

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

VICTÓRIA THOMAZELLI GARCIA

Caracterização do tropismo celular de *Flavivirus* do Brasil e construção de vírus vacinal da  
Febre Amarela e deste vírus recombinante com proteínas do vírus Zika

RIBEIRÃO PRETO

2023

VICTÓRIA THOMAZELLI GARCIA

Caracterização do tropismo celular de *Flavivirus* do Brasil e construção de vírus vacinal da Febre Amarela e deste vírus recombinante com proteínas do vírus Zika

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como exigência parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo.

RIBEIRÃO PRETO

2023

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

- Universidade de São Paulo -

Thomazelli-Garcia, Victória

Caracterização do tropismo celular de Flavivirus do Brasil e construção de vírus vacinal da Febre Amarela e deste vírus recombinante com proteínas do vírus Zika. Ribeirão Preto, 2023.

85 p. f.: il. color. 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Figueiredo, Luiz Tadeu Moraes

1. *Flavivirus*. 2. susceptibilidade celular a vírus. 3. construção viral. 4. CPER.

Trabalho realizado no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil), processo 131538/2019-5, e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), processo 2019/10565-1.

VICTÓRIA THOMAZELLI GARCIA

Caracterização do tropismo celular de *Flavivirus* do Brasil e construção de vírus vacinal da Febre Amarela e deste vírus recombinante com proteínas do vírus Zika

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como exigência parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Data da defesa:

Resultado: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo – FMRP/USP

Membro 1

---

XXXXXXXXXXXXX

Membro 2

---

XXXXXXXXXXXXX

Membro 3

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó,  
Eloisa Carrascosa Thomazelli (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, de início, a Deus. Ele quem me deu forças nos momentos mais difíceis ao longo da vida, mas principalmente durante a realização desse trabalho.

Agradeço à minha família, a base e motivo de tudo. Obrigada por terem acreditado em mim mais uma vez, na realização de mais um sonho. Aos meus avós, Pedro e Eloisa (*in memoriam*), que me deram todo o amor do mundo, sentimento esse que me motivou desde o princípio a fazer o bem. Vocês me deram a sede de mudar, de alguma forma, a realidade das pessoas para melhor. E foi com esse sonho que iniciei minha vida acadêmica. Obrigada, mãe e pai. Irmãs e Irmãos. Tias e tios. Primas e primos. Vocês todos, mais que ninguém, sabem como foi para chegar até aqui. Obrigada por tudo! Eu amo vocês! E, vó, onde quer que esteja, espero que sinta meu agradecimento, é difícil terminar esse ciclo sem sua presença. Seu carinho e apoio sempre foram muito especiais e essenciais para mim.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, que desde a primeira vez que entrei em seu laboratório foi atencioso e solícito. Sem ele, esse sonho não teria sido possível. Obrigada, professor, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela paciência. Que seu conhecimento e experiência sejam sempre lembrados e valorizados. Te admiro!

Um super obrigada ao Dr. Alberto Amarilla, sem ele esse trabalho não teria sido realizado. Obrigada, Alberto. Obrigada por mesmo com 13 horas de diferença, desde o início, ter sido tão solícito, tão paciente, tão atencioso. Obrigada por todos os ensinamentos, orientações e disponibilidade. Palavras não descreveriam o tamanho da minha gratidão!

Agradeço também aos meus amigos, eles que me ouviram, muitas vezes sem nem entender as conquistas ou reclamações ao logo desses anos, mas estiveram do meu lado sempre. Um agradecimento especial aos responsáveis por me motivarem lá no início do mestrado. Lili, Lucas e Alex, vocês foram (e são) tão essenciais em um dos momentos mais difíceis desse mestrado que não têm noção. Obrigada!

Obrigada a todo o pessoal do Centro de Pesquisa em Virologia, famoso CPV! Só quem vive ali para saber a luta diária e o quanto a presença de cada um é importante para seguirmos. Obrigada por todo ensinamento, apoio, ajuda, desabafos, trocas, solicitude, empatia, carinho, risadas e enfim, sou muito grata por ter tido vocês. Obrigada especialmente ao pessoal do lab, aos que já saíram e aos que permanecem. Obrigada não só pela amizade científica, mas pela amizade construída nessa convivência diária.

Agradeço também à Ana, secretária do PPG-IBA, que sempre esteve disponível e disposta a me ajudar com as questões burocráticas do mestrado. Muito obrigada, mesmo.

Ainda, às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro que proporcionou a realização do presente trabalho e dos trabalhos desenvolvidos no laboratório.

Por fim, a cada um que esteve do meu lado, presente durante a realização desse trabalho.. obrigada! Espero que saibam a importância de cada um de vocês ao longo desse período. Sou muito grata pela presença de cada um de vocês na minha vida. Obrigada!!!

## RESUMO

### **Caracterização do tropismo celular de *Flavivirus* do Brasil e construção de vírus vacinal da Febre Amarela e deste vírus recombinante com proteínas do vírus Zika**

Dentre os *Flavivirus* do Brasil incluem-se os arbovírus Cacipacoré (CPCV), Encefalite de *Saint Louis* (SLEV), Febre Amarela vacinal 17DD (YFV17DD), Ilhéus (ILHV) e Zika (ZIKV). Todos estes vírus são causadores de infecções humanas e alguns produzem doenças graves. Na primeira parte desta Dissertação, estudamos o tropismo celular de alguns *Flavivirus* do Brasil. Caracterizamos o tropismo de CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV por células dos tecidos de diferentes órgãos identificando novas linhagens celulares susceptíveis. Dessa forma, avaliamos a susceptibilidade das células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2), células de adenocarcinoma de pulmão humano (Calu-3), células de larva de *Aedes albopictus* (C6/36), células embrionárias de rim humano (HEK293T), célula de adenocarcinoma cervical humano (HeLa), células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC), células de glioblastoma humano (U251-MG) e células de rim de macaco verde africano (Vero CCL81 e Vero E6), procurando entender a fisiopatologia das infecções humanas relacionadas aos tropismos pelas células dos diferentes tecidos. Observamos que os *Flavivirus* CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV infectam *in vitro* células de origem intestinal, epitelial, pulmonar, renal, cervical uterina e neuronal, com a exceção das células renais ao YFV17DD. CPCV, ILHV e ZIKV mostraram tropismo por células de tecido nervoso, o que pode ter relevância na patogênese de suas infecções humanas. As células Vero CCL81, HUVEC e Caco-2 foram mais susceptíveis aos vírus estudados e podem ser utilizadas rotineiramente na amplificação dos mesmos. Na segunda parte da Dissertação, considerando a ausência de tratamento e vacinas contra o vírus Zika, causador de epidemias e infecção relacionada ao desenvolvimento de Síndrome de Guillain-Barré e Síndrome Congênita do Zika, decidimos construir o vírus vacinal da Febre Amarela 17D e um recombinante deste vírus incluindo proteínas do ZIKV. Assim, utilizando a técnica CPER, construímos clones infecciosos de YFV17D e de um vírus recombinante quimérico com o genoma de YFV17D incluindo as proteínas prM e E de ZIKV. O trabalho foi bem sucedido porque permitiu obter o vírus YFV17D e um recombinante YFV17DZIKV, objetivo maior do trabalho. Entretanto, os vírus obtidos não mostraram-se estáveis o que exige novas intervenções para que YFV17DZIKV possa tornar-se um candidato vacinal.

Palavras-chave: *Flavivirus*; susceptibilidade celular a vírus; construção viral; CPER.

## ABSTRACT

### **Characterization of cell tropism of *Flavivirus* from Brazil and construction of a Yellow Fever vaccine virus and a recombinant of this virus with Zika virus proteins**

Among the *Flavivirus* in Brazil are included the arboviruses Cacipacoré (CPCV), Saint Louis Encephalitis (SLEV), 17DD Yellow Fever vaccine (YFV17DD), Ilhéus (ILHV) and Zika (ZIKV). These viruses cause human infections and some cause serious illness. In the first part of this Dissertation, we studied the cellular tropism of some *Flavivirus* from Brazil. We characterized the tropism of CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD and ZIKV by infection of cell tissues from different organs, identifying new susceptible cell lineages. Thus, we evaluated the susceptibility of human colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2), human lung adenocarcinoma cells (Calu-3), *Aedes albopictus* larval cells (C6/36), human embryonic kidney cells (HEK293T), human cervical adenocarcinoma cell (HeLa), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), human glioblastoma cells (U251-MG) and African green monkey kidney cells (Vero CCL81 and Vero E6), seeking to understand the pathophysiology of human infections related to tropisms by cells of different tissues. We observed that CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD and ZIKV *Flavivirus* infected *in vitro* cells of intestinal, epithelial, pulmonary, renal, uterine cervical and neuronal origin, except for YFV17DD in renal cells. CPCV, ILHV and ZIKV showed tropism for nervous tissue cells, which may be relevant in the pathogenesis of their human infections. Vero CCL81, HUVEC and Caco-2 cells were more susceptible to the viruses studied and can be routinely used for their amplification. In the second part of the Dissertation, considering the absence of treatment and vaccines against the Zika virus, which causes epidemics and infection related to the development of Guillain-Barré Syndrome and Congenital Zika Syndrome, we decided to construct a 17D Yellow Fever vaccine virus and a recombinant of this virus including ZIKV proteins. Thus, using the CPER technique, we constructed infectious clones of YFV17D and a chimeric recombinant virus with the YFV17D genome including the ZIKV prM and E proteins. The work was successful because it allowed obtaining the YFV17D virus and a YFV17DZIKV recombinant, the main objective of the work. However, the viruses obtained were not stable, which requires new interventions so that YFV17DZIKV can become a vaccine candidate.

Keywords: *Flavivirus*; cellular susceptibility to viruses; viral construction; CPER.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclos de transmissão de arbovírus.....	15
Figura 2	Esquema do processo replicativo dos <i>Flavivirus</i> .....	18
Figura 3	Organização do genoma dos <i>Flavivirus</i> .....	19
Figura 4	Estruturas imatura e madura dos <i>Flavivirus</i> .....	20
Figura 5	Fórmula para cálculo do título viral por TCID <sub>50</sub> , segundo Reed e Muench.....	29
Figura 6	Cinética de crescimento temporal dos <i>Flavivirus</i> em células Caco-2.....	33
Figura 7	Cinética de crescimento temporal dos <i>Flavivirus</i> em células Calu-3.....	34
Figura 8	Cinética de crescimento temporal dos <i>Flavivirus</i> em células C6/36.....	35
Figura 9	Cinética de crescimento temporal dos <i>Flavivirus</i> em células HEK293T	36
Figura 10	Cinética de crescimento temporal dos <i>Flavivirus</i> em células HeLa.....	37
Figura 11	Cinética de crescimento temporal dos <i>Flavivirus</i> em células HUVEC...	38
Figura 12	Cinética de crescimento temporal dos <i>Flavivirus</i> em células U-251 MG.....	39
Figura 13	Cinética de crescimento temporal dos <i>Flavivirus</i> em células Vero CCL81.....	40
Figura 14	Cinética de crescimento temporal dos <i>Flavivirus</i> em células Vero E6...	41
Tabela 1	<i>Primers</i> e suas sequências nucleotídicas, utilizados para a construção do YFV17D-CPER e do recombinante YFV17DZIKV-CPER.....	52
Tabela 2	Sequência de <i>primers</i> e sonda usadas no RT-qPCR <i>Pan-Flavi</i> .....	54
Figura 15	Reagentes e respectivos volumes e ciclo utilizados na reação de CPER.	55
Figura 16	Esquema das etapas realizadas para a construção e recuperação de vírus por CPER.....	56
Figura 17	Esquemas com os genomas de YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER incluindo seus respectivos fragmentos.....	58
Figura 18	Representação esquemática dos genomas dos vírus construídos, YFV17D-CPER e YFV71DZIKV-CPER, incluindo foto e gel dos fragmentos de 1 a 10 e fragmento de <i>linker</i> .....	59
Tabela 3	Tabela mostrando valores de Ct do controle negativo, controle positivo e dos vírus YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER submetidos à RT-qPCR específica para <i>Flavivirus</i> .....	60

Figura 19	Foto de microplaca cujos orifícios exibem <i>plaques</i> formados por YFV17DD, ZIKV e Passagens 0, 1 e 2 dos vírus construídos, YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER.....	61
Figura 20	Imunofluorescência da Passagem 0 dos vírus YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER.....	62
Figura 21	Alinhamentos de sequências nucleotídicas incluindo o vírus recombinante YFV17DZIKV-CPER (material obtido da Passagem 0 para sequenciamento de Sanger).....	63

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>µL</b>	Microlitro
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>C</b>	Capsídeo
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>CPCV</b>	Vírus Cacipacoré
<b>CPER</b>	<i>Circular Polymerase Extension Reaction</i>
<b>Ct</b>	<i>Cycle Threshold</i>
<b>DAPI</b>	4',6'-diamino-2-fenil-indol
<b>DENV</b>	Vírus do Dengue
<b>DEPC</b>	Dicarbonato de dietila
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
<b>DP</b>	<i>Primers</i> diagnóstico
<b>E</b>	Envelope
<b>ECP</b>	Efeito citopático
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FMRP</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<b>h.p.i.</b>	Horas pós-infecção
<b>HDVr</b>	Ribozima do vírus da Hepatite delta
<b>IFA</b>	Imunofluorescência
<b>IFN</b>	Interferon
<b>ILHV</b>	Vírus Ilhéus
<b>JEV</b>	Vírus da Encefalite Japonesa
<b>kb</b>	Kilobases
<b>MIAF</b>	Fluído Ascítico Imune De Camundongo
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MOI</b>	Multiplicidade de infecção
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>nm</b>	Nanômetros

<b>NS</b>	Não-estrutural
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ORF</b>	Fase de leitura aberta
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>pmol</b>	Picomol
<b>PrM</b>	Pré-Membrana
<b>qPCR</b>	Reação em Cadeira da Polimerase quantitativa
<b>RdRp</b>	RNA polimerase dependente de RNA
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT</b>	Transcrição reversa
<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
<b>SCZ</b>	Síndrome Congênita do Zika
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SGB</b>	Síndrome de Guillain-Barré
<b>SLEV</b>	Vírus da Encefalite de <i>Saint Louis</i>
<b>ssRNA+</b>	RNA de fita simples e polaridade positiva
<b>TCID<sub>50</sub></b>	Dose Infecciosa Para 50% da Cultura de Tecidos
<b>UFP</b>	Unidade Formadora de <i>Plaque</i>
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>UTR</b>	Regiões não-traduzidas
<b>VLP</b>	Partículas Semelhantes a Vírus
<b>WNV</b>	Vírus <i>West Nile</i>
<b>WT</b>	<i>Wildtype</i>
<b>YFV</b>	Vírus da Febre Amarela
<b>YFV17D</b>	Vírus vacinal da Febre Amarela 17D
<b>YFV17D-CPER</b>	Vírus vacinal da Febre Amarela 17D construído por CPER
<b>YFV17DD</b>	Vírus vacinal da Febre Amarela 17DD
<b>YFV17DZIKV-CPER</b>	Vírus recombinante construído por CPER
<b>ZIKV</b>	Vírus Zika

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 ARBOVÍRUS.....	15
1.2 FAMÍLIA <i>Flaviviridae</i> .....	17
1.2.1 Gênero <i>Flavivirus</i> .....	17
1.2.1.1 Vírus Cacipacoré.....	21
1.2.1.2 Vírus da Encefalite de <i>Saint Louis</i> .....	22
1.2.1.3 Vírus da Febre Amarela.....	22
1.2.1.4 Vírus Ilhéus.....	23
1.2.1.5 Vírus Zika.....	24
<b>Parte 1: Caracterização do tropismo celular de <i>Flavivirus</i> do Brasil.....</b>	<b>27</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1 ESTUDOS <i>in vitro</i> .....	27
1.2 O TROPISMO DOS <i>Flavivirus</i> .....	28
1.2.1 Dose Infecciosa Para 50% da Cultura de Tecidos (TCID <sub>50</sub> ) .....	29
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 CÉLULAS.....	31
3.2 VÍRUS.....	31
3.3 CURVAS DE CRESCIMENTO VIRAL.....	32
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>Parte 2: Construção de vírus vacinal da Febre Amarela e deste vírus recombinante com proteínas do vírus Zika.....</b>	<b>46</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>46</b>
1.1 VACINAS.....	46

1.1.1 Vacinas Utilizando como Molde o Vírus Vacinal da Febre Amarela.....	47
1.2 <i>CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION REACTION</i> (CPER).....	48
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
3.1 PRODUÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIS.....	51
3.2 RT-PCR.....	51
3.2.1 Extração de RNA por TRIzol LS.....	51
3.2.2 <i>Primers</i> .....	52
3.2.3 Transcrição Reversa (RT).....	52
3.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	53
3.2.4.1 PCR de amplificação dos fragmentos utilizados na construção dos vírus YFV171D-CPER e YFV17DZIKV-CPER.....	53
3.2.4.2 PCR diagnóstica.....	54
3.3 RT-qPCR .....	54
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE.....	54
3.5 RECUPERAÇÃO VIRAL.....	55
3.5.1 CPER.....	55
3.5.2 Transfecção para Produzir YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER.....	55
3.6 TITULAÇÃO VIRAL POR ENSAIO DE <i>PLAQUE</i> .....	56
3.7 TESTE DE IMUNOFLORESCÊNCIA (IFA) DE CÉLULAS ADERIDAS A LAMÍNULAS CIRCULARES.....	57
3.8 SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	57
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>84</b>

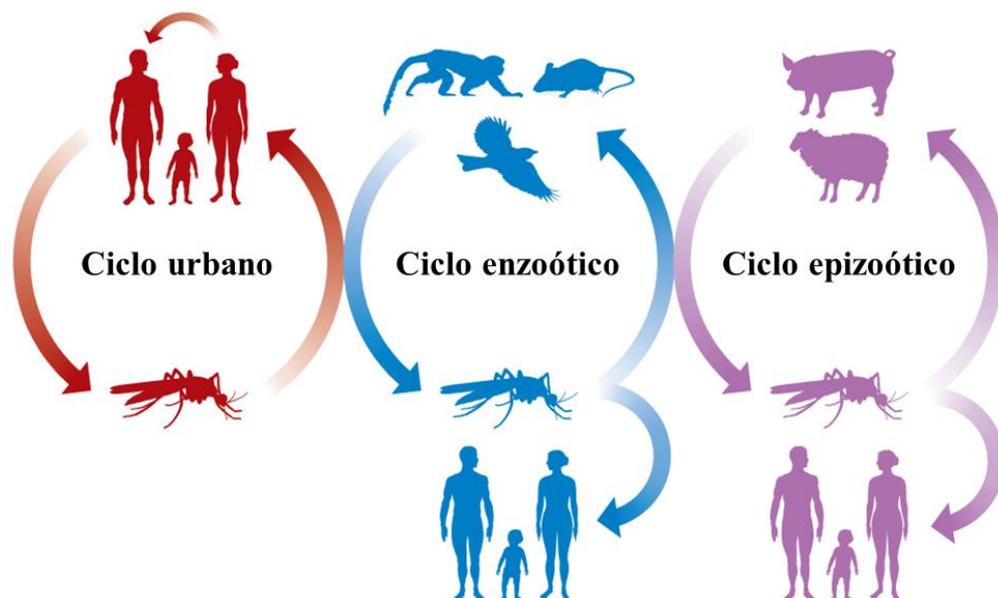
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ARBOVÍRUS

Arbovírus, do inglês ***A**rthropod-**B**orne **V**irus*, são vírus transmitidos por vetores artrópodes hematófagos, mais comumente mosquitos e carrapatos (FIGUEIREDO, 2007). A partir do momento que o vetor realiza sua dieta à base de sangue, ele pode adquirir vírus que, por sua vez, podem infectar e replicar em suas células intestinais. Com o sucesso da infecção e replicação, as partículas virais se espalham pelos outros órgãos via hemocele, chegando até as glândulas salivares, o que torna este artrópodo um agente transmissor de vírus para hospedeiros vertebrados, como aves, pequenos mamíferos e seres humanos (FRANZ et al., 2015; FIGUEIREDO, 2007).

Praticamente todos os arbovírus são zoonóticos, ou seja, têm origem no ambiente selvagem. Para que haja difusão e aumento progressivo na transmissão de um arbovírus, possibilitando epidemias, é necessário que vetores e hospedeiros competentes estejam dentro de um mesmo ambiente permissível, desenvolvendo assim um ciclo de transmissão (WEAVER; REISEN, 2010). Didaticamente, pode se identificar três principais ciclos de transmissão dos arbovírus, como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Ciclos de transmissão de arbovírus



Fonte: adaptado de WEAVER et al., 2018.

Sendo assim, os três componentes essenciais para a transmissão de um arbovírus relacionam-se ao vírus, ao vetor e ao vertebrado-reservatório (KUNO; CHANG, 2005). Animais selvagens ao se infectarem com arbovírus, e se tornarem virêmicos, mantem o ciclo

destes agentes na natureza transmitindo-os ao mosquito no momento do repasto sanguíneo. O ciclo enzoótico, caracterizado pela manutenção do vírus entre o vetor e vertebrados selvagens, eventualmente, pode sofrer um transbordamento (do inglês, *spillover*) de barreira nos hospedeiros-reservatório tradicionais passando a criar novos hospedeiros, que, podem ser animais domésticos e inclusive, seres humanos. Entretanto, os seres humanos ao se infectarem com vários arbovírus, desenvolvem baixa viremia e não são capazes de infectar vetores. Por outro lado, hospedeiros-reservatório tradicionais podem infectar vetores com arbovírus que, por sua vez, podem transmitir o patógeno para seres humanos produzindo casos eventuais ou, até mesmo, epizootias. Alguns arbovírus se adaptam a ciclos urbanos envolvendo vetores mosquitos antropofílicos e seres humanos virêmicos como transmissores do vírus. Este é o caso do *Flavivirus* da Febre Amarela, dos 4 vírus do Dengue (DENV 1-4) e do vírus Zika (PLOWRIGHT et al., 2017; WEAVER et al., 2018).

Ainda, com relação ao vírus Zika, este mostrou-se capaz de ser transmitido de humano para humano por via congênita e sexual (WEAVER et al., 2018).

Os ciclos arbovéricos estão estreitamente conectados, visto que o vetor pode se infectar durante seu repasto sanguíneo em seres humanos e transmitir o agente para mamíferos do ambiente selvagem, como primatas não-humanos. O salto dos arbovírus de ciclo urbano para novos ciclos silvestres tem sido cada vez mais descrito e possivelmente, fatores como o desmatamento e a urbanização desenfreada, que aproximam seres humanos dos animais selvagens possíveis hospedeiros, facilitaria a transmissão vetorial, principalmente por mosquitos (FIGUEIREDO, 2019).

A infestação mundial dos mosquitos antropofílicos *Aedes*, expõe cerca de 3,9 bilhões de pessoas aos DENV (KRAEMER et al, 2015; OMS, 2020). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), todos os anos são registradas cerca de 96 milhões de infecções sintomáticas e aproximadamente 40 mil mortes por Dengue no mundo, sendo essa a arbovirose mais prevalente (OMS, 2020). Assim, estes insetos são os animais mais assassinos do mundo, pois são capazes de causar mais mortes e doenças do que qualquer outro animal (CDC, 2015).

Além de possuir vetores mosquitos do gênero *Aedes*, o Brasil é um território propício para a introdução e manutenção de diversas arboviroses. É um país de clima tropical com grande extensão de florestas, ocupando um terço de todo seu território, onde ocorre desmatamento para agricultura e pecuária. As cidades são infestadas por mosquitos do gênero *Culex* e *Aedes*, e existe um sistema pouco eficiente para controle desses vetores, fatores esses que possibilitam a emergência e reemergência de arboviroses (FIGUEIREDO, 2000; VASCONCELOS et al., 2001; FIGUEIREDO, 2006; FIGUEIREDO, 2007).

Arbovírus, ao infectarem seres humanos, podem causar quadros assintomáticos, ou sintomáticos com doença febril aguda (Dengue-símile) com febre, dor de cabeça, dor nas articulações, prostração, exantema. Também, podem causar doenças mais graves como febres hemorrágicas e meningoencefalites (FIGUEIREDO, 2000; FIGUEIREDO, 2006; FIGUEIREDO, 2007).

Sendo um nome de qualificação eminentemente epidemiológica, os arbovírus são classificados em diferentes famílias, como *Arenaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuviridae*, *Reoviridae* e *Asfarviridae* (SOUZA, 2017).

## 1.2 FAMÍLIA *Flaviviridae*

Em 1900 Walter Reed descobriu que o agente causador da Febre Amarela podia ser transferido de uma pessoa para outra a partir do sangue filtrado de uma pessoa infectada, e que esse agente era transmitido de um mosquito, mais especificamente o *Aedes aegypti*, para o homem (REED et al., 1900). Sendo esse o primeiro relato de um arbovírus. No entanto, o vírus da Febre Amarela (YFV) foi isolado somente em 1927, de um homem doente em Gana, por Adrian Stokes (STAPLES; MONATH, 2008). YFV pertence à família *Flaviviridae* que é composta por 4 gêneros e um total de 89 espécies. Os gêneros incluídos nessa família são o dos *Flavivirus*, com maior número de espécies, contendo 53 espécies. *Hepacivirus*, com 14 espécies. *Pegivirus* e *Pestivirus*, com 11 espécies cada um (ICTV, 2021). O foco deste trabalho é o gênero *Flavivirus*.

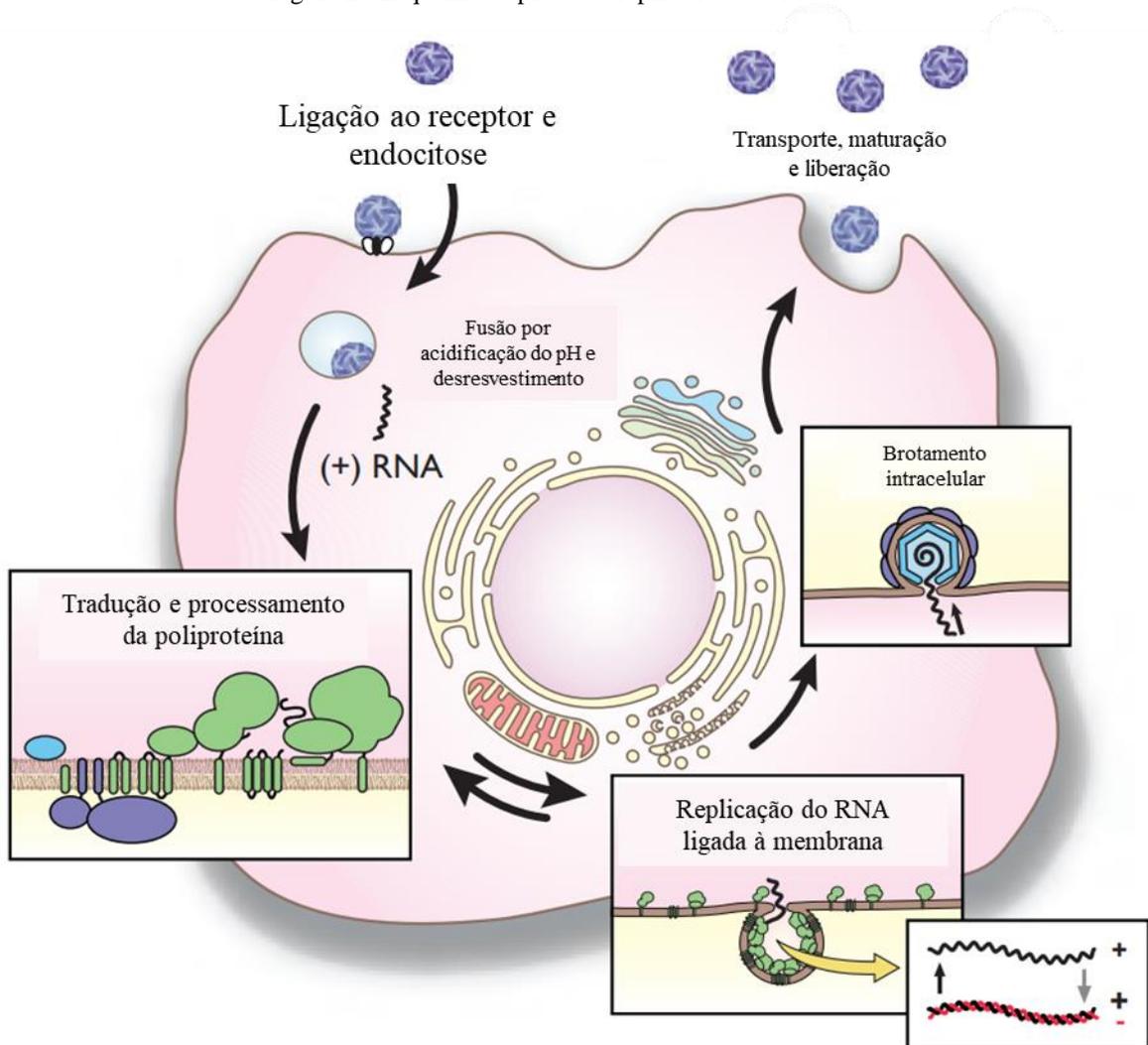
### 1.2.1 Gênero *Flavivirus*

YFV pertence ao gênero *Flavivirus*, que inclui vírus envelopados de RNA com fita simples e polaridade positiva (ssRNA<sup>+</sup>), envolvido por um nucleocapsídeo. O genoma possui uma única fase de leitura aberta (ORF) flanqueada por duas regiões não traduzidas (do inglês *untranslated region*, UTR), 5' e 3'. A ORF é traduzida em uma única poliproteína que é clivada em proteínas estruturais e não-estruturais por proteases virais e do próprio hospedeiro. As proteínas estruturais estão localizadas na porção N-terminal, seguida das não-estruturais até a porção C-terminal (LINDENBACH et al., 2013; ALZHRANI et al., 2020).

A replicação celular dos *Flavivirus* inicia-se com a endocitose mediada por receptor, proporcionando a ligação e absorção da partícula viral, como mostra a Figura 2. Com a redução no pH do endossomo ocorre a fusão do envelope do *virion* com a membrana da célula, seguida do desnudamento do nucleocapsídeo liberando o RNA viral no citoplasma, onde ocorre a

replicação. O RNA liberado funciona como RNA mensageiro (mRNA), ou seja, contém a mensagem pronta para que haja a replicação já no citoplasma, além de servir como molde para esta replicação. No citoplasma ocorre a tradução e processamento de uma poliproteína em associação com as membranas intracelulares associadas ao retículo endoplasmático (RE) e a partícula viral nascente é liberada pela via secretora da célula (LINDENBACH et al., 2013).

Figura 2 - Esquema do processo replicativo dos *Flavivirus*

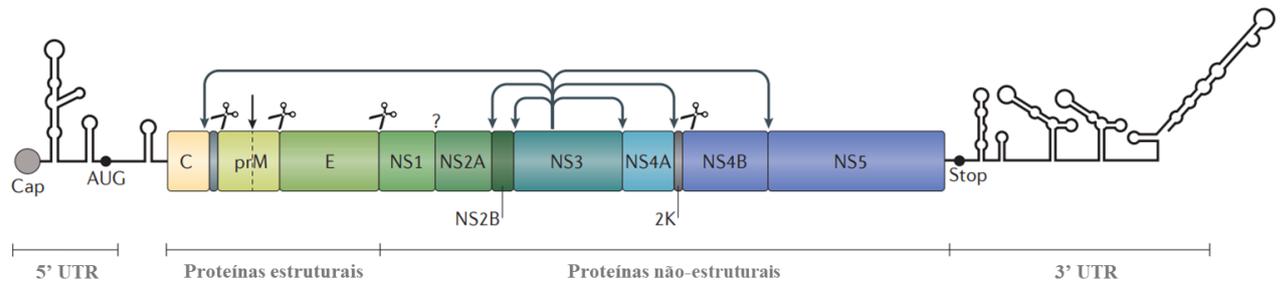


Fonte: adaptado de LINDENBACH et al., 2013.

Os *Flavivirus* possuem genoma de aproximadamente 11 kb. Morfologicamente são partículas virais icosaédricas de 50 nm de diâmetro, possuem três proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E), e sete não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Seu genoma é capeado por cap do tipo 1, na extremidade 5' UTR, que tem a função de proteger o RNA e auxiliar no reconhecimento pelo ribossomo ao dar início à tradução do RNA, produzindo as proteínas virais. A poliproteína dos *Flavivirus* é clivada por

peptidases de sinal da própria célula hospedeira e pela protease viral (NS3), formando suas três proteínas estruturais e as sete não-estruturais, como mostra a Figura 3 (LINDENBACH et al., 2013; NEUFELDT et al., 2018; ALZHRANI et al., 2020).

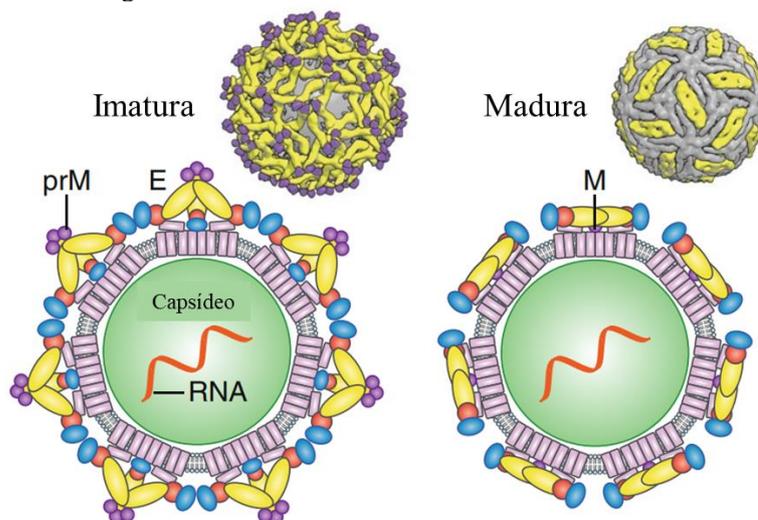
Figura 3 – Organização do genoma dos *Flavivirus*



Fonte: adaptado de NEUFELDT et al., 2018.

As proteínas estruturais C, prM e E dão estrutura e constituem o envoltório da partícula viral. A proteína C, propicia a interação do genoma viral com a membrana do RE, possuindo uma porção hidrofóbica que se liga ao RNA viral e uma porção básica, que permite seu empacotamento (SOTCHEFF; ROUTH, 2020). A proteína E é a parte mais exposta da partícula viral e medeia a ligação e fusão da partícula durante a entrada do vírus na célula. Trata-se da porção mais imunogênica do *virion* e durante a montagem da partícula viral, juntamente com a proteína prM, é incorporada ao envelope viral formando picos heterotriméricos de prM-E, para evitar alterações conformacionais na proteína E e impedir a fusão da partícula viral às membranas do hospedeiro durante sua saída. A proteína M é uma pequena porção da prM, que é produzida durante o processo de maturação viral que ocorre na via secretora da célula. A partícula viral só se torna madura com a clivagem de prM, possibilitando a expressão de M, juntamente com a proteína E no envelope da partícula. Além da clivagem de prM, o *virion* nascente precisa ser exposto a pH neutro para que o fragmento pr seja liberado e haja fusão do mesmo à célula hospedeira (LINDENBACH et al., 2013; NEUFELDT et al., 2018; PIERSON; DIAMOND, 2020).

O processo de maturação viral nem sempre é eficiente. Mesmo que muito semelhantes aos vírus maduros, vírus imaturos podem ter diferentes morfologias, comumente próximos de 60 nm, e com espículas por prM e E na superfície, como mostra a Figura 4 (LINDENBACH et al., 2013; NEUFELDT et al., 2018; PIERSON; DIAMOND, 2020).

Figura 4 – Estruturas imatura e madura dos *Flavivirus*

Fonte: adaptado de PIERSON; DIAMOND, 2020.

Também, partículas virais imaturas costumam possuir menor quantidade de espículas formadas em superfície, podendo não compor todo o envelope da partícula. No entanto, mesmo sendo partículas imaturas, quando formadas em uma segunda infecção por DENV, podem ser reconhecidas por anticorpos específicos e entrar na célula, podendo sofrer maturação endossômica com a acidificação do pH, clivando a prM, liberando pr e infectando a célula. Provavelmente, este mecanismo ocorre em infecções secundárias por DENV devido à presença de altos níveis de anticorpos. Ainda, vírus incompletos, apenas apresentando a estrutura do envelope, sem capsídeo ou genoma, podem ser liberados. São partículas subvirais não infecciosas (LINDENBACH et al., 2013; PIERSON; DIAMOND, 2020).

As proteínas não-estruturais dos *Flavivirus* atuam na replicação viral, no entanto, a função da maioria delas não está completamente esclarecida. A NS1 tem diversas funções, participando no complexo replicativo dos *Flavivirus* e no processo de maturação viral. NS1 pode assumir uma forma hexamérica que é secretada o que permite seu uso como um biomarcador diagnóstico, além de modular o sistema imunológico e por esse motivo, tem sido utilizada como alvo vacinal (WATTERSON; MODHIRAN; YOUNG, 2016). Sugere-se que NS2A e NS4B estão envolvidas na ancoragem dos complexos de replicação em membranas celulares, além de atuarem como antagonistas de interferon (IFN) do tipo I. NS2B e NS3 formam um complexo cofator da NS3, recrutando NS3 para o RE, onde atuam como protease na clivagem da poliproteína viral. NS3 também é essencial para a replicação e capeamento do RNA. NS4A atua produzindo uma curvatura de membrana do RE, permitindo a formação das fábricas virais. A NS5 tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)

responsável pela replicação do RNA viral e está envolvida no capeamento do genoma de RNA recém-sintetizado (LINDENBACH et al., 2013; NEUFELDT et al., 2018; PIERSON; DIAMOND, 2020). Além de ser a proteína mais conservada dos *Flavivirus* (BEST, 2017). Ainda, existe o peptídeo 2K, um peptídeo de sinal responsável pela inserção de NS4B na membrana do RE (NEUFELDT et al., 2018).

Os *Flavivirus* infectam cerca de 400 milhões de pessoas no mundo anualmente (PIERSON; DIAMOND, 2020). Dentre os *Flavivirus* descritos no Brasil incluem-se os DENV1-4, YFV e ZIKV como os de maior importância (FIGUEIREDO, 2019). Em 2022, no Brasil, ocorreram mais de 1,3 milhões de casos prováveis de Dengue, sendo 1.410 casos graves e 975 óbitos (BRASIL, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 1, 2022). A sintomatologia das infecções por *Flavivirus* é muito parecida o que compromete a diferenciação do diagnóstico a partir dos sintomas (THOMAS; MARTINEZ; ENDY, 2014).

Sendo negligenciadas as arboviroses, costumam ter seus diagnósticos laboratoriais, incluindo o da maioria dos *Flavivirus* causadores de doença humana, só realizados em centros de pesquisa. Essa dificuldade diagnóstica leva ao desconhecimento sobre a real circulação de *Flavivirus* e outros arbovírus.

Dos *Flavivirus* que causam doença humana no Brasil, selecionamos 5 para a realização do presente trabalho, os vírus: Cacipacoré (CPCV), Encefalite de *Saint Louis* (SLEV), YFV, Ilhéus (ILHV) e ZIKV.

#### 1.2.1.1 Vírus Cacipacoré

O CPCV foi isolado pela primeira vez em 1977 de sangue do pássaro Tauoca (*Formicarius analis*), no Pará, perto do rio Cacipacoré (FIGUEIREDO, 2000). Em 1998, CPCV foi isolado de um carrapato (*Amblyomma cajennense*) coletado de uma capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) doente no estado de São Paulo (FIGUEIREDO et al., 2017). Em 2011, foi descrita a primeira infecção humana por CPCV. Tratava-se de um paciente internado na unidade de terapia intensiva (UTI) com suspeita de leptospirose e Febre Amarela, cujo sangue mostrou-se positivo para CPCV, o que foi confirmado por sequenciamento nucleotídico (BATISTA et al., 2011).

CPCV agrupa-se com o sorogrupo do vírus da Encefalite Japonesa (JEV) (MOUREAU et al., 2015). No CPCV descreveram-se aminoácidos motivos de *Flavivirus* transmitidos por mosquitos e também, outros semelhantes aos de *Flavivirus* transmitidos por carrapato, ampliando as possibilidades de seus ciclos de transmissão (FIGUEIREDO et al., 2017). A presença de CPCV em pássaro (FIGUEIREDO, 2000), carrapato (FIGUEIREDO et al., 2017)

e a sorologia positiva em mamíferos domésticos, como cavalos (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011), sugere ciclo de transmissão amplo, envolvendo diversos hospedeiros. Entretanto, são necessários mais estudos para melhor caracterizar CPCV, um vírus com potencial emergente no Brasil.

#### 1.2.1.2 Vírus da Encefalite de *Saint Louis*

O SLEV existe em todas as Américas ocasionando surtos principalmente nos Estados Unidos da América (EUA) (ROSA et al., 2013; DIAZ et al., 2018). Possui um ciclo silvestre que envolve mosquitos *Culex* e aves migratórias, o que possibilita sua dispersão por todo o continente infectando seres humanos e equídeos (SWETNAM et al., 2020). Apesar do SLEV causar infecção e doença humana, produz baixa viremia, o que impede sua transmissão aos mosquitos (RIDENOUR et al., 2021). No entanto, alguns casos de infecções sintomáticas por SLEV evoluem com encefalites que resultam em 5-20% de óbitos (RIDENOUR et al., 2021).

No Brasil, SLEV foi isolado pela primeira vez em 1960, de um *pool* de mosquitos *Sabethes belisarioi* (FIGUEIREDO, 2000). Estudos brasileiros relatam sorologia positiva contra SLEV em cavalos, seres humanos (COSTA et al., 2019) e em primatas não-humanos (ALMEIDA et al., 2019). Em 2006, observaram-se pacientes infectados com SLEV em meio a um surto de Dengue (MONDINI et al., 2007). A circulação de SLEV é silenciosa em equídeos e humanos (COSTA et al., 2019), sendo este vírus disseminado pelas Américas por aves migratórias. Portanto, não pode ser ignorada a presença do SLEV em ambientes propícios para sua disseminação (SWETNAM et al., 2020). Mais estudos são necessários sobre o SLEV, sua manutenção na natureza, sua epidemiologia e patogenicidade.

#### 1.2.1.3 Vírus da Febre Amarela

Caracterizado pela icterícia nas infecções humanas, YFV, um velho conhecido da humanidade, causando gravíssimas epidemias desde o Século XVI, foi isolado pela primeira vez em 1927 (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Após o isolamento do YFV, Max Theiler e colaboradores começaram a realizar passagens dessa cepa em cérebro de camundongos e em ovos embrionados para atenuar o vírus. Depois de quase 200 passagens obteve-se a cepa 17D do vírus da Febre Amarela, a cepa vacinal, contida na vacina utilizada até hoje. Uma vacina eficaz e segura. No entanto, por ser uma vacina de vírus vivo-atenuado, indivíduos imunocomprometidos não devem ser imunizados com a vacina (FIGUEIREDO; FONSECA, 2015). A partir da definição da cepa 17D, foram realizadas mais passagens, obtendo-se a cepa 17DD, utilizada na imunização contra YFV no Brasil (SANTOS et al., 1995).

Atualmente YFV possui ciclo urbano e ciclo enzoótico (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Transmitido por mosquito *Aedes aegypti*, em ciclo urbano, e por mosquitos do gênero *Hemagogus*, da copa das árvores, capazes de transmitir o vírus para primatas não-humanos mantendo o ciclo silvestre de YFV (FIGUEIREDO, 2019). Devido à vacinação e aos programas de controle do vetor, ambos iniciados em meados de 1940 no Brasil, os casos diminuíram ao ponto de o ciclo urbano ter sido erradicado em 1942 (CUNHA et al., 2019). O último surto de Febre Amarela no Brasil ocorreu entre 2016 e 2017 levando ao óbito cerca de 270 pessoas, vivendo em áreas de baixa cobertura vacinal (FIGUEIREDO, 2019; CUNHA et al., 2019).

Devido à probabilidade de ocorrência de epizootias de YFV a cobertura vacinal de mais de 90% da população é necessária para evitar os surtos humanos. Também, o controle do vetor urbano, o *Aedes aegypti* e a conscientização da população contribuem para evitar a circulação do vírus e a reurbanização da Febre Amarela.

#### 1.2.1.4 Vírus Ilhéus

O ILHV foi isolado pela primeira vez de mosquitos do gênero *Aedes* e *Psorophora* em 1944, na cidade de Ilhéus, Bahia, durante um inquérito epidemiológico de YFV (FIGUEIREDO, 2000). Seu ciclo enzoótico inclui pássaros e mosquitos de diferentes gêneros, sendo *Psorophora* seu provável vetor primário (VIEIRA et al., 2019; MILHIM et al., 2020). Este vírus causa infecções em seres humanos. Os isolados humanos, mesmo que esporádicos, são provenientes de diferentes países presentes na América do Sul, instigando uma ampla zona de transmissão para esse vírus (SPENCE; ANDERSON; DOWNS, 1962; SRIHONGSE; JOHNSON, 1967; PRÍAS-LANDÍNEZ; BERNAL-CUBIDES; MORALES-ALARCÓN, 1968; PANON; FAURAN; DIGOUTTE, 1979; JOHNSON et al., 2007; MILHIM et al., 2020). No Brasil, foi responsável pelo desenvolvimento de encefalite em um idoso, que veio a óbito, sendo este o primeiro relato de caso fatal decorrente de infecção por ILHV (MILHIM et al., 2020).

ILHV já foi isolado de mosquitos (AITKEN; ANDERSON; DOWNS, 1956; DE RODANICHE, 1956; DE RODANICHE; GALINDO, 1957; DE RODANICHE; GALINDO, 1963; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2013; VIEIRA et al., 2019; CUNHA et al., 2020) e pássaros (GALINDO; DE RODANICHE, 1961; PEREIRA et al., 2001). Além disso, estudos realizados para avaliar a presença de anticorpos contra ILHV observaram infecções em pássaros (PEREIRA et al., 2001), roedores (DÉGALLIER et al., 1992), cavalos (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011) e primatas não-humanos (MORALES et al., 2017; ALMEIDA et al., 2019).

Considerando a diversidade de hospedeiros, de vetores e a gravidade que a doença causada por ILHV pode causar, são necessários mais estudos para entender melhor sua infecção e epidemiologia no Brasil.

#### 1.2.1.5 Vírus Zika

ZIKV foi isolado pela primeira vez do sangue de um macaco *Rhesus* (*Macaca mulatta*) sentinela febril em 1947, na floresta de Zika, em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). É um vírus transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, seu ciclo de transmissão é enzoótico, mantido por primatas não-humanos e mosquitos. No entanto, pode causar infecção e doença humana (PIELNAA et al., 2020). Sua transmissão também pode ser sexual ou vertical (PIERSON; DIAMOND, 2018).

Atualmente descrevem-se 2 linhagens de ZIKV, a linhagem africana e a asiática (FARIA et al., 2016). A segunda, causou os três principais surtos de Zika no mundo. O primeiro surto de ZIKV foi identificado em 2007, causando doença febril na ilha Yap, na Micronésia, com exantema, conjuntivite e artralgia (DUFFY et al., 2009). O segundo, em 2013. Proveniente das cepas do surto de 2007, foi descrito um surto na Polinésia Francesa. Nesse surto descreveu-se um aumento em 20 vezes na incidência de casos da síndrome de Guillain-Barré (SGB), sendo esse o primeiro relato sobre a relação da infecção por ZIKV com a síndrome (OEHLER et al., 2014). A síndrome de Guillain-Barré é uma doença inflamatória aguda que geralmente produz parestesia, fraqueza e dor muscular, com a possibilidade de progredir para paralisia e até a morte (PIERSON; DIAMOND, 2018). No início de 2015, no Brasil, foram notificados os primeiros casos autóctones por ZIKV, em Natal, Rio Grande do Norte, causando quadros semelhantes aos dos DENV, com artralgia, edema nas extremidades, febre moderada, exantema, dor de cabeça, dor ocular, conjuntivite, vertigem e desordem digestiva (ZANLUCA et al., 2015).

Entretanto, em 2015, no mês de setembro, começou a ser observado um grande aumento no número de nascituros com microcefalia o que foi associado e depois confirmado como casos de infecção congênita por ZIKV (BRASIL, 2017). De novembro de 2015 a dezembro de 2022, foram confirmados 1.852 casos de síndrome congênita do Zika (SCZ), dos quais 239 vieram à óbito (BRASIL, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 2, 2022). A SCZ pode resultar em morte fetal e em problemas no desenvolvimento neurológico dos nascituros, comumente resultando em microcefalia. Essas crianças apresentam comprometimento motor grave, distúrbios convulsivos, anormalidades auditivas e visuais e dificuldades para dormir. A chance de desenvolvimento adequado e saudável dos microencefálicos é muito limitada, necessitando de apoio a longo prazo o que produz enorme impacto social (PIERSON; DIAMOND, 2018).

Em 2017 os casos de microcefalia diminuíram, no entanto, ainda há circulação do Zika no Brasil (BRASIL, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 2, 2022). Devido ao seu potencial emergente e às complicações relacionadas à infecção, o desenvolvimento de vacinas capazes de prevenir a infecção e/ou a SCZ é de suma importância. O vírus Zika pode reemergir a qualquer momento em países como o Brasil.

Esta Dissertação inclui 2 partes que são mostradas em:

Parte 1: Caracterização do tropismo celular de *Flavivirus* do Brasil

Parte 2: Construção de vírus vacinal da Febre Amarela e deste vírus recombinante com proteínas do vírus Zika

# Parte 1:

## Caracterização do tropismo celular de *Flavivirus* do Brasil

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 ESTUDOS *in vitro*

Ainda que artificiais e limitados, estudos *in vitro* são necessários à pesquisa (CHESNUT et al., 2019). Vírus são parasitas intracelulares, por conseguinte, o primeiro passo utilizado em virologia é o cultivo celular *in vitro* para propagação ou isolamento de espécies virais. Estudos *in vitro* podem ser realizados para identificação e classificação viral, patogênese viral, além de serem utilizados para validação de medicamentos e vacinas (BENZARTI; GARIGLIANY, 2020).

Também, estudos *in vivo* são necessários para obtenção de resultados adicionais mais fidedignos. No entanto, estudos *in vitro* podem prever resultados *in vivo*, proporcionando ganho de tempo e dinheiro, além de poupar a vida de seres vivos. É claro que após obtenção de resultados preliminares *in vitro*, torna-se necessária a validação *in vivo* (CHESNUT et al., 2019). Dessa forma, a evolução de metodologias para cultivo celular tem resultado em dados estatísticos de redução no número de animais utilizados em pesquisa, respeitando as leis éticas para animais (PAMIES; HARTUNG, 2016)

Os cultivos celulares mais utilizados em virologia incluem os de células Vero, BHK e C6/36, pela susceptibilidade de replicação viral nas mesmas, amplificando os teores de vírus (CHESNUT et al., 2019). No entanto, outras células vem sendo cada vez mais utilizadas por oferecerem susceptibilidade a vírus, o que aumenta possibilidades de pesquisas na área de virologia.

Por outro lado, células de uma mesma linhagem podem não se comportar da mesma forma em lugares/laboratórios diferentes, onde variam os métodos de cultivo incluindo o número de passagens da linhagem celular. Sabe-se que quanto maior o número de passagens, maior o acúmulo de mutações. Por isso, é necessário cuidado ao interpretar e discutir resultados obtidos (BENZARTI; GARIGLIANY, 2020).

Para alguns vírus, principalmente os não-endêmicos, costuma haver escassez de estudos avaliando a replicação e tropismo viral o que prejudica o conhecimento sobre esses microrganismos (BENZARTI; GARIGLIANY, 2020). No presente estudo, observamos que existem escassos trabalhos pressupondo o tipo de infecção esperada caso haja uma emergência dos *Flavivirus* Cacipacoré (CPCV) e Ilhéus (ILHV) quando comparamos ao vírus Zika (ZIKV), causador de graves epidemias e sobre o qual existem centenas de trabalhos decifrando o vírus, sua infecção, tropismo e doença (MINER; DIAMOND, 2018).

## 1.2 O TROPISMO DOS *Flavivirus*

Mesmo pertencendo à mesma família, os *Flavivirus* não se comportam igualmente no organismo humano, causando distintas doenças sistêmicas, como DENV e YFV, algumas neurotrópicas, como as por ILHV, vírus *West Nile* (WNV), SLEV, vírus da encefalite japonesa (JEV) e ZIKV (RIVAROLA et al., 2017; PIERSON; DIAMOND, 2020).

Para melhor explicar a forma que tais vírus agem no organismo humano, são realizados estudos de susceptibilidade viral frente a diferentes linhagens celulares (BAKONYI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2018; DAI et al., 2021). Chan e colaboradores (2016) avaliaram a susceptibilidade do ZIKV a diversas linhagens celulares: células de placenta, de tecido nervoso, músculo, pulmão, rim, fígado, testículo, intestino e retina, sendo tais células de diferentes espécies animais. A maioria dos achados corroborou o observado na maioria dos casos humanos sintomáticos, inclusive o descrito em casos com manifestações pouco comuns, como o da menina com ZIKV que teve grave anemia e veio a óbito. Nesse caso, também, houve desconforto respiratório e a paciente necessitou de ventilação mecânica. O estudo, de Chan observou a replicação crescente do ZIKV em células pulmonares, que poderia estar relacionada ao caso mencionado.

Assim, nosso estudo busca trazer informações sobre a susceptibilidade a linhagens celulares de diferentes órgãos humanos a *Flavivirus* causadores de epidemias (como SLEV e ZIKV) e outros, causadores de casos humanos esporádicos mas com potencial emergente (como CPCV e ILHV), e ainda o vírus vacinal da Febre Amarela (YFV17DD). Nosso estudo também, inclui linhagens celulares de macaco e mosquito, visando a conhecer melhor o tropismo viral. O estudo, ainda, oferece informação sobre o que ocorre após imunização anti-amarílica com YFV17DD.

### 1.2.1 Dose Infecciosa para 50% da Cultura de Tecidos (TCID<sub>50</sub>)

A infecciosidade de um vírus é sua capacidade fundamental. Para saber essa infecciosidade utiliza-se a quantificação viral nos cultivos celulares. O teor ou título de um dado vírus é fornecido como quantidade de partículas virais infecciosas, por unidade de volume, comumente mililitros (mL) (LEI et al., 2020).

O ensaio de *plaque* (área comumente arredondada onde morrem todas as células numa camada de cultura celular, identificável a olho nu após coloração) é uma metodologia muito utilizada para quantificação (titulação) viral (SMITHER et al., 2013). No entanto, nem todo vírus e nem toda cultura celular permite que se observem *plaques* (HAMMARLUND et al., 2012; LÜLF et al., 2016). Como alternativa, existe outra metodologia muito utilizada para a titulação viral, o ensaio da Dose Infecciosa para 50% da Cultura de Tecidos - TCID<sub>50</sub> (SMITHER et al., 2013). TCID<sub>50</sub> permite definir a diluição de uma dada solução viral necessária para infectar e causar efeito citopático - ECP (morte ou grande alteração celular) em 50% das células em uma determinada cultura celular (LEI et al., 2020). A detecção do ECP é feita por observação a olho nu dos poços corados após coloração com solução corante de Cristal Violeta, comparando os poços infectados aos poços não infectados, que se mantém com a monocamada íntegra. Nesse caso o título viral é fornecido em TCID<sub>50</sub>/mL utilizando o método de cálculo descrito por Reed e Muench (REED; MUENCH, 1938), mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Fórmula para cálculo do título viral por TCID<sub>50</sub>, segundo Reed e Muench

$$\text{Índice de correção (IC)} = \frac{(\% \text{ de poços com CPE na diluição acima de } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ de poços com CPE na diluição acima de } 50\%) - (\% \text{ de poços com CPE na diluição abaixo de } 50\%)}$$

$$\text{TCID}_{50}/\text{mL} = \frac{10^{(\log \text{ da diluição acima de } 50\% + \text{IC})}}{\text{volume do inóculo em mL}}$$

Fonte: adaptado de REED; MUENCH, 1938.

Em diversos estudos de cinética de replicação viral em cultura celular o título dos vírus é exibido em TCID<sub>50</sub>/mL (BAKONYI et al., 2005; SVENSSON et al., 1999; BRIEN et al., 2013; SMITHER et al., 2013; AGBULOS et al., 2016; KARAKUS et al., 2018; SMITH et al., 2019; AMANAT et al., 2020; MENDOZA et al., 2020; AMARILLA et al., 2021). Portanto, essa foi a metodologia utilizada neste trabalho para quantificar teores virais nos estoques e em outras situações ocorridas durante o estudo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o tropismo de diferentes *Flavivirus* brasileiros por células dos tecidos de diferentes órgãos identificando novas linhagens celulares susceptíveis.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudos da cinética replicativa viral para CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV nas células Caco-2, Calu-3, C6/36, HEK293T, HeLa, HUVEC, U251-MG, Vero CCL81 e Vero E6.
- Fazer titulação viral TCID<sub>50</sub> 0 a 72 horas pós-infecção em células Caco-2, Calu-3, C6/36, HEK293T, HeLa, HUVEC, U251-MG, Vero CCL81 e Vero E6, para vírus CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV.
- Avaliar a susceptibilidade das células Caco-2, Calu-3, C6/36, HEK293T, HeLa, HUVEC, U251-MG, Vero CCL81 e Vero E6, aos vírus CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV, buscando conhecer seus tropismos aos tecidos.
- Conhecer linhagens celulares susceptíveis para a amplificação de CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

#### 3.1 CÉLULAS

Células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2), células embrionárias de rim humano (HEK293T), célula de adenocarcinoma cervical humano (HeLa), células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC), células de glioblastoma humano (U251-MG) e células de rim de macaco verde africano (Vero CCL81 e Vero E6) foram mantidas em meio Dulbecco MEM (DMEM; Vitrocell, BRA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, BRA) em estufa, a 37°C e com 5% de atmosfera com CO<sub>2</sub>. Células de adenocarcinoma de pulmão humano (Calu-3) foram mantidas em meio Dulbecco MEM (DMEM; Vitrocell, BRA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, BRA) e 1x MEM *Non-essential Amino Acid Solution* (100×) (Sigma-Aldrich, EUA), em estufa, a 37°C e com 5% de atmosfera com CO<sub>2</sub>. Células de larva de *Aedes albopictus* (C6/36) foram mantidas em meio Leibovitz (L-15; Vitrocell, BRA) suplementado com 10% de SFB em estufa, a 25°C. Após infecção as células foram mantidas em seu respectivo meio de cultura substituído por 2% de SFB. Todos os meios de cultura utilizados continham 1% de solução antibiótica contendo Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA).

As células Caco-2, Calu-3, HeLa e HUVEC foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ronaldo Bragança Martins Júnior e pelo Me. Carlos Fabiano Capato, pesquisadores neste Centro de Pesquisa em Virologia, no laboratório do Prof. Eurico de Arruda Neto.

#### 3.2 VÍRUS

Os *Flavivirus* utilizados neste estudo são: Cacipacoré (CPCV - número do GenBank: NC\_026623.1), Ilhéus (ILHV- número do GenBank: NC\_009028.2), Encefalite de *Saint Louis* (SLEV- número do GenBank: NC\_007580.2), pertencentes ao Banco de Arbovírus do Centro de Pesquisa em Virologia (FMRP-USP) no laboratório do Prof. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. Febre Amarela vacinal (YF17DD - número do GenBank: U17066.1) e Zika (ZIKV- número do GenBank: KU321639.1), gentilmente cedidos pelo Me. Vitor Gonçalves Floriano, pesquisador deste Centro de Pesquisa em Virologia, no laboratório do Prof. Benedito Antônio Lopes da Fonseca. Os estoques virais foram feitos em células Vero CCL81. Para tanto, fazia-se a respectiva infecção e após observar ECP, o sobrenadante da cultura celular era coletado e

armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os vírus contidos nos estoques foram quantificados por método  $\text{TCID}_{50}$  (AMARILLA et al., 2021).

### 3.3 CURVAS DE CRESCIMENTO VIRAL

Para as curvas de crescimento viral infectavam-se células em duplicata com CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV na multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 de vírus por célula contida nas colônias de células Caco-2, Calu-3, C6/36, HEK-293T, HeLa, HUVEC, U251-MG, Vero CCL81 e Vero E6. Após a infecção, sobrenadantes do cultivo foram coletados em 0 hora, 24 horas, 48 horas e 72 horas e os vírus foram quantificados em  $\text{TCID}_{50}$  (AMARILLA et al., 2021).

Para a quantificação, foram colocadas  $4 \times 10^4$  células Vero CCL81, por poço da microplaca de 96 *wells*. No dia seguinte os sobrenadantes coletados foram submetidos a diluição decimal em meio DMEM com 2% de SFB. Por poço foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição em triplicata. Quatro dias após a infecção o inóculo era retirado e as células fixadas por uma noite com 10% de formaldeído à temperatura ambiente e coradas por 1 hora com solução de cristal violeta 0,2 % para evidenciar orifícios em que havia ECP (células mortas). A solução corante era removida, as placas eram lavadas com água corrente e secas a temperatura ambiente e eram observadas olho nu. O título viral, com base em orifícios infectados (com ECP) era calculado por método de Reed e Muench (1938).

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

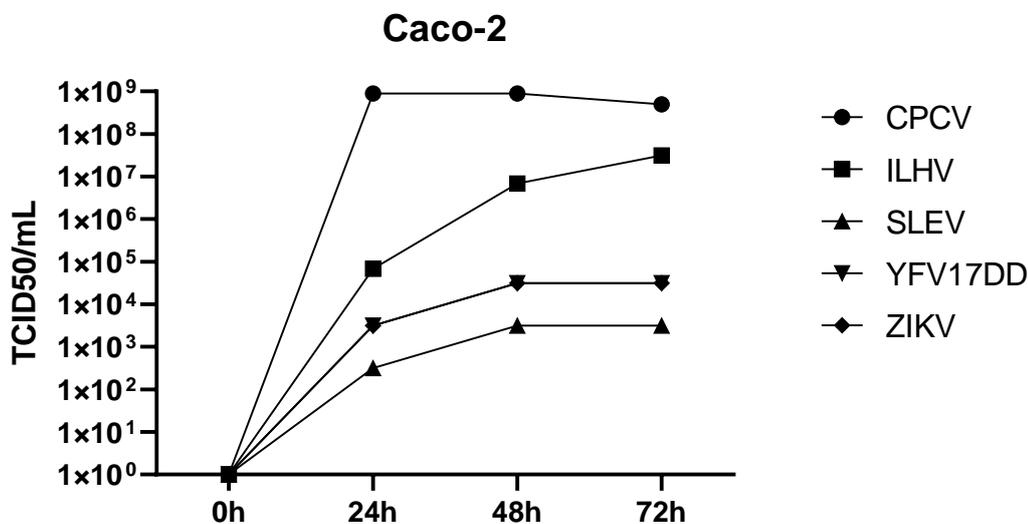
A análise estatística comparando as infecções por vírus nos diferentes tempos pós-infecção, nas diferentes linhagens celulares, foi feito por ANOVA de duas vias e o teste de múltiplas comparações de Tukey, para  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas com auxílio do programa *GraphPad Prism* 8.0.1.

#### 4 RESULTADOS

A susceptibilidade das linhagens celulares Caco-2, Calu-3, C6/36, HEK293 T, HeLa, Huvec, U-251 MG, Vero CCL81 e Vero E6 a CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV foi avaliada pelas curvas temporais (0, 24, 48 e 72 horas pós-infecção) de crescimento desses vírus, obtida pela coleta de sobrenadantes da cultura.

Observou-se teores crescentes de vírus 0, 24, 48 e 72 horas pós-infecção, nas células Caco-2 como mostra a Figura 6. Todos os vírus aumentaram seus títulos de  $10^2$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL. 24 horas pós-infecção CPCV manteve o título viral de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL até 72 h.p.i. ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV tiveram seus títulos aumentados 48h pós-infecção, tcom  $10^3$  a  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL, mantendo-o 72h pós-infecção. Fez exceção ILHV, que aumentou seu título para  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL. Portanto, às células Caco-2 foram mais susceptíveis a ILHV do que a SLEV, YFV17DD e ZIKV ( $p < 0,05$ ). Também, as células Caco-2 foram menos susceptíveis ao SLEV que YFV17DD e ZIKV ( $p < 0,05$ ).

Figura 6 – Cinética de crescimento temporal dos *Flavivirus* em células Caco-2

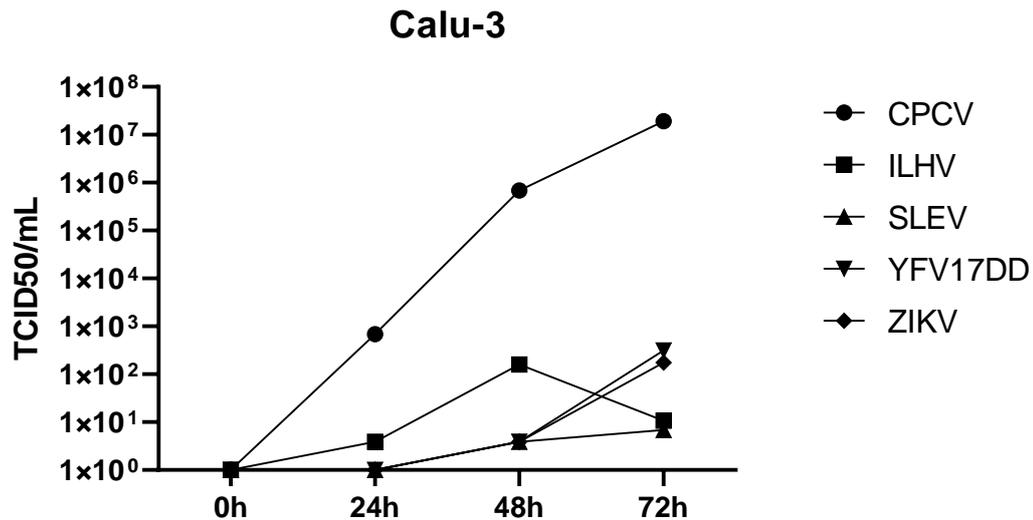


Foram analisados CPCV (círculo), ILHV (quadrado), SLEV (triângulo), YFV17DD (triângulo invertido) e ZIKV (losango) em células CACO-2. As células CACO-2 foram infectadas com 0,01 MOI e os sobrenadantes do cultivo celular coletados 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção. YFV17DD e ZIKV encontram sobrepostos no gráfico

As células Calu-3 mostraram susceptibilidade mais variável aos *Flavivirus* testados como mostra a Figura 7. Apenas CPCV elevou seus teores exponencialmente ao longo do tempo pós-infecção, de  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL em 24h para  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL em 72h. ILHV exibiu replicação crescente até 48 h.p.i. a  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL, no entanto, reduziu seus teores a  $10^1$  TCID<sub>50</sub>/mL em 72 h.p.i. SLEV, YFV17DD e ZIKV exibiram-se em teores detectáveis apenas 48 h.p.i. e estes

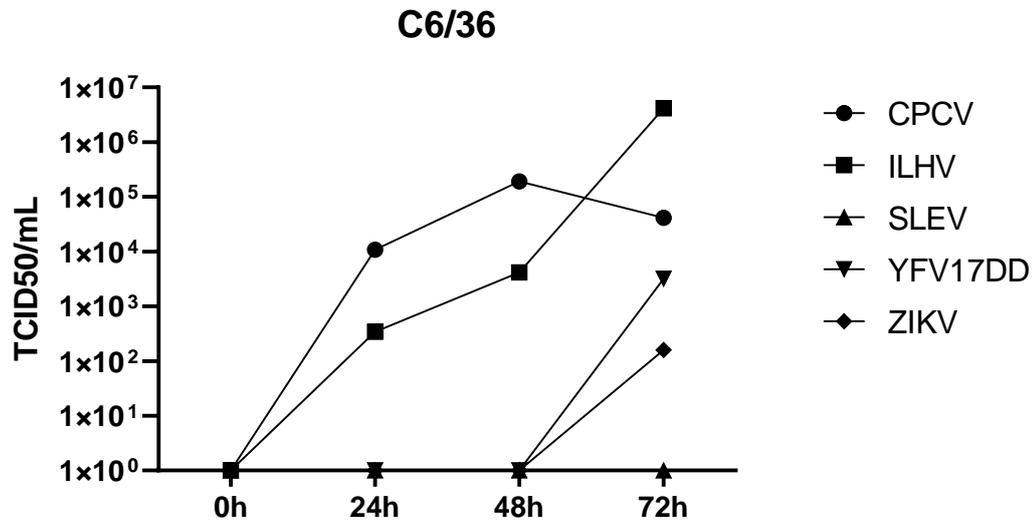
se elevaram a  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL em 72 h.p.i. A susceptibilidade das células Calu-3 a CPCV mostrou-se maior que aquela a ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV 24 e 48 h.p.i. ( $p < 0,05$ ). Ainda, células Calu-3 mostraram-se menos susceptíveis a ILHV e SLEV que a YFV17DD, 72 h.p.i. ( $p < 0,05$ ).

Figura 7 – Cinética de crescimento temporal dos *Flavivirus* em células Calu-3



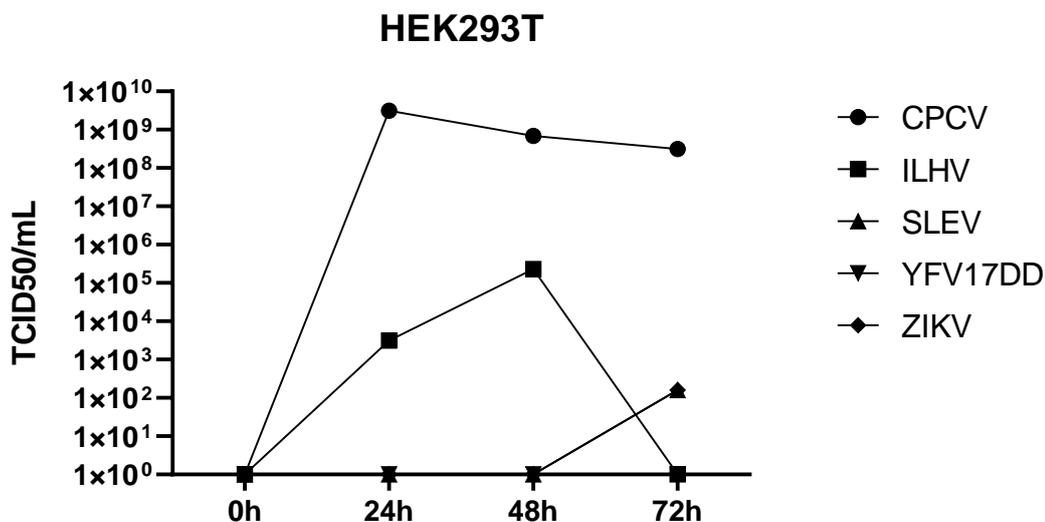
Foram analisados CPCV (círculo), ILHV (quadrado), SLEV (triângulo), YFV17DD (triângulo invertido) e ZIKV (losango) em células Calu-3. As células Calu-3 foram infectadas com 0,01 MOI e os sobrenadantes do cultivo celular coletados 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção.

Nas células C6/36, mostradas na Figura 8 os vírus CPCV e ILHV apresentaram teores crescentes de 0 a 48 h.p.i, de  $10^3$  e  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL em 24h.p.i, respectivamente e  $10^5$  e  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL, respectivamente. Com 72h.p.i. CPCV reduziu seu título ( $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL) quando comparado a tempo 48h.p.i. ILHV elevou seus teores 48 h.p.i.  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL. SLEV não foi detectado nos tempos pós infecção do estudo. YFV17DD e ZIKV comportaram-se de forma semelhante, não foram detectados até 48 h.p.i. mas exibiram teores de  $10^3$  e  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL 72 h.p.i, respectivamente. Houve diferença entre a susceptibilidade das células C6/36 a SLEV e YFV17DD 72 h.p.i. ( $p < 0,05$ ).

Figura 8 – Cinética de crescimento temporal dos *Flavivirus* em células C6/36

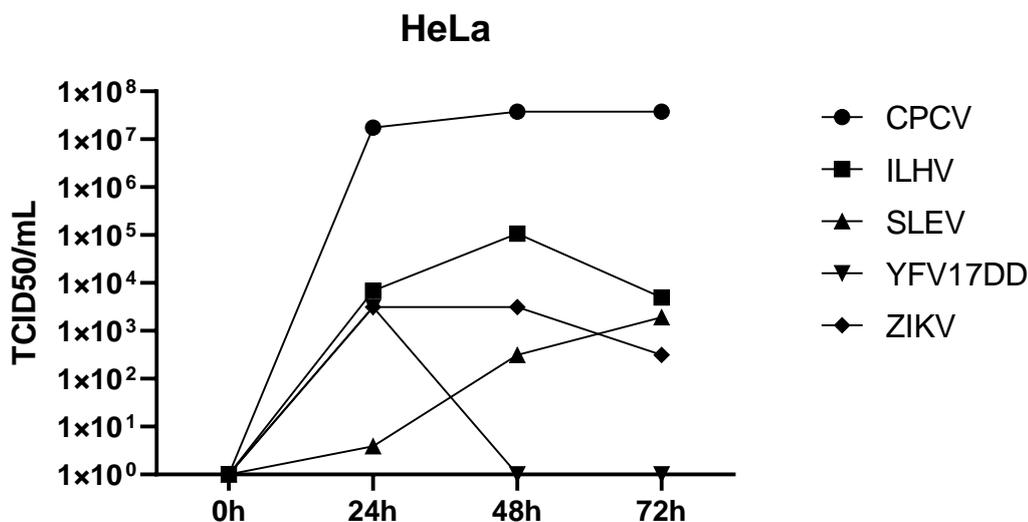
Foram analisados CPCV (círculo), ILHV (quadrado), SLEV (triângulo), YFV17DD (triângulo invertido) e ZIKV (losango) em células C6/36. As células C6/36 foram infectadas com 0,01 MOI e os sobrenadantes do cultivo celular coletados 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção.

Em células HEK293T o CPCV mostrou título de  $10^9$  TCID<sub>50</sub>/mL 24 h.p.i. com queda 48 h.p.i e manutenção 72 h.p.i ( $10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL), como mostra a Figura 9. ILHV apresentou elevação nos seus teores até 48 h.p.i.,  $10^3$  e  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL e não foi detectado 72 h.p.i. SLEV e ZIKV foram detectados, em título de  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL apenas 72 h.p.i. YFV17DD não foi detectado pós-infecção nessa linhagem celular. As células HEK293T mostraram-se mais susceptíveis ao CPCV que aos SLEV, YFV17DD e ZIKV ( $p < 0,05$ ). As células HEK293T mostraram-se mais susceptíveis aos ILHV que aos SLEV, YFV17DD e ZIKV 24 h.p.i ( $p < 0,05$ ).

Figura 9 – Cinética de crescimento temporal dos *Flavivirus* em células HEK293T

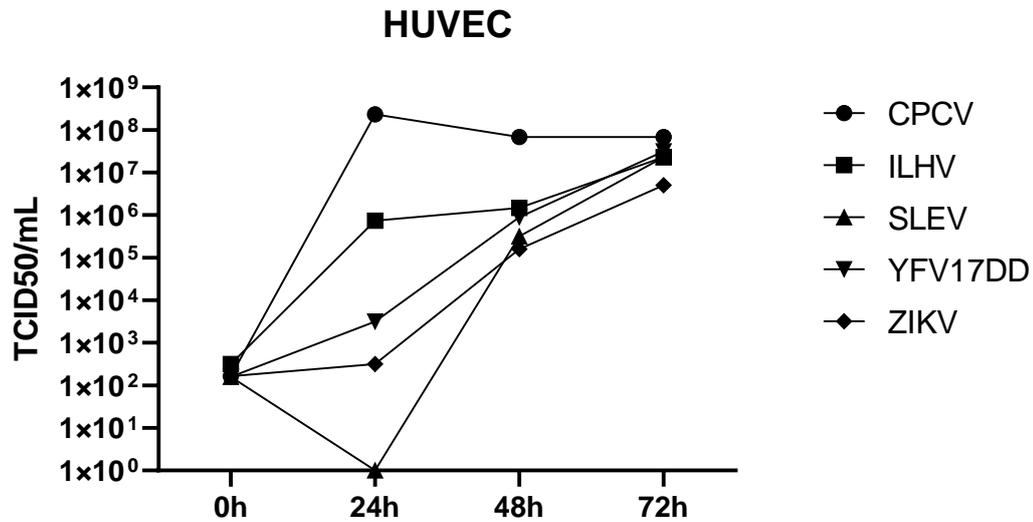
Foram analisados CPCV (círculo), ILHV (quadrado), SLEV (triângulo), YFV17DD (triângulo invertido) e ZIKV (losango) em células HEK293T. As células HEK293T foram infectadas com 0,01 MOI e os sobrenadantes do cultivo celular coletados 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção.

Na linhagem celular HeLa, mostrada na Figura 10, todos os *Flavivirus* analisados replicaram com elevação temporal de seus títulos de  $10^0$  a  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL. CPCV manteve seu título até 72 h.p.i.,  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL. ILHV e SLEV tiveram aumento nos tempos seguintes pós-infecção,  $10^4$  e  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL, respectivamente. No entanto, ILHV reduziu seu título 72 h.p.i.,  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL, enquanto o de SLEV se manteve,  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL. YFV17DD e ZIKV reduziram seus títulos 48 e 72 h.p.i., de ZIKV,  $10^3$  a  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL, respectivamente, YFV17DD não foi detectado 48 e 72 h.p.i. A linhagem celular HeLa mostrou-se mais susceptível à infecção por ILHV 24 h.p.i que para SLEV, YFV17DD e ZIKV ( $p < 0,05$ ). Também, a linhagem celular HeLa foi mais susceptível ao SLEV que a YFV17DD e ZIKV. Nas amostras de 48 h.p.i a linhagem celular HeLa mostrou-se mais susceptível ao SLEV que aos vírus YFV17DD e ZIKV ( $p < 0,05$ ). Ainda, as células HeLa foram mais susceptíveis ao ZIKV 48 h.p.i e 72 h.p.i quando comparada ao YFV17DD ( $p < 0,05$ ).

Figura 10 – Cinética de crescimento temporal dos *Flavivirus* em células HeLa

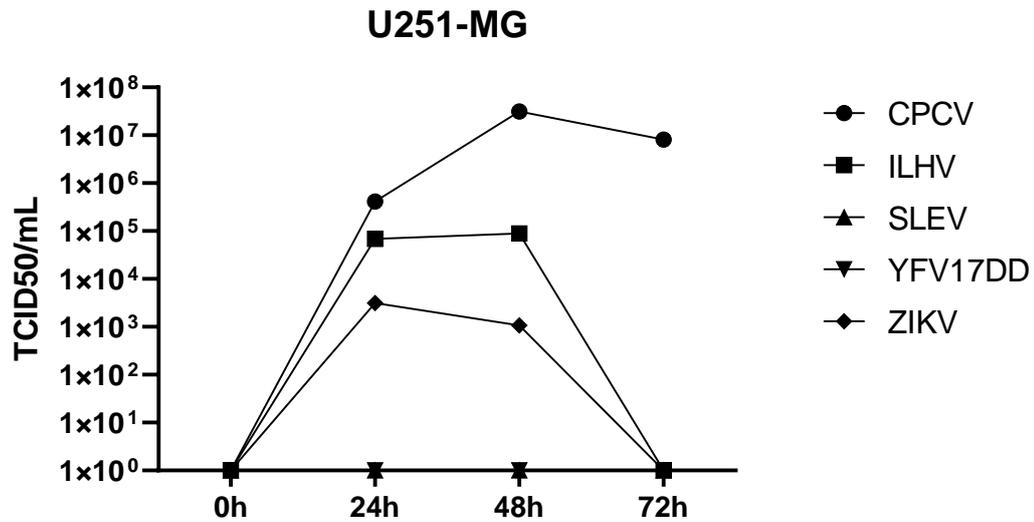
Foram analisados CPCV (círculo), ILHV (quadrado), SLEV (triângulo), YFV17DD (triângulo invertido) e ZIKV (losango) em células HeLa. As células HeLa foram infectadas com 0,01 MOI e os sobrenadantes do cultivo celular coletados 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção.

Sendo mais sensíveis e por perderem facilmente a aderência, as células HUVEC em cultura, após a adsorção viral por 1 hora, foram lavadas nos poços por apenas 3 vezes e não 5 como as outras linhagens. Nestas células, observou-se ECP no tempo 0h.p.i. provavelmente por resquício de partículas virais no sobrenadante mesmo após as 3 lavagens. Também, observou-se que os *Flavivirus* analisados exibiram títulos crescentes de 24 a 72 h.p.i.,  $10^0$  a  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL em 24 h.p.i. e todos apresentaram  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 72 h.p.i., confirmando a susceptibilidade destas células HUVEC, como mostra a Figura 11. as células HUVEC mostraram maior susceptibilidade a YFV17DD e ZIKV 24 h.p.i. quando comparados ao SLEV ( $p < 0,05$ ). As células HUVEC foram mais susceptíveis a YFV17DD que ao ZIKV ( $p < 0,05$ ). Ainda, as células HUVEC foram mais susceptíveis ao CPCV 48 h.p.i. que a ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV ( $p < 0,05$ ). Nesse mesmo tempo, ILHV causou mais susceptibilidade que SLEV ( $p < 0,05$ ). Finalmente, as células HUVEC foram mais susceptíveis ao CPCV em 72 h.p.i. que a YFV17DD e ZIKV ( $p < 0,05$ ).

Figura 11 – Cinética de crescimento temporal dos *Flavivirus* em células HUVEC

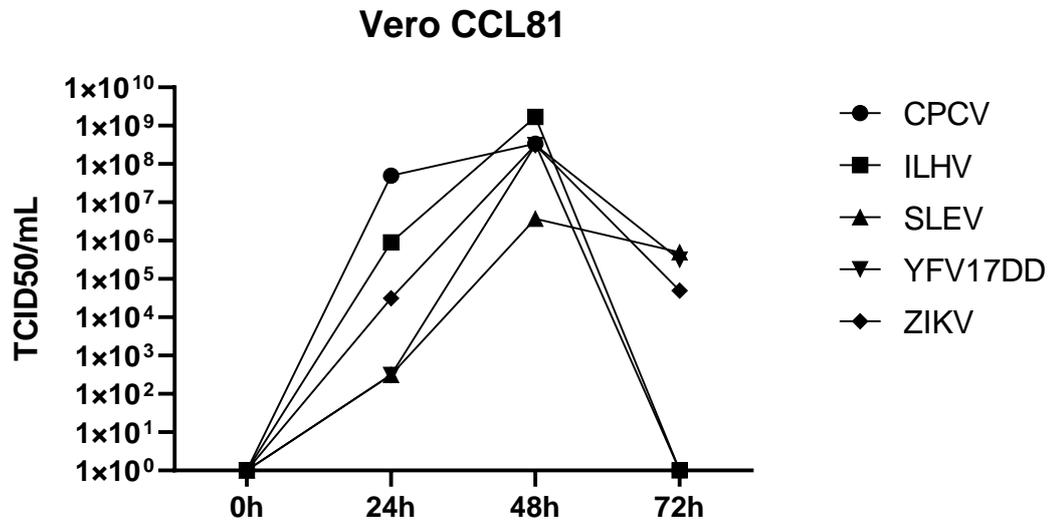
Foram analisados CPCV (círculo), ILHV (quadrado), SLEV (triângulo), YFV17DD (triângulo invertido) e ZIKV (losango) em células HUVEC. As células HUVEC foram infectadas com 0,01 MOI e os sobrenadantes do cultivo celular coletados 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção

Nas células U251 MG mostradas na Figura 12, observou-se elevação consecutiva no título do CPCV entre 0 e 48 h.p.i.,  $10^0$  a  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL, com redução 72 h.p.i.,  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL. ILHV apresentou elevação no título 24 h.p.i.,  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL, mantendo-se assim 72 h.p.i. ZIKV elevou o título 24 h.p.i.,  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL, com queda consecutiva 48h.p.i.,  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL e não sendo detectado 72 h.p.i. SLEV e YFV17DD não foram detectados após infecção desta linhagem celular. As células U251 MG mais susceptíveis a ILHV 24 h.p.i que SLEV, YFV17DD E ZIKV ( $p < 0,05$ ). às células U-251 MG que os vírus SLEV, YFV17DD E ZIKV. As células U251 MG mostraram-se mais susceptíveis a ZIKV comparado a SLEV e YFV17DD e mais susceptíveis ( $p < 0,05$ ). Finalmente, as células U251 MG mostraram-se mais susceptíveis a CPCV que os outros 4 vírus do estudo ( $p < 0,05$ ).

Figura 12 – Cinética de crescimento temporal dos *Flavivirus* em células U-251MG

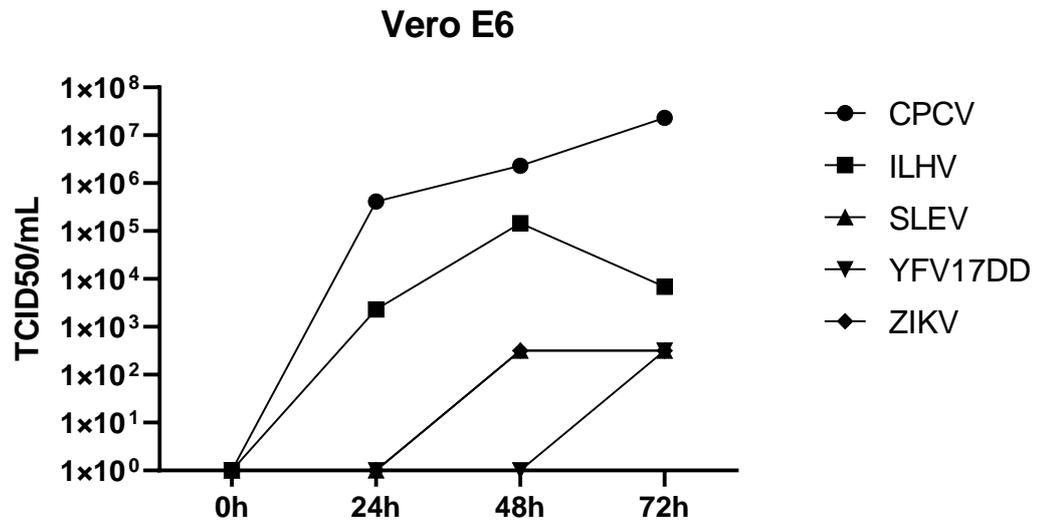
Foram analisados CPCV (círculo), ILHV (quadrado), SLEV (triângulo), YFV17DD (triângulo invertido) e ZIKV (losango) em células U-251 MG. As células U-251 MG foram infectadas com 0,01 MOI e os sobrenadantes do cultivo celular coletados 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção.

Na linhagem celular Vero CCL81, mostrada na Figura 13, todos os vírus apresentaram um mesmo perfil de infecção, com aumento do título viral 24 e 48 h.p.i. e queda deste título em 72 h.p.i., de  $10^2$  a  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 24 h.p.i.,  $10^6$  a  $10^9$  TCID<sub>50</sub>/mL 48 h.p.i., e  $10^0$  a  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL 72 h.p.i. A linhagem celular Vero CCL81 exibiu maior susceptibilidade a ZIKV 24 h.p.i. que a SLEV e YFV17DD ( $p < 0,05$ ). No tempo 48 h.p.i., as células Vero CCL81 exibiram maior susceptibilidade a YFV17DD e ZIKV que ao SLEV ( $p < 0,05$ ). E em 72 h.p.i. o YFV17DD produziu maior susceptibilidade que CPCV, ILHV e ZIKV ( $p < 0,05$ ).

Figura 13 – Cinética de crescimento temporal dos *Flavivirus* em células Vero CCL81

Foram analisados CPCV (círculo), ILHV (quadrado), SLEV (triângulo), YFV17DD (triângulo invertido) e ZIKV (losango) em células Vero CCL81. As células Vero CCL81 foram infectadas com 0,01 MOI e os sobrenadantes do cultivo celular coletados 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção.

Na infecção das células Vero E6, mostradas na Figura 14, CPCV elevou seus teores de forma crescente, de  $10^5$  a  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL. ILHV elevou seu título 24 e 48 h.p.i.,  $10^3$  a  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL, respectivamente, com queda em 72 h.p.i.,  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL. SLEV e ZIKV elevaram seus títulos 48 h.p.i., a  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL e este se manteve até 72 h.p.i. YFV17DD foi detectado apenas 72 h.p.i., com  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL. As células Vero E6 foram mais susceptíveis a ILHV 48 e 72 h.p.i. comparadas a SLEV, YFV17DD e ZIKV ( $p < 0,05$ ). Finalmente, as células Vero E6 foram mais susceptíveis a SLEV e ZIKV que ao YFV17DD 48 h.p.i ( $p < 0,05$ ).

Figura 14 – Cinética de crescimento temporal dos *Flavivirus* em células Vero E6

Foram analisados CPCV (círculo), ILHV (quadrado), SLEV (triângulo), YFV17DD (triângulo invertido) e ZIKV (losango) em células Vero E6. As células Vero E6 foram infectadas com 0,01 MOI e os sobrenadantes do cultivo celular coletados 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção.

## 5 DISCUSSÃO

Estudos com infecções de *Flavivirus* como ZIKV, JEV e WNV para avaliar a susceptibilidade de células epiteliais nasais (VIELLE et al., 2019), DENV e ZIKV em células C6/36 (SHAH et al., 2018), YFV17D e WNV em células Vero 76 (REIS et al., 2021), tiveram o sobrenadante coletado 72 horas pós-infecção, permitindo observar adequadamente o resultado da infecção viral, inclusive a cinética de replicação dos *Flavivirus*. Por isso, nosso estudo de cinética replicativa, também, foi realizado de 0 a 72 horas após a infecção o que nos permitiu observar a susceptibilidade das células aos vírus do estudo.

A metodologia utilizada para obtenção do teor viral nos permitiu ver a olho nu os locais onde houve morte celular nos poços das placas coradas com cristal violeta. Para a leitura a olho nu, é necessário que as placas sejam observadas contra a luz, comparando os poços contendo vírus aos poços contendo apenas meio puro, no caso, o controle negativo. Assim, foi possível observar as áreas com efeito citopático e morte de células. Os poços contendo efeito citopático e morte de células foram contados permitindo determinar a quantidade de vírus por TCID<sub>50</sub>/ml.

Os resultados desse trabalho mostram que as linhagens celulares mais susceptíveis aos CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV foram Vero CCL81, HUVEC e Caco-2. Assim, além da célula Vero CCL81, comumente utilizada para replicação e amplificação de vírus, incluímos outras 2 linhagens que são permissivas aos vírus em questão, as células HUVEC e Caco-2.

Existem quatro sublinhagens de células Vero, dentre elas, a Vero CCL81 e a Vero E6, utilizadas nesse estudo, ambas possuem produção deficiente de IFN, que é importante na resposta antiviral e por isso são susceptíveis a vírus em geral, o que não é diferente para os *Flavivirus* (EMENY; MORGAN, 1979; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Sabe-se que a linhagem CCL81 é mais susceptível a arbovírus como JEV, e a E6 a vírus respiratórios como SARS-CoV-2, no entanto, os motivos ainda não são muito bem esclarecidos (KONISHI et al., 2022). Observamos que até 48 h.p.i. nas células Vero CCL81, todos os vírus exibiram teores crescentes. Ao final do experimento, 72 horas h.p.i., os vírus apresentaram queda nos teores de vírus. É possível que a redução nos teores de vírus deva-se à morte celular. Sem células vivas, não há possibilidade de replicação viral. Em suma, corroboramos o conhecimento prévio que a linhagem de células Vero CCL81 é de extrema utilidade, com uso amplo na virologia. Também, as células Vero E6, que apresentaram teores virais mais baixos quando comparada à sublinhagem Vero CCL81, foram susceptíveis aos *Flavivirus* analisados.

As células HUVEC são conhecidas como susceptíveis a *Flavivirus* como os DENV (AVIRUTNAN et al., 1998; CONCEIÇÃO et al., 2013). Inclusive a susceptibilidade destas células tem sido estreitamente relacionada aos casos de Dengue grave e hemorrágico

(CONCEIÇÃO et al., 2013). Sabe-se que a síndrome de extravasamento capilar no Dengue grave dá-se após a infecção das células endoteliais, que recrutam a resposta imunológica do hospedeiro, resultando na alteração da permeabilidade dos vasos, o que pode facilitar também a disseminação da infecção a outros tecidos (FIGUEIREDO, 1999). A susceptibilidade da linhagem endotelial HUVEC aos *Flavivirus* estudados, sugere que estes vírus da mesma família e gênero também infectem o endotélio, o que teria relevância na patogênese de suas doenças. Portanto, nossos resultados corroboram trabalhos anteriores, sugerindo que infecções por *Flavivirus* sejam capazes de desencadear alteração na permeabilidade de células endoteliais.

Manifestações clínicas como desconforto abdominal e diarreia, relacionados à infecção e doença por alguns *Flavivirus* analisados neste estudo poderiam estar associados a infecção de células da mucosa intestinal (CARDONA-CARDONA; MORALES, 2016; BACHILLER-LUQUE et al., 2016; WHITE et al., 2018). A presença de antígeno viral de WNV no intestino de pacientes que vieram à óbito também já foi relatada (ARMAH et al., 2007). A linhagem intestinal analisada no presente estudo, Caco-2, é conhecida por ser susceptível à *Flavivirus* (SUZUKAWA et al., 2020), o que corroboramos no presente estudo. CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV se mostraram infectando as células e replicando durante todo o período pós-infecção analisado. Esse resultado sugere não só um tropismo intestinal dos vírus estudados, mas, também, uma possível persistência dos mesmos em mucosa intestinal, sem causar morte celular em curto período, o que tornaria este órgão importante na manutenção da infecção.

Em um caso fatal de infecção por ZIKV ocorrido em 2016, numa paciente com anemia, observou-se que apresentava insuficiência respiratória grave, que necessitou ventilação mecânica (ARZUZA-ORTEGA et al., 2016). No nosso estudo, a linhagem celular de pulmão Calu-3, apresentou baixa susceptibilidade aos 5 *Flavivirus* estudados. Entretanto, mesmo com baixos teores 0 a 72 horas após infecção foi possível observar a replicação de ZIKV. Chamou atenção o CPCV, que apresentou aumento crescente em seu título nos tempos pós-infecção. Nosso estudo corrobora trabalhos anteriores mostrando ZIKV em *swabs* de nasofaringe e saliva (FONSECA et al., 2014; BINGHAM et al., 2016), sugerindo uma replicação viral no trato respiratório. É provável que CPCV, ILHV, SLEV e YFV17DD repliquem em células do trato respiratório.

As células de mosquito, C6/36, foram susceptíveis aos *Flavivirus* estudados exceto o SLEV. É possível que o curto tempo de estudo, 72 horas, não tenha sido permitido detectar SLEV infectando as células. A capacidade das células C6/36 de se infectarem com *Flavivirus* tem sido evidenciada em outros trabalhos (FIGUEIREDO, 1990).

No presente estudo, as células renais HEK293T mostraram-se susceptíveis a todos os *Flavivirus* estudados exceto o YFV17DD. Destacaram-se os altos teores de CPCV e ILHV. Sabe-se que ZIKV é mais detectado em amostras de urina do que nas de sangue, sugerindo presença do vírus no tecido renal (BONALDO et al., 2016). Também, estudos *in vivo* para investigar a patogenicidade do ILHV descreveram a presença viral nas amostras de rim dos animais infectados (AZEVEDO et al., 2010). Nosso estudo corrobora com o que se sabe sobre o tropismo renal dos *Flavivirus*.

A primeira linhagem celular humana desenvolvida foi a HeLa (GEY; COFFMAN; KUBICEK, 1952). Proveniente do cérvix uterino, essa linhagem foi descrita como atenuadora da virulência de *Flavivirus* após 6 passagens consecutivas (DUNSTER et al., 1990). Os resultados do presente estudo mostraram a susceptibilidade das células HeLa aos *Flavivirus* estudados, sugerindo um tropismo destes vírus pelo sistema reprodutor feminino. Estudos mostram a presença de genoma de ZIKV em amostras de muco cervical mesmo depois do *clearance* no sangue (MORELLI et al., 2020). Nossos resultados corroboram os de outros trabalhos e sugerem que outros *Flavivirus*, também, possam ser encontrados em tecido uterino ou fluido tecidual, visto a susceptibilidade da linhagem HeLa aos mesmos.

Sabe-se que alguns *Flavivirus* em suas infecções têm comportamento neurotrópico. A linhagem de células do tecido nervoso utilizada no presente estudo, U251MG, mostrou-se susceptível ao CPCV, ILHV e ZIKV, inclusive com notável morte celular. Nos casos de ZIKV descreveu-se SGB e inclusive uma doença congênita neurotrópica, a SCZ. Também, casos de encefalite têm sido descritos por ILHV (OEHLER et al., 2014; BRASIL, 2017; MILIHM et al., 2020). Estudo *in vivo* sobre a patogenia de ILHV, mostrou alteração cerebral dos animais, que morreram por encefalite (AZEVEDO et al., 2010). Ainda, notificou-se um caso fatal de idoso em que se detectou ILHV no liquor. O paciente apresentava edema cerebral consequente à doença neurotrópica (MILHIM et al., 2020). Finalmente, CPCV, também, deve ser um vírus neurotrópico visto que que apresentou seus maiores títulos na linhagem U-251MG.

Portanto observamos neste trabalho que os *Flavivirus* CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV infectam *in vitro* células de origem intestinal, epitelial, pulmonar, renal, cervical uterina e neuronal, com a exceção das células renais ao YFV17DD. Nossos resultados corroboram aqueles descritos em infecções por ZIKV, dentre os cinco vírus do estudo aquele com mais estudos publicados. Por fim, nossos resultados sugerem que CPCV e ILHV tenham tropismo celular parecido ao do ZIKV.

## 6 CONCLUSÕES

Os *Flavivirus* CPCV, ILHV, SLEV, YFV17DD e ZIKV infectam *in vitro* células de origem intestinal, epitelial, pulmonar, renal, cervical uterina e neuronal, com a exceção das células renais ao YFV17DD.

CPCV, ILHV e ZIKV mostraram tropismo por células de tecido nervoso, o que pode ter relevância na patogenia de suas infecções humanas.

As células Vero CCL81, HUVEC e Caco-2 foram mais susceptíveis aos vírus estudados e podem ser utilizadas rotineiramente na amplificação dos vírus estudados.

## Parte 2:

# Construção de vírus vacinal da Febre Amarela e deste vírus recombinante com proteínas do vírus Zika

### 1 INTRODUÇÃO

Até o momento, não existem medicamentos aprovados para infecções por *Flavivirus*. Considerando o número anual de casos, morbidade e letalidade das doenças por *Flavivirus*, bem como a presença de vetores e hospedeiros por praticamente todo o globo, é essencial o desenvolvimento de medidas de tratamento ou protetivas para infecções por muitos *Flavivirus*. O vírus Zika (ZIKV) é um importante *Flavivirus* para o qual deve-se desenvolver tais medidas protetivas.

Considerando que uma vacina seria o instrumento mais efetivo para prevenir infecções por ZIKV (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015), no presente trabalho, buscamos construir um vírus recombinante quimérico, pela metodologia denominada CPER (do inglês, *Circular Polymerase Extension Reaction*), utilizando como *backbone* o vírus vacinal da Febre Amarela 17D ao qual acrescentamos genes codificadores de proteínas antigênicas do ZIKV. Este vírus recombinante poderia ser um possível candidato vacinal.

#### 1.1 VACINAS

Existem relatos históricos de imunização desde antes de 1700 na Ásia. No entanto, apenas em 1798, Edward Jenner desenvolveu e testou uma vacina contra a varíola baseada no material purulento de pústulas de bovinos infectados com *cowpox*. Este, é o primeiro relato histórico de uma vacina capaz de gerar proteção contra uma doença na pessoa imunizada (SADANAND, 2020).

Hoje são conhecidos 8 diferentes tipos de vacinas. Incluindo a maioria das vacinas aprovadas atualmente para uso humano, estão as de vírus vivo-atenuado ou inativado. As vacinas vivas-atenuadas buscam manter o microrganismo íntegro e infectante mas incapaz de produzir doença. Estas vacinas são capazes de ativar todas as respostas imunológicas no

indivíduo porque mimetizam uma infecção comum. As vacinas vivas-atenuadas proporcionam uma imunidade robusta e de longa duração, em geral, sem necessidade de reforço vacinal. Como exemplo, temos a vacina anti-amarílica. As vacinas contendo vírus inativado incluem um microrganismo não infectante. Portanto, estas vacinas embora sejam mais seguras quanto a efeitos colaterais relacionados ao patógeno, proporcionam uma imunidade induzida pela presença de antígenos do microrganismo completo. Entretanto, por serem menos imunogênicas, em geral, exigem uma segunda dose vacinal de reforço (KRAMMER, 2020).

Outro tipo de vacinas são aquelas de subunidade. Em geral, são compostas por uma ou mais proteínas antigênicas do microrganismo. Tratam-se de vacinas extremamente seguras mas de capacidade imunogênica inferior às anteriores e exigem revacinação. Exemplo são as vacinas de VLP (do inglês, *Virus Like Particles*), compostas por uma ou mais proteínas estruturais do microrganismo, no caso dos *Flavivirus* incluem apenas a carcaça do envelope viral, sem material genético (KRAMMER, 2020).

Considerando vacinas mais modernas, temos aquelas de vetores virais que podem ser replicantes ou não-replicantes. São compostas por um vírus incapaz de causar doença em seres humanos, como o adenovírus de macaco, por exemplo. Utilizam o vírus vetor expressando proteínas antigênicas do microrganismo de interesse. No caso das vacinas de vetor replicante, estas são menos seguras, especialmente para indivíduos imunossuprimidos. Ambas podem exigir revacinação (KRAMMER, 2020).

Outros tipos de vacinas são as gênicas, de DNA ou RNA. São compostas pela sequência nucleotídica do gene codificador de determinada proteína imunogênica do microrganismo de interesse. Normalmente, são sequências de genes encapsuladas que ao adentrarem as células do vacinado as próprias células produzem as proteínas que proporcionam imunidade. Em geral estas vacinas exigem revacinação e tem desenvolvimento e produção de alto custo (KRAMMER, 2020). Por fim, as vacinas tumorais, as chamadas CAR-T cell, incluem células do próprio paciente, modificadas para combaterem seu tumor. Quando utilizadas, produzem menos efeitos colaterais que as quimioterapias clássicas, no entanto, ainda não são disponíveis para a maioria dos tumores e tem um custo elevado (SAXENA et al., 2021)

#### 1.1.1 Vacinas utilizando como molde o vírus vacinal da Febre Amarela

Considerando os modelos vacinais descritos, decidimos por desenvolver um modelo viral vivo-atenuado, o vírus vacinal da Febre Amarela 17D, porém, quimérico.

O vírus vacinal da Febre Amarela, como já mencionado, foi atenuado a partir de passagens consecutivas gerando a cepa 17D e no Brasil, a 17DD. Charles Rice foi pioneiro em

conseguir produzir um cDNA infeccioso do YFV17D. A manipulação de seu genoma por tecnologia de clonagem abriu uma nova possibilidade para o desenvolvimento de vacinas. YFV17D pode ser utilizada como plataforma para expressão de outros antígenos (BONALDO et al., 2006). Neste caso o vírus atenuado usado como vetor garantirá também a atenuação do vírus quimérico, mantendo o caráter imunogênico da proteína E do outro *Flavivirus* com gene nela incluído.

O *backbone* completo do YFV17D substituindo apenas as proteínas prM e E do YFV1D, pelas respectivas do vírus da Encefalite japonesa (JEV), foi produzido no final da década de 90, produzindo imunidade protetora em primatas não-humanos (MONATH et al., 1999; CHAMBERS et al., 1999). Conhecida como IMOJEV®, é a primeira e única vacina deste tipo aprovada para uso humano. De qualquer maneira, esta vacina comprova a eficácia do modelo em questão, possibilitando o desenvolvimento de novas vacinas, contra outros *Flavivirus*.

## 1.2 CIRCULAR POLYMERASE EXTENSION REACTION (CPER)

Selecionamos para este trabalho metodologia molecular que permite uma construção viral adequada e a recuperação dos vírus construídos. Escolhemos a reação em cadeia da polimerase com extensão circular (*Circular Polymerase Extension Reaction - CPER*).

Quan e Tian (2009) desenvolveram um método de clonagem que minimizava as mutações e problemas encontrados nas clonagens comuns, utilizando plasmídeos, bactérias e enzimas de restrição. A metodologia utiliza apenas uma polimerase para montar e clonar múltiplas inserções, em qualquer vetor, sem enzimas de restrição ou ligação. A metodologia tem início com a amplificação do genoma de interesse por PCR e os *amplicons* obtidos são inseridos com base em sequências que se sobrepõem nas extremidades. Na reação de extensão os genomas são colocados em quantidades equimolares e o DNA é circularizado. Ao final do processo, o conteúdo presente em um único tubo está pronto para ser transformado ou transfectado.

Edmonds e colaboradores (2013) adaptaram a CPER para a construção e recuperação de vírus de RNA com polaridade positiva. Dividia-se o genoma viral em fragmentos e utilizando um *linker* (fragmento ligante das extremidades 5' e 3' do vírus) realizava-se a circularização do DNA, permitindo a sua transcrição após ser transfectado em cultura celular. O *linker* inclui uma cauda poliA, a ribozima do vírus da hepatite delta (HDVr) para clivar a extremidade 3' do RNA viral e possui um sinal poliA SV40, para garantir o término eficiente da transcrição, além de uma sequência espaçadora capaz de separar os elementos funcionais e um promotor de CMV, para que o RNA viral seja transcrito pela RNA polimerase III da célula

(AMARILLA et al., 2021). A sobreposição de fragmentos deve ter 20 a 22 nucleotídeos, e todos devem se anelar na mesma temperatura ou em temperatura muito próxima. Além disso, para que haja uma adição correta dos nucleotídeos, é necessário que seja utilizada uma DNA polimerase de alta fidelidade (EDMONDS et al., 2013; AMARILLA et al., 2021).

A CPER é bem conhecida atualmente e tem sido utilizada na construção e recuperação de diversos vírus, inclusive vírus recombinantes com intuito vacinal (EDMONDS et al., 2013; SETOH et al., 2017; HOBSON-PETERS et al., 2019; AMARILLA et al., 2021). Além da facilidade e menor custo dessa metodologia, a margem de erro durante a amplificação e formação do genoma do vírus de interesse é menor quando comparada às metodologias envolvendo plasmídeos e transcrição *in vitro*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Construir clones infecciosos do vírus vacinal da Febre Amarela e de um vírus recombinante quimérico utilizando o genoma completo do vírus vacinal da Febre Amarela e nele incluindo as proteínas prM e E do vírus Zika.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir, por CPER clones infecciosos do vírus vacinal da Febre Amarela (YFV17D-CPER) e de um vírus recombinante, utilizando o genoma completo do vírus vacinal da Febre Amarela substituindo os genes de suas proteínas prM e E pelos respectivos genes do vírus Zika (YFV17DZIKV-CPER).
- Avaliar a replicação *in vitro* dos vírus construídos, YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER, comparada à dos vírus vacinal da Febre Amarela e Zika, por ensaio de *plaques*.
- Avaliar a produção de proteínas dos YFV17D-CPER e YFVZIKV-CPER comparada à do vírus vacinal da Febre Amarela, por método de imunofluorescência.
- Confirmar, por sequenciamento Sanger, o genoma recombinante do vírus YFVZIKV-CPER.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

#### 3.1 PRODUÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIS

Primeiramente, células Vero CCL81, oriundas de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foram mantidas em meio Dulbecco MEM (DMEM; Vitrocell, BRA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, BRA) e 1% de solução antibiótica contendo Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA), em estufa, a 37°C e com 5% de atmosfera com CO<sub>2</sub>. A passagem das células era realizada 3 vezes por semana, quando atingia uma densidade máxima de 90%.

Para a produção dos estoques de Febre Amarela vacinal (YFV17DD - número do GenBank: U17066.1) e Zika (ZIKV - número do GenBank: KU321639.1), gentilmente cedidos pelo Me. Vitor Gonçalves Floriano, pesquisador deste Centro de Pesquisa em Virologia, no laboratório do Prof. Benedito Antônio Lopes da Fonseca, frascos de 175 cm<sup>2</sup> contendo monocamadas 90% confluentes de células Vero CCL81 foram infectados com 500 µL da amostra viral. Os frascos foram mantidos em estufa por 1 hora para adsorção dos vírus, em seguida, adicionou-se DMEM suplementado com 2% de SFB, 1% de antibiótico e antimicótico e incubou-se a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. As células infectadas foram observadas diariamente até o surgimento de efeito citopático. Coletou-se o conteúdo do frasco infectado com YFV17DD 7 dias pós-infecção e o infectado com ZIKV 6 dias pós-infecção. Os fluidos infectados coletados eram centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm e 4°C. Em seguida, os sobrenadantes (aproximadamente 25 mL) eram submetidos à membrana de Amicon® de 100 kDa (Merck, ALE) para concentração viral, seguindo as orientações do fabricante. Ao final, o conteúdo concentrado, retido na coluna, foi aliquoteado e armazenado a -80°C como estoques virais.

#### 3.2 RT-PCR

##### 3.2.1 Extração de RNA por TRIzol LS

Os estoques virais foram submetidos a extração de RNA pelo TRIzol LS (Invitrogen, EUA), seguindo protocolo do fabricante. Os precipitados de RNA foram eluídos em 20 µL de água DEPC (Invitrogen, EUA).

### 3.2.2 Primers

Foram desenhados, pelo Dr. Alberto Amarilla, 14 pares de *primers* (Exxtend, BRA) para a construção do YFV17D-CPER e do recombinante YFV17DZIKV-CPER. Um par de *primers* (Exxtend, BRA) foi idealizado para avaliar a construção do vírus recombinante (DP). Os *primers* são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – *Primers* e suas sequências nucleotídicas, utilizados para a construção do YFV17D-CPER e do recombinante YFV17DZIKV-CPER

Fragmentos	Identificação	Sequências (5' → 3')
LNK	YFV-Linker-F	GACCTTTGGATGACAAACACAAAACCACTGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTC
	YFV-Linker-R	GCACCTCAATTAGCACACAGGATTTACTCGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAG
1	YFV-5'UTR-F	AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTGCATTG
	YFV-F1-R	CCAAAGTTGATGGCGCATCCTTGATC
2	YFV-F2-F	GATCAAGGATGCGCCATCAACTTTGG
	YFV-F2-R	CATGTTTCATCTCATGGAAATGCAATCCCAC
3	YFV-F3-F	GTGGGATTGCATTTCCATGAGATGAACAATG
	YFV-F3-R	CAAGACATCCCCACTTCTCCTAGCTC
4	YFV-F4-F	GAGCTAGGAGAAGTGGGGATGTCTTG
	YFV-F4-R	GCACAACAGCACTTCAGCAGCTC
5	YFV-F5-F	GAGCTGCTGAAGTGCTAGTTGTGC
	YFV-F5-R	CCGGCGTCCAGTTTTTCATCTTCC
6	YFV-F6-F	GGAAGATGAAAACCTGGACGCCGG
	YFV-F6-R	CTCCAGCCTGGTCAGAACTGATTC
7	YFV-F7-F	GAATCAGTTCTGACCAGGCTGGAG
	YFV-3'UTR	AGTGGTTTTGTGTTTGTTCATCCAAAGGTC
9	YFV-5'UTR-F	AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTGCATTG
	YFV-Chim-1R	TCCACCCGTCATCAACAGCATTCC
10	YFV-Chim-2F	GGAATGCTGTTGATGACGGGTGGAGCGGAGGTCCTAGACGTGG
	YFV-Chim-2R	CCAAAGTTGATGGCGCATCCTTGATCAGCAGAGACGGCTGTGGATAAG
7 "novo"	YFV-F7-F	GAATCAGTTCTGACCAGGCTGGAG
	YFV-F7-R	GGATGTGGGAGGCCAGGTGG
8	YFV-F8-F	CCACCTGGGCCTCCCACATCC
	YFV-F8-R	AAAGGTCTGCTTATTCTTGAGCAAACCTGTGC
8.1	YFV-F8-F	CCACCTGGGCCTCCCACATCC
	YFV-F8-R.1	AGTGGATTTGTGTTTGTGATCCAAAGGTCTGCTTATTCTTGAGCAAACCTGTGC
8.2	YFV-F8-F	CCACCTGGGCCTCCCACATCC
	YFV-3'UTR	AGTGGTTTTGTGTTTGTTCATCCAAAGGTC
DP	DP-F1-F	GTCTGGTCGTAAGCTCAGGG
	DP-F1-R	CAACCAGGTTTGCGACCCGCG

LNK – *linker*. F – *forward*. R – *reverse*. DP – *diagnostic primers*.

### 3.2.3 Transcrição Reversa (RT)

A RT de extratos do RNA dos estoques virais foi feita com o *primer* YFV-3'UTR e a enzima *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* 200 U/μL (Invitrogen, EUA), seguindo as orientações do fabricante e produzindo DNAs complementares (cDNA).

A RT dos extratos de RNA da Passagem 0 foi feita com *primers* randômicos e a enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (200 U/μL) (Invitrogen, EUA), seguindo as orientações do fabricante e produzindo os cDNAs.

A enzima *SuperScript™ III* foi utilizada para a produção dos cDNAs utilizados para CPER devido à padronização da metodologia.

### 3.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

#### 3.2.4.1 PCR de amplificação dos fragmentos utilizados na construção dos vírus YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER

O cDNA de YFV17DD foi utilizado para amplificar os fragmentos 1, 2 e 9. O cDNA de ZIKV foi utilizado para amplificar o fragmento 10. O fragmento *linker* (LNK) foi amplificado a partir de um plasmídeo contendo sequência previamente descrita, informada no Anexo A (EDMONDS et al., 2013). Os fragmentos 3, 4, 5 e 6 foram amplificados a partir de um plasmídeo pré-existente no laboratório, feito pela Dra. Aline Lavado Tolardo, contendo o genoma completo do YFV17D com proteínas do ZIKV (Anexo B). O fragmento 7, inicialmente amplificado com os *primers* F7-YFV-F e YFV-3'UTR-R, precisou ser dividido em 2 fragmentos, o F7 “novo” e o F8.2, devido a problemas na amplificação do mesmo. Para a amplificação do F7 “novo” e do F8, também foi utilizado como *template* o plasmídeo contendo todo o genoma do YFV17D com proteínas do ZIKV. O F8 foi utilizado como *template* para amplificar o F8.1, este foi purificado e utilizado como *template* para a obtenção do F8.2. Por fim, F8.2 foi o fragmento utilizado para a construção dos vírus YFV17D-CPER e YFVZIKV-CPER. Essa particularidade até chegar ao F8.2 foi realizada para mantermos a sequência amplificada fidedigna à sequência modelo.

Todas as PCRs utilizaram a enzima *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, EUA)* e amplificando os 14 fragmentos necessários para a construção dos vírus YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER. A reação utilizada para cada um dos fragmentos foi realizada segundo orientações do fabricante. A ciclagem dos fragmentos amplificados utilizando cDNA como *template*, também foi utilizada com base nas informações do fabricante. No entanto, ciclagem para as PCRs as quais foram utilizados plasmídeo como *template* foi diferente. A mistura foi submetida a 1 ciclo de 98 °C por 2 minutos, seguido de 5 ciclos de 98 °C por 20 segundos, 45 °C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, posteriormente, 30 ciclos de 98 °C por 20 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Ainda, 1 ciclo de 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, finalizado em 15 °C por tempo indeterminado.

Após a PCR, os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados em transiluminador, para confirmar a amplificação com base em bandas de tamanho esperado.

### 3.2.4.2 PCR diagnóstica

A recombinação do YFV17D com as proteínas de ZIKV, formando o YFV71DZIKV-CPER, foi confirmada utilizando uma PCR com cDNA da Passagem 0 do vírus quimérico e os *primers* DP, mostrados na Tabela 1.

O cDNAs obtidos foram submetidos à PCR com *PCRBIO Taq DNA Polymerase* (PCRBIO, UK), seguindo protocolo do fabricante. Os *amplicons* foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico de *Sanger*.

### 3.3 RT-qPCR

Os RNAs extraídos dos sobrenadantes, coletados 0 (T0), 24 (T1) e 96 (T5) horas após a transfecção, foram submetidos a RT-qPCR para avaliar a redução do Ct (do inglês, *cycle threshold*).

O Ct consiste na quantidade de ciclos necessárias para a detecção do genoma alvo. Com isso, o valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de material genético presente na amostra utilizada. Quanto maior o Ct, menor a quantidade de material genético, ou seja, mais ciclos foram necessários para a detecção do genoma alvo pelo equipamento.

A RT-qPCR foi realizada com kit *TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix* (Applied Biosystems, EUA) seguindo o protocolo previamente publicado (PATEL et al., 2013). Os *primers* utilizados amplificam uma região conservada da NS5 dos *Flavivirus*. A sequência dos *primers* e da sonda utilizados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequência de *primers* e sonda usadas no RT-qPCR *Pan-Flavi*

<b>Primers e Sonda</b>	<b>Sequência</b>	<b>Concentração</b>
Flavi all S	TACAACATgATggggAARAgAgARAA	10 pmol
Flavi all AS 2	gTgTCCCAgCCNgCKgTgTCATCWgC	10 pmol
Flavi all probe 3 mix	FAM-Tg + gTWYATgT + ggYTNg + gRgC—BBQc	5 pmol

Fonte: adaptado de PATEL et al., 2013.

### 3.4 EXTRAÇÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE

As bandas dos fragmentos com tamanho esperado, citados no item 3.2.4.1, foram reamplificadas por PCR para obtenção de maior volume, o que foi confirmado por nova eletroforese em gel de agarose a 1%, seguida de purificação no gel. Observando o gel pós-eletroforese, as bandas respectivas foram cortadas e purificadas com *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, ALE), seguindo as orientações do fabricante. Os DNAs contidos nos fragmentos

de géis cortados, foram extraídos e eluídos em 20  $\mu\text{L}$  de água *DEPC* (Invitrogen, EUA), sendo armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5 RECUPERAÇÃO VIRAL

#### 3.5.1 CPER

Os fragmentos purificados foram adicionados em quantidade equimolar de 0,1 pmol/fragmento em um único tubo e submetidos à reação de CPER com a enzima *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs, EUA) a um volume final de 50  $\mu\text{L}$ .

Na Figura 15 encontram-se os reagentes, seus respectivos volumes e a ciclagem utilizados para a CPER.

Figura 15 – Reagentes e respectivos volumes e ciclo utilizados na reação de CPER

A

Reação CPER	
Reagentes	1 reação
<i>Buffer</i>	10 $\mu\text{L}$
dNTP	1 $\mu\text{L}$
<i>Template</i>	Volume respectivo a 0,1 pmol
<i>Q5 polymerase</i>	0,5 $\mu\text{L}$
DEPC	Para 50 $\mu\text{L}$

B

Ciclagem CPER		
Temperatura	Tempo (minutos)	Ciclos
98 $^{\circ}\text{C}$	2:00	1x
98 $^{\circ}\text{C}$	0:20	12x
60 $^{\circ}\text{C}$	0:30	
72 $^{\circ}\text{C}$	12:00	
72 $^{\circ}\text{C}$	12:00	1x
15 $^{\circ}\text{C}$	$\infty$	1x

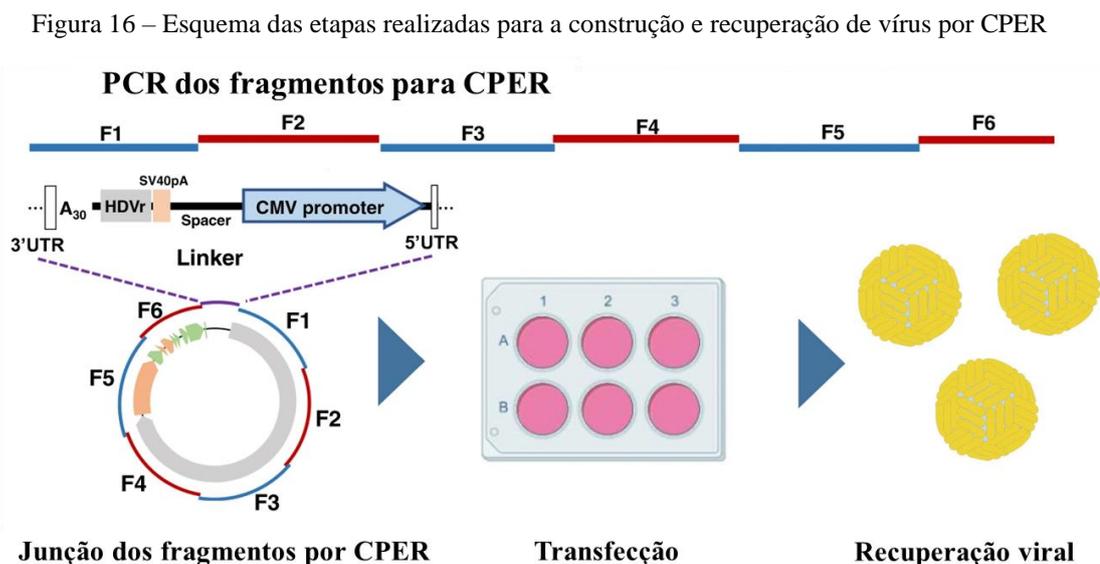
A: Reagentes e respectivos volumes utilizados na reação de CPER. B: Ciclagem utilizada para reação de CPER.

#### 3.5.2 Transfecção para Produzir YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER

Ao final da CPER o conteúdo de cada um dos tubos, contendo DNA circular de YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER, foi transfectado em  $1 \times 10^6$  células HEK293T, em placa de 6 cavidades. Para recuperar os vírus utilizou-se Lipofectamina LTX + *Plus Reagent* (Invitrogen, USA), segundo as orientações do fabricante. Vinte e quatro horas após a transfecção, o sobrenadante e a cultura de células HEK293T foram transferidos para uma

garrafa de 75cm<sup>2</sup> contendo monocamada de células Vero CCL81, fazendo uma co-cultura de células HEK293T e células Vero CCL81. Durante 5 dias coletou-se diariamente o sobrenadante da cultura para que fosse avaliada a replicação dos vírus por RT-qPCR. Cinco dias após a transfecção (Passagem 0) foram coletados sobrenadante e precipitado celular dos transfectados. Os sobrenadantes foram utilizados para realizar a Passagem 1, para uma quantificação viral por ensaio de *plaque* e para imunofluorescência indireta nas células Vero CCL81, além de RT-PCR e sequenciamento Sanger. Sete dias após a Passagem 1, foram coletados sobrenadante e precipitado celular. Os sobrenadantes foram utilizados para a Passagem 2 e para quantificação viral por ensaio de *plaque*. Sete dias após a Passagem 2, também foram coletados sobrenadante e precipitado celular. Os sobrenadantes foram submetidos a ensaio de *plaque*.

A fim de proporcionar uma melhor visualização da metodologia, encontra-se representado na Figura 16 um esboço das etapas de construção e recuperação viral através da CPER.



Fonte: adaptado de AMARILLA et al., 2021.

### 3.6 TITULAÇÃO VIRAL POR ENSAIO DE *PLAQUE*

Células Vero CCL81,  $2 \times 10^5$  células/mL, foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços, em DMEM (Vitrocell®, BRA) suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Os poços contendo as monocamadas celulares foram inoculados com 200 µL do estoque viral de YFV17D e ZIKV, ou com os sobrenadantes das Passagens 0, 1 e 2 dos vírus YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER, em duplicata, utilizando diluições decimais com DMEM ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ). As placas infectadas foram incubadas por 1 hora para promover

adsorção dos vírus à monocamada celular. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de *overlay* 2,5 % (1:1; solução de carboximetilcelulose 5% : DMEM 2X + 4% SFB) a cada poço. As placas foram mantidas por 8 dias a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e após esse tempo, a *overlay* foi descartada e adicionou-se 1 mL de formalina 10% a cada poço por 1 hora para a fixação das células. Em seguida, a formalina foi descartada, e 1 mL de uma solução de cristal violeta 0,2% foi adicionada a cada poço por uma hora para a coloração das células. Finalmente, o corante foi descartado e os *plaques* (halo com células mortas) formados foram contados permitindo a quantificação viral em Unidades Formadoras de *Plaques* (UFP)/mL, pelo método de Reed e Muench (1938).

### 3.7 TESTE DE IMUNOFLOURESCÊNCIA (IFA) EM CÉLULAS ADERIDAS A LAMÍNULAS CIRCULARES

Para confirmar que havia produção de proteínas virais, foram realizadas IFAs de células Vero CCL81 aderidas em lamínulas circulares infectadas com 200 µL do estoque viral de YFV17D (controle positivo), YFV17D-CPER e YFVZIKV-CPER, além do controle negativo. Sete dias após infecção, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e permeabilizadas com PBS contendo 0,1% de saponina e 1% de BSA. Em seguida, as células foram incubadas com solução *SuperBlock*<sup>TM</sup> (*PBS*) *Blocking Buffer* (Thermo Fisher Scientific, EUA), e incubadas com fluído ascítico imune de camundongo (*mouse immune ascitic fluid*; MIAF) de YFV17D (BRANDT; BUESCHER; HETRICK, 1967; FIGUEIREDO, 1990). Posteriormente, após lavagem, adicionou-se o anticorpo *Anti-Mouse IgG-Alexa 488* (Sigma-Aldrich, EUA) na diluição 1:1000. Também marcou-se o núcleo celular com DAPI (Sigma-Aldrich, EUA), na diluição 1:1000. Por fim, para montar lamínulas à lâmina utilizou-se o *Fluoromount-G* (Invitrogen, EUA). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus, JAP).

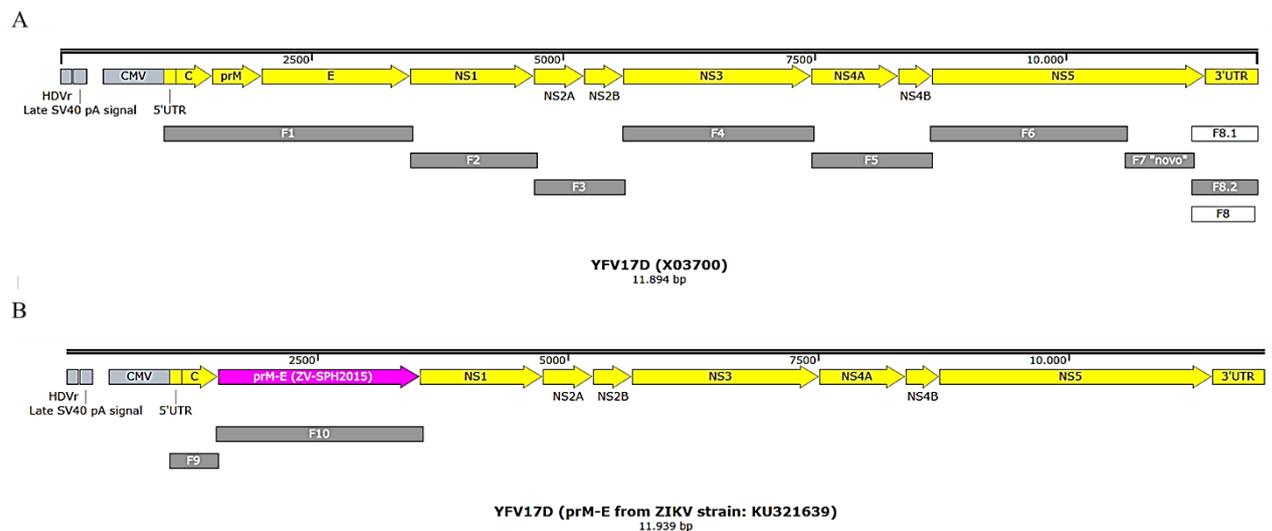
### 3.8 SEQUENCIAMENTO DE SANGER

O *amplicon* resultante da PCR diagnóstica (item 3.2.4.3) foi purificado com *Wizard*<sup>®</sup> *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, foi submetido a marcação fluorescente com *BigDye*<sup>TM</sup> *Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, EUA). O sequenciamento nucleotídico dos *amplicons* foi realizado no *3500 Series Genetic Analyzers* (Applied Biosystems, EUA), por método de Sanger. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa Geneious.

## 4 RESULTADOS

Inicialmente, para a construção dos vírus, selecionaram-se genomas de YFV17D (GenBank nº X03700) e ZIKV (GenBank nº KU321639). Os genomas virais juntamente com a sequência *linker* foram inseridos no programa *SnapGene* para que fossem desenhados os pares de *primers* relacionados aos fragmentos de 1 a 10, compreendendo todo o genoma do YFV17D-CPER e do recombinante YFV17DZIKV-CPER, além do fragmento *linker*, todos ilustrados na Figura 17. As construções basearam-se no estudo de Edmonds e colaboradores (2013).

Figura 17 – Esquemas com os genomas de YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER incluindo seus respectivos fragmentos



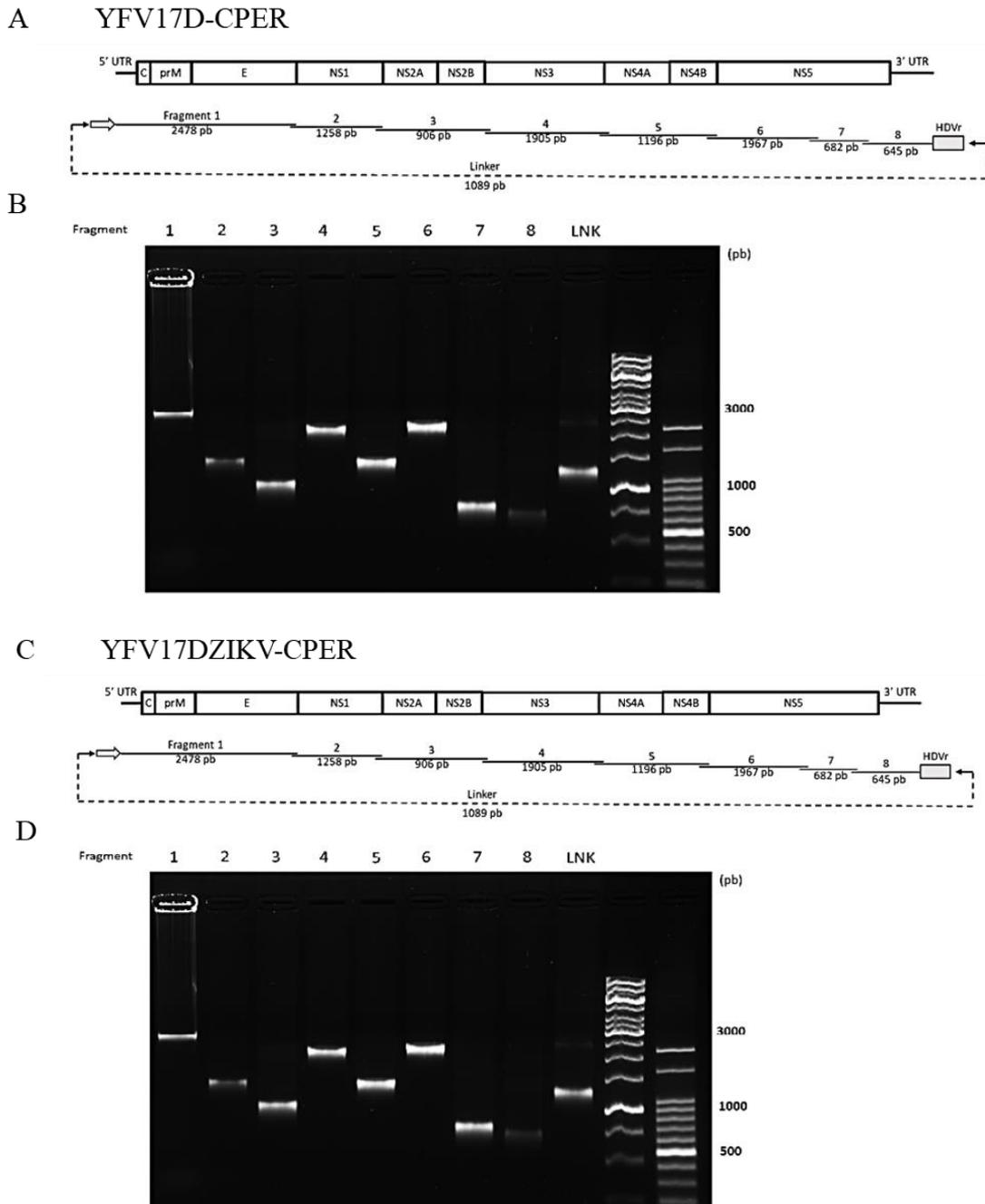
A: As proteínas do YFV17D estão em amarelo, em cinza os fragmentos de 1 a 8.2, além dos fragmentos F8 e F8.1 em branco. B: YFV17DZIKV-CPER inclui em amarelo as proteínas do YFV17D, em rosa as proteínas do ZIKV e em cinza os fragmentos 9 e 10. Também em cinza claro, em ambas as imagens, estão os componentes do fragmento LNK (HDVr, *late SV40 pA signal* e promotor de CMV).

Fragmentos adequados foram obtidos em PCR com os *primers* utilizados. Estes fragmentos foram reamplificados, purificados e as bandas dos mesmos, com o tamanho esperado, foram evidenciadas em transiluminador após eletroforese em gel de agarose a 1%, como mostra a Figura 18.

Na construção do YFV17D-CPER, mostrado na Figura 18A, foram utilizados os fragmentos purificados F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 “novo”, F8.2 e *linker*. Para a construção do YFV17DZIKV-CPER, mostrado na Figura 18B, foram utilizados os fragmentos purificados F9, F10, F2, F3, F4, F5, F6, F7 “novo”, F8.2 e *linker*. Estes conjuntos de fragmentos dos 2 vírus foram submetidos à CPER para circularização. Esta circularização ocorre pela sobreposição do final e do início de cada um dos fragmentos, sendo essa uma reação de extensão e

consequentemente, de circularização em que cada um dos fragmentos é utilizado como *primer* do seguinte e a enzima faz uma extensão, e não amplificação, como em uma PCR.

Figura 18 – Representação esquemática dos genomas dos vírus construídos, YFV17D-CPER e YFV71DZIKV-CPER, incluindo foto e gel dos fragmentos de 1 a 10 e fragmento de *linker*



A e C esquematizam os genomas de YFV17D-CPER e YFV71DZIKV-CPER, respectivamente. Além da demonstração da sobreposição de cada um dos fragmentos e o tamanho dos mesmos em pares de base. Na Figura 16B, observa-se foto de gel de agarose após eletroforese exibindo os fragmentos que compuseram o YFV17D-CPER (F1 a F8.2 e *linker*). As bandas representam, da esquerda para a direita, *amplicons* de 2478 pb (F1), 1258 pb (F2), 906 pb (F3), 1905 pb (F4), 1196 pb (F5), 1967 pb (F6), 682 pb (F7 “novo”), 645 pb (F8.2) e 1089 pb (LNK). Na Figura 16D, observa-se foto de gel de agarose após eletroforese exibindo os fragmentos que que

compuseram o YFV17DZIKV-CPER (F2 a F8.2, *linker*, F9 e F10). As bandas representam, da esquerda para a direita, *amplicons* de 481 pb (F9), 2066 pb (F10), 1258 pb (F2), 906 pb (F3), 1905 pb (F4), 1196 pb (F5), 1967 pb (F6), 682 pb (F7 “novo”), 645 pb (F8.2) e 1089 pb (LNK).

Confirmados os tamanhos corretos dos fragmentos, o conjunto que compreende o genoma de cada um dos vírus a serem construídos, YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER, mais o *linker*, foram submetidos à CPER. Um volume de 50 µL dos fluidos da CPER foi utilizado para transfectar células HEK293T para recuperação dos vírus construídos. A replicação viral pós-transfecção, foi avaliada em coletas feitas 0 horas (T0), 24 horas (T1) e 120 horas (T5) após a transfecção. Estes fluidos foram submetidos a RT-qPCR específico para detecção de *Flavivirus*, nesta reação amplifica-se uma parte da NS5 (PATEL et al., 2013). Os resultados permitiram fazer uma quantificação relativa ao observar a diminuição do Ct nas fases mais tardias pós-infecção, indicando aumento dos genomas virais e desta forma pressupondo uma replicação crescente do vírus (T0) até 5 dias após a transfecção (T5), como mostra a Tabela 3. Ainda, não houve amplificação para os controles negativos e a amplificação do controle positivo, apresentou mesmo Ct que o T5 de ambos os vírus utilizando o conjunto de *primers* utilizado, o que validou a metodologia utilizada.

Tabela 3 – Tabela mostrando valores de Ct do controle negativo, controle positivo e dos vírus YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER submetidos à RT-qPCR específica para *Flavivirus*

		T0	T1	T5
<b>Controle negativo</b>	////////////////////	indeterminado	indeterminado	indeterminado
<b>Controle positivo YFV17DD</b>	32,75812912	////////////////////	////////////////////	////////////////////
<b>YFV17D-CPER</b>	////////////////////	35,1602211	36,72591782	30,59883308
<b>YFV17DZIKV-CPER</b>	////////////////////	35,98974609	33,96353149	32,06613541

Confirmada a eficiência da transfecção com recuperação dos vírus construídos, coletou-se o sobrenadante das culturas, 5 dias após a transfecção (Passagem 0), para realização da Passagem 1. Após 7 dias de infecção da Passagem 1, fez-se a Passagem 2 do sobrenadante. Os sobrenadantes de Passagem 0, 1 e 2 foram submetidos a testes para confirmação da recuperação dos vírus construídos. Primeiramente, para avaliar a formação de vírus infecciosos, fez-se a quantificação viral por ensaio de *plaque*, como mostra a Figura 19. YFV17D-CPER e YFVZIKV-CPER se mostraram infecciosos até a Passagem 1, visto à presença de unidades formadoras de *plaque* nas passagens 0 e 1 pois não observamos plaques na Passagem 2 de ambos os vírus. Ainda, quando comparados aos controles virais *wildtype* (WT) de YFV17DD e ZIKV, os vírus construídos apresentaram *plaques* de morfologia visivelmente menor após 8 dias de pós-infecção e não 6 dias, como os WT. A diferença no tempo pós-infecção deu-se pela

apresentação de ECP, que foi mais tardia nos vírus construídos. Esse experimento confirma a presença de partículas virais infecciosas dos vírus construídos. No entanto, estes vírus, provavelmente, mostraram-se instáveis perdendo a capacidade infecciosa como mostra a ausência de *plaques* nos sobrenadantes da Passagem 2.

Figura 19 – Foto de microplaca cujos orifícios exibem *plaques* formados por YFV17DD, ZIKV e Passagens 0, 1 e 2 dos vírus construídos, YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER

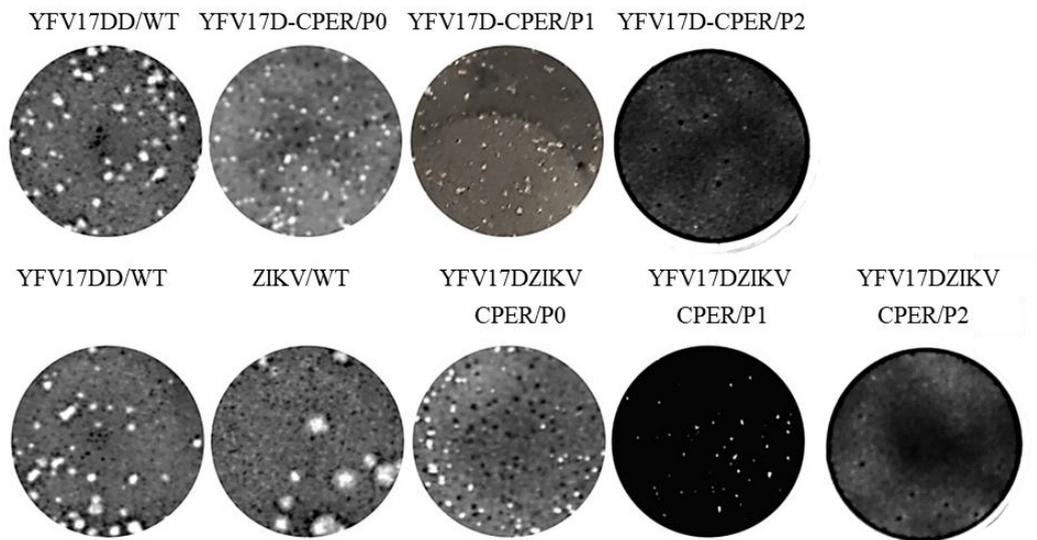
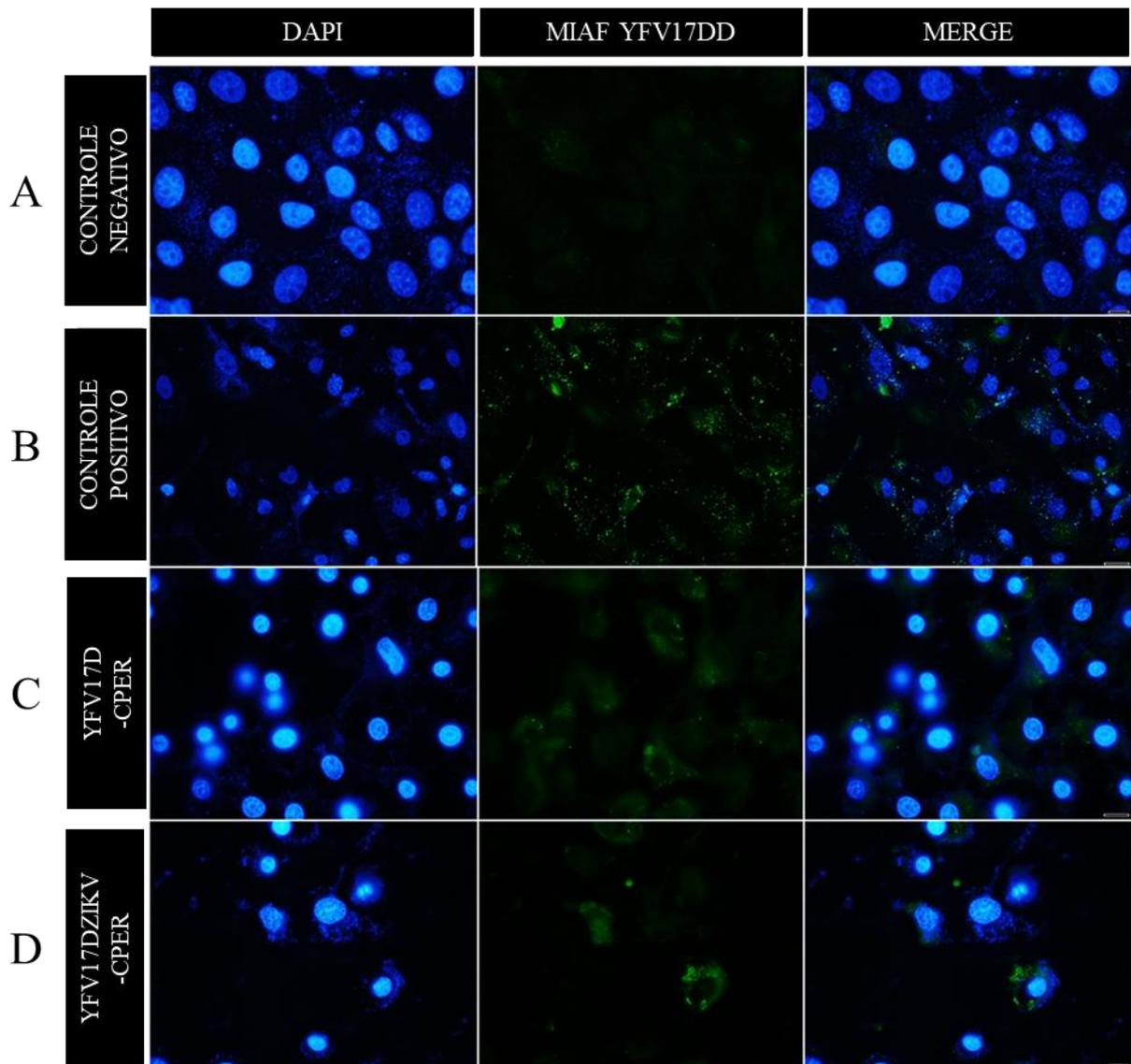


Imagem representativa da formação de *plaques* formados pelos estoques dos vírus YFV17DD (YFV17DD/WT) e ZIKV (ZIKV/WT), e das Passagens 0, 1 e 2 do vírus YFV17D-CPER (YFV17D-CPER/P0, YFV17D-CPER/P1 e YFV17D-CPER/P2, respectivamente) e, também, Passagens 0, 1 e 2 do vírus YFV17DZIKV-CPER (YFV17DZIKV-CPER/P0, YFV17DZIKV-CPER/P1 e YFV17DZIKV-CPER/P2, respectivamente).

A presença de proteínas produzidas pela infecção com os vírus construídos, foi mostrada em imunofluorescência. Observou-se fluorescência apenas nas culturas infectadas com sobrenadantes da Passagem 0, como mostra a Figura 20. As passagens 1 e 2 não apresentaram fluorescência após a revelação do ensaio.

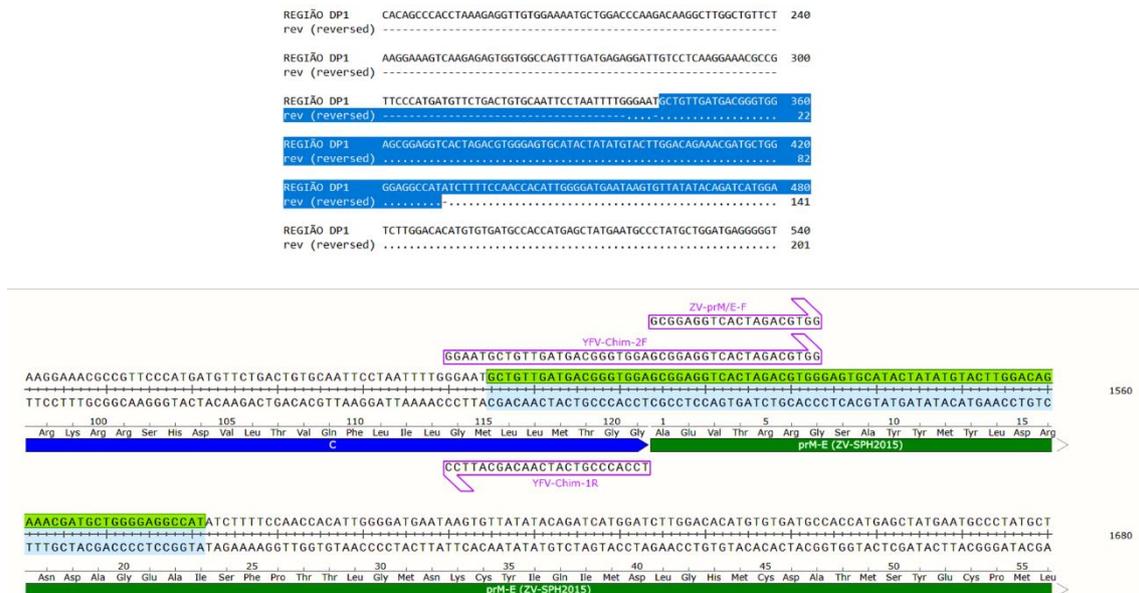
Figura 20 – Imunofluorescência da Passagem 0 dos vírus YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER



A Figura 20A representa o controle negativo. Marcação com DAPI (azul), marcação com MIAF de YFV17DD (verde) e a sobreposição das duas, respectivamente. A Figura 20B mostra o vírus controle positivo, células Vero CCL81 infectadas com YFV17DD. Marcação com DAPI (azul), marcação com MIAF de YFV17DD (verde) e a sobreposição das duas, respectivamente. A Figura 20C mostra a infecção do YFV17D-CPER. Marcação com DAPI (azul), marcação com MIAF de YFV17DD (verde) e a sobreposição das duas, respectivamente. A Figura 20D mostra a infecção do YFV17DZIKV-CPER. Marcação com DAPI (azul), marcação com MIAF de YFV17DD (verde) e a sobreposição das duas, respectivamente.

Por fim, para confirmar a presença da parte recombinante, as proteínas prM-E do ZIKV, YFV17DZIKV-CPER, teve o *amplicon* obtido do sobrenadante da Passagem 0 obtida em RT-PCR. A sequência nucleotídica confirmou a união dos genes virais YFV17D e ZIKV ao final do capsídeo, evidenciando o início da prM do ZIKV, como mostra a Figura 21.

Figura 21 – Alinhamentos de sequências nucleotídicas incluindo o vírus recombinante YFV17DZIKV-CPER (material obtido da Passagem 0 para sequenciamento de Sanger)



Representação do alinhamento da sequência referência, utilizada na construção do vírus quimérico, com a sequência da Passagem 0 obtida por meio de sequenciamento Sanger. A parte selecionada mostra 100% de identidade com sequências de referência.

Portanto, 100% de identidade do genoma do vírus YFV17DZIKV-CPER na passagem 0, com YFV17D e as prM e E de ZIKV foi confirmada, o que mostra claramente uma construção bem sucedida com a metodologia CPER.

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, apresentamos pela primeira vez no Brasil a construção de vírus por CPER, metodologia inovadora aperfeiçoada recentemente (EDMONDS et al., 2013). São vantagens da CPER, a rapidez, facilidade, baixo custo, baixa margem de erros. Recentemente foi construído por CPER o SARS-CoV-2, vírus que possui um genoma de aproximadamente 30 kb, três vezes maior que o genoma dos *Flavivirus*. Ainda, os autores construíram um SARS-CoV-2 modificado, para estudar a replicação viral e as interações vírus-receptor (AMARILLA et al., 2021). Com isso, observou-se que essa metodologia tem grande aplicabilidade e oferece muitas possibilidades para a ciência.

Uma grande vantagem da CPER é dispensar transformações bacterianas, etapa que proporciona acúmulo de mutações no genoma de interesse (AMARILLA et al., 2021). Entretanto, a transfecção em células HEK293T tem limitações inerentes à permissividade e susceptibilidade destas células a diferentes vírus. Embora para muitos vírus estas células sejam susceptíveis, tal não ocorre com o YFV17DD, como mostrado na Parte 1 dessa Dissertação, na Figura 9. Estudos em células HEK293T já demonstraram que a infecção por outros *Flavivirus*, como ZIKV, a depender da estirpe viral, reduzem taxas de crescimento, aumentam a apoptose e até mesmo a morte celular (LIU et al., 2019).

Por essa limitação, no presente trabalho, houve necessidade de fazer uma co-cultura das células HEK293T com células Vero CCL81, estas amplamente utilizadas para infecção por diferentes *Flavivirus*, incluindo YFV17DD (GUERRERO; BELLO, 2019). Também, verificamos previamente a susceptibilidade das células Vero CCL81 aos *Flavivirus* do estudo. Os resultados obtidos indicaram tratar-se de células permissivas e susceptíveis a infecção pelo YFV17DD. Portanto, a co-cultura que efetuamos foi fundamental para transfectar o conteúdo da CPER e recuperar os vírus construídos.

Na construção de vírus recombinantes, para produção de vacinas ou para vírus repórter, o ensaio de *plaque* que quantifica vírus infectantes e a imunofluorescência (IFA) que mostra a produção celular de proteínas virais nas células transfectadas são técnicas fundamentais (SETOH et al., 2017; HOBSON-PETERS et al., 2019; TORII et al., 2021; AMARILA et al., 2021; TORRES et al., 2022). No presente trabalho, a construção dos vírus YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER, foi evidenciada com RT-qPCR, quantificação viral por ensaio de *plaque*, IFA e sequenciamento de *Sanger*. Em suma, todos estes testes confirmaram a recuperação dos vírus construídos.

Realizada a CPER, o conteúdo do tubo foi submetido à transfecção em células HEK293T. Para avaliar o aumento da quantidade de genoma com o passar do tempo, foram

coletados os sobrenadantes nos tempos 0, 24 e 120 horas após a realização da co-cultura de células HEK293T e Vero CCL81. Os devidos sobrenadantes foram submetidos à extração de RNA seguida de RT-qPCR. Nossos resultados com a CPER e os vírus transfectados em células HEK293T, mostraram a elevação progressiva nos teores de RNA genômico, o que fez reduzir o Ct na PCR em tempo real. Assim, mesmo sem curva para a quantificação exata de genoma viral nos sobrenadantes, observamos que esta informação pode ser feita preliminarmente com base em valores de Ct (WALKER, 2002).

Passados os 5 dias de transfecção, os sobrenadantes (Passagem 0) foram coletados, quantificados por ensaio de *plaque* (DULBECCO, 1952), utilizados para realização da Passagem 1 e ensaio de IFA. Sabidamente, YFV17D e ZIKV formam *plaques* em células Vero CCL81 e isso permitiu compararmos resultados com aqueles obtidos dos YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER. A cultura monocamada infectada (Passagem 1) foi acompanhada até o aparecimento de ECP, apresentado após 8 dias de infecção. Para a revelação do ensaio de *plaque* das Passagens 0 e 1, também após 8 dias de infecção, foram observados *plaques* dos vírus construídos que mostraram-se menores que os dos vírus WT. De qualquer maneira, a presença dos *plaques* mostra a formação de partículas virais viáveis, capazes de infectar e de lisar a monocamada celular (WINOCOUR; SACHS, 1959; GONZALEZ-HERNANDEZ; CUNHA; WOBUS, 2012; SHURTLEFF et al., 2016; KARAKUS et al., 2018; CARNEIRO; MENDES-MONTEIRO; MOHANA-BORGES, 2022). Dessa forma, confirmamos a presença de YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER viáveis nas passagens 0 e 1.

A produção de proteínas de YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER provenientes da Passagem 0 foi mostrada no teste de imunofluorescência em células Vero CCL81 aderidas em lamínulas circulares. Como anticorpo primário, utilizamos MIAF contendo grande quantidade de anticorpos contra o vírus amarelo (BRANDT; BUESCHER; HETRICK, 1967; FIGUEIREDO, 1990). A revelação do teste com conjugado fluorescente anti-imunoglobulina murina mostrou que YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER infectaram as células e produziram proteínas após a Passagem 0.

Com a formação de *plaques* também na Passagem 1, era esperado que os vírus apresentassem fluorescência nessa mesma Passagem após revelação da IFA, o que não aconteceu. Sugerimos que a falta de estabilidade do vírus e o congelamento a -80 °C pode ter alterado a infecciosidade das partículas virais viáveis formadas, visto que a IFA não foi realizada logo após a coleta do sobrenadante da Passagem 1, como a titulação por ensaio de *plaque*. Considerando o congelamento e descongelamento, estudos demonstram perda da

viabilidade e infecciosidade de partículas virais viáveis devido à temperatura, seja ela alta (FONG; LIPP, 2005) ou baixa, mesmo que a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (OLSON; AXLER; HICKS, 2004).

O sequenciamento nucleotídico seguido de alinhamento dos genomas previamente conhecidos de YFV17D e ZIKV permitiu confirmar a obtenção particularmente do YFV17DZIKV-CPER. Inclusive o sequenciamento, mesmo que preliminar, mostrou a recombinação de YF17D com prM/E de ZIKV.

A principal hipótese relacionada à instabilidade dos vírus construídos relaciona-se a um provável erro na obtenção e purificação dos fragmentos, mesmo sabendo que esta é uma metodologia já padronizada e que em seu desenvolvimento tivemos o auxílio do Dr. Alberto Amarilla, pesquisador experiente e capacitado para tal. Entretanto, a resposta para os possíveis erros no genoma dos vírus construídos deve ser confirmada com sequenciamento completo dos vírus YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER.

Caso a instabilidade seja confirmada por problemas na amplificação e purificação dos fragmentos, seria necessário repetir a CPER seguida de uma nova tentativa de recuperação viral. Com a obtenção dos vírus viáveis, principalmente o recombinante YFV17DZIKV-CPER, poderíamos iniciar experimentos *in vivo* avaliando este vírus como candidato vacinal contra ZIKV, principalmente se demonstrássemos proteção contra infecção e, até mesmo, evitando o nascimento de proles com SCZ (ABBINK; STEPHENSON; BAROUCH, 2018). O passo seguinte no desenvolvimento de vacinas é o ensaio clínico em seres humanos, caso o candidato vacinal seja imunizante contra o microrganismo de interesse (KRAMMER, 2020). Por fim, caso estável, o YFV17DZIKV-CPER poderia ser uma vacina contra o ZIKV.

Nossos resultados mostram que trabalho foi bem sucedido na construção e na recuperação dos vírus YFV17D-CPER e YFV17DZIKV-CPER. No entanto, ainda faltam respostas para justificar ausência de estabilidade e a manutenção da partícula viral infecciosa após sucessivas passagens.

## **6 CONCLUSÃO**

Foi possível obter o vírus YFV17D e o recombinante YFV17DZIKV, objetivo maior do trabalho, utilizando a técnica CPER.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

Abbink P, Stephenson KE, Barouch DH. Zika virus vaccines. **Nat Rev Microbiol**. 2018 Oct;16(10):594-600. doi: 10.1038/s41579-018-0039-7. PMID: 29921914; PMCID: PMC6162149.

Agbulos, D. S., Barelli, L., Giordano, B. V., and Hunter, F. F. (2016). Zika virus: quantification, propagation, detection, and storage. **Curr. Protoc. Microbiol**. 43, 15D.4 1–15D.16.

AITKEN TH, ANDERSON CR, DOWNS WG. The isolation of Ilhéus virus from wild caught forest mosquitoes in Trinidad. *Am J Trop Med Hyg*. 1956 Jul;5(4):621-5. doi: 10.4269/ajtmh.1956.5.621. PMID: 13354883.

Almeida MAB, Santos ED, Cardoso JDC, Noll CA, Lima MM, Silva FAE, Ferreira MS, Martins LC, Vasconcelos PFDC, Bicca-Marques JC. Detection of antibodies against Icoaraci, Ilhéus, and Saint Louis Encephalitis arboviruses during yellow fever monitoring surveillance in non-human primates (*Alouatta caraya*) in southern Brazil. **J Med Primatol**. 2019 Aug;48(4):211-217. doi: 10.1111/jmp.12417. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31032984.

Alzahrani N, Wu MJ, Shanmugam S, Yi M. Delayed by Design: Role of Suboptimal Signal Peptidase Processing of Viral Structural Protein Precursors in Flaviviridae Virus Assembly. **Viruses**. 2020 Sep 26;12(10):1090. doi: 10.3390/v12101090. PMID: 32993149; PMCID: PMC7601889.

Amanat, F., White, K. M., Miorin, L., Strohmeier, S., McMahon, M., Meade, P., et al. (2020). An in vitro microneutralization assay for SARS-CoV-2 serology and drug screening. **Curr. Protoc. Microbiol**. 58:e108.

Amarilla AA, Modhiran N, Setoh YX, Peng NYG, Sng JDJ, Liang B, McMillan CLD, Freney ME, Cheung STM, Chappell KJ, Khromykh AA, Young PR, Watterson D. An Optimized High-Throughput Immuno-Plaque Assay for SARS-CoV-2. **Front Microbiol**. 2021 Feb 12;12:625136. doi: 10.3389/fmicb.2021.625136. PMID: 33643253; PMCID: PMC7906992.

Amarilla AA, Sng JDJ, Parry R, Deerain JM, Potter JR, Setoh YX, Rawle DJ, Le TT, Modhiran N, Wang X, Peng NYG, Torres FJ, Pyke A, Harrison JJ, Freney ME, Liang B, McMillan CLD, Cheung STM, Guevara DJDC, Hardy JM, Bettington M, Muller DA, Coulibaly F, Moore F, Hall RA, Young PR, Mackenzie JM, Hobson-Peters J, Suhrbier A, Watterson D, Khromykh AA. A versatile reverse genetics platform for SARS-CoV-2 and other positive-strand RNA viruses. **Nat Commun**. 2021 Jun 8;12(1):3431. doi: 10.1038/s41467-021-23779-5. PMID: 34103499; PMCID: PMC8187723.

Arzuza-Ortega L, Polo A, Pérez-Tatis G, López-García H, Parra E, Pardo-Herrera LC, Rico-Turca AM, Villamil-Gómez W, Rodríguez-Morales AJ. Fatal Sickle Cell Disease and Zika Virus Infection in Girl from Colombia. **Emerg Infect Dis**. 2016 May;22(5):925-7. doi: 10.3201/eid2205.151934. PMID: 27089120; PMCID: PMC4861530.

Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. **J Immunol**. 1998 Dec 1;161(11):6338-46. PMID: 9834124.

AZEVEDO, Raimunda do Socorro da Silva et al . Estudo experimental sobre a patogenicidade do Vírus Ilhéus em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua , v. 1, n. 1, p. 73-80, mar. 2010 .

Bachiller-Luque P, Domínguez-Gil González M, Álvarez-Manzanares J, Vázquez A, De Ory F, Sánchez-Seco Fariñas MP. First case of imported Zika virus infection in Spain. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. 2016 Apr;34(4):243-6. doi: 10.1016/j.eimc.2016.02.012. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26994814.

Bakonyi T, Lussy H, Weissenböck H, Hornyák A, Nowotny N. In vitro host-cell susceptibility to Usutu virus. **Emerg Infect Dis**. 2005 Feb;11(2):298-301. doi: 10.3201/eid1102.041016. PMID: 15752450; PMCID: PMC3320467.

Barbosa Costa G, Marinho PES, Vilela APP, Saraiva-Silva AT, Crispim APC, Borges IA, Dutra AGS, Lobato ZIP, Dos Reis JKP, de Oliveira DB, Drumond BP, Kroon EG, Trindade GS. Silent Circulation of the Saint Louis Encephalitis Virus among Humans and Equids, Southeast Brazil. **Viruses**. 2019 Nov 5;11(11):1029. doi: 10.3390/v11111029. PMID: 31694207; PMCID: PMC6893452.

Batista WC, Tavares Gda S, Vieira DS, Honda ER, Pereira SS, Tada MS. Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the State of Rondônia, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2011 Jul-Aug;44(4):528-30. doi: 10.1590/s0037-86822011000400028. PMID: 21860907.

Benzarti E, Garigliany M. In Vitro and In Vivo Models to Study the Zoonotic Mosquito-Borne Usutu Virus. **Viruses**. 2020 Sep 30;12(10):1116. doi: 10.3390/v12101116. PMID: 33008141; PMCID: PMC7599730.

Best SM. The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. **J Virol**. 2017 Jan 18;91(3):e01970-16. doi: 10.1128/JVI.01970-16. PMID: 27881649; PMCID: PMC5244349.

Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein-Larson L, Stanek D, Blackmore C, Likos A. Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease - Florida, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**. 2016 May 13;65(18):475-8. doi: 10.15585/mmwr.mm6518e2. PMID: 27171533.

Bonaldo MC, Garratt RC, Freire MS, Galler R. Expression of foreign protein epitopes at the surface of recombinant yellow fever 17D viruses based on three-dimensional modeling of its envelope protein. **Cell Biochem Biophys**. 2006;44(3):313-24. doi: 10.1385/CBB:44:3:313. PMID: 16679518.

Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Dos Santos AA, Menezes LS, da Cruz SO, de Mello IS, Furtado ND, de Moura EE, Damasceno L, da Silva KA, de Castro MG, Gerber AL, de Almeida LG, Lourenço-de-Oliveira R, Vasconcelos AT, Brasil P. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. 2016 Jun

24;10(6):e0004816. doi: 10.1371/journal.pntd.0004816. PMID: 27341420; PMCID: PMC4920388.

Brandt WE, Buescher EL, Hetrick FM. Production and characterization of arbovirus antibody in mouse ascitic fluid. **Am J Trop Med Hyg.** 1967 May;16(3):339-47. doi: 10.4269/ajtmh.1967.16.339. PMID: 4164665.

BRASIL. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 1. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 47 de 2022. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, 2022.

BRASIL. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 2. Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2022, até a SE 31. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS**. Brasília, 2017.

Brien, J. D., Lazear, H. M., and Diamond, M. S. (2013). Propagation, quantification, detection, and storage of west nile virus. **Curr. Protoc. Microbiol.** 31, 15D.3.1–15D.3.18.

Cardona-Cardona AF, Rodríguez Morales AJ. Severe abdominal pain in a patient with Zika infection: A case in Risaralda, Colombia. **J Infect Public Health.** 2016 May-Jun;9(3):372-3. doi: 10.1016/j.jiph.2016.03.001. Epub 2016 Mar 19. PMID: 27005012.

Carneiro PH, Mendes-Monteiro L, Mohana-Borges R. Virus Propagation and Plaque Assay for Dengue Virus. **Methods Mol Biol.** 2022;2409:3-9. doi: 10.1007/978-1-0716-1879-0\_1. PMID: 34709631.

CDC. Mosquitoes cause more death and disease than any other animal on the planet. Centers for Disease Control and Prevention, 2015. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/44603>.

Chambers TJ, Nestorowicz A, Mason PW, Rice CM. Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. **J Virol.** 1999 Apr;73(4):3095-101. doi: 10.1128/JVI.73.4.3095-3101.1999. PMID: 10074160; PMCID: PMC104070.

Chan JF, Yip CC, Tsang JO, Tee KM, Cai JP, Chik KK, Zhu Z, Chan CC, Choi GK, Sridhar S, Zhang AJ, Lu G, Chiu K, Lo AC, Tsao SW, Kok KH, Jin DY, Chan KH, Yuen KY. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. **Emerg Microbes Infect.** 2016 Aug 24;5(8):e93. doi: 10.1038/emi.2016.99. PMID: 27553173; PMCID: PMC5034105.

Chesnut M, Muñoz LS, Harris G, Freeman D, Gama L, Pardo CA, Pamies D. In vitro and in silico Models to Study Mosquito-Borne Flavivirus Neuropathogenesis, Prevention, and Treatment. **Front Cell Infect Microbiol.** 2019 Jul 9;9:223. doi: 10.3389/fcimb.2019.00223. PMID: 31338335; PMCID: PMC6629778.

Cunha MS, da Costa AC, de Azevedo Fernandes NCC, Guerra JM, Dos Santos FCP, Nogueira JS, D'Agostino LG, Komninakis SV, Witkin SS, Ressio RA, Maeda AY, Vasami

FGS, Kaigawa UMA, de Azevedo LS, de Souza Facioli PA, Macedo FLL, Sabino EC, Leal É, de Souza RP. Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016-2017). **Sci Rep**. 2019 Apr 2;9(1):5474. doi: 10.1038/s41598-019-41950-3. PMID: 30940867; PMCID: PMC6445104.

Cunha MS, Luchs A, da Costa AC, Ribeiro GO, Dos Santos FCP, Nogueira JS, Komninakis SV, Marinho RDSS, Witkin SS, Villanova F, Deng X, Sabino EC, Delwart E, Leal É, Nogueira ML, Maiorka PC. Detection and characterization of Ilheus and Iguape virus genomes in historical mosquito samples from Southern Brazil. **Acta Trop**. 2020 May;205:105401. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105401. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32081658.

da Conceição TM, Rust NM, Berbel AC, Martins NB, do Nascimento Santos CA, Da Poian AT, de Arruda LB. Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus. **Virology**. 2013 Jan 20;435(2):281-92. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.038. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23089253.

Dai S, Wu Q, Wu X, Peng C, Liu J, Tang S, Zhang T, Deng F, Shen S. Differential Cell Line Susceptibility to Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. **Front Cell Infect Microbiol**. 2021 Mar 24;11:648077. doi: 10.3389/fcimb.2021.648077. PMID: 33869079; PMCID: PMC8044861.

de Figueiredo GG, Amarilla AA, de Souza WM, Fumagalli MJ, de Figueiredo MLG, Szabó MPJ, Badra SJ, Setoh YX, Khromykh AA, Aquino VH, Figueiredo LTM. Genetic characterization of Cacipacoré virus from ticks collected in São Paulo State, Brazil. **Arch Virol**. 2017 Jun;162(6):1783-1786. doi: 10.1007/s00705-017-3279-3. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28220327.

DE RODANICHE E, GALINDO P. ECOLOGICAL OBSERVATIONS ON ILH'EUS VIRUS IN THE VICINITY OF ALMIRANTE, REPUBLIC OF PANAMA. **Am J Trop Med Hyg**. 1963 Nov;12:924-8. doi: 10.4269/ajtmh.1963.12.924. PMID: 14072452.

DE RODANICHE E, GALINDO P. Isolation of Ilhéus virus from *Sabethes chloropterus* captured in Guatemala in 1956. **Am J Trop Med Hyg**. 1957 Jul;6(4):686-7. doi: 10.4269/ajtmh.1957.6.686. PMID: 13458675.

DE RODANICHE E. Isolation of the virus of Ilhéus encephalitis from mosquitoes of the genus *Psorophora* captured in Honduras. **Am J Trop Med Hyg**. 1956 Sep;5(5):797-801. doi: 10.4269/ajtmh.1956.5.797. PMID: 13362745.

Degallier, Nicolas; Rosa, Amélia P. A. Travassos da; Vasconcelos, Pedro F. C; Hervé, Jean-Pierre; Sá Filho, Gregório C; Rosa, Jorge F. S. Travassos da; Rosa, Elizabeth S. Travassos da; Rodrigues, Sueli G. Modifications of arbovirus transmission in relation to construction of dams in Brazilian Amazonia. **Ciênc. cult.** (São Paulo) ; 44(2/3): 124-35, Mar.-Jun. 1992.

Diaz A, Coffey LL, Burkett-Cadena N, Day JF. Reemergence of St. Louis Encephalitis Virus in the Americas. **Emerg Infect Dis**. 2018 Dec;24(12):2150-7. doi: 10.3201/eid2412.180372. PMID: 30457961; PMCID: PMC6256408.

DICK GW, KITCHEN SF, HADDOW AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1952 Sep;46(5):509-20. doi: 10.1016/0035-9203(52)90042-4. PMID: 12995440.

dos Santos CN, Post PR, Carvalho R, Ferreira II, Rice CM, Galler R. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. **Virus Res.** 1995 Jan;35(1):35-41. doi: 10.1016/0168-1702(94)00076-o. PMID: 7754673.

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med.** 2009 Jun 11;360(24):2536-43. doi: 10.1056/NEJMoa0805715. PMID: 19516034.

Dulbecco R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1952 Aug;38(8):747-52. doi: 10.1073/pnas.38.8.747. PMID: 16589172; PMCID: PMC1063645.

Dunster LM, Gibson CA, Stephenson JR, Minor PD, Barrett AD. Attenuation of virulence of flaviviruses following passage in HeLa cells. **J Gen Virol.** 1990 Mar;71 ( Pt 3):601-7. doi: 10.1099/0022-1317-71-3-601. PMID: 2155996.

Edmonds J, van Grinsven E, Prow N, Bosco-Lauth A, Brault AC, Bowen RA, Hall RA, Khromykh AA. 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 Feb;87(4):2367-72. doi: 10.1128/JVI.03162-12. Epub 2012 Dec 12. PMID: 23236063; PMCID: PMC3571472.

Emeny JM, Morgan MJ. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. **J Gen Virol.** 1979 Apr;43(1):247-52. doi: 10.1099/0022-1317-43-1-247. PMID: 113494.

Faria et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science.** 2016 Apr 15;352(6283):345-349. doi: 10.1126/science.aaf5036. Epub 2016 Mar 24. PMID: 27013429; PMCID: PMC4918795.

Figueiredo LT. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2007 Mar-Apr;40(2):224-9. doi: 10.1590/s0037-86822007000200016. PMID: 17568894.

Figueiredo LT. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil [Viral hemorrhagic fevers in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2006 Mar-Apr;39(2):203-10. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822006000200014. Epub 2006 May 5. PMID: 16699651.

Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect.** 2000 Nov;2(13):1643-9. doi: 10.1016/s1286-4579(00)01320-4. PMID: 11113383.

Figueiredo LT. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae [The use of *Aedes albopictus* C6/36 cells in the propagation and classification of arbovirus of the Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae families]. **Rev Soc Bras Med**

**Trop.** 1990 Jan-Mar;23(1):13-8. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86821990000100003. PMID: 2089478.

Figueiredo LTM. Human Urban Arboviruses Can Infect Wild Animals and Jump to Sylvatic Maintenance Cycles in South America. **Front Cell Infect Microbiol.** 2019 Jul 17;9:259. doi: 10.3389/fcimb.2019.00259. PMID: 31380302; PMCID: PMC6653809.

Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2005 Jun;69(2):357-71. doi: 10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005. PMID: 15944460; PMCID: PMC1197419.

Fonseca K, Meatherall B, Zarra D, Drebot M, MacDonald J, Pabbaraju K, Wong S, Webster P, Lindsay R, Tellier R. First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. **Am J Trop Med Hyg.** 2014 Nov;91(5):1035-8. doi: 10.4269/ajtmh.14-0151. Epub 2014 Oct 6. PMID: 25294619; PMCID: PMC4228871.

Franz AW, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses.** 2015 Jul 8;7(7):3741-67. doi: 10.3390/v7072795. PMID: 26184281; PMCID: PMC4517124.

GALINDO P, de RODANICHE. Birds as hosts of Ilheus encephalitis virus in Panama. **Am J Trop Med Hyg.** 1961 May;10:395-6. doi: 10.4269/ajtmh.1961.10.395. PMID: 13703088.

Gey G. O., Coffman W. D., Kubicek M. T., 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res.** 12: 264–265

Gonzalez-Hernandez MB, Bragazzi Cunha J, Wobus CE. Plaque assay for murine norovirus. **J Vis Exp.** 2012 Aug 22;(66):e4297. doi: 10.3791/4297. PMID: 22951568; PMCID: PMC3487293.

Gould EA. Methods for long-term virus preservation. **Mol Biotechnol.** 1999 Nov;13(1):57-66. doi: 10.1385/MB:13:1:57. PMID: 10934522.

Guerrero NAS, Bello FJ. Comparative assessment of the replication efficiency of dengue, yellow fever, and chikungunya arboviruses in some insect and mammalian cell lines. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2019 Apr 25;52:e20180511. doi: 10.1590/0037-8682-0511-2018. Erratum in: Rev Soc Bras Med Trop. 2019 Jun 06;52:e20180511b. García, Felio Jesús Bello [corrected to Bello, Felio Jesús]. PMID: 31038623.

Hammarlund E, Amanna IJ, Dubois ME, Barron A, Engelmann F, Messaoudi I, Slifka MK. A flow cytometry-based assay for quantifying non-plaque forming strains of yellow fever virus. **PLoS One.** 2012;7(9):e41707. doi: 10.1371/journal.pone.0041707. Epub 2012 Sep 19. PMID: 23028428; PMCID: PMC3446955.

Hobson-Peters J, Harrison JJ, Watterson D, Hazlewood JE, Vet LJ, Newton ND, Warrilow D, Colmant AMG, Taylor C, Huang B, Piyasena TBH, Chow WK, Setoh YX, Tang B, Nakayama E, Yan K, Amarilla AA, Wheatley S, Moore PR, Finger M, Kurucz N, Modhiran N, Young PR, Khromykh AA, Bielefeldt-Ohmann H, Suhrbier A, Hall RA. A recombinant platform for flavivirus vaccines and diagnostics using chimeras of a new insect-specific virus.

**Sci Transl Med.** 2019 Dec 11;11(522):eaax7888. doi: 10.1126/scitranslmed.aax7888. PMID: 31826984.

ICTV. Current ICTV Taxonomy Release. Taxonomy Browser: *Flaviviridae*. ICTV, 2021. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>.

Johnson BW, Cruz C, Felices V, Espinoza WR, Manock SR, Guevara C, Olson JG, Kochel TJ. Ilheus virus isolate from a human, Ecuador. **Emerg Infect Dis.** 2007 Jun;13(6):956-8. doi: 10.3201/eid1306.070118. PMID: 17582910; PMCID: PMC2792834.

Karakus, U., Cramer, M., Lanz, C., and Yanguéz, E. (2018). Propagation and titration of influenza viruses. **Methods Mol. Biol.** 1836, 59–88. doi: 10.1007/978-1-4939-8678-1\_4

Konishi K, Yamaji T, Sakuma C, Kasai F, Endo T, Kohara A, Hanada K, Osada N. Whole-Genome Sequencing of Vero E6 (VERO C1008) and Comparative Analysis of Four Vero Cell Sublines. **Front Genet.** 2022 Mar 22;13:801382. doi: 10.3389/fgene.2022.801382. PMID: 35391802; PMCID: PMC8981525.

Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Van Bortel W, Hendrickx G, Schaffner F, Elyazar IR, Teng HJ, Brady OJ, Messina JP, Pigott DM, Scott TW, Smith DL, Wint GR, Golding N, Hay SI. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife.** 2015 Jun 30;4:e08347. doi: 10.7554/eLife.08347. PMID: 26126267; PMCID: PMC4493616.

Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. **Nature.** 2020 Oct;586(7830):516-527. doi: 10.1038/s41586-020-2798-3. Epub 2020 Sep 23. PMID: 32967006.

Kuno G, Chang GJ. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clin Microbiol Rev.** 2005 Oct;18(4):608-37. doi: 10.1128/CMR.18.4.608-637.2005. PMID: 16223950; PMCID: PMC1265912.

Lei C, Yang J, Hu J, Sun X. On the Calculation of TCID<sub>50</sub> for Quantitation of Virus Infectivity. **Virol Sin.** 2021 Feb;36(1):141-144. doi: 10.1007/s12250-020-00230-5. Epub 2020 May 26. PMID: 32458296; PMCID: PMC7973348.

Lindenbach et al. *Flaviviridae*. In: Fields; Knipe; Howley. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business, 2013. p. 712-746.

Liu H, Liao HM, Li B, Tsai S, Hung GC, Lo SC. Comparative Genomics, Infectivity and Cytopathogenicity of American Isolates of Zika Virus that Developed Persistent Infections in Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells. **Int J Mol Sci.** 2019 Jun 21;20(12):3035. doi: 10.3390/ijms20123035. PMID: 31234341; PMCID: PMC6628096.

Lülf AT, Freudenstein A, Marr L, Sutter G, Volz A. Non-plaque-forming virions of Modified Vaccinia virus Ankara express viral genes. **Virology.** 2016 Dec;499:322-330. doi: 10.1016/j.virol.2016.09.006. Epub 2016 Oct 11. PMID: 27741426; PMCID: PMC7111619.

Mendoza, E. J., Manguiat, K., Wood, H., and Drebot, M. (2020). Two detailed plaque assay protocols for the quantification of infectious SARS-CoV-2. **Curr. Protoc. Microbiol.** 57:ecmc105.

Milhim BHGA, Estofolete CF, Rocha LCD, Liso E, Brienze VMS, Vasilakis N, Terzian ACB, Nogueira ML. Fatal Outcome of Ilheus Virus in the Cerebrospinal Fluid of a Patient Diagnosed with Encephalitis. **Viruses.** 2020 Aug 29;12(9):957. doi: 10.3390/v12090957. PMID: 32872425; PMCID: PMC7552055.

Monath TP, Soike K, Levenbook I, Zhang ZX, Arroyo J, Delagrave S, Myers G, Barrett AD, Shope RE, Ratterree M, Chambers TJ, Guirakhoo F. Recombinant, chimeric live, attenuated vaccine (ChimeriVax) incorporating the envelope genes of Japanese encephalitis (SA14-14-2) virus and the capsid and nonstructural genes of yellow fever (17D) virus is safe, immunogenic and protective in non-human primates. **Vaccine.** 1999 Apr 9;17(15-16):1869-82. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00487-3. PMID: 10217584.

Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. **J Clin Virol.** 2015 Mar;64:160-73. doi: 10.1016/j.jcv.2014.08.030. Epub 2014 Oct 24. PMID: 25453327.

Mondini A, Cardeal IL, Lázaro E, Nunes SH, Moreira CC, Rahal P, Maia IL, Franco C, Góngora DV, Góngora-Rubio F, Cabrera EM, Figueiredo LT, da Fonseca FG, Bronzoni RV, Chiaravalloti-Neto F, Nogueira ML. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 2007 Jan;13(1):176-8. doi: 10.3201/eid1301.060905. PMID: 17370543; PMCID: PMC2725838.

Morales MA, Fabbri CM, Zunino GE, Kowalewski MM, Luppo VC, Enría DA, Levis SC, Calderón GE. Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. **PLoS Negl Trop Dis.** 2017 Feb 10;11(2):e0005351. doi: 10.1371/journal.pntd.0005351. PMID: 28187130; PMCID: PMC5330535.

Morelli F, Souza RP, Cruz TED, Damke GMZF, Damke E, Suehiro TT, Silva VRSD, Consolaro MEL. Zika virus infection in the genital tract of non-pregnant females: a systematic review. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2020 Mar 2;62:e16. doi: 10.1590/S1678-9946202062016. PMID: 32130356; PMCID: PMC7051180.

Moureau G, Cook S, Lemey P, Nougairede A, Forrester NL, Khasnatinov M, Charrel RN, Firth AE, Gould EA, de Lamballerie X. New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences. **PLoS One.** 2015 Feb 26;10(2):e0117849. doi: 10.1371/journal.pone.0117849. PMID: 25719412; PMCID: PMC4342338.

Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nat Rev Microbiol.** 2018 Feb 12;16(3):125-142. doi: 10.1038/nrmicro.2017.170. PMID: 29430005; PMCID: PMC7097628.

Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastere S, Valour F, Baudouin L, Mallet H, Musso D, Ghawche F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill.** 2014 Mar 6;19(9):20720. doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20720. PMID: 24626205.

Olson MR, Axler RP, Hicks RE. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **J Virol Methods**. 2004 Dec 15;122(2):147-52. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.08.010. PMID: 15542138.

OMS. Vector-borne diseases. World Health Organization, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>.

Pamies D, Hartung T. 21st Century Cell Culture for 21st Century Toxicology. **Chem Res Toxicol**. 2017 Jan 17;30(1):43-52. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00269. Epub 2016 Dec 5. PMID: 28092941; PMCID: PMC5578455.

Panon G, Fauran P, Digoutte JP. Isolement du virus Ilheus en Guyane française [Isolation of Ilheus virus in french Guyana]. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**. 1979 Jul-Aug;72(4):315-8. French. PMID: 535114.

Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, Sall AA, Niedrig M. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virol J**. 2013 Feb 14;10:58. doi: 10.1186/1743-422X-10-58. PMID: 23410000; PMCID: PMC3616844.

Pauvolid-Corrêa A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LT, Couto-Lima D, Campos Z, Nogueira MF, da Silva EE, Nogueira RM, Schatzmayr HG. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2011 Jun;106(4):467-74. doi: 10.1590/s0074-02762011000400014. PMID: 21739036.

Pereira LE, Suzuki A, Coimbra TL, de Souza RP, Chamelet EL. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*) [Ilheus arbovirus in wild birds (*Sporophila caerulescens* and *Molothrus bonariensis*)]. **Rev Saude Publica**. 2001 Apr;35(2):119-23. Portuguese. doi: 10.1590/s0034-89102001000200003. PMID: 11359196.

Pielnaa P, Al-Saadawe M, Saro A, Dama MF, Zhou M, Huang Y, Huang J, Xia Z. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**. 2020 Apr;543:34-42. doi: 10.1016/j.virol.2020.01.015. Epub 2020 Feb 2. PMID: 32056845.

Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nat Microbiol**. 2020 Jun;5(6):796-812. doi: 10.1038/s41564-020-0714-0. Epub 2020 May 4. PMID: 32367055; PMCID: PMC7696730.

Pierson TC, Diamond MS. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**. 2018 Aug;560(7720):573-581. doi: 10.1038/s41586-018-0446-y. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30158602.

PIERSON; DIAMOND. *Flavivirus*. In: Fields; Knipe; Howley. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business, 2013. p. 747-794.

Plowright RK, Parrish CR, McCallum H, Hudson PJ, Ko AI, Graham AL, Lloyd-Smith JO. Pathways to zoonotic spillover. **Nat Rev Microbiol**. 2017 Aug;15(8):502-510. doi: 10.1038/nrmicro.2017.45. Epub 2017 May 30. PMID: 28555073; PMCID: PMC5791534.

Prías-Landínez E, Bernal-Cubides C, Morales-Alarcón A. Isolation of Ilhéus virus from man in Colombia. **Am J Trop Med Hyg**. 1968 Jan;17(1):112-4. doi: 10.4269/ajtmh.1968.17.112. PMID: 5637016.

Quan J, Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. **PLoS One**. 2009 Jul 30;4(7):e6441. doi: 10.1371/journal.pone.0006441. PMID: 19649325; PMCID: PMC2713398.

Reed W, Carroll J, Agramonte A, Lazear JW. The Etiology of Yellow Fever-A Preliminary Note. **Public Health Pap Rep**. 1900;26:37-53. PMID: 19600960; PMCID: PMC2329228.

Reed, L.J. and Muench, H. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. **American Journal of Hygiene**, 1938. 27, 493-497.

Reis VPD, Keller M, Schmidt K, Ulrich RG, Groschup MH.  $\alpha$ V $\beta$ 3 Integrin Expression Is Essential for Replication of Mosquito and Tick-Borne Flaviviruses in Murine Fibroblast Cells. **Viruses**. 2021 Dec 23;14(1):18. doi: 10.3390/v14010018. PMID: 35062222; PMCID: PMC8780171.

RIBEIRO, Ana Cláudia da Silva et al . Perfis de infecção do vírus Mayaro e do vírus Chikungunya em linhagens de células de mamíferos e mosquitos. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua , v. 9, n. 4, p. 25-35, dez. 2018 .

Ridenour CL, Cocking J, Poidmore S, Erickson D, Brock B, Valentine M, Roe CC, Young SJ, Henke JA, Hung KY, Wittie J, Stefanakos E, Sumner C, Ruedas M, Raman V, Seaton N, Bendik W, Hornstra O'Neill HM, Sheridan K, Centner H, Lemmer D, Fofanov V, Smith K, Will J, Townsend J, Foster JT, Keim PS, Engelthaler DM, Hepp CM. St. Louis Encephalitis Virus in the Southwestern United States: A Phylogeographic Case for a Multi-Variant Introduction Event. **Front Genet**. 2021 Jun 8;12:667895. doi: 10.3389/fgene.2021.667895. PMID: 34168675; PMCID: PMC8217752.

Rivarola ME, Albrieu-Llinás G, Pisano MB, Tauro LB, Gorosito-Serrán M, Beccaria CG, Díaz LA, Vázquez A, Quaglia A, López C, Spinsanti L, Gruppi A, Contigiani MS. Tissue tropism of Saint Louis encephalitis virus: Histopathology triggered by epidemic and non-epidemic strains isolated in Argentina. **Virology**. 2017 May;505:181-192. doi: 10.1016/j.virol.2017.02.023. Epub 2017 Mar 6. PMID: 28279829.

Rosa R, Costa EA, Marques RE, Oliveira TS, Furtini R, Bomfim MR, Teixeira MM, Paixão TA, Santos RL. Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. 2013 Nov 21;7(11):e2537. doi: 10.1371/journal.pntd.0002537. PMID: 24278489; PMCID: PMC3836713.

Sadanand. Putting smallpox out to pasture. **Nature portfolio**, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/d42859-020-00007-6>.

Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, Bhardwaj N. Therapeutic cancer vaccines. **Nat Rev Cancer**. 2021 Jun;21(6):360-378. doi: 10.1038/s41568-021-00346-0. Epub 2021 Apr 27. PMID: 33907315.

Setoh YX, Prow NA, Peng N, Hugo LE, Devine G, Hazlewood JE, Suhrbier A, Khromykh AA. De Novo Generation and Characterization of New Zika Virus Isolate Using Sequence Data from a Microcephaly Case. **mSphere**. 2017 May 17;2(3):e00190-17. doi: 10.1128/mSphereDirect.00190-17. PMID: 28529976; PMCID: PMC5437134.

Shah PS, Link N, Jang GM, Sharp PP, Zhu T, Swaney DL, Johnson JR, Von Dollen J, Ramage HR, Satkamp L, Newton B, Hüttenhain R, Petit MJ, Baum T, Everitt A, Laufman O, Tassetto M, Shales M, Stevenson E, Iglesias GN, Shokat L, Tripathi S, Balasubramaniam V, Webb LG, Aguirre S, Willsey AJ, Garcia-Sastre A, Pollard KS, Cherry S, Gamarnik AV, Marazzi I, Taunton J, Fernandez-Sesma A, Bellen HJ, Andino R, Krogan NJ. Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. **Cell**. 2018 Dec 13;175(7):1931-1945.e18. doi: 10.1016/j.cell.2018.11.028. PMID: 30550790; PMCID: PMC6474419.

Shurtleff AC, Bloomfield HA, Mort S, Orr SA, Audet B, Whitaker T, Richards MJ, Bavari S. Validation of the Filovirus Plaque Assay for Use in Preclinical Studies. **Viruses**. 2016 Apr 21;8(4):113. doi: 10.3390/v8040113. PMID: 27110807; PMCID: PMC4848606.

Smith, M. R., Schirtzinger, E. E., Wilson, W. C., and Davis, A. S. (2019). Rift valley fever virus: propagation, quantification, and storage. **Curr. Protoc. Microbiol.** 55:e92.

Smither SJ, Lear-Rooney C, Biggins J, Pettitt J, Lever MS, Olinger GG Jr. Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity. **J Virol Methods**. 2013 Nov;193(2):565-71. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.05.015. Epub 2013 Jun 5. PMID: 23748121.

Sotcheff S, Routh A. Understanding Flavivirus Capsid Protein Functions: The Tip of the Iceberg. **Pathogens**. 2020 Jan 5;9(1):42. doi: 10.3390/pathogens9010042. PMID: 31948047; PMCID: PMC7168633.

SOUZA, W. M. Caracterização genômica e evolutiva de vírus zoonóticos nas Américas. 2017. 107 p. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. Ribeirão Preto, 2017.

SPENCE L, ANDERSON CR, DOWNS WG. Isolation of Ilheus virus from human beings in Trinidad, West Indies. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1962 Nov;56:504-9. doi: 10.1016/0035-9203(62)90074-3. PMID: 13990008.

Srihongse S, Johnson CM. The isolation of Ilhéus virus from man in Panamá. **Am J Trop Med Hyg**. 1967 Jul;16(4):516-8. doi: 10.4269/ajtmh.1967.16.516. PMID: 4378148.

Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. **JAMA**. 2008 Aug 27;300(8):960-2. doi: 10.1001/jama.300.8.960. PMID: 18728272.

Suzukawa AA, Zanluca C, Jorge NAN, de Noronha L, Koishi AC, de Paula CBV, Rebutini PZ, Nagashima S, Hansel-Frose AFF, Parreira VSC, Bordignon J, MacDonald MR, Rice CM, Passetti F, Duarte Dos Santos CN. Downregulation of IGF2 expression in third trimester placental tissues from Zika virus infected women in Brazil. **J Infect**. 2020 Nov;81(5):766-775. doi: 10.1016/j.jinf.2020.09.028. Epub 2020 Sep 26. PMID: 32987099.

Svensson, L., Hjalmarsson, A., and Everitt, E. (1999). TCID50 determination by an immuno dot blot assay as exemplified in a study of storage conditions of infectious pancreatic necrosis virus. **J. Virol. Methods** 80, 17–24. doi: 10.1016/s0166-0934(99)00018-x

Swetnam DM, Stuart JB, Young K, Maharaj PD, Fang Y, Garcia S, Barker CM, Smith K, Godsey MS, Savage HM, Barton V, Bolling BG, Duggal N, Brault AC, Coffey LL. Movement of St. Louis encephalitis virus in the Western United States, 2014- 2018. **PLoS Negl Trop Dis**. 2020 Jun 10;14(6):e0008343. doi: 10.1371/journal.pntd.0008343. PMID: 32520944; PMCID: PMC7307790.

Thomas, S.J., Martinez, L.J., Endy, T.P. (2014). Flaviviruses: Yellow Fever, Japanese B, West Nile, and Others. In: Kaslow, R., Stanberry, L., Le Duc, J. (eds) *Viral Infections of Humans*. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7448-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7448-8_16)

Torii S, Ono C, Suzuki R, Morioka Y, Anzai I, Fauzyah Y, Maeda Y, Kamitani W, Fukuhara T, Matsuura Y. Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction. **Cell Rep**. 2021 Apr 20;35(3):109014. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109014. Epub 2021 Apr 1. PMID: 33838744; PMCID: PMC8015404.

Torres FJ, Parry R, Hugo LE, Slonchak A, Newton ND, Vet LJ, Modhiran N, Pullinger B, Wang X, Potter J, Winterford C, Hobson-Peters J, Hall RA, Khromykh AA. Reporter Flaviviruses as Tools to Demonstrate Homologous and Heterologous Superinfection Exclusion. **Viruses**. 2022 Jul 8;14(7):1501. doi: 10.3390/v14071501. PMID: 35891480; PMCID: PMC9317482.

Vasconcelos PF, Travassos da Rosa AP, Rodrigues SG, Travassos da Rosa ES, Dégallier N, Travassos da Rosa JF. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cad Saude Publica**. 2001;17 Suppl:155-64. doi: 10.1590/s0102-311x2001000700025. PMID: 11426277.

Vieira CJDSP, Andrade CD, Kubiszeski JR, Silva DJFD, Barreto ES, Massey AL, Canale GR, Bernardo CSS, Levi T, Peres CA, Bronzoni RVM. Detection of Ilheus virus in mosquitoes from southeast Amazon, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2019 Jul 1;113(7):424-427. doi: 10.1093/trstmh/trz031. PMID: 31050765.

Vielle NJ, García-Nicolás O, Oliveira Esteves BI, Brügger M, Summerfield A, Alves MP. The Human Upper Respiratory Tract Epithelium Is Susceptible to Flaviviruses. **Front Microbiol**. 2019 Apr 16;10:811. doi: 10.3389/fmicb.2019.00811. PMID: 31057517; PMCID: PMC6477545.

Walker NJ. Tech.Sight. A technique whose time has come. **Science**. 2002 Apr 19;296(5567):557-9. doi: 10.1126/science.296.5567.557. PMID: 11964485.

Watterson D, Modhiran N, Young PR. The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. **Antiviral Res**. 2016 Jun;130:7-18. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.02.014. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26944216.

Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annu Rev Med**. 2018 Jan 29;69:395-408. doi:

10.1146/annurev-med-050715-105122. Epub 2017 Aug 28. PMID: 28846489; PMCID: PMC6343128.

Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res.** 2010 Feb;85(2):328-45. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008. Epub 2009 Oct 24. PMID: 19857523; PMCID: PMC2815176.

White JP, Xiong S, Malvin NP, Khoury-Hanold W, Heuckeroth RO, Stappenbeck TS, Diamond MS. Intestinal Dysmotility Syndromes following Systemic Infection by Flaviviruses. **Cell.** 2018 Nov 15;175(5):1198-1212.e12. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.069. Epub 2018 Oct 4. PMID: 30293866; PMCID: PMC6309989.

WINOCOUR E, SACHS L. A plaque assay for the polyoma virus. **Virology.** 1959 Jul;8(3):397-400. doi: 10.1016/0042-6822(59)90044-3. PMID: 13669363.

Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2015 Jun;110(4):569-72. doi: 10.1590/0074-02760150192. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26061233; PMCID: PMC4501423.

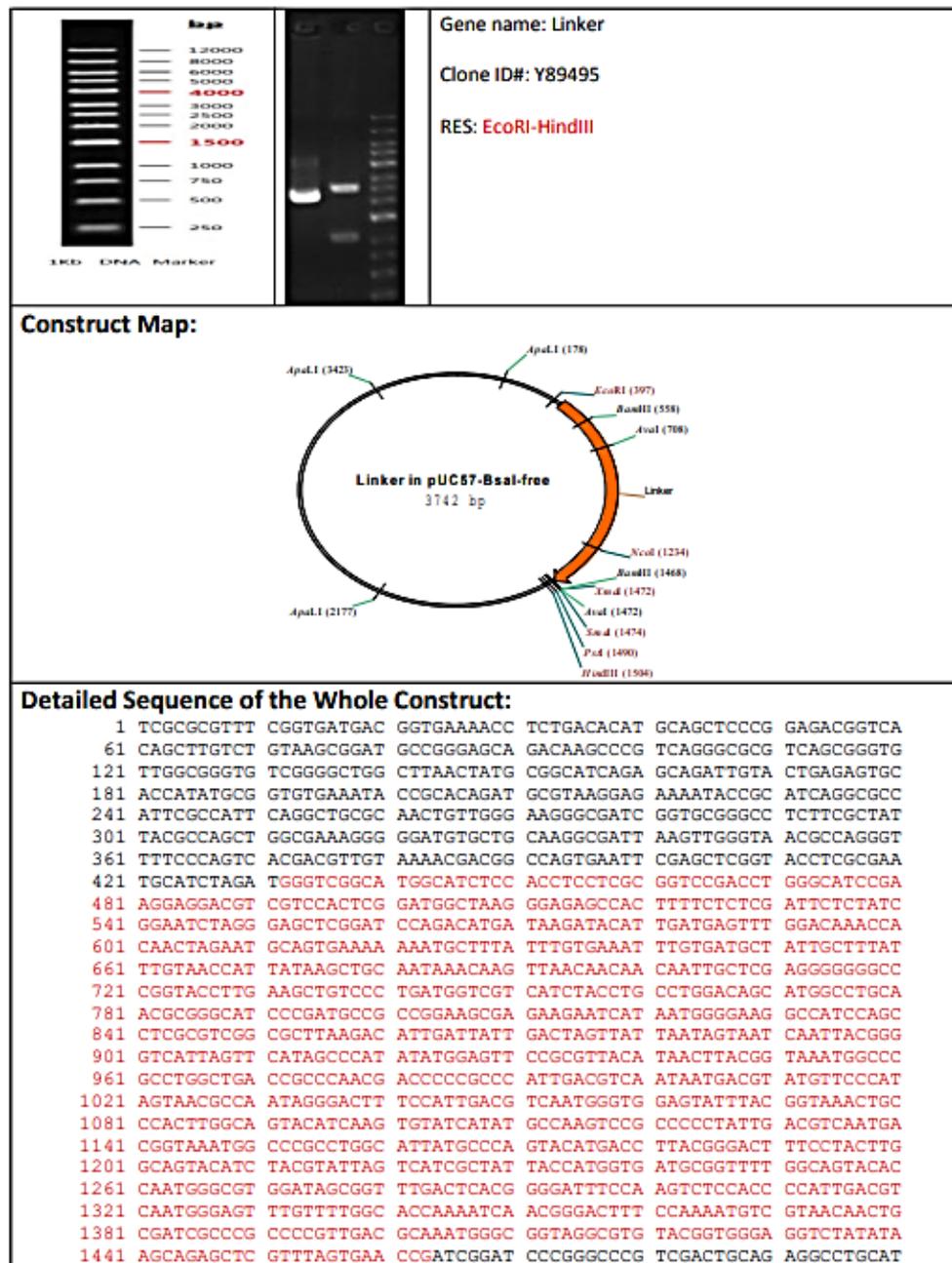
## ANEXO A – INFORMAÇÕES DO PLASMÍDEO CONTENDO A SEQUÊNCIA DO FRAGMENTO *LINKER*



**Biomatik**  
Tel: (519) 489-7195, (800) 836-8089  
Fax: (519) 231-0140, (877) 221-3515  
Email: info@biomatik.com  
http://www.biomatik.com

### Gene Synthesis QA Report

<b>Gene Name</b>	<b>Linker</b>	<b>Order ID</b>	<b>SG190316-1</b>
<b>Lot#</b>	<b>Y89495</b>	<b>Cloning Vector</b>	<b>pUC57-Bsal-Free</b>
<b>Length (bp)</b>	<b>1032</b>	<b>Cloning Sites</b>	<b>EcoRV</b>
Quality Control			
Test Items	Specifications	Results	
<b>Sequencing Alignment</b>	Sequencing data consistent with target	[ X ] Pass	
<b>Vector Sequence</b>	Flanking sequence of cloning sites are correct	[ X ] Pass	
<b>Restriction Digest</b>	Insert size is correct and no contaminated bands	[ X ] Pass	
<b>ORF Across Junction</b>	Correct and consistent with target	N/A	
<b>PCR Amplification</b>	Correct and no contaminated bands	[ X ] Pass	
<b>Endotoxin Level</b>	Verified, <0.1 EU/μg (Endo-Free Preps Only)	N/A	
<b>Appearance</b>	Clear, no foreign particles	[ X ] Pass	
<b>DNA Purity</b>	Purity (A 260/A280 = 1.8 - 2.0)	[ X ] Pass	
<b>DNA Quantity</b>	Actual yield (by A 260 )	5μg/5μg	
<b>Comments</b>			
<p>Delivery form: lyophilized plasmid (TE lyophilized) containing the gene insert. It is stable at room temperature for extended period of time during shipping. The lyophilized plasmid can be dissolved in sterile TE buffer or nuclease-free water (neutral pH) depending on the established laboratory practice. After reconstitution, store the stock solution at -20°C or -80°C for long term storage. The lyophilized plasmid dissolved in TE buffer is stable for at least 6 months at 4°C while the lyophilized DNA dissolved in water is <b>NOT STABLE</b> at 4°C.</p> <p>a) Before opening the tube containing the plasmid, please briefly centrifuge the tube. Lyophilized plasmid could attach to the wall of the tube. Opening without centrifugation could cause DNA loss.</p> <p>b) Stock Solution: Reconstitute lyophilized plasmid (4ug or 10ug) in 40ul or 100ul of TE buffer or nuclease-free water (final concentration - 100ng/ul). To accurately determine the quantity of DNA present, please measure OD value of original stock at OD<sub>260nm</sub> after reconstitution.</p> <p>c) Working Solution: make a 1:10 dilution of stock solution using TE buffer or nuclease-free water (final concentration - 10ng/ul)</p> <p><b>Transformation and Replating:</b> Transform 2ul of stock solution into appropriate <i>E. coli</i> competent cells according to standard laboratory protocol. Plate the mixture on LB agar (with desired antibiotic selection) and incubate at 37°C for overnight. Select a well separated, <u>SINGLE</u> colony and inoculate in LB medium with desired antibiotic selection for overnight culture. Purify Plasmid DNA from overnight cultures, verify sequences and continue with project of interest. *It is important to select only a <u>SINGLE</u> colony for overnight culture.</p>			
Restriction Digestion			





**Biomatik**  
 Tel: (519) 489-7195, (800) 836-8089  
 Fax: (519) 231-0140, (877) 221-3515  
 Email: [info@biomatik.com](mailto:info@biomatik.com)  
<http://www.biomatik.com>

1501	GCAAGCTTGG	CGTAATCATG	GTCATAGCTG	TTTCCTGTGT	GAAATTGTTA	TCCGCTCACA
1561	ATTCACACACA	ACATACGAGC	CGGAAGCATA	AAGTGTAAG	CCTGGGGTGC	CTAATGAGTG
1621	AGCTAACTCA	CATTAATTGC	GTTGCGCTCA	CTGCCCGCTT	TCCAGTCCGG	AAACCTGTCCG
1681	TGCCAGCTGC	ATTAATGAAT	CGGCCAACGC	GCGGGGAGAG	GCGGTTTGGC	TATTGGGGCGC
1741	TCTTCCGCTT	CCTCGCTCAC	TGACTCGCTG	CGCTCGGTG	TTCGGCTGCG	GCGAGCGGTA
1801	TCAGCTCACT	CAAAGGCGGT	AATACGGTTA	TCCACAGAAT	CAGGGGATAA	CGCAGGAAAG
1861	AACATGTGAG	CAAAAGGCCA	GCAAAAGGCC	AGGAACCGTA	AAAAGGCCGC	GTTGCTGGCG
1921	TTTTCCATA	GGCTCCGCC	CCCTGACGAG	CATCACAAA	ATCGACGCTC	AAGTCAGAGG
1981	TGGCGAAACC	CGACAGGACT	ATAAAGATAC	CAGGCGTTTC	CCCCTGGAAG	CTCCCTCGTG
2041	CGCTCTCCTG	TTCCGACCCT	GCCGCTTACC	GGATACCTGT	CCGCTTTTCT	CCCTTCGGGA
2101	AGCGTGGCGC	TTTCTCATAG	CTCACGCTGT	AGGTATCTCA	GTTCCGGTGA	GGTCGTTCCG
2161	TCCAAGCTGG	GCTGTGTGCA	CGAACCCCCC	GTTCAGCCCG	ACCGCTGGCG	CTTATCCGGT
2221	AACTATCGTC	TTGAGTCCAA	CCCGGTAAGA	CACGACTTAT	CGCCACTGGC	AGCAGCCACT
2281	GGTAACAGGA	TTAGCAGAGC	GAGGTATGTA	GGCGGTGCTA	CAGAGTCTTT	GAAGTGGTGG
2341	CCTAACTACG	GCTACACTAG	AAGAACAGTA	TTTGGTATCT	GCGCTCTGCT	GAAGCCAGTT
2401	ACCTTCGGAA	AAAGAGTTGG	TAGCTCTTGA	TCCGGCAAAC	AAACCACCCG	TGGTAGCGGT
2461	GGTTTTTTTG	TTTGCAAGCA	GCAGATTACG	CGCAGAAAA	AAGGATCTCA	AGAAGATCCT
2521	TTGATCTTTT	CTACGGGGTC	TGACGCTCAG	TGGAACGAAA	ACTCACGTTA	AGGGATTTTG
2581	GTCATGAGAT	TATCAAAAAG	GATCTTCACC	TAGATCCTTT	TAAATTAATA	ATGAAGTTTT
2641	AAATCAATCT	AAAGTATATA	TGAGTAAACT	TGGTCTGACA	GTTACCAATG	CTTAATCAGT
2701	GAGGCACCTA	TCTCAGCGAT	CTGTCTATTT	CGTTCATCCA	TAGTTGCCCTG	ACTCCCCTGC
2761	GTGTAGATAA	CTACGATACG	GGAGGGGCTTA	CCATCTGGCC	CCAGTGTCTG	AATGATACCG
2821	CGAGATCCAC	GCTCACCGGC	TCCAGATTTA	TCAGCAATAA	ACCAGCCAGC	CGGAAGGGCC
2881	GAGCGCAGAA	GTGGTCTGTC	AACTTTATCC	GCCTCCATCC	AGTCTATTTA	TTGTTGCCGG
2941	GAAGCTAGAG	TAAGTAGTTC	GCCAGTTAAT	AGTTTGCGCA	ACGTTGTTGC	CATTGCTACA
3001	GGCATCGTGG	TGTCACGCTC	GTCGTTTGGT	ATGGCTTCAT	TCAGCTCCGG	TTCCCAACGA
3061	TCAAGGCGAG	TTACATGATC	CCCCATGTTG	TGCAAAAAAG	CGGTTAGCTC	CTTCGGTCTC
3121	CCGATCGTTG	TCAGAAGTAA	GTTGGCCGCA	GTGTTATCAC	TCATGGTTAT	GGCAGCACTG
3181	CATAATTCTC	TTACTGTCAT	GCCATCCGTA	AGATGCTTTT	CTGTGACTGG	TGAGTACTCA
3241	ACCAAGTCAT	TCTGAGAATA	GTGTATGCGG	CGACCGAGTT	GCTCTTGCCC	GGCGTCAATA
3301	CGGGATAATA	CCGCGCCACA	TAGCAGAACT	TTAAAAGTGC	TCATCATTGG	AAAACGTTCT
3361	TCGGGGCGAA	AACTCTCAAG	GATCTTACCG	CTGTTGAGAT	CCAGTTCGAT	GTAACCCACT
3421	CGTGACCCCA	ACTGATCTTC	AGCATCTTTT	ACTTTCACCA	GCGTTTCTGG	GTGAGCAAAA
3481	ACAGGAAGGC	AAAATGCCGC	AAAAAAGGGA	ATAAGGGCGA	CACGGAAATG	TTGAATACTC
3541	ATACTCTTCC	TTTTTCAATA	TTATTGAAGC	ATTTATCAGG	GTTATTGTCT	CATGAGCGGA
3601	TACATATTTG	AATGTATTTA	GAAAAATAAA	CAAATAGGGG	TTCCGCGCAC	ATTTCCCGCA
3661	AAAGTGCCAC	CTGACGTCTA	AGAAACCATT	ATTATCATGA	CATTAACCTA	TAAAAATAGG
3721	CGTATCACGA	GGCCCTTTCG	TC			

**Certified by:**

**Date:** 04/26/2019

## ANEXO B – INFORMAÇÕES DO PLASMÍDEO CONTENDO A SEQUÊNCIA DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA VACINAL COM PROTEÍNAS DO ZIKA



Make Research Easy  
CONFIDENTIAL

# Certificate of Analysis

**Project ID:** U4329CD200-1  
**Lot No.:** U4329CD200S-1/G134312  
**Plasmid Name:** U6024BI130-1 pCC1-4K+T7T7I  
**Quantity:** 100 µg(0.05 mg each 2 vials)      **Concentration:** N/A  
**Final Volume:** N/A      **Final Buffer:** Lyophilized

QC Items	Specifications	Results	
Appearance	Colorless, clear, free of precipitate or foreign particles	Pass	Colorless, clear, free of precipitate or foreign particles
Identity	Co-migrates with reference DNA and/or size confirmed versus marker	Pass	Confirmed
Restriction Digests	Matches expected test	Pass	Matched Shown in attachment 1
OD260/OD280	1.8-2.0	Pass	1.86
Residual RNA	Not visible on agarose gel	Pass	Invisible
Genomic DNA	Not visible on agarose gel	Pass	Invisible
Endotoxin	<input type="checkbox"/> ≤ 0.005 EU/µg <input checked="" type="checkbox"/> No QC testing requested	N/A	
Bio-Burden Assay	<input type="checkbox"/> Bio-Burden Assay <input checked="" type="checkbox"/> No QC testing requested	N/A	
Additional Test		N/A	

### NOTE

Shipping at	Plasmid Storing at	Bacstab Storing at	Glycerol Stock Storing at
Room Temperature	-20°C	4°C	-20°C/-80°C

Certified *Morgan*      Date: 2017/4/30

Thank you for your patronage to our Gene services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1,000 EZcoupon™ points. For more information, please contact us by e-mail at [web@genscript.com](mailto:web@genscript.com).

For research use only

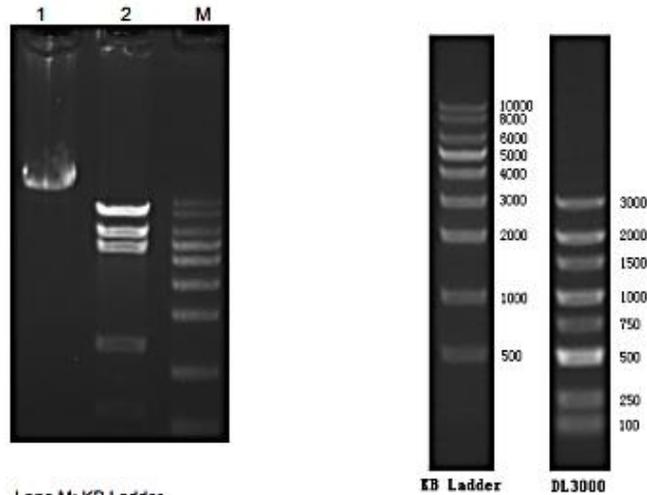
860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274    Tel: 1-732-885-9188    Fax: 1-732-210-0262    Email: [order@genscript.com](mailto:order@genscript.com)    Web: [www.genscript.com](http://www.genscript.com)

Page 1 of 2

Attachment 1

## Enzyme Digestion



Lane M: KB Ladder

Lane 1: U4329CD200-1 plasmid

Lane 2: U4329CD200-1 plasmid digested  
by SpeI and NotI**Digestion Conditions:**

About 300ng plasmid digested

Digestion in water-bath, 37°C for 40 minutes

1% Agarose Gel

For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274

Tel: 1-732-885-9188

Fax: 1-732-210-0262

Email: [order@genscript.com](mailto:order@genscript.com)Web: [www.genscript.com](http://www.genscript.com)

Page 2 of 2