NAYARA GOMES LUIZ SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE IMUNFLUORESCÊNCIA APLICADO À DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O ARBOVÍRUS *MAYARO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Renato Mancini Astray

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

.

SÃO PAULO
2017

RESUMO

SANTOS, N. G. L. **Desenvolvimento de um método de imunofluorescência aplicado à detecção de anticorpos contra o arbovírus Mayaro.** 2017. (101 f.) Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O vírus *Mayaro* (MAYV) é um *Alphavirus* artritogênico responsável por causar uma doença febril aguda com sintomatologia parecida com a Dengue não-hemorrágica, porém com o agravante, igualmente à febre *Chikungunya*, de desenvolvimento de artralgia, a qual pode perdurar por meses ou anos, em alguns casos. Os dados epidemiológicos disponíveis ainda são poucos devido à falta de diagnóstico adequado, pois algumas das técnicas desenvolvidas apresentam dificuldades quanto à coleta de amostra, devido à curta viremia, e ao *background* que interfere na interpretação dos resultados, subestimando o real número dos casos de infecção principalmente em tempos de co-circulação de outras arboviroses também de impacto socioeconômico, como a própria Dengue e, mais recentemente, os vírus Zika e *Chikungunya*. A imunofluorescência é uma das metodologias mais utilizadas para o diagnóstico de infecções virais. Quando aplicada para a pesquisa de anticorpos direcionados a antígenos virais imunogênicos tem a capacidade de diagnosticar se o paciente já entrou em contato com um agente etiológico, mesmo que o período de viremia já tenha sido ultrapassado. Neste trabalho desenvolvemos um procedimento de imunofluorescência indireta dirigido ao diagnóstico da infecção pelo vírus *Mayaro* (MAYV) através da detecção de anticorpos contra a glicoproteína de membrana E2 do vírus. Primeiramente foi padronizada a metodologia de imunofluorescência indireta (IFI) direcionada à detecção de anticorpos contra a Glicoproteína do Vírus da Raiva (RVGP) em amostra de soro de camundongo e coelho, objetivando a reprodutibilidade da técnica para a detecção de anticorpos anti-E2 em amostras de soro de camundongos e humanos e, em seguida, obtivemos células de *Drosophila melanogaster* expressando E2 na membrana plasmática (S2MtMAYV(E3E2) e S2MtBipMAYV(E3E2V5)). Essas linhagens passaram por processos de seleções clonal e imunomagnética, dando origem às sub-linhagens S2MtMAYV(E3E2)_SC, S2MtBipMAYV(E3E2V5)_SC e S2MtMAYV(E3E2)_M1. A metodologia de IFI para RVGP foi aplicada para as linhagens recombinantes de MAYV utilizando soro hiperimune de camundongos e a sub-linhagem S2MtMAYV(E3E2)_SC, que apresentou a melhor relação de fluorescência por célula, foi testada, posteriormente, para amostras de soro humano com infecção confirmada para *Mayaro e* para os vírus Zika, Dengue e *Chikungunya*, permitindo a avaliação de possível reação cruzada. Análises de cinética de crescimento, em comparação com a linhagem selvagem, e de RT-qPCR, utilizando *primers* específicos de E2, foram realizadas para as linhagens originais e sub-linhagens em diferentes tempos de indução por $CuSO_4$ e mostraram alcançar altas concentrações (ordem de 10^{7-}/mL) mesmo após 168 horas de indução, além do fato de que apresentaram menor quantidade de mRNA relativo à proteína E2 nos tempos 144 e 168 pós-indução, momentos em que a expressão da mesma na membrana foi maior. Os resultados obtidos com as células S2 expressando E2 na sua membrana confirmaram a utilidade da técnica de imunofluorescência indireta desenvolvida para o diagnóstico de infecção por MAYV, de forma que a aplicação de células S2 como suporte diagnóstico foi eficientemente avaliada. O teste também mostrou ser eficiente para diferenciar infecções por *Alphavirus* e *Flavivirus*, o que o torna ainda mais interessante em tempos de co-circulação de diversos arbovírus com sintomatologia semelhante.

Palavras-chave: Vírus *Mayaro*. Células S2. Expressão de proteína. Imunofluorescência.

ABSTRACT

SANTOS, N. G. L. **Development of an immunofluorescence method applied to detection of antibodies against *Mayaro* arbovirus.** 2017. (101 p). Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Mayaro virus (MAYV) is an arthritogenic *Alphavirus* responsible for causing an acute febrile illness with symptoms similar to non-hemorrhagic Dengue, but with the aggravation, as Chikungunya fever, to develop arthralgia, which can last for months or years, in some cases. The epidemiological data available still are few due to lack of proper diagnosis, because some of the techniques developed present difficulties regarding sample collection, due to the short viremia, and background that interferes on interpretation of the results, underestimating the actual number of infection cases especially in times of many other socioeconomic impact arboviruses, such as Dengue fever and, more recently, Zika and Chikungunya viruses. Immunofluorescence is one of the most widely used methods for the diagnosis of viral infections. When applied to the presence of antibodies directed to viral antigens imunogênicos has the ability to diagnose whether the patient came into contact with a causative agent, even if the period of viremia has already been exceeded. In this work we developed an indirect immunofluorescence procedure to the diagnosis of the Mayaro virus (MAYV) infection through the detection of antibodies against membrane E2 glycoprotein. First we standardized then methodology of indirect immunofluorescence (IFI) directed to the detection of antibodies against the Glycoprotein of rabies virus (RVGP) in mices and rabbits serum, aiming the reproducibility of technique for the detection of antibodies to E2 in mices and humans serum samples, and then, we obtained *Drosophila melanogaster* cells expressing E2 in the plasma membrane (S2MtMAYV (E3E2) and S2MtBipMAYV (E3E2V5)). These lineages were selected using clonal and immunomagnetic selection processes, giving rise to the sub-lineages S2MtMAYV (E3E2)_SC, S2MtBipMAYV(E3E2V5)_SC and S2MtMAYV(E3E2)_M1. The methodology of indirect immunofluorescence for RVGP was applied to MAYV recombinant population cells using hiperimmune mice serum and S2MtMAYV (E3E2)_SC sub-lineage, that presented the best cell fluorescence relation, was tested later for human serum samples confirmed to *Mayaro* infection and also to Zika, Dengue and *Chikungunya* viruses, allowing the evaluation of possible cross reaction. Growth kinetic analysis, comparing to the wild lineage, and RT-qPCR, using specific primers to E2, were taken to the original and sub-populations in different induction times using CuSO4 and reached high concentrations (10^{7-} /mL) even after 168 hours of induction, apart from the fact that showed reduced amount of relative mRNA to E2 protein in 144 and 168 hours after induction, when the glycoprotein expression in the membrane was higher. Results obtained to S2 cells expressing E2 in its membrane have confirmed the usefulness of the indirect immunofluorescence technique developed for diagnosing MAYV infection, so that the implementation of S2 cells support diagnosis was efficiently evaluated. The test also turned out to be efficient to differentiate Alphavirus and Flavivirus infections, which makes it even more interesting in co-circulation times of several arboviruses with similar symptoms.

Keywords: *Mayaro* Virus. S2 Cells. Protein expression. Immunofluorescence.

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, alguns arbovírus têm sido determinados como importantes agentes de doenças emergentes no Brasil, como os vírus Dengue (DENV), Febre Amarela (YFV), Zika (ZKV), *Chikungunya* (CHIKV), *West Nile* (WNV), *Mayaro* (MAYV), *Rocio*, *Saint Louis* e *Oroupoche*. Dentre esses, até o ano de 2015, DENV, MAYV, YFV, *Rocio*, *Saint Louis* e *Oroupoche* eram os responsáveis por mais de 95% dos casos de infecção por arbovírus no Brasil, sendo DENV o mais prevalente, causando epidemias por 4 diferentes sorotipos (MARCONDES; XIMENES, 2015).

O principal vetor para as arboviroses em território brasileiro é o mosquito da espécie *Aedes aegypti* e, secundariamente, aparece a espécie *Aedes albopictus.* Ainda que seja conhecido há vários anos que os mosquitos do gênero *Aedes* sejam capazes de transmitir diversos arbovírus de importância médica em todo o mundo, durante os recorrentes surtos anuais de Dengue (DENV) nas últimas duas décadas, a possibilidade de introdução dos vírus Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) foi negligenciada. Atualmente, a preocupação quanto às consequências clínicas e socioeconômicas decorrentes das infecções por arbovírus abrange, na sua grande totalidade, DENV, CHIKV, ZIKV. Os pesquisadores, por outro lado, têm começado a incluir também o vírus Mayaro (MAYV) nessa lista, devido aos surtos esporádicos cada vez mais crescentes e à sua já comprovada urbanização envolvendo as espécies de mosquito *Cx. Quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* em cidades brasileiras. No entanto, o diagnóstico da infecção por MAYV ainda constitui um problema no atual cenário de co-circulação dos arbovírus CHIKV, ZIKV e DENV devido à baixa especificidade das técnicas sorológicas empregadas (FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2016; SERRA et al., 2016; ZUCHI et al., 2014). Quanto ao impacto econômico na saúde pública gerado pelas arboviroses, este tem aumentado dramaticamente nos últimos 50 anos, pois essas doenças vêm alcançando novas localizações geográficas. O aumento atualmente observado na distribuição e intensidade dessas infecções é agravado pela indisponibilidade de antivirais ou vacinas (KRAEMER et al., 2015).

A febre Mayaro, como é chamada a doença por ele causada, não está associada à fatalidades e, embora mais leve do que a ocasionada por Dengue, pode ser uma doença mais debilitante mesmo após a primeira infecção. O aspecto mais proeminente da doença também é a artralgia severa, como ocorre com a infecção por CHIKV, que pode ocasionar alta perda de produtividade e sobrecarga dos serviços médicos públicos (MOTA et al., 2015). Por esta razão, existe a necessidade de soluções quanto ao controle de vetores e desenvolvimento de

novas estratégias de diagnóstico, prevenção e tratamento das infecções transmitidas por *Alphavirus* causadores de artralgia . Os dados epidemiológicos da Febre *Mayaro* precisam ser melhor coletados e avaliados, o que permitiria um maior conhecimento da enfermidade (ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2013; MOTA et al., 2015). Isto somente é possível a partir da existência de um ou mais métodos de diagnóstico complementares, sensíveis, específicos e diferenciais, capazes de detectar os casos de infecção mesmo em tempos de co-circulação de inúmeras arboviroses.

Neste trabalho desenvolvemos um método de imunofluorescência indireta, utilizando células de inseto recombinantes, que poderá ser utilizado como estratégia de diagnóstico de infecção por *Alphavirus*. Deve-se ressaltar que no início do trabalho ainda não havia a transmissão notável do vírus *Chikungunya* em território brasileiro, sendo apenas diagnosticado em casos importados. Esse fato resultou no direcionamento do objetivo da pesquisa para a obtenção de um método de diagnóstico diferencial apenas entre *Alphavirus* (*Mayaro*) e *Flavivirus* (*Dengue*). A técnica de imunofluorescência é um dos métodos mais frequentemente utilizados na área de diagnóstico clínico, tratando-se de uma técnica explorada há muitos anos, que permite a detecção de anticorpos circulantes no soro de pacientes e animais infectados e a diferenciação entre arboviroses (DUAN et al., 2012; TAPPE et al., 2009). O desenvolvimento de uma nova técnica de imunofluorescência para a detecção da infecção por MAYV/CHIKV poderia contribuir para o melhor acompanhamento do quadro clínico do paciente, oferecendo o tratamento mais adequado e registros epidemiológicos mais confiáveis, visto que os serviços médicos públicos ainda empregam maior atenção aos casos de infecção por *Flavivirus* Dengue e Zika.

Existem alguns métodos de diagnóstico disponíveis para a detecção da infecção por MAYV, porém, como revisado adiante, todos possuem limitações importantes, como alto valor de ruído (*background*), complexidade excessiva por utilizarem vírus em pelo menos uma das etapas de realização, inespecificidade dos resultados, dificuldade na coleta de amostras devido ao curto período de viremia e semelhança de sintomas com outras arboviroses. Estas, isoladas ou em associação, podem ser causas da falta de dados epidemiológicos da doença, gerando, como consequência, dificuldade na compreensão dos fatores de risco (ABAD-FRANCH et al., 2012). Por essa razão, é importante o desenvolvimento de um método diagnóstico para a detecção de anticorpos no soro contra a principal proteína imunogênica do vírus *Mayaro*, a glicoproteína E2.

A obtenção de um sistema produtor de antígenos de MAYV por si só é um importante objetivo alcançado neste trabalho, pois a demanda pela expressão recombinante dessas

proteínas já é colocada há alguns anos em estudos anteriores (OLIVEIRA, 2008), por ser um dos pontos limitantes ao desenvolvimento de métodos modernos de diagnóstico da doença. Em síntese, este trabalho contribui para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico da infecção pelo vírus *Mayaro* através do desenvolvimento de uma ferramenta biotecnológica que poderá ser utilizada em um teste de imunofluorescência para identificação de infecção por *Alphavirus*. Este trabalho também é pioneiro na expressão recombinante da proteína E2 do MAYV e na utilização de células S2 de *Drosophila melanogaster* como suporte para o desenvolvimento de um método de imunofluorescência.

2 CONCLUSÕES

- ✓ Um método de imunofluorescência baseado em células S2 foi padronizado com sucesso utilizando células S2MtRVGP-M3, tendo sido estabelecidos os melhores procedimentos para fixação de células, marcação com anticorpos purificados ou amostras de soro, etapas de lavagem e montagem das lâminas.
- ✓ Foram obtidas, de forma eficaz, as células S2MtMAYV(E3E2), S2MtBipMAYV(E3E2V5) e linhagens após processos de clonagem, transfecção e seleção populacional.
- ✓ Uma segunda etapa de padronização, utilizando células S2MtMAYV(E3E2) e S2MtBipMAYV(E3E2V5) permitiu melhorar o procedimento estabelecido, gerando economia de material.
- ✓ Foi comprovado por meio de ensaio de imunofluorescência indireta, que as células S2 são capazes de sintetizar com eficiência a glicoproteína E2 do MAYV.
- ✓ As células S2 expressando E2 de MAYV apresentaram cinéticas de crescimento e de expressão do mRNA de E2 compatíveis com dados anteriores obtidos com células S2 expressando RVGP, reforçando as características do sistema descritas anteriormente pelo grupo de pesquisa.
- ✓ A linhagem S2MtMAYV(E3E2)_SC obtida após seleção clonal se mostrou eficiente na expressão da glicoproteina E2 de membrana, permitindo a correta detecção de anticorpos IgM e IgG específicos no soro de indivíduos infectados com o vírus *Mayaro*, aliando sensibilidade e especificidade.
- ✓ O suporte antigênico S2MtMAYV(E3E2)_SC funcionou como um método diagnóstico diferencial entre *Alphavirus*/*Flavivirus* e é potencialmente sensível/específico para substituir o teste EIA-ICC empregado no diagnóstico de infecção por *Mayaro*.

REFERÊNCIAS*

AASKOV, J.G.; DAVIES, C,E,A. An immunofluorescence assay for human antibodies to Ross River virus. **Journal of Immunological Methods**, vol. 25, no. 1, p. 37-41, 1979.

ABAD-FRANCH, F. et al. *Mayaro* virus infection in Amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLoS Neglected Tropical Disease**, vol. 6: e1846, 2012.

ACADEMIA BRASILEIRADE CIÊNCIAS. Doenças Negligenciadas. **Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento Nacional. Estudos Estratégicos.** Rio de Janeiro, 2010. 45 páginas.

AGGARWAL S. What's fueling the biotech engine?. **Nature Biotechnology,** vol. 25, no. 12, p. 1097-1104, 2007.

AMARAL, J.J.F. Avaliação de artigos científicos: Bases da epidemiologia clínica. Disponível em: <http://www.geocities.ws/abs5famed/avalcient.pdf>, 2007. Acesso em: 17 Out. 2014.

AMARAL NMF. **Regulação da saída de mitose em células humanas - a função de hsMob1.** 2010. Número total de folhas: 71.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2010.

AOKI, V. et al. Direct and indirect immunofluorescence. **Anais Brasileiros de Dermatologia.**; vol. 85, no. 4, p. 490-500, 2010.

ASSUNÇÃO-MIRANDA I. et al. Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. **BioMed Research International**, vol. 2013, no. 2013, 11 páginas, 2013.

ASTRAY RM et al. Kinetic studies of recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP) cDNA transcription and mRNA translation in Drosophila melanogaster S2 cell populations. **Cytotechnology**, vol. 65, no. 5, p. 829-38, 2013.

BOONPUCKNAVIG,S. et al. Indirect fluorescent antibody technique for demonstration of serum antibody in dengue hemorrhagic fever cases. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 64, no. 3, p. 365-371, 1975.

CAUSEY OR; MAROJA OM. *Mayaro* Virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Pará, Brazil, and isolation of *Mayaro* Virus as causative agent. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**,vol. 6, no. 6, p. 1017-23, 1957.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAUSEY OR; THEILER, M. Virus antibody survey on sera of residents of the Amazon valley in Brasil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**,vol. 7, no 1, p. 36-41, 1958.

CHENG RH. et al. Nucleocapsid and Glycoprotein Organization in an Enveloped Virus. **Cell**, vol. 80, no. 4, p. 621-630, 1995.

CHERBAS L; GONG L. Cell lines. **Methods**, vol. 68, no. 1, p. 74–81, 2014.

DUAN Y. et al. A faster immunofluorescence assay for tracking infection progress of human Cytomegalovirus. **Acta Biochim Biophys Sin**, vol. 44, no. 7, p. 597–605, 2012.

EL MEKKI A. A., VAN DER GROEN G., PATTYN S. R. Evaluation of immunofluorescence and immunoperoxidase methods for antibody determination against Chikungunya, West Nile, and Yellow Fever viruses. **Annales de la Societe Belge De Medecine Tropicale**, vol. 59, no. 2, p.121-125, 1979.

FERNÁNDEZ-SALAS I. et al. Chikungunya and Zika Virus Dissemination in the Americas. **Current Opinion in Infectious Diseases.**, vol. 29, no. 5, p. 467-475, 2016.

FERREIRA DF. et al. Weak bases affect late stages of *Mayaro* virus replication cycle in vertebrate cells. **Journal of Medical Microbiology.**, vol.49, no. 4, p. 313-318, 2000.

FIGUEIREDO LTM. et al. Study oh two different enzyme immunoassays for the detection of Mayaro Virus antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol 84, no. 3, p. 303-307, 1989.

FIGUEIREDO MLG; FIGUEIREDO LTM. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 47, no. 6, p. 677-683, 2014.

FLORES, E.F. **Virologia Veterinária.** Santa Maria: UFSM., 2007. 598 p.

FRANCIS HL; KABEYA M; KAFUAMA N. et al. Comparison of sensitivities and specificities of latex agglutination and an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to the Human immunodeficiency virus in Africa sera. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 26, no. 11, p.2462-2464, 1988.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PARA *CHIKUNGUNYA*. SECRETARIA DA SAÚDE – BAHIA GOVERNO DO ESTADO. Disponível em: < http://www1.saude.ba.gov.br/entomologiabahia/photoartwork2/downloads/guia_ve_chik.pdf> Acesso em: 15 Ago. 2016.

HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, volume 166, no. 4, p. 557-580, 1983.

JACOBSEN S et al. External quality assessment studies for laboratory performance of molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. **Journal of Clinical Virology.**, vol. 76, p. 55-65, 2016.

JOHANSSON DX; DRAKENBERG K; HOPMANN KH; SCHMIDT A; YARI F; HINKULA J; PERSSON MA. Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in Drosophila S2 cells. **Journal of Immunological Methods**, vol. 318, no. 1-2, p. 37-46, 2007.

KRAEMER MUG et al. The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. Albopictus. **eLife**, vol. 4, e08347, 2015.

LAVERGNE A. et al. Short communication *Mayaro* virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. **Virus Research**, vol. 117, no. 2, p. 283–290, 2006.

LELAND DS; GINOCCHIO CC. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. **Clinical Microbiology Reviews**.; vol. 20, no. 1, p. 49-78, 2007.

LEMOS MAN. **Construção e transfecção de vetores plasmidiais contendo o gene da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) em células de *Drosophila melanogaster.*** Número total de folhas: 82, 2009.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia).

LOBIGS, M; HONGXING, Z; GAROFF, H. Function of Semliki Forest Virus E3 Peptide in Virus Assembly: Replacement of E3 with an Artificial Signal Peptide Abolishes Spike Heterodimerization and Surface Expression of E1. **Journal of Virology**, vol. 64, no. 9, p. 4346-55, 1990.

LONG KC et al. Experimental Transmission of *Mayaro* Virus by *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, vol. 85, no. 4, p. 750-757, 2011.

MACS MILTENYI BIOTEC. **Cell separation with MACS Technology: MACS Strategies.** MACS Separators user manual – Miltenyi Biotec GmbH; páginas 2.2 – 2.2.1.2., 2011.

MARANGONI A. et al. *Treponema pallidum* Surface Immunofluorescence Assay for Serologic Diagnosis of Syphilis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, vol. 7, no. 3, p. 417–421, 2000.

MARCONDES CB; XIMENES MFFM. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by Aedes (Stegomyia) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 49, no. 1, 2015.

MENDONÇA JC; DOLCI JEL. Imunofluorescência para neuropeptídeos na mucosa nasal humana: avaliação de técnica para peptídeo intestinal vasoativo (VIP*).* **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, vol.71, no.2, 2005.

PORTAL DA SAÚDE-SUS. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1205-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-do-mayaro/20950-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 15 Set. 2016.

MORAES AM; AUGUSTO EFP; CASTILHO LR. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo, Roca, 2007.

MOTA MTO; RIBEIRO MR; VEDOVELLO D; NOGUEIRA ML. *Mayaro* virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, vol 10, no. 9, p. 1109 – 1122, 2015.

MUÑOZ M.; NAVARRO J. C. Virus *Mayaro*: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. **Biomédica**, vol. 32, no. 2, p. 286-302, 2012.

NIEDRIG M et al. Evaluation of an Indirect Immunofluorescence Assay for Detection of Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies against Yellow Fever Virus. **Clinical and Vaccine Immunology**, vol. 15, no. 2, p. 177–181, 2008.

OLIVEIRA MS. ENAGIS-MAY: **Uma proposta de ensaio de hemaglutinação indireta para detectar no sangue imunoglobulinas contra o vírus *Mayaro*.** Número total de folhas: 80. 2008.
Dissertação (Mestrado em Ciências).

PFAFFL MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, vol. 29, no. 9, e45, 2007.

PAUVOLID- CORRÊA A., et al. Neutralising antibodies for *Mayaro* virus in Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 110, no. 1, 2015.

PONCHIO L. et al. Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays. **Cytotherapy**, vol. 2, no. 4, p.281–286, 2000.

POWERS AM., et al. Genetic relationships among *Mayaro* and UNA viruses suggest distinct patterns of transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, vol. 75, no. 3, p. 461–469, 2006.

ROGERS SL; ROGERS GC. Culture of Drosophila S2 cells and their use for RNAi-mediated loss-of-function studies and immunofluorescence microscopy. **Nature protocols**, vol. 3, no. 4, p. 606 – 611, 2008.

SAIJO, M. et al. Immunofluorescence Technique Using HeLa Cells Expressing Recombinant Nucleoprotein for Detection of Immunoglobulin G Antibodies to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 40, no. 2, p. 372–375, 2002.

SANTOS, N. G. L. et al. Impact of recombinant Drosophila S2 cell population enrichment on expression of rabies virus glycoprotein. **Cytotechnology**, vol. 68, no. 6, p 1–7, 2016.

SERRA, O. P. et al. *Mayaro* virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 111, no. 1, p. 20-29, 2016.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E.G. The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. **Microbiological Reviews**, vol. 58, no. 3, p. 491-562, 1994.

SUHRBIER A.; LA LINN M. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. **Current Opinion in Rheumatology**, vol.16, no. 4, p. 374–379, 2004.

SNYDER, A. J.; MUKHOPADHYAY, S. The Alphavirus E3 Glycoprotein Functions in a Clade-Specific Manner. **Journal of Virology**, vol. 86, no. 24, p. 13609-20, 2012.

SWIECH, K. et al. Characterization of growth and metabolism of *Drosophila melanogaster* cells transfected with the rabies virus glycoprotein gene. **Biotechonology and Applied Biochemistry**, vol. 49, no. 1, p. 41-49, 2008.

TAPPE, D. et al. Ross River virus infection in a traveller returning from northern Australia. **Medical Microbiology and Immunology**, vol. 198, no. 4, p.271-273, 2009.

PROMEGA. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Technical Manual. Disponível em: <https://www.promega.com/~/media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf>. Acesso em: 10 Out. 2014.

TOIVANEN, A. Alphaviruses: an emerging cause of arthritis? **Current Opinion in Rheumatology**, vol. 20, no. 4, p. 486–490, 2008.

VASCONCELOS, P. F. C.; DA ROSA, A. P. A. T.; PINHEIRO, F. P. Evolutionary, ecological and taxonomic relationships between arboviruses of Florida, U.S.A., and Brazil . In: DA ROSA, A. P. A. T.; VASCONCELOS, P. F. C.; DA ROSA, J. F. S. T. (eds.). **An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries.** Belém: Instituto Evando Chagas, 1998. p. 71-99

WEAVER SC; REISEN WK. Present and Future Arboviral Threats. **Antiviral Research**, vol. 85, no. 2, p. 328-45, 2010.

WURM, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, vol.22, no. 11, p.1393 – 1398, 2004.

ZUCHI N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 109, no.6, p.820-823, 2014.