

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
CENTRO DE PESQUISA EM VIROLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**Construção de Vírus Rocio recombinante para expressão de genes repórter**

Danilo Machado de Melo

Ribeirão Preto, SP  
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
CENTRO DE PESQUISA EM VIROLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**Construção de Vírus Rocio recombinante para expressão de genes repórter**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Danilo Machado de Melo

Orientador: Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Tese apresentada como forma de avaliação para conclusão de Doutorado no programa de pós-graduação de Imunologia Básica e Aplicada na Universidade de São Paulo – USP.

Ribeirão Preto, SP

Julho de 2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Danilo Machado de Melo

Construção de Vírus Rocio recombinante para expressão de genes repórter, Ribeirão Preto, 2023

95 f.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

1. Rocio 2. Vírus Repórter 3. CPER

## Folha de Aprovação

### Construção de Vírus Rocio recombinante para expressão de genes repórter

Prof. Dr.: Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Instituição: Faculdade de Medicina – Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr. (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr. (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr. (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **APOIO E SUPORTE FINANCEIRO**

---

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia no Centro de Pesquisa em Virologia (CPV), localizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, na Universidade de São Paulo (USP), e na Universidade de Queensland em Brisbane, na Austrália, com apoio e suporte financeiro das seguintes instituições:

- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.
- Chamada pública CNPq nº 26/2021 – Apoio à Pesquisa Científica, Tecnológica e de Inovação: Bolsas no Exterior, fomentado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Processo: 200129/2022-8.

Dedico este trabalho à minha mãe  
Simone e meus irmãos Gabriel e Artur, por seu  
amor e apoio em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo pela orientação, todos os ensinamentos e oportunidades dadas.

Ao Professor Dr. Victor Hugo Aquino Quintana por contribuir com minha orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Alberto Anastácio Amarilla Ortiz pela orientação, motivação e por me receber com tanto cuidado durante minha estadia em Brisbane.

Ao professor Dr. Daniel Watterson, por me receber e orientar durante meu estágio na Universidade de Queensland, na Austrália.

Ao Dr. Julio Aguado pela contribuição durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Victória Thomazelli pela colaboração e auxílio nos experimentos, pela amizade e por dividir tantos momentos de anseio durante o desenvolvimento dos nossos trabalhos.

À Angélica Silva pela colaboração nos experimentos realizados no laboratório de biossegurança nível 3 e pela amizade.

À Andréia Carvalho pela colaboração com o trabalho, pela paciência e cuidado ao me ensinar e pela amizade, por me apresentar um pouco mais Ribeirão Preto.

A técnica de laboratório Soraya Jabur Badra, pelo apoio técnico, amizade e amor que nos oferece.

A técnica Sueli Abramovicius por tudo suporte técnico, amizade e conversas animadas durante o café da manhã.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Rafael Cazarotti, Leonado La Serra, Carla Cardoso, Renan Amaral e Felipe Carvalho por ajudarem em discussões, ideias, apoio moral e pela amizade e companheirismo, tornando a minha trajetória mais agradável e feliz.

À Ana Beatriz dos Anjos Souza, em especial, pela amizade e por dividir tanto tempo e a vida comigo, por me mostrar que eu tenho apoio e uma família aqui em Ribeirão Preto, por me incentivar e apoiar a crescer.



Aos amigos Felipe Araújo e Rafael Pontes, pela amizade, por todos os momentos compartilhados, pelas trocas de conhecimentos, e por me mostrar que ainda tenho tanto pra conhecer e viver.

Aos amigos do Centro de Pesquisa em Virologia, pelas discussões a respeito de nossos trabalhos e pela amizade, que tornam este ambiente tão amigável e agradável para trabalhar, a virologia não seria a mesma sem vocês. Em Especial a Rosa Viana, agradeço por tantos momentos felizes compartilhados, momentos que me fizeram sentir em casa e em família.

À Helda e seus filhos por me receberem com tanto cuidado e carinho em sua família, que junto ao Alberto me permitiram conhecer seus amigos, a cidade e viver tantas experiências que trarei para sempre comigo.

À Ana Cristine S. Ferreira, secretária do programa de imunologia Básica e Aplicada, que sempre teve cuidado e disposição em me ajudar e orientar.

A minha família, minha mãe Simone Rocha e irmãos Gabriel e Artur Machado, sem os quais nada na minha vida seria possível, por seu amor e apoio incondicionais, por acreditar que tudo o que eu estava fazendo aqui é possível, por acreditar nos meus sonhos e esforços. Ao apoio e suporte dados com minha decisão em ir a Austrália para terminar o doutorado.

Às minhas tias e tios, Silvia, Cláudia, Carmen, Cleide, Carlos e Jorge e todos os meus primos, pelo amor e apoio para que minha viagem a Austrália se tornasse possível.

A minha Cunhada Adryeli Silva, pela amizade e pelo apoio com o teste de proficiência em inglês.

A minha família de Maceió, meu pai Aldo, vó Marli, tio Jr, Dayse e Suely, por todo apoio e amor.

Aos meus irmãos Aurélio e Theo.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro, imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que tenham contribuído de forma direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho e no meu desenvolvimento pessoal e profissional durante estes anos de doutorado.



## RESUMO

MELO, D. M. **Construção de Vírus Rocio recombinante para expressão de genes repórter.**

Tese de doutorado. Centro de Pesquisas em Virologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O vírus Rocio, um Flavivirus brasileiro, produz epidemias com casos de infecção do sistema nervoso central humano que são muito graves, como foi evidenciado no Vale do Ribeira, SP, na década de 1970. Entretanto, achados soroepidemiológicos e encontros eventuais de indivíduos infectados com ROCV tem sido relatados, o que indica a circulação atual do vírus Rocio no Brasil, embora quase silenciosa. Há risco de re-emergência do vírus Rocio causando epidemias no Brasil. Esta Tese mostra como construímos um vírus Rocio repórter, com substância marcadora luminescente facilmente detectável. A construção dos vírus Rocio repórter foi feita expressando mCherry, mNeonGreen e HiBiT-tag. As construções foram feitas por *Circular Polymerase Extension Reaction* (CPER) onde fragmentos de DNA que perfazem todo o genoma viral foram submetidos a reação de circularização com fragmento *Linker*. Os genomas virais circularizados foram transfectados em cultura de células HEK 293T seguindo-se por infecção de células C6/36, que produziu sobrenadantes contendo vírus os quais foram coletados e armazenados. A expressão dos genes repórter para mCherry e mNeonGreen foram avaliadas por imunofluorescência, comprovando o resgate de vírus que expressaram estes genes repórter. Em suma, construímos com êxito vírus Rocio repórter contendo marcadores luminescentes e que deverão ter grande utilidade como marcadores da presença viral em muitos estudos futuros.

Palavras-chave: (1) Rocio, (2) Vírus repórter, (3) CPER.

## **ABSTRACT**

MELO, D. M. Construction of recombinant Rocio virus for reporter genes expression. PhD Thesis. Virology Research Center - Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Rocio virus, a Brazilian Flavivirus, causes epidemics of severe human central nervous system infections, as demonstrated in the 1970s in the Ribeira Valley, SP. However, seroepidemiological findings and occasional encounters with individuals infected with ROCV have been reported, indicating that Rocio virus is currently circulating in Brazil, albeit almost silently. There is a risk that Rocio virus will reemerge and cause epidemics in Brazil. This work shows how we constructed a Rocio reporter virus with an easily detectable luminescent marker substance. The Rocio reporter viruses were constructed to express mCherry, mNeonGreen and HiBiT tag. The constructs were made using the circular polymerase extension reaction (CPER), in which DNA fragments forming the entire viral genome were subjected to a circularization reaction with a linker fragment. The circularized viral genomes were transfected into HEK 293T cell cultures, followed by infection of C6/36 cells, which produced virus-containing supernatants that were collected and stored. Expression of reporter genes for mCherry and mNeonGreen was assessed by immunofluorescence, demonstrating the rescue of viruses expressing these reporter genes. In conclusion, we have successfully constructed Rocio reporter viruses containing luminescent markers that should be very useful as markers of virus presence in many future studies.

Keywords: (1) Rocio, (2) Reporter virus, (3) CPER.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Mapa de ocorrência global de flavivírus(6).....	4
<b>Figura 2:</b> Árvore filogenética do vírus Rocio, utilizando dois sequenciamentos do fragmento do gene da proteína não estrutural 5 (NS5) (9).....	5
<b>Figura 3:</b> Vale do Ribeira, no estado de São Paulo.....	6
<b>Figura 4:</b> Linha temporal dos casos de infecção por vírus Rocio no Brasil e mapa mostrando locais de ocorrência do vírus.....	8
<b>Figura 5:</b> Mapas do Brasil mostrando locais com risco de expansão do vírus Rocio(17). .....	9
<b>Figura 6:</b> Representação geral da estrutura e genoma dos Flavivírus(30).....	10
<b>Figura 7:</b> Ciclo replicativo de Flavivírus(4).....	11
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática da ciclização de vírus com genoma de RNA polaridade positiva(34).....	13
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática das três estratégias mais empregadas para o desenho de vírus recombinantes(30). .....	19
<b>Figura 10:</b> Esquema da circularização por CPER(86). .....	21
<b>Figura 11:</b> Representação do conteúdo do fragmento Linker. ....	22
<b>Figura 12:</b> Representação esquemática dos vírus recombinantes carregando gene repórter .....	28
<b>Figura 13:</b> Conjunto de amplicons produzidos por RT-PCR .....	30
<b>Figura 14:</b> Ciclo de PCR utilizado com Kit Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB).....	30
<b>Figura 15:</b> Ciclo de PCR utilizado com Kit PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (TaKaRa). .....	31
<b>Figura 16:</b> Representação esquemática do vírus CPER-ROCV-Repórter contendo gene da luciferase.....	35
<b>Figura 17:</b> Eletroforese em gel de agarose. Amplicons com fragmentos de DNA para construção de vírus WT e CPER-ROCV-Repórter contendo gene da luciferase. ....	36
<b>Figura 18:</b> Representação esquemática do processo de transfecção para a tentativa de construção de vírus recombinante Rocio carregando o gene da luciferase.....	37
<b>Figura 19:</b> Eletroforese em gel de agarose. Amplicons dos produtos de transfecção da tentativa de construção de vírus recombinante Rocio carregando o gene da luciferase. ....	38
<b>Figura 20:</b> Imunofluorescência Indireta para busca por antígeno viral do vírus CPER-ROCV-Repórter, produto da tentativa de construção do vírus recombinante Rocio carregando gene da luciferase.....	38
<b>Figura 21:</b> Eletroforese em gel de agarose. Amplicons dos produtos de passagens em cultura de células VERO.....	39
<b>Figura 22:</b> Representação esquemática da sequência de trabalho realizado para construção de vírus recombinante. ....	40
<b>Figura 23:</b> Representação do genoma do vírus Rocio e dos fragmentos de DNA gerados para a produção de vírus CPER-ROCV-WT por CPER.....	41
<b>Figura 24:</b> Eletroforese em gel de agarose. Amplicons do genoma parcial de CPER-ROCV-WT. ....	42
<b>Figura 25:</b> Titulação do vírus CPER-ROCV-WT construído por CPER. Primeira etapa de padronização. ....	43
<b>Figura 26:</b> Titulação do vírus CPER-ROCV-WT construído por CPER. Segunda etapa de padronização. ....	44
<b>Figura 27:</b> Representação do genoma do vírus Rocio e dos fragmentos de DNA gerados para a produção de vírus apresentando genes repórter por CPER.....	45

<b>Figura 28:</b> Representação esquemática de etapas para produção de fragmento contendo capsídeo parcialmente otimizado. ....	46
<b>Figura 29:</b> Eletroforese em gel de agarose contendo todos os fragmentos para produção de vírus CPER-ROCV-RV1 e RV2. ....	47
<b>Figura 30:</b> Representação esquemática de etapas para produção de fragmento contendo capsídeo totalmente otimizado. ....	48
<b>Figura 31:</b> Eletroforese em gel de agarose contendo todos os fragmentos para produção de vírus CPER-ROCV-RV3 e RV4. ....	49
<b>Figura 32:</b> Representação esquemática de etapas para produção de fragmento contendo gene repórter para os vírus CPER-ROCV-RV5 e RV6 . ....	50
<b>Figura 33:</b> Eletroforese em gel de agarose contendo Amplicons para produção dos vírus CPER-CROV-RV5 e RV6.....	50
<b>Figura 34:</b> Representação esquemática de etapas para produção de fragmento contendo gene repórter para os vírus CPER-ROCV-RV7. ....	51
<b>Figura 35:</b> Eletroforese em gel de agarose contendo todos os amplicons para produção dos vírus CPER-CROV-RV7.....	51
<b>Figura 36:</b> Representação esquemática e placas de titulação dos vírus CPER-ROCV-RV1 e RV2.....	53
<b>Figura 37:</b> Representação esquemática e placas de titulação dos vírus CPER-ROCV-RV3 e RV4.....	54
<b>Figura 38:</b> Representação esquemática e placas de titulação dos vírus CPER-ROCV-RV5 e RV6.....	55
<b>Figura 39:</b> Representação esquemática e placas de titulação dos vírus CPER-ROCV-RV7. ....	56
<b>Figura 40:</b> Imunofluorescência indireta para os vírus CPER-ROCV-RV1, RV3 e RV4, marcando NS1 com anticorpo h4G4 e proteínas repórter.....	57
<b>Figura 41:</b> Imunofluorescência indireta para os vírus CPER-ROCV-RV1, RV3 e RV4, marcando Envelope viral com anticorpo h4G2 e proteínas repórter. ....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Municípios com casos de Rocio entre 1961 e 2012(17) .....	7
<b>Tabela 2:</b> Vírus repórter produzidos. A tabela apresenta seus respectivos genes, passagem em cultura de células, linhagem celular e título de vírus infeccioso. ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	Região não codificante da extremidade 3'
5'UAR	5' <i>upstream</i> AUG region
5'UTR	Região não codificante da extremidade 5'
BBB	Barreira hematoencefálica (blood-brain barrier)
BSA	Albumina de soro bovino (bovine serum albumin)
C	Capsídeo
CCR5	Receptor quimiocina tipo 5
cDNA	DNA complementar
cHP	Capsid coding region hairpin
CMV	Citomegalovírus humano
CPE	Efeito citopático (cytopathic effect)
CPEC	Circular Polymerase Extension Cloning
CPER	Circular Polymerase Extension Reaction
DAR	Downstream AUG region
DCS-PK	The downstream of 5' cyclization sequence pseudoknot
DENV	Vírus dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato.
E	Envelope
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GFP	Proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)
HDVr	sequência da Ribozima do vírus da Hepatite delta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
ILHV	Vírus Ilhéus
JEV	Vírus da encefalite japonesa
M	Membrana
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos
NK	Células Natural Killer
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2	Proteína não estrutural 2
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4	Proteína não estrutural 4
NS5	Proteína não estrutural 5
OGM	Organismo geneticamente modificado
ON	Oxido nítrico
pA	Calda poli A
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (Phosphate-buffered saline)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
prM	Pré membrana
RE	Reticulo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
ROCV	Vírus Rocio
rROCV	Vírus Rocio recombinante
RT	Transcriptase reversa
RV	Vírus recombinante
SFB	Soro fetal bovino (fetal bovine serum)
SLA	Large stem loop
SLB	Short stem loop
SLEV	Vírus da encefalite de Saint Louis
SNC	Sistema nervoso central



ssRNA	RNA de fita simples
ssRNA(-)	RNA de fita simples sentido negativo
ssRNA(+)	RNA de fita simples sentido positivo
ST2	ST de fita simples sentido positivo
TBEV	Vírus da encefalite do carrapato (tickborne encephalitis virus)
TCD8 <sup>+</sup>	Linfócito T citotóxico
TH1	Linfócitos T helper do tipo 1
TH2	Linfócitos T helper do tipo 2
TJ	Junções apertadas (tight junctions)
IL-33	Interleucina 33
T <sub>m</sub>	Temperatura de melting
TNF- $\alpha$	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
USP	Universidade de São Paulo
UTR	Regiões não codificantes (untranslated region)
VLP	Partículas semelhantes a vírus
WNV	Vírus do oeste do Nilo (west nile)
WT	Tipo selvagem (wild type)
YFV	Vírus da febre amarela (yellow fever virus)
ZIKV	Vírus Zika

## LISTA DE ANEXOS

Lista de <i>primers</i> para rROCV <i>Wild Type</i> .....	76
Lista de <i>primers</i> para rROCV com genes repórter inseridos entre cópias do gene do capsídeo.....	77
Lista de <i>primers</i> para rROCV com genes repórter inseridos entre proteínas E e NS1.....	78
Lista de <i>primers</i> para rROCV com HiBiT-Tag.....	79

# SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>3</b>
<b>1. Introdução Vírus Rocio</b>	<b>4</b>
1.1. Agente etiológico	5
1.2. Histórico	5
1.3. Estrutura, genoma e replicação	9
1.4. Ciclização do genoma	12
1.5. Clínica e patogênese	14
1.5.1. Infecção do sistema nervoso	14
1.5.2. Infecção do sistema nervoso central pelo vírus Rocio	15
<b>2. Vírus Recombinantes</b>	<b>17</b>
2.1. Uso de CPER para construção de vírus recombinantes	20
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
4.1. Objetivo geral	24
4.2. Objetivos específicos	24
<b>5. MATERIAL E METÓDOS</b>	<b>26</b>
5.1. Vírus Rocio	26
5.2. <i>Design</i> para construção dos vírus recombinantes por CPER	26
5.3. Extração de RNA viral	29
5.4. Transcrição Reversa (RT)	29
5.5. Produção dos vírus recombinantes	29
5.6. Transfecção em células HEK	32
5.7. Resgate de vírus construído	32
5.8. Imunofluorescência	32

5.9. Quantificação viral por contagem de <i>plaques</i> com focos fluorescentes _____	32
5.10. Avaliação da Expressão de gene repórter _____	33
<b>6. RESULTADOS</b> _____	<b>35</b>
6.1. Tentativa infrutífera de construção de vírus Rocio recombinante com gene da Luciferase.	35
6.2. Construção de vírus Rocio recombinante carregando gene repórter _____	39
6.2.1. Construção do vírus Rocio WT _____	40
6.2.2. Construção do vírus Rocio repórter _____	45
6.2.3. Resgate _____	52
6.2.4. Expressão de gene repórter _____	57
<b>7. DISCUSSÃO</b> _____	<b>60</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> _____	<b>66</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b> _____	<b>68</b>
<b>10. LISTA DE ANEXOS</b> _____	<b>76</b>

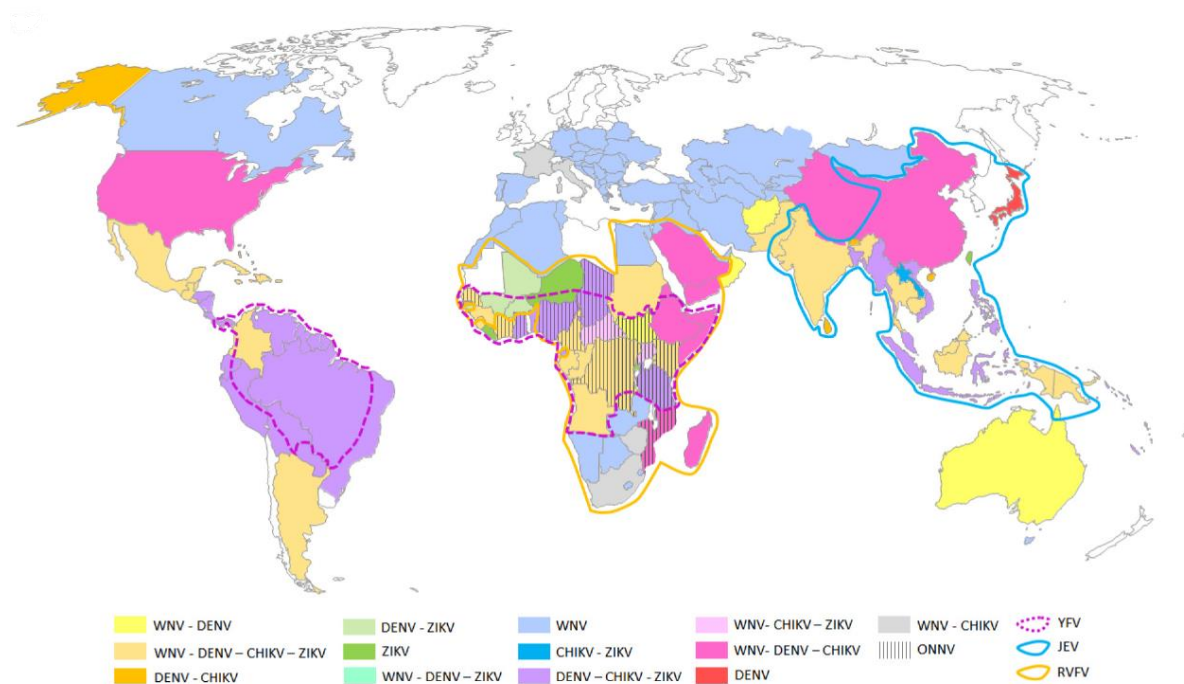
# INTRODUÇÃO

## 1. Introdução Flavivírus

Os Arbovírus, do inglês *Arthropod-borne viruses*, são vírus mantidos na natureza através de ciclos que envolvem vetores artrópodes e animais vertebrados como reservatórios ou hospedeiros(1). Dentre os arbovírus de maior importância médica, incluindo patógenos de grande emergência no mundo, destacam-se os do gênero *Flavivirus* (família Flaviviridae).

O gênero *Flavivirus* inclui mais de 70 vírus, que podem ser classificados de acordo com a sua associação a vetores artrópodes (mosquitos ou carrapatos) (2, 3), sorogrupo e manifestações clínicas. Os flavivírus transmitidos por mosquitos incluem o vírus da dengue (DENV), o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), o vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV), o vírus Rocio (ROCV), o vírus Zika (ZIKV)(4, 5). Estes vírus apresentam ampla ocorrência no mundo, como mostra a **Figura 1**.

**Figura 1:** Mapa de ocorrência global de flavivírus(6).

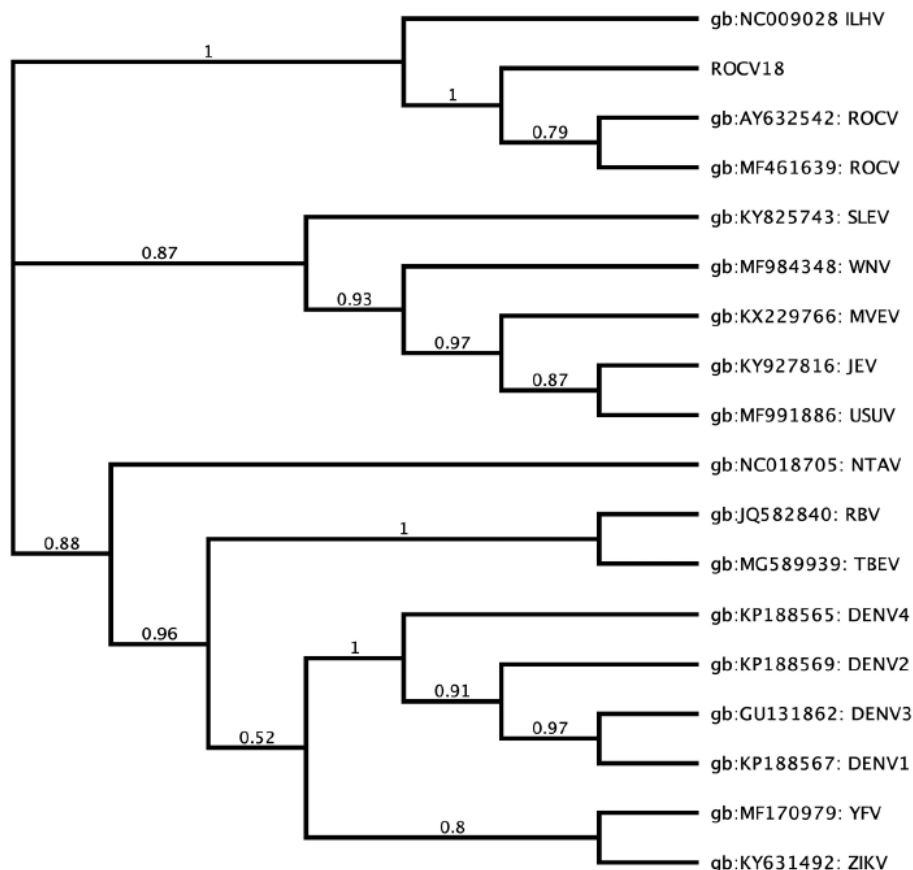


Outra forma de classificação dos Flavivírus inclui a sua divisão em sorogrupos, incluindo os sorogrupos do vírus da Encefalite Japonesa, do vírus Dengue e sorogrupo Febre Amarela(3, 7). Ainda, os Flavivírus vírus podem ser classificados de acordo com as manifestações clínicas causadas por suas infecções, possuindo flavivírus causadores de encefalite e flavivírus relacionados a febre hemorrágica(1).

## 1.1. Agente etiológico

No gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, o vírus Rocio pertence ao clado associado a mosquitos *Culex*(8). Estudos filogenéticos que fizeram uso de sequências parciais da proteína não estrutural 5 (NS5) do ROCV mostram que este possui maior relação filogenética aos vírus Ilhéus (ILHV) e ao vírus da Encefalite de Saint Louis, como apresentado na **Figura 2**(9, 10).

**Figura 2:** Árvore filogenética do vírus Rocio, utilizando dois sequenciamentos do fragmento do gene da proteína não estrutural 5 (NS5) (9).

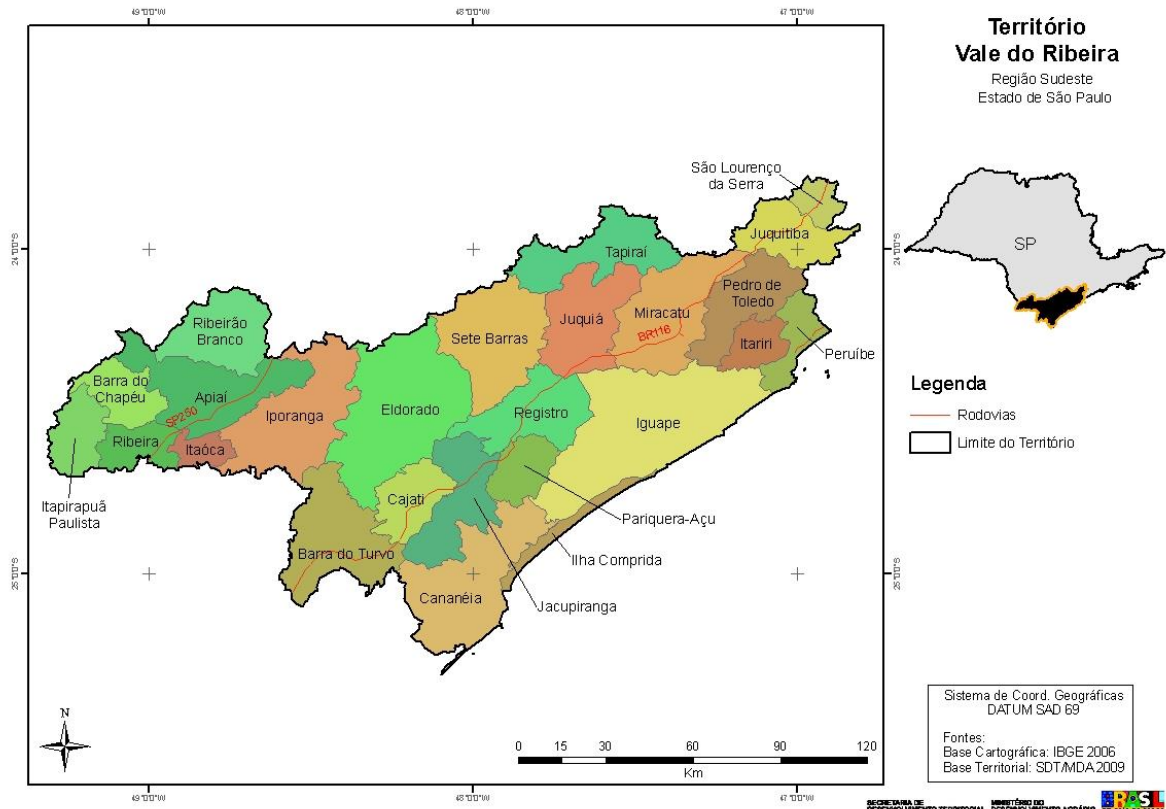


## 1.2. Histórico

O vírus Rocio foi responsável por epidemia de encefalite grave no estado de São Paulo. Crescente número de casos de pacientes com sintomas de encefalite foram reportados em 1974, com maior número em Peruíbe, Itanhahém e Mongongua. Com o aumento do número de casos, a epidemia devastou a região do Vale do Ribeira e Baixada santista, perdurando até 1978. A epidemia causada pelo vírus Rocio, entre 1974 e 1978, apresentou mais de 1000 casos notificados e cerca de 100 óbitos, apresentando letalidade de 13%. Mapa do Vale do Ribeira é apresentado na **Figura 3**. O vírus foi isolado pela primeira vez do tecido nervoso de um caso fatal de encefalite ocorrido em Iguape, de paciente que veio a óbito em 1975 (11, 12, 13).

**Figura 3:** Vale do Ribeira, no estado de São Paulo.

Local onde foi isolado originalmente o ROCV, SPAn37630 e SPH37623, durante surto de encefalite na década de 70 (14).



A encefalite por ROCV acometeu 20 cidades paulistas, mostrados na **Tabela 1**. Nesta mesma época, também foram registrados 5 casos no estado contíguo do Paraná(15). Posteriormente, alguns estudos mostraram anticorpos neutralizantes contra ROCV em moradores rurais do Sudeste e Nordeste do Brasil, sugerindo que o vírus possa circular em outras regiões do país, com resultados resumidos na **Figura 4** (16).



**Tabela 1:** Municípios com casos de Rocio entre 1961 e 2012(17)

Município	Ano
Cubatão (SP)	1975
Guarujá (SP)	1975
Itanhahém (SP)	1975
São Vicente (SP)	1975
Mongaguá (SP)	1975
Praia Grande (SP)	1975
Santos (SP)	1975
Cananéia (SP)	1975-1976
Iguape (SP)	1975-1976
Itariri (SP)	1975-1976
Jacupiranga (SP)	1975-1976
Juquiá (SP)	1975-1976
Miracatu (SP)	1975-1976
Pariquera-açu (SP)	1975-1976
Pedro de Toledo (SP)	1975-1976
Peruíbe (SP)	1975-1976
Registro (SP)	1975-1976
Sete Barras (SP)	1975-1976
Barra do Turvo (SP)	1976
Eldorado Paulista (SP)	1976

Durante a epidemia, Lopes e colaboradores(18) isolaram o vírus de casos fatais de encefalite, o primeiro deles de um paciente da cidade de Iguape, que vivia no Bairro denominado Rocio, o que, posteriormente, deu o nome ao vírus. O ROCV, também, foi isolado de um camundongo sentinela e de uma ave silvestre *Zenothrichia capensis* (Tico-tico), indicando a possível participação de outros animais na manutenção do ciclo silvestre do vírus na natureza. Ainda, ROCV foi isolado de um *pool* de mosquitos *Psorophora ferox*, o que identificou esta espécie de Culicídeo como potencial vetor(18). Assim, nesse surto foram identificados 2 espécimes de ROCV, SPAn37630 (camundongo) e SPH37623 (humano)(11).

O mosquito *Aedes scapularis*, abundante na área e época em que ocorreu o surto de encefalite por ROCV, mostrou-se experimentalmente susceptível à infecção oral pelo vírus, o que sugere que também possa ter tipo um papel como vetor(19, 20). Dessa forma podem participar do ciclo de transmissão os mosquitos *Psorophora ferox* e *Aedes scapularis*. Estudo mais recente indicou que humanos são altamente expostos a picadas destes mosquitos nos municípios de Cananéia, Iguape e Ilha Comprida(21)

Após o surto de encefalite por ROCV (1973 e 1978) foram notificados indivíduos com anticorpos contra o vírus e casos de infecção humana, representados na Figura 4. Em 1986, uma criança de 12 anos do povoado corte de Pedra no município de Valença, na Bahia com anticorpos neutralizantes para ROCV (22). Também, em 1987, anos após a epidemia, foram encontradas 2 crianças de área rural do Vale do Ribeira com anticorpos para ROCV(23). Em 1995, 2 dos 3 casos suspeitos de dengue soroconverteram para anticorpos neutralizantes para

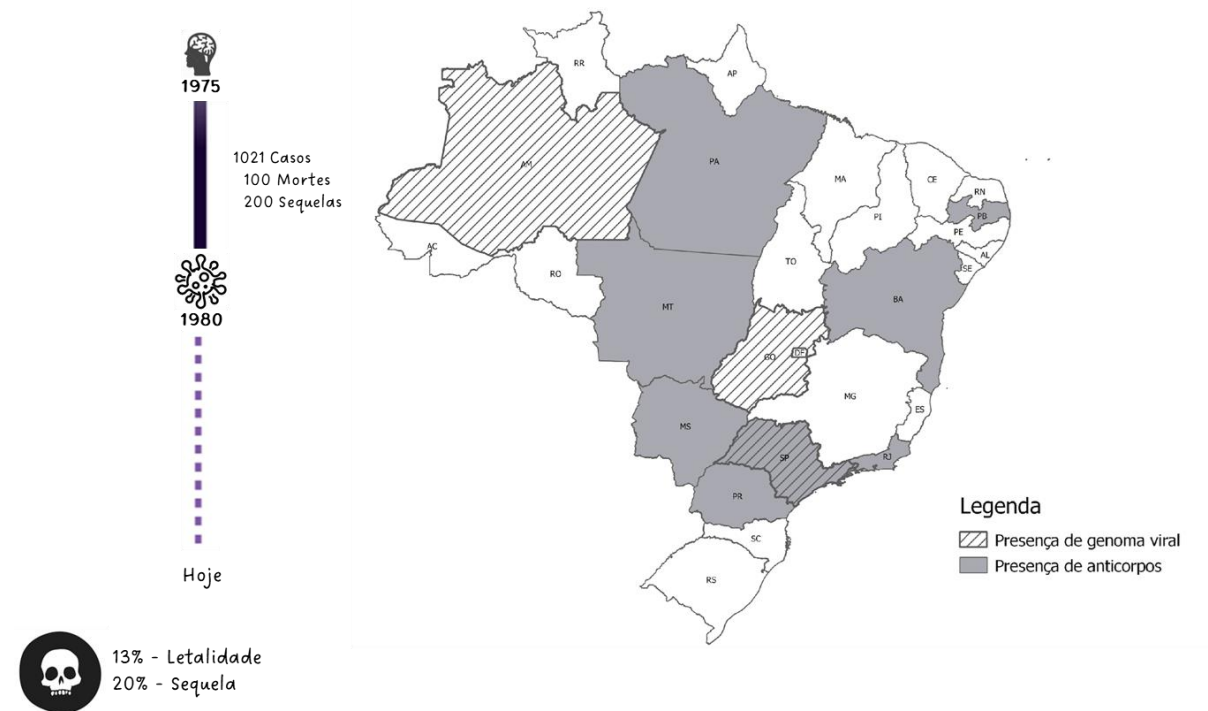
ROCV em Salvador (15). Ainda na Bahia, em 1995 nas cidades de Ipuíara e Prado, em inquérito soroepidemiológico observou-se que 5 amostras apresentavam anticorpos para ROCV (5/689, representando 0,7%) (15).

Quanto aos achados genômicos de ROCV, este foi encontrado em 2 casos ocorridos em Manaus, em 2010(24). Ainda, outros estudos detectaram genoma de ROCV em amostras de 2 pacientes com suspeita clínica de dengue, durante surto de DENV entre 2012 e 2013, em Goiânia (9).

Anticorpos contra ROCV também foram observados em cavalos(25). Estes autores pesquisaram anticorpos contra SLEV, ROCV e WNV em 753 amostras de cavalos e 144 apresentaram anticorpos contra ROCV (46 reagiram com positividade monotípica, representando 6,1%). Também, estudo de 2009, que analisou 724 cavalos, 238 ovelhas e 61 jacarés de Nhecolândia, no Pantanal de Mato Grosso do Sul, evidenciou anticorpos neutralizantes em 1 cavalo(26). Ainda, foi identificado anticorpos contra Rocio em búfalos d'água (*Bubalus bubalis*) no Pará(27).

**Figura 4:** Linha temporal dos casos de infecção por vírus Rocio no Brasil e mapa mostrando locais de ocorrência do vírus.

O surto de encefalite pelo vírus ocorreu entre os anos de 1975 e 1980, com letalidade de 13% e deixando sequelas em 20% dos acometidos. O mapa do Brasil indica locais onde houve relato de indivíduos e animais com anticorpos anti-ROCV estão em cinza. Locais onde genoma de ROCV foi detectado estão em hachurado

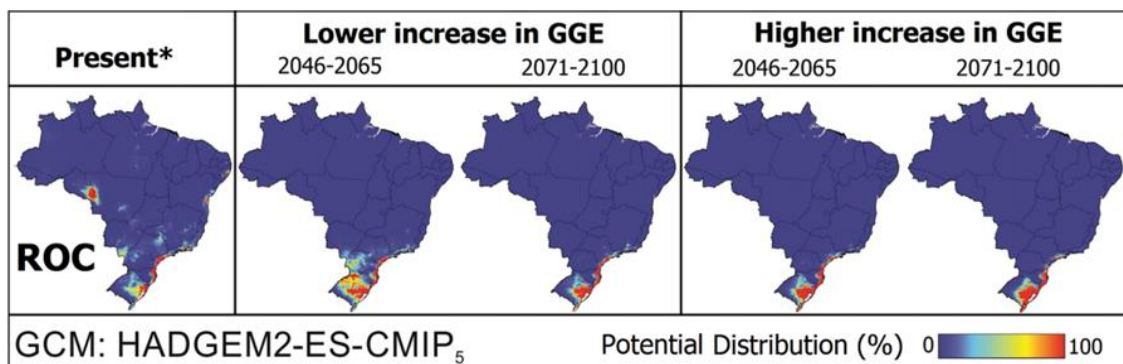


Fonte: Autoria própria

Com base no isolamento viral e nos dados soroepidemiológicos, acredita-se que o vírus ROCV seja mantido em um ciclo de transmissão silvestre que envolva aves selvagens, incluindo algumas espécies migratórias, equinos, domésticos e selvagens e tendo como vetores mosquitos do gênero *Aedes* e *Psorophora*, presentes em zonas urbanas, periurbanas e selvagens, sugerindo assim risco de transmissão para o ser humano(21).

O encontro de indivíduos e animais com anticorpos anti-ROCV bem como achados do genoma viral, em diferentes regiões do Brasil, sugere que ROCV ou outro vírus intimamente relacionado, circule por quase todo o país com possibilidade de produzir casos humanos esporádicos ou surtos. Um estudo de predição de casos de ROCV no Brasil destaca áreas com maior potencial de reemergência do ROCV(17). São áreas onde há previsão de aumento de temperatura, e, conseqüentemente, ampliação da área de dispersão vetorial, como *Aedes scapularis* e *Psorophora sp.*, aumentando assim o risco de transmissão do ROCV como mostra a **Figura 5**.

**Figura 5:** Mapas do Brasil mostrando locais com risco de expansão do vírus Rocio(17). Nestes mapas são expostas duas possibilidades de acordo com dois cenários de modificação climática. \*"Present" é o cenário de possível emergência de ROCV com base nos dados climáticos de 1950 a 2010.

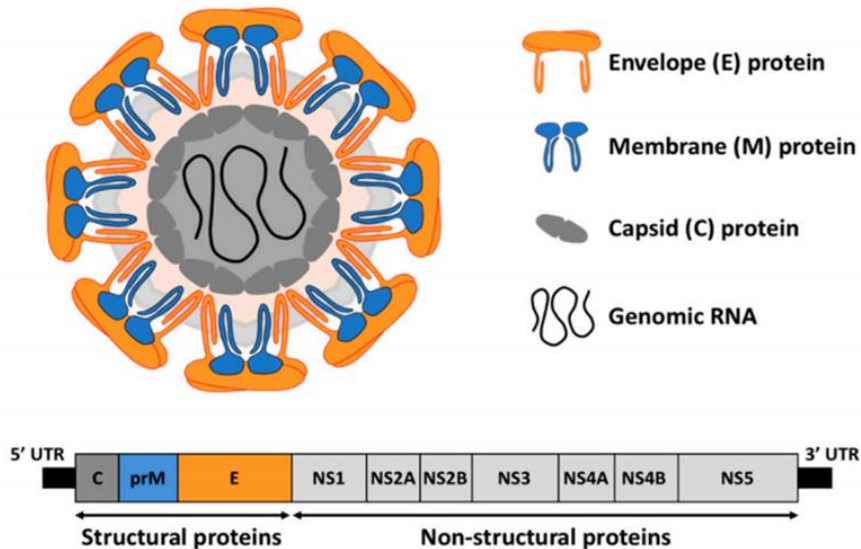


### 1.3. Estrutura, genoma e replicação

O ROCV, assim como os demais *Flavivírus*, apresenta vírion esférico, com 50nm de diâmetro, revestido por um envelope glicoprotéico. Seu nucleocapsídeo também, é esférico (com 25–30 nm de diâmetro) e o genoma consiste em uma fita simples de RNA de polaridade positiva de 10-12,3kb. Seu genoma apresenta uma única sequência de leitura aberta (*open reading frame* - ORF) que codifica 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e 3 estruturais, capsídeo, precursora de membrana e de envelope (C, pré M e E, respectivamente), como mostra a **Figura 6**. A glicoproteína E considera a mais

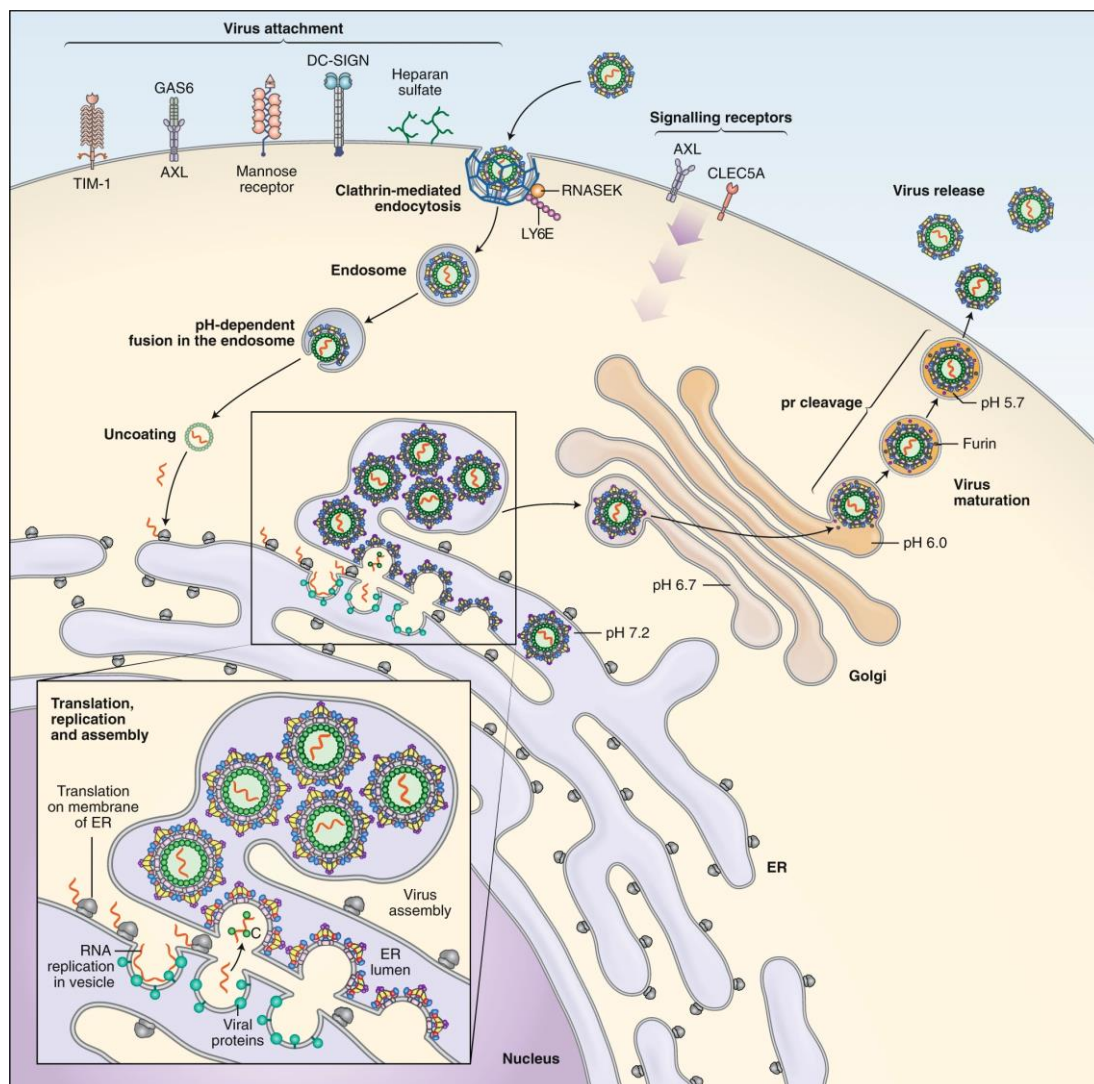
imunogênica, pois possui espículas que são o principal alvo dos anticorpos neutralizantes (28, 29).

**Figura 6:** Representação geral da estrutura e genoma dos Flavivírus(30). Flavivírus possuem o genoma RNA de fita simples, com uma única ORF que codifica para três proteínas estruturais, Capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E) e 7 proteínas não estruturais (NS1-NS5).



O processo replicativo intracelular do ROCV tem início com a ligação de sua proteína E ao receptor celular, conforme a **Figura 7**. O vírus entra na célula por endocitose em endossomo que posteriormente, sofre acidificação. O baixo pH do endossoma tardio promove modificações conformacionais na estrutura da proteína E, que permitem sua fusão com a membrana endossomal liberando o capsídeo viral no citoplasma celular (1, 31). O RNA genômico viral é traduzido por ribossomos no citoplasma dando origem a uma poliproteína. Essa poliproteína é direcionada ao retículo endoplasmático (RE), onde é processada por proteínas virais (NS3/NS2b) e do hospedeiro, codificando as 10 proteínas virais. As proteínas NS auxiliam na replicação, processamento da poliproteína e na montagem do *virion* (1).

**Figura 7:** Ciclo replicativo de Flavivírus(4).



Durante o processo replicativo dos Flavivírus, a proteína do capsídeo (C), ao ser inserida no RE, sofre clivagens para amadurecer. A proteína pré M, presente na membrana do RE, orienta a inserção da proteína E na sua orientação correta, formando um heterodímero que protege a proteína E contra mudanças conformacionais. Além disso, assim como a proteína pré M, a proteína E possui uma sequência sinal para a inserção da proteína NS1 na membrana do RE, onde atuará nos primeiros passos da síntese do RNA viral(1, 28).

Na membrana do RE, a síntese de proteínas não estruturais leva a formação de complexos de replicase ativos, incluindo fatores da célula hospedeira, montados a partir de NS3 e NS5, que atuam sobre o RNA viral. Esse complexo replica o genoma viral, o que requer a síntese de uma fita simples complementar de RNA, com sentido negativo ou ssRNA(-), usada durante o processo replicativo dos Flavivírus.

Nas membranas do RE, a proteína C e o RNA viral recém-sintetizado formam nucleocapsídeos que se ligam a porções citoplasmáticas das glicoproteínas virais ancoradas na mesma membrana. Neste processo, partículas virais brotam para o *lumen* do RE, contudo, as partículas virais formadas são imaturas e não infecciosas. Os vírus imaturos são transportados pela via secretora celular até o Complexo de Golgi, onde o ambiente de pH ácido favorece o dobramento das partículas imaturas e permite a clivagem de pré M pela protease furina do hospedeiro, resultando na proteína de membrana M e no peptídeo *pr* que é secretado no meio extracelular. Com isso ocorre a maturação da partícula viral(1). As partículas virais maduras sofrem rearranjo no envelope viral e são liberadas para o extracelular por vesículas que se fundem à membrana citoplasmática(1).

#### 1.4. Ciclização do genoma

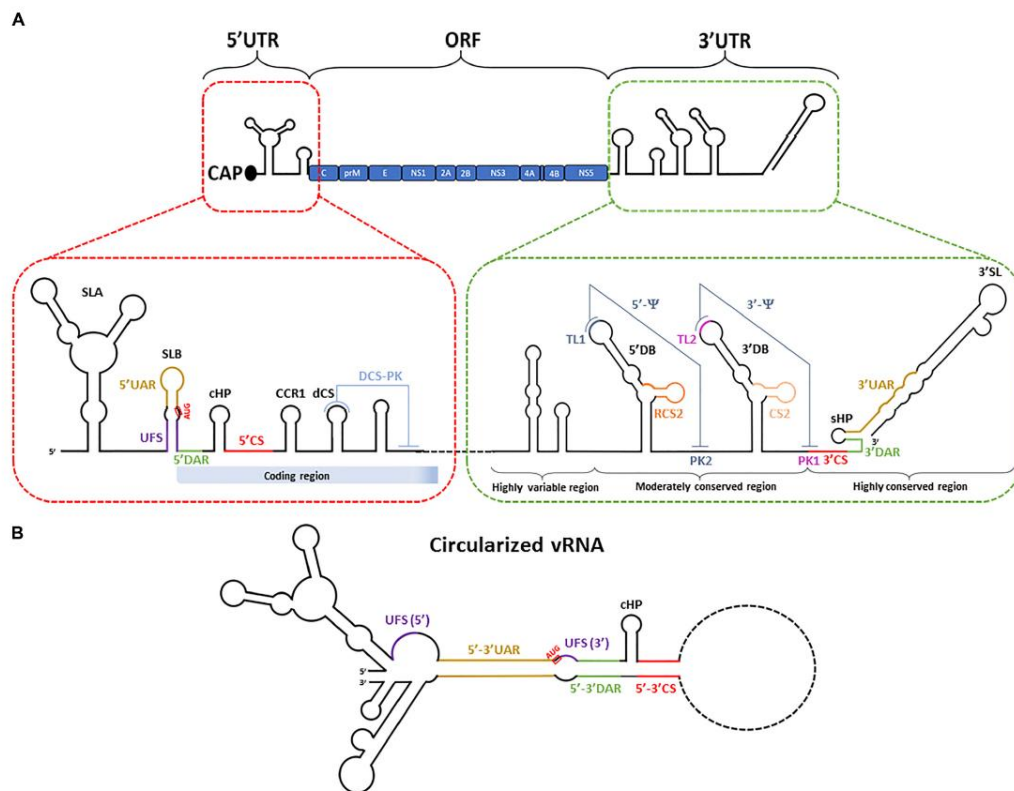
A ciclização de ssRNA(+) é vital para a produção de ssRNA(-) em Flavivírus, uma das etapas para a replicação do genoma viral. Durante o processo de replicação viral, a interação entre regiões complementares das porções 5' e 3' leva a formação de uma estrutura terciária em forma de alça. Essa estrutura permite o recrutamento da RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), que é responsável pela síntese da fita de RNA sentido negativo (32).

A região não codificante (do inglês *untranslated region* – UTR) da extremidade 5' tem aproximadamente 100 nucleotídeos e, em sua estrutura secundária, apresenta regiões bem conservadas entre os Flavivírus, como estrutura Cap tipo I e *large e short stem loop* (SLA e SLB respectivamente). Nestes vírus a SLA possui cerca de 70 nucleotídeos, assume uma estrutura em Y e desempenha papel como promotor da replicação viral. Já SLB, também conhecido como *5' upstream AUG region* (5'UAR), possui cerca de 16 nucleotídeos, possui região complementar na extremidade 3' do genoma viral (3'UAR), o que permite a interação entre estas sequências, permitindo a ciclização do genoma viral, como mostra a **Figura 8**. O códon AUG iniciador da síntese de poliproteínas está situado numa segunda estrutura de laço de haste (SLB), que é seguida pela região codificadora do capsídeo(33).

Outras regiões das porções 5'UTR e 3'UTR também contribuem para o processo de ciclização do genoma viral, observados na **Figura 8**.



**Figura 8:** Representação esquemática da ciclização de vírus com genoma de RNA polaridade positiva(34).



Ainda, parte da sequência para codificação da proteína do capsídeo viral também participa da ciclização do genoma viral e sobrepõe-se parcialmente às estruturas secundárias de RNA na região 3' do genoma. Após o *start códon* AUG, temos a região codificadora do capsídeo e esta região apresenta algumas porções com diferentes funcionalidades 5'DAR, cHP, 5'CS e DCS-PK(33, 34).

A primeira porção *downstream AUG region* (DAR), apresenta-se como uma região moderadamente conservada entre Flavivírus, podendo apresentar-se em uma única sequência ou duas(34).

A segunda porção, forma estrutura em forma de laço, denominada “*capsid coding region hairpin*” (cHP), que também tem importante papel tradução do RNA viral. Tem papel no reconhecimento do START códon e replicação de RNA, porém o mecanismo pelo qual cHP desempenha seu papel na circularização ainda é pouco elucidado, porém é sugerido que possa contribuir para formação e/ou estabilização da estrutura tipo cabo de panela (*panhandle*) do RNA(34).

5'CS encontra-se após cHP. A sua região de complementariedade na extremidade 3' do genoma viral encontra-se na sua porção de alta conservação entre os Flavivírus, anterior ao domínio 3'SL(35).

A última porção, DCS-PK (the *downstream of 5' cyclization sequence pseudoknot*), apresenta estrutura de pseudo-nó de três hastes e, nesta conformação secundária, facilita interações entre as porções 5' e 3' do genoma viral.(36).

## **1.5. Clínica e patogênese**

Acredita-se com base nas infecções por outros Flavivírus neutrotrópicos, na maior parte de casos de infecção por ROCV seriam praticamente assintomáticos(37, 38). As infecções do sistema nervoso central (SNC) com sintomatologia ocorreriam em uma minoria dos casos. Assim, para os casos de meningoencefalomielite, a infecção por ROCV, após período de incubação de 7 a 14 dias, causa febre, dor de cabeça, hiperemia da orofaringe e conjuntiva, lacrimejamento, mal-estar, mialgia, náuseas e vômitos, fotofobia e fraqueza(10, 18, 39). A infecção do SNC acarreta distensão abdominal, aerofobia, mastigação involuntária, retenção urinária, insuficiência respiratória, lassidão, letargia e estupor, que pode evoluir para o coma. Ao exame, os sinais de encefalite incluem confusão mental, alterações de consciência, surdez, disartria, dislalia, distúrbios de reflexos, anormalidades motoras (em especial marcha e equilíbrio prejudicados), irritação meníngea e síndrome cerebelar. Nos sobreviventes, a doença pode deixar sequelas graves de coordenação motora, do equilíbrio e da marcha (10, 39).

### **1.5.1. Infecção do sistema nervoso**

Os Flavivírus também podem ser agrupados de acordo com o quadro clínico que suas infecções apresentam, tais como os flavivírus encefaloptogênicos. Estes flavivírus neurotrópicos incluem o Vírus da encefalite japonesa (JEV), Saint Louis (SLEV), West Nile (WNV) e Tickborne encephalitis vírus (TBEV)(40). Outros Flavivírus também apresentam capacidade de infectar o sistema nervoso central (SNC), tais como o vírus Zika (ZIKV)(41) em infecções congênicas, e os vírus da febre amarela (YFV)(42) e dengue (DENV)(43).

Em geral a infecção do SNC ocorre de forma muito semelhante para infecções por estes vírus. Inicialmente com a infecção de células da pele, tais como queratinócitos, células de Langerhans, fibroblastos, mastócitos e monócitos/macrófagos migratórios. Após infecção cutânea, as células de Langerhans migram para linfonodo drenante onde o vírus é amplificado, permitindo sua disseminação(40). Existem diferentes mecanismos para invasão do SNC e estes vírus neutrotrópicos podem fazer uso de um ou mais mecanismos. Assim, os mecanismos de invasão do SNC podem envolver: **1)** migração paracelular com aumento de permeabilidade celular e rompimento das TJ (do inglês *tight junctions* ou junções apertadas), **2)** infecção das células endoteliais vasculares (HBMECs), permitindo passagem direta através da barreira



hematoencefálica, **3**) difusão passiva através da barreira hematoencefálica (BBB do inglês *blood-brain barrier*), **4**) transporte transcelular, **5**) infecção de células que migram para o SNC, mecanismo conhecido como “cavalo de Tróia” **6**) migração através do plexo coriáide e órgãos circumventriculares e o **7**) transporte axonal através do axônio neuronal do bulbo olfatório ou outros(44). Um importante fator que limita a infecção do SNC é a BBB. Barreira física e fisiológica que protege o acesso ao SNC. Pouco ainda se sabe sobre a forma de invasão do sistema nervoso central pelo vírus Rocio e a fisiopatologia de suas infecções.

### **1.5.2. Infecção do sistema nervoso central pelo vírus Rocio**

Quanto as infecções do SNC por ROCV, Rosemberg descreveu 8 casos humanos fatais, mostrando as estruturas que sofreram maior dano, o tálamo, núcleo dentado, substância inominada, tronco encefálico, medula espinal e núcleos basais. A matéria cinzenta era a região mais lesada. Também, observou infiltração mononuclear intersticial, proliferação microglial, necrose inflamatória talâmica e linfangite perivascular(45).

Experimentos em hamsters infectados com ROCV por Harrison e colaboradores. descreveram danos além do SNC, coração e pâncreas(46). Henriques e colaboradores descreveram infecção persistente com genoma viral em vísceras dos hamsters, incluindo cérebro, sangue, soro e urina(47). De Barros e colaboradores, em modelo murino de infecção do SNC, observaram que os animais infectados desenvolveram meningoencefalite com paralisia ascendente que evoluiu para óbito(48). Observaram, também, a resposta imune, com formação de infiltrados inflamatórios por migração inicial de linfócitos/NK para o cérebro, seguida de neutrófilos, monócitos e por último, linfócitos TCD8<sup>+</sup>, encontrados também na medula espinhal. A resposta imune era induzida pelas citocinas Th1 e Th2. Na fase final da encefalite os animais apresentavam apoptose de neurônios cerebrais e da medula(48). Outros estudos demonstraram que o eixo CCR5/MIP-1  $\alpha$ , importante para a migração de células linfomonocitárias durante a infecção, contribui para o aumento da inflamação no cérebro, assim como reduz a sobrevivência dos animais infectados com ROCV(16). Recentemente, Franca e colaboradores, em modelo experimental murino, observaram resposta imune induzida por ROCV com sinalização de citocina IL-33 e receptor ST2, que tem papel protetor(49). Animais com deficiência para ST2 apresentaram maior dano tecidual, infiltração celular, maiores níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$  e carga viral no SNC, em comparação com roedores selvagens. Barros e colaboradores avaliaram a contribuição de citocinas e óxido nítrico (ON) para o desenvolvimento de infecções por *Flavivirus* brasileiros sugerindo que ON

não tem papel na infectividade de ROCV, ainda que seja mais expresso durante essas infecções e tenha papel antimicrobiano(50).

## 2. Vírus Recombinantes

Desenvolvimentos na virologia, DNA recombinante e genética reversa permitiram avanços na biologia molecular e modificações genéticas de células e organismos. Dentre as técnicas desenvolvidas, deu-se o início a construção de vírus recombinantes, que também contribuiu para avanços significativos na biologia molecular, entendimento de fisiopatologia de infecções virais, replicação viral, ensaios para descoberta de novas drogas antivirais e desenvolvimento de vacinas (51, 52).

Os sistemas de genética reversa permitem a construção de vírus inteiramente a partir de cDNA(53). O primeiro vírus recombinante produzido, foi o vírus da raiva, um vírus ssRNA(-)(54). A produção de vírus recombinantes permite a possibilidade de modificações do genoma original do vírus, com aplicações na identificação do impacto de mutações pontuais no genoma, identificação de determinantes patogênicos ou imunogênicos e o uso de vírus repórter.

Desta forma, existem aspectos de grande importância na construção de vírus recombinantes, que são: o uso de vetores virais(55), a construção de partículas semelhantes a vírus (VLPs)(56, 57), a construção de vírus repórter(58, 59).

Os vírus repórteres codificam genes repórteres estrangeiros e desempenham um papel essencial como ferramenta de pesquisa(53, 60, 61). Esses genes repórteres são expressos apenas em células infectadas, o que pode ser facilmente detectados. Uma classe de genes repórter são as *tags* luminescentes, proteínas utilizadas como marcadores por sua capacidade de emitir luz detectável e quantificável, incluindo os fenômenos de fotoluminescência (fluorescência) e quimioluminescência(62, 63).

O uso de vírus repórter podem ter diversas aplicações(53), como: estudo de replicação viral, permitindo a detecção de diferentes etapas do processo replicativo, localização, função e estrutura de proteínas virais, interação entre proteínas virais e celulares, fisiopatologia de suas infecções, pesquisa por anticorpos neutralizantes, como ferramenta para pesquisa *high-throughput screening* para compostos com capacidade antiviral(30, 53, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72) e métodos de detecção e diagnóstico(73)

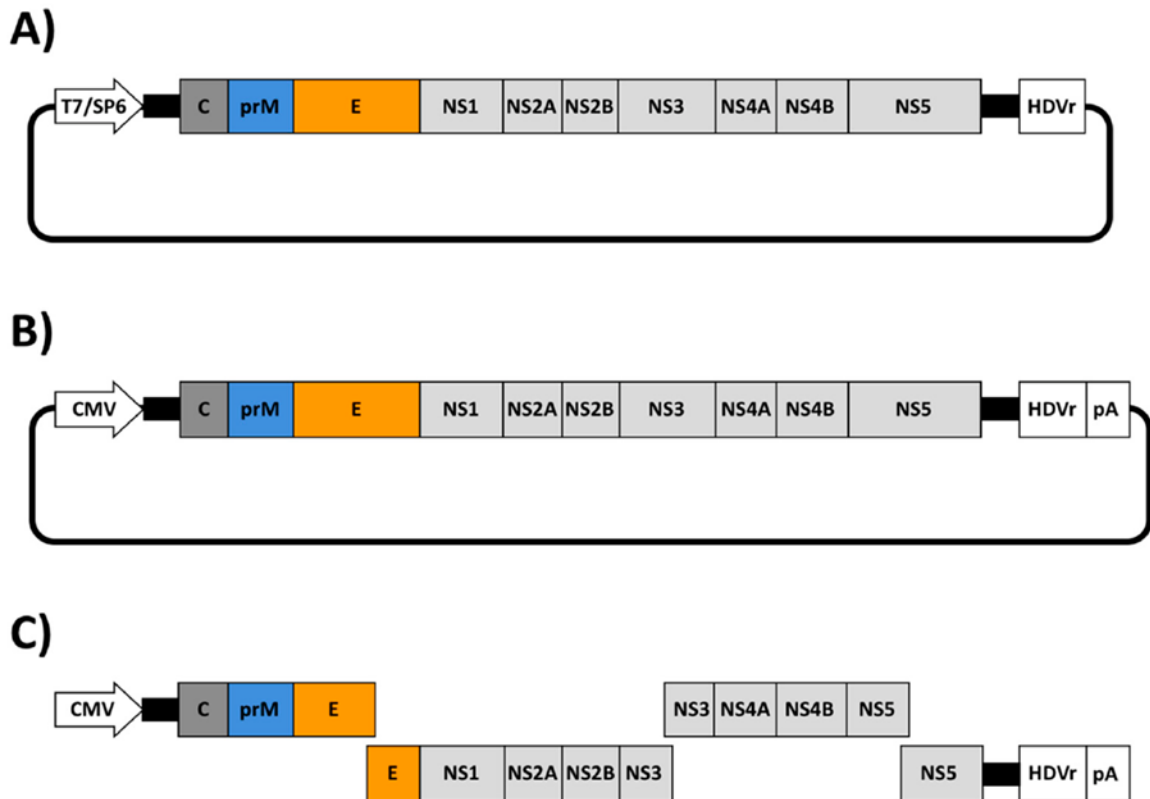
Neste contexto podemos encontrar duas classes de marcadores amplamente utilizados. As Tags-proteína, com mais de 12 aminoácidos, como GFP, família de proteínas luciferase (Firefly, Renilla e nanoluc luciferase), mCherry, mNeonGreen; e as Tags-peptídeos com menos de 12 aminoácidos, como HiBiT, FLAG e HIS.

Existem diferentes possibilidades para a inserção de genes repórter em genoma de flavivírus. *i*) antes da ORF para codificação da poliproteína viral(70, 74, 75, 76, 77, 78, 79); *ii*) entre proteínas virais(80) ou *iii*) após a ORF para codificação da poliproteína viral(81, 82).

O primeiro vírus produzido por transfecção de células competentes, com plasmídeo contendo DNA viral, foi o Poliovírus, realizado por Racaniello em 1981(83). Desde então diversos estudos foram realizados na tentativa de ampliar o conhecimento em biologia molecular e fisiopatologia de infecções virais, contribuindo para o desenvolvimento de técnicas para construção e resgate de vírus recombinantes. Em especial, com a emergência do vírus Zika estes estudos foram intensificados. Dessa forma, em linhas gerais existem três estratégias empregadas na construção do Vírus Zika e de outros vírus de RNA: RNA infecciosos transcritos a partir de cDNA; plasmídeos que são transfectados diretamente para produzir vírus; e *amplicons* subgenômicos infecciosos(30).

A primeira estratégia envolve a transcrição *in vitro* de cDNA contendo todo o genoma do vírus e promotor procariótico de RNA polimerase (como T2 ou SP6), e sequência da Ribozima do vírus da Hepatite delta (do inglês *hepatitis delta virus ribozyme* - HDVr) que permite a produção de região 3' perfeita, como representado na **Figura 9A**. Após a produção do RNA, este é transfectado em células susceptíveis para produção de partículas virais infecciosas.

**Figura 9:** Representação esquemática das três estratégias mais empregadas para o desenho de vírus recombinantes(30).



A segunda estratégia consiste na construção de cDNA contendo promotor para polimerase II de células eucarióticas na região 5' (como promotor do citomegalovírus humano - CMV) e sequências HDVr e terminador para polimerase II e sequência de poliadenilação (pA) na região 3' do genoma viral, como representado na **Figura 9B**. Estes cDNAs são transformados em bactérias, para propagação, recuperados e transfectados em células competentes para produção de partículas virais.

A última estratégia utilizada para construção de vírus recombinantes é a produção de sequências de cDNA com regiões de sobreposição, que perfaçam todo o genoma viral. Estes fragmentos de cDNA também contêm promotor para polimerase II de células eucarióticas na região 5' e sequências HDVr e terminador para polimerase II e sequência de poliadenilação (pA) na região 3' do genoma viral, representado na **Figura 9C**. Neste caso todos os fragmentos são cotransfectados em células susceptíveis para que sofram montagem espontânea por recombinação homóloga, gerando um único DNA contendo todo o genoma viral, permitindo assim a produção de novas partículas virais infectivas(30).

A construção de clones infecciosos tem sido tradicionalmente realizada com a inserção de cDNAs em plasmídeos. Para tanto o DNA plasmidial é clivado e ligado a DNA heterólogo,

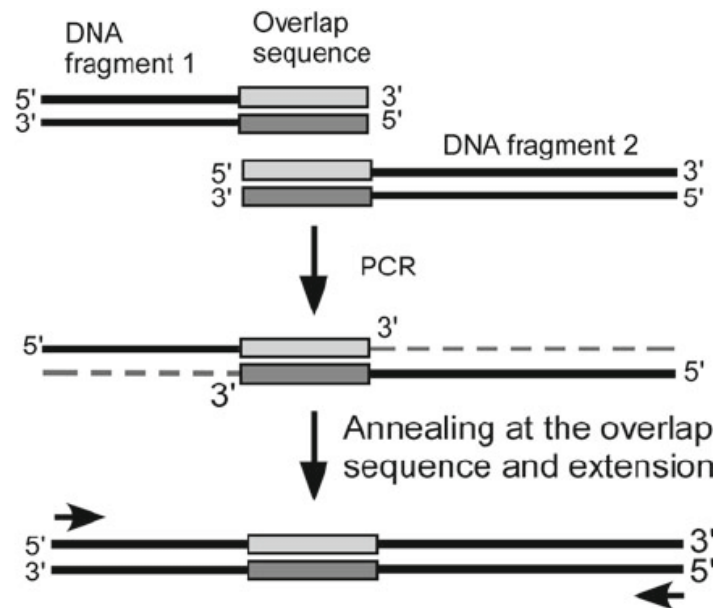
transformado em cepa adequada de *Escherichia coli*. A transformação permite a amplificação de DNA de interesse(84). No entanto, o uso de plasmídeos para amplificação de DNA e transformação em bactérias implica em aumento na taxa de mutação do genoma viral, citotoxicidade causada por produtos bacterianos, custo mais elevado, e necessidade de transcrição *in vitro*(30). Ainda, o uso de plasmídeos para a produção de vírus infectivos, traz como desafio a instabilidade e citotoxicidade em células eucarióticas. Com objetivo de mitigar este, entre outros, problemas, foram desenvolvidas novas estratégias para produção destes DNAs, dentre elas *Gibson Assembly* e *Circular polymerase extension cloning* (CPEC)(30).

## 2.1. Uso de CPER para construção de vírus recombinantes

*Circular Polymerase Extension Reaction* (CPER) surge como *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC) uma metodologia desenvolvida por **Jiayuan Quan** e **Jingdong Tian** para facilitar, baratear e aumentar a eficiência de clonagem de genes individuais, bibliotecas ou fragmentos múltiplos de DNA(85).

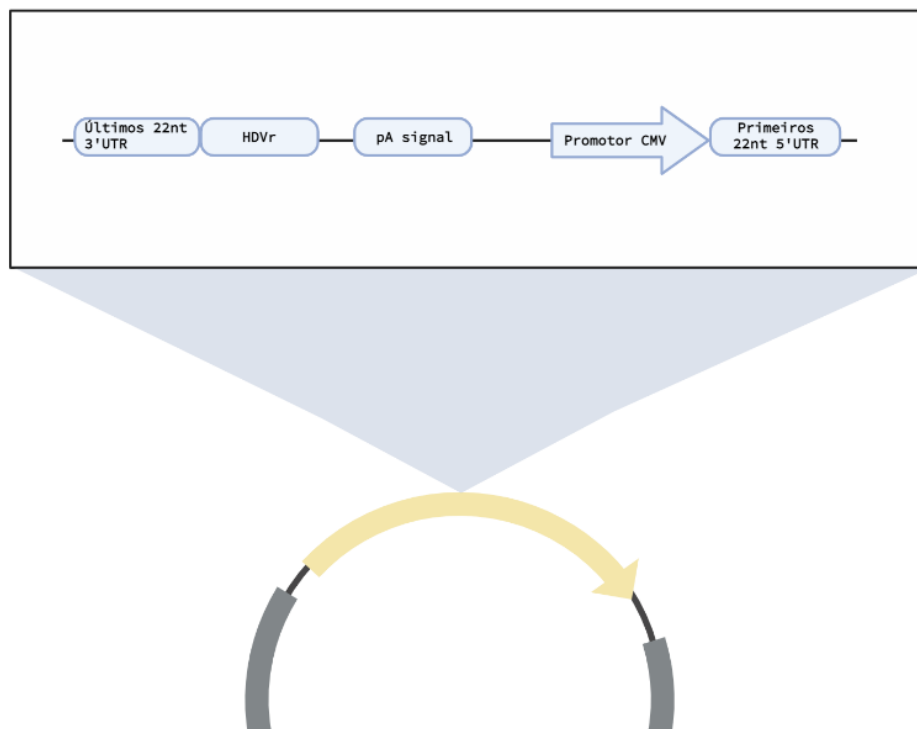
A CPER utiliza a capacidade de extensão da polimerase para ligar insertos e vetores de dupla fita de DNA com regiões de sobreposição. Para uma reação CPER, os insertos lineares de fita dupla de DNA e os vetores de fita dupla, são primeiro desnaturados por calor e então, as fitas simples resultantes se anelam com suas extremidades sobrepostas do vetor e se estendem usando uma à outra como molde para formar DNAs circulares de fita dupla(86). A CPER é utilizada para clonar um ou mais insertos em vetor de DNA, como os plasmídeos, e faz isso em uma única reação, sem a necessidade de enzimas de digestão ou ligação, representado na **Figura 10**. De forma geral, nesta reação são utilizados insertos e vetores contendo regiões de sobreposição, temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) semelhantes, enzima taq polimerase, solução tampão e dNTP. O produto da reação de circularização pode ser diretamente transformado ou transfectado em células competentes, permitindo a sua expressão.

**Figura 10:** Esquema da circularização por CPER(86).



Em 2013 Edmonds e colaboradores (87) usaram e adaptaram a CPER para a construção de *Flavivirus* infecciosos. A metodologia permitiu geração rápida de clones infecciosos eliminando a necessidade de plasmídeos, de passagens em bactérias e da transcrição *in vitro*. O uso da enzima *Phusion high-fidelity DNA polymerase* permite a construção de fragmentos de DNA com regiões de sobreposição de alta fidelidade, perfazendo todo o genoma viral. A circularização deste genoma é permitida pelo uso de uma sequência de DNA *linker* ligando as regiões 5' e 3' do vírus. Esse *linker* contém estruturas importantes para a eficiente expressão do genoma viral que incluem um promotor CMV imediatamente a montante do primeiro nucleotídeo da sequência do vírus, a sequência HDVr e o sinal de poliadenilação de vírus símio SV40 poly(A) colocados diretamente a jusante do último nucleotídeo da sequência viral. As sequências contidas no *linker* podem ser observadas na **Figura 11**.

**Figura 11:** Representação do conteúdo do fragmento Linker.



**Fonte:** Autoria própria

O promotor CMV permite a expressão em células de mamíferos e elimina a necessidade de transcrição *in vitro* do DNA circular. O DNA circular é direcionado para o núcleo, onde a RNA polymerase II da célula hospedeira interage com o promotor permitindo o aumento da transcrição deste DNA. Após a ativação do complexo de transcrição forma-se uma nova fita de RNA mensageiro e a sequência SV40-Poly(A) permite a adição de uma calda poli A, garantindo maior estabilidade e o transporte deste RNA para o citoplasma celular, onde poderá ser traduzido para formação das proteínas virais. Durante a leitura do mRNA para formação de proteína, a sequência da Ribozima do vírus da Hepatite delta (HDVr), permite a clivagem precisa na porção 3' do vírus, criando uma região 3'UTR perfeita, que é importante para a replicação viral.

O uso desta metodologia permitiu a construção de diferentes vírus, em especial Alphavírus e Flavivírus(79, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97). Nos últimos anos CPER também foi empregada para construção de vírus SARS-CoV-2(88, 98, 99).



### 3. JUSTIFICATIVA

O vírus Rocio causou surto de encefalite com alta letalidade no Brasil na década de 70, deixando, também, muitos pacientes com sequelas graves. Embora não tenham ocorrido novos surtos desde então, estudos sorológicos têm comprovado a sua circulação contínua, e infecções ativas subnotificadas foram recentemente descobertas, mascaradas durante um surto de dengue em 2013. Estes dados indicam, não apenas a sua circulação, mas também reforçam a necessidade de esforços em pesquisas para maiores esclarecimentos da fisiopatologia das infecções causadas pelo Rocio. Além disso, é preciso buscar por compostos antivirais que possam ser eficazes contra esse patógeno.

Nesse contexto, o presente trabalho desenvolve um vírus Rocio repórter, uma ferramenta muito útil para futuros estudos. Os vírus repórteres podem ser utilizados para ensaios de *high throughput screening*, para buscar por compostos com atividade antiviral. Além disso, eles permitem a identificação de anticorpos neutralizantes, melhor entendimento de mecanismos fisiopatológicos das infecções virais e a busca por novas abordagens terapêuticas e de controle.

A pesquisa nessa área é importante para a saúde pública, podendo trazer avanços significativos no combate a essa virose causadora de grave doença e para desenvolver medidas preventivas mais eficazes.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Construir um vírus Rocio recombinante (rROCV) expressando gene repórter.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Construir rROCV pra expressão de Renilla Luciferase pela metodologia CPER;
- Construir rROCV para expressão de gene mCherry (proteína fluorescente) pela metodologia CPER;
- Construir rROCV para expressão de gene mNeonGreen (proteína fluorescente) pela metodologia CPER;
- Construir rROCV para expressão de gene HiBit-Tag, fragmento de Nanoluc Luciferase, pela metodologia CPER;

# MATERIAL E MÉTODOS

## 5. MATERIAL E METÓDOS

Este trabalho foi aprovado pelo Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio, em EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.262/2020. Processo SEI nº: 01245.004361/2020-77 (100).

O trabalho foi desenvolvido em Laboratórios com nível de biossegurança 3 do Centro de Pesquisa em virologia da FMRP-USP e em estágio desenvolvido com bolsa de mobilidade acadêmica no Laboratório de Virologia da Universidade de Queensland na Austrália sob supervisão do Dr. Daniel Watterson.

### 5.1. Vírus Rocio

Para este trabalho, foi utilizado vírus Rocio (ROCV) da cepa SPH34675(11), GenBank: AY632542.4 armazenado no banco de vírus do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP, esta CEPA é a mesma presente em banco de vírus do laboratório da Universidade de Queensland. ROCV foi propagado em culturas de células C6/36 (células de larvas de *Aedes albopictus*) e VERO (rim de macaco verde africano). Os estoques virais produzidos foram testados quanto à presença viral por RT-PCR e posteriormente quantificados por ensaio de plaque. Este estoque de vírus é referenciado neste trabalho como ROCV-WT e foi utilizado como molde para a construção dos vírus recombinantes.

### 5.2. Design para construção dos vírus recombinantes por CPER

Este projeto foi realizado em 2 etapas. A primeira etapa foi a tentativa de construção do vírus Rocio recombinante com expressão de gene da Renilla luciferase, conforme representado na **Figura 12A**. Nesta construção o vírus recombinante apresenta a região 5'UTR seguida dos primeiros 35 aminoácidos do capsídeo, sítio de clivagem FMV2A e sequência completa do vírus a partir do capsídeo viral.

A segunda etapa do projeto foi realizada com 3 diferentes *designs* para a construção de vírus repórter, como representado na **Figura 12**.

Na **Figura 12B, C e D** podemos observar as construções realizada na segunda etapa deste trabalho, na Universidade de Queensland. Na **Figura 12B** podemos ver o primeiro *design* utilizado, este apresenta a região 5'UTR, seguida dos primeiros 43 aminoácidos do capsídeo viral, gene repórter e sítio de clivagem T2A. Foram feitas 4 versões de vírus diferentes seguindo este modelo. mCherry e mNeonGreen seguidos da sequência para expressão da proteína do capsídeo totalmente otimizada (foi alterada a sequência de bases, mantendo a sequência correta

de aminoácidos) e mCherry e mNeonGreen seguidos de capsídeo com sequência parcialmente otimizada, este apresentando a otimização do códon apenas até o nucleotídeo 60 do capsídeo.

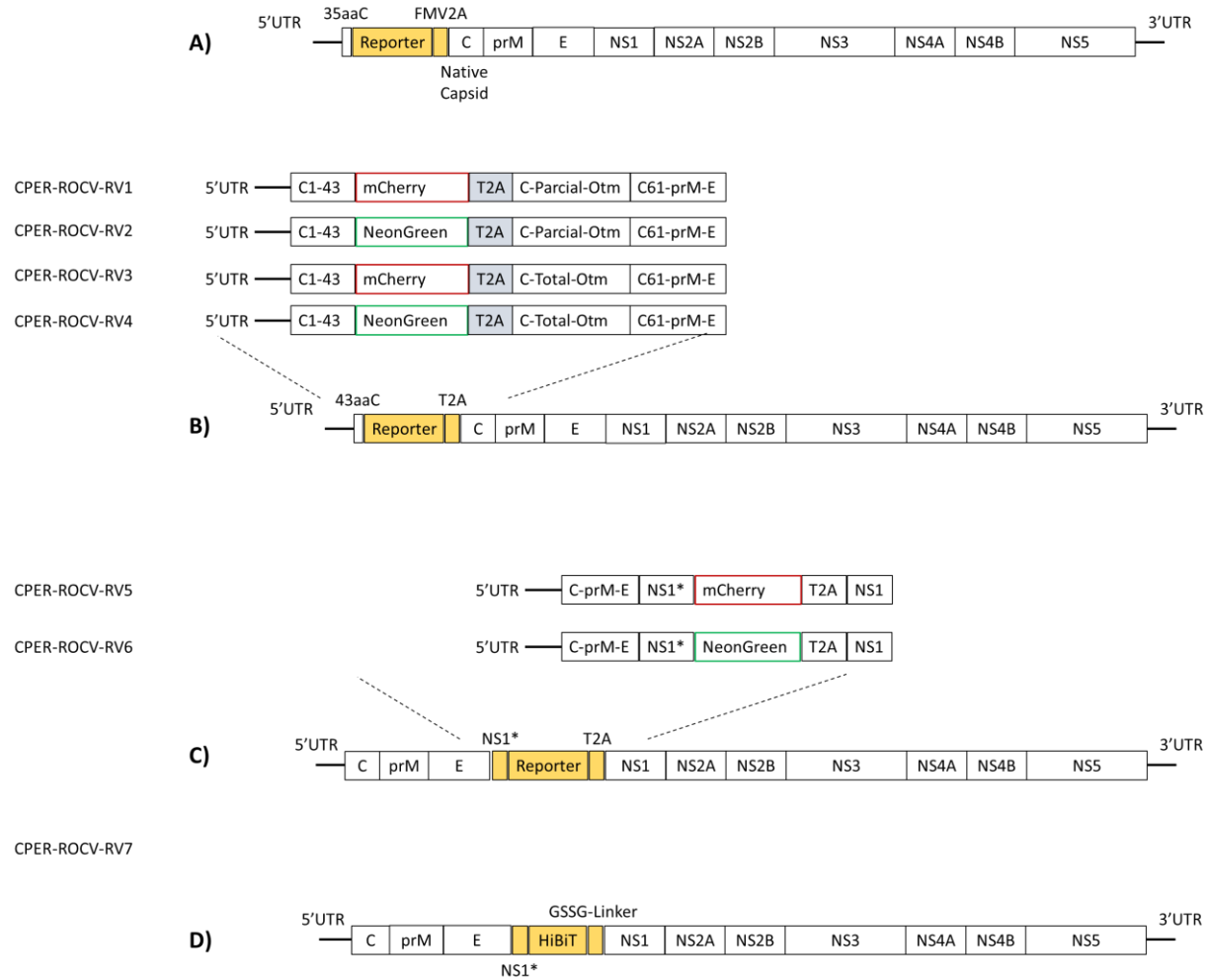
Na **Figura 12C** podemos observar o segundo modelo de vírus idealizado, em que o gene repórter foi inserido após a proteína do envelope e 4 aminoácidos otimizados da proteína não estrutural NS1. Para este modelo foram produzidos mais dois vírus, um com o gene repórter mCherry e o outro com mNeonGreen.

Já na **Figura 12D**, após a proteína do envelope e 4 aminoácidos otimizados da proteína não estrutural NS1, inseriu-se HiBiT-tag e um linker GS, produzindo apenas um vírus.

Dessa forma foram desenhados 8 diferentes vírus Rocio expressando gene repórter.

**Figura 12:** Representação esquemática dos vírus recombinantes carregando gene repórter

- A) Representação esquemática de vírus repórter apresentando gene repórter entre cópias de genes do capsídeo, com a primeira parte apresentando 35 aminoácidos do capsídeo;
- B) Representação esquemática de vírus repórter apresentando gene repórter entre cópias de genes do capsídeo, com a primeira parte apresentando 43 aminoácidos do capsídeo e a segunda com sequência parcial ou totalmente otimizada do capsídeo;
- C) Representação esquemática do vírus repórter apresentando gene repórter entre gene do envelope e NS1;
- D) Representação esquemática de vírus repórter apresentando gene repórter HiBiT-tag entre proteína do envelope e NS1



Fonte: Autoria própria

### 5.3. Extração de RNA viral

Estoque viral foi crescido em cultura de células C6/36, incubado a 28°C até o surgimento de efeito citopático (CPE). O produto da transfecção foi colhido e concentrado em coluna Amicon (Merck). O concentrado viral foi submetido a extração de RNA total com o uso de Trizol LS (Thermo Fisher) seguindo indicações do fabricante. O RNA viral foi suspenso em 50 µl de água DEPC livre de RNase e armazenado a -80°C.

### 5.4. Transcrição Reversa (RT)

O RNA total extraído foi utilizado na produção de cDNA utilizando kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) seguindo indicação da fabricante. Para a etapa de produção de cDNA foram utilizados *primers* randômicos (Invitrogen) ou *primer* 3'UTR-reverso. Os cDNAs obtidos foram submetidos a tratamento com RNase H (GIBCO, EUA) e incubados a 37°C por 30min e posteriormente armazenados a -20°C.

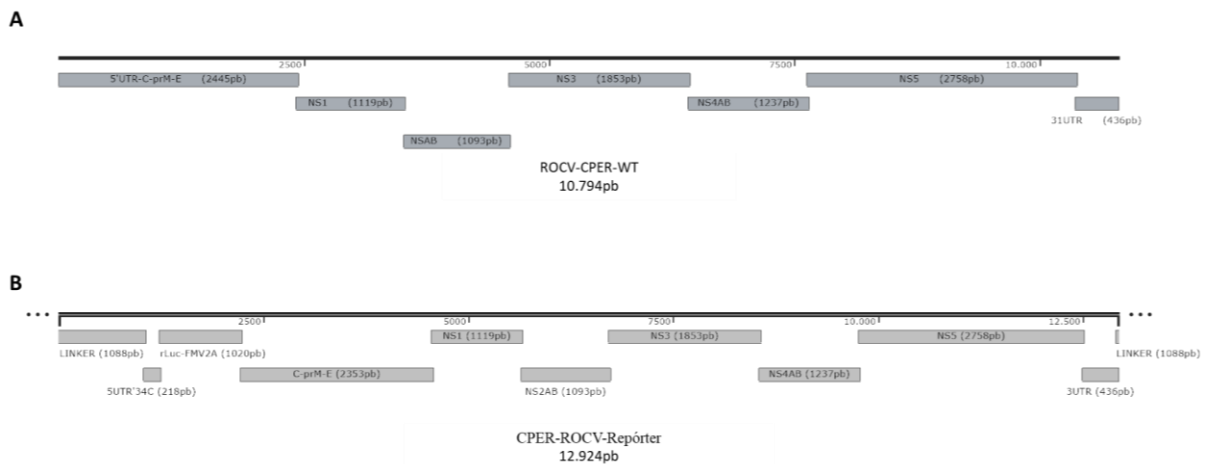
### 5.5. Produção dos vírus recombinantes

Para construção de vírus CPER-ROCV-WT, CPER-ROCV-Repórter e demais vírus recombinantes por CPER utilizou-se metodologia e *primers* já descritos por Amarilla e colaboradores(90). *Primers* foram usados para construção de fragmentos de DNA perfazendo todo o genoma viral e incluindo regiões de sobreposição entre si. Também, obteve-se por PCR fragmento *linker* para ligação entre as regiões 5'UTR e 3'UTR do vírus. Para os fragmentos *linker* e fragmentos de genes repórteres foram utilizados plasmídeos contendo as respectivas sequências.

Para obter os fragmentos de DNA utilizados na construção dos 7 vírus recombinantes, foram utilizadas as enzimas de PCR Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) ou PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (TaKaRa). Lista de *primers* utilizados encontra-se em anexo neste documento.

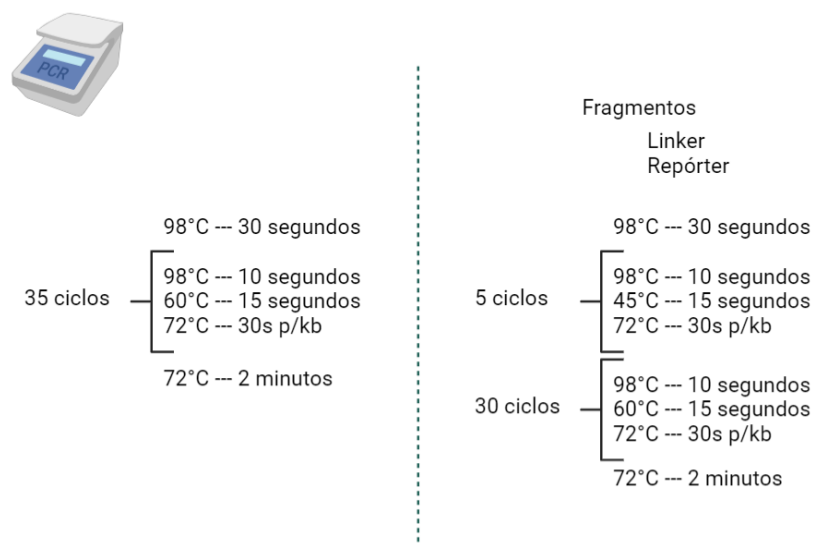
Para a primeira etapa deste trabalho, desenvolvida no Brasil, realizamos a obtenção de fragmentos de DNA utilizando Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB), seguindo orientações da fabricante. O conjunto de *amplicons* obtidos para o vírus CPER-ROCV-WT e CPER-ROCV-repórter contendo luciferase são apresentados na **Figura 13**.

**Figura 13:** Conjunto de *amplicons* produzidos por RT-PCR  
**A)** O conjunto de *amplicons* obtidos para o vírus CPER-ROCV-WT  
**B)** CPER-ROCV-repórter contendo luciferase



A mistura contendo reagentes de PCR e cDNA foi submetida a denaturação, a 98°C por 30 segundos, seguida por 35 ciclos de 98°C 10 segundos, 60°C 15 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma etapa final de extensão de 72°C por 2 minutos. Os fragmentos para gene repórter e *linker*, que não possuem *amplicon* com sua sequência em totalidade, foram submetidos a 98°C por 30 segundos para denaturação e 5 ciclos de 98°C 10 segundos, 45°C 15 segundos e 72°C por 30 segundos por cada kb do *amplicon* e mais 30 ciclos de 98°C 10 segundos, 60°C 15 segundos e 72°C por 1 por cada kb do *amplicon*, como na **Figura 14**.

**Figura 14:** Ciclo de PCR utilizado com Kit Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)

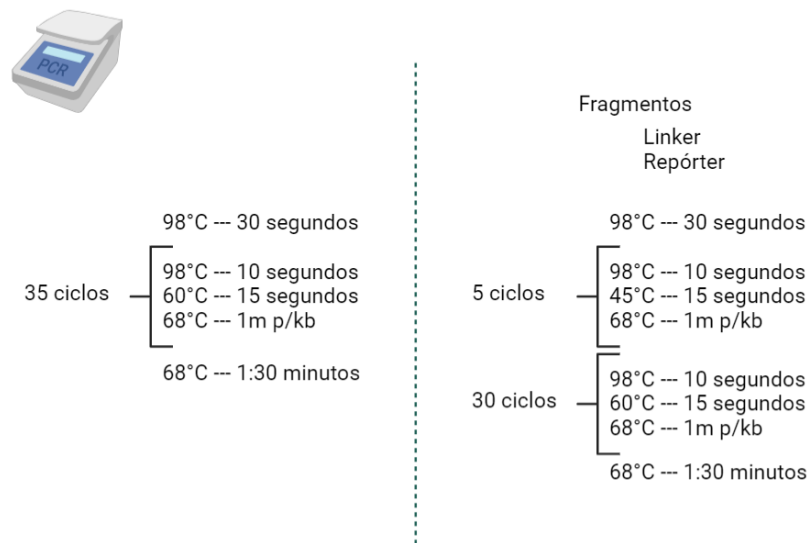


Para a segunda etapa de desenvolvimento deste trabalho, foi realizada PCR utilizando PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (TaKaRa) seguindo orientações do fabricante. Em



resumo os fragmentos do genoma viral foram submetidos a 98°C por 30 segundos para denaturação e 35 ciclos de 98°C 10 segundos, 60°C 15 segundos e 68°C por 1 por cada kb do *amplicon*, seguidos de 98°C por 1:30 minutos. Os fragmentos para gene repórter e linker, que não possuem *amplicon* com sua sequência em totalidade, foram submetidos a 98°C por 30 segundos para denaturação e 5 ciclos de 98°C 10 segundos, 45°C 15 segundos e 68°C por 1 por cada kb do *amplicon* e mais 30 ciclos de 98°C 10 segundos, 60°C 15 segundos e 68°C por 1 por cada kb do *amplicon*, como apresentado na **Figura 15**.

**Figura 15:** Ciclo de PCR utilizado com Kit PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (TaKaRa).



Os *amplicons* foram purificados com o kit Monarch DNA gel extraction (BioLabs), seguindo orientações do fabricante. De forma geral, os fragmentos de DNA foram obtidos por excisão da banda corresponde em gel de agarose e este pedaço de gel foi adicionado a tubo de 1,5mL. O gel foi dissolvido em solução própria, a 55 °C, por aproximadamente 10 minutos, sendo adicionado a uma coluna e centrifugado a 16.000xg por 1 minuto, seguido de passos para lavagem e eluição em água ultrapura.

Os fragmentos foram quantificados em *nanodrop* para cálculo do teor de DNA em pmol. Para a circularização do DNA, quantidades equimolares de DNA, em concentração 0,1 uM foram misturadas para uma reação de 50µL sem uso de *primers*. Na reação de circularização utilizou-se a mesma polimerase empregada na produção dos *amplicons*.

A mistura de reagentes contendo fragmentos de DNA foi submetida a 98°C por 2 minutos, seguidos por 12 ciclos de 98°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos e 68° por 7 minutos; e por fim, 68°C por 12 minutos.

## **5.6. Transfecção em células HEK**

O produto da CPER foi transfectado em cultura de células. Para este fim, foram utilizadas placas de 6 poços, que foram semeadas com  $3 \times 10^6$  células HEK 293T por poço. Utilizaram-se 2 kits de transfecção: Kit lipofectamina LTX (Invitrogen) e TransIT®-LT1 (Mirus) e nos 2 casos seguiram-se indicações do fabricante.

## **5.7. Resgate de vírus construído**

Após transfecção e incubação em culturas de células HEK293T, o sobrenadante foi colhido e utilizado para passagem em cultura de células VERO76 ou C6/36. Os produtos da transfecção e das culturas em células VERO76 e C6/36 foram avaliados quanto a presença de genoma viral por RT-PCR e titulados.

## **5.8. Imunofluorescência**

Para confirmar infecção por ROCV nas culturas de células, foi realizado teste de imunofluorescência indireta (IFA) que permite detectar antígenos do vírus no citoplasma das células infectadas. Para o teste, células VERO foram semeadas sobre lamínulas de vidro, em placas de 24 poços. No dia seguinte, estas células foram inoculadas com ROCV recombinante e após aparecimento de efeito citopático, foram fixadas com paraformaldeído a 4%, por 15 minutos, com posterior lavagem em PBS. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com triton 100X 0,1% para permeabilização celular e foram bloqueadas com solução de BSA 3%, por 1 hora. Posteriormente um soro murino contra vírus Rocio foi adicionado às lamínulas e estas foram incubadas por 1 hora, a 37°C. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS e a elas adicionou-se conjugado equino anti-mouse IgG (H+L) Alexa fluor 488 (LIFE), sendo incubadas por 30 min, a 37°C e em seguida lavadas com PBS. Finalmente, as lamínulas de vidro foram montadas em lâminas com Fluormount (Sigma) e observadas ao microscópio de fluorescência (Nikon 120, Japão).

## **5.9. Quantificação viral por contagem de *plaques* com focos fluorescentes**

ROCV foi quantificado por contagem de *plaques* (focos) fluorescentes. Para tanto, células VERO (células de rim de macaco verde africano) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C. Após confluência, as monocamadas celulares foram lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS) e inoculadas com 20µL do vírus, em diluições decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) em DMEM. As placas foram incubadas a 37°C por uma hora e sob agitação constante. Decorrido este tempo,

adicionou-se a cada poço, 180µL de uma solução de carboximetilcelulose (CMC), sendo esta composta de carboximetilcelulose e meio DMEM 2 vezes concentrado, em partes iguais, suplementado com 2% de SFB. As placas foram novamente incubadas, por tempo suficiente para a formação de *plaques*. Neste momento, o sobrenadante semi-sólido foi removido e adicionou-se 180µL acetona 90% (solução líquida constituída por formaldeído) a cada poço e incubou-se por 1 hora a -20C. Em seguida, a formalina foi removida por inversão vigorosa da placa e esta foi lavada em água corrente.

As células foram bloqueadas com solução KPL Milk Diluent/Blocking Solution (SERACARE), incubadas por 1 hora a 37°C e incubadas com anticorpo primário h4G2 por 1 hora a 37°C. Em seguida, as monocamadas foram submetidas a 4 lavagens em PBS por 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário anti-Human 488 por 1 hora a 37°C. Por fim as células foram lavadas e secas, prontas para a leitura em *scanner* de placas Odissey clx (LICOR). A quantificação viral, em unidades formadoras de placas (ou focos) fluorescentes/mL (FFU/mL), foi calculada com base na média do número de *plaques* na última diluição da amostra em que os mesmos puderam ser observados e contados.

### **5.10. Avaliação da Expressão de gene repórter**

Para avaliar a expressão dos genes repórteres mCherry e mNeonGreen, as células VERO76 foram infectadas com um M.O.I de 0,01 do vírus. Para essa finalidade, as monocamadas de células foram semeadas em lamínulas de vidro, em placas de 24 poços e incubadas a 37 °C por 24 horas, até a infecção. As monocamadas infectadas foram incubadas por mais 3 dias e, em seguida, fixadas em paraformaldeído 4% por 1 hora, em temperatura ambiente (RT). As células fixadas foram lavadas três vezes em PBS e, em seguida, permeabilizadas com uma solução de Triton 0,1% em PBS por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de incubação em uma solução de bloqueio (0,5% de BSA e 0,2% de gelatina de pele de peixe de água fria em PBS 1X) por 1 hora à temperatura ambiente. As monocamadas foram incubadas com anticorpos monoclonais h4G4 e h4G2 para NS1 e proteínas de envelope de Flavivírus, respectivamente. Após incubação à temperatura ambiente, *overnight*, as monocamadas de células foram lavadas três vezes com PBS1X. Por fim, as monocamadas foram incubadas com anticorpos secundários fluorescentes marcados com Alexafluor 488, 568 ou 647 (Invitrogen) por 45 minutos à temperatura ambiente. Os núcleos foram corados com DAPI (1 µg ml<sup>-1</sup>). As amostras foram montadas em solução de mowiol. As imagens de imunofluorescência foram obtidas com um Zeiss AxioScan Z1 Fluorescent Imager.

# RESULTADOS

## 6. RESULTADOS

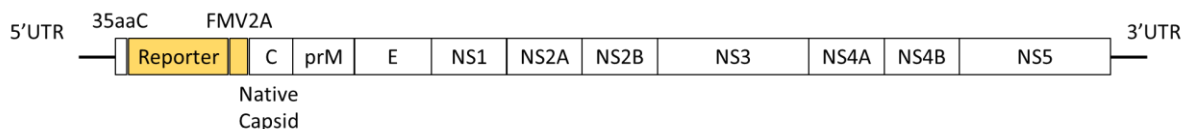
Utilizando o vírus Rocio (ROCV) da cepa SPH34675, foi possível construir ROCVs recombinantes com expressão de genes repórter. Também, para comparação, foi construído ROCV recombinante WT, denominado CPER-ROCV-WT. Dessa forma, produzimos e avaliamos os vírus:

- CPER-ROCV-WT
- CPER-ROCV-Repórter
- CPER-ROCV-RV1
- CPER-ROCV-RV2
- CPER-ROCV-RV3
- CPER-ROCV-RV4
- CPER-ROCV-RV5
- CPER-ROCV-RV6
- CPER-ROCV-RV7

### 6.1. Tentativa infrutífera de construção de vírus Rocio recombinante com gene da Luciferase.

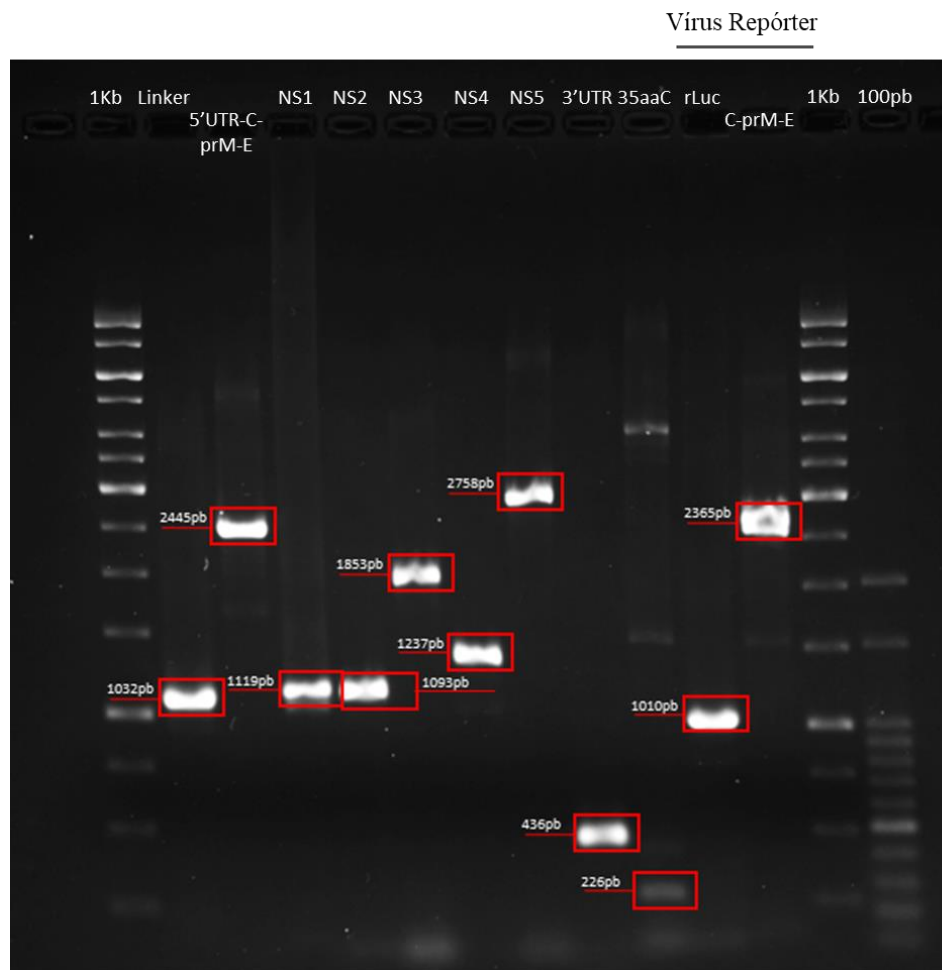
A primeira etapa deste projeto foi realizada para produzir ROCV contendo os primeiros 35 aminoácidos do capsídeo, seguidos do gene repórter Renilla Luciferase, contendo a região de autoclivagem FMV2A e a sequência completa do capsídeo em sua forma nativa (não otimizada), como representado na **Figuras 12A e 16**.

**Figura 16:** Representação esquemática do vírus CPER-ROCV-Repórter contendo gene da luciferase.



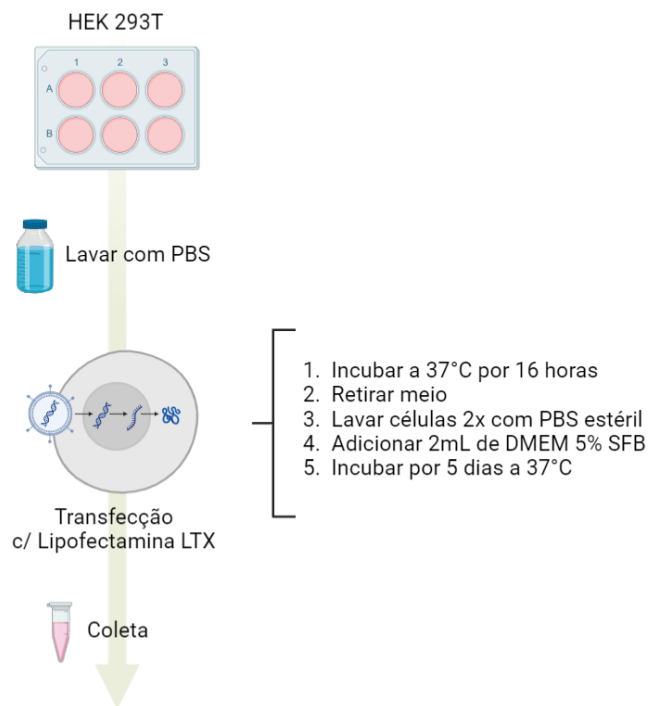
Para a construção do vírus Rocio com gene repórter luciferase foram produzidos por PCR todos os fragmentos do vírus Rocio e do vírus recombinante contendo o gene repórter. Para tanto, utilizou-se a enzima Q5 Hot Start (NEB), com os fragmentos apresentados na **Figura 17**.

**Figura 17:** Eletroforese em gel de agarose. Amplicons com fragmentos de DNA para construção de vírus WT e CPER-ROCV-Repórter contendo gene da luciferase.



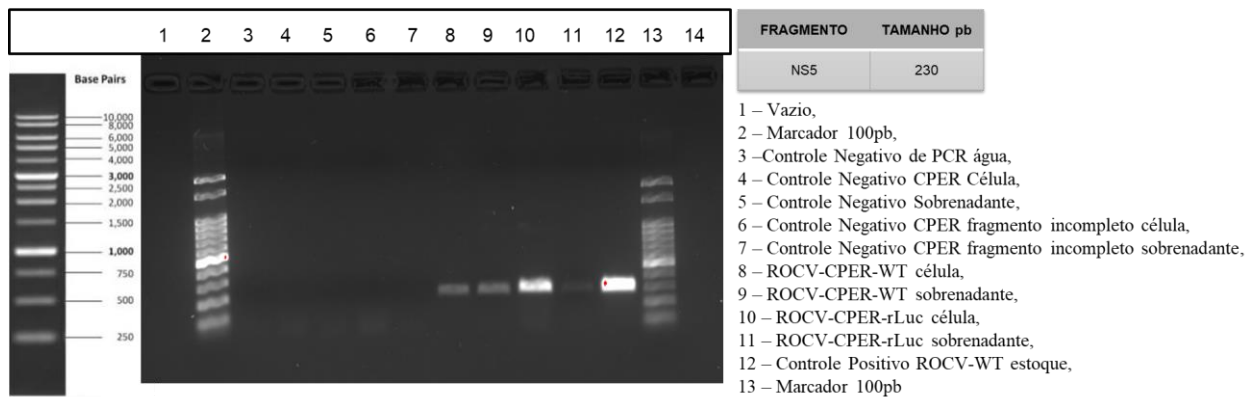
Estes *amplicons* foram posteriormente purificados por excisão do gel de agarose e utilizados na reação de circularização. Para a CPER utilizou-se a enzima Q5 Hot Start (NEB) e o produto obtido foi transfectado em cultura de células HEK293T, conforme apresentado na **Figura 18**.

**Figura 18:** Representação esquemática do processo de transfecção para a tentativa de construção de vírus recombinante Rocio carregando o gene da luciferase.



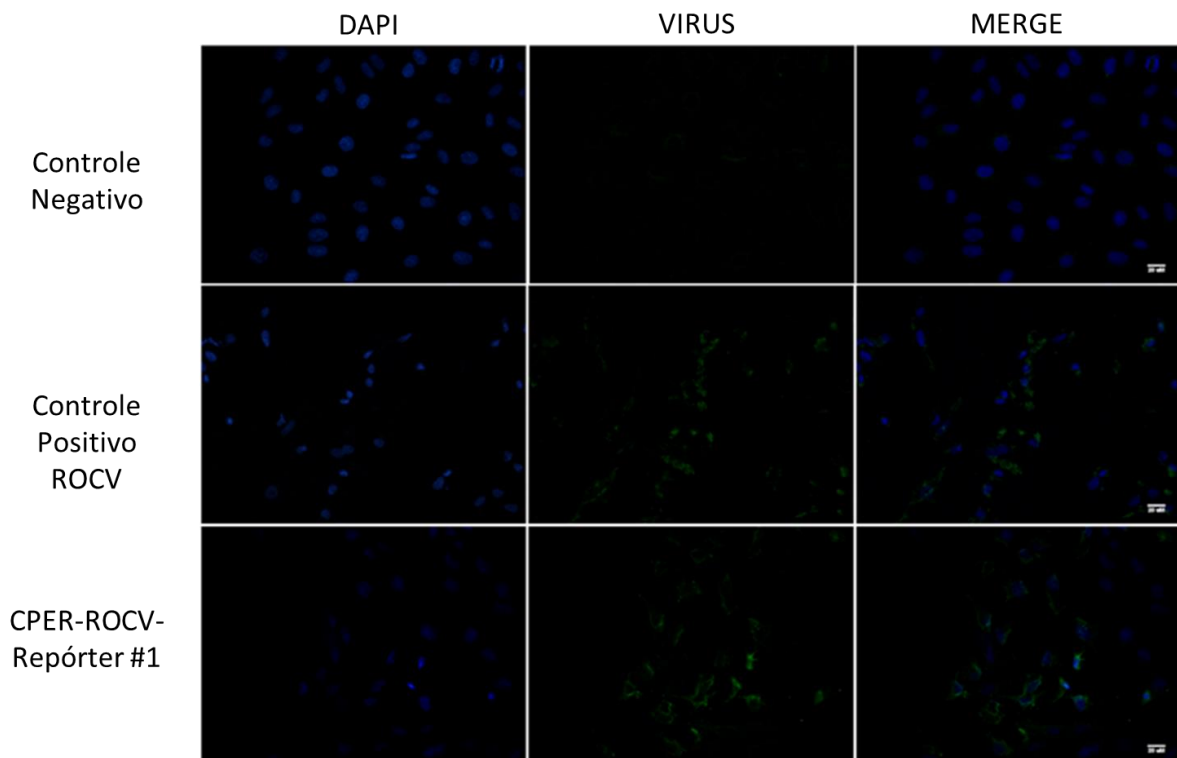
Desta forma, o protocolo inicialmente utilizado foi de circularização do DNA utilizando enzima Q5 Hot Start (NEB), com posterior transfecção do produto utilizando Lipofectamina LTX em cultura de células HEK. A transfecção foi realizada seguindo recomendações do fabricante, incubada a 37°C por 16 horas, teve o meio descartado e monocamada de células lavadas, com posterior adição de 2 mL de meio DMEM novo. Então a monocamada de células transfectada foi incubada por 5 dias, quando coletou-se o sobrenadante. O produto foi submetido a RT-PCR para confirmar a presença do genoma viral, o que indica o sucesso na produção das partículas virais recombinantes. Deste teste, os *amplicons* podem ser observados na **Figura 19**.

**Figura 19:** Eletroforese em gel de agarose. *Amplicons* dos produtos de transfecção da tentativa de construção de vírus recombinante Rocio carregando o gene da luciferase.



Na etapa seguinte, o produto da transfecção foi utilizado para infecção de células VERO e nelas pesquisou-se por antígenos virais por imunofluorescência, como observado na **Figura 20**. A presença de antígenos virais é indicativa da replicação do vírus.

**Figura 20:** Imunofluorescência Indireta para busca por antígeno viral do vírus CPER-ROCV-Repórter, produto da tentativa de construção do vírus recombinante Rocio carregando gene da luciferase.

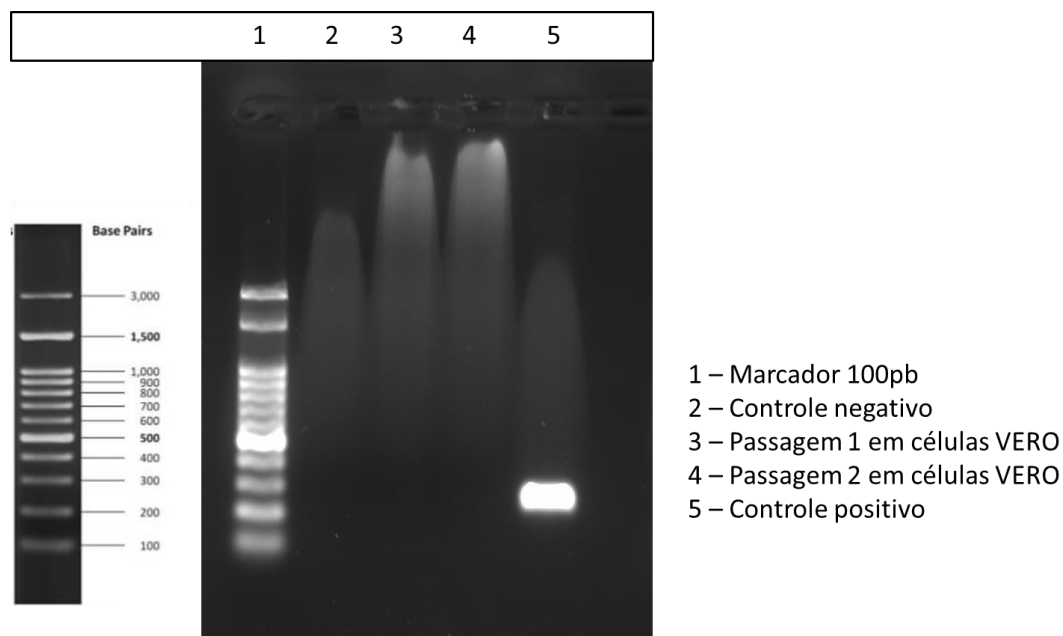


Para a primeira passagem em cultura de células para expansão da cultura de vírus, titulação e análise da expressão do gene repórter, 500uL do produto de transfecção infectou monocamada de células VERO. O produto da transfecção, mostrou-se incapaz de infectar



células, gerando novas partículas virais infectivas, **Figura 21**. Os experimentos foram repetidos por 4 vezes, obtendo os mesmos resultados negativos. Portanto, não foi possível expressar o gene repórter Renilla Luciferase no vírus Rocio utilizando esta abordagem.

**Figura 21:** Eletroforese em gel de agarose. *Amplicons* dos produtos de passagens em cultura de células VERO.



## 6.2. Construção de vírus Rocio recombinante carregando gene repórter

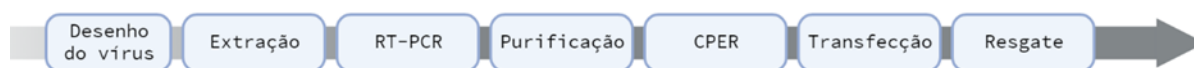
Para fazermos novas abordagens consideramos estudos indicando construções em que o gene repórter é inserido no gene do capsídeo viral de Flavivirus com otimização por uma segunda sequência do capsídeo completa, apresentada após o gene repórter (101). Esta otimização trata-se da alteração da sequência de bases sem alterar a sequência de aminoácidos, mantendo a correta produção de proteína viral. Esta abordagem previne interações por ciclização em sítios errados do genoma, uma vez que a primeira porção do capsídeo participa das interações que permitem a ligação da região 5'UTR a 3'UTR do vírus, aumentando estabilidade genética (68, 79).

Na Universidade de Queensland, Austrália, realizamos novas abordagens experimentais, para construção de vírus Rocio recombinante repórter inserido no gene do capsídeo viral parcialmente ou totalmente otimizado. Nosso trabalho foi desenvolvido em 4 etapas: construção do vírus Rocio WT, construção do vírus repórter, resgate do vírus e expressão do gene repórter.

### 6.2.1. Construção do vírus Rocio WT

ROCV já estabelecido, armazenado e sequenciado no laboratório australiano foi utilizado como molde para construção de vírus recombinante. Na primeira etapa, construímos o vírus Rocio *Wild Type* (WT) por CPER, conforme fluxo de trabalho resumido na **Figura 22**.

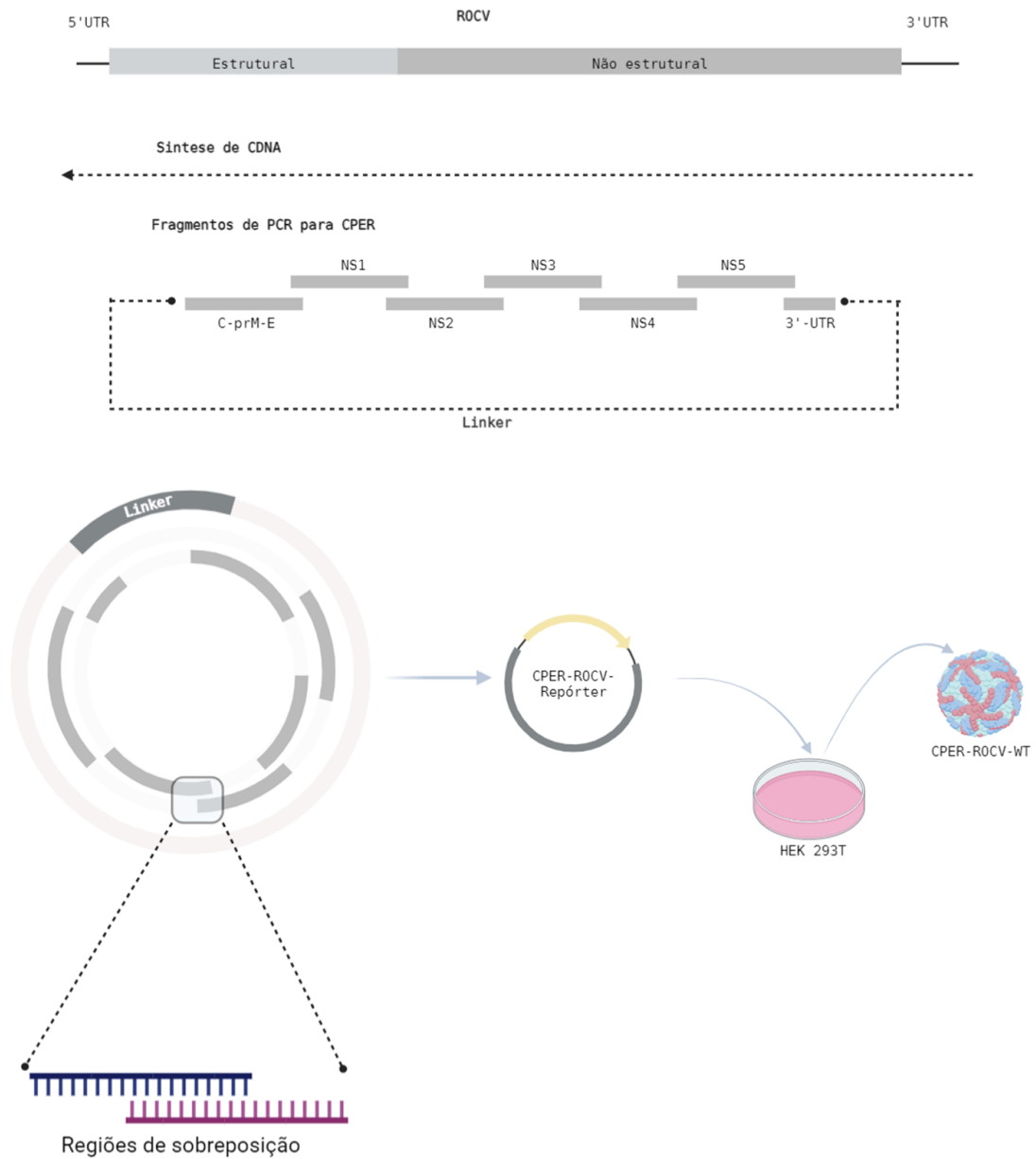
**Figura 22:** Representação esquemática da sequência de trabalho realizado para construção de vírus recombinante.



**FONTE:** Autoria própria.

Para esta construção utilizamos metodologia e *primers* já descritos por Amarilla e colaboradores(90). Os *primers* construíram fragmentos de DNA que perfazem todo o genoma viral, com regiões de sobreposição entre si. Também, obtivemos por PCR fragmento (*linker*) que liga as regiões 5'UTR e 3'UTR do vírus. Representação destes fragmentos é mostrada na **Figura 23**.

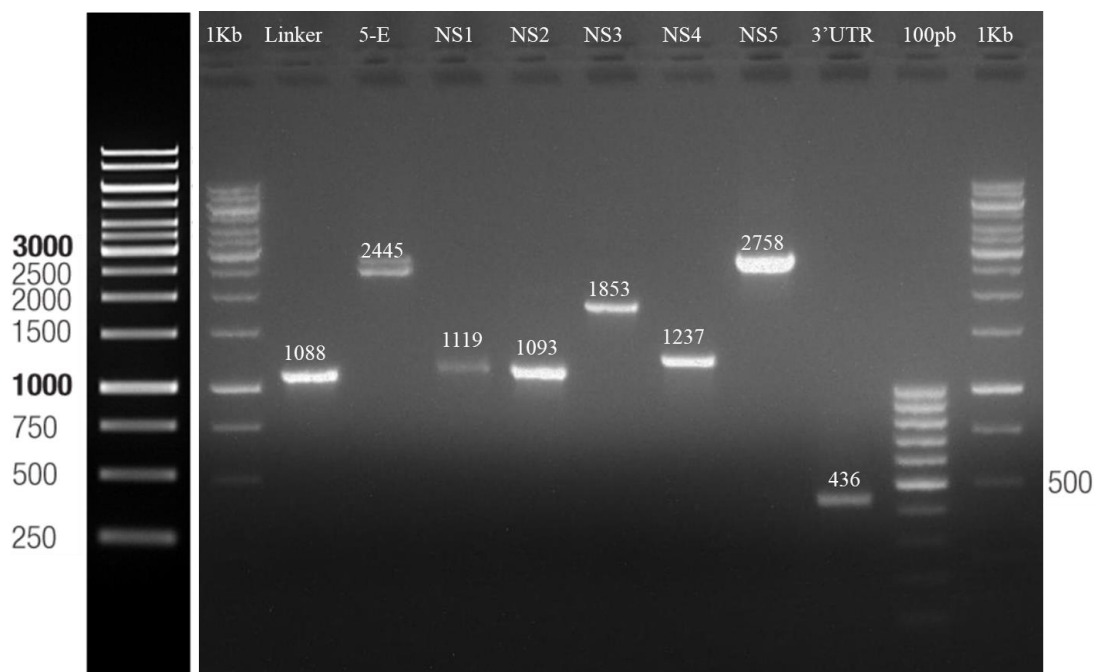
**Figura 23:** Representação do genoma do vírus Rocio e dos fragmentos de DNA gerados para a produção de vírus CPER-ROCV-WT por CPER.



**FONTE:** Autoria própria.

Para tanto, ROCV teve extraído seu RNA total por Trizol LS (Ambion). Com o kit SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) este RNA foi submetido a transcrição reversa com *primers* randômicos produzindo cDNA. A PCR foi realizada com kit PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara) e os *amplicons* foram purificados com kit Monarch DNA gel extraction (BioLabs). Os *amplicons* purificados, com seus respectivos tamanhos, são mostrados na **Figura 24**.

**Figura 24:** Eletroforese em gel de agarose. Amplicons do genoma parcial de CPER-ROCV-WT.

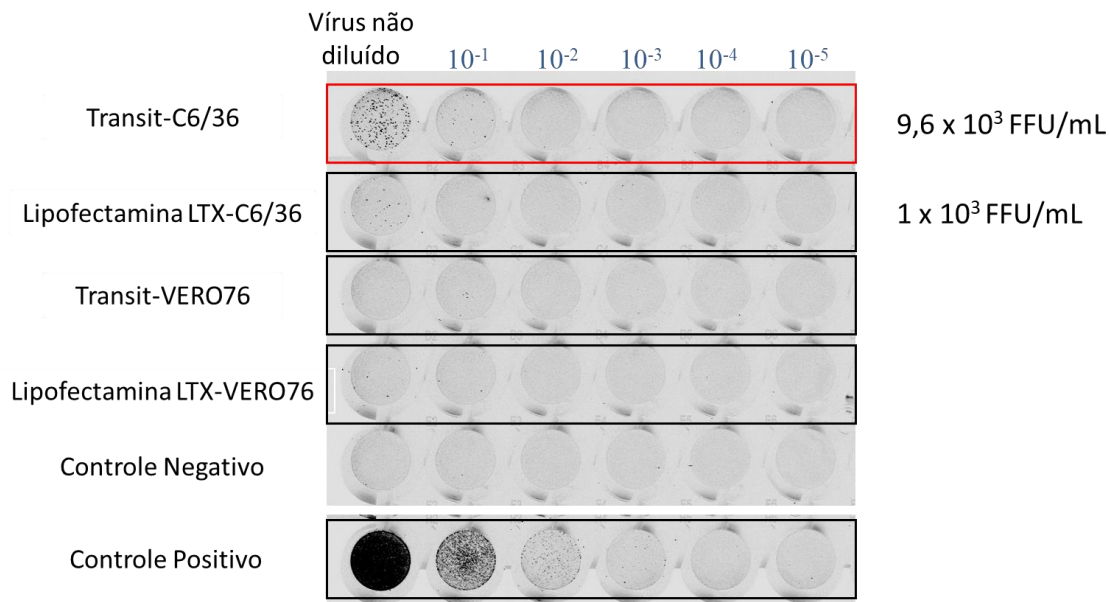


Gel com *amplicons* para os fragmentos do vírus Rocio WT.

Obtidos os *amplicons* que perfazem todo o genoma viral, incluindo regiões de sobreposição, fez-se a reação de circularização (CPER). A reação foi realizada com kit PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara) e 0,1pmol de cada fragmento de DNA, incluindo o *Linker*. Para circularização a reação teve 13 minutos de extensão. Em seguida, o DNA circularizado foi transfectado em células HEK293T utilizando 2 diferentes reagentes de transfecção, TransIT®-LT1 (Mirus) e Lipofectamina LTX (Invitrogen). Culturas de células transfectadas foram incubadas *overnight* a 37°C e posteriormente teve seu sobrenadante transferido cultura de células C6/36 ou VERO76. Estas colônias celulares foram incubadas por mais 5 dias buscando pelo aparecimento de efeito citopático. Após 5 dias de infecção, o sobrenadante foi colhido e armazenado a -80°C e uma alíquota foi titulada, como mostra a **Figura 25**.

O vírus CPER-ROCV-WT exibiu título  $9,6 \times 10^3$  FFU/mL em células C6/36, com uso de reagente TransIT®-LT1 (Mirus) e  $1 \times 10^3$  FFU/mL em células C6/36, com uso de reagente Lipofectamina LTX (Invitrogen). Não se observou produção de vírus infectivo em células VERO76 utilizando ambos os reagentes de transfecção.

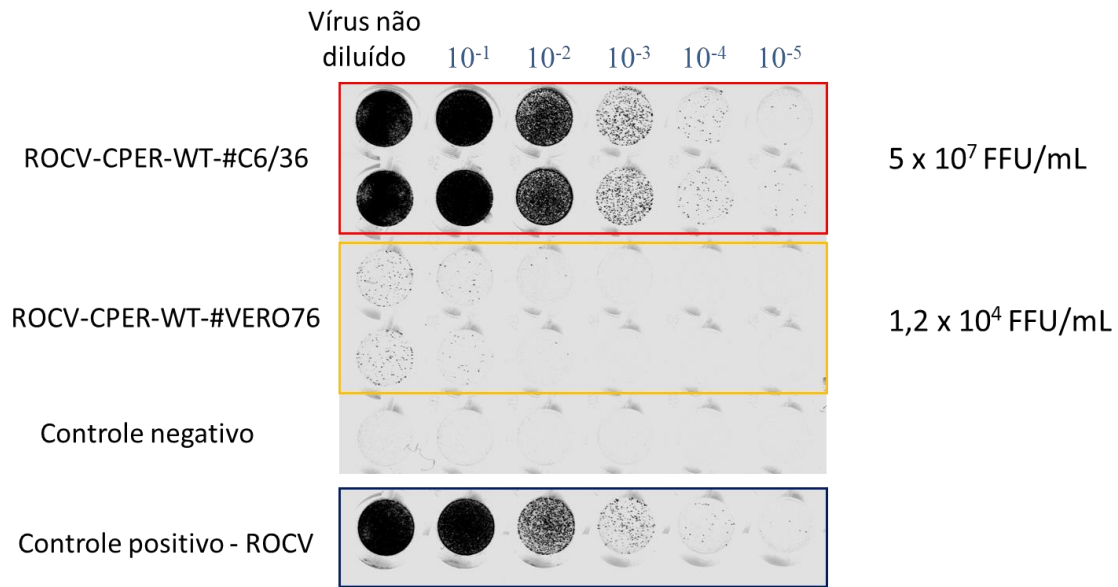
**Figura 25:** Titulação do vírus CPER-ROCV-WT construído por CPER. Primeira etapa de padronização. Vírus obtido por transfecção de células HEK 293T com uso de dois diferentes kits de transfecção, TransIT®-LT1 (Mirus) e Lipofectamina LTX.



Os resultados indicam que o uso do reagente de transfecção TransIT®-LT1 (Mirus) apresentou resultados mais promissores, com maior sucesso de transfecção e resgate de vírus em maior título. A linhagem celular C6/36 com vírus transfectado, mostrou maior produção de vírus infectivo.

Também, fez-se uma diferente ciclagem térmica para a circularização do genoma viral. Fez-se nova reação de CPER com 7 minutos de extensão. O produto total da CPER foi transfectado em cultura de células HEK293T e incubado por 24 horas, com posterior infecção de células C6/36 e VERO76. Após 5 dias de infecção o sobrenadante foi titulado por foco-fluorescência apresentou título de  $5 \times 10^7$  FFU/mL. Fotos desta titulação podem ser observadas na **Figura 26**.

**Figura 26:** Titulação do vírus CPER-ROCV-WT construído por CPER. Segunda etapa de padronização.

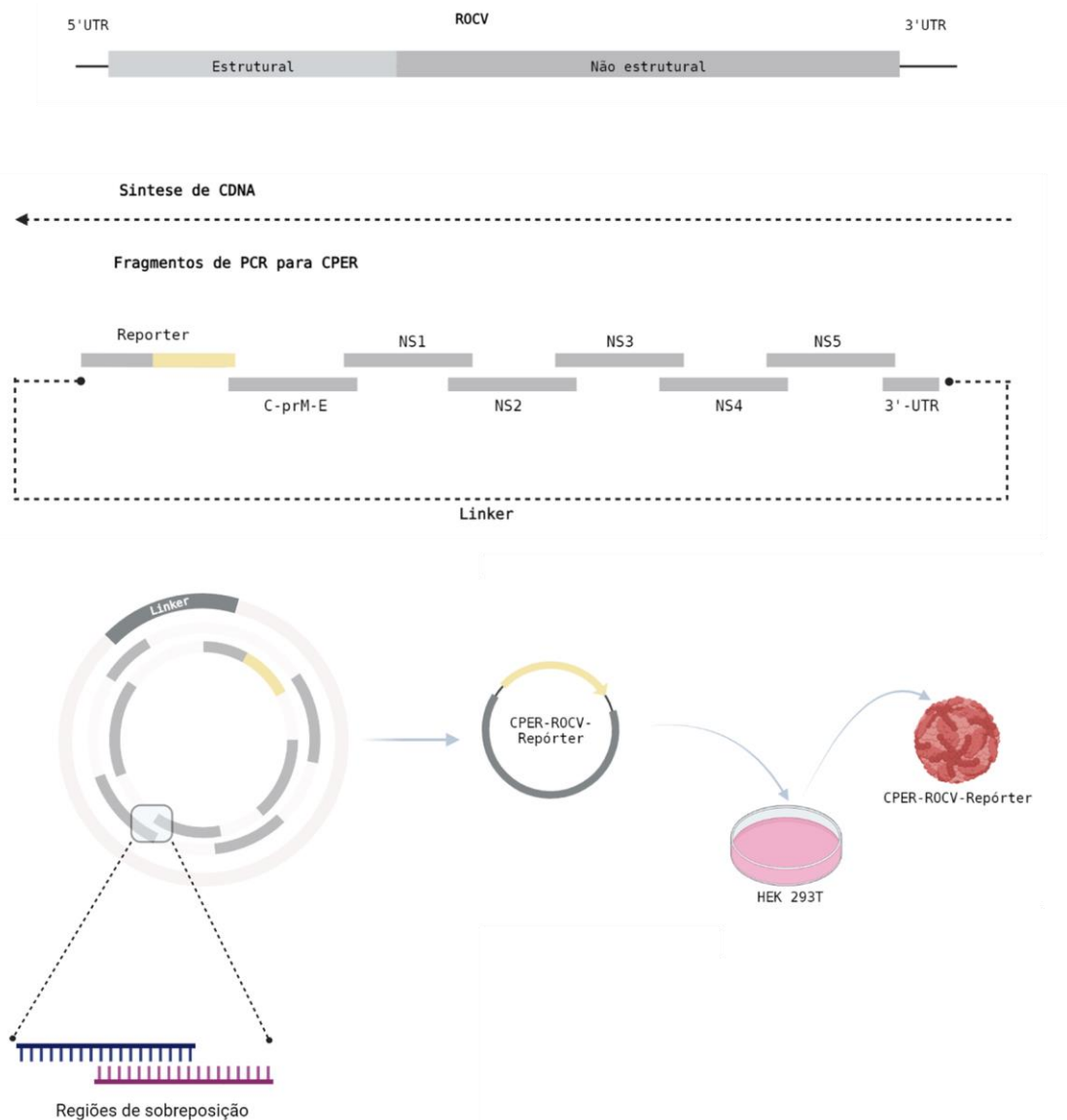


Reduzindo o tempo de extensão, de 13 para 7 minutos, observou-se aumento do título viral e, portanto, maior produção de vírus infeccioso em células C6/36. Desta forma, estabelecemos a metodologia para produção de vírus Rocio recombinante repórter por CPER, utilizando 7 minutos para extensão do DNA, transfecção de células HEK293T com reagente TransIT®-LT1 (Mirus), e incubação a 37°C *overnight*, com posterior infecção de células C6/36. A metodologia a ser empregada na construção de vírus mostrou que havia integridade e funcionamento dos fragmentos de DNA na produção de vírus. Grande volume de DNA para cada fragmento foi produzido e utilizado na construção dos vírus utilizados no estudo.

## 6.2.2. Construção do vírus Rocio repórter

Na construção dos vírus repórter, as etapas estão representadas na **Figura 27**.

**Figura 27:** Representação do genoma do vírus Rocio e dos fragmentos de DNA gerados para a produção de vírus apresentando genes repórter por CPER.

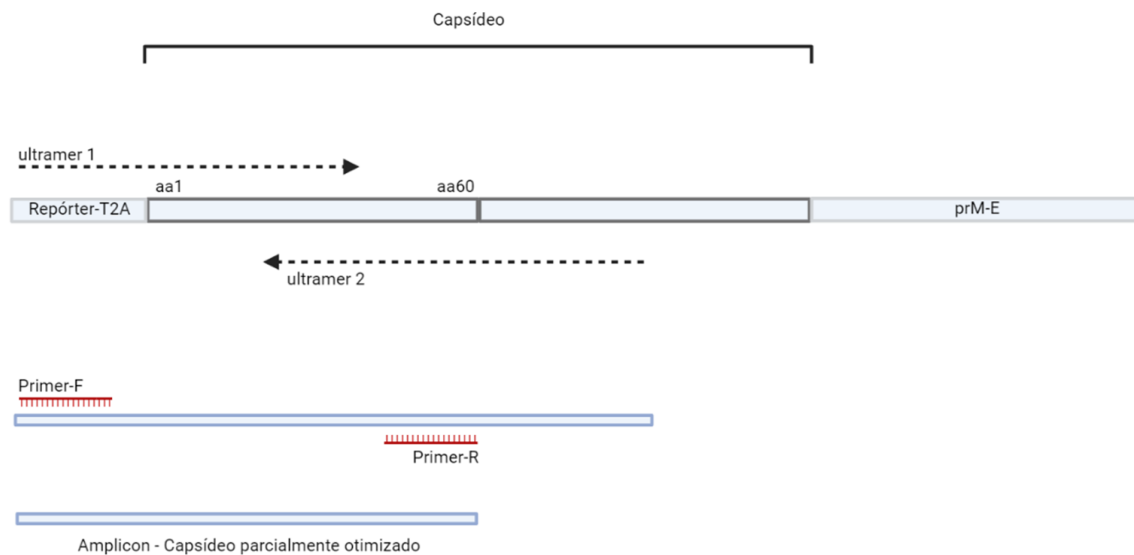


Fonte: autoria própria

Primeiramente, produziram-se fragmentos das regiões genômicas que codificam para proteínas não estruturais e região 3'UTR com os *amplicons* feitos para a construção do vírus WT. Para as regiões anteriores a NS1 foram desenhados novos conjuntos de *primers* que permitiram obter fragmentos contendo o gene repórter e o capsídeo, parcialmente ou totalmente otimizado.

Para os vírus CPER-ROCV-RV1 e RV2, que apresentam capsídeo parcialmente otimizado, foram utilizados os *ultramers* 1 e 2 que apresentam sequência de nucleotídeos otimizada. A PCR dos *ultramers* 1 e 2, incluiu etapa de denaturação a 96°C por 15 segundos, seguida por 10 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos, 68°C por 1 minutos e etapa de extensão final de 96°C por mais 1 minuto. O produto obtido foi submetido a PCR de amplificação utilizando *primers* que produzem o *amplicon* com capsídeo otimizado até o nucleotídeo 60, como representado na **Figura 28**.

**Figura 28:** Representação esquemática de etapas para produção de fragmento contendo capsídeo parcialmente otimizado.

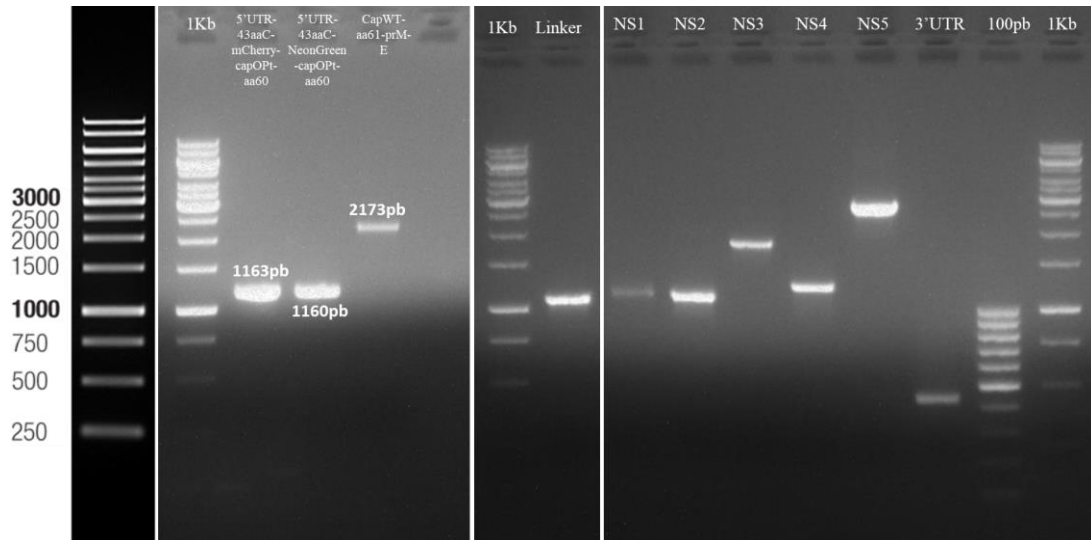


Fonte: autoria própria

O fragmento do capsídeo otimizado foi unido ao fragmento contendo 5'UTR e os primeiros 43 aminoácidos do capsídeo WT, em uma reação de *overlap*, seguida de PCR para amplificação e purificação por excisão de banda em gel de agarose. Em seguida, fragmento contendo a parte restante do capsídeo WT e as proteínas estruturais prM e E foram produzidos. Todos os *amplicons* utilizados para produção dos vírus CPER-ROCV-RV1 e RV2 são apresentados na **Figura 29**.

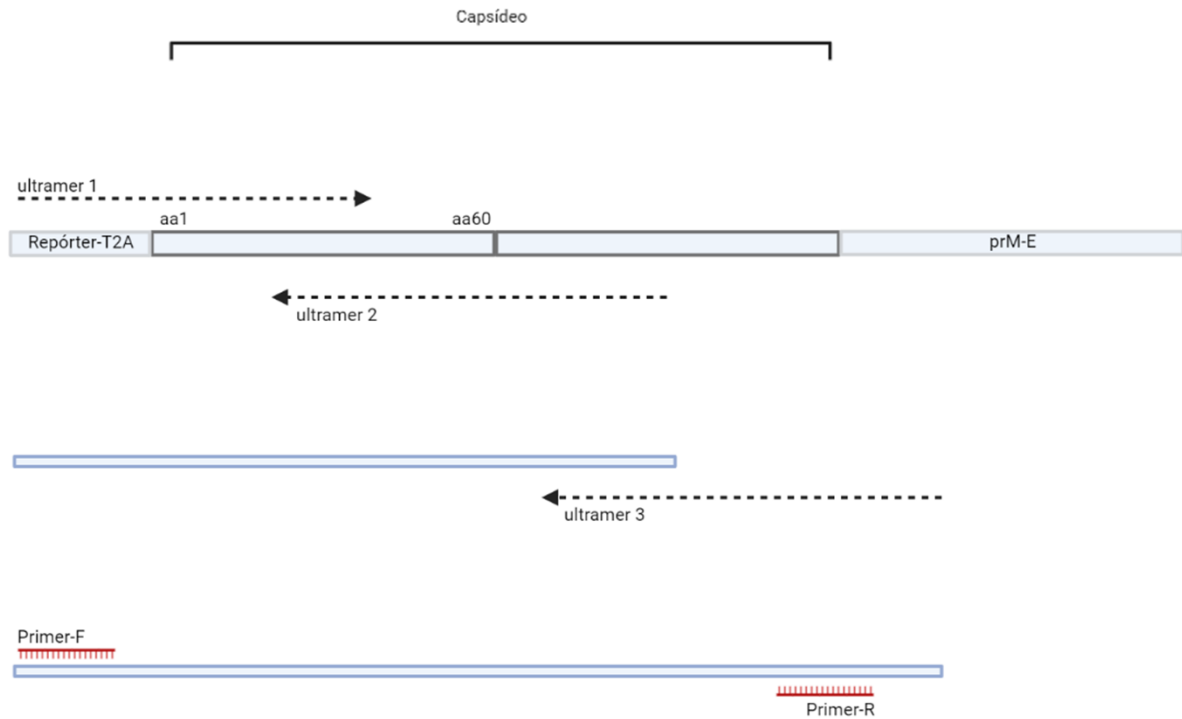


**Figura 29:** Eletroforese em gel de agarose contendo todos os fragmentos para produção de vírus CPER-ROCV-RV1 e RV2.



Os vírus CPER-ROCV-RV3 e RV4, que apresentam a sequência do capsídeo completamente otimizada até o nucleotídeo 60, foram submetidos a PCR contendo o *ultramer* 3, na ausência de *primers*, com etapa de denaturação de 96°C por 15 segundos, seguida de 10 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos, 68°C por 1 minutos e etapa de extensão final de 96°C por mais 1 minuto. O produto obtido foi submetido a PCR com *primers* que produzem *amplicon* contendo capsídeo totalmente otimizado, como representado na **Figura 30**.

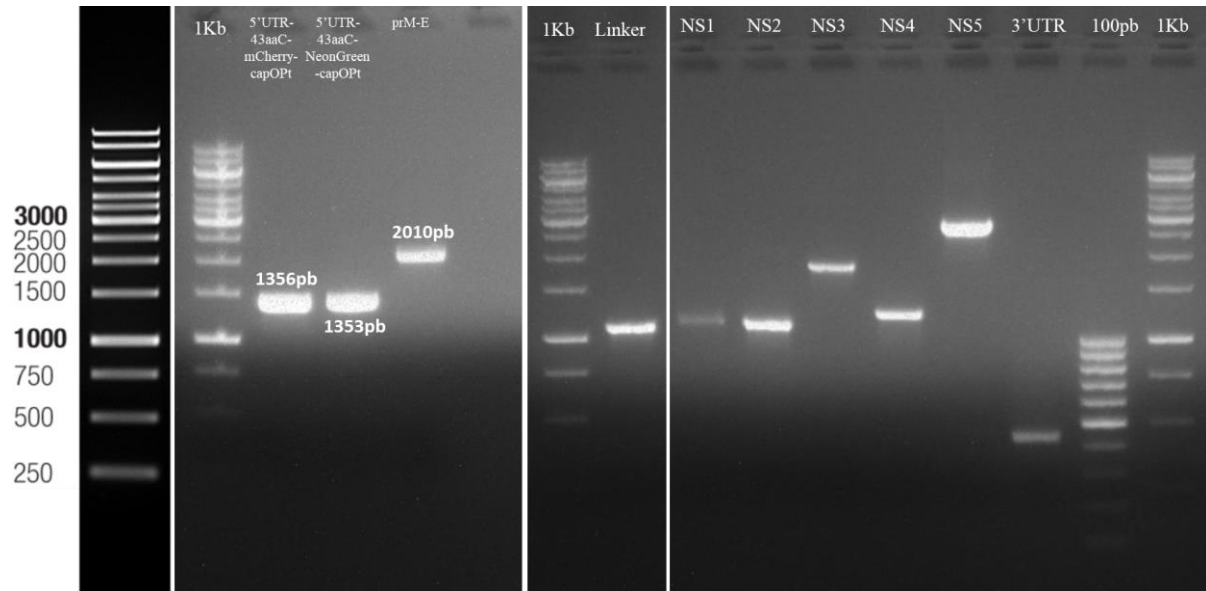
**Figura 30:** Representação esquemática de etapas para produção de fragmento contendo capsídeo totalmente otimizado.



Fonte: autoria própria

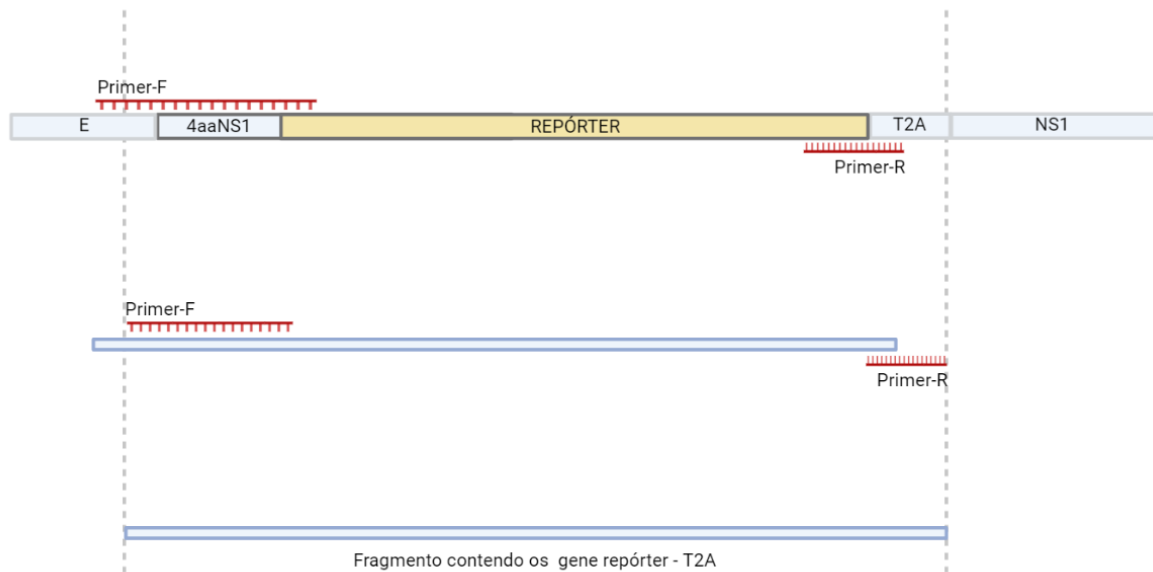
O fragmento do capsídeo otimizado foi submetido a reação de *overlap* sendo unido ao fragmento 5'UTR e os primeiros 43 aminoácidos do capsídeo WT. Em seguida o produto de *overlap* foi amplificado por PCR e purificado por excisão de banda em gel de agarose. Em seguida, também, produziu-se fragmento contendo as proteínas estruturais prM e E. Todos os fragmentos utilizados para produção dos vírus CPER-ROCV-RV2 e RV3 são apresentados na **Figura 31**.

**Figura 31:** Eletroforese em gel de agarose contendo todos os fragmentos para produção de vírus CPER-ROCV-RV3 e RV4.



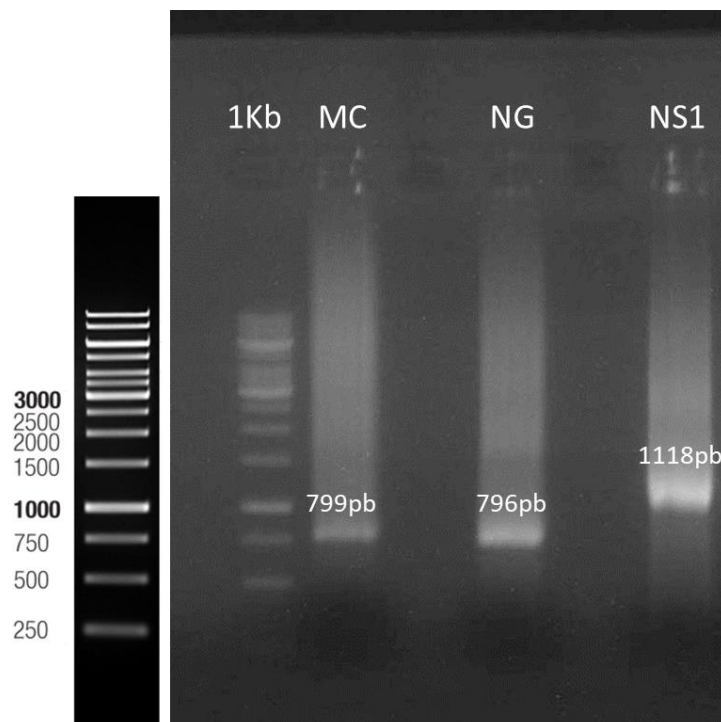
A construção dos vírus CPER-ROCV-RV5 e RV6, que apresentam o gene repórter após a proteína do envelope, foi feita com 2 PCRs. Estas, utilizaram *geneblock* como *template* e *primers* para amplificação do fragmento do gene repórter por adição das regiões de sobreposição. Na região 5' do fragmento os *primers* permitiram adicionar 12 aminoácidos da NS1, com sequência otimizada e região de sobreposição na proteína do envelope. A representação da metodologia está representada na **Figura 32**.

**Figura 32:** Representação esquemática de etapas para produção de fragmento contendo gene repórter para os vírus CPER-ROCV-RV5 e RV6 .



Em seguida foi produzido o fragmento contendo 5'UTR-C-prM-E e fragmento para NS1. Estes fragmentos podem ser observados na **Figura 33**.

**Figura 33:** Eletroforese em gel de agarose contendo Amplicons para produção dos vírus CPER-CROV-RV5 e RV6.



Para o vírus contendo HiBiT-Tag como repórter, foi utilizado *ultramer* com sequência do HiBiT-tag. Para tanto, fez-se PCR com *primers* específicos e *ultramer* contendo toda a sequência do repórter HiBiT-Tag. Representação desta metodologia pode ser observada na **Figura 34**.

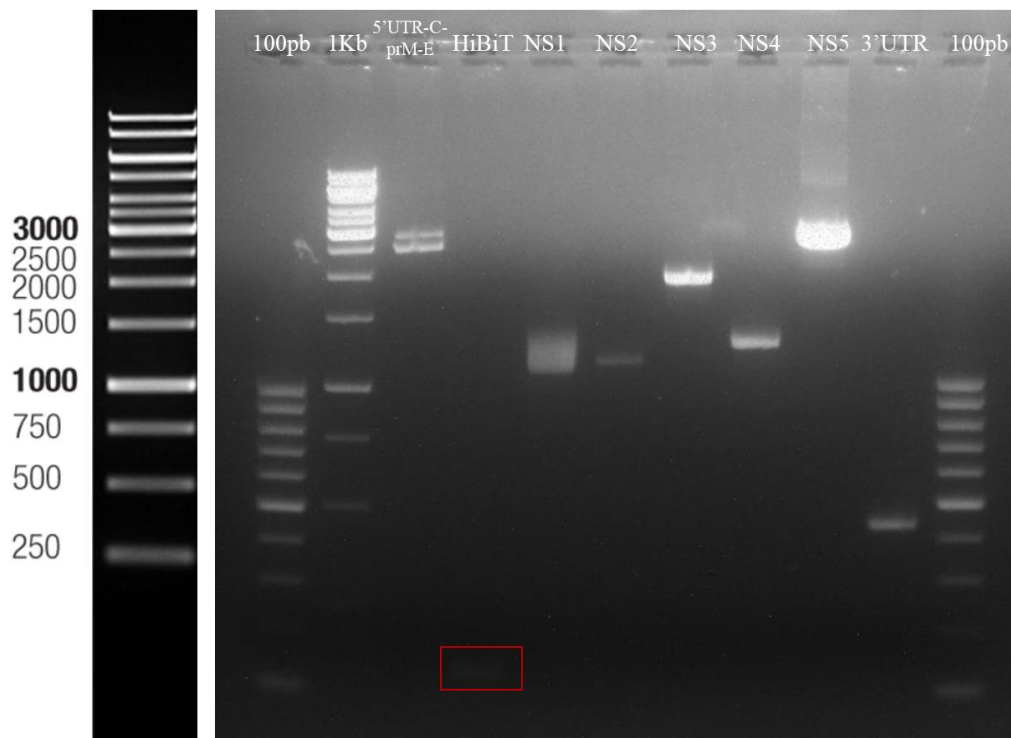
**Figura 34:** Representação esquemática de etapas para produção de fragmento contendo gene repórter para os vírus CPER-ROCV-RV7.



**Fonte:** Autoria própria

Também, produziu-se o fragmento 5'UTR-prM-E e NS1, para completar todos os fragmentos necessários à produção do vírus CPER-ROCV-RV7. O fragmento HiBiT-Tag é apresentado na **Figura 35**.

**Figura 35:** Eletroforese em gel de agarose contendo todos os *amplicons* para produção dos vírus CPER-CROV-RV7.



Após a produção de todos os fragmentos de PCR para construção dos 7 distintos vírus repórter, seguindo a padronização realizada com o vírus controle CPER-ROCV-WT, estes fragmentos foram utilizados na reação de circularização. Os produtos da CPER foram transfectados em células HEK293T, incubados *overnight* e os sobrenadantes utilizados para infecção de culturas de células C6/36.

### 6.2.3. Resgate

Decorridos 5 dias pós-infecção em cultura de células C6/36, os sobrenadantes dos vírus Rocio recombinantes foram colhidos e avaliados quanto à presença de partículas virais infectivas por focofluorescência.

Também, buscando aumentar os títulos de vírus em todas as construções apresentadas, fez-se uma passagem em cultura de células C6/36. Para isto, 1mL de vírus foi inoculado em garrafa de cultura de 75cm<sup>2</sup> e incubou-se por 7 dias, quando foi colhido e novamente titulado o vírus por focofluorescência.

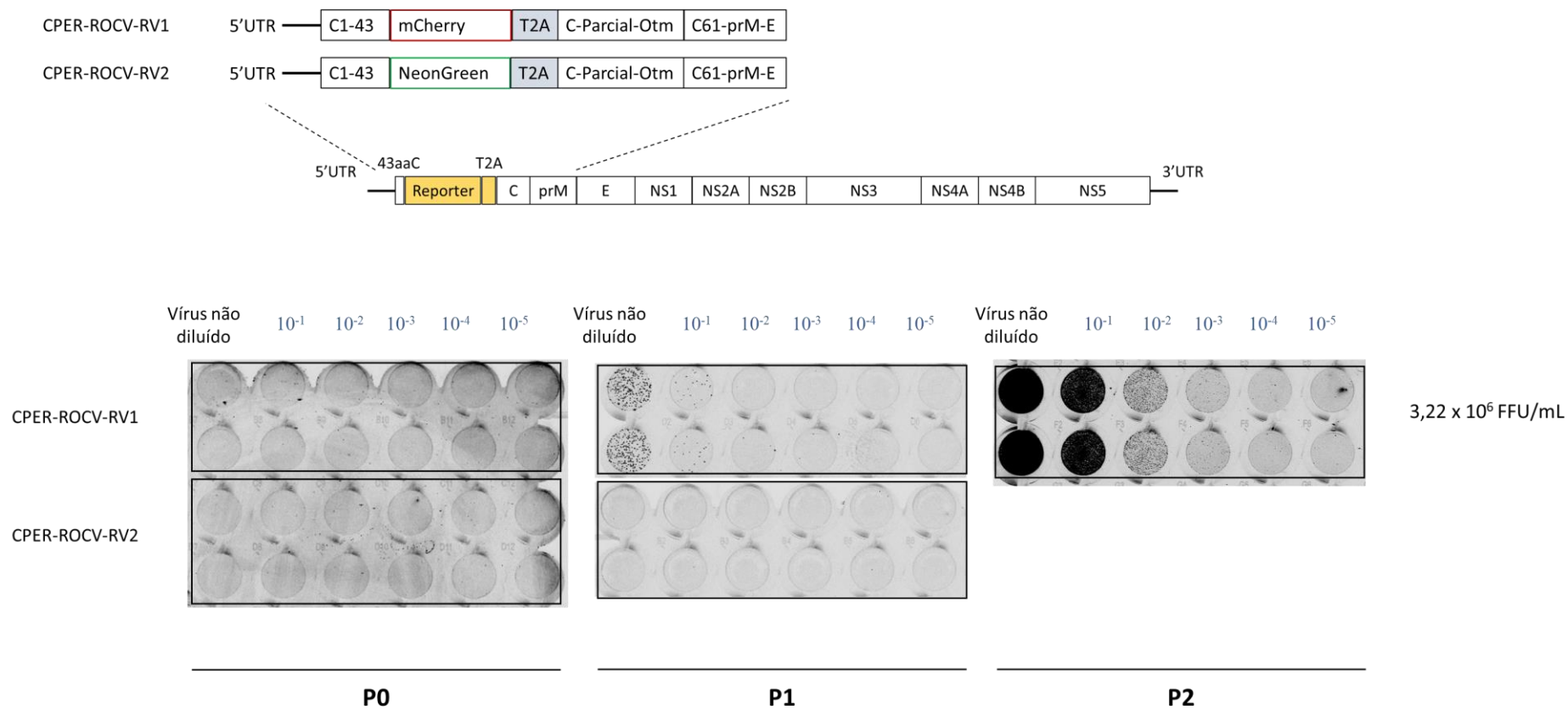
Para o vírus CPER-ROCV-RV1 fez-se uma segunda passagem em células C6/36 e avaliou-se por focofluorescência.

Fotos das placas, mostrando *plaques* produzidos por partículas virais infectivas e títulos virais (FFU/mL) são apresentados nas **Figuras 36, 37, 38 e 39**. Os resultados indicam o sucesso na produção e resgate dos vírus CPER-ROCV-RV1, RV3, RV4 e RV7. Na **Tabela 2** podem ser observados os seus respectivos títulos e passagens em cultura de células.

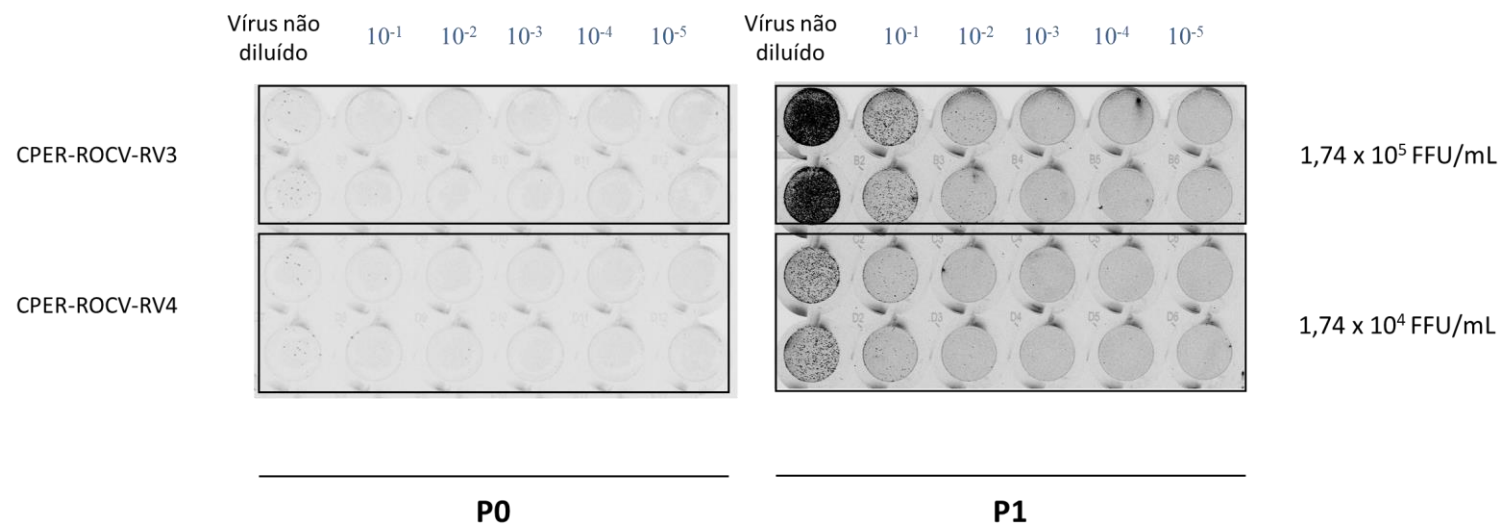
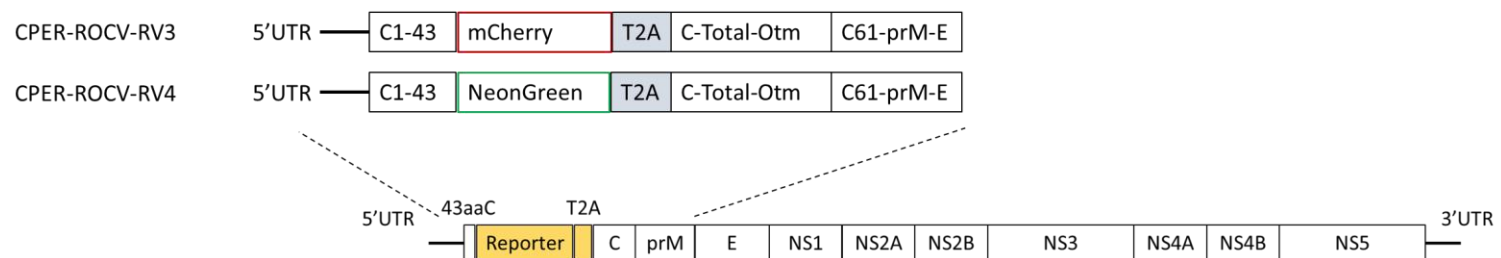
**Tabela 2:** Vírus repórter produzidos. A tabela apresenta seus respectivos genes, passagem em cultura de células, linhagem celular e título de vírus infeccioso.

Vírus	Gene repórter	Passagem n°	Cultura de Células	Título
<b>CPER-ROCV-RV1</b>	mCherry	2	C6/36	3,22 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL
<b>CPER-ROCV-RV3</b>	mCherry	1	C6/36	1,74 x 10 <sup>5</sup> FFU/mL
<b>CPER-ROCV-RV4</b>	mNeonGreen	1	C6/36	1,74 x 10 <sup>4</sup> FFU/mL
<b>CPER-ROCV-RV7</b>	HiBiT-Tag	1	C6/36	8 x 10 <sup>3</sup> FFU/mL

**Figura 36:** Representação esquemática e placas de titulação dos vírus CPER-ROCV-RV1 e RV2.

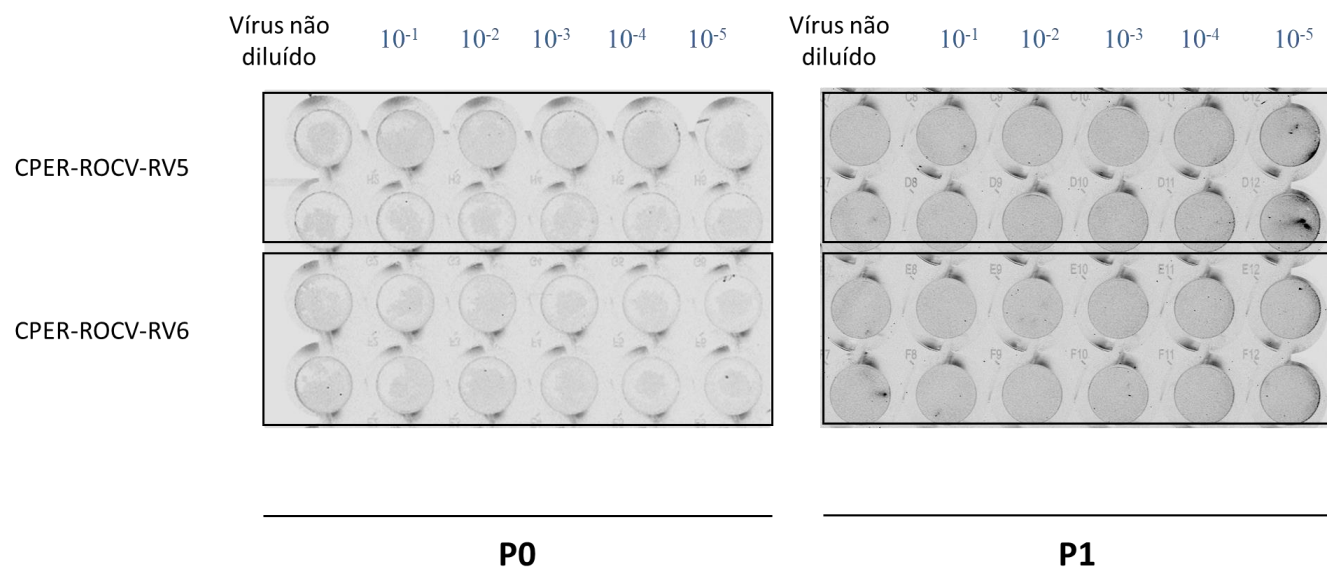
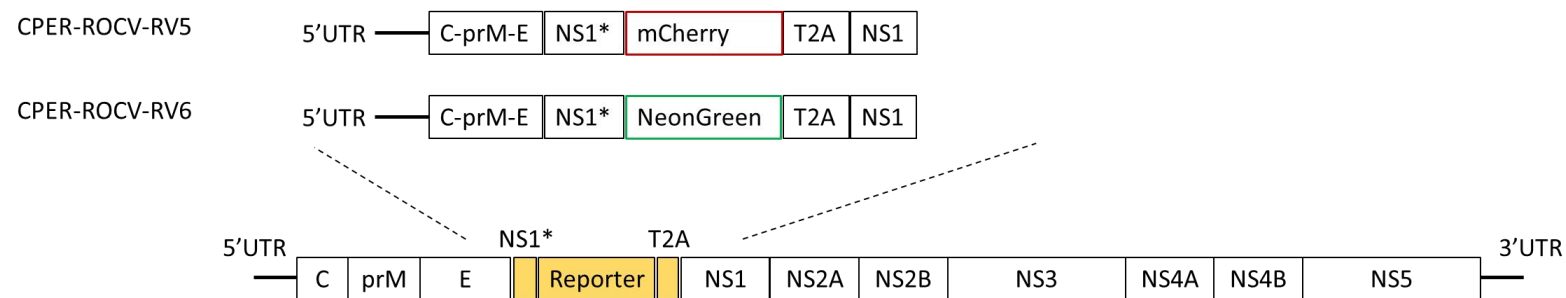


**Figura 37:** Representação esquemática e placas de titulação dos vírus CPER-ROCV-RV3 e RV4.

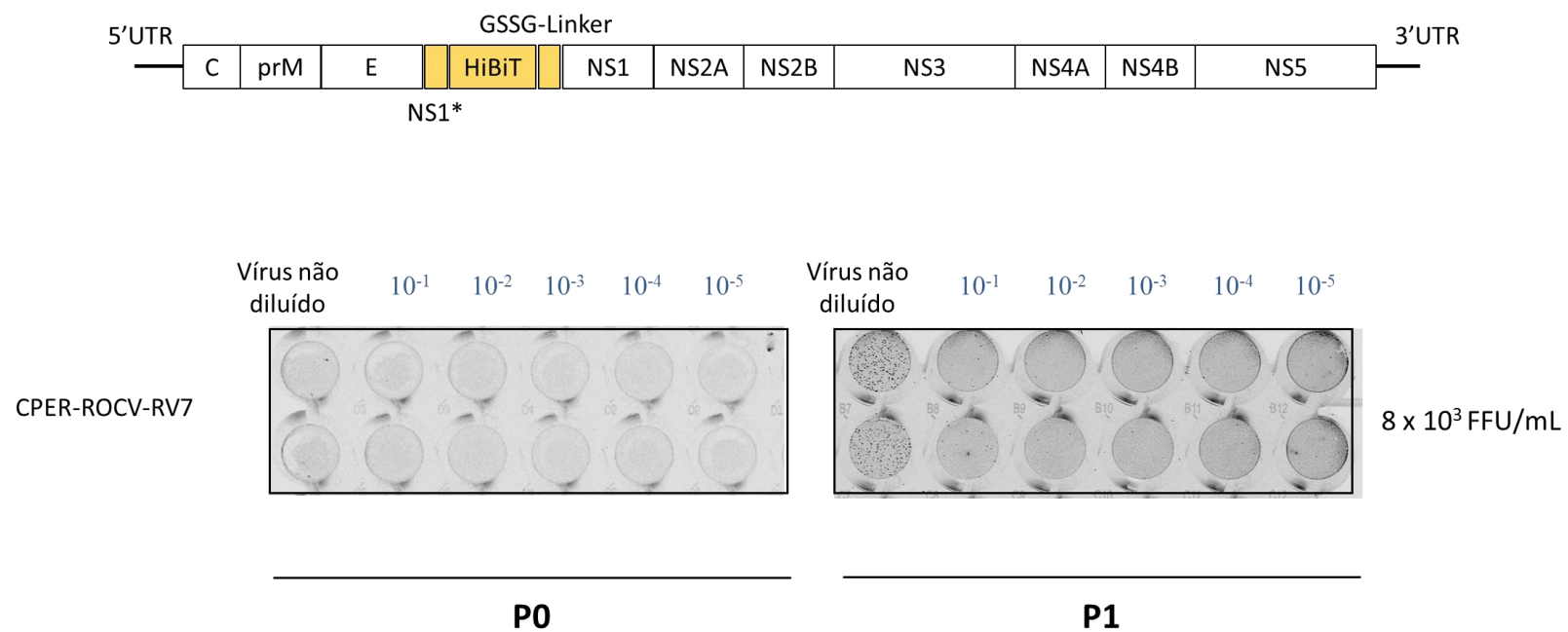




**Figura 38:** Representação esquemática e placas de titulação dos vírus CPER-ROCV-RV5 e RV6.



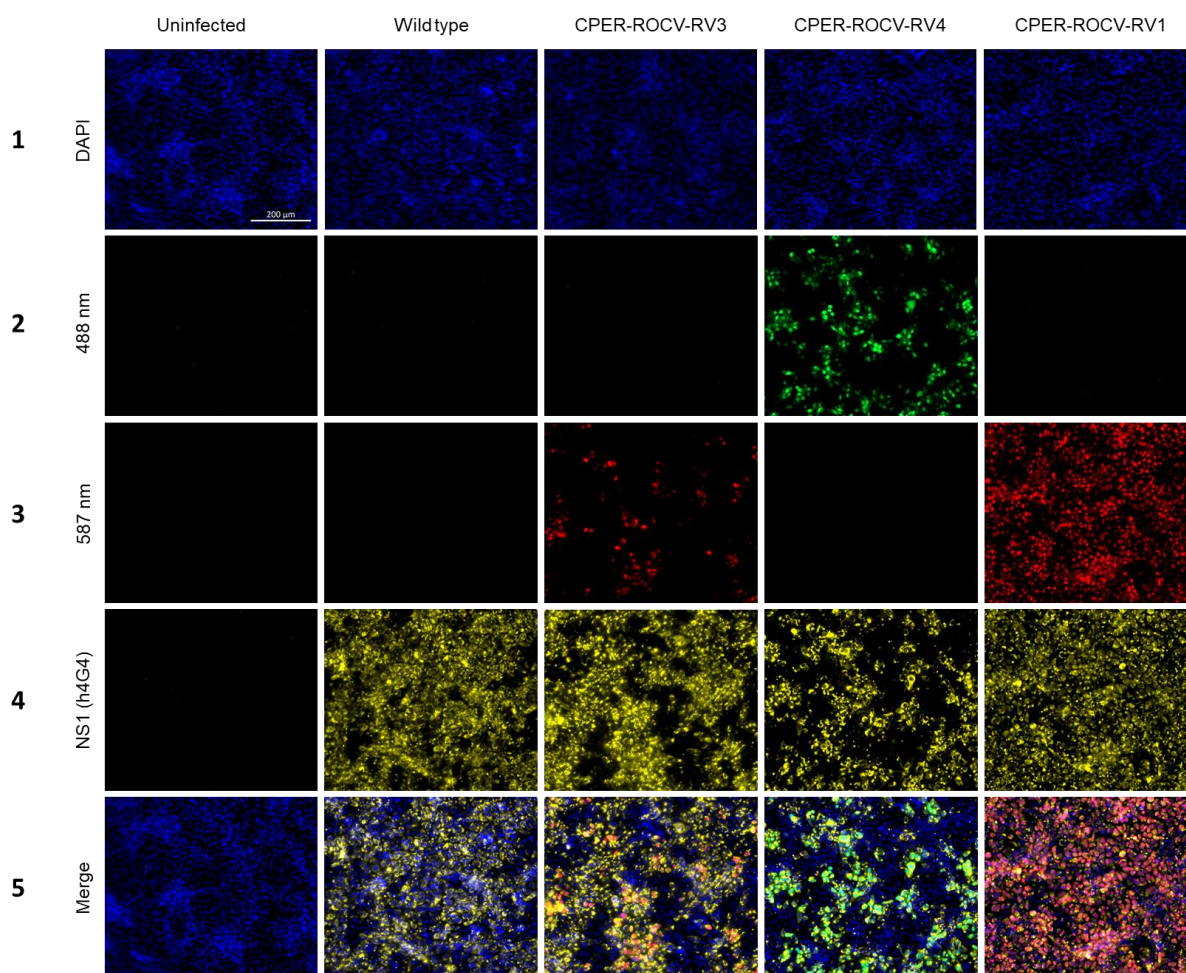
**Figura 39:** Representação esquemática e placas de titulação dos vírus CPER-ROCV-RV7.



#### 6.2.4. Expressão de gene repórter

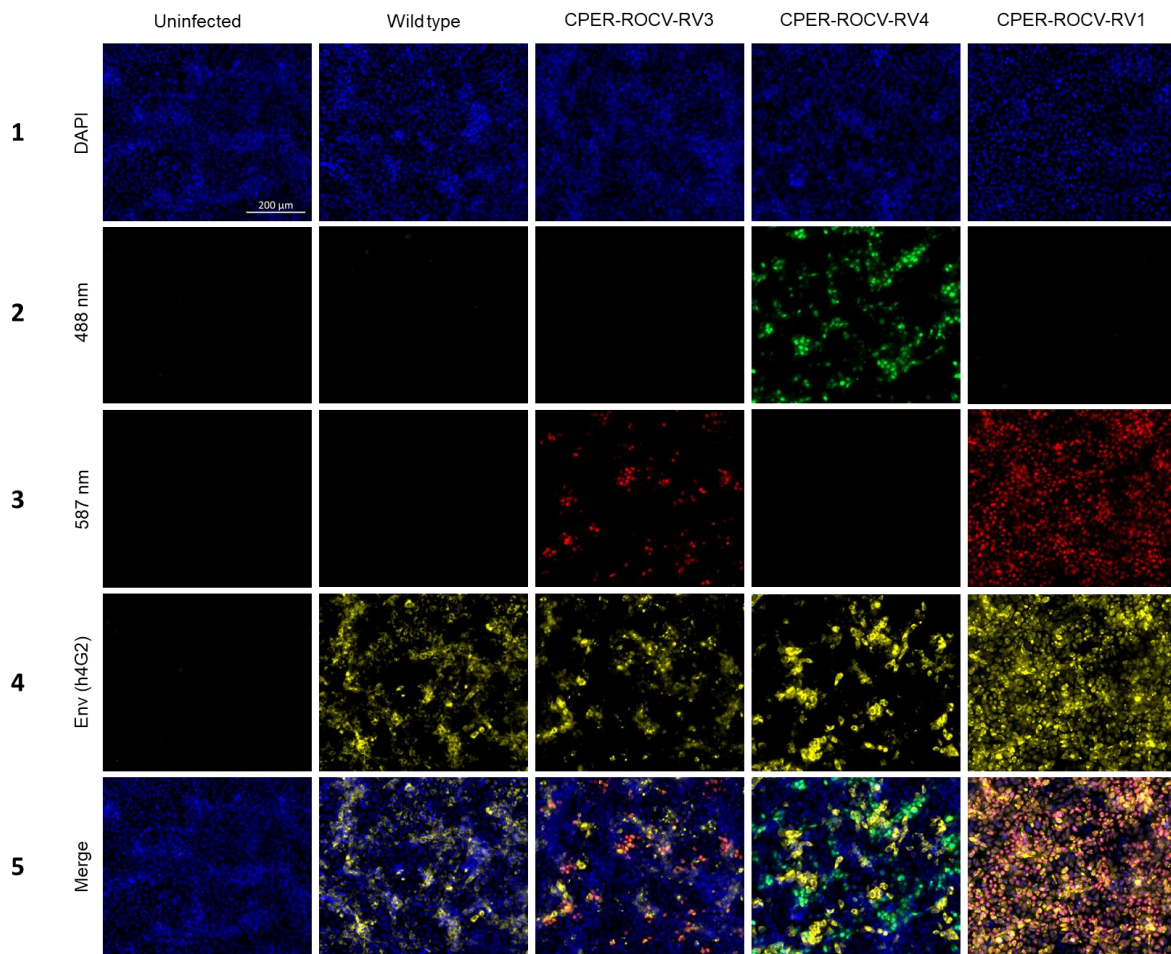
Após confirmar a presença de partículas virais infectivas oriundas de 4 das construções realizadas, avaliou-se a expressão dos genes repórteres mCherry e mNeonGreen. A expressão de mNeonGreen foi provada para o vírus CPER-ROCV-RV4, como apresentado nas **Figuras 40 e 41**. Também, a expressão de mCherry foi provada para os vírus CPER-ROCV-RV1 e RV3. Uma marcação para proteínas virais NS1 e E permitiu colocalizar células infectadas expressando os genes repórter. A presença de células com marcação apenas para proteína viral mostra células infectadas por vírus que não produzem o gene repórter, sugerindo possível deleção do gene exógeno.

**Figura 40:** Imunofluorescência indireta para os vírus CPER-ROCV-RV1, RV3 e RV4, marcando NS1 com anticorpo h4G4 e proteínas repórter.



**Legenda:** Linha 1, marcação para núcleo celular com DAPI (azul); Linha 2 marcações para expressão de mNeonGreen (verde), Linha 3 marcação para mCherry (vermelho), Linha 4 marcação para NS1 (amarelo), Linha 5 merge.

**Figura 41:** Imunofluorescência indireta para os vírus CPER-ROCV-RV1, RV3 e RV4, marcando Envelope viral com anticorpo h4G2 e proteínas repórter.



**Legenda:** Linha 1, marcação para núcleo celular com DAPI (azul); Linha 2 marcações para expressão de mNeonGreen (verde), Linha 3 marcação para mCherry (vermelho), Linha 4 marcação para proteína do envelope (amarelo), Linha 5 merge.

# DISCUSSÃO

## 7. DISCUSSÃO

Foi objeto deste trabalho o vírus Rocio, um Flavivirus brasileiro que produz epidemias com casos de infecção do sistema nervoso central humano que são muito graves, como foi evidenciado no Vale do Ribeira, SP, na década de 1970. Entretanto, achados soroepidemiológicos e encontros eventuais de indivíduos infectados com ROCV tem sido relatados, o que indica a circulação atual do vírus Rocio no Brasil, embora quase silenciosa. De forma geral, é comum que Flavivírus produzam doença febril aguda com sinais e sintomas muito semelhantes, causando erros de diagnóstico com conseqüente subnotificação da ocorrência de certas infecções, como observado com um caso fortuito de infecção aguda por Rocio durante surto de dengue em Goiânia entre os anos 2011 e 2013 (9). Em suma, é necessário aprimorar a vigilância epidemiológica para diagnosticar casos de infecção por vírus Rocio. É importante lembrar que os sistemas de saúde devem ficar atentos para o caso de reemergência do vírus Rocio causando novamente epidemias no Brasil.

Outros aspectos importantes relacionados ao vírus Rocio fazem importante que se estude melhor o microorganismo, sua estrutura, a fisiopatologia de suas infecções, o desenvolvimento de métodos diagnósticos e a pesquisa por compostos antivirais e vacinas. Nesse sentido, a presente Tese mostra como construímos uma importante ferramenta de detecção viral, um vírus Rocio marcado com substância facilmente detectável e que, por isso, deverá ajudar sobremaneira estudos com aqueles citados acima. Utilizando o vírus Rocio repórter poderão ser implementados estudos *in vivo* e *in vitro*.

O trabalho aqui descrito é basicamente ligado à produção em laboratório do vírus Rocio contendo gene repórter, o que, para tanto, utilizou 4 construções/*designs*. Foram produzidos vírus expressando gene mCherry, flanqueado por cópias do gene do capsídeo, sendo o capsídeo a jusante parcialmente otimizado; vírus expressando mCherry e mNeonGreen flanqueado por cópias do gene do capsídeo, sendo o capsídeo a jusante totalmente otimizado; e vírus modificado para a expressão do gene HiBiT-Tag, que produziu partículas virais infectivas, mas que ainda necessita de estudos para averiguar se houve expressão do gene repórter.

A genética reversa permite gerar vírus recombinantes a partir de seus cDNAs. Com essa tecnologia criamos nossos vírus Rocio repórter. Entretanto, sabemos que a presença da proteína repórter e as manipulações genéticas necessárias ao procedimento podem alterar as propriedades biológicas do vírus recombinante levando à sua atenuação *in vitro* e/ou *in vivo*.

Sabe-se que a manipulação genética de vírus e a inserção de genes exógenos prejudicam a produção de partículas virais infectivas. Aspectos importantes com relação a este problema são o tamanho do gene exógeno inserido, a região do genoma viral escolhida para a de inserção de gene exógeno e eventuais ocorrências de recombinação-mutações. No presente trabalho tivemos dificuldades relacionadas ao gene do capsídeo duplicado e à **otimização** da sequência nucleotídica do capsídeo viral.

Inicialmente, nossa estratégia foi inserir o gene da renilla luciferase com o sítio de autoclivagem FMV2A (996pb) entre duas cópias do gene do capsídeo viral. Também, inserimos os primeiros 34 aminoácidos do capsídeo, totalizando 1204 pb, o que representa aproximadamente 9,3% do genoma viral. Estudos indicam que vírus do porte do Rocio tolerariam inserções (que aumentam o tamanho do genoma viral) com até 11,15% do genoma. A inserção de genes grandes pode causar instabilidade genética que dificulta a recuperação e a manutenção do vírus mutante em cultura de células (95). O genoma, ssRNA(+) dos Flavivirus pode aumentar a instabilidade desses vírus durante múltiplas passagens em culturas de células, o que se acentua quando genes exógenos são inseridos ao genoma (102). Genes exógenos rompem elementos estruturais dos vírus, particularmente na codificação de suas proteínas estruturais. Vírus West Nile expressando GFP (que aumentaram 1.3kb em seu genoma) exibiram redução importante no título viral e perda da expressão do gene repórter após passagens sucessivas em cultura de células(8). Por outro lado, construções com gene inserido de tamanho reduzido, como fizeram Tamura e colaboradores com HCV exibiram estabilidade adequada(95). Naquele estudo avaliou-se a região de inserção do gene exógeno, colocando-se gene HiBiT-Tag no N-terminal de cada uma das proteínas virais. Os resultados indicaram que os vírus recombinantes apresentaram maior estabilidade, com replicação significativa, quando os genes foram inseridos em região N-terminal de E1, E2 e NS2.

Assim, para evitar instabilidade genética de nosso vírus Rocio repórter, inserimos os genes mCherry e NeonGreen, com apenas 891e 888pb, respectivamente. Esta redução, acompanhado de uma otimização da sequência nucleotídica do gene do capsídeo com aumento de 35 para 43aa, parecem ter contribuído para a estabilidade dos vírus produzidos. Ainda, buscando evitar instabilidade genética e aumentar a recuperação de vírus infectivos utilizamos o gene HiBiT-Tag como gene repórter em uma das construções(80). O gene HiBiT possui 2 subunidades de tamanhos diferentes, a primeira, inserida no genoma para ser expressa é HiBiT-Tag, com 11 aminoácidos. Para funcionar como uma proteína luminescente, HiBiT (1,3kDa) deve ser expressa na célula que, por sua vez, provê sua subunidade maior LgBiT (18 kDa). Dessa forma HiBiT e LgBiT ligam-se com alta afinidade, reconstituindo uma enzima ativa que



na presença do substrato gera um sinal luminescente(103). Esse sistema repórter já foi utilizado para construção de diferentes vírus, tais como vírus da Hepatite C(95), adenovírus oncolítico(104), HIV(105), Pestivirus(106), vírus da Febre Amarela(80); SARS-CoV-2(98, 107), vírus da bronquite infecciosa (IBV)(108), rotavírus(109), vírus da síndrome respiratória e reprodutiva porcina (PRRSV)(110), influenza A H3N2(111) e vírus da Hepatite B(112).

Nosso vírus CPER-ROCV-RV7, construído para expressar a Tag HiBiT recebeu a inserção de apenas 57pb. Este vírus foi resgatado com sucesso e mostrou-se replicativo com o título  $8 \times 10^3$  FFU/mL após uma primeira passagem em cultura celular. Ainda, é necessário realizar passagens adicionais para averiguar a estabilidade do vírus em cultura, analisar a expressão do gene repórter e o sequenciamento de genoma completo.

Com relação à região eleita para a inserção de genes exóticos no genoma viral, Os Flavivírus costumam receber estes genes no início da ORF da poliproteína viral, entre a 5'UTR e o gene do capsídeo(101). Entretanto, tal inserção leva a ruptura da sequência utilizada para a ciclização do genoma, comprometendo a replicação do vírus. Por isso, para reduzir a instabilidade dos vírus produzidos duplicamos uma porção da sequência de nucleotídeos do gene do capsídeo, a ser mantida junto a 5'UTR e assim garantir a interação que cicliza o RNA viral.

Outro aspecto importante a ser considerado são os eventos de recombinação e mutações. Mutações e recombinações são mecanismos necessários ao processo evolutivo fazendo surgir novas variantes e espécies virais(113). Recombinação ocorre quando pelo menos 2 vírus co-infectam a mesma célula produzindo recombinação homóloga que ocorre no mesmo local em ambas as fitas parentais, no mesmo fragmento de gene em ambos os vírus, ou *reassortment*, um tipo particular de recombinação que ocorre em vírus com múltiplos segmentos gênicos.

Para os vírus repórter, que apresentam duplicações de genes do capsídeo, pode ocorrer recombinação homóloga entre essas regiões repetidas, o que poderia deletar o gene exógeno inserido. Para reduzir a recombinação homóloga buscamos otimizar o gene do capsídeo com redução de homologia e consequente aumento na estabilidade dos vírus produzidos. Trabalho realizado para construção de YFV repórter demonstrou que a otimização da sequência completa do gene do capsídeo levou a maior estabilidade viral, resultando em maiores títulos produzidos(114).

Estudos mostram que mutações pontuais nos primeiros 160 e últimos 115 nucleotídeos reduzem a interação entre as porções 5' e 3' do RNA viral, o que dificulta o pareamento destas porções e a ciclização do RNA, resultando em vírus defectivos(115). Portanto, é necessário



produzir mutações compensatórias nas porções 5' e 3' do RNA viral para permitir sua complementariedade, o que permite a interação mantenedora da produção de partículas virais infectantes. Assim há necessidade de manter intactas as regiões alvo de ciclização. Nos vírus Rocio repórter que construímos, o gene repórter foi flanqueado por cópias do gene do capsídeo, o que manteve a região alvo para ciclização, com otimização da sequência do capsídeo após o gene repórter.

Sabe-se que nos nas construções de Flavivirus com inserção de genes exógenos, variações no tamanho da parte inserida do gene do capsídeo junto a 5'UTR tem consequências na estabilidade dos vírus produzidos(101). De forma geral, as construções mantem um fragmento da sequência nucleotídica do gene do capsídeo, seguida da sequência inserida do gene repórter e do sítio de autoclivagem (FMV2A ou T2A) e de uma sequência completa codificadora do capsídeo. Esta primeira sequência duplicada do capsídeo apresenta tamanho variado, por exemplo 25, 33, 34, 38, 50 aminoácidos (aa) ou até mesmo a sequência completa do capsídeo (101). Baker e colaboradores teorizaram que vírus repórter precisam apresentar um tamanho ideal na sequência duplicada do capsídeo, o que influencia sobre a replicação viral dificultando eventos de recombinação com possível exclusão do gene repórter projetado (101). Baker e colaboradores comprovaram sua teoria e indicaram que o uso de 38aa do capsídeo para ZIKV e YFV produziu bons resultados. Em estudo semelhante, os autores tiveram bons resultados em estabilidade viral para DENV-1-4 com 38aaC, para JEV com 34aaC e para WNV, com 33aaC(68).

Em nossas tentativas de produzir o vírus Rocio repórter, construímos vírus com 35aa da proteína do Capsídeo, porém este vírus não se mostrou estável e por isso, optamos por aumentar para 43aa a referida proteína. Tal modificação, somada ao acréscimo de uma segunda sequência do gene do capsídeo, resultou em vírus mais estáveis. Os vírus Rocio repórter produzidos com estes procedimentos produziram partículas virais infectantes e exprimiram o gene repórter na 1ª passagem viral em células o que foi otimizado na 2ª passagem.

Entretanto, na produção de vírus recombinantes, outros sítios genômicos podem ser alvo de mutações. Mutações na sequência cHP, que anulam a estrutura secundária, reduzem a iniciação a partir do primeiro *codon* AUG, resultando na produção de proteínas do capsídeo mais curtas(102). Também, mutações ocorrem em construções cujo gene repórter é inserido em outras regiões, como observou-se para WNV expressando GFP(8). Naquele estudo, Pierson e colaboradores mostraram que WNV é susceptível à inserção do gene repórter, mas os produtos obtidos exibiram baixos níveis de replicação e modificações ou deleções do fragmento inserido.

Quanto à CPER, pudemos mostrar em nosso trabalho que esta metodologia para produção de vírus recombinantes é simples, anulando a necessidade de transformação de células bacterianas e a de transcrição *in vitro*, o que reduz mutações adicionais.

Modificações no genoma de vírus recombinantes, incluindo a adição de genes exógenos, em geral, não levam a um aumento da virulência. Pelo contrário, estes tendem a manter características semelhantes às dos vírus do tipo selvagem ou a atenuação desses vírus em infecções *in vitro* e/ou *in vivo*(68, 116) Alguns exemplos disso são os vírus Bunyamwera(72); Influenza A(117); febre amarela(80); vírus do oeste do Nilo(8); e o SARS-CoV-2(88).

Finalmente, seria necessário analisar o *fitness* dos vírus Rocio repórter, observando seus comportamentos após passagens sucessivas em culturas de células VERO76 e C6/36. Assim, verificamos os títulos virais produzidos e a morfologia dos *plaques*, fazendo curvas virais de crescimento. Entretanto o tempo exíguo para a finalização deste Doutorado não permitiu medir os níveis de expressão dos genes repórter (*time point*) e a estabilidade da expressão desses genes após 10 passagens em cultura celular. Da mesma forma, não foi possível sequenciar os nucleotídeos dos genomas dos vírus Rocio repórter produzidos.

Em suma, neste trabalho construímos com êxito pelo menos 2 vírus Rocio repórter, que deverão ter grande utilidade como marcadores da presença viral em muitos estudos futuros.

# CONCLUSÃO

## 8. CONCLUSÃO

- Obtivemos vírus Rocio repórter por metodologia CPER, fazendo transfecções por TransIT®-LT1 (Mirus) e posteriormente infectando os vírus recombinantes em células C6/36.
- Foi possível construir e resgatar vírus Rocio recombinante expressando a proteína fluorescente mCherry.
- Foi possível construir e resgatar vírus Rocio recombinante expressando a proteína fluorescente mNeonGreen.

# REFERÊNCIA\*

## 9. REFERÊNCIAS

1. Howley PM, Knipe DM, Whelan SPJ. *Fields virology*. Seventh edition. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2021. volumes : illustrations (some color), color maps p.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2022 [updated March 2023. July 2022:[Available from: <https://ictv.global/taxonomy>.
3. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13-22.
4. Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol*. 2020;5(6):796-812.
5. Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol*. 2018;9:2180.
6. Viglietta M, Bellone R, Blisnick AA, Failloux AB. Vector Specificity of Arbovirus Transmission. *Front Microbiol*. 2021;12:773211.
7. Holbrook MR. Historical Perspectives on Flavivirus Research. *Viruses*. 2017;9(5).
8. Pierson TC, Diamond MS, Ahmed AA, Valentine LE, Davis CW, Samuel MA, et al. An infectious West Nile virus that expresses a GFP reporter gene. *Virology*. 2005;334(1):28-40.
9. Saivish MV, da Costa VG, Rodrigues RL, Feres VCR, Montoya-Diaz E, Moreli ML. Detection of Rocio Virus SPH 34675 during Dengue Epidemics, Brazil, 2011-2013. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(4):797-9.
10. Saivish MV, Gomes da Costa V, de Lima Menezes G, Alves da Silva R, Dutra da Silva GC, Moreli ML, et al. Rocio Virus: An Updated View on an Elusive Flavivirus. *Viruses*. 2021;13(11).
11. Coimbra TL, Santos RN, Petrella S, Nagasse-Sugahara TK, Castrignano SB, Santos CL. Molecular characterization of two Rocio flavivirus strains isolated during the encephalitis epidemic in Sao Paulo State, Brazil and the development of a one-step RT-PCR assay for diagnosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50(2):89-94.
12. Iversson LB. Aspects of the encephalitis epidemic due to arbovirus in the region of Vale do Ribeira, S. Paulo, Brazil from 1975-1978. *Rev Saude Publica*. 1980;14(1):9-35.
13. Iversson LB. [Epidemic of arbovirus encephalities in the Southern region of Sao Paulo, Brazil in 1975 and 1976. Aspect of the geographical and chronological distribution of the cases]. *Rev Saude Publica*. 1977;11(3):375-88.
14. Vale do Ribeira 2010 [Available from: <http://cidadeilustre.blogspot.com/2010/10/vale-do-ribeira.html>.
15. Straatmann A, Santos-Torres S, Vasconcelos PF, da Rosa AP, Rodrigues SG, Tavares-Neto J. [Serological evidence of the circulation of the Rocio arbovirus (Flaviviridae) in Bahia]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30(6):511-5.
16. Chavez JH, Franca RF, Oliveira CJ, de Aquino MT, Farias KJ, Machado PR, et al. Influence of the CCR-5/MIP-1 alpha axis in the pathogenesis of Rocio virus encephalitis in a mouse model. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(5):1013-8.
17. Lorenz C, Azevedo TS, Virginio F, Aguiar BS, Chiaravalloti-Neto F, Suesdek L. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(9):e0005959.
18. de Souza Lopes O, de Abreu Sacchetta L, Coimbra TL, Pinto GH, Glasser CM. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. II. Epidemiologic studies on 1975 epidemic. *Am J Epidemiol*. 1978;108(5):394-401.

19. Mitchell CJ, Forattini OP. Experimental transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. *J Med Entomol.* 1984;21(1):34-7.
20. Mitchell CJ, Forattini OP, Miller BR. Vector competence experiments with Rocio virus and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. *Rev Saude Publica.* 1986;20(3):171-7.
21. Laporta GZ, Ribeiro MC, Ramos DG, Sallum MA. Spatial distribution of arboviral mosquito vectors (Diptera, Culicidae) in Vale do Ribeira in the South-eastern Brazilian Atlantic Forest. *Cad Saude Publica.* 2012;28(2):229-38.
22. Tavares-Neto J, Travassos da Rosa AP, Vasconcelos PF, Costa JM, Travassos da Rosa JF, Marsden PD. [Research on antibodies to arbovirus in the serum of residents of the village of Corte de Pedra, Valencia, Bahia]. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(4):351-8.
23. Iversson LB, Travassos da Rosa AP, Rosa MD. Recent occurrence of human infection by Rocio arbovirus in the Valley of Ribeira region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1989;31(1):28-31.
24. Figueiredo MLGd, Figueiredo LTM. Review on Infections of the Central Nervous System by St. Louis Encephalitis, Rocio and West Nile Flaviviruses in Brazil, 2004-2014. *Advances in Microbiology.* 2014;04(13):955-61.
25. Silva JR, Romeiro MF, Souza WM, Munhoz TD, Borges GP, Soares OA, et al. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(4):414-7.
26. Pauvolid-Correa A, Campos Z, Juliano R, Velez J, Nogueira RM, Komar N. Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(2):e2706.
27. Casseb AR, Cruz AV, Jesus IS, Chiang JO, Martins LC, Silva SP, et al. Seroprevalence of flaviviruses antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazilian Amazon. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014;20(1):9.
28. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44:649-88.
29. Acheson NH. *Fundamentals of molecular virology.* 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2011. xxv, 500 pages : illustrations (chiefly color) p.
30. Avila-Perez G, Nogales A, Martin V, Almazan F, Martinez-Sobrido L. Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus. *Viruses.* 2018;10(11).
31. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol.* 2008;3(2):155-65.
32. Lott WB, Doran MR. Do RNA viruses require genome cyclisation for replication? *Trends Biochem Sci.* 2013;38(7):350-5.
33. Liu ZY, Qin CF. Structure and function of cis-acting RNA elements of flavivirus. *Rev Med Virol.* 2020;30(1):e2092.
34. Mazeaud C, Freppel W, Chatel-Chaix L. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Front Genet.* 2018;9:595.
35. Villordo SM, Gamarnik AV. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res.* 2009;139(2):230-9.
36. Liu ZY, Li XF, Jiang T, Deng YQ, Zhao H, Wang HJ, et al. Novel cis-acting element within the capsid-coding region enhances flavivirus viral-RNA replication by regulating genome cyclization. *J Virol.* 2013;87(12):6804-18.
37. Mustafa YM, Meuren LM, Coelho SVA, de Arruda LB. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. *Front Microbiol.* 2019;10:525.

38. Desole G, Sinigaglia A, Riccetti S, Masi G, Pacenti M, Trevisan M, et al. Modelling Neurotropic Flavivirus Infection in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Systems. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21).
39. Ellwanger JHK, V. L.; Chies, J. A. B. Rocio virus: an overview. *Revista Peruana de Divulgación Científica en Genética y Biología Molecular (RDGBM).* 2017:14-20.
40. Maximova OA, Pletnev AG. Flaviviruses and the Central Nervous System: Revisiting Neuropathological Concepts. *Annu Rev Virol.* 2018;5(1):255-72.
41. Pierson TC, Diamond MS. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature.* 2018;560(7720):573-81.
42. Marinho PES, Alvarenga PPM, Crispim APC, Candiani TMS, Alvarenga AM, Bechler IM, et al. Wild-Type Yellow Fever Virus RNA in Cerebrospinal Fluid of Child. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(8):1567-70.
43. Puccioni-Sohler M, Rosadas C, Cabral-Castro MJ. Neurological complications in dengue infection: a review for clinical practice. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013;71(9B):667-71.
44. de Vries L, Harding AT. Mechanisms of Neuroinvasion and Neuropathogenesis by Pathologic Flaviviruses. *Viruses.* 2023;15(2).
45. Rosemberg S. Neuropathology of S. Paulo south coast epidemic encephalitis (Rocio flavivirus). *J Neurol Sci.* 1980;45(1):1-12.
46. Harrison AK, Murphy FA, Gardner JJ, Bauer SP. Myocardial and pancreatic necrosis induced by Rocio virus, a new flavivirus. *Exp Mol Pathol.* 1980;32(1):102-13.
47. Henriques DF, Quaresma JA, Fuzii HT, Nunes MR, Silva EV, Carvalho VL, et al. Persistence of experimental Rocio virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(5):630-6.
48. de Barros VE, Saggioro FP, Neder L, de Oliveira Franca RF, Mariguela V, Chavez JH, et al. An experimental model of meningoencephalomyelitis by Rocio flavivirus in BALB/c mice: inflammatory response, cytokine production, and histopathology. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(2):363-73.
49. Franca RF, Costa RS, Silva JR, Peres RS, Mendonca LR, Colon DF, et al. IL-33 signaling is essential to attenuate viral-induced encephalitis development by downregulating iNOS expression in the central nervous system. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):159.
50. Barros VE, Ferreira BR, Livonesi M, Figueiredo LT. Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with Brazilian flaviviruses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009;51(3):141-7.
51. Souza AP, Haut L, Reyes-Sandoval A, Pinto AR. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(4):509-22.
52. Liniger M, Zuniga A, Naim HY. Use of viral vectors for the development of vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6(2):255-66.
53. Falzarano D, Grosseth A, Hoenen T. Development and application of reporter-expressing mononegaviruses: current challenges and perspectives. *Antiviral Res.* 2014;103:78-87.
54. Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J.* 1994;13(18):4195-203.
55. Ura T, Okuda K, Shimada M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines (Basel).* 2014;2(3):624-41.
56. Tariq H, Batool S, Asif S, Ali M, Abbasi BH. Virus-Like Particles: Revolutionary Platforms for Developing Vaccines Against Emerging Infectious Diseases. *Front Microbiol.* 2021;12:790121.
57. Zeltins A. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol Biotechnol.* 2013;53(1):92-107.



58. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994;263(5148):802-5.
59. Shimomura O. Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(31):5590-602.
60. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods*. 2005;2(12):905-9.
61. de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1987;7(2):725-37.
62. Cabello MC, Bartoloni FH, Bastos EL, Baader WJ. *The Molecular Basis of Organic Chemiluminescence*. Biosensors (Basel). 2023;13(4).
63. Tzani MA, Gioftsidou DK, Kallitsakis MG, Pliatsios NV, Kalogiouri NP, Angaridis PA, et al. Direct and Indirect Chemiluminescence: Reactions, Mechanisms and Challenges. *Molecules*. 2021;26(24).
64. Li LH, Kaptein SJF, Schmid MA, Zmurko J, Leyssen P, Neyts J, et al. A dengue type 2 reporter virus assay amenable to high-throughput screening. *Antiviral Res*. 2020;183:104929.
65. Li X, Zhang H, Zhang Y, Li J, Wang Z, Deng C, et al. Development of a rapid antiviral screening assay based on eGFP reporter virus of Mayaro virus. *Antiviral Res*. 2019;168:82-90.
66. Cruz DJ, Bonotto RM, Gomes RG, da Silva CT, Taniguchi JB, No JH, et al. Identification of novel compounds inhibiting chikungunya virus-induced cell death by high throughput screening of a kinase inhibitor library. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):e2471.
67. Lopez P, Girardi E, Mounce BC, Weiss A, Chane-Woon-Ming B, Messmer M, et al. High-Throughput Fluorescence-Based Screen Identifies the Neuronal MicroRNA miR-124 as a Positive Regulator of Alphavirus Infection. *J Virol*. 2020;94(9).
68. Baker C, Shi PY. Construction of Stable Reporter Flaviviruses and Their Applications. *Viruses*. 2020;12(10).
69. Dumm RE, Heaton NS. The Development and Use of Reporter Influenza B Viruses. *Viruses*. 2019;11(8).
70. Zhang ZR, Zhang HQ, Li XD, Deng CL, Wang Z, Li JQ, et al. Generation and characterization of Japanese encephalitis virus expressing GFP reporter gene for high throughput drug screening. *Antiviral Res*. 2020;182:104884.
71. Zhang JW, Wang H, Liu J, Ma L, Hua RH, Bu ZG. Generation of A Stable GFP-reporter Zika Virus System for High-throughput Screening of Zika Virus Inhibitors. *Virol Sin*. 2021;36(3):476-89.
72. Shi X, van Mierlo JT, French A, Elliott RM. Visualizing the replication cycle of bunyamwera orthobunyavirus expressing fluorescent protein-tagged Gc glycoprotein. *J Virol*. 2010;84(17):8460-9.
73. Nunes JGC, Nunes BT, Shan C, Moraes AF, Silva TR, de Mendonca MHR, et al. Reporter Virus Neutralization Test Evaluation for Dengue and Zika Virus Diagnosis in Flavivirus Endemic Area. *Pathogens*. 2021;10(7).
74. Zhang PT, Shan C, Li XD, Liu SQ, Deng CL, Ye HQ, et al. Generation of a recombinant West Nile virus stably expressing the Gaussia luciferase for neutralization assay. *Virus Res*. 2016;211:17-24.
75. Shan C, Xie X, Muruato AE, Rossi SL, Roundy CM, Azar SR, et al. An Infectious cDNA Clone of Zika Virus to Study Viral Virulence, Mosquito Transmission, and Antiviral Inhibitors. *Cell Host Microbe*. 2016;19(6):891-900.
76. Wang T, Li P, Zhang Y, Liu Y, Tan Z, Sun J, et al. In vivo imaging of Zika virus reveals dynamics of viral invasion in immune-sheltered tissues and vertical propagation during pregnancy. *Theranostics*. 2020;10(14):6430-47.

77. Fang E, Liu X, Li M, Liu J, Zhang Z, Liu X, et al. Construction of a Dengue NanoLuc Reporter Virus for In Vivo Live Imaging in Mice. *Viruses*. 2022;14(6).
78. Rasulova M, Vercruyse T, Paulissen J, Coun C, Suin V, Heyndrickx L, et al. A High-Throughput Yellow Fever Neutralization Assay. *Microbiol Spectr*. 2022;10(3):e0254821.
79. Torres FJ, Parry R, Hugo LE, Slonchak A, Newton ND, Vet LJ, et al. Reporter Flaviviruses as Tools to Demonstrate Homologous and Heterologous Superinfection Exclusion. *Viruses*. 2022;14(7).
80. Sanchez-Velazquez R, de Lorenzo G, Tandavanitj R, Setthapramote C, Bredenbeek PJ, Bozzacco L, et al. Generation of a reporter yellow fever virus for high throughput antiviral assays. *Antiviral Res*. 2020;183:104939.
81. Mondotte JA, Lozach PY, Amara A, Gamarnik AV. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J Virol*. 2007;81(13):7136-48.
82. Yun SI, Song BH, Woolley ME, Frank JC, Julander JG, Lee YM. Development, Characterization, and Application of Two Reporter-Expressing Recombinant Zika Viruses. *Viruses*. 2020;12(5).
83. Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*. 1981;214(4523):916-9.
84. Tejada-Mansir A, Montesinos RM. Upstream processing of plasmid DNA for vaccine and gene therapy applications. *Recent Pat Biotechnol*. 2008;2(3):156-72.
85. Quan J, Tian J. Circular polymerase extension cloning. *Methods Mol Biol*. 2014;1116:103-17.
86. Cha-Aim K, Hoshida H, Fukunaga T, Akada R. Fusion PCR via novel overlap sequences. *Methods Mol Biol*. 2012;852:97-110.
87. Edmonds J, van Grinsven E, Prow N, Bosco-Lauth A, Brault AC, Bowen RA, et al. A novel bacterium-free method for generation of flavivirus infectious DNA by circular polymerase extension reaction allows accurate recapitulation of viral heterogeneity. *J Virol*. 2013;87(4):2367-72.
88. Amarilla AA, Sng JDJ, Parry R, Deerain JM, Potter JR, Setoh YX, et al. A versatile reverse genetics platform for SARS-CoV-2 and other positive-strand RNA viruses. *Nat Commun*. 2021;12(1):3431.
89. Hobson-Peters J, Harrison JJ, Watterson D, Hazlewood JE, Vet LJ, Newton ND, et al. A recombinant platform for flavivirus vaccines and diagnostics using chimeras of a new insect-specific virus. *Sci Transl Med*. 2019;11(522).
90. Amarilla AA, Setoh YX, Periasamy P, Peng NY, Pali G, Figueiredo LT, et al. Chimeric viruses between Rocio and West Nile: the role for Rocio prM-E proteins in virulence and inhibition of interferon-alpha/beta signaling. *Sci Rep*. 2017;7:44642.
91. Mutso M, Saul S, Rausalu K, Susova O, Zusinaite E, Mahalingam S, et al. Reverse genetic system, genetically stable reporter viruses and packaged subgenomic replicon based on a Brazilian Zika virus isolate. *J Gen Virol*. 2017;98(11):2712-24.
92. Tamura T, Zhang J, Madan V, Biswas A, Schwoerer MP, Cafiero TR, et al. Generation and characterization of genetically and antigenically diverse infectious clones of dengue virus serotypes 1-4. *Emerg Microbes Infect*. 2022;11(1):227-39.
93. Setoh YX, Prow NA, Peng N, Hugo LE, Devine G, Hazlewood JE, et al. De Novo Generation and Characterization of New Zika Virus Isolate Using Sequence Data from a Microcephaly Case. *mSphere*. 2017;2(3).
94. Tamura T, Igarashi M, Enkhbold B, Suzuki T, Okamatsu M, Ono C, et al. In Vivo Dynamics of Reporter Flaviviridae Viruses. *J Virol*. 2019;93(22).
95. Tamura T, Fukuhara T, Uchida T, Ono C, Mori H, Sato A, et al. Characterization of Recombinant Flaviviridae Viruses Possessing a Small Reporter Tag. *J Virol*. 2018;92(2).

96. Setoh YX, Periasamy P, Peng NYG, Amarilla AA, Slonchak A, Khromykh AA. Helicase Domain of West Nile Virus NS3 Protein Plays a Role in Inhibition of Type I Interferon Signalling. *Viruses*. 2017;9(11).
97. Setoh YX, Peng NY, Nakayama E, Amarilla AA, Prow NA, Suhrbier A, et al. Fetal Brain Infection Is Not a Unique Characteristic of Brazilian Zika Viruses. *Viruses*. 2018;10(10).
98. Torii S, Ono C, Suzuki R, Morioka Y, Anzai I, Fauzyah Y, et al. Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction. *Cell Rep*. 2021;35(3):109014.
99. Liu G, Gack MU. An Optimized Circular Polymerase Extension Reaction-based Method for Functional Analysis of SARS-CoV-2. *bioRxiv*. 2022.
100. Brasil. EXTRATO DE PARECER TÉCNICO N° 7.260/2020. Brasil: Diário Oficial da União - seção 1; 2020. p. 188.
101. Baker C, Liu Y, Zou J, Muruato A, Xie X, Shi PY. Identifying optimal capsid duplication length for the stability of reporter flaviviruses. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):2256-65.
102. Willemsen A, Zwart MP. On the stability of sequences inserted into viral genomes. *Virus Evol*. 2019;5(2):vez045.
103. Schwinn MK, Machleidt T, Zimmerman K, Eggers CT, Dixon AS, Hurst R, et al. CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide. *ACS Chem Biol*. 2018;13(2):467-74.
104. Gaspar N, Zambito G, Dautzenberg IJC, Cramer SJ, Hoeben RC, Lowik C, et al. NanoBiT System and Hydrofurimazine for Optimized Detection of Viral Infection in Mice-A Novel in Vivo Imaging Platform. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16).
105. Ozono S, Zhang Y, Tobiume M, Kishigami S, Tokunaga K. Super-rapid quantitation of the production of HIV-1 harboring a luminescent peptide tag. *J Biol Chem*. 2020;295(37):13023-30.
106. Tetsuo M, Matsuno K, Tamura T, Fukuhara T, Kim T, Okamatsu M, et al. Development of a High-Throughput Serum Neutralization Test Using Recombinant Pestiviruses Possessing a Small Reporter Tag. *Pathogens*. 2020;9(3).
107. Miyakawa K, Jeremiah SS, Ohtake N, Matsunaga S, Yamaoka Y, Nishi M, et al. Rapid quantitative screening assay for SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using HiBiT-tagged virus-like particles. *J Mol Cell Biol*. 2020;12(12):987-90.
108. Liang XY, Zhu QC, Liang JQ, Liu SY, Liu DX, Fung TS. Development of HiBiT-Tagged Recombinant Infectious Bronchitis Coronavirus for Efficient in vitro and in vivo Viral Quantification. *Front Microbiol*. 2020;11:2100.
109. Pannacha P, Kanai Y, Kawagishi T, Nouda R, Nurdin JA, Yamasaki M, et al. Generation of recombinant rotaviruses encoding a split NanoLuc peptide tag. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;534:740-6.
110. Wang Y, Ge X, Zhang Y, Guo X, Han J, Zhou L, et al. Construction of a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus with Nanoluc Luciferase Reporter: a Stable and Highly Efficient Tool for Viral Quantification Both In Vitro and In Vivo. *Microbiol Spectr*. 2022;10(4):e0027622.
111. Zhang C, Zhang G, Zhang Y, Lin X, Zhao X, Cui Q, et al. Development of an HiBiT-tagged reporter H3N2 influenza A virus and its utility as an antiviral screening platform. *J Med Virol*. 2023;95(1):e28345.
112. Sumiyadorj A, Murai K, Shimakami T, Kuroki K, Nishikawa T, Kakuya M, et al. A single hepatitis B virus genome with a reporter allows the entire viral life cycle to be monitored in primary human hepatocytes. *Hepatol Commun*. 2022;6(9):2441-54.

113. Perez-Losada M, Arenas M, Galan JC, Palero F, Gonzalez-Candelas F. Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect Genet Evol.* 2015;30:296-307.
114. Shustov AV, Mason PW, Frolov I. Production of pseudoinfectious yellow fever virus with a two-component genome. *J Virol.* 2007;81(21):11737-48.
115. Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, Westaway EG. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol.* 2001;75(14):6719-28.
116. Zhao X, Wang L, Cui Q, Li P, Wang Y, Zhang Y, et al. A Mechanism Underlying Attenuation of Recombinant Influenza A Viruses Carrying Reporter Genes. *Viruses.* 2018;10(12).
117. Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, Garcia-Sastre A. Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(25):11531-6.

# ANEXOS

## 10. LISTA DE ANEXOS

1. Lista de *primers* para rROCV *Wild Type*
2. Lista de *primers* para rROCV com genes repórter inseridos entre cópias do gene do capsídeo
3. Lista de *primers* para rROCV com genes repórter inseridos entre proteínas E e NS1
4. Lista de *primers* para rROCV com HiBiT-Tag

Virus Wild Type				
NOME	SEQUÊNCIA	Tm	%GC	amplicon
ROCV-Linker- <b>F</b>	CTGGTGCTGCAAAACACAGGATCTGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTC	67	58%	RPCV-Linker
ROCV-Linker- <b>R</b>	CTGTTGGTGAAATTCACACAGGTGAATTTCTCGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGAC	69	41%	
ROCV-5'UTR- <b>F</b>	AGAAATTCACCTGTGTGAAATTCACCAACAG	62	38%	5'UTR-C-prM-E
ROCV-E- <b>R</b>	GGACGTTTCATGGCCAAGAAGAGAAG	62	52%	
ROCV-NS1- <b>F</b>	CTTCTTCTTGGCCATGAACGTCC	62	52%	NS1
ROCV-NS1- <b>R</b>	CTGGAACCTGCAGATGTCGTTTCC	61	64%	
ROCV-NS2A- <b>F</b>	GGAAACGACATCTGCAGGTTCCAG	61	54%	NS2AB
ROCV-NS2B- <b>R</b>	CTGGAAGGTCCACAGAACCAC	63	58%	
ROCV-NS3- <b>F</b>	GTGGGTTCGTGGGACCTCCAG	63	58%	NS3
ROCV-NS3- <b>R</b>	CTTCCCGCCGCAAATTCCTTG	61	55%	
ROCV-NS4A- <b>F</b>	CAAAGAATTTGCGGCGGGAAG	62	55%	NS4AB
ROCV-NS4B- <b>R</b>	CTTCACTTTCGGAGCTTCCAGGTTT	62	52%	
ROCV-NS5- <b>F</b>	GAACCTGGAAGCTCCGAAAGTGAAG	61	52%	NS5
ROCV-NS5- <b>R</b>	CTGGGCTGTTTACAGTCTTACAGAACTCC	63	52%	
ROCV-3'UTR- <b>F</b>	GGAGTTCTGTAAGACTGAACAGCCCAG	62	52%	3'UTR
ROCV-3'UTR- <b>R</b>	AGATCCTGTGTTTTCAGCACCAG	61	50%	

Vírus com gene repórter inserido entre cópias do gene do capsídeo

NOME	SEQUÊNCIA	Tm	%GC	amplicon
<b>Primers comuns a todosos vírus recombinantes</b>				
ROCV-RV1-Opt-C/prM- <b>F</b>	GTAGTATGGCTCTGCGCCTGGGGACATATC	66	57%	prM
ROCV-E- <b>R</b>	GGACGTTTCATGGCCAAGAAGAGAAG	62	52%	
<b>mCherry</b>				
ROCV-5'UTR- <b>F</b>	AGAAATTCACCTGTGTGAAATTCACCAACAG	62	38%	5'UTR--43aa_Capsídeo
ROCV-RV1-C43MC- <b>R</b>	CGCCCTTGCTCACCATTAGTGGTCCTCTCCC	70	61%	
ROCV-RV1-C43MC- <b>F</b>	GGGAGAGGACCACTAATGGTGAGCAAGGGCG	70	61%	mCherry
T2A-mCherry- <b>R</b>	GGTCAACAGACTTCCCTGCCCTCCTGTACAGCTCGTCCATGCCGCC	76	63%	
<b>NeoGreen</b>				
ROCV-5'UTR- <b>F</b>	AGAAATTCACCTGTGTGAAATTCACCAACAG	62	38%	5'UTR--43aa_Capsídeo
ROCV-RV3-C43/NG- <b>R</b>	CTTCGCCCTTGACACTAGTGGTCCTCTCCC	69	61%	
ROCV-RV3-C43/NG- <b>F</b>	GGGAGAGGACCACTAGTGTCCAAGGGCGAAG	69	61%	NeoGreen
T2A-NeoGreen- <b>R</b>	GGTCAACAGACTTCCCTGCCCTCCTGTACAGCTCGTCCATGCCCATC	75	59%	
NOME	SEQUÊNCIA	Tm	%GC	amplicon
<b>Ultramers para produção do capsídeo otimizado</b>				
ROCV-Ultramer 1 - <b>F</b>	CCGACGTGATGGCATGGACGAGCTGTAC AAGGAGGGCAGGGGAAGTCTGTGACCTGTGGCGAT GTTGAGGAAAACCCCTGGCCCGATGTCTAAGAAGCCCGGTGGTCCGGCGGGAAGAAGAGTAGTCAAC ATGCTCAAGCGACCCGCGAGTGATCACCTATCAAAGGCATAAAGAGGTTGATGGAAACTTGACCG	82	55%	Capsídeo otimizado
ROCV-Ultramer 2 - <b>R</b>	GGGCTTCAGATTTATCATAACCCCTCAGCGCCGAGCAAGCCTGTGTGTCGGCATAAATGCGGCAAA TCGAAAAAAGCTATGAAGGCCAGGACGACTCTCAGCGCCCCCGTCCATCGGTCAAGTTTCCAATC AACCTCTTTATGCC	80	52%	Capsídeo otimizado
ROCV-Ultramer 3 - <b>R</b>	CAAACTTTGCTTGATATGTCCCGAGGCGCAGAGCCATACTACCCGTCACAAGAGCAATCCAGAGA AGTACACTACCATTACCGGTTTGGCTTTGGCTCGGTTAATTATATAAGCATATTAGATAITTTCTTTT TAAAGGAGGTAAGGTGTTAAGGGCTTCAGATTTATCATAACCCCTCAGC	76	41%	Capsídeo otimizado
<b>Primers para produção do capsídeo parcialmente otimizado</b>				
ROCV-Wt-C61- <b>F</b>	ACCCAAGGACTACTCCGCAGG	63	62%	Fragmento do capsídeo WT
ROCV-Opt C54-60+WT-C61-- <b>F</b>	CGATTGCGCGCAATTATGCCGACCCAAGGACTACTCCGCAGG	61	57%	
ROCV-E- <b>R</b>	GGACGTTTCATGGCCAAGAAGAGAAG	62	52%	Fragmento do capsídeo parcialmente otimizado 1-60aa
T2A- <b>F</b>	GAGGGCAGGGGAAGTCTGTTGACC	64	63%	
ROCV-Opt C60- <b>R</b>	CGGCATAATTGCGGCAATCG	61	52%	
<b>Primers para produção do capsídeo totalmente otimizado</b>				
T2A- <b>F</b>	GAGGGCAGGGGAAGTCTGTTGACC	64	63%	T2A + Cap_Full_otimizado
ROCV-RV1-Opt-C/prM- <b>R</b>	GATATGTCCCAGGCGCAGGCCATACTAC	67	57%	



Vírus com gene repórter inserido entre proteína E e NS1

NOME	SEQUÊNCIA	Tm	%GC	amplicon
<b>Primers comuns a todosos vírus recombinantes</b>				
ROCV-NS1-V1- <b>F</b>	GACACAGGATGCGCGATTGACATTAC	62	50%	NS1
ROCV-1-T2A-NS1-V2- <b>F</b>	GTGGCGATGTTGAGGAAAACCTGGCCCGACACAGGATGCGCG	77	64%	
ROCV-NS1- <b>R</b>	CTGGAACCTGCAGATGTCGTTTCC	61	64%	
mCherry-Neo-Nluc- <b>R2</b>	CAGGGTTTTCTCAACATCGCCACAGGTCAACAGACTTCCCC	71	55%	
<b>mCherry</b>				
mCherry- <b>F1</b>	CATGCCGACACGGGCTGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG	75	65%	mCherry
mCherry- <b>F2</b>	CTTCTTCTTGGCCATGAACGTCCATGCCGACACGGGCTGTATGG	63	57%	
mCherry- <b>R1</b>	CAGACTTCCCCTGCCCTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	71	55%	
<b>NeoGreen</b>				
NeoG- <b>F1</b>	CCATGCCGACACGGGCTGTGTGTCCAAGGGCGAAGAGGAC	76	65%	NeoGreen
NeoG- <b>F2</b>	CTTCTTCTTGGCCATGAACGTCCATGCCGACACGGGCTGTG	74	58%	
NeoG- <b>R1</b>	CAGGTCAACAGACTTCCCCTGCCCTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCCA	75	59%	

Vírus com gene repórter HiBit-Tag inserido entre cópias do gene do capsídeo				
NOME	SEQUÊNCIA	Tm	%GC	amplicon
ROCV-NS1-V1- <b>F</b>	GACACAGGATGC GCGATTGACATTAC	61	50%	NS1 para vírus HiBit-Tag
NS1- <b>R</b>	CTGGAACCTGCAGATGTCGTTCC	61	54%	
NOME	SEQUÊNCIA	Tm	%GC	amplicon
Ulramers para produção do HiBit-Tag				
HiBit-Tag ultramer	CTGGAGGAATTCTCTCTCTTGGCCATGAACGTCCATGCCGACACGGGCTGTGTCTCTGGGTGGCG GTTGTCAAGAAAATATCCGGCAGTTCAGGAGACACAGGATGCGCGATTGACATTACGCGGCGGGA G	81	55%	HiBit-Tag
Primers para produção do HiBit-Tag				
NOME	SEQUÊNCIA	Tm	%GC	amplicon
ROCV-NS1- <b>F</b>	CTCTCTCTTGGCCATGAACGTCC	62	52%	HiBit-Tag
ROCV-NS1-V1- <b>R</b>	GTAATGTCAATCGCGCATCCTGTGTC	62	50%	HiBit-Tag