírus utilizando de estratégias de controle temporal da expressão gênica, para coexpressão de proteínas não-estruturais (proteínas NS2A, NS2B e NS3), e proteínas estruturais (C, prM e E) do YFV. Isso foi feito com o objetivo de induzir a maturação das proteínas estruturais virais, e formação de estruturas complexas. A infecção dos baculovírus recombinante em células Tn5B levou a indução de fusão de membranas celulares bastante evidente, efeito citopático claro conhecido da atividade da proteína de envelope viral E de flavivirus. Essa indução de fusão de membranas foi exacerbada pela coexpressão de ambas as proteínas não-estruturais e estruturais, se comparada a expressão individual das proteínas estruturais, indicando importante papel de complementação para produção de proteínas maduras com alta atividade fusogênica. Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram a formação de partículas que se assemelham a vírions do YFV em estruturas membranosas citoplasmáticas, e da presença de partículas no meio de cultura de células infectadas. O capítulo 2 descreve a construção de baculovírus recombinantes contendo genes estruturais do MAYV (C, E3, E2, 6k e E1). Foi confirmada a expressão das proteínas em células de inseto por *Western blot*, mostrando o processamento da poliproteína e liberação da proteína de envelope E1 clivada, assim como da proteína de capsídeo C. A localização celular destas proteínas virais foi analisada por imunomarcagem e microscopia de fluorescência, indicando a concentração da proteína E1 na membrana celular, e da proteína C no núcleo. Análise do meio de cultura de cultura de células infectadas por contrastação negativa em MET, após ultracentrifugação, indicou a presença de partículas com as dimensões esperadas de vírions de alphavirus. Este trabalho reforça a flexibilidade do sistema de expressão de baculovírus em células de inseto para produção de antígenos de arbovírus emergentes que podem ter grande impacto na saúde pública.

Palavras-chave: baculovírus, flavivirus, vírus da febre amarela, alphavirus, vírus Mayaro, arbovírus, VLPs, *virus like particles*.

Abstract

Baculoviruses are a group of viruses extensively studied and utilized as biological control agents of agricultural pests, as well as biotechnological tools for the expression of heterologous proteins. Baculoviruses naturally and exclusively infect only insects, making their laboratory manipulation extremely safe. Its use as a vector for the expression of proteins in insect cells provides several advantages, such as the capacity of the large viral genome to tolerate the insertion of large DNA segments of interest, and the occurrence of more complex post-translational modifications that occur in eukaryotic cells. This technology has ample use in industry for the production of antigenic proteins of several pathogens, with diagnostic and vaccine applications. One strategy that is currently very promising for the development of vaccines is the production and utilization of VLPs ("Virus like particles"). VLPs are particles that utilize the capacity of self-assembly of viral structural proteins, to form structures that closely resemble that of viral particles, but do not possess any viral genetic material, and are therefore unable to cause infection. The baculovirus in insect cells expression system has been used for the production of VLPs of several viruses, with commercial vaccines against the human papilloma virus already available. In this work, recombinant baculoviruses were constructed as tools for the expression of proteins and formation of VLPs of two arthropod borne viruses (arboviruses): the yellow fever virus (YFV), member of the genus *flavivirus*, and of Mayaro virus (MAYV), member of the genus *alphavirus*. In chapter 1 it is described the construction of recombinant baculoviruses utilizing strategies for temporal control of the gene expression, for the co-expression of non-structural proteins (NS2A, NS2B and NS3), and structural proteins (C, prM and E) of YFV. This was done with the goal of inducing the maturation of viral structural proteins, and the formation of complex structures. Recombinant baculoviral infection of Tn5B cells lead to the induction of very evident membrane fusion, a clear known cytopathic effect of the activity of the flavivirus envelope protein E. This induction of membrane fusion was severely exacerbated by the co-expression of both the non-structural and structural proteins, when compared to the individual expression of structural proteins, indicating the complementation role for the production of mature proteins with high fusogenic activity. Transmission electron microscopy (TEM) analysis revealed the formation of particles that resemble YFV virions in cytoplasmic membranous structures, and the presence of particles in the infected cells culture medium. Chapter 2 describes the construction of recombinant baculoviruses containing the structural genes of MAYV (C, E3, E2, 6k and E1). Protein expression in insect cells was confirmed by Western blotting, showing the processing of the polyprotein and production of cleaved E1 envelope protein, as well as the capsid protein C. Cellular localization of these proteins were analyzed by immunostaining and fluorescence microscopy, indicating the concentration of E1 protein in the cellular membrane and, the C protein in the nucleus. Infected cell culture medium analyzed by negative staining, after ultracentrifugation, indicated the presence of particles with the dimensions expected for alphavirus virions. This work reinforces the flexibility of the baculovirus in insect cells expression system for the production of antigens of emerging arbovirus that pose a severe public health risk.

Keywords: Baculovirus, flavivirus, yellow fever virus, alphavirus Mayaro virus, arbovirus, VLPs, *virus like particles*.

Agradecimentos

Primeiramente gratidão imensa pela minha família e seu apoio fundamental ao longo desta jornada. A minha mãe Arlete, meu pai Raul e meu irmão Lucas, obrigado pelo amor incondicional, pelos conselhos e pela compreensão.

Aos meus amigos e amigas sempre presentes e sempre importantes. Ter vocês ao meu lado, mesmo que alguns de longe, me traz alegria sem igual. Espero que algum dia consiga recompensar os anos de convivência e amor que me proporcionam.

Aos meus colegas e minhas colegas de trabalho do grupo de baculovírus e da virologia da UnB. Sou muito grato pelas dicas e trocas enriquecedoras, pela disposição e disponibilidade de ajudar sempre. Vocês são grandes profissionais e seres humanos, muita gratidão. Ao meu coorientador Fabrício Morgado, fonte de paciência e atenção infindável. Sua orientação me ajudou a superar momentos de dúvidas e dificuldades, sem seu papel como guia este projeto não teria sido possível. Ao meu orientador Bergmann Morais Ribeiro, profissional exemplar a quem sempre serei grato pela confiança depositada em mim e em meu trabalho. Me esforço a cada dia para que essa confiança seja justificada. Agradeço aos colegas do laboratório de Imunologia Aplicada da UnB, a professora Anamélia Bocca e seu aluno Stephan pelo conhecimento e ajuda no desenvolvimento dos ensaios imunológicos.

Agradeço a oportunidade proporcionada pela Universidade de Brasília, a CAPES, e o CNPq. Espero que continuem guiando o desenvolvimento do país em meio a tantos retrocessos.

Em memória do meu querido avô Raul e seu amor pelo mundo
natural

Life is a process, not a substance, and it is necessarily temporary. We are not the reason for the existence of the universe, but our ability for self-awareness and reflection makes us special within it.

Sean Carroll - The Big Picture

Índice

Resumo	iii
Abstract	iv
Agradecimentos	v
Índice de figuras e tabelas	xi
Abreviaturas e símbolos	xiii
Introdução Geral	16
1. Baculovírus	16
1.1 Ciclo de infecção.....	16
1.2 Baculovírus como vetor de expressão heteróloga.....	18
2. Virus Like Particles – Produção, estrutura e aplicações.....	19
Capítulo I – Produção de VLPs do vírus da febre amarela em células de inseto	21
1. Introdução	21
1.1 A febre amarela	21
1.2 Doença e diagnóstico.....	21
1.3 Vacinas preventivas.....	23
1.4 Transmissão e epidemiologia.....	23
1.4.1 Epidemia brasileira de 2016-2018.....	25
1.5 Vírus da febre amarela – genoma, proteínas virais e suas funções	27
1.6 Ciclo infeccioso e replicação	30
2. Objetivo	32
2.1 Objetivos específicos.....	32
3. Material e Métodos	33
3.1 Vírus e células.....	33

3.2 Construção dos plasmídeos vetores para expressão de proteínas estruturais e não estruturais do vírus da febre amarela	34
3.2.1 Construção do plasmídeo vetor contendo promotores de baculovírus	34
3.2.2 Construção dos plasmídeos contendo os genes estruturais e não estruturais do YFV ..	37
3.3 Construção dos vírus recombinantes para expressão de proteínas do YFV: transfecção, amplificação e titulação viral	40
3.4 Expressão de antígenos da febre amarela para produção de anticorpos policlonais	42
3.4.1 Construção do plasmídeo contendo regiões de proteínas estruturais do YFV	43
3.4.2 Expressão de proteínas em células de <i>E. coli</i> Rosetta-Gami	45
3.4.3 Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel	45
3.5 Avaliação da expressão de proteínas recombinantes	46
3.5.1 SDS-PAGE e <i>Western Blot</i>	46
3.5.2 Microscopia ótica, ensaio de indução de fusão e complementação	47
3.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	47
4. Resultados	48
4.1 Confirmações de clonagens e construção dos plasmídeos de transferência pFBpVP39pGP64, pFBDYFVNS, pFBDYFVCME e pFBDYFVNSCME	48
4.2 Formação do vírus recombinante, ensaios de infecção e avaliação de indução de fusão celular.....	52
4.3 Avaliação da formação de VLPs por microscopia eletrônica de transmissão e contrastação negativa	55
4.4 Expressão de antígenos da febre amarela para produção de anticorpos policlonais	58
4.4.1 Confirmação da construção do plasmídeo pDEST17CprME FUSION	58
4.4.2 Expressão e purificação de proteínas produzidas em células de <i>E. coli</i> Rosetta-gami™	59
5. Discussão	59

6. Conclusão e perspectivas	64
Capítulo 2 – Produção de VLPs do vírus Mayaro em células de inseto	66
1. Introdução.....	66
1.1 Doença e patogênese	66
1.2 Diagnóstico	67
1.3 Transmissão e epidemiologia.....	68
1.3 Vírus Mayaro – genoma, proteínas virais e suas funções.....	70
1.5 Ciclo infeccioso e replicação	73
2. Objetivo.....	74
2.1 Objetivos específicos.....	75
3. Material e Métodos	75
3.1 Vírus e células	75
3.2 Construção dos plasmídeos vetores para expressão de proteínas estruturais do vírus Mayaro	76
3.4 Avaliação da expressão de proteínas recombinantes	79
3.4.1 SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	79
3.4.2 Microscopia de fluorescência e imunomarcacão	79
3.4.3 Contrastação negativa em microscopia eletrônica de transmissão.....	80
4. Resultados	80
4.1 Confirmações de clonagem e construção do plasmídeo de transferência pFBMAYVSC	80
4.2 Confirmação de expressão de proteínas estruturais por <i>Western blot</i>	81
4.3 Análise da expressão e localização celular de proteínas virais por imunofluorescência .	82
4.4 Avaliação da formação de VLPs por microscopia eletrônica de transmissão	85
5. Discussão.....	86
6. Conclusão e perspectivas	88

Referências Bibliográficas..... 89

Índice de figuras e tabelas

Figura 1. Ciclo de infecção de baculovírus.	17
Figura 2. representação do ciclo de infecção do vírus da febre amarela.	24
Figura 3. Série histórica do número de casos confirmados de febre amarela entre 1980 e junho de 2018.....	25
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de partículas virais de flavivirus.	27
Figura 5. Esquematização do genoma e proteínas do YFV.	28
Figura 6. Esquematização da replicação e ciclo infeccioso do YFV.	32
Figura 7. Representação esquemática do plasmídeo pGEM [®] - T Easy (Promega, Madison, EUA).	36
Figura 8. Representação esquemática da construção pFBpVP39pGP64 indicando os sítios de restrição utilizados e as fases de ativação dos promotores.....	37
Figura 9. Representação esquemática da construção pFBYFVNS contendo a região codante dos genes não estruturais NS2A, NS2B e NS3 no YFV, e indicação das enzimas de restrição utilizadas na clonagem.....	37
Figura 10. Representação esquemática dos plasmídeos vetores finais construídos para expressão dos genes estruturais e não estruturais do YFV, com e sem <i>Tags</i> peptídicas.	39
Figura 11. Esquematização do plasmídeo pFBYFVNSCME para expressão de proteínas estruturais e não estruturais do YFV.....	39
Figura 12. Esquematização mostrando as etapas do sistema Bac-to-Bac [®] (Invitrogen, Carlsbad, USA) para formação de baculovírus recombinantes.	41
Figura 13. Representação dos vírus recombinantes contendo genes do YFV gerados no trabalho.	42
Figura 14. Esquematização mostrando as regiões hidrofóbicas das proteínas estruturais selecionadas.....	43
Figura 15. Representação esquemática do plasmídeo pDEST17CprMEFUSION.....	44
Figura 16. Confirmação da construção do plasmídeo vetor pFBpVP39pGP64.....	49
Figura 17. Confirmação da construção do plasmídeo vetor pFBDYFVNS.....	50
Figura 18. Confirmação da construção do plasmídeo vetor pFDYFVCME e pFBDYFVNSCME.	51

Figura 19. Cinética de efeitos citopáticos observados após infecção de células Tn5B por baculovírus recombinantes em MOI 10.	53
Figura 20. Indução severa de fusão de membrana de células Tn5B por infecção em MOI 10 pelo vírus AcYFVNSCME 72 h p.i.	54
Figura 21. Infecção e formação de vesículas em compartimento membranosos intracelular e na membrana plasmática.	56
Figura 22. Contrastação negativa de concentrado de sobrenadante de cultura de células infectadas com o vírus AcYFVNSCME.	57
Figura 23. Confirmação da construção do plasmídeo vetor pDEST17CprME FUSION.	58
Figura 24. Análise da expressão da proteína contendo regiões fusionadas das proteínas estruturais do YFV.	59
Figura 25. Mosquito <i>Haemagogus janthinomys</i> . (foto: Josué Damacena).	68
Figura 26. Representação do ciclo de transmissão do MAYV.	69
Figura 27. Esquematização do genoma e proteínas do MAYV.	71
Figura 28. Morfologia e representação da partícula viral de alphavirus.	72
Figura 29. Representação esquemática do plasmídeo pDEST8-MAYVSC para construção de um baculovírus recombinante contendo os genes das proteínas estruturais do MAYV.	78
Figura 30. Representação dos vírus contendo genes do MAYV gerados no trabalho.	79
Figura 31. Confirmação da construção do plasmídeo vetor pDONR207 MAYVSC.	81
Figura 32. Análise por Western blot da expressão de proteínas de MAYV.	82
Figura 33. Análise da expressão e localização de proteínas do MAYV por imunofluorescência.	84
Figura 34. Contrastação negativa do sobrenadante de cultura de células infectadas com o vírus AcMAYVSC.	85
Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de genes do YFV e suas sequências.	35
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do cassete contendo porções das proteínas estruturais do YFV.	43
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do cassete contendo as proteínas estruturais do MAYV.	77

Abreviaturas e símbolos

6xHis	cauda de hexa-histidina
<i>g</i>	velocidade de sedimentação gravitacional
AcMNPV	Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus
AgMNPV	Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	albumina sérica bovina
BV	“ <i>Budded virus</i> ”
CAT	Cloranfenicol acetil transferase
cDNA	DNA complementar
DENV	vírus da dengue
dNTP	deoxinucleotídeos
DNA	ácido desoxirribonucleico trifosfato
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FA	febre amarela
h p.i.	horas após infecção
HCl	ácido clorídrico
INF	interferon
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
JEV	vírus da encefalite japonesa
kDa	quilodaltons
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar: mol/L
MAYV	vírus Mayaro
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MW	peso molecular
mg	miligrama = 10 ⁻⁶ grama
min	minuto

ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MOI	<i>“Multiplicity of infection”</i>
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NBT	<i>“nitro blue tetrazolium”</i>
ODV	<i>“Occluded-derived virus”</i>
ng	nano grama
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
PMSF	<i>“Phenylmethylsulfonyl fluoride”</i>
PTA	ácido fosfo-túngstico
RT-PCR	transcriptase reversa- PCR
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
TCID50	<i>“50% Tissue Culture Infective Dose”</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade enzimática
VLP	<i>“Virus like particle”</i>
WNV	vírus do Nilo ocidental
X-Gal	<i>“5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside”</i>
YFV	<i>“Yellow fever virus”</i> - vírus da febre amarela
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar (micromol por litro)

μm micrometro
 $^{\circ}\text{C}$ grau Celsius

Introdução Geral

1. Baculovírus

Baculovírus são vírus pertencentes à família Baculoviridae que infectam exclusivamente insetos. Esses vírus têm sido extensamente estudados e explorados por causa do seu uso no controle biológico de pragas agrícolas, e também pela sua utilização como ferramenta biotecnológica para expressão de proteínas heterólogas (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1992).

A família Baculoviridae é dividida em 4 gêneros: Alphabaculovirus infectam larvas de insetos da ordem Lepidoptera (borboletas e mariposas); Betabaculovirus (também chamados de granulovírus); Gammabaculovirus infectam larvas de insetos da ordem Hymenoptera (vespas, abelhas e formigas); Deltabaculovirus infectam larvas da ordem Diptera (moscas e mosquitos) (JEHLE et al., 2006). O vírus tipo da família, e mais estudado, é o *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), membro do gênero Alphabaculovirus (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1992).

O seu genoma é composto por uma molécula circular de DNA fita dupla com tamanho que varia entre 80.000 a 180.000 pares de bases (pb), codificando proteínas responsáveis pela regulação tanto da produção de novas partículas virais, como pela modulação da defesa e comportamento de seu hospedeiro (GOULSON, 1997).

1.1 Ciclo de infecção

O ciclo de infecção do baculovírus depende da formação de dois fenótipos virais geneticamente idênticos, porém morfológicamente distintos. A infecção inicial do animal pelo baculovírus no ambiente se dá através da ingestão de corpos de oclusão ("*Occlusion Body*" - OBs), contendo partículas virais em seu fenótipo de vírus derivado de oclusão ("*Occlusion-derived virus*" - ODV). Os OBs são cristais proteicos, compostos majoritariamente pela proteína viral poliedrina, que envolve as partículas virais de ODVs em uma matriz cristalina, formando uma estrutura de resistência. O pH alcalino do intestino médio de lagartas é capaz de dissolver os OBs, liberando os ODVs oclusos, que por sua vez atravessam a membrana peritrófica do intestino, e adentram as células epiteliais colunares no intestino do animal por fusão direta. Os ODVs então iniciam o ciclo

de infecção celular, aonde durante as fases iniciais é produzido o fenótipo viral denominado de vírus brotado (“*Budded Virus*” – BV) (CASTRO *et al.*, 1999).

O fenótipo BV é responsável pela transmissão viral célula-a-célula no organismo, levando a sua infecção sistêmica. Durante as fases tardias e muito tardias de infecção é produzido o fenótipo ODV, a proteína viral poliedrina é hiperexpressa e acumulam em volta das partículas virais, formando uma matriz proteica, OB. A morte do animal pela infecção leva a liberação dos OBs no ambiente, dando continuidade ao ciclo infeccioso (Figura 1).

A infecção *in vitro* de células de inseto por baculovírus depende da glicoproteína de envelope viral GP64, mediando tanto a entrada de vírions em novas células quanto o seu brotamento eficiente de células infectadas (OOMENS; BLISSARD, 1999; ZHOU; BLISSARD, 2008).

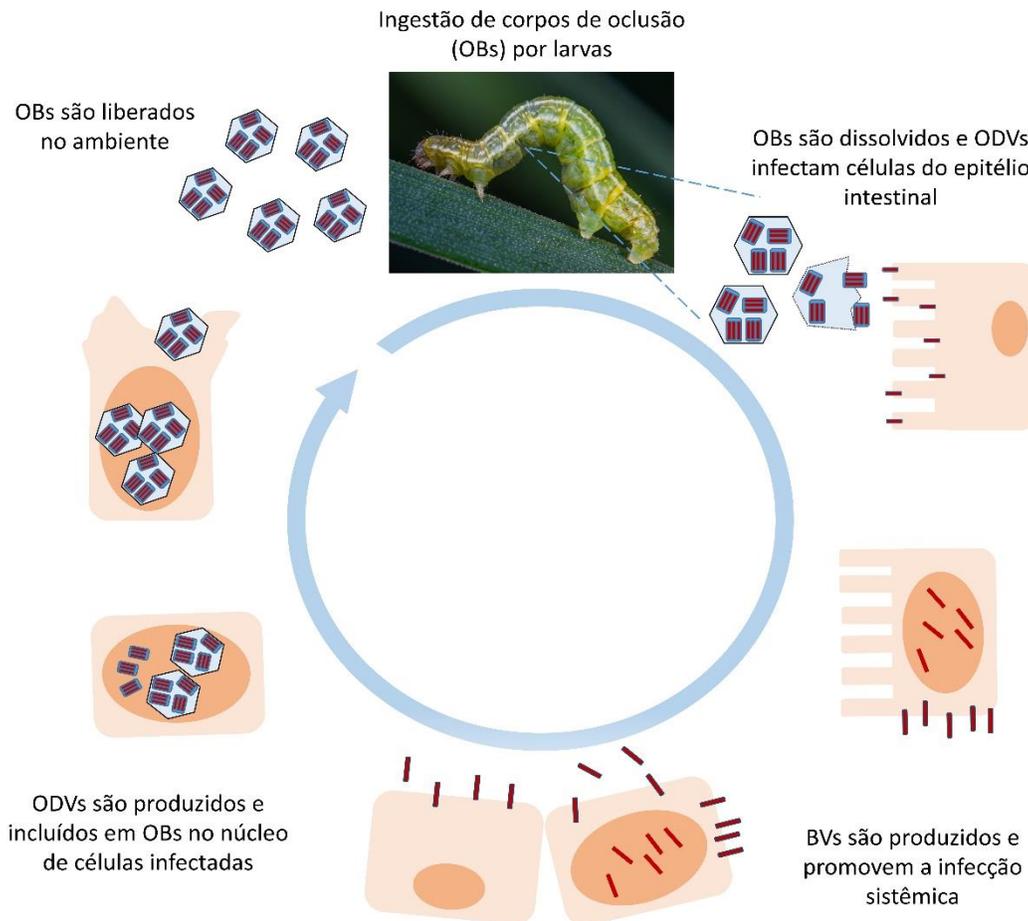


Figura 1. Ciclo de infecção de baculovírus. A infecção de larvas se inicia a partir da ingestão de corpos de oclusão (OBs) que são dissolvidos, no pH alcalino do intestino do inseto, liberando partículas virais em seu fenótipo ODV. O estágio inicial da infecção leva a produção do vírus no seu fenótipo BV, responsável pela infecção sistêmica do animal,

seguido então da fase final de infecção com a formação ODVs e sua inclusão em OBs que são liberados no ambiente e capazes de infectar novos animais. Fonte: elaborado pelo autor.

1.2 Baculovírus como vetor de expressão heteróloga

O sistema de expressão baseado na construção de baculovírus recombinantes e infecção de células de inseto é amplamente utilizado como ferramenta biotecnológica para produção de proteínas heterólogas (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1992).

Nas fases finais de infecção, RNAs mensageiros (mRNAs) virais podem corresponder a 80% do total de mRNAs da célula, grande parte deles da proteína poliedrina (CHEN, YUN-RU *et al.*, 2013). A utilização do promotor do gene da poliedrina como região controladora da expressão de genes de interesse possibilitou a utilização do sistema para produção de proteínas heterólogas em grandes quantidades.

Foram desenvolvidos diversos vetores e metodologias baseadas na construção de baculovírus recombinantes, levando a significativos avanços no aprimoramento tanto da facilidade de clonagem molecular de genes de interesse, quanto a regulação da expressão gênica, tornando o sistema altamente versátil (KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005, RIBEIRO *et al.*, 2015).

Por ser um vírus exclusivo de insetos, a manipulação do baculovírus em laboratório é extremamente segura, não sendo necessário altos níveis de biossegurança, e o cultivo de células de inseto é mais simples e menos custoso se comparado a células de mamífero. Diversas linhagens celulares de lepidóptera foram otimizadas para expressão heteróloga, podendo ser utilizadas tanto culturas de células aderentes, quanto células em suspensão e em biorreatores, possibilitando o escalonamento do processo de produção de proteínas (CHAMBERS *et al.*, 2018).

Células de inseto são capazes de processar proteínas e produzir modificações pós-traducionais observadas em eucariotos superiores. Sendo assim é um sistema extremamente útil para produção de antígenos que requerem padrões complexos de glicosilação, assim como processamento proteolítico correto, como VLPs (“*Virus like particles*”) (GOPAL; SCHNEEMANN, 2018; MENA; KAMEN, 2011).

2. Virus Like Particles – Produção, estrutura e aplicações

Atualmente existem diversos tipos de vacinas utilizadas para prevenção de doenças virais. Vacinas de vírus atenuados, criadas através de passagem consecutivas em cultura de células, foram as primeiras a serem desenvolvidas, se baseando na imunização com linhagens virais incapazes de causar infecção no recipiente da vacina. Essas vacinas são altamente imunogênicas, normalmente capazes de produzir imunidade duradoura com apenas uma dose. Entretanto, existe a possibilidade de ocorrência de reversão da patogenicidade e ocorrência de complicações severas, ainda que esses casos sejam raros. Vacinas de vírus inativados, por sua vez, consistem da inativação química ou física de partículas virais antes de sua inoculação, sendo de fácil escalonamento da produção, porém requer manipulação laboratorial de vírus infecciosos, ao mesmo tempo que o processo de inativação pode ocasionar prejuízos a imunogenicidade do antígeno.

A tecnologia de DNA recombinante e expressão heteróloga de proteínas possibilitou a produção de vacinas de subunidade, aonde proteínas virais purificadas são utilizadas para imunização. Também possibilitou o surgimento de vacinas de DNA, aonde segmentos de DNA recombinante contendo a sequência de antígenos virais são inoculados para expressão de proteínas virais pelo seu recipiente e geração de imunidade. Ambos tipos de vacinas tendem a ter um excelente perfil de segurança, porém nem sempre ocasionam uma estimulação elevada de imunidade, podendo requerer uma quantidade maior de antígenos injetados, ou de doses da vacina (NOAD; ROY, 2003).

A tecnologia de DNA recombinante também possibilitou a utilização de VLPs como vacinas. VLPs são partículas nanométricas compostas por proteínas estruturais virais de maneira regular e organizada, porém sem conter qualquer material genético viral, tornando-as incapazes de reversão à patogenicidade. Estas estruturas podem ser compostas de uma ou diversas proteínas virais simultaneamente, explorando a capacidade de automontagem de proteínas virais para formar partículas que se assemelham a composição e morfologia de partículas virais selvagens (LUA *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2013)

VLPs possuem alto potencial imunogênico devido à distribuição altamente repetitiva de antígenos virais, assim como a presença de epítomos conformacionais, favorecendo a ativação efetiva de linfócitos B e a indução de uma resposta imune humoral efetiva e de longo prazo (BACHMANN; JENNINGS, 2010).

Atualmente VLPs foram produzidas para mais de 30 espécies de vírus diferentes que infectam humanos, baseada em diversos sistemas de expressão (procariótico, leveduras, células vegetais, células de inseto e células de mamífero). Essa tecnologia possui aplicação não só na produção alternativas seguras de vacinas, mas também como ferramenta para biologia básica, no estudo da morfogênese e montagem de diversos vírus (GOPAL; SCHNEEMANN, 2018; ROLDÃO; LEDA; JT, 2010).

O sistema de expressão de baculovírus em células de inseto é extremamente versátil e robusto para utilização na produção de VLPs e antígenos de diversos vírus (MENA; KAMEN, 2011). Como exemplo comercial, a vacina licenciada Cervarix[®] (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica), contra os subtipos 16 e 18 do papilomavírus humano (HPV), é baseada na produção de VLPs no sistema baculovírus e provou-se ser eficaz e segura na prevenção contra infecção e desenvolvimento de câncer cervical (HARPER *et al.*, 2006; SCHWARZ, 2009). A vacina de subunidade FluBlok[®] (Protein Sciences Corporation, Meriden, EUA) trivalente contra o vírus influenza, por sua vez, é produzida a partir da expressão da proteína de envelope viral hemaglutinina (HA) em células de inseto (COX; HOLLISTER, 2009).

Diversas estratégias já foram exploradas para produção de VLPs, sendo adaptadas ao vírus estudado e as particularidades de sua estrutura, e do processo de montagem da partícula viral. VLPs envelopadas de diferentes vírus transmitidos por artrópodes já foram produzidas com o sistema baculovírus e células de inseto, utilizando da capacidade de processamento pós-traducional para formação de antígenos que apresentaram resultados positivos de indução de imunidade em ensaios pré-clínicos, e continuam em desenvolvimento (KROL; BRZUSKA; SZEWCZYK, 2019; PIJLMAN, 2015).

A expressão em conjunto de proteínas não-estruturais (que auxiliam na montagem e replicação de partículas virais, sem compor a sua estrutura), e de proteínas estruturais, foi utilizada para produção de VLPs do vírus Zika (ZIKV). A utilização destas VLPs como vacina induziu a produção de um título maior de anticorpos neutralizantes em camundongos se comparado a utilização do vírus inativado como vacina, possivelmente devido a alterações a imunogenicidade da partícula viral no processo de inativação (BOIGARD *et al.*, 2017). Essa mesma estratégia também foi utilizada para produção de VLPs do vírus da dengue (DENV), também induzindo uma resposta imune humoral robusta (BOIGARD; CIMICA; GALARZA, 2018).

A expressão de todas as proteínas estruturais do vírus Chikungunya (CHIKV) usando o sistema baculovírus em células de inseto levou à formação de VLPs que, quando utilizadas como vacina, geraram altos títulos de anticorpos neutralizantes, assim como proteção contra desafio utilizando o vírus selvagem em camundongos (METZ *et al.*, 2013). VLPs produzidas em células de mamífero foram capazes de proteger primatas não-humanos contra infecção por CHIKV, sendo que o soro de animais imunizados também foi capaz de conferir proteção contra infecção em camundongos imunodeficientes (AKAHATA *et al.*, 2010). Estes estudos indicam esta tecnologia como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de novas vacinas, podendo ser especialmente útil para resposta rápida a vírus emergentes.

Capítulo I – Produção de VLPs do vírus da febre amarela em células de inseto

1. Introdução

1.1 A febre amarela

A febre amarela é uma doença infecciosa febril e hemorrágica severa, endêmica dos continentes africanos e sul-americanos, sendo estimada a ocorrência de 84.000 a 170.000 casos severos e entre 26.000 e 60.000 óbitos decorrentes da doença anualmente (PAULES; FAUCI, 2017). Apesar da existência de uma vacina de vírus atenuado eficaz desde a década de 1940, é estimado que em torno de 400 milhões de pessoas vivam em áreas de risco de infecção e ainda necessitem de imunização (SHEARER *et al.*, 2017).

A doença é causada pelo vírus da febre amarela (“*Yellow Fever Virus*” – YFV), vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, mesmo gênero de vírus de alta importância para saúde pública como o ZIKV, DENV, vírus do Nilo do Oeste (WNV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV) (SIMMONDS *et al.*, 2017).

1.2 Doença e diagnóstico

A progressão da doença é extremamente variável. Em cerca de 40-65% dos casos a infecção é assintomática, 20-30% ocasiona formas leves e moderadas, sendo que em 10-20% das infecções

há o desenvolvimento da forma grave da doença, levando a óbito em cerca de 20-50% de pessoas que desenvolvem essa forma da doença (VASCONCELOS, 2003).

Após a picada do mosquito infectado, há um período de incubação que pode durar de 3–6 dias, depois do qual podem surgir quadro sintomático de febre, mialgia, náusea e mal-estar. Esse período de infecção pode ser seguido de um período de remissão, aonde esses sintomas cessam, e há a chance de resolução da infecção. Quadros severos da doença podem seguir, aonde o tropismo viral leva ao comprometimento do baço, rins, coração e especialmente do fígado. Nas manifestações graves da doença há a ocorrência de lesões hepáticas severas, hemorragia e surgimento de icterícia, podendo evoluir para choque e morte (GARDNER; RYMAN, 2010).

O método mais comumente utilizado para o diagnóstico da doença é a detecção sorológica de anticorpos contra o YFV, utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), especialmente para detecção do anticorpo IgM (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Outros testes sorológicos como inibição o de neutralização e de inibição de hemaglutinação também podem ser empregados, porém reações cruzadas com outros flavivirus podem ocorrer, complicando o diagnóstico sorológico diferencial onde há a circulação de diversos flavivirus endêmicos (MONATH, 2001).

O isolamento viral pode ser realizado através da inoculação de camundongos neonatos, ou do cultivo em cultura de células de mosquito (por exemplo linhagem C6/36, proveniente de *Aedes albopictus*) e de mamífero (por exemplo linhagem Vero – células renais de macaco verde africano). O isolamento pode ser importante para avaliação da virulência, infectividade e transmissibilidade de linhagens virais isoladas (MONATH; VASCONCELOS, 2015).

Análises moleculares baseadas em técnicas utilizando a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), são extremamente sensíveis e muito úteis na diferenciação de infecções provenientes de vírus selvagem, ou da linhagem vacinal, porém dependem da presença de material genético viral circulante para detecção. Avanços desenvolvidos na área podem levar a maior acessibilidade de testes moleculares rápidos e precisos em áreas com poucos recursos (ESCADAFAL *et al.*, 2014; KWALLAH *et al.*, 2013).

1.3 Vacinas

Vacinas são a melhor forma de proteção contra a infecção pelo YFV, sendo utilizadas desde o final da década de 1930, já tendo sido aplicadas em mais de 600 milhões de pessoas no mundo. As vacinas atuais foram geradas a partir da atenuação da linhagem Asibi vírus por passagens consecutivas em células de galinha, sendo gerados as linhagens vacinais 17DD (produzida e usada do Brasil) e 17D-204 (usadas no resto do mundo) (MONATH, 2005). A vacina é eficaz em 99% dos casos após 30 dias de sua administração, sendo que apenas uma única dose padrão é capaz de propiciar proteção por toda vida (Organização Mundial da Saúde, 2019). A vacina estimula uma resposta imune robusta, composta pela estimulação linfócitos T auxiliares 1 e 2 (GAUCHER *et al.*, 2008), assim como resposta composta por células T citotóxicas (AKONDY *et al.*, 2009; CO *et al.*, 2002). O mecanismo principal de indução de proteção é pela geração de uma resposta imune humoral mediada por linfócitos B, ocasionando a produção de anticorpos neutralizantes que persistem e medeiam a proteção a longo prazo (BRANDRISS *et al.*, 1986; POLAND *et al.*, 1981).

Apesar de historicamente demonstrada como segura, por ser uma vacina de vírus atenuado produzida em ovos de galinha, existem algumas contraindicações para o seu uso. Não é recomendado o uso para pessoas com imunodeficiências graves (induzidas por infecção sintomática por HIV/AIDS, ou tratamentos quimioterápicos, por exemplo), para crianças com menos de 9 meses, para pessoas com alergias severas a ovo. Para pessoas acima de 60 anos de idade e gestantes, é recomendada a vacinação apenas se residirem ou se deslocarem para regiões de transmissão ativa da febre amarela (<http://www.saude.gov.br/assessoria-de-imprensa/920-saude-de-a-a-z/febre-amarela/10771-vacinacao-febre-amarela>). Existem casos registrados de efeitos adversos severos, como a doença viscerotrópica aguda associada à vacina da febre amarela (DVA-VFA) (aonde há o aparecimento de sintomas similares a forma grave da febre amarela) e a doença neurológica aguda associada a vacina da febre amarela (DNA-VFA), porém são extremamente raros, sendo o benefício em áreas endêmicas muito superior aos riscos (HAYES, 2010; MONATH, 2012).

1.4 Transmissão e epidemiologia

O YFV é um vírus transmitido por artrópodes (“*Arthropod borne virus*” – arbovírus), e sua transmissão pode ser classificada como parte do ciclo silvestre ou urbano (Figura 2). A transmissão

silvestre do vírus nas américas ocorre através de mosquitos hematófagos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, aonde primatas não humanos servem como reservatórios em ambiente peri-urbanos e de mata. A transmissão urbana do vírus se entre humanos se dá principalmente através do vetor *Aedes aegypti*, altamente adaptado e atualmente amplamente distribuído em cidades do Brasil (figura 2).

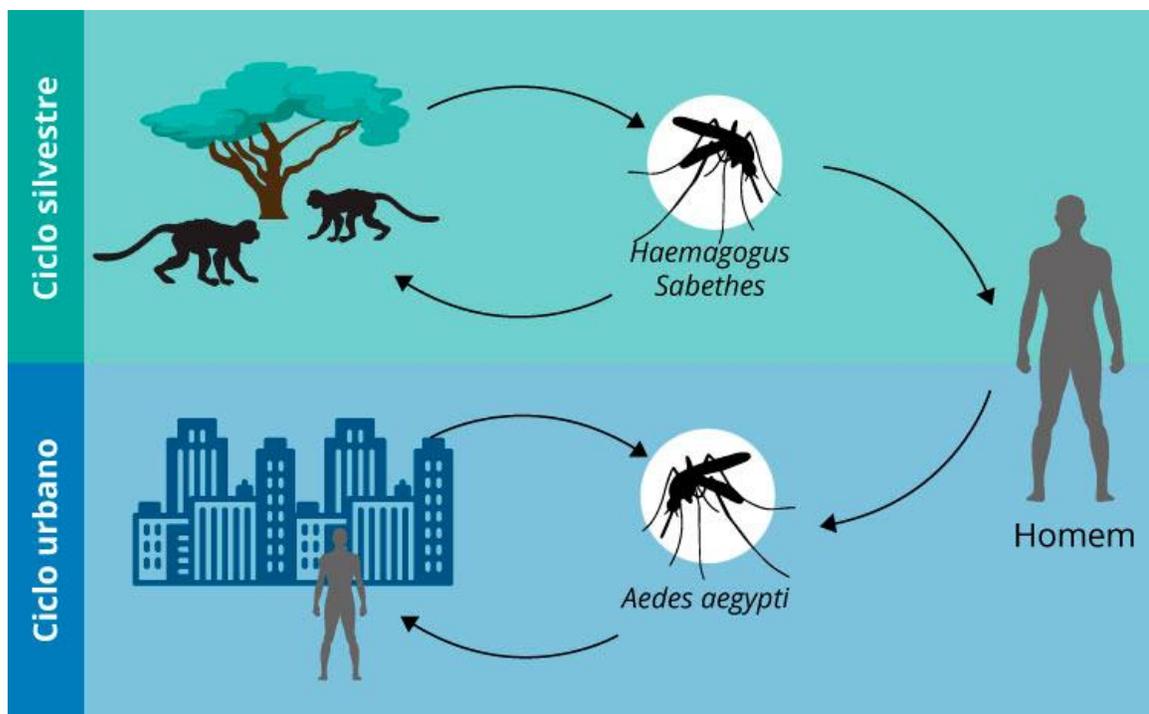


Figura 2. representação do ciclo de infecção do vírus da febre amarela. O ciclo de transmissão silvestre é mantido pela transmissão por mosquitos vetores *Haemagogus sp.* e *Sabethes sp.*, entre primatas não humanos e humanos. O ciclo urbano é mantido pela transmissão de humano para humano pelo vetor *A. aegypti* amplamente adaptados para habitats antrópicos. Fonte: Ministério da Saúde, disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao#transmissao>.

O YFV possui origem africana, e foi introduzido nas américas pelo comercio de escravos, com o registro da primeira epidemia na península de Yucatan, México, em 1648 (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007; STAPLES; MONATH, 2008), sendo causador de epidemias urbanas severas nas américas e no Brasil até o século XX. O desenvolvimento da vacina atenuada por Max Theiler e Hugh Smith (THEILER; SMITH, 1937) e sua distribuição, associado ao programa de erradicação do mosquito vetor *A. aegypti* que levou à sua eliminação no Brasil em 1957, extinguiu a ocorrência de epidemias urbanas no país. A partir da década de 1980, o vetor *A. aegypti* foi reintroduzido no país e se distribuiu amplamente pelo território, porém o último caso registrado de

transmissão urbana no Brasil foi registrado na década de 1940 (COUTO-LIMA *et al.*, 2017). Atualmente é estimada a ocorrência de 1.366 casos da doença no Brasil entre 1950 e 2016, todos associados ao ciclo de transmissão silvestre da doença (FARIA *et al.*, 2018).

1.4.1 Epidemia brasileira de 2016-2018

A área de distribuição do vírus vem se expandindo nas duas últimas décadas, com casos sendo registrados em regiões que não são consideradas endêmicas, como estados do centro-oeste, sudeste e sul do país (Ministério da Saúde, 2019). No período de dezembro de 2016 até julho de 2018 foram confirmados 2043 casos da doença, com 676 óbitos, representando a maior epidemia do país nas últimas décadas (Figura 3). A epidemia afetou principalmente os estados de Minas Gerais e Espírito Santo, porém com casos registrados também do Rio de Janeiro e em São Paulo (FARIA *et al.*, 2018). Foi expandido, pelo Ministério da Saúde, a área de recomendação de vacinação contra a febre amarela para todo território nacional em 2020 (<http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/46139-em-2020-ministerio-da-saude-amplia-publico-para-vacinas-contr-febre-amarela-e-gripe>).

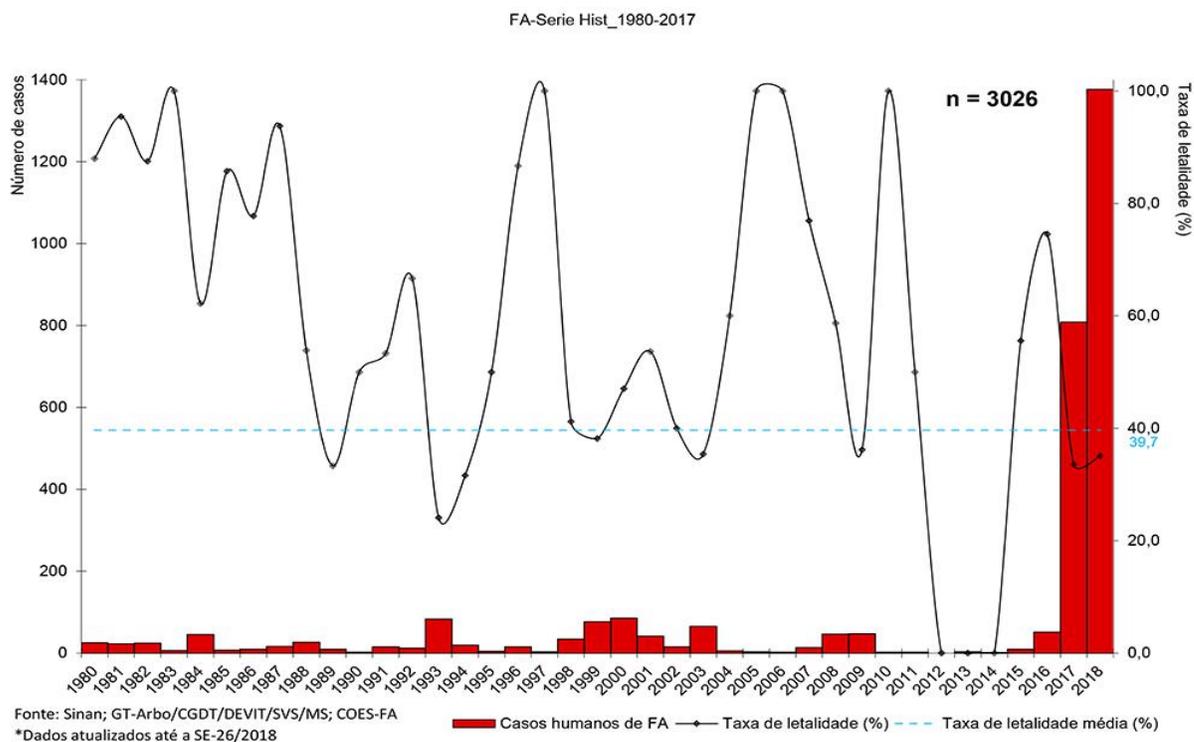


Figura 3. Série histórica do número de casos confirmados de febre amarela entre 1980 e junho de 2018. A epidemia relacionada ao ciclo silvestre de transmissão da doença ocorrida entre 2017 e 2018 pode ser observada com 1.379 casos

humanos e 483 óbitos, com 864 epizootias registradas. A taxa média de letalidade se manteve constante em 39,7%. Fonte: Ministério da Saúde. **Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela - Brasil 2017/2018 Informe Epidemiológico - SVS - Ministério da Saúde.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/maio/18/Informe-FA-26.pdf>>.

Essa ocorrência também levantou preocupações com o risco de reurbanização da doença, devido ao grande número de casos ocorridos próximos a regiões urbanas densamente povoadas e com grande presença de vetores competentes. Um estudo de Couto-Lima et al., (2017), mostrou a susceptibilidade dos mosquitos antropofílicos *A. aegypti* e *Aedes albopictus*, à infecção com linhagens americanas e africanas do YFV, reforçando a necessidade de uma alta cobertura vacinal para evitar a emergência de epidemias urbanas, provenientes tanto de linhagens já circulantes, quanto da possível introdução de linhagens virais africanas.

Análises genômicas do vírus circulante durante a epidemia, tanto em primatas não-humanos, quanto em casos confirmados e óbitos decorrentes da doença em humanos, ajudaram a revelar os padrões de distribuição espacial e temporal da progressão da epidemia. Casos de epizootias ocorridas em 2014 no estado do Mato Grosso do Sul e Goiás indicam que a região centro-oeste do país provavelmente serviu como zona de transição do vírus entre a região amazônica e o sudeste brasileiro, não se observando a ocorrência de muitos casos humanos provavelmente devido a maior cobertura vacinal na região (CUNHA, MARIELTON DOS PASSOS *et al.*, 2019). O início da epidemia em si se deu no estado de Minas Gerais em junho de 2015, a partir genótipo sul americano I do YFV, que então divergiu em dois clados durante a sua disseminação por Minas Gerais, e pelos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo (CUNHA, MARIANA SEQUETIN *et al.*, 2019; CUNHA, MARIELTON DOS PASSOS *et al.*, 2019). O estudo de Faria et al. (2018), baseado em análises epidemiológicas moleculares e geográficas, também ajudou a caracterizar a epidemia como associada ao ciclo de transmissão silvestre do vírus, e a elucidar como se deu sua progressão. Esses estudos mostram o papel importante da epidemiologia molecular, e das novas tecnologias de sequenciamento, para o monitoramento e elaboração de estratégias de políticas públicas de prevenção ao surgimento de novas epidemias.

1.5 Vírus da febre amarela – genoma, proteínas virais e suas funções

O vírion do YFV é uma partícula esférica, de superfície relativamente lisa, com aproximadamente 50 nm de diâmetro, contendo um envelope de bicamada lipídica (Figura 4 B).

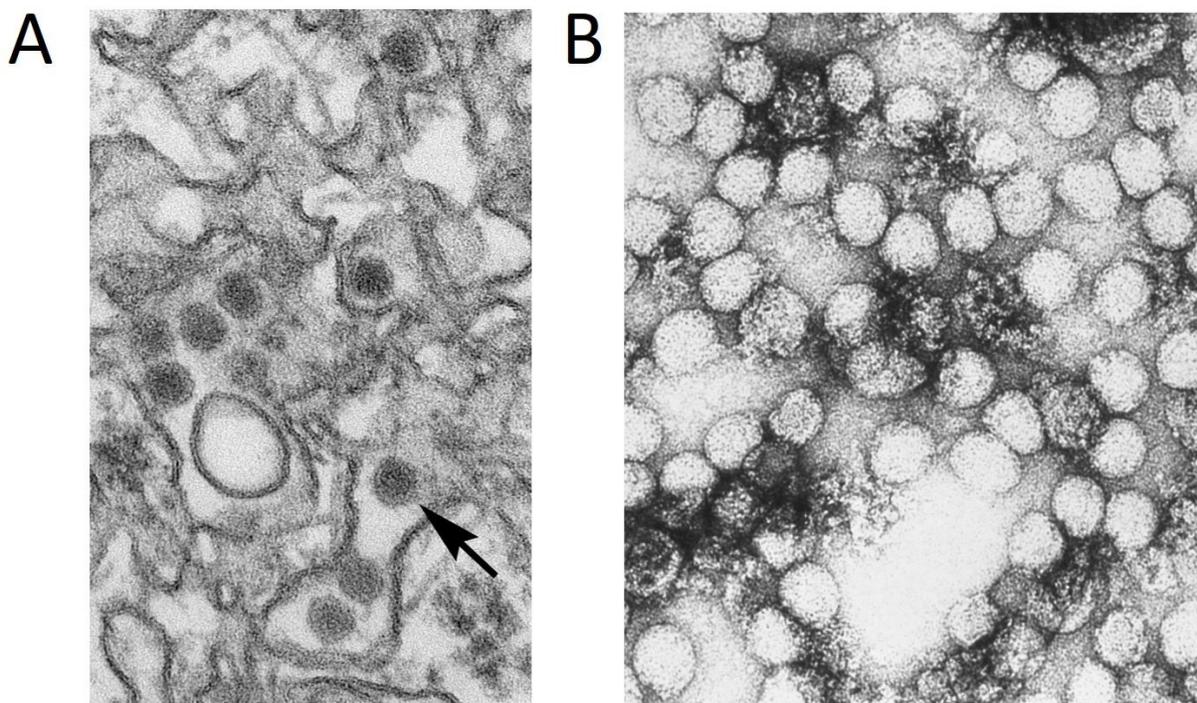


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de partículas virais de flavivirus. A: Partículas virais do flavivirus ZIKV (seta preta) em célula infectada, mostrando sua replicação associada a membranas citoplasmáticas. Fonte: CDC/ Cynthia Goldsmith, disponível em <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=20487> – domínio público B: Contrastação negativa de vírions do YFV, sendo possível observar a morfologia esférica com diâmetros entre 40 e 60 nm. Fonte: CDC/ Erskine Palmer, disponível em <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2176> – domínio público.

O seu capsídeo icosaédrico contém o genoma constituído por uma fita simples de RNA senso-positivo com aproximadamente 11.000 nucleotídeos (nt). O RNA genômico possui um segmento não codante e uma estrutura CAP na sua extremidade 5', estrutura essa importante para garantir tradução eficiente do RNA, para proteção de sua degradação por exonucleases celulares, assim como para prevenir o reconhecimento celular do RNA viral e ativação de resposta imune inata (DECROLY *et al.*, 2012). Possui outra região não codante e sem poliadenilação (cauda poli-A) na sua extremidade 3'. O RNA genômico possui apenas uma ORF (fase aberta de leitura, do inglês “*Open reading frame*”) que codifica para um poliproteína que é processada

proteoliticamente para dar origem a 3 proteínas estruturais – capsídeo C, membrana prM e envelope E (que compõe a estrutura da partícula viral), assim como as 7 proteínas não-estruturais – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (responsáveis pela replicação viral) (Figura 5) (SIMMONDS *et al.*, 2017).

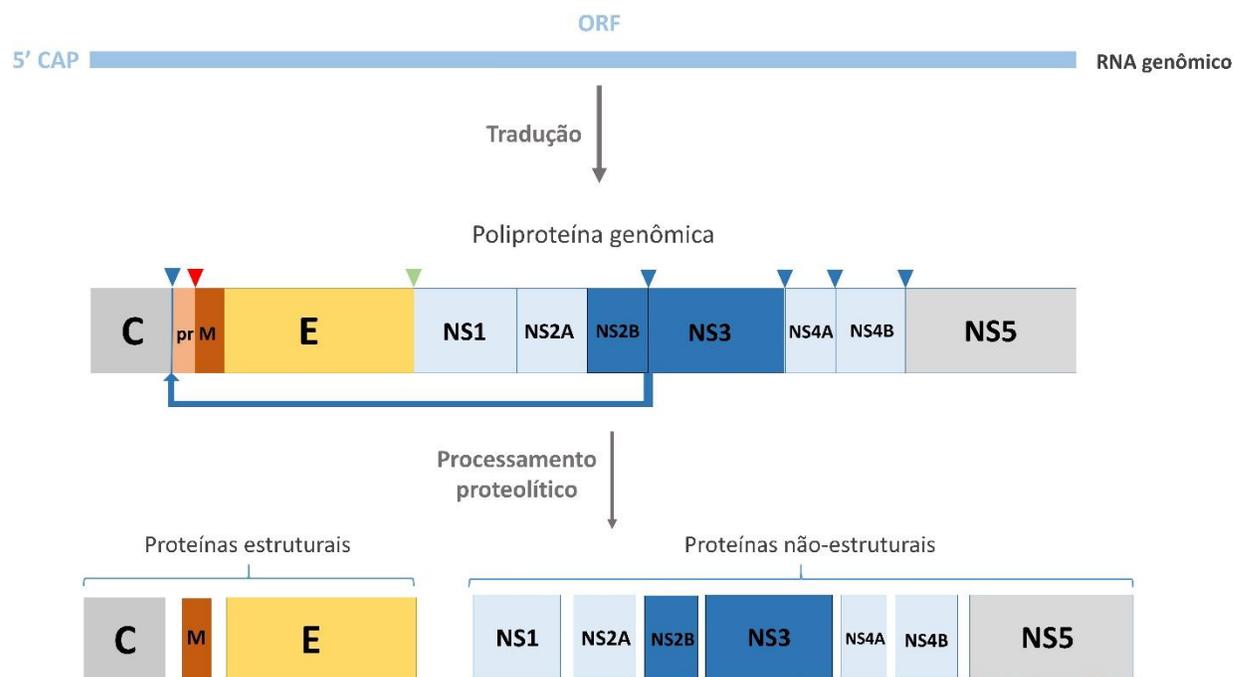


Figura 5. Esquematização do genoma e proteínas do YFV. O RNA genômico viral codifica uma poliproteína que é clivada co e pós-traducionalmente por proteases virais e do hospedeiro. Os triângulos azuis indicam os sítios de clivagem pela protease viral NS2B/NS3, assim como a seta destaca o sítio de clivagem entre a proteína de capsídeo C e a proteína prM. O triângulo vermelho indica o lugar de clivagem pela protease no complexo de Golgi, e triângulo verde por peptidase celular. Fonte: elaborado pelo autor.

A proteína de envelope (E) (~53 kD) é o principal componente do envelope viral, sendo responsável pela entrada em células através de endocitose mediada por receptor e fusão de membrana. A proteína é composta por três domínios estruturais (DI, DII e DIII). O domínio II (DII) contém a região responsável pela fusão de membranas, e também pela dimerização entre monômeros da proteína E, formando estruturas alongadas que se organizam em homodímeros paralelos na superfície do envelope viral (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). O domínio III (DIII) é responsável pelo reconhecimento de receptores, e é alvo de anticorpos neutralizantes para diversos flavivirus (KAUFMANN; ROSSMANN, 2011; LINDENBACH; RICE, 2007).

A proteína prM (~26 kD), assim como a proteína de envelope (E), se encontra ancorada ao envelope viral, com 180 cópias de ambas proteínas compondo a superfície da partícula. A proteína é sintetizada e incorporada a partícula no seu estado imaturo (prM – pré-M), isso é importante para inibir o rearranjo prematuro da proteína E em sua forma fusogênica. A porção pr somente é clivada da porção M tardiamente, durante o trânsito da partícula no complexo de Golgi por uma protease residente, o que leva formação da partícula viral madura capaz de induzir fusão de membranas (ZHANG, YING *et al.*, 2003).

A proteína de capsídeo (C) possui uma massa molecular de ~11 kD, sendo a proteína menos conservada entre os flavivirus. Monômeros da proteína C formam dímeros através de associações entre alfa-hélices, importante para oligomerização e montagem da estrutura do capsídeo viral (TEOH *et al.*, 2014). A proteína é altamente básica, característica que foi associada à sua função de empacotamento do RNA viral através de interações eletroestáticas não específicas, apesar deste processo não ser completamente elucidado (MA *et al.*, 2004; PONG *et al.*, 2011). Um estudo de Samuel *et al.* (2016) identificou a forte atividade da proteína C do YFV de inibição da resposta antiviral mediada por RNAs interferentes (RNAi) no mosquito *A. aegypti*, reforçando o papel adaptativo para multifuncionalidade de proteínas em vírus com genomas reduzido.

As proteínas não estruturais (NSs) desempenham papéis fundamentais na replicação viral e na maturação dos vírions. A proteína NS1 (~46 kD) foi identificada como importante para replicação viral a partir de estudos de mutações direcionadas, possuindo também uma associação importante com a proteína NS4A (LINDENBACH; RICE, 2003), porém sua exata função ainda não é bem estabelecida (LINDENBACH; RICE, 2007). Além de ser produzida por células durante a infecção essa proteína também é secretada em sua forma solúvel, resultando em uma forte resposta humoral contra a proteína (LINDENBACH; RICE, 2003).

A proteína NS2A (~22 kD) é uma proteína hidrofóbica que possui associação a membranas celulares. Essa proteína foi identificada como importante no processo de montagem/secreção de partículas virais de flavivirus, sendo que mutações seletivas nessa proteína causaram o bloqueio da produção de partículas infecciosas, associada a falha na formação de partículas contendo nucleocapsídeos (KUMMERER; RICE, 2002; LIU; CHEN; KHRAMYKH, 2003). A proteína também é associada a indução da formação de estruturas membranosas intracelulares, possivelmente também associadas ao processo de montagem de partículas (LEUNG *et al.*, 2008).

A pequena proteína NS2B (~14 kDa) se associa estavelmente a proteína NS3 funcionando como um cofator essencial para o funcionamento dessa como protease. O cofator NS2B age tanto estabilizando o dobramento correto, como também diretamente no sítio ativo de clivagem de seu substrato (FALGOUT *et al.*, 1991; LI; PHOO; LUO, 2014). NS3 (~70 kD), por sua vez, é multifuncional. Sua porção amino-terminal funciona como uma serino protease para o processamento da poliproteína viral, enquanto sua porção carboxi-terminal possui atividade de helicase e nucleotídeo trifosfatase, aparentemente importante para separação da fita molde de RNA da nova fita de RNA nascente durante a replicação (ASSENBERG *et al.*, 2009; LUO *et al.*, 2008).

As proteínas NS4A (~16 kD) e NS4B (~27 kD) são hidrofóbicas e interagem com membranas. Ambas proteínas não possuem atividade enzimáticas identificadas, e sua função exata ainda não é completamente conhecida. Há evidências que indicam a presença de NS4A no complexo replicativo (MACKENZIE *et al.*, 1998) e a interação entre as duas proteínas, que é importante para eficiência de replicação de DENV (ZOU *et al.*, 2015). Foi identificada uma associação entre NS4B e NS3 também importante para eficiência de replicação de DENV (CHATEL-CHAIX *et al.*, 2015). Interessantemente, foi observada a indução de autofagia *in vitro* por NS4A, protegendo células contra morte induzida pela infecção por DENV e o vírus Modoc (flavivirus murino), e aumentando a replicação viral (MCLEAN *et al.*, 2011). Ambas NS4A e NS4B de ZIKV foram identificadas induzindo autofagia e levando ao desenvolvimento neuronal anormal *in vitro* (LIANG *et al.*, 2016).

NS5 é a maior proteína não-estrutural do YFV, com ~103 kD. Sua principal atividade é como uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), responsável pela reação de polimerização de RNA durante a replicação viral, também sendo importante na mediação da adição da estrutura CAP da extremidade 5' do RNA genômico (LINDENBACH; RICE, 2003).

1.6 Ciclo infeccioso e replicação

A infecção por flavivirus se inicia com o reconhecimento da proteína E por receptores virais e fatores de ligação celulares (associados ao recrutamento e concentração de partículas virais à superfície celular). Os mecanismos e componentes exatos envolvidos não são completamente elucidados, porém diversas proteínas de membrana como os receptores de lectina tipo C (CLRs), glicosaminoglicanos (GAGs) como sulfato de heparano, receptores da família TIM e TAM, e a

proteína conservada proibitina aparentam estar envolvidos (KUADKITKAN *et al.*, 2010; PERERA-LECOIN *et al.*, 2013).

Após internalização de vírions por endocitose, a acidificação do endossomo desencadeia a reorganização da proteína E em homotrímeros, possibilitando a fusão do envelope viral a membrana endossomal, levando a liberação citoplasmática do RNA genômico (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). A replicação acontece no retículo endoplasmático (RE), e estudos recentes ajudaram a elucidar parte deste processo. É induzido o remodelamento dessa organela, com papel importante das proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS4A e NS4B, levando à formação de estruturas denominadas organelas de replicação viral. São formados então complexos para replicação e montagem de partículas virais, associados também à membrana e proteínas do RE do hospedeiro (ARAKAWA; MORITA, 2019; ROTHAN; KUMAR, 2019). Os nucleocapsídeos formados adquirem seu envelope ao brotarem do RE, e são então encaminhados pelo caminho secretório ao complexo de Golgi, aonde ocorrerá o processamento proteolítico final da proteína prM por uma protease residente. Partículas são então liberadas na membrana plasmática em seu estado maduro (GEROLD *et al.*, 2017) (Figura 6).

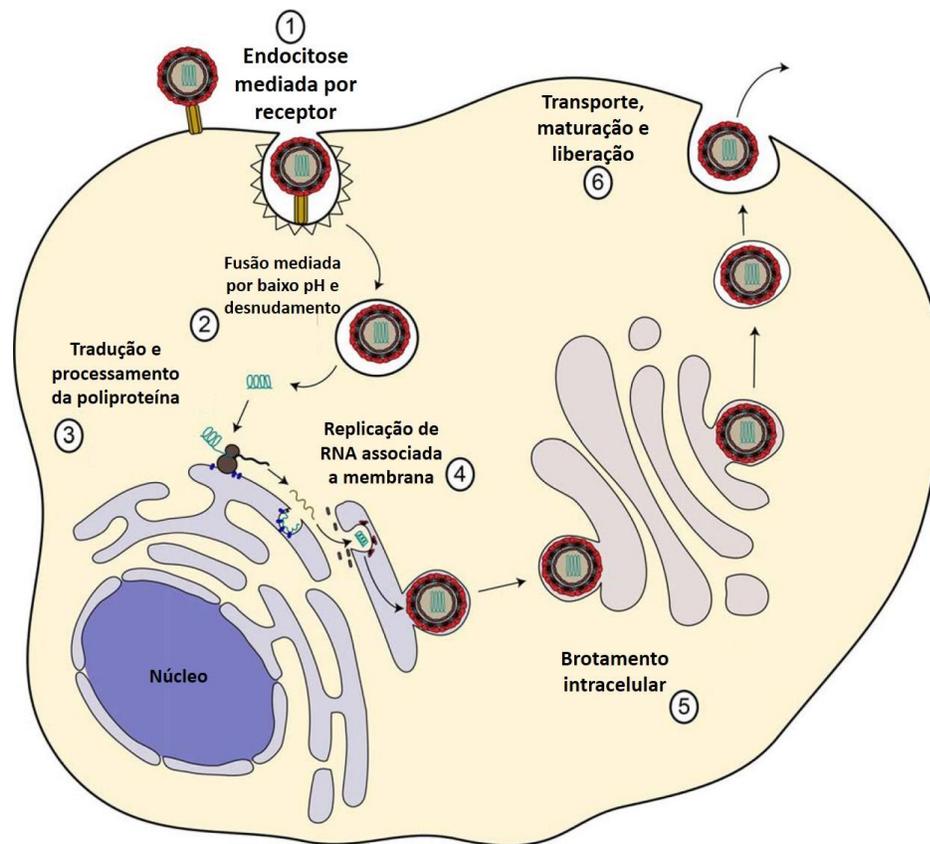


Figura 6. Esquemática da replicação e ciclo infeccioso do YFV. Partículas virais entram em células por endocitose mediada por receptor (1), que é seguido por fusão com a membrana endossomal mediada por sua acidificação, liberando o RNA genômico viral (2). A tradução da poliproteína viral (3) ocorre em seguida, e a replicação e montagem de novas partículas virais acontece associada à membrana do retículo endoplasmático (4), de onde a partícula brota adquirindo seu envelope. A partícula percorre o caminho secretório (5) aonde termina sua maturação com a clivagem de prM em M, adquirindo sua capacidade fusogênica e é então liberada da célula (6). Adaptado de: Gerold et al., 2017.

2. Objetivo

Avaliar a produção de VLPs do YFV utilizando sistema de expressão de baculovírus em células de inseto através de diferentes estratégias de controle de expressão gênica e processamento proteico.

2.1 Objetivos específicos

- Construção de baculovírus recombinantes contendo apenas genes de proteínas estruturais, ou genes de proteínas estruturais e não estruturais do YFV, para avaliação do papel de proteínas não estruturais no processamento de proteínas virais e formação de VLPs;

- Avaliar os efeitos citopáticos causados pela expressão dos genes do YFV em células de lepidóptera como possível plataforma de teste para inibidores virais;
- Analisar o perfil de expressão de proteínas do YFV e de baculovírus por SDS-PAGE e *Western blot*;
- Produção de VLPs no sobrenadante de cultura de células sem a presença de BVs de baculovírus, através da utilização da construção de baculovírus recombinantes *gp64-null*;
- Analisar a formação de VLPs de YFV por microscopia eletrônica de células infectadas com vírus recombinantes, assim como a secreção de VLPs por ultracentrifugação e contrastação negativa.

3. Material e Métodos

3.1 Vírus e células

Todos os vírus utilizados no trabalho foram construídos a partir do genoma do baculovírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* isolado E2 (AcMNPV) contido no cromossomo bacteriano artificial bMON14272 (bacmídeo) presente em células de *Escherichia coli* DH10Bac™ do sistema “*Baculovirus Expression System*” Bac-to-Bac®, (Invitrogen, Carlsbad, USA) (LUCKOW *et al.*, 1993).

Células Sf9^{op1d} expressando constitutivamente a proteína GP64 proveniente do vírus *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus* (OpMNPV) foram utilizadas para propagação de vírus recombinantes sem o gene *gp64*, que codifica a principal glicoproteína de envelope viral (PLONSKY *et al.*, 1999).

Foram utilizadas as linhagens celulares provenientes de lepidóptera *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21-AE (Sf21) (VAUGHN *et al.*, 1977) para propagação viral, e de *Trichoplusia ni* BTI-TN5B1-4 (Tn5B) (GRANADOS *et al.*, 1994) para expressão de proteínas e os demais ensaios. Células Sf-9 Easy Titer (Sf-9 ET) (HOPKINS; ESPOSITO, 2009), estavelmente transformadas com um plasmídeo contendo o gene da proteína *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) sob

o controle do promotor da poliedrina de baculovírus, ativado durante a infecção por baculovírus, foram utilizadas para titulação de todos os vírus construídos. Todas as células foram mantidas a 27°C em meio de cultura TC-100 (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) suplementado com 10% soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Células eletrocompetentes de *E. coli* da linhagem Max Efficiency DH10B (Invitrogen) foram utilizadas para todas as clonagens moleculares, enquanto para expressão heteróloga em *E. coli* foram utilizadas células Rosetta-gami™ 2(DE3) pLysS (Merck, Darmstadt, Alemanha) quimiocompetentes.

3.2 Construção dos plasmídeos vetores para expressão de proteínas estruturais e não estruturais do vírus da febre amarela

3.2.1 Construção do plasmídeo vetor contendo promotores de baculovírus

Inicialmente foi sintetizado quimicamente, pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT; Iowa, EUA), uma sequência de nucleotídeos contendo a sequência do promotor tardio pVP39 e o promotor precoce pGP64 do vírus *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus isolado 2D (AgMNPV) em sentidos opostos, separados por um sítio de restrição da enzima *XbaI*, e flanqueados com sítio de restrição para as enzimas *SphI* e *HindIII*. Foram utilizadas sequências promotoras provenientes do vírus AgMNPV e não do vírus AcMNPV como uma forma de evitar possível ocorrência de recombinação entre a região promotora inserida e regiões promotoras homólogas presentes no genoma do AcMNPV, o que poderia ocasionar a perda do cassete clonado. A construção contendo as sequências promotoras foi então amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando 25 microlitros (μ l) da enzima GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, EUA); 0,2 μ l da enzima Q5® *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs, Ipswich, EUA); 1 μ l cada dos primers pPVP39PGP64 F e pPVP39PGP6 R (**Tabela 1**) (concentração 10 μ M); 1 μ l do DNA sintético (10 ng/ μ l) e completado para o volume final de 50 μ l com água “milli-Q”. O programa utilizado para amplificação foi: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 20 s, 55°C por 20 s, 72°C por 50 s (extensão) e uma etapa de extensão final por 4 min. O produto de PCR foi então submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%, sendo verificada a presença de uma banda do tamanho esperado de ~716 pares de base (pb) e subsequentemente excisada e eluída utilizando o kit *ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE

Healthcare, Chicago, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as outras eluições de gel de agarose foram realizadas da mesma forma.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados e suas sequências.

Nome	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')
pPVP39PGP64 F	TGTGTAATTTATGTAGCTGT
pPVP39PGP6 R	ACAAACGCACCACTCTTGA
pYFVCprMESal F	GACGTCGACGCCATTTTAATCGTTCGTTGAGC
pYFVCprMEXma R	ATTCCCGGGATTGTTACGCCCAACTCCTAG
pCMEHistagSal F	CTGCCCGGGTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTA TGGGTACGCCCAACTCCTAG
pCMEHAtagXma R	GTCGTCGACATGCATCACCATCACCATCACTCT GGTCGTAAAGCTC
pYFVNSEco F	GTAGAATTCGCTACAATGGGAGAAATACATG
pYFVNSPst R	GCACTGCAGAGCTTACCTCCTACCTTCAGCA
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	GCGGATAACAATTCACACAGG

DNA eluído foi então ligado ao plasmídeo PGEM[®] – T Easy (Promega, Madison, EUA) (Figura 7) utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega, Madison, EUA) de acordo com as indicações do fabricante. Dois microlitros da reação de ligação foram transformados por eletroporação como em células DH10B eletrocompetentes como descrito por Sambrook et al. (1989), incubadas em placa de Petri com meio LB sólido contendo os devidos marcadores de seleção (ampicilina 100 µg/ml, 0,5% mM IPTG, X-Gal 80 µg/ml). Os clones foram selecionados por seleção azul e branco de acordo com indicações do fabricante, e subsequentemente confirmados para presença da inserção da sequência de interesse no plasmídeo pela técnica de PCR de colônias, como descrito por Berkgekessel & Guthire (2013), utilizando primers M13F e M13R que possuem sítio de anelamento flanqueando as extremidades do gene *lacZ*. Um clone confirmado foi crescido em meio LB líquido e o DNA plasmidial extraído utilizando o kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA*

Purification Systems (Promega, Madison, EUA) de acordo com as indicações do fabricante. Todas as extrações de DNA plasmidial do trabalho foram realizadas desta maneira.

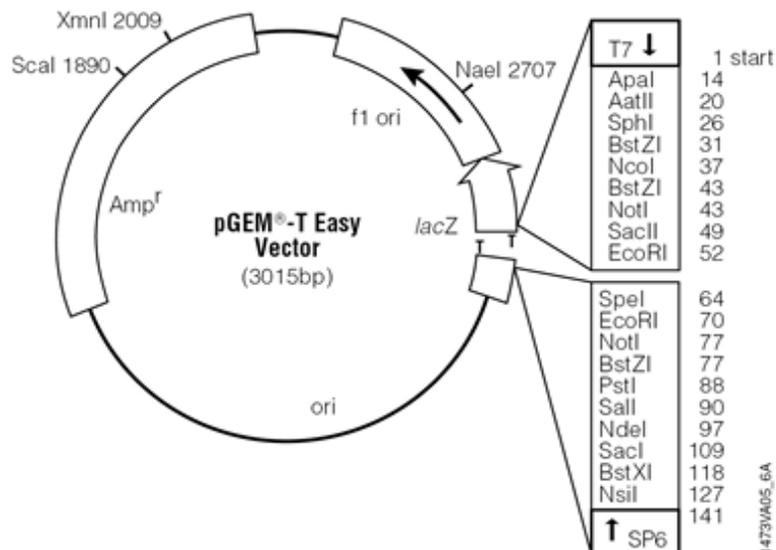


Figura 7. Representação esquemática do plasmídeo pGEM® - T Easy (Promega, Madison, EUA). Os sítios múltiplos de clonagem se encontra no interior do gene lacZ.

O plasmídeo pGEMpVP39pGP64 gerado foi digerido com as enzimas *SphI* e *HindIII* (Promega, Madison, EUA) por ~14 h (“*overnight*”) (10 µl de DNA ~81 ng/µl, 1 µl de cada enzima, 3 µl tampão de reação 10X, 0,3 µl de albumina sérica bovina – BSA, água “milliQ” para um volume final de reação de 30 µl) para liberação do segmento de interesse portando os promotores. O segmento gênico de interesse produto de digestão foi então eluído, e subsequentemente ligado ao vetor pFastBac™ Dual (Invitrogen, Carlsbad, USA), previamente digerido com as mesmas enzimas. Foi então formado o plasmídeo vetor pFastBac™ nomeado de pFBpVP39pGP64, contendo as regiões para as seguintes subclonagens. A clonagem foi confirmada por PCR de colônia e digestão enzimática (Figura 8).

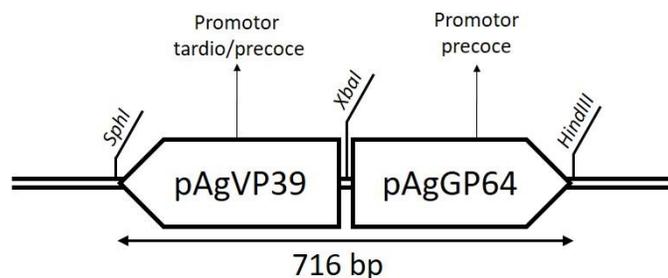


Figura 8. Representação esquemática da construção pFBpVP39pGP64 indicando os sítios de restrição utilizados e as fases de ativação dos promotores.

3.2.2 Construção dos plasmídeos contendo os genes estruturais e não estruturais do YFV

O DNA complementar (cDNA) do YFV linhagem 17D, contido no plasmídeo pCDNAYFV (previamente gerado, dados não publicados), foi usado de molde para amplificação por PCR do segmento contendo a sequência codante para os genes não estruturais NS2A, NS2B e NS3, utilizando os primers pYFVNSEco F e pYFVNSPst R (tabela 1), sendo adicionados os sítios de restrição para as enzimas *Pst*I e *Eco*RI. A reação enzimática foi realizada com as concentrações e volumes descritos em 3.2.1, o programa para amplificação também foi o mesmo com exceção do aumento do tempo de extensão para 3 min. Este segmento foi então submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%, eluído, e posteriormente digerido com as enzimas de restrição *Pst*I e *Eco*RI (Promega, Madison, EUA) “overnight” (11 μ l de DNA \sim 137 ng/ μ l, 1 μ l de cada enzima, 3 μ l tampão de reação 10X, 0,3 μ l de BSA completado para um volume final de reação de 30 μ l). O vetor FBpVP39pGP64 gerado foi também digerido com as mesmas enzimas para subclonagem dos genes não estruturais, que foi confirmada por digestão enzimática e sequenciamento Sanger (Macrogen, Coréia do Sul), dando origem ao plasmídeo pFBYFVNS (Figura 9).

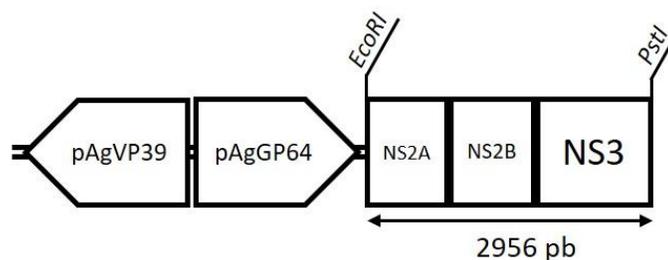


Figura 9. Representação esquemática da construção pFBYFVNS contendo a região codante dos genes não estruturais NS2A, NS2B e NS3 no YFV, e indicação das enzimas de restrição utilizadas na clonagem.

O cassete contendo todos os genes estruturais (C, prM e E) do YFV foi também amplificado a partir do cDNA do YFV previamente gerado, por PCR, utilizando as mesmas quantidades e programa de amplificação usado para amplificação dos genes não estruturais. Foram utilizados dois pares de primers distintos: o par pYFVCprMESal F e pYFVCprMEXma R foi utilizado para adição apenas dos sítios de restrição para as enzimas *SalI* e *XmaI*, enquanto o par de primers pCMEHistagSal F e pCMEHAtagXma R foram usados para adição também de caudas de histidina (6xHisTag) e hemaglutinina (HATag), respectivamente, com o objetivo de auxiliar na detecção da expressão e avaliar o impacto da adição de “Tags” na formação de possíveis VLPs. Os produtos de PCR gerados foram submetidos à separação eletroforética e eluídos como descrito anteriormente. A digestão enzimática foi realizada sequencialmente, devido a incompatibilidade entre os tampões das enzimas selecionadas. Primeiramente foi realizada a digestão por *XmaI* (New England BioLabs, Ipswich, EUA) “overnight” (6 µl de DNA ~365 ng/µl, 1 µl de *XmaI* (New England BioLabs, Ipswich, EUA), 5 µl tampão de reação 10X, completado para um volume final de reação de 50 µl), o produto da digestão foi então limpo utilizando o kit *ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) e em seguida submetido a digestão pela enzima *SalI* (Promega, Madison, EUA) “overnight” (25 µl de DNA, 1 µl de *SalI*, 5 µl tampão de reação 10X, 0,5 µl de BSA, completado para um volume final de reação de 50 µl).

O mesmo protocolo de digestão foi realizado com os plasmídeos FBpVP39pGP64 (contendo apenas a sequência dos promotores), quanto o plasmídeo pFBYFVNS (contendo os genes não estruturais do YFV). Os produtos de digestão foram então ligados, transformados e confirmados por digestão enzimática e sequenciamento como anteriormente para gerar quatro novos plasmídeos: pFBYFVCME contendo apenas os genes estruturais do YFV (Figura 10 A e C), e o pFBYFVNSCME contendo os genes não estruturais e estruturais do YFV (Figura 10B e Figura 11D).

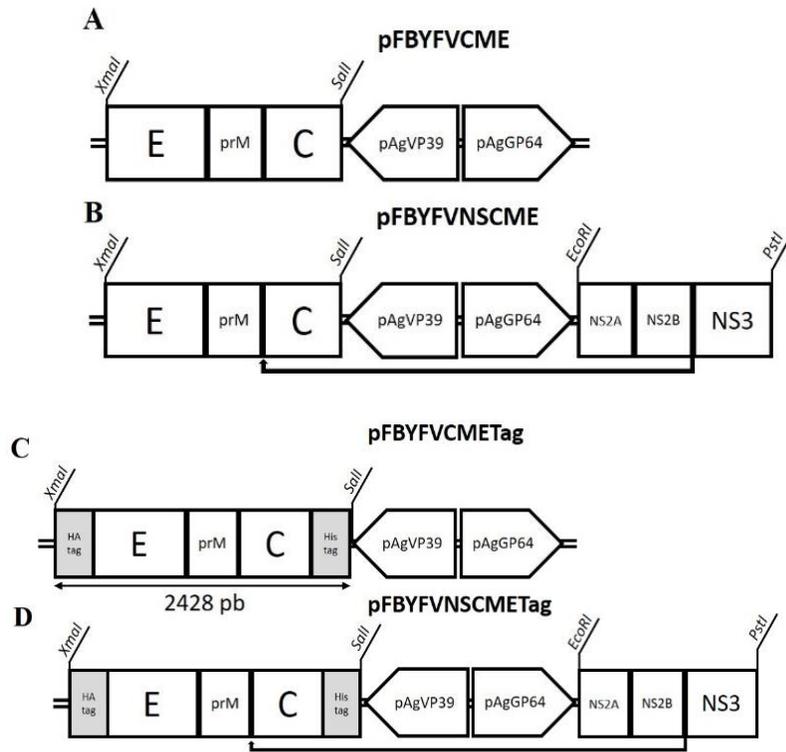


Figura 10. Representação esquemática dos plasmídeos vetores finais construídos para expressão dos genes estruturais e não estruturais do YFV, com e sem Tags peptídicas. A seta preta ligando a região NS2B/NS3 a junção C/prM indica o sítio de clivagem da protease.

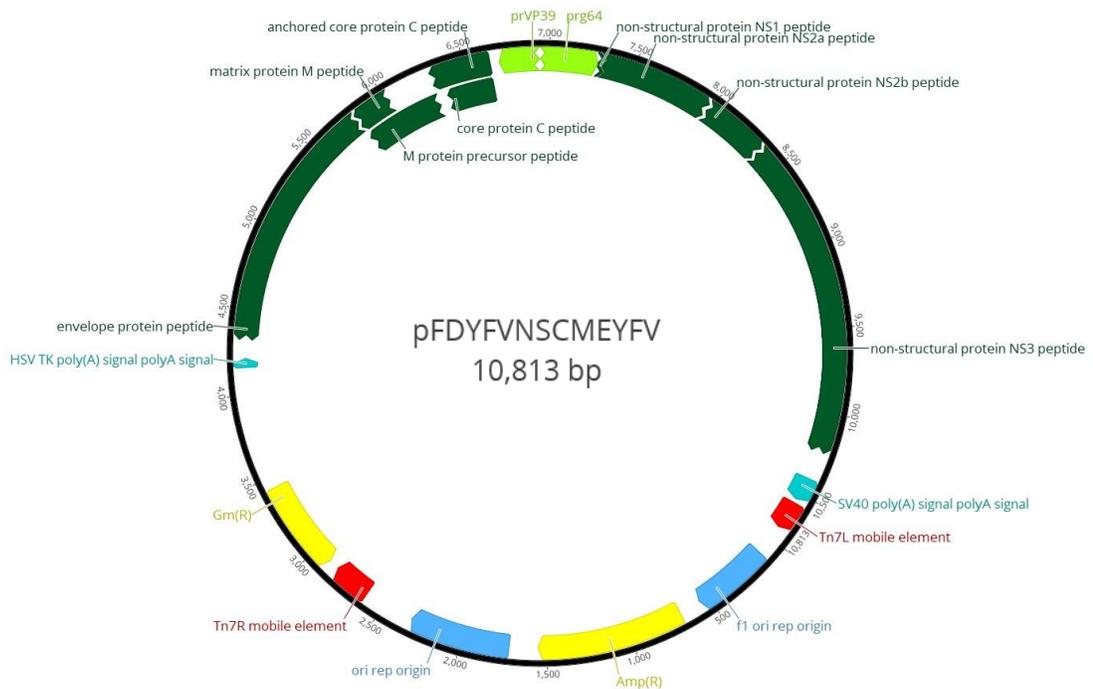


Figura 11. Esquemática do plasmídeo pFBYFVNSCME para expressão de proteínas estruturais e não estruturais do YFV. Está indicado o cassete de proteínas não estruturais (NS2A, NS2B e NS3) – verde escuro, sob o controle do promotor precoce prAgGP64 (verde claro), e o cassete estrutural (C, prM e E) – verde escuro, sob o controle do

promotor precoce/tardio prAgVP39 (verde claro). Estão indicados também: marcadores de resistência a ampicilina e gentamicina (amarelo), sítios Tn7R/Tn7L de transposição (vermelho), sinais de poliadenilação (SV40)pA e HSV TK – turquesa) e origem de replicação (azul claro). Criado com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia).

3.3 Construção dos vírus recombinantes para expressão de proteínas do YFV: transfecção, amplificação e titulação viral

Com todos os plasmídeos doadores pFastBac™ construídos, foi realizada então a formação dos baculovírus recombinantes para expressão heteróloga em células de inseto, utilizando o sistema Bac-to-Bac®, (Invitrogen, Carlsbad, USA) (Figura 11), de acordo com as especificações do fabricante. Os plasmídeos contendo as diferentes construções geradas (Figura 10) foram individualmente transformados em células DH10Bac™ aonde, a partir da síntese da enzima transposase pelo plasmídeo auxiliar (*Helper*), são reconhecidos os sítios de transposição mini-Tn7 do plasmídeo doador, e transposto para o sítio de destino mini-attTn7 no bacmídeo estavelmente transformado. Células transformadas foram incubadas em meio LB sólido contendo 10 µg/ml de tetraciclina, 7 µg/ml de gentamicina, 50 µg/ml de canamicina, 40 µg/ml de IPTG e 100 µg/ml de X-Gal. O bacmídeo recombinante gerado possui o gene *lacZ* interrompido pela inserção da sequência de interesse, possibilitando então a seleção azul e branco de colônias em que ocorreu a recombinação. Colônias brancas tiveram a presença do bacmídeo recombinante confirmada por PCR de colônias utilizando os primers M13F e M13R. Clones confirmados foram esgotados em meio sólido para eliminação de contaminantes não recombinantes pelo método “*streak plate*” (SANDERS, 2012) e o DNA de bacmídeos recombinantes foi então purificado como descrito em 3.2.1.

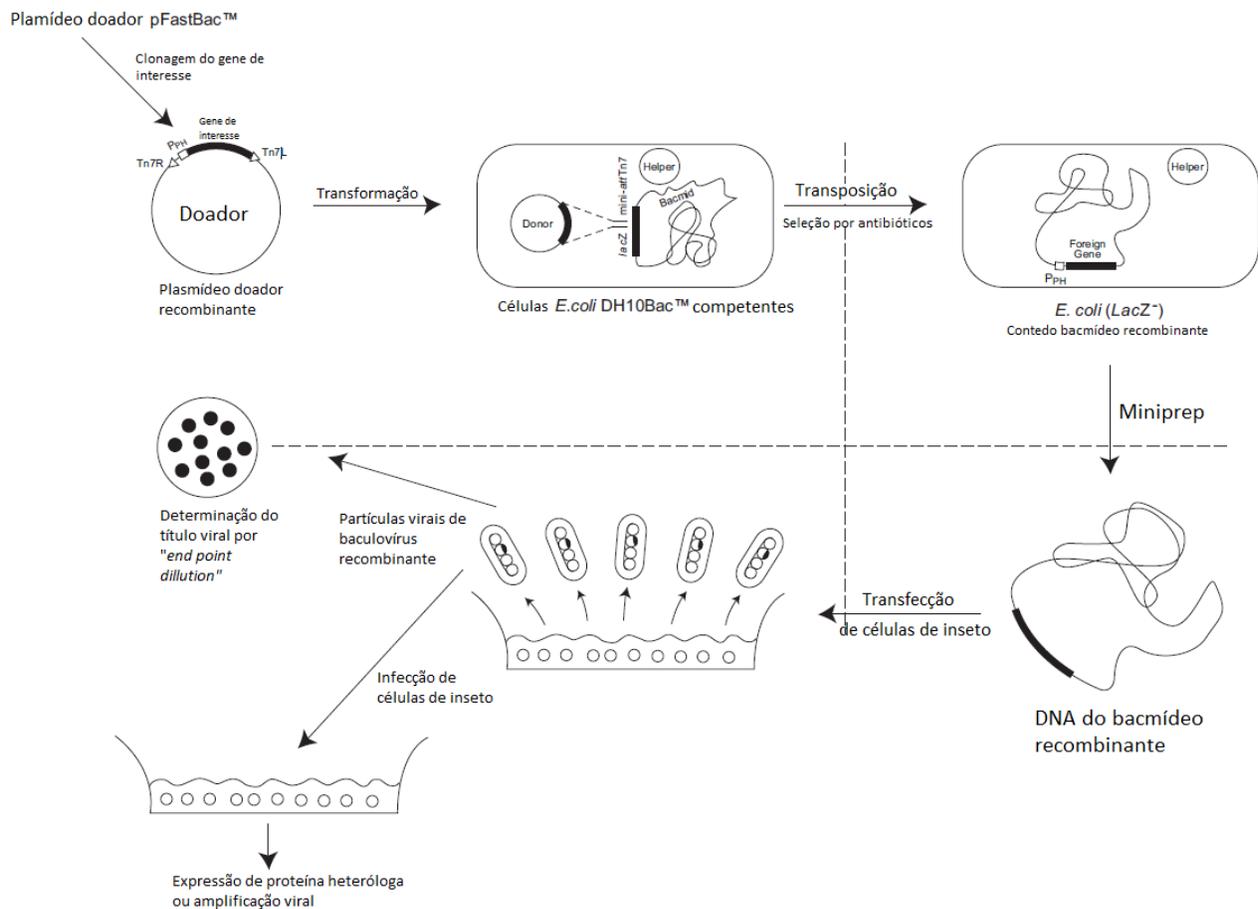


Figura 12. Esquemática mostrando as etapas do sistema Bac-to-Bac® (Invitrogen, Carlsbad, USA) para formação de baculovírus recombinantes. Adaptado de: *User Guide Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*, disponível em: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf.

Também foi utilizada a linhagem de células DH10Bac™*gp64-null* cedida pelo professor Gary W. Blissard da Universidade Cornell (EUA). Esta linhagem possui o gene *gp64*, responsável pela codificação da proteína de envelope viral essencial para a entrada e brotamento de BVs, deletada pela inserção do gene de resistência a cloranfenicol (CAT – Cloranfenicol acetil transferase) em seu *locus*. Isso foi feito com o objetivo de gerar baculovírus *gp64-null* que expressassem as proteínas heterólogas de interesse, sem que houvesse a formação de partículas virais brotadas como contaminante.

Para formação dos baculovírus recombinantes 6 µl do agente de transfecção FuGENE® HD (Promega, Madison, EUA) foi adicionado a 10 µl de DNA plasmidial purificado (100 ng/ µl) diluído em meio TC-100 para um volume final de 100 µl, incubado por 10 min em temperatura ambiente e adicionado a células Sf21 60% confluentes em placas para cultivo de célula 32,8 mm

(Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil). Após 7 dias de transfecção o sobrenadante da cultura, nomeado de P0, foi coletado e 200 µl usados para infectar células Sf21 80% confluentes em uma garrafa para cultivo de células de 75 cm² (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil). Setenta e duas h pós infecção (h p.i.), o sobrenadante da cultura, nomeado P1, foi coletado para titulação e uso como inóculo viral nos demais ensaios. A titulação viral foi realizada pelo método de “*End-point dilution*”, aonde placas de 96 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) foram semeadas com 1x10⁴ células/ml de células Sf9-ET em meio de cultura TC-100, e em seguida fileiras foram inoculadas com diluições crescentes de inóculo viral P1 (10⁻² a 10⁻⁸). Poços com células exibindo fluorescência (expressando eGFP) foram então contabilizados como infectados para determinação do título viral em 50% *Tissue Culture Infective Dose* (TCID₅₀) (REED; MUENCH, 1938). Todos os vírus gerados se encontram esquematizados na Figura 13.

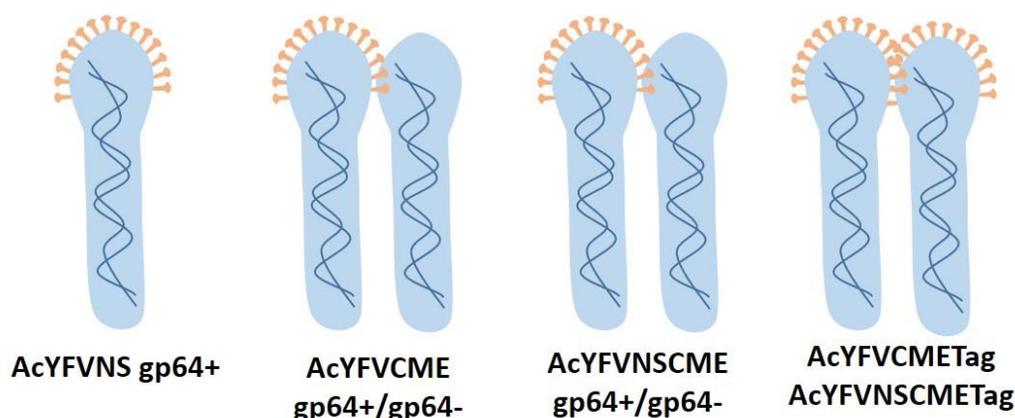


Figura 13. Representação dos vírus gerados no trabalho. AcYFVNS: vírus contendo genes somente de proteínas não estruturais do YFV; AcYFVCMETag gp64+/gp64-: vírus contendo genes somente de proteínas estruturais do YFV, com e sem o gene gp64; AcYFVNSCME gp64+/gp64-: vírus contendo genes de proteínas estruturais e não estruturais do YFV com e sem o gene gp64; AcYFVNSCME Tag/AcYFVNSCME Tag: vírus contendo genes das proteínas estruturais ou estruturais e não estruturais de YFV com 6xHIS e HA-tag.

3.4 Expressão de antígenos da febre amarela para produção de anticorpos policlonais

No trabalho também foi construído um plasmídeo contendo regiões específicas das proteínas C, prM e E do vírus da febre amarela. Este plasmídeo foi utilizado para expressão em sistema procariótico de uma proteína contendo regiões de proteínas estruturais do YFV fusionadas, com o objetivo de inoculação em camundongos para produção de anticorpos policlonais a serem utilizados nos ensaios de detecção desenvolvidos.

3.4.1 Construção do plasmídeo contendo regiões de proteínas estruturais do YFV

Foi sintetizado quimicamente, pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT; Iowa, EUA), um cassete contendo regiões selecionadas das proteínas estruturais do YFV fusionadas, contendo trechos hidrofílicos que facilitassem sua expressão heteróloga em sistema bacteriano (Figura 14).

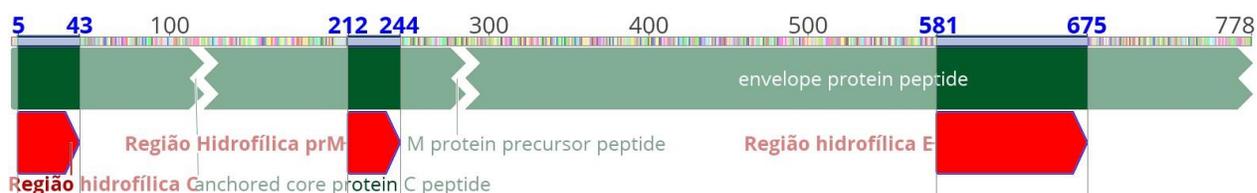


Figura 14. Esquemática mostrando a sequência de resíduos de aminoácidos das proteínas estruturais do YFV. Em verde está indicada a poliproteína estrutural completa do YFV (C, pr e E), enquanto em vermelho estão indicadas as regiões hidrofílicas, sem domínios transmembrana, selecionadas para expressão em sistema procaríoto. Criado com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia).

A sequência de nucleotídeos sintetizada foi amplificada utilizando os primers listados na Tabela 2, sendo adicionados sítios attB1 e attB2 para clonagem utilizando o sistema Gateway™ (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do cassete contendo porções das proteínas estruturais do YFV.

Nome	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')
CprME FUSIONattB1 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTCTGG TCGTAAAGCG
CprME FUSIONattB2 R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAATGGTG ATGGTGATGGT

A clonagem molecular foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. Inicialmente, foi realizada a reação de recombinação BP para inserção do cassete no plasmídeo pDONR™207 (Invitrogen, Carlsbad, USA) da seguinte forma: 3 µl de produto de PCR-attB (~150 ng de DNA) foi adicionado a 1 µl (~500 ng de DNA) do plasmídeo pDONR™207, completado para 8 µl com tampão TE (pH 8.0) e então incubado com 0,5 µl da enzima BP Clonase™ II por 1

h à temperatura ambiente. A reação foi então interrompida com 1 µl da solução de proteinase K por 10 min a 37°C. A transformação foi realizada por eletroporação com 2 µl da reação como descrito anteriormente, e transformantes incubados com o marcador de seleção de gentamicina (7 µg/ml). Clones foram confirmados por PCR de colônias e digestão enzimática, e o DNA plasmidial de um clone foi purificado como descrito em 3.2.1 e nomeado como pDONR™207CprMEFUSION, sendo usado para reação LR. A reação LR para transposição para o plasmídeo de destino foi realizada incubando 1 µl (~150 ng) do plasmídeo pDONR™207 com 2 µl do vetor de destino pDEST™17 (Invitrogen, Carlsbad, USA), 2 µl da enzima LR clonase, completado para 10 µl com tampão TE. A reação foi incubada *overnight* à temperatura ambiente, interrompida com 1 µl de solução de proteinase K, assim como na reação BP, e 2 µl foram transformados em células competentes. Colônias crescidas com o marcador de seleção (ampicilina 100 µg/ml) foram confirmadas como clones por PCR de colônia e o plasmídeo resultante foi nomeado de pDEST™17CprMEFUSION (Figura 15), e confirmado por digestão enzimática.

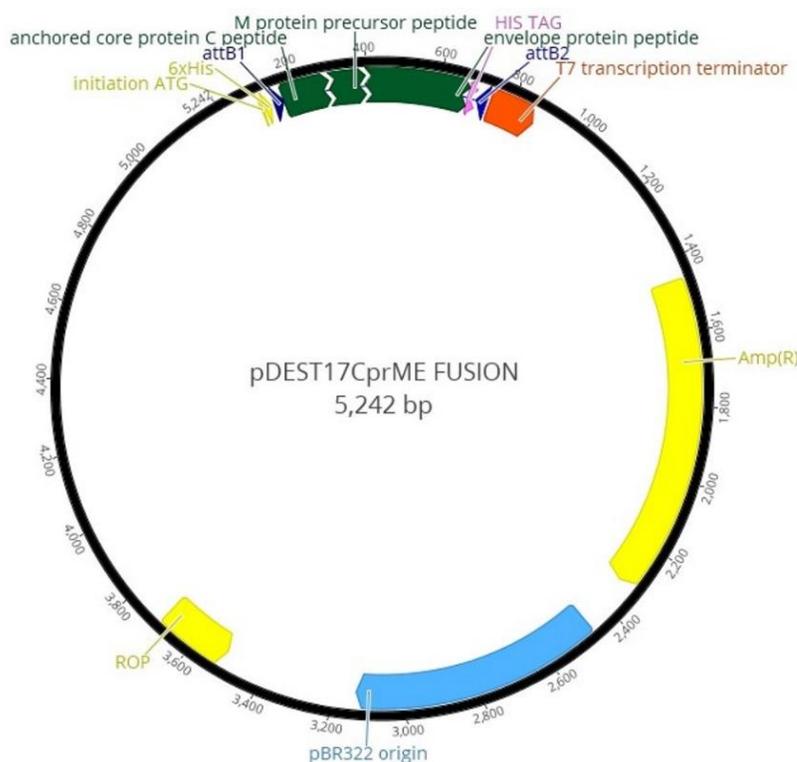


Figura 15. Representação esquemática do plasmídeo pDEST17CprMEFUSION. Estão destacados em verde os domínios da proteína C, prM e E fusionados que foram selecionados para expressão. Também é possível observar as caudas de histina presentes no N- e C-terminal da proteína (rosa e amarelo). Estão também indicados os sítios attB de transposição (azul escuro), terminador de transcrição T7 (laranja), origem de replicação (azul claro), e gene de resistência a ampicilina (Amp). Criado com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia).

O plasmídeo pDEST™17CprME FUSION, contendo o cassete de interesse fusionado a sequência de 6xHisTag contida no plasmídeo, foi então transformado por choque térmico como descrito em (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) em células Rosetta-gami™ 2(DE3) pLysS (Novagen) quimiocompetentes. Transformantes crescidos com as marcas de seleção (ampicilina 100 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml e cloranfenicol 25 µg/ml) foram confirmadas por PCR de colônias e alíquotas estocadas a -80°C.

3.4.2 Expressão de proteínas em células de *E. coli* Rosetta-Gami

Para expressão da proteína contendo epítomos fusionados das proteínas estruturais do YFV foi inicialmente crescido um pré-inóculo em 10 ml de meio LB líquido, contendo ampicilina 100 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml e cloranfenicol 25 µg/ml *overnight* a 37°C. Este pré-inóculo foi então utilizado para inocular 100 mL de meio LB líquido, e a OD600 aferida a cada 30 min até atingir o valor de 0,6, momento no qual a expressão foi induzida utilizando IPTG em uma concentração final de 1mM. Foram coletadas frações de 1 mL de 1 em 1 h até 4 h pós indução, e o volume remanescente coletado, centrifugado a 5,000 g por 7 min e armazenado a -20°C.

3.4.3 Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel

Para purificação desnaturante por cromatografia de afinidade, foi utilizada a coluna HIS-Select Nickel Affinity Gel® (Sigma Aldrich) para captura de proteínas com 6xHis *tag*. Os precipitados de células foram lisados utilizando homogeneizador ultrassônico (Bandelin Sonoplus HD 2070) para purificação de proteínas, através de 5 ciclos de sonicação por 15 segundos em 30% de potência, diluídos em 10 ml de tampão de ligação (50 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM imidazol, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 6 M uréia e 1 mM PMSF). A coluna foi preparada com lavagem com 3 volumes de água deionizada, seguida de lavagem com um volume de tampão de eluição (50 mM Tris-Cl pH 8,0, 300 mM imidazol, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 6 M uréia e 1 mM PMSF), equilibrada com 5 volumes de tampão de ligação. Em seguida foi adicionada o lisado celular, lavado com 2 volumes de tampão de lavagem (50 mM Tris-Cl pH 8,0, 60 mM imidazol, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 6 M uréia e 1 mM PMSF) e finalmente eluído em 3 ml de tampão de eluição. As proteínas purificadas foram então concentradas utilizando a coluna Vivaspin® 6 10 kDa MWCO

(GE Healthcare), de acordo com indicações do fabricante, e ressuspendidas em 1 ml de tampão fosfato salino 1X (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4). As proteínas purificadas foram então quantificadas por densitometria em gel de SDS-PAGE utilizando a ferramenta do *software* ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, USA).

3.5 Avaliação da expressão de proteínas recombinantes

3.5.1 SDS-PAGE e *Western Blot*

A avaliação da expressão das proteínas recombinantes foi realizada analisando as proteínas presentes no extrato total de células infectadas, e da porção do sobrenadante após ultracentrifugação, submetidas a separação eletroforética em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio - SDS 12% (SDS-PAGE), e *Western blot*.

Os géis de poliacrilamida foram preparados utilizando o aparato Mini-PROTEAN 3 system[®] (Bio-Rad) de acordo com as indicações do fabricante. Para avaliação de proteínas totais nas amostras o gel foi corado e fixado utilizando solução de 0,1% Comassie[®] Azul brilhante G 250 em solução de 10% ácido acético e 40% metanol, sob agitação por 2 h, seguido de tratamento com solução descorante de 40% metanol e 10% ácido acético.

As proteínas separadas nos géis utilizados para *western blot*, foram transferidas para membrana de PVDF Amersham Hybond P 0.45 (GE Healthcare) utilizando o equipamento Trans-Blot[®] Turbo[™] (Bio-Rad) de acordo com indicações do fabricante e, utilizando o tampão de transferência *Bjerrum Schafer-Nielsen* sem SDS (48mM Tris, 39mM glicina, 20% metanol). Após a transferência, a membrana foi lavada 1 vez com PBS e em seguida bloqueada por 2 h em solução 3% BSA em PBS, e então incubada com o anticorpo primário apropriado diluído em PBS com 0,5% BSA *overnight* a 4°C. Após a incubação com anticorpo primário a membrana foi lavada 3 vezes por 15 min sob agitação leve com tampão PBS mais 0,05% Tween (PBST) e em seguida incubada com o anticorpo secundário apropriado conjugado à enzima fosfatase alcalina por 1 h, lavada novamente 3 vezes com PBST por 15 min. A revelação foi feita utilizando o substrato BCIP/NBT (Promega, Madison, EUA), ou o substrato Novex[™] AP *Chemiluminescent Substrate* (Invitrogen, Carlsbad, USA), ambos de acordo com as indicações do fabricante.

3.5.2 Microscopia ótica, ensaio de indução de fusão e complementação

Todas as análises de microscopia ótica e fluorescência foram realizadas utilizando o microscópio invertido AxioVert 100 (Zeiss).

A avaliação da capacidade de indução de fusão de membranas celulares da proteína de envelope do YFV, e o papel da complementação das proteínas não estruturais na formação de sincícios (células multinucleadas) foi realizado como descrito abaixo.

Uma placa de cultura de células de 24 poços (TPP, Tchno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça) foi semeada com células Tn5B, com a mesma quantidade de células por poço, permitidas aderir por 12 h, e quantidade de células por poço estimada utilizando a ferramenta de área e contagem de células do software Zen 3.1 Blue (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Munique, Alemanha). Células foram então infectados em triplicatas com multiplicidade de infecção (MOI) 5 com os vírus AcYFVNS, AcYFVCME ou AcYFVNSME apenas. Após 24, 48 e 72 h p.i. foram adquiridas imagens de 3 campos escolhidos aleatoriamente das três triplicatas biológicas para cada tratamento. Um quadrado com arestas de 200 μm foi selecionado de cada micrografia, dentro do qual todas as células individuais e sincícios foram contados manualmente utilizando a ferramenta de contagem do *software* Zen 3.1 Blue (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Munique, Alemanha). O total de cada tratamento, em cada tempo, foi compilado para o cálculo da porcentagem que sincícios representavam do total de células nos campos. Para comparação entre as médias foi realizado o teste T de Student pareado entre os mesmos tempos de tratamento dos vírus AcYFVCME e AcYFVNSCME. A elaboração dos gráficos e análise estatística foram realizadas usando o *software* GraphPad Prism versão 7 (GraphPad Prism Software Inc, La Jolla, Califórnia, EUA).

3.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão

A avaliação da formação de possíveis VLPs de YFV foi realizada através de análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células Tn5B infectadas, e por contrastação negativa do meio de cultura sobrenadante. Os sobrenadantes de culturas infectadas foram clarificados 72 h p.i por centrifugação (5000 g por 6 min) e então ultracentrifugados através de colchão de sacarose 25% em PBS (p/v) a 90000 x g por 1:30 h". Os precipitados obtidos foram ressuspensos em PBS, em seguida foram adsorvidos em telas de níquel revestidas por carbono por 15 min, contrastadas em 2% ácido fosfotúngstico (PTA) por 6 min, lavadas em uma gota de

água “*milliq*”, e permitidas secar por 6 h antes de observação pelo MET Jeol 1011, 80 kV. A análise das dimensões das partículas encontradas no sobrenadante de cultura foi realizada usando o *software* ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, USA), sendo medido o diâmetro de um total de 124 partículas e os gráficos construídos utilizando o *software* GraphPad Prism versão 7 (GraphPad Prism Software Inc, La Jolla, Califórnia, EUA).

Células Tn5B (24 h p.i.) foram coletadas por centrifugação a 4000 x g por 6 min, lavadas 2 vezes com PBS pH 7,4 e em seguida fixadas *overnight* a 4°C em fixador Karnovsky (glutaraldeído 2%, formaldeído 2%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4). Após fixação, as células foram centrifugadas a 5000 x g por 5 min, lavadas duas vezes por 5 min com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, e em seguida pós-fixadas em solução de 1% tetróxido de ósmio e 1% ferrocianeto de potássio em 0,1 M tampão cacodilato de sódio pH 7,4, logo após lavadas 3 vezes em água “*milliQ*”. As células foram então contrastadas *in bloc* em solução de 2% acetato de uranila a 4°C *overnight*, desidratadas e concentrações crescentes de acetona por 15 min cada (30% 50% 70% 90% e duas vezes em 100%), seguidamente incluídas em concentrações crescentes da resina Spurr (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 razão acetona:resina) e finalmente em resina pura e emblocadas a 65°C por 72 h. Amostras emblocadas foram cortadas em sessões ultrafinas utilizando o ultramicrotomo Leica EM UC 7, colocadas sob telas de níquel e visualizadas no MET Jeol 1011, 80 kV.

4. Resultados

4.1 Confirmações de clonagens e construção dos plasmídeos de transferência pFBpVP39pGP64, pFBDYFVNS, pFBDYFVCME e pFBDYFVNSCME

Para a construção do vetor de transferência modificado pFBpVP39pGP64, o amplicon com as sequências promotoras prVP39 e prGP64 para controle da expressão de genes heterólogos utilizando um mesmo baculovírus recombinante foi amplificada por PCR a partir de DNA sintetizado (IDT) utilizando como base as sequências dos promotores dos genes *vp39* e *gp64* do baculovírus AgMNPV, gerando um fragmento de DNA de 580 pares de bases. Este vetor visa a expressão de dois genes em sequência durante a infecção de células de inseto: na fase inicial ou precoce da infecção pelo promotor do gene precoce *gp64* que forma a proteína de envelope do baculovírus, seguido pela fase precoce atrasada e tardia da infecção, quando inicia-se a expressão a partir do promotor tardio do gene estrutural de capsídeo de baculovírus *vp39*. O amplicon foi

clonado no vetor pFastBac™ Dual (Invitrogen, Carlsbad, USA), utilizando as enzimas de restrição *SphI* e *HindIII* em ambos elementos. Esta digestão resulta na excisão dos promotores muito tardios prPOLH e prP10 originais do plasmídeo comercial pFastBac™ Dual. A construção foi confirmada pela reação de digestão do plasmídeo com as enzimas de restrição *XbaI* e *EcoRI*, sendo liberados segmentos de DNA dos tamanhos esperados de 5139 pb e 344 pb, e com as enzimas *XbaI* e *Sall*, gerando as bandas dos tamanhos esperados de 5244 pb e 239 pb (Figura 16).

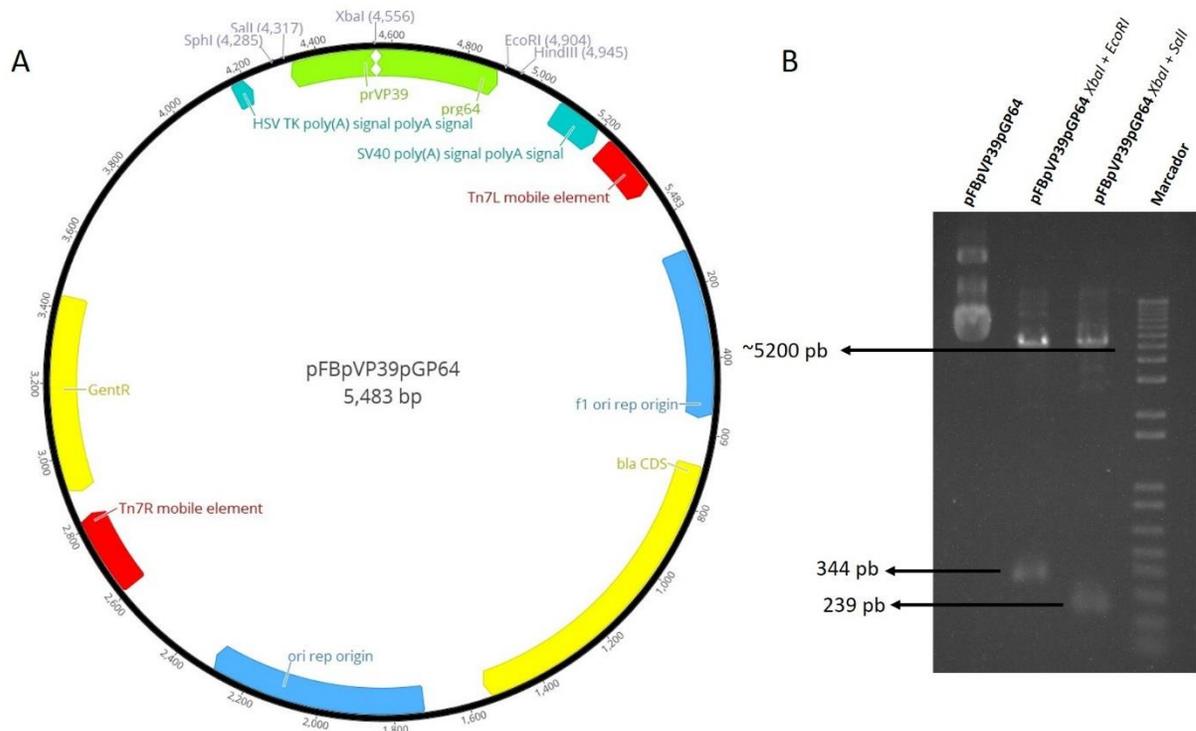


Figura 16. A: Mapa vetor do plasmídeo pFBpVP39pGP64. Em destaque estão as seqüências dos promotores pVP39 e pGP64 em verde, assim como os sítios de restrição usados para clonagem (*SphI* e *HindIII*) e os sítios utilizados para digestões de confirmação (*XbaI*, *EcoRI* e *Sall*) - Criado com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia). B: Perfil de digestão de confirmação analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a liberação de segmentos DNA de tamanhos esperados.

A seqüência dos genes não estruturais NS2A, NS2B e NS3 do YFV foram amplificadas por PCR, utilizando o cDNA viral como molde, e clonados sob o controle do promotor precoce do baculovírus AgMNPV pGP64, gerando plasmídeo pFBDYFVNS. A confirmação da construção do plasmídeo foi realizada por digestão utilizando a enzima de restrição *HindIII*, liberando as bandas de tamanhos 2140 pb e 6291 pb, e com a enzima *BglII* liberando as bandas de tamanhos 476 pb,

1096 pb, 3375 pb e 3494 pb, assim como o esperado (Figura 17). O plasmídeo gerado também teve sua sequência confirmada por sequenciamento Sanger.

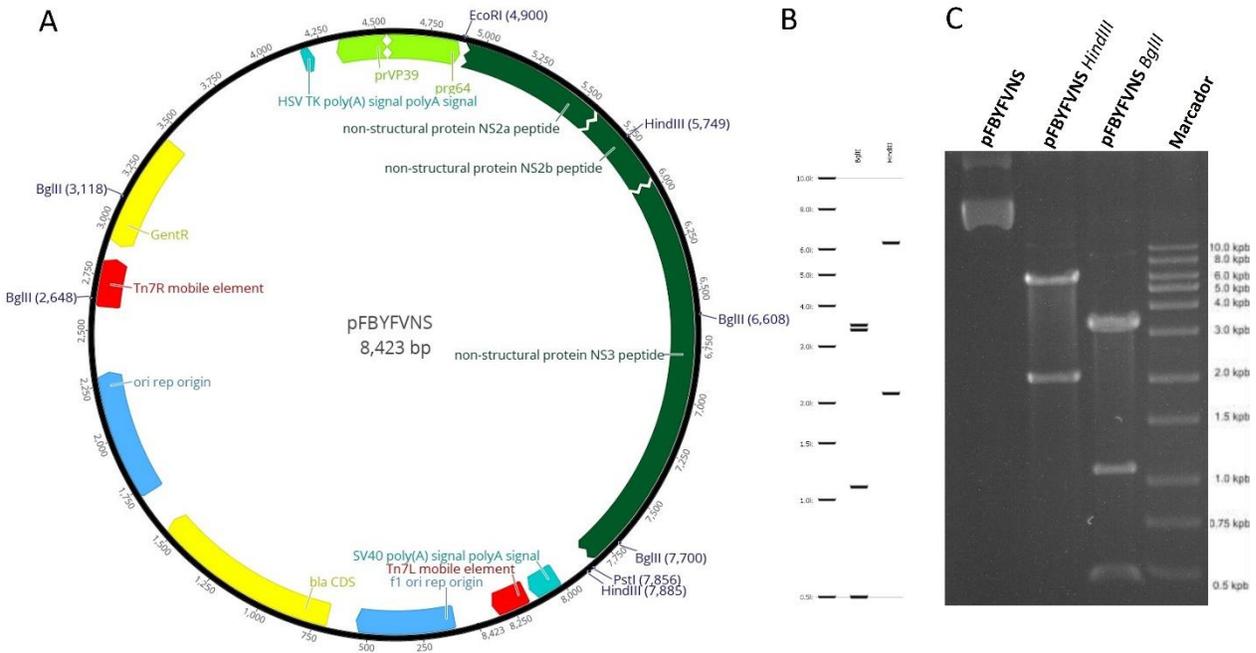


Figura 17. Confirmação da clonagem dos genes não estruturais do YFV no plasmídeo pFBpVP39pGP64. A: Mapa vetor do plasmídeo pFBYFVNS. Em destaque estão as sequências dos genes não estruturais do YFV NS2A, NS2B e NS3 em verde, assim como os sítios de restrição usados para clonagem (*Pst*I e *Eco*RI) e os sítios utilizados para digestões de confirmação (*Hind*III e *Bgl*II). B: Simulação *in silico* do perfil de digestão com as enzimas de restrição selecionadas. Criados com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia). C: Perfil de digestão de confirmação analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a liberação de segmentos de DNA de tamanhos esperados.

As construções contendo a sequência dos genes estruturais do YFV (C, prM e E) foram gerados a partir de subclonagem tanto no plasmídeo pFBpVP39pGP64, quanto no plasmídeo pFBYFVNS. Isso foi feito como forma de avaliar o papel da expressão das proteínas não estruturais virais (NS2A, NSB e NS3), em particular a protease viral, na formação de VLPs.

A confirmação do plasmídeo pFBYFVNSCME foi feita por digestão enzimática com a enzima *Bgl*II gerando os fragmentos de DNA de 7395 pb e 474 pb, e com a enzima *Eco*RI resultando em fragmentos de 5073 pb e 2796 pb, como esperado a partir de simulação de digestão *in silico* (Figura 18, A-C). Também foi confirmada a sequência do plasmídeo por Sequenciamento Sanger. O plasmídeo pFBYFVNSCME foi também confirmado por digestão enzimática com a enzima *Bgl*II (fragmentos gerados de 474 pb, 1096 pb, 3375 pb e 5884 pb) e com a enzima *Eco*RI (fragmentos gerados de 2796 pb e 8025 pb) (Figura 18, D-F).

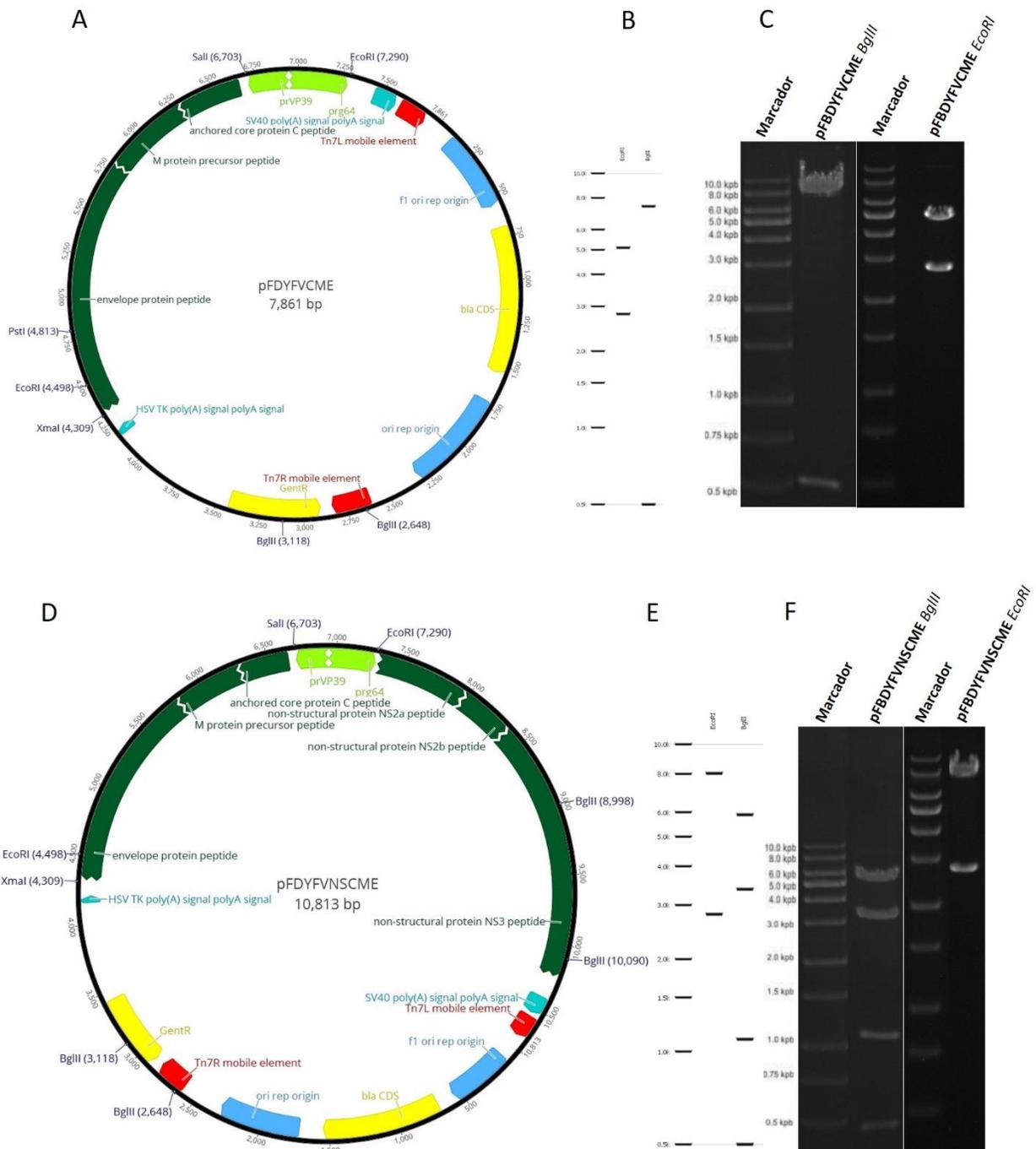


Figura 18. Confirmação da clonagem dos genes estruturais de YFV nos plasmídeos pFBpVP39pGP64 e pFB DYFVNS. A: Mapa vetor do plasmídeo pFDYFVCMC. Em destaque estão as sequências dos genes estruturais do YFV C, prM e E em verde, assim como os sítios de restrição usados para clonagem (*Sall* e *XmaI*) e os sítios utilizados para digestões de confirmação (*BglII* e *EcoRI*). B: Simulação in silico do perfil de digestão com as enzimas de restrição selecionadas.

Criados com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia). C: Perfil de digestão de confirmação analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a liberação de segmentos de DNA de tamanhos esperados. D: Mapa vetor do plasmídeo pFDYFVNSCME, em verde as sequências dos genes estruturais (C, prM e E) sob o controle do promotor precoce/tardio pVP39 e os genes não estruturais (NS2A, NS2B e NS3) sob controle do promotor precoce pGP64. E: Simulação in silico do perfil de digestão com as enzimas de restrição selecionadas Criados com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia). F: Perfil de digestão de confirmação analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a liberação de segmentos de DNA de tamanhos esperados.

4.2 Formação do vírus recombinante, ensaios de infecção e avaliação de indução de fusão celular

Os plasmídeos gerados foram utilizados para construção de baculovírus recombinantes utilizando o sistema Bac-to-Bac[®] (Invitrogen, Carlsbad, USA), como descrito no item 3.3. A infecção de células Tn5B por baculovírus AcMNPV recombinantes resultam na ocorrência de efeitos citopáticos de infecção pelo vírus, sendo possível observar a partir de 24 h p.i hipertrofia nuclear associada à replicação viral, e a redução das projeções citoplasmáticas e arredondamento das células.

Infecção pelo baculovírus recombinante AcYFVNS, expressando somente as proteínas não estruturais (NS2A, NS2B e NS3) do YFV, apresentaram apenas efeitos citopáticos clássicos de baculovírus descritos acima, sem aumento aparente de ocorrência de morte celular ou outras alterações morfológicas (Figura 19, A painel superior). Interessantemente, infecções pelo baculovírus recombinante AcYFVCME expressando somente as proteínas estruturais (C, prM e E) do YFV, ocasionou uma indução de fusão da membrana plasmática entre células, dando origem a sincícios multinucleados contendo em torno de 2 a 4 núcleos por célula. Esse efeito foi observado a partir de 48 h p.i. sendo observado em maior quantidade 72 h p.i. (Figura 19, A painel do meio).

Infecções em células Tn5B com o vírus AcYFVNSCME, expressando precocemente as proteínas não estruturais e de forma precoce/tardia as proteínas estruturais do YFV, levou a indução exacerbada da fusão entre células, aparente já a partir de 24 h p.i., e se intensificando em 48 h p.i.. Após de 72 h de infecção a maior parte das células na cultura se encontravam fusionadas em sincícios contendo uma grande quantidade de núcleos por célula (Figura 19, A painel inferior, e Figura 20).

A porcentagem de sincícios do total de células contabilizadas, como descrito no item 3.5.2, mostrou a maior indução de formação de sincícios quando coexpresso ambas proteínas estruturais e não-estruturais (Figura 19, B).

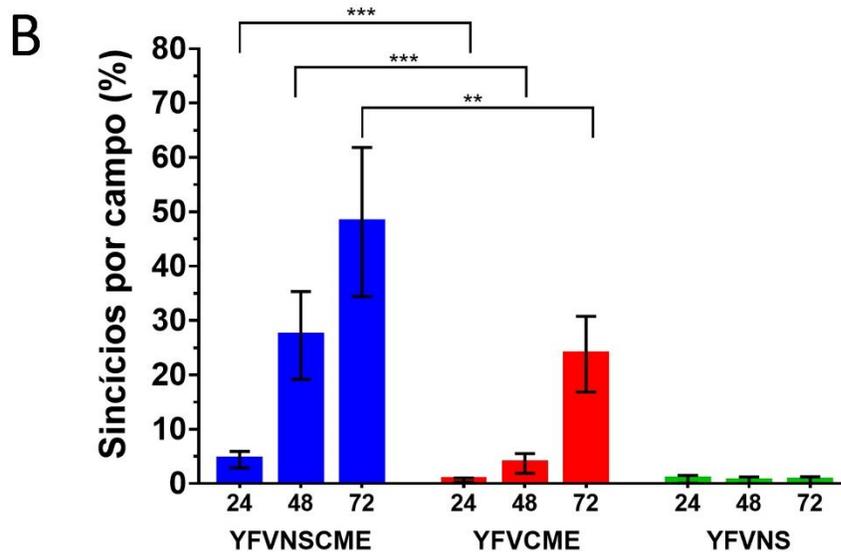
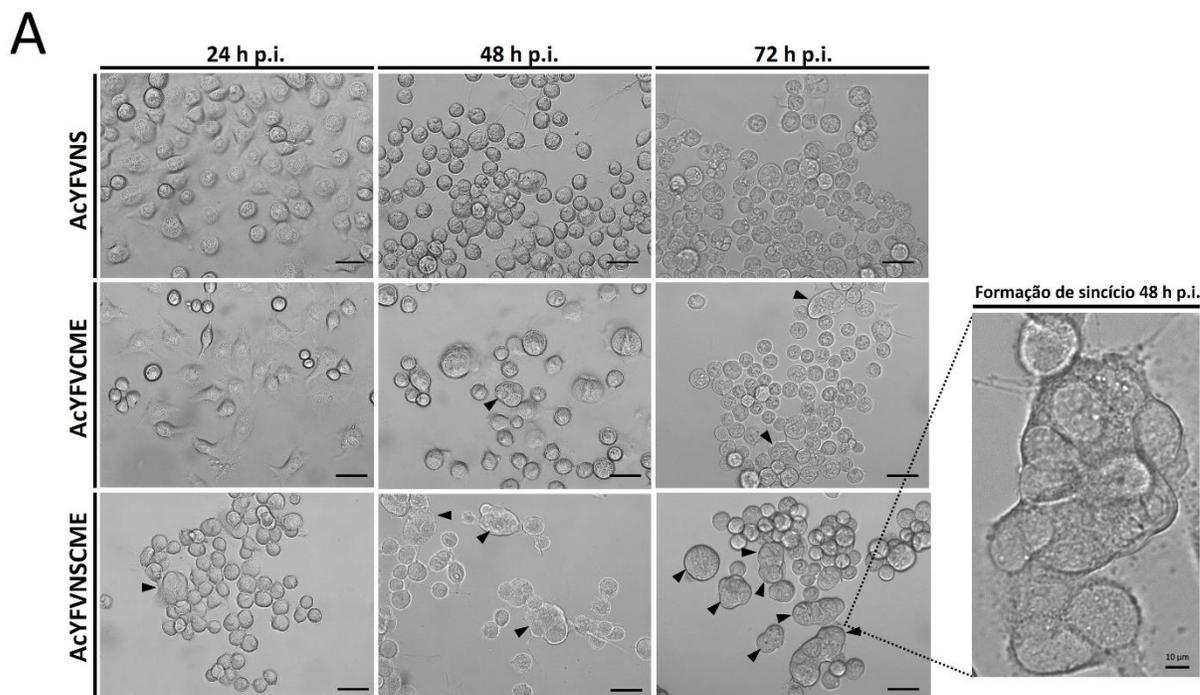


Figura 19. Cinética de efeitos citopáticos observados após infecção de células Tn5B por baculovírus recombinantes em MOI 10. A: O painel superior mostra a evolução da infecção de células pelo baculovírus AcYFVNS (expressando apenas as proteínas não estruturais NS2A, NS2B e NS3), sendo possível observar apenas os efeitos citopáticos usuais de infecção por baculovírus. Painel do meio mostra infecção pelo vírus AcYFVCME (expressando apenas as proteínas estruturais C, prM e E), aonde houve a indução pouca fusão celular, com sincícios indicados pelas setas pretas. Painel inferior mostra a infecção pelo vírus AcYFVNSCME expressando proteínas estruturais e não estruturais, ocasionando forte indução de fusão celular e grandes sincícios multinucleados indicados por setas pretas. Um sincício com grande número de núcleos se encontra destacado em maior aumento. Barra de escala - 50 µm. B: quantificação da fusão celular pela porcentagem de células fusionadas por campo, indicando diferenças estatisticamente significativas. **/* = $P < 0.005$.

A análise de células infectadas com o vírus AcYFVNSCME gp64- 72 h p.i. por microscopia de fluorescência, após tratamento com o marcador de ácido nucleico Hoechst 3358, confirma a presença de grandes sincícios com múltiplos núcleos (Figura 20).

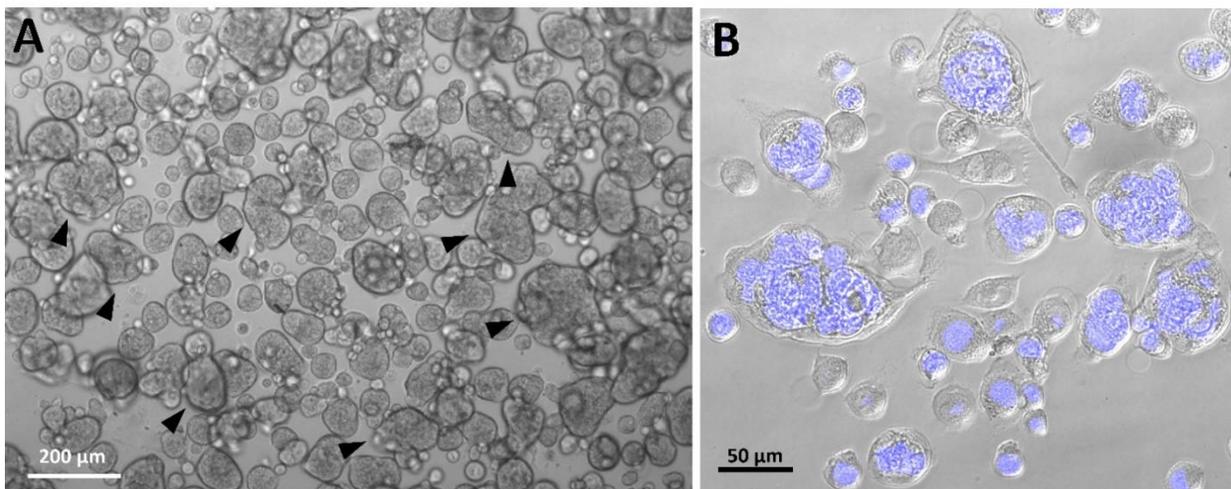


Figura 20. Indução severa de fusão de membrana de células Tn5B por infecção em MOI 10 pelo vírus AcYFVNSCME 72 h p.i. A: Células infectadas com o vírus contendo o gene gp64, codificador da proteína essencial para produção de BVs (AcYFVNSCME gp64+). Cultura de células aonde a grande maioria das células estão fusionadas, setas pretas indicam alguns sincícios de maior dimensão. B: Células infectadas com o vírus sem o gene gp64 (AcYFVNSCME gp64-). Sincícios observados em maior aumento sob microscopia de fluorescência com marcação nuclear em azul, indicando a presença de múltiplos núcleos por célula.

A observação da formação de sincícios em células infectadas pelos vírus recombinantes, é forte indício da expressão e clivagem da poliproteína CprME, sendo mais provável que a fusão de membrana ocorra devido à proteína E do envelope de YFV, que possui atividade fusogênica. A observação de que a coexpressão das proteínas não estruturais NS2A, NS2B e NS3 do YFV leva a um aumento drástico na formação de sincícios indica que estas últimas auxiliaram no processamento pós-traducional da poliproteína estrutural, resultando na formação de proteínas maduras associadas a indução de intensa fusão de membranas.

A mesma atividade de indução de fusão celular foi observada quando células Tn5B foram infectadas com vírus AcYFVNSCME gp64- nas mesmas condições de multiplicidade de infecção (Figura 20, B). Entretanto foi optado pela utilização do vírus AcYFVNSCME gp64+ no restante dos ensaios pela limitação da produção de títulos elevados do vírus deletado em células Sf^{OP1D}.

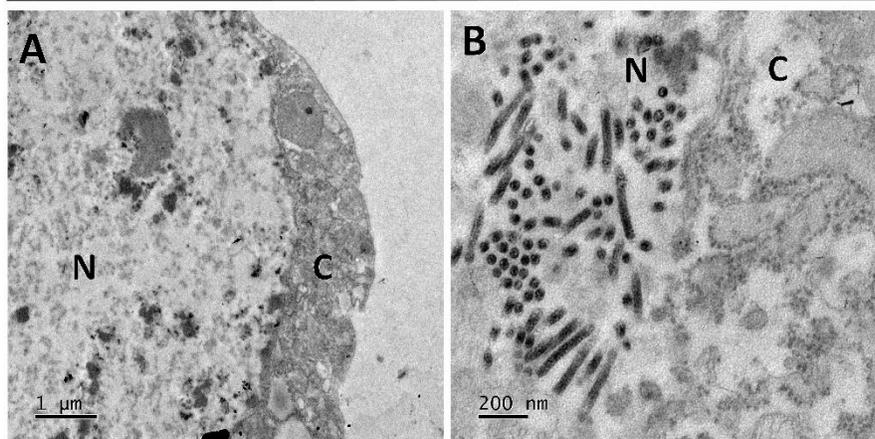
4.3 Avaliação da formação de VLPs por microscopia eletrônica de transmissão e contrastação negativa

Para análise das alterações morfológicas intracelulares decorrentes da expressão heteróloga de proteínas do YFV, e avaliação de possíveis estruturas associadas a formação de VLPs, células infectadas com o vírus recombinante AcYFVNSMCE foram submetidas a processamento para visualização em microscopia eletrônica de transmissão.

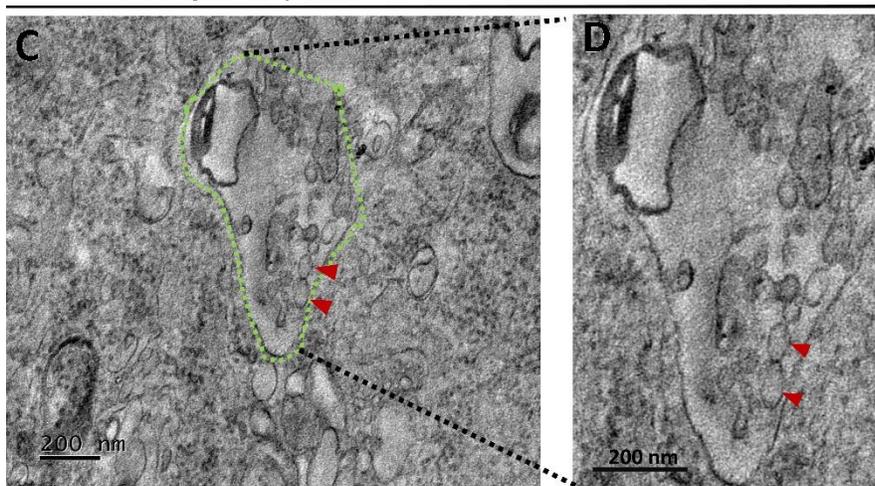
Células coletadas 48 h p.i. não tiveram sua estrutura e morfologia preservada após o processamento, sendo possível identificar com clareza majoritariamente estruturas nucleares associadas a replicação e formação de partículas virais de baculovírus (Figura 21, A e B). Isso possivelmente pode ter ocorrido em função da fragilização de membranas plasmáticas decorrentes do processo de fusão celular, já bem disseminado neste momento da infecção.

Células coletadas e processadas 24 h p.i. resistiram ao processamento e mantiveram sua morfologia conservada. Foi possível identificar a hipertrofia nuclear, assim como a formação de BVs do AcMNPV recombinante. No citoplasma celular foram identificadas estruturas membranosas internas, dentro das quais havia a formação de partículas circulares com as dimensões aproximadas do YFV de 50 nm (Figura 21, C e D). Possivelmente as estruturas observadas podem estar relacionadas ao sítio de síntese proteica e montagem de VLPs associadas ao retículo endoplasmático, de forma análoga ao que acontece durante a montagem de partículas virais de flavivirus durante a infecção (ARAKAWA; MORITA, 2019). Na membrana plasmática destas células também foi possível observar o aparente brotamento de estruturas circulares de dimensões similares (Figura 21, E e F).

Alterações celulares causadas por baculovírus



Formação de partículas em estruturas membranasas



Brotamento de partículas de membrana

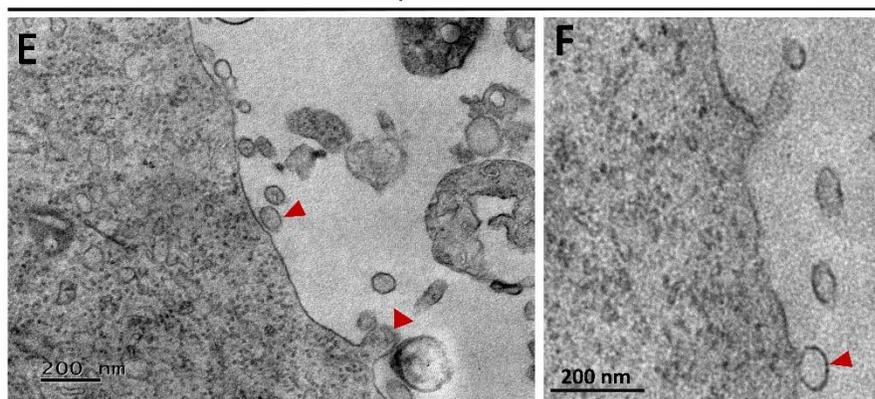


Figura 21. Infecção e formação de vesículas em compartimento membranosos intracelular e na membrana plasmática. A e B mostram alterações celulares causadas por baculovírus, com hipertrófica nuclear e formação de ODVs. N= núcleo, C= Citoplasma. C: pontilhado verde demarca compartimento membranosos intracelular dentro do qual ocorre a aparente formação de vesículas circulares de diâmetro aproximado de partículas do YFV (setas vermelhas). D: maior

aumento das estruturas mostradas em C. E e F: associação de vesículas de dimensões similares as observadas em formação intracelular à membrana plasmática.

O sobrenadante de cultura de células infectadas com o vírus AcYFVNSCME foi coletado 72 h p.i. e submetido a ultracentrifugação em colchão de sacarose para observação de partículas formada por contrastação negativa. No meio de cultura foram identificadas em grandes quantidades estruturas de diâmetro similar aquelas observadas em formação em estruturas membranosas intracelulares, e em aparente brotamento da membrana plasmática. Também foram observadas vesículas de menor dimensão, assim como partículas de BVs (Figura 22).

Sobrenadante

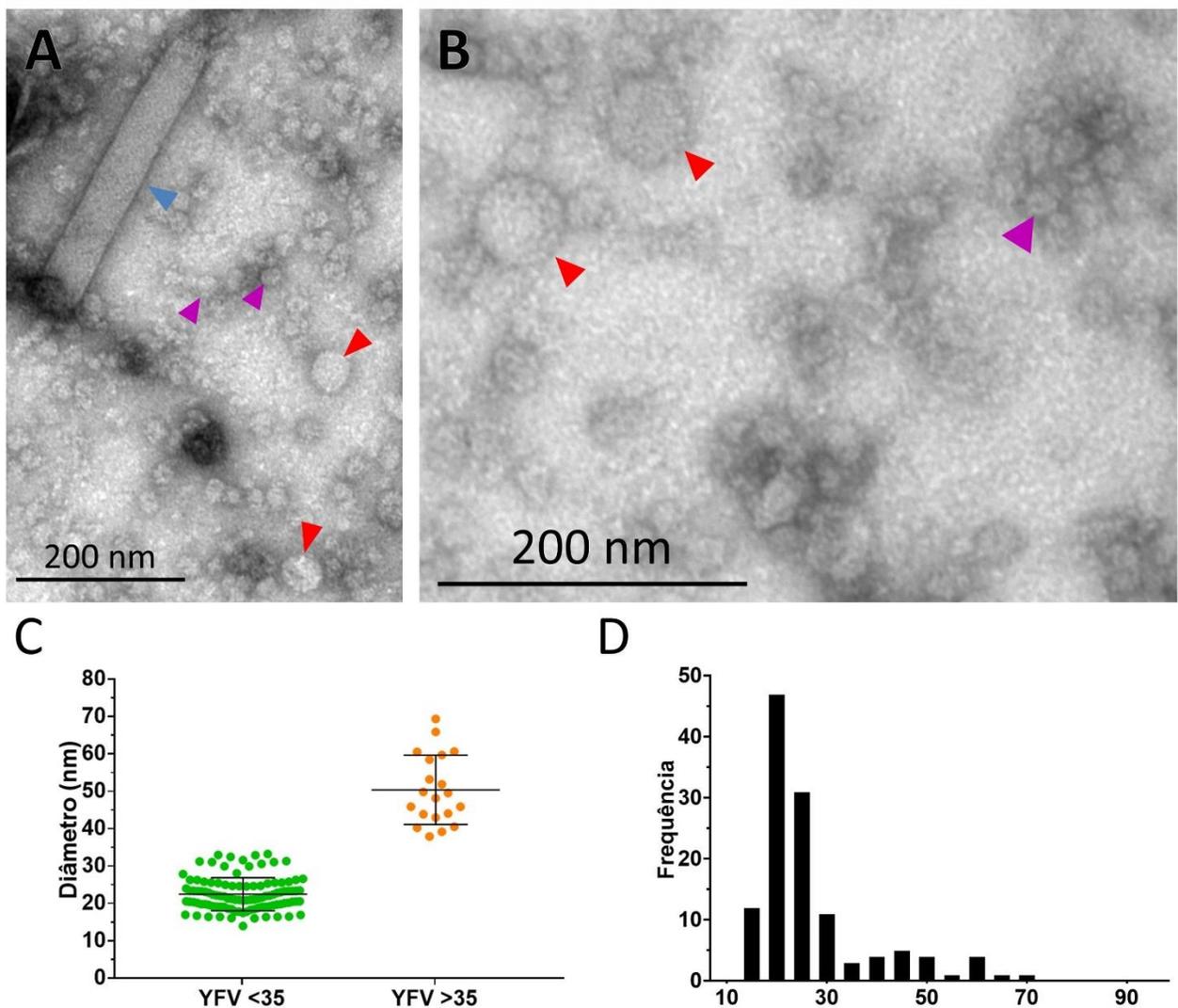


Figura 22. Contrastação negativa de concentrado de sobrenadante de cultura de células infectadas. O sobrenadante de células Tn5B foi coletado 72 h p.i. e submetido a concentração por ultracentrifugação em colchão de sacarose para

observação por MET. Triângulo azul indica vírus brotado (BV) de baculovírus, enquanto triângulos vermelhos apontam estruturas esféricas secretadas de $50,37 \pm 9,3$ nm de diâmetro e triângulo roxo vesículas menores com diâmetro de $22,46 \pm 4,4$ nm. C: Detribuição das dimensões de partículas secretadas indicando dois grupamentos de tamanhos distintos. D: frequência das dimensões de partículas medidas.

4.4 Expressão de antígenos da febre amarela para produção de anticorpos policlonais

4.4.1 Confirmação da construção do plasmídeo pDEST17CprME FUSION

A construção do plasmídeo foi confirmada por ensaio de digestão utilizando a enzima de restrição *PstI*, resultando na liberação dos fragmentos de DNA dos tamanhos esperados de 1623 pb e 3627 pb, confirmando a construção do plasmídeo (Figura 23).

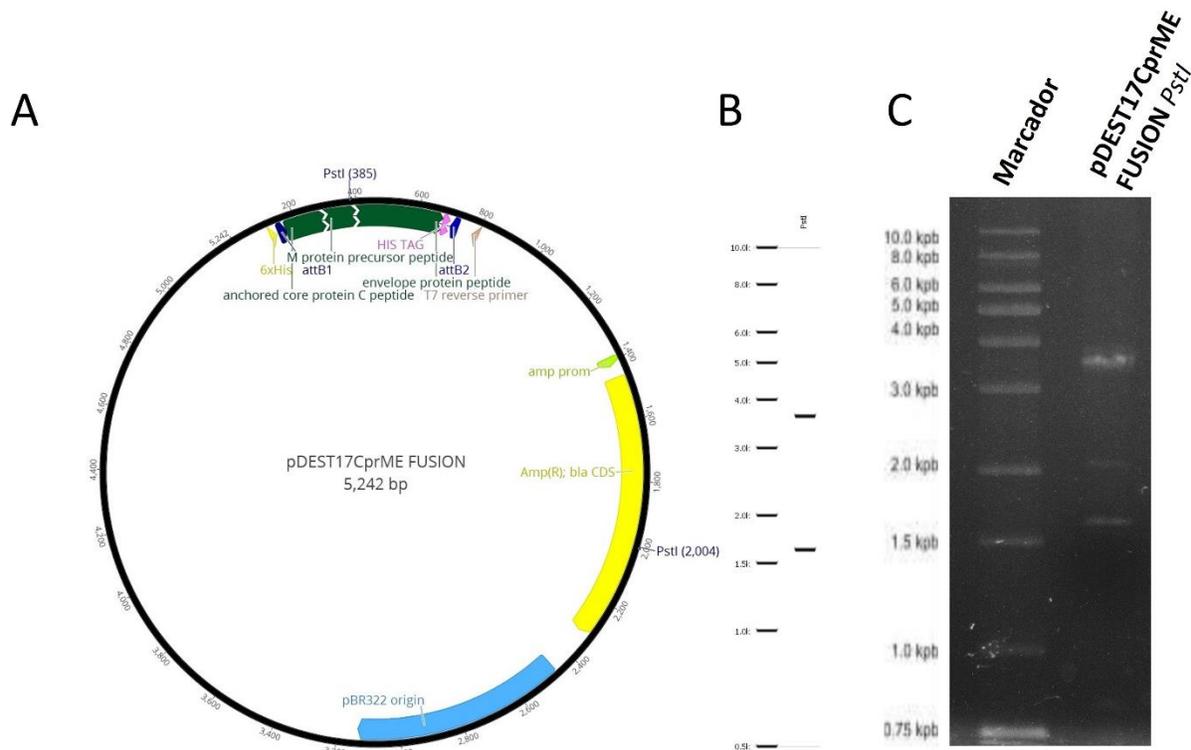


Figura 23. A: Mapa vetor do plasmídeo pDEST17CprME FUSION. Em destaque estão as sequências das regiões hidrofílicas dos genes estruturais do YFV C, prM e E em verde, assim como o sítio de restrição utilizados para digestão de confirmação (*PstI*). B: Simulação in silico do perfil de digestão com as enzimas de restrição selecionadas. Criados com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia). C: Perfil de digestão de confirmação analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% mostrando a liberação de segmentos de DNA de tamanhos esperados.

4.4.2 Expressão e purificação de proteínas produzidas em células de *E. coli* Rosetta-gami™

A proteína fusionada contendo domínios da proteína de C, prM e E do YFV foi expressa na linhagem de *E. coli* Rosetta-gami™ 2(DE3) pLysS, e purificada por cromatografia de afinidade desnaturante, como descrito nos itens 3.4.2 e 3.4.3 respectivamente. A confirmação da expressão e purificação da proteína de tamanho esperado de 21 kDa foi feita por análise em SDS-PAGE e *Western blot* (Figura 24).

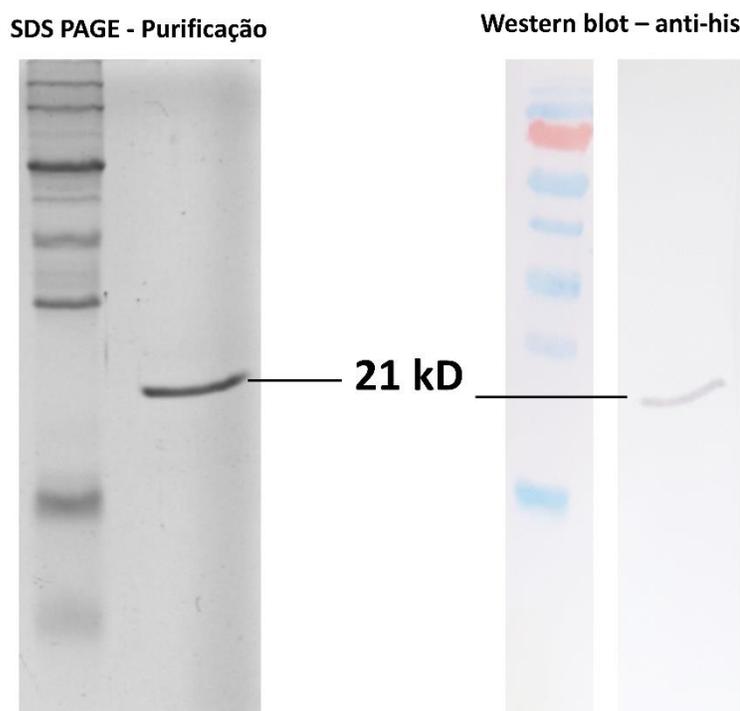


Figura 24. Análise da expressão da proteína contendo regiões fusionadas das proteínas estruturais do YFV. A proteína fusionada contendo domínios das proteínas C, prM e E do YFV foi expressa em sistema procariótico e purificada por cromatografia de afinidade de níquel a cauda de histidina fusionada a proteína recombinante. O produto da purificação foi analisado em gel de poliacrilamida 12% e por imunomarcção com anticorpo monoclonal anti-his (diluição 1:1000). A purificação foi bem-sucedida, verificando apenas a banda de 21 kD referente a proteína expressa, e sua identidade foi confirmada por imunomarcção.

5. Discussão

O recente surto de febre amarela ocorrida no Brasil entre 2016 e 2018 foi a maior epidemia da doença registrada nas américas no século XXI. A baixa cobertura vacinal na região sudeste do país, a presença do vetor de transmissão silvestre do YFV, assim como a presença de primatas não-

humanos reservatórios do vírus, levaram a um grande número de casos da doença. Felizmente, o surto se limitou ao ciclo de transmissão silvestre da doença, porém a proximidade da sua ocorrência com centros urbanos densamente povoados, e com presença do vetor de transmissão urbana do vírus *A. aegypti* (como a região metropolitana da cidade de São Paulo), levantou grandes preocupações com o possível ressurgimento da transmissão urbana do vírus (COUTO-LIMA *et al.*, 2017). A atual situação epidemiológica reforça a necessidade do monitoramento constante e eficiente da doença no país.

Limitações na recomendação de vacinação para alguns grupos de pessoas, assim como a ocorrência de casos raros, porém severos de complicações associadas as atuais vacinas de vírus atenuado (LINDSEY *et al.*, 2008; MONATH, 2012; VASCONCELOS, P F *et al.*, 2001; WHITTEMBURY *et al.*, 2009), levantam questões sobre a possível utilidade de uma nova vacina para prevenção a infecção pelo YFV (HAYES, 2010). Desta maneira, vacinas de subunidade, especialmente baseadas em VLPs altamente imunogênicas, se mostram como uma possível plataforma para o desenvolvimento de vacinas modernas eficazes.

Atualmente várias vacinas baseadas em VLPs se encontram em diferentes fases de desenvolvimento e testes. Além de vacinas já comercialmente disponíveis como a Cervarix (produzida em sistema de baculovírus e célula de inseto) e Gardasil (produzido em leveduras), ambas contra o HPV, VLPs contra diversos outros patógenos humanos e vírus emergentes já foram produzidas. Além de aplicações como vacinas, VLPs podem ser utilizadas como insumos para produção de kits diagnósticos, sendo base para detecção de anticorpos contra vírus presentes no soro de pessoas que já foram infectadas. O diagnóstico diferencial entre patógenos filogeneticamente próximos (especialmente em regiões geográficas aonde estão em cocirculação) pode ser difícil em função da proximidade entre as manifestações clínicas da doença, e em testes sorológicos com a ocorrência de reatividade cruzada, como pode ocorrer entre membros do gênero flavivirus (VAN MEER *et al.*, 2017). O sistema de expressão de proteínas heterólogas baseado no uso de baculovírus recombinantes e células de inseto se mostra como uma alternativa versátil e útil para produção de antígenos, como VLPs, que possuem aplicações vacinais e de diagnóstico.

A produção de VLPs de flavivirus pode ser feita através da expressão apenas das proteínas estruturais prM e E presentes no envelope viral, que mesmo na ausência da proteína de capsídeo, mantém a capacidade de formar estruturas que se assemelham ao vírus (KROL; BRZUSKA; SZEWCZYK, 2019). Entretanto, VLPs contendo o capsídeo viral, formadas a partir

da expressão em conjunto das proteínas prM, E e C de ZIKV, induziram a produção de um maior título de anticorpos neutralizantes em camundongos, se comparado a VLPs compostas apenas por prM e E, podendo refletir o papel da proteína C na indução de imunidade (GARG *et al.*, 2017, 2019). A formação dessas VLPs contendo o capsídeo viral depende da coexpressão da protease NS2B/NS3 para o correto processamento proteolítico da poliproteína precursora, no sítio de clivagem entre C e prM (KROL; BRZUSKA; SZEWCZYK, 2019).

Avanços no conhecimento do ciclo de infecção celular de baculovírus, e os complexos mecanismos de regulação empregados pelo vírus para o controle da expressão dos seus genes, possibilitou a exploração de novas estratégias para expressão de proteínas de interesse. Nos estágios precoces da infecção por baculovírus o gene *gp64* (glicoproteína de envelope viral) é prontamente expresso para produção de BVs, sendo que o gene que codifica para proteína VP39 (principal componente do capsídeo viral) também é expresso na fase precoce, assim como na fase tardia. Neste trabalho, foi realizado a construção de vetores de expressão que se baseiam nesta cinética de expressão para controlar temporalmente a expressão de proteínas estruturais e não-estruturais do YFV, de forma induzir o processamento da poliproteína viral e formação de VLPs maduras. Foram utilizadas sequências promotoras do vírus AgMNPV, diferentes das sequências promotoras do genoma do vírus recombinante AcMNPV, como forma de evitar a possível ocorrência de recombinação homóloga com a região clonada, e perda da sequência gênica de interesse. Os genes não-estruturais (NS2A, NS2B e NS3) foram clonados sob o controle do promotor do gene *gp64*, – para expressão precoce, e os genes estruturais (C, prM e E) sob o controle do promotor do gene *vp39*, – para expressão precoce e tardia, de forma a produzir as proteínas estruturais em um microambiente aonde já eram expressas as proteínas não-estruturais virais, com o intuito de estimular o processamento proteolítico e a maturação de VLPs.

Infecções com os diferentes vírus recombinantes, expressando em combinação ambos cassetes de proteínas não-estruturais e estruturais (AcYFVNSCME), levou a indução de intensa fusão celular e a formação de grandes sincícios compostos de muitos núcleos. A infecção de células Tn5B com o vírus recombinante contendo apenas os genes estruturais (AcYFVCME), também induziram a fusão celular, porém com uma quantidade menor de sincícios formados, e com menos núcleos por sincício. Por sua vez, células infectadas com vírus recombinante contendo apenas os genes não-estruturais (AcYFVNS), não mostraram indução de fusão celular. Esses dados indicam

a complementação dos genes NS2A, NS2B e NS3 no processo de produção de proteínas maduras que apresentam forte atividade de promoção de fusão celular.

O fenômeno de indução de fusão celular é bem documentado entre flavivirus, sendo um efeito citopático característico de sua infecção *in vitro* (DAI *et al.*, 2018; FU; ZHANG, 1996; ZHANG -F. *et al.*, 1993). Como exemplo, a expressão da glicoproteína E do JEV por baculovírus em células de lepidoptera Sf9 (linhagem IPLB-Sf21-AE) levou a formação de sincícios, assim como a produção e secreção de VLPs do JEV (DU *et al.*, 2015). Resultados anteriores do grupo de pesquisa da UnB também mostrou que a proteína E do YFV também foi capaz de formar sincícios em células de inseto quando expressa pela infecção por um baculovírus recombinante (BARROS *et al.*, 2011). O mesmo foi observado durante a expressão também em células de inseto somente da proteína E, ou em conjunto com a proteína prM de ZIKV, havendo formação de VLPs e indução de fusão de membranas (DAI *et al.*, 2018).

Este fenômeno de indução de formação de sincícios pode ser explorado no futuro como uma plataforma para testes de inibição de fusão, de forma análoga ao funcionamento de ensaios sorológicos de inibição de hemaglutinação. Células Tn5B, por exemplo, podem ser incubadas com diluições crescentes tanto com anticorpos contra a proteína E, assim como com compostos antivirais que também possuem essa proteína como alvo, levando a inibição do processo de fusão celular. Esse ensaio consistiria em um método simples e seguro para avaliação tanto da presença de anticorpos contra YFV no soro de pacientes, quanto da atividade inibitória de anticorpos e compostos antivirais sobre atividade de proteína E.

Tentativas de marcação das proteínas recombinantes utilizando o anticorpo comercial anti-flavivirus, assim como soro imune de camundongos inoculados com a cepa vacinal 17DD do YFV, não resultaram na identificação de proteínas virais por *Western blot* (dados não mostrados). A incapacidade de detecção com este anticorpo utilizado pode ser devido à baixa afinidade deste por antígenos específicos de YFV, também sendo possível que baixos níveis de expressão de proteína dificultem a detecção pelas técnicas de imunomarcação utilizadas. Entretanto os efeitos citopáticos observados são indicativos claros da expressão das proteínas estruturais do YFV, reforçado pelo papel de complementação da coexpressão de proteínas estruturais na intensificação da fusão celular. Sendo assim, foram construídos novos vírus recombinantes para expressão de proteínas estruturais do YFV fusionadas sequências peptídicas de 6xHis e HA com o intuito de facilitar a detecção com anticorpos específicos a essas estruturas. A imunomarcação das proteínas expressas

por estes novos vírus recombinantes atualmente se encontra em andamento, sendo que os mesmos padrões de efeitos citopáticos foram observados em células infectadas por estes vírus (dados não mostrados).

Com o mesmo objetivo de detecção de proteínas do YFV, foi expressa em sistema procariótico de expressão, e purificada por cromatografia de afinidade, uma proteína contendo regiões fusionadas das proteínas estruturais do YFV C, prM e E. A expressão e purificação dessa proteína foi confirmada por SDS-PAGE e *Western blot*, e serão utilizadas para produção de anticorpos policlonais após inoculação em camundongos para aplicações de detecção das proteínas expressas no sistema baculovírus células de inseto.

As análises MET de célula 24 h p.i infectadas revelou a presença de sítios intracelulares membranosos com a aparente formação de estruturas de morfologia similar a partículas virais. Não é possível afirmar que se trata do exato local de formação de VLPs, mas apresentam uma morfologia similar a observada durante a formação de flavivirus (Figura 21A), e são compatíveis com entendimento de sítios de montagem viral associados ao retículo endoplasmático deste grupo viral. A membrana destas células apresentou aparente brotamento de estruturas de morfologia também similar a observada intracelular. A análise por MET de células em tempos mais avançados de infecção como 48 h p.i e 72 h p.i. seria extremamente interessante para observação de sincícios e de estruturas intracelulares e de membrana que poderiam estar associadas ao fenômeno de fusão celular, porém não foi possível realizar o processamento de células para tais análises que mantivessem sua integridade, possivelmente indicando a fragilização de células após a indução de fusão exacerbada.

O sobrenadante de cultura de células Tn5B 72 h p.i. com o vírus AcYFVNSCME apresentou a presença de grande quantidade de estruturas que aparentam possuir duas de dimensões distintas sob análise por contrastação negativa. Partículas menores com diâmetro de cerca de 20 nm eram as mais abundantes, sendo possível observar também partículas com diâmetro de cerca de 50 nm, mais próximo ao esperado de partículas de YFV madura (Figura 22). De fato, a ocorrência da produção de estruturas denominadas de partículas subvirais (“*subviral particles*” - SVP) de dimensões menores do que a partícula viral foi reportada para diversos flavivirus, durante a infecção por vírus selvagens, e através da expressão heteróloga de proteínas virais. O estudo de Ohtaki et al. (2010) a expressou as proteínas prM e E do WNV em sistema de células de mamífero, e observou a produção de duas classes de dimensões de VLPs. Partículas de 20-30 nm foram

identificadas como possuindo a proteína prM em seu estado imaturo, e partículas de 40-50 nm possuíam a proteína M madura, a segunda se mostrando mais imunogênica. Também foi observada a formação de SVPs de WNV (diâmetro de ~30 nm) sem a presença de capsídeo viral em cultura de células infectadas (HANNA *et al.*, 2005). Isso indica que a formação de estruturas de dimensões distintas, observadas no sobrenadante de células infectadas com o vírus AcYFVNSCME, pode ocorrer em função da incorporação ou não do capsídeo viral na partícula formada, ou em função de diferentes estágios de maturação da proteína prM. De fato, já foi observado a formação VLPs de flavivirus em estado maduro, imaturo ou parcialmente maduras (KROL; BRZUSKA; SZEWCZYK, 2019).

As análises reforçam a flexibilidade do sistema de expressão baseado em baculovírus recombinante e células de inseto, utilizando estratégias que promovam o processamento de proteínas e a formação de estruturas complexas, e potencialmente antigênicas. O modelo também permite a estudo e análise da função gênica em um modelo de artrópodes, ajudando a elucidar função e interação entre proteínas importantes para montagem das partículas virais.

6. Conclusão e perspectivas

A recorrência de epidemias de febre amarela demonstra a importância do estudo constante dos padrões epidemiológicos de distribuição da doença, assim como reforçam a necessidade do desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que possam ser utilizadas tanto para fins diagnósticos precisos, e aplicações vacinais modernas e eficientes. VLPs se mostram como uma nova tecnologia com alto potencial para o desenvolvimento de tais aplicações, sendo que o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto apresentam diversas vantagens para o seu desenvolvimento. Neste trabalho, foi demonstrado a construção de baculovírus recombinantes contendo genes estruturais e não-estruturais do YFV, utilizando uma nova estratégia de controle de expressão gênica para estimulação de produção de proteínas maduras. Os vírus recombinantes construídos foram capazes de induzir efeitos citopáticos claros de infecção por flavivirus (indução de fusão celular), indicando ainda a função de complementação da das proteínas não-estruturais (NS2A, NS2B e NS3) no correto processamento da poliproteína estrutural viral, observado pela exacerbação severa dos efeitos citopáticos quando coexpressa. Análise de MET identificou possíveis sítios de formação de partículas compostas por proteínas virais, assim como a morfologia

de partículas encontradas no sobrenadante de culturas infectadas. Como perspectivas futuras do trabalho estão:

- Detecção das proteínas expressas por técnicas de imunomarcção como *Western blot*, imunfluorescência e imunomarcção com nanopartículas de ouro em MET;
- Aprimoramento do processo de purificação de partículas produzidas por técnicas de ultracentrifugação por gradiente de densidade e por cromatografia;
- Produção de anticorpos para aplicações de detecção e diagnóstico de febre amarela
- Avaliação do potencial de estimulação do sistema imunológico com ensaios de proliferação de linfócitos e quantificação da produção de citocinas;
- Avaliar o potencial das partículas formadas para uso vacinal com e verificação e titulação da produção de anticorpos neutralizantes e ensaios de desafio *in vivo*.

Capítulo 2 – Produção de VLPs do vírus Mayaro em células de inseto

1. Introdução

1.1 Doença e patogênese

O vírus Mayaro (MAYV) é um vírus transmitido por artrópodes (arbovírus), membro do gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*, mesma família de outros vírus com importância médica e veterinária, como o vírus chikungunya (CHIKV) e o vírus da encefalite equina do leste (EEEV) (CHEN, RUBING *et al.*, 2018). O vírus é causador da febre do Mayaro, doença febril aguda em humanos, e sem vacinas licenciadas até o momento.

A progressão da doença se inicia com um período de viremia transiente que pode durar entre 3 e 7 dias, seguida do período de incubação que pode durar de 7 a 12 dias, a partir do qual os sintomas sistêmicos agudos da doença se tornam evidentes (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018). Após a inoculação subcutânea do vírus pelo seu vetor artrópode, os alphavirus se disseminam pelo sistema linfático, ou em monócitos infectados, chegando ao fígado e baço como locais de replicação, e então se disseminando para músculos e tecidos articulares (ASSUNÇÃO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; DA POIAN, 2013; CAVALHEIRO *et al.*, 2016)

Febre ocorre em todos os casos registrados da doença, sendo comum também a ocorrência de dores musculares (mialgia), erupções cutâneas (“rash”), cefaleia e dor retro orbital (NAPOLEÃO-PEGO *et al.*, 2014), com casos raros registrados de eventos hemorrágicos (MOURÃO *et al.*, 2012). Dores articulares (artralgia) ou artrite acompanhada de edemas articulares podem ter início também durante a fase aguda da doença, podendo ser altamente debilitantes (MCGILL, 1995). O período de viremia dos alphavirus normalmente é controlado através da resposta de interferon (IFN) $-\alpha/\beta$ e por anticorpos neutralizantes (COUDERC *et al.*, 2008; HOLZER *et al.*, 2011).

Após o final da fase aguda de infecção se inicia a fase de convalescença, durante a qual podem persistir os acometimentos nas articulações durante semanas ou até meses pós a infecção inicial (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012). Os exatos mecanismos e estímulos inflamatórios responsáveis por artropatias persistentes causadas por alphavirus não são conhecidos (VAN AALST *et al.*, 2017). É levantado um possível papel importante da presença do vírus e restos

celulares no tecido de articulações para o desenvolvimento dessa complicação (SUHRBIER, 2019), não havendo evidências diretas de que artrites virais levem ao desenvolvimento de autoimunidade (SUHRBIER; MAHALINGAM, 2009).

Um estudo de coorte conduzido por Santiago et al. (2015) em pessoas que tiveram infecção pelo MAYV indicou a correlação entre a alta indução da produção dos mediadores de inflamação IL-13, IL-17 e VEGF, e o eventual desenvolvimento de artralgia persistente. O estudo também indicou que a forte geração de anticorpos neutralizantes não foi suficiente para evitar a ocorrência de artralgia persistente.

1.2 Diagnóstico

A similaridade entre as manifestações clínicas provocadas pelo MAYV (especialmente durante a fase aguda), e outros arbovírus como o vírus da dengue (DENV) e CHIKV, dificulta o seu diagnóstico diferencial (ZUCHI *et al.*, 2014). O isolamento viral a partir do sangue de indivíduos contaminados é o meio mais preciso de diagnóstico. Este método é limitado pois depende da inoculação intracerebral de camundongos neonatos, ou da infecção em cultura de células de mosquito (*e.g.* células C6/36) ou em células de mamífero (*e.g.* células Vero) para subsequentes análises (DE FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014).

Testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o MAYV podem ser empregados, como o ELISA, ensaio de inibição de hemaglutinação, fixação de complemento e teste de neutralização (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018). O teste ELISA é sensível para detecção de anticorpos IgM contra o MAYV que estão presentes a partir de 3 dias pós infecção, podendo persistir por até 3 meses, e também para detecção de anticorpos IgG que podem persistir por anos (DE FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014). Apesar de sensível, pode existir a ocorrência de reatividade cruzada com outros alphavirus do mesmo grupo sorológico, sendo que a utilização de mais de uma técnica pode resultar em um diagnóstico mais preciso (DE FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014).

Atualmente, técnicas moleculares utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) são capazes de detecção sensível e altamente específica do vírus MAYV (NAVECA *et al.*, 2017; SÁNCHEZ-SECO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2006), porém dependem da presença do ácido

nucleico viral circulante que é limitada a 2 a 6 dias pós infecção (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018).

Candidatos à vacina foram testados apenas em ensaios pré-clínicos, utilizando a partícula viral inativada (ROBINSON *et al.*, 1976), e um candidato baseado em uma linhagem de vírus atenuado (WEISE *et al.*, 2014). Recentemente, também foi desenvolvido uma vacina de DNA para o vírus (CHOI *et al.*, 2019), porém não há candidatos baseados em tecnologia de vacinas de subunidades, não existindo vacina licenciadas.

1.3 Transmissão e epidemiologia

O ciclo de transmissão do MAYV está associado a mosquitos hematófagos de hábito silvestre, principalmente pelo vetor da espécie *Haemagogus janthinomys* (Figura 25 e Figura 26), porém já foi isolado de mosquitos de gêneros encontrados em ambientes urbanos como *Culex sp.* e *Aedes sp.* (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018). Primatas não humanos muito provavelmente servem como reservatório do vírus no ambiente silvestre, já tendo sido também identificado anticorpos contra o vírus em aves (TESH *et al.*, 1999).



Figura 25. Mosquito *Haemagogus janthinomys*. (foto: Josué Damacena). Fonte: <https://agencia.fiocruz.br/febre-amarela-estudo-identifica-mosquitos-causadores-de-surtos>.

Um estudo de Long *et al.* (2011) demonstrou que o mosquito *Aedes aegypti* é um vetor competente na transmissão de MAYV em laboratório. Essa análise foi corroborada pelo estudo de Wiggins *et al.* (2018), demonstrando o potencial de transmissão do vírus também pelo mosquito

Aedes albopictus, além do estudo de Kantor et al. (2019) mostrando o potencial da transmissão mista de MAYV e CHIKV pelo mesmo vetor *A. aegypti*. Essas observações aumentam a preocupação com a possível inserção desse vírus em um ciclo urbano de transmissão.

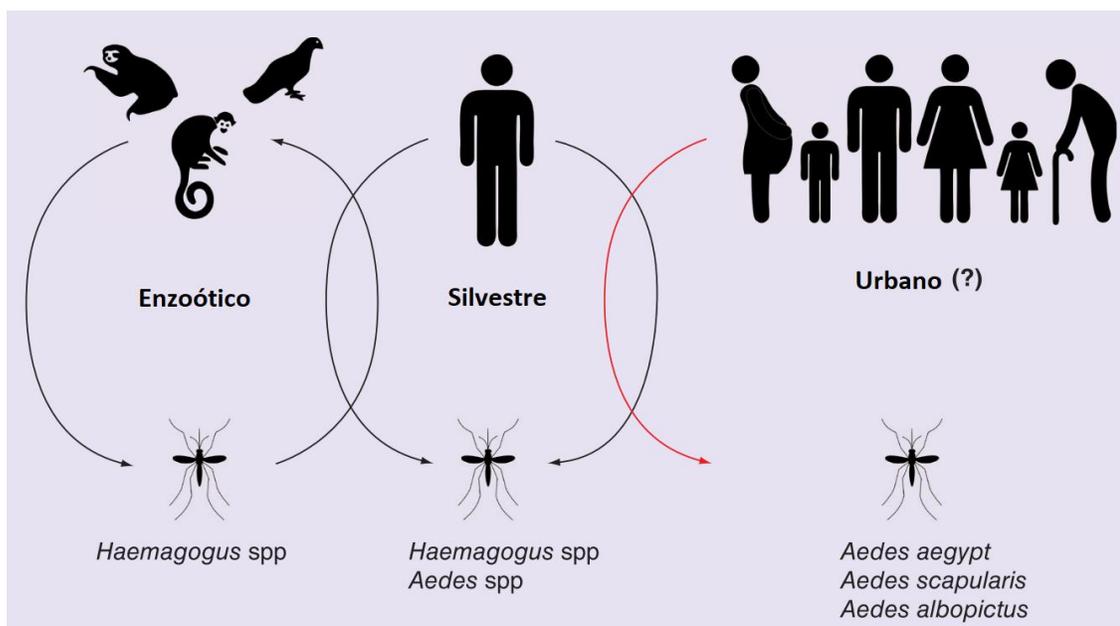


Figura 26. Representação do ciclo de transmissão do MAYV. Os casos já registrados da doença estão associados ao ciclo silvestre, aonde mosquitos do gênero *Haemagogus* são responsáveis pela infecção acidental de humanos a partir de reservatórios de primatas não humanos. Não há indicação de estabelecimento de um ciclo urbano, porém seu surgimento é uma preocupação. Adaptado de: Mota et al., (2015), com permissão de Future Medicine Ltd.

O MAYV é endêmico da América Central e América do Sul, e foi primeiramente isolado na ilha de Trinidad em 1954 (ANDERSON *et al.*, 1957). Desde então, a maioria dos casos foram registrados no Peru, Bolívia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa e Brasil (AZEVEDO *et al.*, 2009). Casos esporádicos e surtos da doença tem sido detectados no Brasil desde 1955, mais frequentemente na região norte no país, porém com casos registrados no estado do Mato Grosso, Goiás e Tocantins, e muitas vezes são confundidos por diagnósticos de dengue (LORENZ; FREITAS RIBEIRO; CHIARAVALLI-NETO, 2019; VIEIRA *et al.*, 2015).

A similaridade das manifestações clínicas da doença com outros arbovírus gera casos de diagnósticos errados, que provavelmente subestimam o número de casos reais da doença (WESULA OLIVIA *et al.*, 2015). Em uma análise recente, amostras de 57 pacientes com quadro clínico suspeito de infecção pelo CHIKV foram analisadas por biologia molecular, revelando que

3 estavam na verdade infectadas com MAYV. Assim foram observados dados compatíveis com infecção autóctone na região, provavelmente associada ao ciclo de transmissão silvestre da doença (dados ainda não publicados; divulgação: “UFRJ detecta vírus Mayaro no estado do Rio de Janeiro | Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ”, [s.d.]). A atual circulação do vírus, associada à presença de seu vetor de transmissão silvestre, e possível colonização de vetores urbanos, levanta a preocupação com surgimento de futuros surtos associados à transmissão da doença no Brasil (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018; DE O’MOTA; AVILLA; NOGUEIRA, 2019; DE OLIVEIRA MOTA *et al.*, 2015).

1.3 Vírus Mayaro – genoma, proteínas virais e suas funções

O MAYV consiste de uma partícula composta por um capsídeo icosaédrico, envolto por um envelope de bicamada lipídica com glicoproteínas virais de superfície, com diâmetro de ~ 70 nm (CHEN, RUBING *et al.*, 2018). O genoma do vírus é composto por uma fita simples de RNA senso-positivo de aproximadamente 11.500 nt, possuindo um CAP na sua extremidade 5’, assim como uma extremidade 3’ com uma cauda poli(A) (LAVERGNE *et al.*, 2006). Assim como todos os alphavirus, a porção proximal 5’ do genoma viral codifica uma poliproteína que é clivada pela protease viral para geração de 4 proteínas não estruturais maduras: nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, essenciais para replicação viral. A porção proximal 3’ por sua vez, é transcrita em um RNA subgenômico, que codifica uma poliproteína clivada por protease viral e do hospedeiro, dando origem às proteínas estruturais de capsídeo (C), E3, E2, 6k, E1 (STRAUSS; STRAUSS, 1994) (Figura 27).

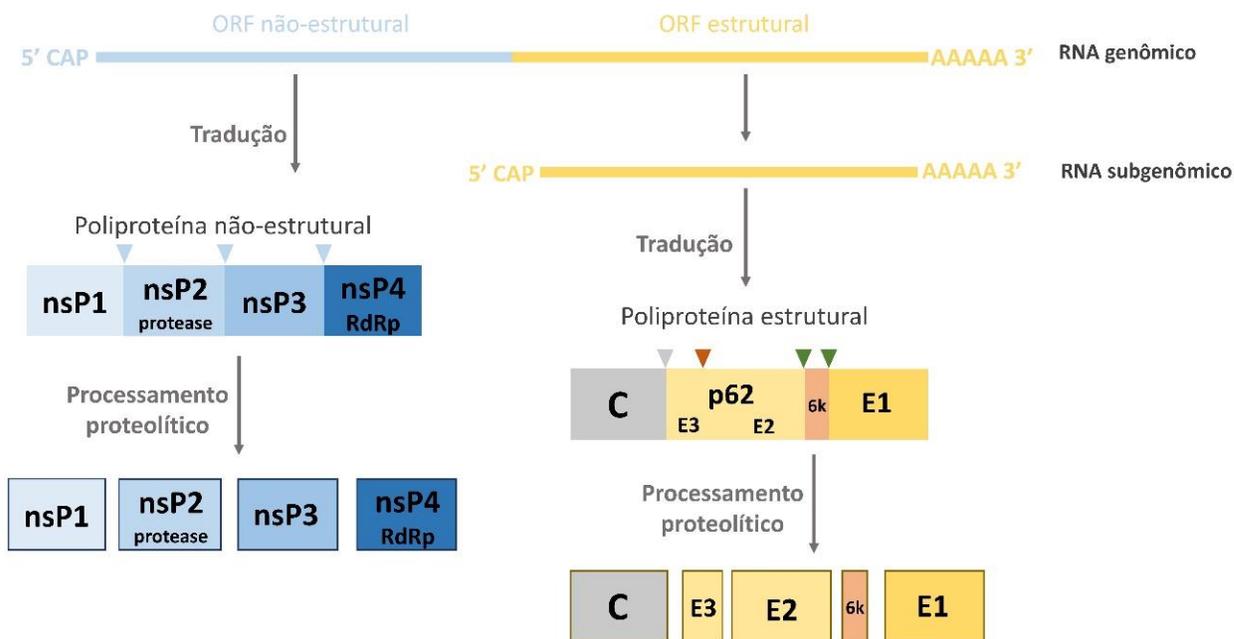


Figura 27. Esquemática do genoma e proteínas do MAYV. O RNA genômico viral codifica a uma ORF (fase aberta de leitura) para uma poliproteína não estrutural, que é clivada pela protease nsP2 (triângulos azuis) para dar origem às proteínas não estruturais maduras. Um RNA subgenômico codifica uma poliproteína estrutural que, por processamento proteolítico, dá origem às proteínas estruturais maduras. Triângulo cinza representa o sítio de clivagem pela atividade protease da proteína C, triângulo marrom clivagem por furino protease celular, e triângulos verdes clivagem por sinal peptidase celular. Fonte: elaborado pelo autor.

A proteína C (~30 kDa) se organiza em um padrão repetido de 240 cópias para o empacotamento do RNA genômico no nucléocapsídeo viral, possuindo também atividade proteolítica agindo na sua auto clivagem e separação do resto da poliproteína estrutural (THOMAS *et al.*, 2010). Essa proteína contém um domínio de importação nuclear, e foi também implicada na modulação da resposta imune inata por inibição de transcrição celular, e indução de efeitos citopáticos *in vitro*, em alphavirus causadores de encefalite (GARMASHOVA; ATASHEVA; *et al.*, 2007). Alphavirus causadores de artropatias, como é o caso do MAYV, também detém domínio de importação nuclear, entretanto sua proteína C não exerce atividade na inibição de transcrição (GARMASHOVA; GORCHAKOV; *et al.*, 2007), sendo ainda incerto seu papel no processo infeccioso destes vírus.

A proteína E1 (~47 kDa) é responsável pela atividade de indução de fusão do envelope viral, enquanto a proteína E2 interage com receptores celulares de membrana para entrada viral, ambas constituindo os principais determinantes antigênicos virais (VOSS *et al.*, 2010). As glicoproteínas E1 e E2 se organizam em heterodímeros, que por sua vez se agrupam em trímeros

que constituem os 80 peplômeros (protuberâncias associadas ao envelope viral essenciais para o reconhecimento de receptores e entrada em novas células) presentes na superfície viral (Figura 28) (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009). A formação dessas estruturas maduras depende da clivagem da proteína p62 (realizada por uma furino protease celular durante transporte no complexo de Golgi) que ocasiona a separação entre E2 e E3, levando a uma mudança conformacional no dímero que resulta em seu estado com capacidade de fusão e do envelope viral com a membrana endossomal intracelular (LAN *et al.*, 2017).

A proteína de envelope E2 (~50 kDa) de alphavirus é essencial na entrada de vírus em novas células. A proteína é composta por três domínios distintos (A, B e C) sendo seu domínio B identificado como importante alvo de anticorpos neutralizantes (WEGER-LUCARELLI *et al.*, 2015), sendo explorada em diversas estratégias para uso como antígeno vacinal, principalmente para o CHIKV (KAM *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2012; KUMAR; SUDEEP; ARANKALLE, 2012). Recentemente, uma estratégia baseada em uma vacina de DNA codificando para os genes de E1 e E2 de MAYV se mostrou imunogênica, induzindo a produção de anticorpos neutralizantes e de uma resposta imune celular, apresentando atividade protetora contra o desafio por MAYV em ensaios *in vivo* (CHOI *et al.*, 2019).

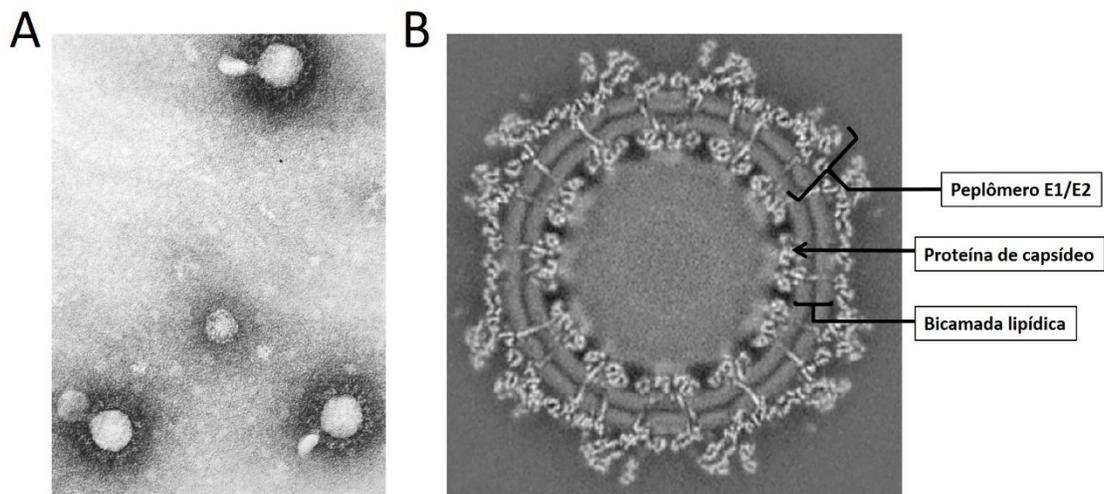


Figura 28. Morfologia e representação da partícula viral de alphavirus. A: Contrastação negativa (MET) do vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) mostrando a morfologia dos vírions de alphavirus com ~70 nm de diâmetro. Fonte: CDC/Dr. Fred Murphy; Sylvia Whitfield, disponível em <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10266> - domínio público. B: Corte equatorial bidimensional de uma VLP do vírus CHIKV através de crio-microscopia eletrônica de transmissão. Sendo possível observar as proteínas de capsídeo envolta pelo envelope viral, com as projeções compostas por E1 e E2 fixados pelo domínio transmembrana a bicamada lipídica. Adaptado de: Basore *et al.*, (2019), setas e indicações do autor, com autorização de Elsevier.

O polipeptídeo 6K (6 kDa) tem papel na montagem da partícula viral e auxilia no trânsito e processamento das glicoproteínas E1 e E2 e, no processo de brotamento. Apesar disso, a proteína é incorporada em pequenas quantidades nos virions maduros, e não é essencial para formação de partículas infecciosas (SANZ *et al.*, 2007)

A proteína não estrutural nsP1 (~60 kDa) contém um domínio metiltransferase responsável pela adição do CAP 5' na fita de RNA transcrita. A proteína também é importante no processo de transcrição da fita de RNA senso negativa, através de interações com outras proteínas não estruturais no complexo replicativo (STRAUSS; STRAUSS, 1994), e podendo estar associada às membranas intracelulares (SALONEN; AHOLA; KÄÄRIÄINEN, 2004).

A proteína nsP2 (~ 90 kDa) possui atividade essencial como protease, agindo na clivagem da poliproteína não estrutural (KÄÄRIÄINEN *et al.*, 2001) para formação das proteínas maduras. Também possui atividade de helicase, desenovelando estruturas secundárias de RNA formadas durante a replicação, e atividade de RNA trifosfatase, removendo o grupo fosfato da extremidade 5' nascente para adição do CAP por nsP1 (VASILJEVA *et al.*, 2000). Além disso, a proteína foi mostrada ter atividade como inibidor global de transcrição celular para alguns alphavirus, sendo um importante fator de virulência (GARMASHOVA *et al.*, 2006).

A atividade exata da proteína nsP3 (~60 kDa) ainda é desconhecida, porém é demonstrada importante para síntese de RNA, sendo que mutações na mesma levaram a defeitos na produção da fita de RNA senso negativo e do RNA subgenômico (RUPP *et al.*, 2015).

A proteína nsP4 é uma proteína de ~70 kDa, possuindo atividade enzimática de RNA polimerase dependente de RNA, exercendo a função catalítica da polimerização de fitas nascentes de RNA durante a replicação viral. É uma proteína altamente instável, e sua concentração altamente regulada (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

1.5 Ciclo infeccioso e replicação

A maior parte das informações sobre o processo de entrada e replicação do MAYV vem de estudos de alphavirus relacionados. A via de entrada do vírus em novas células se dá majoritariamente pelo fenômeno de endocitose mediada por receptor, sendo a proteína de envelope E2 reconhecida por receptores celulares, induzindo endocitose mediada por clatrina (KIELIAN;

CHANEL-VOS; LIAO, 2010). Alguns autores conduziram ensaios de microscopia eletrônica de transmissão com imunomarcagem sugerindo a ocorrência de penetração direta de membrana mediada por receptores, independente de endocitose, sugerindo que mais de um mecanismo pode estar envolvido no processo de entrada viral (BROWN; HERNANDEZ, 2012; PAREDES *et al.*, 2004; VANCINI *et al.*, 2013).

Os receptores e fatores de ligação específicos que medeiam a entrada viral de alphavirus ainda não são totalmente conhecidos. Algumas proteínas de membrana foram implicadas como importantes para o processo de entrada de alphavirus, como a molécula de adesão celular Mxra 8 (ZHANG, RONG *et al.*, 2018) e a proteína evolutivamente conservada proibitina (WINTACHAI *et al.*, 2012). Por infectar tanto vetores artrópodes como hospedeiros mamíferos é provável que o MAYV utilize um receptor que seja altamente conservado evolutivamente, ou que disponha de mecanismos de entrada diferenciados entre insetos e mamíferos (SCHNIERLE, 2019).

A entrada é seguida pela fusão do envelope viral ao endossomo celular induzido por sua acidificação, levando a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma, que é desassociado para liberação do RNA genômico no citoplasma (MARSH; HELENIUS, 2006).

O ciclo de replicação de alphavirus acontece no citoplasma associado à membranas e é mediada pelo complexo de replicase, aonde todas as proteínas não estruturais se encontram intimamente associadas durante a infecção (SALONEN; AHOLA; KÄÄRIÄINEN, 2004; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

O nucleocapsídeo se forma a partir da replicação e encapsidação do RNA genômico, e é então translocado para o sítio de brotamento na membrana plasmática, aonde o vírus adquire seu envelope lipídico (LU; KIELIAN, 2000).

2. Objetivo

Produção de VLPs do MAYV utilizando o sistema de expressão de baculovírus em células de inseto através da expressão de todas as suas proteínas estruturais.

2.1 Objetivos específicos

- Construção de baculovírus recombinantes, com e sem a presença do gene *gp64* de baculovírus, expressando as proteínas estruturais do MAYV sob o controle do promotor muito tardio da poliedrina;
- Analisar o perfil de expressão de proteínas do MAYV e de baculovírus por SDS-PAGE e *Western blot*;
- Analisar a localização celular das proteínas de MAYV expressas, por imunomarcação e microscopia de fluorescência;
- Avaliar a formação e secreção de VLPs de MAYV por ultracentrifugação e contrastação negativa do sobrenadante de cultura de células infectadas

3. Material e Métodos

3.1 Vírus e células

Todos os vírus utilizados no trabalho foram construídos a partir do genoma do baculovírus AcMNPV contido no cromossomo bacteriano artificial bMON14272 (bacmídeo) presente em células de *Escherichia coli* DH10Bac™ do sistema “*Baculovirus Expression System*” Bac-to-Bac®, (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Células Sf9^{op1d} expressando constitutivamente a proteína GP64 proveniente do vírus *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus* (OpMNPV) foram utilizadas para propagação de vírus recombinantes *gp64* deletados (*gp64*-) (PLONSKY *et al.*, 1999).

Foram utilizadas as linhagens celulares provenientes de lepidóptera *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21-AE (Sf21) (VAUGHN *et al.*, 1977) para propagação viral, e de *Trichoplusia ni* BTI-TN5B1-4 (Tn5B) (GRANADOS *et al.*, 1994) para expressão de proteínas e os demais ensaios. Células Sf-9 Easy Titer (Sf-9 ET) (HOPKINS; ESPOSITO, 2009), estavelmente transformadas com um plasmídeo contendo o gene da proteína *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) sob o controle do promotor da poliedrina de baculovírus, ativado durante a infecção por baculovírus,

foram utilizadas para titulação de todos os vírus construídos. Todas as células foram mantidas a 27 °C em meio de cultura TC-100 (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) suplementado com 10% soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Células eletrocompetentes de *E. coli* da linhagem Max Efficiency DH10B (Invitrogen, Carlsbad, USA), preparadas como descrito por Sambrook et al. (1989), foram utilizadas para todas as clonagens moleculares.

3.2 Construção dos plasmídeos vetores para expressão de proteínas estruturais do vírus Mayaro

Inicialmente, foi realizada a síntese do cDNA do MAYV a partir do isolado (linhagem Campos-RJ) gentilmente cedido pelo instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, Brasil. O vírus foi primeiramente propagado em células Vero (provenientes de células epiteliais renais de macaco verde africano), cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – DMEM (Gibco – Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A 72 h p.i., o meio de cultura foi removido e TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, USA) utilizado para extração de RNA total. Foram adicionados 300 µl TRIzol™ diretamente na placa de cultura, o conteúdo transferido para um tubo de 1,5 ml e incubadas por 5 min, 200 µl de clorofórmio incubado por 3 min e seguidamente centrifugado por 15 min a 12,000 x g a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo e adicionados 300 µl de isopropanol, incubados por 10 min e centrifugados por 10 min a 12,000 x g a 4°C para precipitação de ácidos nucleicos. O sobrenadante foi então descartado, adicionados 300 µl de etanol 75% e misturado vigorosamente e centrifugado por 5 min a 75000 x g a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em água livre de RNase. A amplificação do cassete contendo os genes estruturais do MAYV foi realizada utilizando o RNA extraído em uma reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), utilizando o kit *SuperScript® IV* (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acordo com as orientações do fabricante. A reação de anelamento de primers a RNA foi feita combinando 50 µM de primers hexâmeros randômicos (1 µl), 10 mM de mistura de dNTPs (1 µL), 9 µl de RNA molde, aquecido por 5 min a 65°C. Em seguida misturado com 4 µl de tampão SSIV 5X, 1 µl de 100 mM DTT, 1 µl de inibidor de *RNaseOUT™*, e 1 µl da enzima *SuperScript® IV* (200 U/µl) e a reação incubada a 50°C por 10 min em seguida inativada a

80°C por 10 min. O produto da reação de RT foi utilizado para amplificação por PCR utilizando na reação montada com 10 µl de tampão *Phusion HF 5X*, 1 µl de dNTPs (10mM) 1 µl de cada primer específico (Tabela 3), 5 µl de DNA template e 0,5 µl da enzima *Phusion DNA polimerase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

Os primers utilizados para amplificação do cDNA (Tabela 3) tiveram a adição de sítios attB para clonagem molecular utilizando o sistema Gateway™ (Invitrogen, Carlsbad, USA), também foi adicionado uma 6xHisTag no primer reverso, fusionado a proteína E1, para facilitar a detecção de proteínas pós processamento proteolítico.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do cassette contendo as proteínas estruturais do MAYV. Primers contêm sítios attB para clonagem utilizando sistema Gateway™ (Invitrogen, Carlsbad, USA) e o primer reverso possui sequência para adição de cauda de histidina (sublinhado).

Nome	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')
pMAYVSC F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGACTTCCTACCAACTCA
pMAYVSC6xhis R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCC <u>TAGTGGTGATGGTGATGATGCCTTCTCAAAG</u> TCACACAAG

O produto de PCR contendo o cassette estrutural do MAYV foi então recombinado no plasmídeo pDONR™207 (Invitrogen, Carlsbad, USA) através da reação de recombinação BP de acordo com as indicações do fabricante, assim como descrito do capítulo I, item 3.4.1. O plasmídeo vetor gerado foi confirmado por PCR de colônia e digestão enzimática, e então nomeado de pDONR207-MAYVSC. Este vetor foi por sua vez utilizado para inserção do cassette estrutural no plasmídeo de destino pDEST™8 (Invitrogen, Carlsbad, USA), parte do sistema de expressão Bacto-Bac®, contendo a sequência da região promotora do gene da poliedrina para controle da expressão do cassette heterólogo, assim como a região de recombinação Tn7R/Tn7L. A inserção do cassette no pDEST™8 foi realizada através da reação de recombinação LR assim como descrita no capítulo I, item 3.4.1. O plasmídeo final gerado, contendo a sequência codificadora para todas as

proteínas estruturais do MAYV, foi confirmado por digestão enzimática e sequenciamento Sanger (Macrogen, Coréia do Sul), e nomeado pDEST8-MAYVSC (Figura 29).

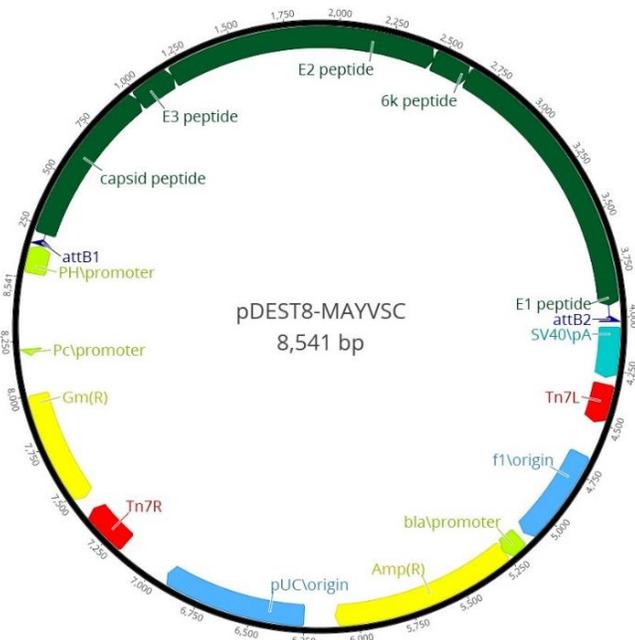


Figura 29. Representação esquemática do plasmídeo pDEST8-MAYVSC para construção de um baculovírus recombinante contendo os genes das proteínas estruturais do MAYV. Estão destacados genes estruturais do MAYV (verde escuro), que estão sob o controle do promotor muito tardio da poliedrina (PH\promoter – verde claro). Estão indicados também: sítios de recombinação attB (azul escuro) marcadores de resistência a ampicilina e gentamicina (amarelo), sítios Tn7R/Tn7L de transposição (vermelho), sinal de poliadenilação SV40\pA (turquesa) e origem de replicação (azul claro).

3.3 Construção dos vírus recombinantes para expressão: transfecção, amplificação e titulação viral

Os vírus recombinantes contendo o cassete para expressão dos genes estruturais do MAYV foram gerados utilizando o sistema Bac-to-Bac[®] - Invitrogen, Carlsbad, USA, (Figura 12) de acordo com as especificações do fabricante. O protocolo utilizado para geração do DNA viral recombinante, assim como a metodologia utilizada para sua transfecção, formação de vírus recombinantes e titulação foram os mesmos descritos no item 3.3 do capítulo I. Foram então gerados os vírus recombinantes: AcMAYVSCgp64+ e o vírus AcMAYVSCgp64-.

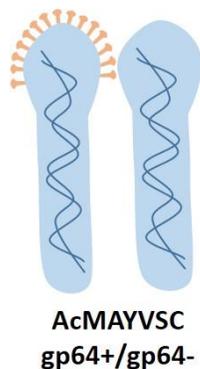


Figura 30. Representação dos vírus gerados no trabalho. AcMAYVSC_{gp64+}: vírus contendo os genes das proteínas estruturais do MAYV; AcMAYVSC_{gp64-}: vírus contendo os genes das proteínas estruturais do MAYV e com deleção para o gene da glicoproteína GP64.

3.4 Avaliação da expressão de proteínas recombinantes

3.4.1 SDS-PAGE e *Western blot*

A análise da expressão de proteínas recombinantes foi realizada por separação eletroforética em gel de poliácridamida e *Western blot*, sendo utilizado o mesmo protocolo para realização das técnicas descrito no item 3.5.1 do capítulo I. Os anticorpos primários utilizados para detecção das proteínas de MAYV foram o anticorpo monoclonal anti-*Alphavirus* (G771, Invitrogen, Carlsbad, USA) e o anticorpo monoclonal anti-*6x-His Tag* (MA1-21315, Invitrogen, Carlsbad, USA), na diluição de 1:1000 em PBS com 0,5% BSA.

3.4.2 Microscopia de fluorescência e imunomarcagem

Células Tn5B (80% de confluência) foram infectadas em MOI 10 pelo vírus AcMAYVSC, com vírus controle (AcYFVNSCME), ou não infectadas em triplicatas em uma placa de cultura de 24 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil). Células foram fixadas 48 h p.i. com 3,7% formaldeído diluído em tampão fosfato (PBS). Lavadas três vezes com PBS por 10 min, e em seguida permeabilizadas com triton x-100 (Invitrogen, Carlsbad, USA) 0,1% em PBS por 10 min. Seguidamente lavadas 3 vezes por 10 min com PBS, e então bloqueadas com 3% albumina sérica bovina (BSA) diluída em PBS por 1 h à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal IgG *mouse anti-6xhis* (Invitrogen, Carlsbad,

USA), ou com o anticorpo primário monoclonal IgG *mouse anti-Alphavirus* (Invitrogen, Carlsbad, USA, G77L), em diluição 1:500 em PBS 0,5% BSA over-night a 4°C em câmara úmida. As células foram então lavadas 3 vezes (7, 10 e 15 min) com PBS e incubadas com anticorpo secundário *goat anti-mouse* conjugado a alexafluor-488 (Invitrogen, Carlsbad, USA) em concentração 5 µg/ml diluído em PBS, por 1 h à temperatura ambiente. As células foram subsequentemente lavadas 3 vezes (7, 10 e 15 min) com PBS e então incubadas com o marcador nuclear Hoechst 33258 em concentração final 1 µg/ml durante 7 min, lavadas 3 vezes (7, 10 e 15 min com PBS) e, finalmente, observadas no microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 100.

3.4.3 Contrastação negativa em microscopia eletrônica de transmissão

Análise da formação de possíveis VLPs de MAYV foi feita a partir da contrastação negativa de partículas presentes no sobrenadante de cultura de células infectadas, coletadas a 72 h p.i.. A coleta e ultracentrifugação foi realizada como descrito no item 3.5.3 do capítulo I, sendo também utilizado o mesmo protocolo para contrastação negativa e visualização das amostras descrito neste item. A análise das dimensões das partículas do sobrenadante também foi realizado como descrito em 3.5.3, sendo medido o diâmetro de 41 partículas.

4. Resultados

4.1 Confirmações de clonagem e construção do plasmídeo de transferência pFBMAYVSC

O plasmídeo de transferência pFBMAYVSC foi gerado a partir da transposição do cassete de genes estruturais do MAYV clonados no plasmídeo pDONR207 MAYVSC (Figura 31), utilizando o sistema Gateway™ (Invitrogen, Carlsbad, USA). A digestão do plasmídeo pDONR207 MAYVSC utilizando a enzima de restrição *Pst*I gerou segmentos de DNA dos tamanhos esperados de 402 pb, 1020 pb e 5832 pb, confirmando a clonagem do cassete estrutural de genes do MAYV.

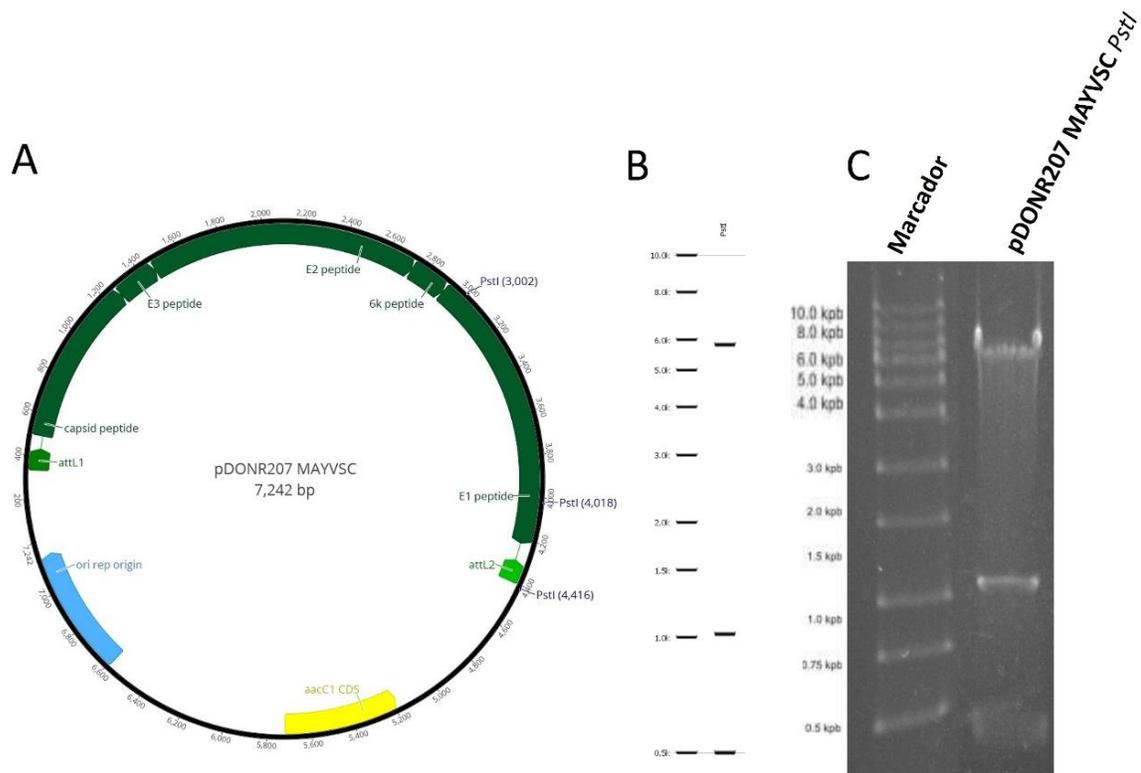


Figura 31. A: mapa vetor do plasmídeo de entrada pDONR207 MAYVSC, destacando a sequência do cassete dos genes estruturais C, E3, E2, 6k e E1 (verde escuro), assim como os sítios de recombinação Gateway™ attL1 e attL2, assim como os sítios de restrição para enzima *Pst*I utilizadas para confirmação. B: Simulação in silico do padrão de digestão esperado do plasmídeo com a enzima *Pst*I. Criados com: Geneious version 11.0 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia). C: padrão de restrição obtido analisado em gel de agarose 0,8% confirmando a construção do plasmídeo.

4.2 Confirmação de expressão de proteínas estruturais por *Western blot*

Os ensaios de infecção e expressão de proteínas heterólogas foi realiza utilizando apenas o vírus AcMAYVSC gp64+, devido a limitações iniciais na produção de um título viral alto suficiente do vírus gp64- para condução dos ensaios. A confirmação da expressão das proteínas foi realizada através da análise do perfil de expressão de proteínas por SDS-PAGE e detecção por *Western blot* a 72 h p.i. de células Tn5B, em MOI 10 com o vírus AcMAYVSC. A imunomarcagem utilizando o anticorpo primário anti-histidina revelou a presença de duas bandas distintas. Uma banda do tamanho previsto da proteína de envelope E1 fusionada a cauda de histidina (~ 47 kDa), e uma banda respectiva a poliproteína estrutural inteira do MAYV não clivada (> 100 kDa) (Figura 32A). A banda de ~ 47 kDa referente à proteína E1 clivada foi encontrada em maior proporção do que a poliproteína não clivada no meio de cultura, se comparado ao extrato total de célula infectadas

pelo vírus recombinante (Figura 32A). Isso indica que as proteínas secretadas no meio de cultura se encontram majoritariamente na sua forma clivada e madura, enquanto ainda existe uma quantidade grande de poliproteína intracelular ainda não processadas a 72 h p.i..

A análise utilizando anticorpo comercial anti-*Alphavirus*, revelou a marcação de uma banda de ~ 35 kDa, compatível com o peso molecular da proteína de capsídeo viral (C) (Figura 32B), proteína de MAYV com massa molecular mais próxima do observado, ainda que a massa molecular prevista *in silico* seja de 29 kDa. Entretanto, a proteína de capsídeo de MAYV já foi descrita como possuindo 34 kD (MEZENCIO; REBELLO, 1993), sendo possível que a ocorrência de modificações pós-traducionais explique a diferença observada.

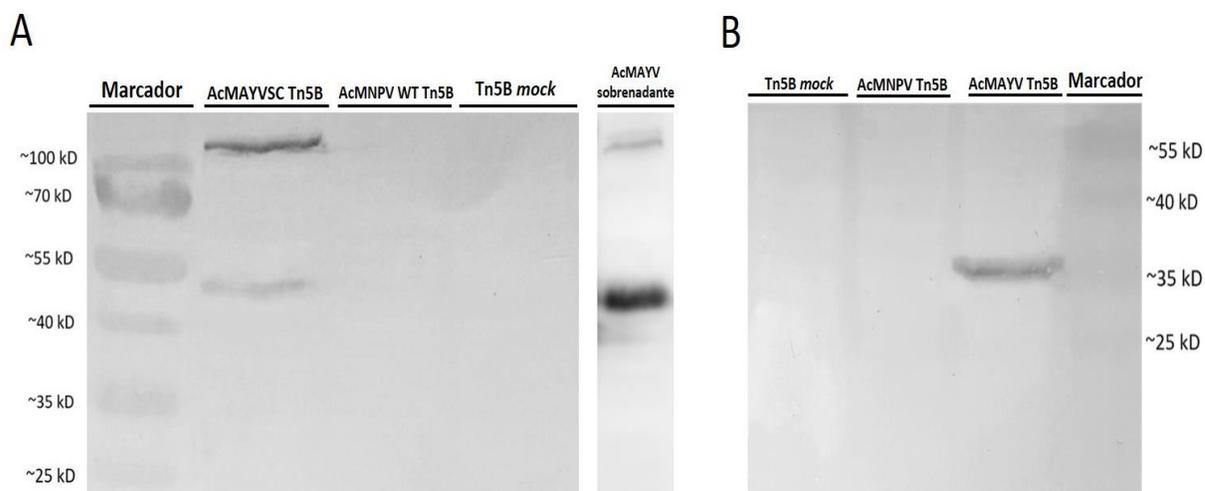


Figura 32. Análise por Western blot da expressão de proteínas de MAYV. Proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF e submetidas a detecção com anticorpos monoclonais. Como controles negativos foram utilizadas células infectadas com o vírus AcMNPV selvagem (WT) e células Tn5B não infectadas (mock). A: Marcação utilizando anticorpo anti-his em diluição 1:1000 para detecção da proteína de envelope E1, em extrato total de células Tn5B e no sobrenadante concentrado de cultura de células infectadas pelo vírus AcMAYVSC. B: detecção utilizando anticorpo anti-alphavirus em diluição 1:1000 em extrato de células infectadas pelo vírus AcMAYVSC.

4.3 Análise da expressão e localização celular de proteínas virais por imunofluorescência

Ensaio de marcação por imunofluorescência confirmaram a expressão das proteínas estruturais de MAYV e revelaram a sua localização celular. As células infectadas (72 h p.i.) com vírus AcMAYVSC e incubadas com o anticorpo *anti-6xhis* indicaram a presença da proteína E1 difusa pelo citoplasma, porém com maior intensidade de fluorescência na membrana celular (Figura 33, painel do meio), local de brotamento de vírions e formação do envelope viral (KIELIAN, 2006).

A incubação de células infectadas com o anticorpo *anti- alphavirus* indica a presença da proteína de capsídeo localizada majoritariamente no núcleo, como verificado na sobreposição entre o sinal de fluorescência da marcação de ácidos nucleicos (azul – Hoechst 33258) e a marcação da proteína C (vermelho – Texas Red), gerando o sinal violeta observado (Figura 33, painel da direita).

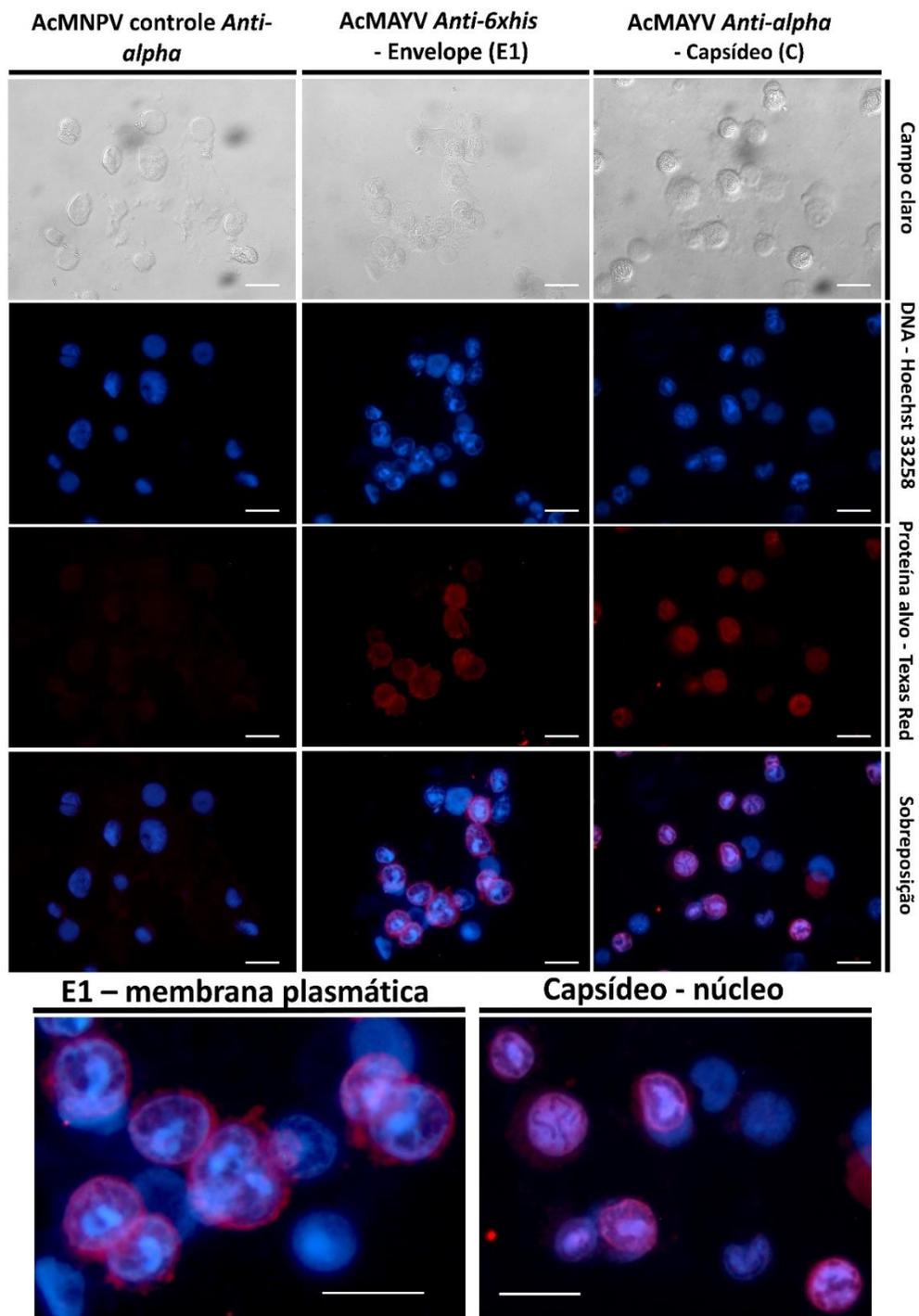


Figura 33. Análise da expressão e localização de proteínas do MAYV por imunofluorescência. Células Tn5b 72 h p.i infecção com MOI 10 pelo vírus AcMAYVSC, ou pelo vírus AcYFVNSCME utilizado como controle negativo. As células infectadas com o vírus controle não apresentaram marcação específica com anticorpo primário anti-alphavirus (painel da esquerda). A imagem de sobreposição na marcação contra 6xHis indica a localização da proteína de envelope viral E1 em maior concentração na membrana celular (painel do meio). Sobreposição na marcação com anticorpo contra alphavirus indica o acúmulo da proteína de capsídeo no núcleo celular (painel da direita). Barra de escala – 50 μm .

4.4 Avaliação da formação de VLPs por microscopia eletrônica de transmissão

A formação de VLPs foi avaliada por contrastação negativa do sobrenadante de cultura de células infectadas, após ultracentrifugação por colchão de sacarose. Foram identificadas partículas esféricas com diâmetro médio de 70 nm (Figura 34), compatíveis com as dimensões de partículas virais de alphavirus.

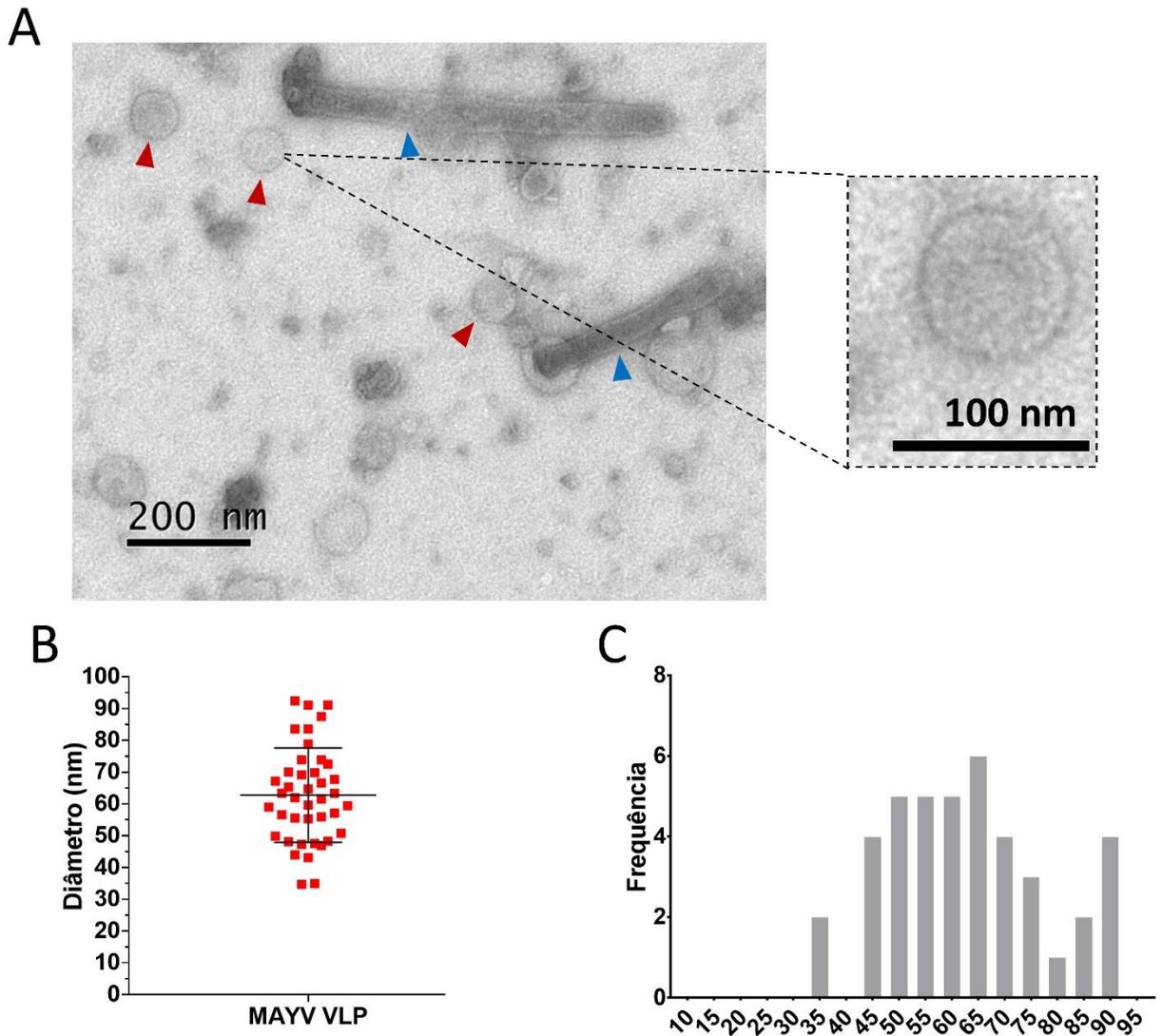


Figura 34. Contrastação negativa do sobrenadante de cultura de células Tn5B infectadas com o vírus AcMAYVSC em MOI 10. O sobrenadante de cultura de células foi coletado 72 h p.i., submetido a ultracentrifugação em colchão de sacarose e analisado por contrastação negativa em MET. Partículas com dimensões similares a partículas virais de alphavirus estão indicadas com triângulos vermelhos, e partículas virais (BVs) de baculovírus indicadas por triângulos azuis. B: Distribuição do diâmetro de partículas encontradas no sobrenadante de culturas infectadas com vírus recombinante para expressão de proteínas do MAYV (AcMAYVSC). Diâmetro das partículas = $62,75 \pm 14,84$ nm. C: Frequência das dimensões de partículas encontradas no sobrenadante de cultura de células infectadas com AcMAYVSC.

5. Discussão

Arbovírus emergentes apresentam um grande risco à saúde pública em países tropicais em desenvolvimento. A epidemia recente ocorrida no Brasil de Zika, e a síndrome congênita do Zika (com manifestações como microcefalia em neonatos), foi causada por um vírus que até então tinha sua distribuição restrita, e sem vacinas desenvolvidas (LOWE *et al.*, 2018). De forma similar, a introdução do vírus CHIKV (alphavirus) no Brasil, associada à presença de vetores competentes para sua transmissão, levou a uma epidemia recente que gerou grande impacto na saúde pública. Estes casos recentes ilustram o potencial que arbovírus emergentes possuem de causarem surtos de doenças até então pouco estudadas.

A presença do MAYV no território nacional já é estabelecida na região norte do país, porém foram detectados anticorpos contra MAYV em 15 pessoas com doenças febris com agente etiológico previamente indeterminado no estado do Goiás, indicando que o vírus se encontra presente em ciclo silvestre de transmissão na região (BRUNINI *et al.*, 2017). No caso da epidemia recente de febre amarela, a região centro-oeste serviu como zona de transição para introdução de uma epidemia da doença na região sudoeste do país. Sendo assim, existe o potencial do MAYV causar surtos de maiores dimensões da doença no futuro, transmitidos tanto por seus vetores silvestres já estabelecidos, quanto a partir de sua introdução em possíveis ciclos urbanos de transmissão mediado por mosquitos que habitam ambientes antrópicos.

Ainda não existem vacinas comerciais para proteção contra infecção pelo MAYV, e, apesar de casos identificados da doença serem de notificação compulsória no Brasil (<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-do-mayaro>), a doença é provavelmente subdiagnosticada em função da cocirculação de outros arbovírus no país (SMITH *et al.*, 2018). Desta forma, o desenvolvimento precoce de vacinas, e de insumos para diagnóstico diferencial da doença, podem gerar ferramentas importantes para evitar a ocorrência de surtos da doença no futuro.

A eficiência de antígenos produzidos com aplicações vacinais depende de sua imunogenicidade e, no caso de alphavirus, esta depende predominantemente das proteínas de envelope viral E1 e, especialmente, E2 (PORTA *et al.*, 2014). Desta forma, VLPs que simulem a estrutura da partícula viral, contendo as proteínas de envelope maduras e disposta e padrões repetitivos, formando epítomos conformacionais, são candidatos para vacinas eficazes. Sendo

assim, neste trabalho foram construídos baculovírus recombinantes como vetor para expressão de proteínas estruturais do MAYV, e formação de VLPs.

A expressão das proteínas foi confirmada por *Western blot*, sendo possível detectar proteínas virais tanto no lisado de células, quanto no meio de cultura de células infectadas, indicando que as proteínas heterólogas estão sendo produzidas e secretadas. A proteína E1 foi detectada na sua forma clivada, e também ainda associada à poliproteína viral, evidente pela presença de duas bandas de massas moleculares esperados (~47 kD e ~136 kD), o que indica o processamento proteolítico incompleto da poliproteína. No entanto, foi possível observar uma aparente maior quantidade relativa de E1 clivada em relação a poliproteína inteira no sobrenadante de cultura, sugerindo que proteínas secretadas se encontram majoritariamente em sua forma madura.

A análise de células infectadas com o vírus recombinante AcMAYVSC sob microscopia de fluorescência com imunomarcação ajudou a revelar a localização celular das proteínas produzidas. Durante a infecção de alphavirus a proteína E1 é endereçada a membrana plasmática celular (se associando a ela através de seu domínio transmembrana), local aonde ocorre o brotamento de novas partículas virais (KIELIAN, 2006). A proteína E1 de MAYV foi observada difusa pela célula, porém em aparente acúmulo associado à membrana plasmática de células Tn5B, indicando sua localização esperada para o brotamento de partículas. A proteína de capsídeo também foi observada dispersa pela célula, porém apresentou um aparente acúmulo no núcleo. Já foi identificada a presença de um sinal de importação e exportação nuclear para proteína C de outros alphavirus, e o acúmulo nuclear da proteína também já foi observado para outros vírus do grupo (GARMASHOVA; ATASHEVA; *et al.*, 2007; JACOBS *et al.*, 2017; THOMAS *et al.*, 2013).

A análise do meio de cultura de células Tn5B infectadas com o vírus AcMAYVSC por contrastação negativa revelou a presença de partículas com dimensões de partículas virais de alphavirus. As partículas apresentaram morfologia homogênea com um diâmetro próximo do esperado para partículas virais.

Além da produção de VLPs do CHIKV em sistema de expressão por baculovírus em células de inseto (METZ *et al.*, 2013), e em células de mamífero (AKAHATA *et al.*, 2010), como vacinas contra o vírus, a produção de VLPs de alphavirus também é explorada como plataforma para a incorporação de antígenos de outros patógenos. Urakami *et al.* (2017) fusionaram antígeno CSP do parasita causador de malária *Plasmodium falciparum* à proteína E2 de CHIKV, produzindo

VLPs quiméricas que conferiram imunidade protetora contra o parasita. A produção de nanopartículas que se assemelham ao nucleocapsídeo viral (em inglês *core like particles* – CLPs) no núcleo de células de inseto, também foi explorada como para incorporação de antígenos de outros patógenos para produção de vacinas (HIKKE *et al.*, 2016). Estes estudos demonstram as possibilidades que podem ser exploradas no desenvolvimento de VLPs de alphavirus como plataformas vacinais.

6. Conclusão e perspectivas

Neste trabalho foram construídos dois baculovírus recombinantes para expressão de proteínas de MAYV em células de inseto. A expressão da poliproteína e seu processamento foram confirmados por *Wester blot*, assim como a localização celular das proteínas identificada por imunofluorescência. Análises por MET revelaram a presença de partículas que se assemelham a morfologia do MAYV sendo secretadas no meio de cultura. Como perspectivas para continuação deste trabalho se encontram:

- Imunomarcção das estruturas produzidas e secretadas com nanopartículas de ouro e análise por MET;
- Otimização da utilização do vetor sem o gene *gp64* para produção de VLPs sem a presença de BVs no sobrenadante de cultura;
- Purificação de partículas por técnicas de ultracentrifugação em gradiente de densidade e por cromatografia;
- Análise do potencial imunogênico das partículas através de ensaios *in vitro* de avaliação da produção de citosinas;
- Avaliação do potencial vacinal das partículas através de inoculação *in vivo* e análise de produção de anticorpos neutralizantes e através de ensaios de desafio.

Referências Bibliográficas

ACOSTA-AMPUDIA, Yeny *et al.* Mayaro: an emerging viral threat? *Emerging Microbes and Infections*, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>>.

AKAHATA, Wataru *et al.* A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nature Medicine*, v. 16, n. 3, p. 334–338, 2010.

AKONDY, Rama S. *et al.* The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8 + T Cell Response. *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 12, p. 7919–7930, 15 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0803903>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

ANDERSON, Charles R. *et al.* Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 6, n. 6, p. 1012–1016, 1 nov. 1957. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1957.6.1012>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

ARAKAWA, Masashi; MORITA, Eiji. Flavivirus replication organelle biogenesis in the endoplasmic reticulum: Comparison with other single-stranded positive-sense RNA viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 9, 1 maio 2019.

ASSENBERG, R. *et al.* Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication. *Journal of Virology*, v. 83, n. 24, p. 12895–12906, 15 dez. 2009.

ASSUNÇÃO-MIRANDA, Iranaia; CRUZ-OLIVEIRA, Christine; DA POIAN, Andrea T. *Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. BioMed Research International*. [S.l.: s.n.], 2013

AZEVEDO, Raimunda S.S. *et al.* Mayaro fever virus, Brazilian amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 11, p. 1830–1832, nov. 2009.

BACHMANN, Martin F.; JENNINGS, Gary T. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 11, p. 787–796, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri2868>>.

BARROS, Maria CES *et al.* Yellow fever virus envelope protein expressed in insect cells is capable of syncytium formation in lepidopteran cells and could be used for immunodetection of YFV in human sera. *Virology Journal*, v. 8, n. 1, p. 261, 2011. Disponível em: <<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-8-261>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

BERGKESSEL, Megan; GUTHRIE, Christine. Colony PCR. *Methods in Enzymology*. [S.l.]: Academic Press Inc., 2013. v. 529. p. 299–309.

BOIGARD, Hélène *et al.* Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS Neglected*

Tropical Diseases, v. 11, n. 5, p. 1–20, 2017.

BOIGARD, Hélène; CIMICA, Velasco; GALARZA, Jose M. Dengue-2 virus-like particle (VLP) based vaccine elicits the highest titers of neutralizing antibodies when produced at reduced temperature. *Vaccine*, v. 36, n. 50, 2018.

BRANDRISS, M. W. *et al.* Lethal 17D yellow fever encephalitis in mice. I. Passive protection by monoclonal antibodies to the envelope proteins of 17D yellow fever and dengue 2 viruses. *Journal of General Virology*, v. 67, n. 2, p. 229–234, 1986.

BROWN, Dennis T.; HERNANDEZ, Raquel. Infection of Cells by Alphaviruses. *Saponins used in Food and Agriculture plenum press*. [S.l: s.n.], 2012. p. 181–199. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-0980-9_8>.

BRUNINI, Sandra *et al.* High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 23, n. 6, p. 1025–1026, 1 jun. 2017. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/6/16-0929_article.htm>. Acesso em: 14 jan. 2020.

BRYANT, Juliet E.; HOLMES, Edward C.; BARRETT, Alan D. T. Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 5, p. e75, 2007. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0030075>>. Acesso em: 28 dez. 2019.

CASTRO, Maria Elita Batista De *et al.* Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 10, p. 1733–1761, out. 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X1999001000001&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 2 jan. 2020.

CAVALHEIRO, Mariana G. *et al.* 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 Ciencias*, v. 88, n. 3, p. 1485–1499, 1 set. 2016.

CHAMBERS, Adam C. *et al.* Overview of the Baculovirus Expression System. *Current Protocols in Protein Science*, v. 91, n. 1, p. 5.4.1–5.4.6, 21 jan. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpps.47>>.

CHATEL-CHAIX, Laurent *et al.* A Combined Genetic-Proteomic Approach Identifies Residues within Dengue Virus NS4B Critical for Interaction with NS3 and Viral Replication. *Journal of Virology*, v. 89, n. 14, p. 7170–7186, 2015.

CHEN, Rubing *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. *Journal of General Virology*, v. 99, n. 6, p. 761–762, 1 jan. 2018.

CHEN, Yun-ru *et al.* The Transcriptome of the Baculovirus *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* Cells. v. 87, n. 11, p. 6391–6405, 2013.

CHOI, Hyeree *et al.* Protective immunity by an engineered DNA vaccine for mayaro virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 2, 1 fev. 2019.

CO, Mary Dawn T. *et al.* Human Cytotoxic T Lymphocyte Responses to Live Attenuated 17D Yellow Fever Vaccine: Identification of HLA-B35-Restricted CTL Epitopes on Nonstructural Proteins NS1, NS2b, NS3, and the Structural Protein E. *Virology*, v. 293, n. 1, p. 151–163, 1 fev. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682201912553>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

COUDERC, Thérèse *et al.* A mouse model for Chikungunya: Young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 2, 2008.

COUTO-LIMA, Dinair *et al.* Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 4848, 7 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-05186-3>>.

COX, Manon M.J.; HOLLISTER, Jason R. FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*, v. 37, n. 3, p. 182–189, jun. 2009.

CUNHA, Mariana Sequetin *et al.* Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016–2017). *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

CUNHA, Marielton dos Passos *et al.* Origin of the São Paulo Yellow Fever epidemic of 2017–2018 revealed through molecular epidemiological analysis of fatal cases. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 20418, 31 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-56650-1>>.

DAI, Shiyu *et al.* Establishment of Baculovirus-Expressed VLPs Induced Syncytial Formation Assay for Flavivirus Antiviral Screening. *Viruses*, v. 10, n. 7, p. 365, 11 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/10/7/365>>.

DE FIGUEIREDO, Mario Luis Garcia; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Emerging alphaviruses in the americas: Chikungunya and mayaro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 6, p. 677–683, 2014.

DE O’MOTA, Mânlio T.; AVILLA, Clarita M.S.; NOGUEIRA, Maurício L. *Mayaro virus: A neglected threat could cause the next worldwide viral epidemic*. Future Virology. [S.l.]: Future Medicine Ltd. , 2019

DE OLIVEIRA MOTA, Mânlio Tasso *et al.* Mayaro virus: A neglected arbovirus of the Americas. *Future Virology*, v. 10, n. 9, p. 1109–1122, 2015.

DECROLY, Etienne *et al.* *Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA*. *Nature Reviews Microbiology*. [S.l.: s.n.]. , jan. 2012

DU, Ruikun *et al.* Glycoprotein E of the Japanese encephalitis virus forms virus-like particles and induces syncytia when expressed by a baculovirus. *Journal of General Virology*, v. 96, n. 5, 2015.

ESCADAFAL, Camille *et al.* Rapid Molecular Assays for the Detection of Yellow Fever Virus in Low-Resource Settings. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 3, p. e2730, 6 mar.

2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002730>>. Acesso em: 28 dez. 2019.

FALGOUT, B *et al.* Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of virology*, v. 65, n. 5, p. 2467–75, maio 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2016768>>. Acesso em: 30 dez. 2019.

FARIA, N. R. *et al.* Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*, v. 361, n. 6405, p. 894–899, 31 ago. 2018.

Febre do Mayaro: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-do-mayaro>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

FU, Da-wei; ZHANG, Peng-fei. Establishment and Characterization of Japanese B Encephalitis Virus Persistent Infection in the Sf9 Insect Cell Line. *Biologicals*, v. 24, n. 3, p. 225–233, set. 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105696900317>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

GARDNER, Christina L.; RYMAN, Kate D. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, n. 1, p. 237–260, mar. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272271210000028>>.

GARG, Himanshu *et al.* Capsid containing virus like particle vaccine against Zika virus made from a stable cell line. *Vaccine*, v. 37, n. 48, p. 7123–7131, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.093>>.

GARG, Himanshu *et al.* Development of Virus-Like-Particle Vaccine and Reporter Assay for Zika Virus. *Journal of Virology*, v. 91, n. 20, 2017.

GARMASHOVA, N.; ATASHEVA, S.; *et al.* Analysis of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Function in the Inhibition of Cellular Transcription. *Journal of Virology*, v. 81, n. 24, p. 13552–13565, 15 dez. 2007.

GARMASHOVA, N. *et al.* Sindbis Virus Nonstructural Protein nsP2 Is Cytotoxic and Inhibits Cellular Transcription. *Journal of Virology*, v. 80, n. 12, p. 5686–5696, 15 jun. 2006.

GARMASHOVA, N.; GORCHAKOV, R.; *et al.* The Old World and New World Alphaviruses Use Different Virus-Specific Proteins for Induction of Transcriptional Shutoff. *Journal of Virology*, v. 81, n. 5, p. 2472–2484, 2007.

GAUCHER, Denis *et al.* Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 205, n. 13, p. 3119–3131, 22 dez. 2008. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/205/13/3119/47167/Yellow-fever-vaccine-induces-integrated>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

GEROLD, Gisa *et al.* Protein Interactions during the Flavivirus and Hepacivirus Life Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 16, n. 4 suppl 1, p. S75–S91, 1 abr. 2017. Disponível em:

<<http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.R116.065649>>. Acesso em: 31 dez. 2019.

GOPAL, Radhika; SCHNEEMANN, Anette. Production and Application of Insect Virus-Based VLPs. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.: s.n.], 2018. v. 1776. p. 125–141. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7808-3_8>.

GOULSON, Dave. Wipfelkrankheit: Modification of host behaviour during baculoviral infection. *Oecologia*, v. 109, n. 2, p. 219–228, 2 jan. 1997.

GRANADOS, Robert R. *et al.* A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 64, n. 3, p. 260–266, 1994.

HANNA, S. L. *et al.* N-Linked Glycosylation of West Nile Virus Envelope Proteins Influences Particle Assembly and Infectivity. *Journal of Virology*, v. 79, n. 21, p. 13262–13274, 1 nov. 2005. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.21.13262-13274.2005>>. Acesso em: 3 jan. 2020.

HARPER, Diane M. *et al.* Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*, v. 367, n. 9518, p. 1247–1255, 15 abr. 2006.

HAYES, Edward B. Is it time for a new yellow fever vaccine? *Vaccine*, v. 28, n. 51, p. 8073–8076, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.015>>.

HIKKE, Mia C. *et al.* Alphavirus capsid proteins self-assemble into core-like particles in insect cells: A promising platform for nanoparticle vaccine development. *Biotechnology Journal*, v. 11, n. 2, p. 266–273, 2016.

HOLZER, Georg W. *et al.* Evaluation of an inactivated Ross River virus vaccine in active and passive mouse immunization models and establishment of a correlate of protection. *Vaccine*, v. 29, n. 24, p. 4132–4141, 31 maio 2011.

HOPKINS, Ralph F.; ESPOSITO, Dominic. A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. *BioTechniques*, v. 47, n. 3, p. 785–788, 2009.

JACOBS, Susan *et al.* Mutation of a Conserved Nuclear Export Sequence in Chikungunya Virus Capsid Protein Disrupts Host Cell Nuclear Import. *Viruses*, v. 9, n. 10, p. 306, 20 out. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/9/10/306>>. Acesso em: 21 dez. 2019.

JEHLE, J. A. *et al.* On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*, v. 151, n. 7, p. 1257–1266, 2006.

JOSE, Joyce; SNYDER, Jonathan E; KUHN, Richard J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*, v. 4, n. 7, p. 837–856, set. 2009. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.09.59>>.

KÄÄRIÄINEN, Leevi *et al.* Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-

structural polyprotein by nsP2 protease. *Journal of General Virology*, v. 82, n. 4, p. 765–773, 1 abr. 2001. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-82-4-765>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

KAM, Yiu Wing *et al.* Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Molecular Medicine*, v. 4, n. 4, p. 330–343, abr. 2012.

KANTOR, Asher M *et al.* Infection Pattern of Mayaro Virus in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and Transmission Potential of the Virus in Mixed Infections With Chikungunya Virus. *Journal of Medical Entomology*, v. 56, n. 3, p. 832–843, 16 abr. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jme/article/56/3/832/5298684>>. Acesso em: 26 dez. 2019.

KAUFMANN, Bärbel; ROSSMANN, Michael G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and Infection*, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2011.

KHAN, Mohsin *et al.* Subunit vaccine formulations based on recombinant envelope proteins of Chikungunya virus elicit balanced Th1/Th2 response and virus-neutralizing antibodies in mice. *Virus research*, v. 167, n. 2, p. 236–46, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22610133>>. Acesso em: 22 dez. 2019.

KIELIAN, Margaret. Class II virus membrane fusion proteins. *Virology*, v. 344, n. 1, p. 38–47, 5 jan. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682205006008>>. Acesso em: 14 jan. 2020.

KIELIAN, Margaret; CHANEL-VOS, Chantal; LIAO, Maofu. *Alphavirus entry and membrane fusion. Viruses*. [S.l: s.n.], abr. 2010

KOST, Thomas A.; CONDREAY, J. Patrick; JARVIS, Donald L. *Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nature Biotechnology*. [S.l: s.n.], 2005

KROL, Ewelina; BRZUSKA, Gabriela; SZEWCZYK, Boguslaw. *Production and Biomedical Application of Flavivirus-like Particles. Trends in Biotechnology*. [S.l: s.n.], 2019

KUADKITKAN, Atichat *et al.* Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology*, v. 406, n. 1, p. 149–161, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.015>>.

KUMAR, Manish; SUDEEP, A. B.; ARANKALLE, Vidya A. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus. *Vaccine*, v. 30, n. 43, p. 6142–6149, 21 set. 2012.

KUMMERER, B. M.; RICE, Charles M. Mutations in the Yellow Fever Virus Nonstructural Protein NS2A Selectively Block Production of Infectious Particles. *Journal of Virology*, v. 76, n. 10, p. 4773–4784, 15 maio 2002. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.76.10.4773-4784.2002>>.

KWALLAH, Allan *et al.* A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. *Journal of Virological Methods*, v. 193, n. 1, p. 23–27, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.05.004>>.

LAN, Moh *et al.* Structural studies of Chikungunya virus maturation. v. 114, n. 52, p. 1–5, 2017.

LAVERGNE, Anne *et al.* Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Research*, v. 117, n. 2, p. 283–290, 2006.

LEUNG, J. Y. *et al.* Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *Journal of Virology*, v. 82, n. 10, p. 4731–4741, 15 maio 2008. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00002-08>>. Acesso em: 30 dez. 2019.

LI, Kuohan; PHOO, Wint Wint; LUO, Dahai. Functional interplay among the flavivirus NS3 protease, helicase, and cofactors. *Virologica Sinica*, v. 29, n. 2, p. 74–85, 2014.

LIANG, Qiming *et al.* Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell*, v. 19, n. 5, p. 663–671, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>>.

LINDENBACH, Brett D.; RICE, Charles M. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*. [S.l.: s.n.], 2003. v. 59. p. 23–61. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352703590029>>.

LINDENBACH, Brett D; RICE, Charles M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: DAVID M. KNIFE, PETER M. HOWLEY (Org.). *Fields Virology*. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. p. 1101–1151.

LINDSEY, Nicole P. *et al.* Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine*, v. 26, n. 48, p. 6077–6082, 11 nov. 2008.

LIU, W. J.; CHEN, H. B.; KHROMYKH, A. A. Molecular and Functional Analyses of Kunjin Virus Infectious cDNA Clones Demonstrate the Essential Roles for NS2A in Virus Assembly and for a Nonconservative Residue in NS3 in RNA Replication. *Journal of Virology*, v. 77, n. 14, p. 7804–7813, 15 jul. 2003.

LONG, Kanya C. *et al.* Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 4, p. 750–757, 2011.

LORENZ, Camila; FREITAS RIBEIRO, Ana; CHIARAVALLI NETO, Francisco. Mayaro virus distribution in South America. *Acta Tropica*, v. 198, n. July, p. 105093, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105093>>.

LOWE, Rachel *et al.* The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 1, p. 96, 9 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/15/1/96>>. Acesso em: 14 jan.

2020.

LU, Y. E.; KIELIAN, M. Semliki Forest Virus Budding: Assay, Mechanisms, and Cholesterol Requirement. *Journal of Virology*, v. 74, n. 17, p. 7708–7719, 1 set. 2000.

LUA, Linda H L *et al.* Bioengineering Virus-Like Particles as Vaccines. v. 111, n. 3, p. 425–440, 2014.

LUCKOW, Verne A *et al.* Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*. v. 67, n. 8, p. 4566–4579, 1993.

LUO, D. *et al.* Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus. *Journal of Virology*, v. 82, n. 1, p. 173–183, 1 jan. 2008.

MA, Lixin *et al.* Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 10, p. 3414–3419, 9 mar. 2004.

MACKENZIE, Jason M. *et al.* Subcellular Localization and Some Biochemical Properties of the Flavivirus Kunjin Nonstructural Proteins NS2A and NS4A. *Virology*, v. 245, n. 2, p. 203–215, jun. 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682298991565>>.

MARSH, Mark; HELENIUS, Ari. Virus entry: Open sesame. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 729–740, 2006.

MCGILL, Paul E. Viral infections: α -viral arthropathy. *Baillière's Clinical Rheumatology*, v. 9, n. 1, p. 145–150, fev. 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0950357905801517>>.

MCLEAN, Jeffrey E. *et al.* Flavivirus NS4A-induced Autophagy Protects Cells against Death and Enhances Virus Replication. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 25, p. 22147–22159, 24 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110.192500>>.

MENA, Jimmy A.; KAMEN, Amine A. Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. *Expert Review of Vaccines*, v. 10, n. 7, p. 1063–1081, 2011.

METZ, Stefan W. *et al.* Effective Chikungunya Virus-like Particle Vaccine Produced in Insect Cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 3, p. e2124, 14 mar. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002124>>. Acesso em: 23 dez. 2019.

MEZENCIO, J. M. S.; REBELLO, M. A. Mayaro virus proteins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 88, n. 2, p. 299–304, jun. 1993. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761993000200020&lng=en&tlng=en>.

MONATH, Thomas P.; VASCONCELOS, Pedro F.C. Yellow fever. *Journal of Clinical*

Virology, v. 64, p. 160–173, 6 mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>>.

MONATH, Thomas P. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. *Expert Review of Vaccines*, v. 11, n. 4, p. 427–448, 9 abr. 2012. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed10&NEWS=N&AN=2012256014>>.

MONATH, Thomas P. Yellow fever update. *Infectious Diseases*, v. 1, n. 1, p. 11–20, 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309901000160>>.

MONATH, Thomas P. Yellow fever vaccine. *Expert Review of Vaccines*, v. 4, n. 4, p. 553–574, 9 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L41297302%0Ahttp://dx.doi.org/10.1586/14760584.4.4.553>>.

MOURÃO, Maria Paula Gomes *et al.* Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 12, n. 1, p. 42–46, 2012. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2011.0669>>.

MUKHOPADHYAY, Suchetana; KUHN, Richard J.; ROSSMANN, Michael G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 13–22, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro1067>>.

NAPOLEÃO-PEGO, Paloma *et al.* Mayaro Virus Disease. *Journal of Human Virology & Retrovirology*, v. 1, n. 3, p. 1–11, 2 set. 2014. Disponível em: <<http://medcraveonline.com/JHVRV/JHVRV-01-00018.php>>.

NAVECA, Felipe Gomes *et al.* Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and oropouche-like viruses. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 7, p. 510–513, 1 jul. 2017.

NOAD, Rob; ROY, Polly. Virus-like particles as immunogens. *Trends in microbiology*, v. 11, n. 9, p. 438–44, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678860>>.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual.*, 1992.

OHTAKI, Naohiro *et al.* Immunogenicity and efficacy of two types of West Nile virus-like particles different in size and maturation as a second-generation vaccine candidate. *Vaccine*, v. 28, n. 40, p. 6588–6596, set. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.055>>.

OOMENS, A.G.P.; BLISSARD, G.W. Requirement for GP64 to Drive Efficient Budding of Autographa californica Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. *Virology*, v. 254, n. 2, p. 297–314, 15 fev. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004268229899523X>>. Acesso em: 2 jan. 2020.

PAREDES, Angel M. *et al.* Conformational changes in Sindbis virions resulting from exposure to low pH and interactions with cells suggest that cell penetration may occur at the cell surface in the absence of membrane fusion. *Virology*, v. 324, n. 2, p. 373–386, 1 jul. 2004.

PAULES, Catharine I.; FAUCI, Anthony S. Yellow Fever — Once Again on the Radar Screen in the Americas. *New England Journal of Medicine*, v. 376, n. 15, p. 1397–1399, 13 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMp1702172>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

PERERA-LECOIN, Manuel *et al.* Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses*, v. 6, n. 1, p. 69–88, 30 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/6/1/69>>. Acesso em: 30 dez. 2019.

PIJLMAN, Gorben P. Enveloped virus-like particles as vaccines against pathogenic arboviruses. *Biotechnology Journal*, v. 10, n. 5, p. 659–670, maio 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201400427>>.

PLONSKY, Ilya *et al.* An analysis of the role of the target membrane on the Gp64-induced fusion pore. *Virology*, v. 253, n. 1, p. 65–76, 5 jan. 1999.

POLAND, J. D. *et al.* Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 59, n. 6, p. 895–900, 1981.

PONG, Wen-Li *et al.* RNA binding property and RNA chaperone activity of dengue virus core protein and other viral RNA-interacting proteins. *FEBS Letters*, v. 585, n. 16, p. 2575–2581, 19 ago. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2011.06.038>>. Acesso em: 29 dez. 2019.

PORTA, J. *et al.* Locking and Blocking the Viral Landscape of an Alphavirus with Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, v. 88, n. 17, p. 9616–9623, 1 set. 2014. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01286-14>>. Acesso em: 14 jan. 2020.

REED, L.J.; MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². *American Journal of Epidemiology*, v. 27, n. 3, p. 493–497, maio 1938. Disponível em: <<https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>>. Acesso em: 8 dez. 2019.

RIBEIRO, B. M.; MORGADO, F. S.; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P. ;SILVA, L. A.; CHAVES, L. C. S. ; QUIRINO, M. S. ;ANDRADE, M. S.; CORREA, R. F. T. . Baculovírus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos. In: Rodrigo Ribeiro Resende; Carlos Ricardo Soccol. (Org.). *Biotecnologia Aplicada à Saúde - Volume 2*. 1ed. São Paulo: Blucher, 2015, v. 2, p. 255-306

ROBINSON, D M *et al.* Inactivated Mayaro vaccine produced in human diploid cell cultures. *Military medicine*, v. 141, n. 3, p. 163–6, mar. 1976. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/815839>>. Acesso em: 23 dez. 2019.

ROLDÃO, António; LEDA, R; JT, Manuel. Virus-like particles in vaccine development. - PubMed - NCBI. v. 9, n. 10, p. 1149–1176, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923267>>.

ROTHAN, Hussin A.; KUMAR, Mukesh. Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Proteins in Flavivirus Replication and Assembly Complexes. *Pathogens*, v. 8, n. 3, p. 148, 12 set. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/8/3/148>>. Acesso em: 30 dez. 2019.

RUPP, Jonathan C. *et al.* Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *Journal of General Virology*, v. 96, n. 9, p. 2483–2500, 1 set. 2015.

SALONEN, A.; AHOLA, T.; KÄÄRIÄINEN, L. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 285, p. 139–173, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Molecular cloning: a laboratory manual.*, n. Ed. 2, 1989.

SAMUEL, Gladys Hazitha *et al.* Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 48, p. 13863–13868, 2016.

SÁNCHEZ-SECO, M. Paz *et al.* A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *Journal of Virological Methods*, v. 95, n. 1–2, p. 153–161, 2001.

SANDERS, Erin R. Aseptic laboratory techniques: Plating methods. *Journal of Visualized Experiments*, n. 63, p. 1–18, 11 maio 2012.

SANTIAGO, Felix W. *et al.* Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 10, p. e0004104, 23 out. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004104>>. Acesso em: 19 dez. 2019.

SANZ, M. A. *et al.* The Alphavirus 6K Protein. *Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design*. Boston, MA: Springer US, 2007. p. 233–244. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/0-387-28146-0_16>. Acesso em: 26 dez. 2019.

SAÚDE, Ministério Da. *Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela - Brasil 2017/2018. Informe Epidemiológico - SVS - Ministério da Saúde*. [S.l: s.n.], 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/maio/18/Informe-FA-26.pdf>>.

SCHNIERLE, Barbara S. Cellular Attachment and Entry Factors for Chikungunya Virus. *Viruses*, v. 11, n. 11, p. 1078, 19 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/11/11/1078>>.

SCHWARZ, Tino F. *Clinical update of the AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18*

cervical cancer vaccine, Cervarix®. Advances in Therapy. [S.l: s.n.]. , nov. 2009

SHEARER, Freya M. *et al.* Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 11, p. 1209–1217, 2017.

SIMMONDS, Peter *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, v. 98, n. 1, p. 2–3, 1 jan. 2017.

SMITH, Jessica L. *et al.* Human Antibody Responses to Emerging Mayaro Virus and Cocirculating Alphavirus Infections Examined by Using Structural Proteins from Nine New and Old World Lineages. *mSphere*, v. 3, n. 2, 21 mar. 2018.

STAPLES, J. Erin; MONATH, Thomas P. *Yellow fever: 100 Years of discovery. JAMA - Journal of the American Medical Association*. [S.l: s.n.]. , 27 ago. 2008

STRAUSS, J H; STRAUSS, E G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7968923><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC372977>>.

SUHRBIER, Andreas. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 15, n. 10, p. 597–611, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41584-019-0276-9>>.

SUHRBIER, Andreas; JAFFAR-BANDJEE, Marie Christine; GASQUE, Philippe. Arthritogenic alphaviruses-an overview. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 8, n. 7, p. 420–429, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2012.64>>.

SUHRBIER, Andreas; MAHALINGAM, Suresh. *The immunobiology of viral arthritides. Pharmacology and Therapeutics*. [S.l: s.n.]. , dez. 2009

TEOH, Pak-Guan *et al.* Maintenance of Dimer Conformation by the Dengue Virus Core Protein $\alpha 4$ - $\alpha 4'$ Helix Pair Is Critical for Nucleocapsid Formation and Virus Production. *Journal of Virology*, v. 88, n. 14, p. 7998–8015, 15 jul. 2014.

TESH, Robert B. *et al.* Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 28, n. 1, p. 67–73, jan. 1999.

THEILER, Max; SMITH, Hugh H. THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 65, n. 6, p. 787–800, 1 jun. 1937. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/65/6/787/3622/THE-USE-OF-YELLOW-FEVER-VIRUS-MODIFIED-BY-IN-VITRO>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

THOMAS, Saijo *et al.* Chikungunya virus capsid protein contains nuclear import and export signals. *Virology Journal*, v. 10, p. 1–13, 2013.

THOMAS, Saijo *et al.* Functional dissection of the alphavirus capsid protease: Sequence requirements for activity. *Virology Journal*, v. 7, 2010.

UFRJ detecta vírus Mayaro no estado do Rio de Janeiro | Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. Disponível em: <<https://ufrj.br/noticia/2019/05/16/ufrj-detecta-virus-mayaro-no-estado-do-rio-de-janeiro>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

URAKAMI, Akane *et al.* Development of a novel virus-like particle vaccine platform that mimics the immature form of alphavirus. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 24, n. 7, 1 jul. 2017.

VAN AALST, Mariëlle *et al.* Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*. [S.l.]: Elsevier USA. , 1 jan. 2017

VAN MEER, Maurits P.A. *et al.* Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence. *Journal of Clinical Virology*, v. 92, p. 25–31, 1 jul. 2017.

VANCINI, R. *et al.* Alphavirus Genome Delivery Occurs Directly at the Plasma Membrane in a Time- and Temperature-Dependent Process. *Journal of Virology*, v. 87, n. 8, p. 4352–4359, 15 abr. 2013.

VASCONCELOS, P F *et al.* Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases.[Erratum appears in Lancet 2001 Sep 22;358(9286):1018 Note: Papaiordanou, CM [corrected to Papaiordanou, PM]], [Erratum appears in Lancet 2001 Jul 28;358(927). *Lancet*, v. 358, p. 91–97, 2001.

VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 2, p. 275–293, abr. 2003. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=290004&indexSearch=ID>>.

VASILJEVA, Lidia *et al.* Identification of a novel function of the Alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 23, p. 17281–17287, 9 jun. 2000.

VAUGHN, J. L. *et al.* The establishment of two cell lines from the insect spodoptera frugiperda (lepidoptera; noctuidae). *In Vitro*, v. 13, n. 4, p. 213–217, 1977.

VIEIRA, Carla Julia da Silva Pessoa *et al.* Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. *Acta Tropica*, v. 147, p. 12–16, jul. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X15000790>>.

VOSS, James E. *et al.* Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, v. 468, n. 7324, p. 709–712, 1 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature09555>>.

WANG, Eryu *et al.* Reverse transcription-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection and differentiation of alphavirus infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v.

44, n. 11, p. 4000–4008, nov. 2006.

WEGER-LUCARELLI, James *et al.* Identifying the Role of E2 Domains on Alphavirus Neutralization and Protective Immune Responses. p. 1–17, 2015.

WEISE, William J. *et al.* A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 8, p. e2969, 7 ago. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002969>>. Acesso em: 23 dez. 2019.

WESULA OLIVIA, Lwande *et al.* Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. *Infection Ecology & Epidemiology*, v. 5, n. 1, p. 29853, 2015.

WHITTEMBURY, Alvaro *et al.* Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine*, v. 27, n. 43, p. 5974–5981, 9 out. 2009.

WIGGINS, K.; EASTMOND, B.; ALTO, B. W. Transmission potential of Mayaro virus in Florida *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 32, n. 4, p. 436–442, 1 dez. 2018.

WINTACHAI, Phitchayapak *et al.* Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. *Journal of Medical Virology*, v. 84, n. 11, p. 1757–1770, nov. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.23403>>.

Yellow fever. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>>. Acesso em: 31 dez. 2019.

ZHANG -F., P. *et al.* St Louis encephalitis virus establishes a productive, cytopathic and persistent infection of Sf9 cells. *Journal of General Virology*, v. 74, n. 8, p. 1703–1708, 1993.

ZHANG, Rong *et al.* Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 16 maio 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41586-018-0121-3>>.

ZHANG, Ying *et al.* Structures of immature flavivirus particles. *EMBO Journal*, v. 22, n. 11, p. 2604–2613, 2003.

ZHAO, Qinjian *et al.* Virus-like particle-based human vaccines: Quality assessment based on structural and functional properties. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 11, p. 654–663, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.002>>.

ZHOU, J.; BLISSARD, G. W. Identification of a GP64 Subdomain Involved in Receptor Binding by Budded Virions of the Baculovirus *Autographica californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, v. 82, n. 9, p. 4449–4460, 1 maio 2008. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02490-07>>. Acesso em: 2 jan. 2020.

ZOU, Jing *et al.* Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. *Journal of Virology*, v. 89, n. 7, p. 3455–3470, 1 abr. 2015. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.03453-14>>.

ZUCHI, Nayara *et al.* Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 6, p. 820–823, 1 set. 2014.