



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

GABRIELA MATTOSO COELHO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA UM NOVO ARBOVIRUS E SUA APLICABILIDADE NO DIAGNÓSTICO E
ESTUDO DE INTERAÇÕES EM MOSQUITOS VETORES**

CURITIBA
2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

GABRIELA MATTOSO COELHO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA UM NOVO ARBOVIRUS E SUA APLICABILIDADE NO DIAGNÓSTICO E
ESTUDO DE INTERAÇÕES EM MOSQUITOS VETORES

Dissertação apresentada ao Instituto
Carlos Chagas como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos
Co-orientadora: Dra. Camila Zanluca

CURITIBA
2020

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Claudia, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Virologia Molecular, sempre proporcionando ensinamentos, desafios e oportunidades para crescer. Obrigada pelas orientações e confiança que depositou em mim.

À minha co-orientadora Dra. Camila, por todos ensinamentos e auxílio. Obrigada por estar sempre à disposição para discutir o andamento do trabalho e oferecer apoio moral, especialmente na reta final.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Molecular. Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a minha formação profissional e para a realização deste trabalho, seja através do auxílio na realização de experimentos, na discussão de resultados ou da simples convivência que tornou o ambiente do laboratório tão agradável. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos e inúmeros momentos de descontração que com certeza levarei para vida. Em especial, agradeço à Stefanny pela amizade, pelas conversas sinceras e inúmeros conselhos. Obrigada pelo apoio durante todo esse período.

À Capes e CNPq, pelo financiamento que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos funcionários do ICC/Fiocruz-PR e do programa de pós-graduação que prestaram auxílio e suporte durante esse período.

Ao Prof. Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira do Laboratório de Interação Mosquito-Vírus da UFSC, pela colaboração para realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e por terem aceitado o convite no prazo curto que lhes foi proposto.

Ao meu querido esposo Denis, que sempre me proporcionou apoio e amor incondicional. Obrigada por esses anos de companheirismo e em especial, por ter deixado nossa cidade natal e ter me acompanhado até Curitiba para eu seguir minhas aspirações.

À minha família, por todo incentivo, apoio e conselhos. Em especial, agradeço a meus pais, que não apenas me apoiaram mas me inspiraram a seguir essa trajetória. Obrigada pela inabalável fé em mim.

A Deus, que me concedeu o dom da vida e me guiou em todas minhas escolhas.

RESUMO

Referência para o Ministério da Saúde na região Sul do país, o Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz PR tem entre suas atribuições a vigilância epidemiológica de vírus emergentes e reemergentes. Neste contexto, recentemente identificou e caracterizou um novo alphavirus, denominado Caaingua (CAAV). A maior parte dos vírus desse gênero possuem insetos como vetores, majoritariamente mosquitos, e infectam uma grande variedade de hospedeiros vertebrados. Os alphavirus que incluem humanos como hospedeiros em seus ciclos de transmissão podem causar doenças, tipicamente caracterizadas por artralgia ou encefalite. O CAAV foi isolado a partir de *pools* de mosquitos *Culex* na região de Marilena (PR) durante um surto de doença artritogênica, a qual não teve diagnóstico laboratorial confirmado para nenhuma arbovirose circulante e foi, portanto, descrita como desconhecida. Apesar de até o momento não ter sido estabelecido um vínculo entre o vírus e o surto em Marilena, maiores estudos são necessários para investigar o papel epidemiológico do novo vírus e seu ciclo de transmissão. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver insumos para ampliar a caracterização de CAAV *in vitro* e em mosquitos. Os objetivos específicos do estudo foram o desenvolvimento e caracterização de anticorpos monoclonais (mAbs) reativos contra o vírus e a avaliação da infecção de CAAV em mosquitos *Aedes albopictus* por RT-qPCR. Para atingir esses objetivos, camundongos Balb/C foram imunizados com o vírus purificado e seus esplenócitos foram fusionados com células de mieloma da linhagem P3X63Ag8.653. Os hibridomas secretores de anticorpos anti-CAAV foram selecionados por imunofluorescência indireta e os positivos foram submetidos a diluição limitante para obtenção de mAbs. O protocolo de fusão resultou em três hibridomas (8A11, 7D11 e 5F4) estáveis produtores de anticorpos anti-CAAV, dos quais foram obtidos 15 mAbs. Dois mAbs (5F4/F6/A10 e 5F4/H6/D6) foram purificados e caracterizados, sendo ambos do isotipo IgG2a com cadeia leve κ . Os mAbs não apresentaram reatividade cruzada com os alphavirus Aura virus, Chikungunya, vírus da Encefalite Equina Venezuelana e Mayaro e continuaram reativos contra o CAAV após a purificação. Ademais, o mAb 5F4/F6/A10 teve sua aplicabilidade em ensaio de citometria de fluxo demonstrada e apresentou desempenho semelhante ao anticorpo comercial usado como controle. Para avaliar a infecção por CAAV em *A. albopictus*, mosquitos dessa espécie foram infectados por via oral em dois experimentos: no primeiro, os mosquitos foram coletados e analisados individualmente após 0, 4, 7, 14 e 21 dias e, no segundo, os mosquitos foram coletados após 0, 7, 14 e 21 dias, foram dissecados em intestino, tórax e cabeça e analisados em *pools*. As análises por RT-qPCR sugerem que mosquitos *A. albopictus* são suscetíveis à infecção por CAAV e que a replicação não se limita ao intestino, mas também se dissemina para cabeça e tórax em até 7 dias após a ingestão do vírus. Em ambos os experimentos, houve detecção viral nos mosquitos até 21 dias após a alimentação, sugerindo uma infecção persistente. Esse foi o primeiro estudo a avaliar a infecção por CAAV em espécies de mosquitos vetores e a produzir mAbs específicos para CAAV.

Palavras chave: vírus Caaingua; anticorpos monoclonais; RT-qPCR; *Aedes albopictus*.

ABSTRACT

The Reference Laboratory of Emerging Viruses at Carlos Chagas Institute/ Fiocruz-PR provides surveillance services for emerging and re-emerging arboviruses for the Brazilian Ministry of Health. In this context, recently a novel alphavirus, named Caaingua virus (CAAV), was identified and characterized. Most viruses of this genus have insects as vectors (mainly mosquitoes) and can infect a large variety of vertebrate hosts. Alphaviruses that have humans as hosts in their transmission cycle can cause disease, typically characterized by arthralgia or encephalitis. CAAV was isolated from pools of *Culex* mosquitoes collected at Marilena municipality, South Brazil, during an outbreak of an arthritogenic disease. Since patients had no laboratory diagnosis for the commonly circulating arboviruses, the etiological agent was considered unknown. Although a link between the outbreak at Marilena city and CAAV has not been established, additional studies are needed to investigate the virus transmission cycle and epidemiological role. Therefore, the aim of this study was to develop reagents that can be applied to broaden the characterization of CAAV *in vitro* and in mosquitoes. Specific goals include the production and characterization of anti-CAAV monoclonal antibodies and the evaluation of CAAV infection in *Aedes albopictus* mosquitoes using RT-qPCR. For this purpose, Balb/C mice were immunized with purified CAAV and their splenocytes were fused with myeloma cell line P3X63Ag8.653. Hybridomas producing anti-CAAV antibodies were selected by indirect immunofluorescence assay and were cloned to obtain mAbs. Fusion protocol resulted in three stable hybridomas (8A11, 7D11, 5F4), from which 15 mAbs were obtained. Two mAbs (5F4/F6/A10 and 5F4/H6/D6) were chosen for characterization, both with IgG2a isotypes and kappa light chains. Both mAbs did not cross-react with the alphaviruses Aura virus, Chikungunya virus, Mayaro virus and Eastern Equine Encephalitis virus and antibody reactivity against CAAV was retained after affinity purification procedures. In addition, mAb suitability for flow cytometry assay was demonstrated with 5F4/F6/A10 and showed a similar performance to the commercial antibody used as a control. In order to evaluate CAAV infection in *A. albopictus*, mosquitoes were orally infected in two experiments: in the first, mosquitoes were individually collected and processed at 0, 4, 7, 14 and 21 days post infection (d.p.i.) and in the second, mosquitoes were collected at 0, 7, 14 and 21 d.p.i., dissected in midgut, thorax and head and processed in pools. RT-qPCR analysis suggests that *A. albopictus* mosquitoes are susceptible to CAAV and that infection is not limited to the midgut, but disseminates to the head and thorax up to 7 days after an infectious blood meal. In both experiments, the virus was detected up to 21 d.p.i., suggesting the establishment of a persistent infection. This was the first study to evaluate CAAV infection in vector mosquitoes and to produce anti-CAAV specific mAbs.

Keywords: Caaingua virus; monoclonal antibodies; RT-qPCR; *Aedes albopictus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Representação do genoma de alphavirus	14
Figura 1.2 - Representação de uma partícula viral de alphavirus	15
Figura 1.3 - Representação esquemática do ciclo de infecção de alphavirus.....	16
Figura 1.4 - Representação esquemática do ciclo de infecção viral em mosquitos	20
Figura 4.1 - Soroconversão de camundongos Balb/C imunizados com CAAV	42
Figura 4.2 - Ensaio de imunofluorescência indireta dos hibridomas policlonais secretores de anticorpos anti-CAAV.....	43
Figura 4.3 - Reatividade cruzada dos mAbs anti-CAAV contra outros alphavirus.....	43
Figura 4.4 - Purificação dos mAbs anti-CAAV 5F4/F6/A10 e 5F4/H6/D6.....	44
Figura 4.5 - Avaliação do mAb 5F4/F6/A10 em células C6/36 infectadas com CAAV (MOI=10, 1 d.p.i.).....	45
Figura 4.6 - Curvas de dissociação de RT-qPCR feita com diferentes temperaturas de hibridização para iniciadores de CAAV	46
Figura 4.7 - Curvas de dissociação da reação de RT-qPCR feita com RNA extraído por dois protocolos: (A) com o <i>QIAamp® Viral RNA Mini Kit</i> e (B) com TRizol	48
Figura 4.8 - Análise de estabilidade dos genes endógenos RPL32 e RPS17 pela ferramenta RefFinder.....	49
Figura 4.9 - Curvas padrão utilizadas para a análise da eficiência de amplificação dos iniciadores CAAV, RPL32 e RPS17	50
Figura 4.10 - Cinética de mosquitos <i>A. albopictus</i> infectados por CAAV e coletados após 0, 4, 7, 14 e 21 dias	51
Figura 4.11 - Cinética da infecção por CAAV no intestino, tórax e cabeça de mosquitos <i>A. albopictus</i> coletados após 0, 7, 14 e 21 dias.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Concentrações dos reagentes e RNA usados em cada reação de RT-qPCR...39	39
Tabela 3.2 - Condições de ciclagem utilizadas para as reações de RT-qPCR..... 39	39
Tabela 3.3 - Sequências e alvos dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR para detecção de CAAV e genes endógenos de <i>A. albopictus</i> 40	40
Tabela 4.1 - RT-qPCR feita com diferentes temperaturas de hibridização para iniciadores de CAAV 46	46
Tabela 4.2 - Resultado da RT-qPCR feita com RNA de mosquitos <i>A. albopictus</i> extraído utilizando o <i>QIAamp® Viral RNA Mini Kit</i> ou pelo método com TRizol..... 47	47
Tabela 4.3 - Número de mosquitos coletados 0, 4, 7, 14 e 21 dias após infecção de mosquitos <i>A. albopictus</i> com CAAV..... 50	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Emergência de vírus	10
1.2 Vírus Caaingua (CAAV)	11
1.3 Alphavirus	13
1.3.1 Organização do genoma e estrutura do vírion	14
1.3.2 Ciclo de replicação dos alphavirus.....	15
1.3.3 Hospedeiros de alphavirus	18
1.4 Mosquitos como vetores para alphavirus	20
1.5 Vírus Inseto-Específicos	22
1.6 Justificativa	28
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos gerais	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. METODOLOGIA	30
3.1 Linhagens Celulares e Vírus	30
3.1.1 Linhagens celulares.....	30
3.1.2 Vírus.....	30
3.2 Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais anti-CAAV	31
3.2.1 Preparo do Antígeno.....	31
3.2.2 Imunização dos Camundongos	32
3.2.3 Obtenção dos Esplenócitos e Preparo das Células de Mieloma	32
3.2.4 Fusão	33
3.2.5 Triagem dos Hibridomas e Obtenção de Anticorpos Monoclonais	34
3.2.6 Caracterização dos Anticorpos	35
3.2.7 Concentração e Purificação dos mAbs	35
3.3 Avaliação da infecção por CAAV em <i>Aedes albopictus</i>	37
3.3.1 Manejo dos Mosquitos.....	37
3.3.2 Infecção dos Mosquitos com CAAV	37
3.3.3 Extração de RNA.....	38
3.3.4 RT-qPCR.....	39
4. RESULTADOS	41
4.1 Produção de Anticorpos Monoclonais anti-CAAV	41
4.2 Infecção por CAAV em mosquitos <i>A. albopictus</i>	45
4.2.1 Padronização da RT-qPCR	45
4.2.1.1 Otimização da temperatura de hibridização (<i>annealing</i>).....	45

4.2.1.2	Comparação dos métodos de extração de RNA	47
4.2.1.3	Validação de gene endógeno.....	48
4.2.2	Infeções em <i>A. albopictus</i>	50
5.	DISCUSSÃO	54
5.1	Produção de anticorpos monoclonais	54
5.2	Infeção de mosquitos <i>A. albopictus</i> por CAAV	59
6.	CONCLUSÕES	65
7.	PERSPECTIVAS	66
8.	REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 Emergência de vírus

Inúmeros fatores podem contribuir para a emergência de novas arboviroses. De modo geral, esse fenômeno pode ser descrito como um processo de três etapas. Primeiramente, o vírus adquire a capacidade de infectar células de um novo hospedeiro. Em seguida, o vírus se adapta ao novo organismo de modo a se replicar mais eficientemente e facilitar a transmissão entre hospedeiros. Por fim, a disseminação do vírus de forma endêmica na população de hospedeiros é possibilitada, levando a sua emergência. As duas primeiras etapas estão relacionadas a mudanças genéticas e evolutivas do vírus. Já a terceira está ligada a alterações na população dos hospedeiros e vetores do vírus, as quais podem ser causadas por fatores ambientais e antropológicos (DENNEHY, 2016).

Sob o ponto de vista evolutivo, vírus possuem diversas características que podem estar associadas a uma rápida capacidade adaptativa, entre elas um genoma pequeno, ampla diversidade genética, curto ciclo replicativo e altas taxas de mutação/recombinação/rearranjos (HOLMES, 2009; ELENA; SANJUÁN, 2007). A maioria dos arbovirus emergentes são vírus com genoma composto por molécula(s) de RNA, os quais em grande parte não dispõem de mecanismos de *proofreading* durante a replicação e apresentam as maiores taxas de mutação na natureza (DRAKE, 1993; DENNEHY, 2016). Essas altas taxas de mutação tem como consequência um conjunto de moléculas de RNA genômicos virais que apresentam um amplo espectro de variações genéticas e genótipos, fenômeno identificado como quasiespécies (LAURING; ANDINO, 2010). Consequentemente, esse fenômeno facilita a replicação viral em organismos extremamente diferentes como artrópodes e vertebrados, fator crítico para sustentar o ciclo de transmissão. Ademais, a presença de quasiespécies pode contribuir para a emergência de novos vírus, uma vez que pode produzir variantes capazes de infectar novos hospedeiros (DENNEHY, 2016).

Além de fatores intrínsecos à natureza do vírus, diversas ações antropológicas podem influenciar na emergência de arboviroses, sobretudo através da alteração na distribuição e dispersão de insetos vetores. Recentemente, o aumento da densidade populacional, a intensificação da urbanização e da globalização através do deslocamento de pessoas especialmente por via aérea contribuíram para uma maior

frequência de exposição de humanos a mosquitos. Além disso, a expansão demográfica, o desenvolvimento industrial e, conseqüentemente, o aumento do desmatamento contribuíram para a constante invasão do ser humano em habitats selvagens e seu contato com ciclos de transmissão silvestre de diversos vírus (GOULD *et al.*, 2017). Esse contexto tem favorecido a emergência de arbovirus que causaram grandes impactos em termos de saúde pública globalmente, como Chikungunya e Zika (A TSETSARKIN *et al.*, 2011; ZANLUCA; SANTOS, 2016; ZANLUCA *et al.*, 2015).

A distribuição e dispersão de insetos vetores também pode ser influenciada por mudanças climáticas. Fatores como umidade, pluviosidade e temperatura podem impactar no tempo de oviposição, sobrevivência e taxa reprodutiva dos vetores. Ademais, o aumento das temperaturas globais pode permitir a expansão de espécies tropicais para regiões temperadas e períodos de maior pluviosidade aumentam a disponibilidade de ambientes para reprodução. Sendo assim, fatores climáticos afetam a abundância e distribuição de insetos vetores e conseqüentemente dos vírus associados a eles (MARKLEWITZ; JUNGLEN, 2019; SEMENZA; MENNE, 2009).

Em suma, a emergência de arboviroses é um fenômeno complexo influenciado por diversos elementos relacionados à evolução viral, ações antropológicas e mudanças ambientais. As conseqüências desses fatores podem ser exemplificadas pela emergência de vírus que impactaram fortemente a saúde humana, como a febre amarela (YFV), dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) (A TSETSARKIN *et al.*, 2011; MONATH; VASCONCELOS, 2015; ZANLUCA; SANTOS, 2016; GUBLER; CLARK, 1995). Diante desse contexto, uma série de medidas são necessárias para melhor compreender, combater e prevenir a emergência de arboviroses. Ações promissoras incluem a realização de estudos de ecologia viral e genética molecular para a elaboração de modelos preditivos, o desenvolvimento de medicamentos antivirais de amplo espectro, o combate a vetores comuns e a manutenção de uma constante vigilância epidemiológica (DENNEHY, 2016).

1.2 Vírus Caaingua (CAAV)

No atual panorama da (re)emergência de arboviroses de importância clínica, a vigilância epidemiológica demonstra ser de suma importância para ações de enfrentamento. Nesse sentido, o Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz PR atua como Referência para o Ministério da Saúde em ações de

vigilância de arbovirus (re)emergentes, realizando a detecção de infecções virais em amostras humanas, de animais reservatórios e vetores. Neste contexto, o alphavirus Caaingua (CAAV) foi identificado e isolado a partir de *pools* de mosquitos coletados no estado do Paraná (TSCHÁ *et al.*, 2019).

O vírus foi identificado no município de Marilena, região que tem apresentado alta incidência de arboviroses nos últimos anos, sobretudo dengue. Em 2017, ocorreu no município um surto de uma doença cujos pacientes manifestaram sintomas sugestivos de infecção por arbovirus como febre, mialgia, cefaleia, dores nas costas, dor retro-orbital e artralgia. No entanto, os pacientes não tiveram diagnóstico laboratorial confirmado para nenhuma das arboviroses circulantes no país e portanto, a doença foi descrita como de etiologia desconhecida.

Tendo como finalidade identificar o agente etiológico causador do surto, o Laboratório de Referência em Vírus Emergentes (LRV) recebeu amostras de soro dos pacientes. As amostras de fase aguda de infecção foram triadas para detecção genérica de alphavirus e flavivirus utilizando protocolos de RT-PCR (SÁNCHEZ-SECO *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-SECO *et al.*, 2001).

Uma vez que os protocolos de triagem tiveram resultados negativos, foram realizadas coletas de mosquitos na cidade, sobretudo nas proximidades das residências dos pacientes. As coletas totalizaram 121 *pools* de mosquitos de diferentes espécies, que foram triados para detecção de flavivirus e alphavirus por RT-PCR genéricos. Essa triagem resultou em 3 *pools* positivos para alphavirus, para os quais foi realizado o sequenciamento dos amplicons e posteriormente o isolamento viral em cultura de células de mosquito. Objetivando identificar o vírus isolado, o genoma completo do isolado viral (denominado MS681) foi sequenciado por NGS (Sequenciamento de Nova Geração - do inglês *Next Generation Sequencing*), revelando 73% de identidade com os vírus dos complexos das encefalites equinas (TSCHÁ *et al.*, 2019). Visto que o ICTV (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus) determina uma divergência nucleotídica mínima de 21% para distinção de espécies de alphavirus, confirmou-se a identificação de um novo vírus desse gênero (CHEN *et al.*, 2018; KING; ADAMS; CARSTENS; LEFKOWITZ, 2012). O vírus foi nomeado Caaingua, em referência à tribo indígena que habitou a região (TSCHÁ *et al.*, 2019).

A confirmação das espécies de mosquitos dos *pools* positivos para alphavirus foi realizada por DNA *barcoding* através da análise da subunidade I do citocromo C Oxidase (COI). Os resultados indicaram a existência de diversas espécies de *Culex* como possíveis vetores de CAAV. Além de mosquitos do gênero *Culex*, é possível

que outros mosquitos estejam envolvidos no ciclo de transmissão, visto que ensaios de caracterização biológica *in vitro* indicaram a permissividade de linhagens celulares do gênero *Aedes* à infecção (TSCHÁ *et al.*, 2019).

Os alphavirus são capazes de infectar uma grande diversidade de vertebrados (KUHN, 2013). Todavia, até o momento não foram identificados hospedeiros vertebrados para CAAV. Ensaios visando avaliar a replicação de CAAV em diferentes linhagens celulares indicaram que células de humanos, macacos, galinhas, hamsters, ratos e *zebrafish* não são permissíveis à infecção (TSCHÁ *et al.*, 2019). É importante destacar que células de linhagem possuem um caráter genético modificado e, conseqüentemente, seu perfil de expressão e fenótipo podem ser diferentes dos tipos celulares que as originaram. Sendo assim, podem não apresentar o comportamento que seria observado em células primárias ou em um sistema *in vivo* (KAUR; DUFOUR, 2012).

Apesar das linhagens de vertebrados testadas não serem susceptíveis à replicação de CAAV, ensaios com células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) indicaram infecção dessas culturas primárias. Ademais, uma baixa viremia ou as condições de armazenamento das amostras antes de serem enviadas para análise podem ter influenciado nos resultados negativos observados nos soros dos pacientes (TSCHÁ *et al.*, 2019). Dessa forma, embora a caracterização biológica inicial sugira que CAAV seja um alphavirus inseto-específico, um possível vínculo epidemiológico entre o vírus e o surto que ocorreu em Marilena não foi descartado.

1.3 Alphavirus

O gênero *Alphavirus* representa o único da família *Togaviridae* e atualmente compreende 32 espécies reconhecidas pelo ICTV (CHEN *et al.*, 2018). Baseado em testes de reatividade cruzada, as espécies podem ser divididas em oito complexos antigênicos: Semliki Forest, Barmah Forest, Trocara, Middelburg, Ndumu e complexos das Encefalites Equinas Venezuelana, do Leste e do Oeste (KUHN, 2013; POWERS *et al.*, 2001; GOULD *et al.*, 2010; CALISHER; KARABATSOS, 1988). Por possuírem uma ampla distribuição geográfica, os alphavirus são tipicamente descritos como vírus do Novo Mundo ou Velho Mundo e compreendem diversos vírus de relevância médica e veterinária. Os alphavirus patogênicos que circulam no Velho Mundo comumente causam doenças febris com artralgia e erupção cutânea, como o CHIKV, enquanto os vírus do Novo Mundo frequentemente causam encefalites, como o vírus da Encefalite

Equina Venezuelana (VEEV) (GOULD *et al.*, 2010; GRIFFIN, 2013). Apesar dessa classificação, recentemente tem-se observado uma mudança na dinâmica de circulação dos alphavirus, exemplificada pela emergência de CHIKV nas Américas. Sua circulação foi reportada na ilha Saint Martin em 2013 e, após um ano, já havia causado mais de 1 milhão de casos no continente americano (YACTAYO *et al.*, 2016; CASSADOU *et al.*, 2014).

1.3.1 Organização do genoma e estrutura do vírion

Os alphavirus são vírus envelopados de RNA fita simples, de polaridade positiva e de aproximadamente 11.7 kilobases de comprimento (Figura 1.1). O RNA genômico possui Cap, cauda poliadenilada e duas fases abertas de leitura (ORFs- *Open Reading Frames*) que codificam dois grupos de proteínas virais: as não-estruturais e as estruturais. As proteínas não estruturais (nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4) atuam na replicação viral e são traduzidas diretamente do RNA genômico. Em contrapartida, as proteínas estruturais (Cp, E3, E2, 6K, TF e E1) compõem a partícula viral e são traduzidas através da produção de um RNA mensageiro subgenômico (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

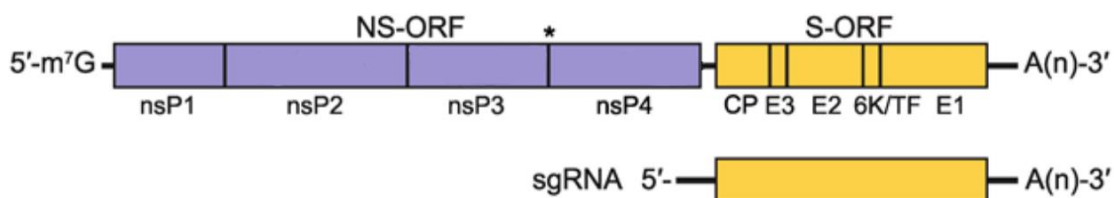


Figura 1.1 - Representação do genoma de alphavirus. O RNA genômico possui Cap (m7G) e cauda poliadenilada (A(n)). As linhas sólidas representam regiões não-codificadoras. Os retângulos representam a fase aberta de leitura não estrutural (NS-ORF - do inglês *Non Structural Open Reading Frame*) e estrutural (S-ORF - do inglês *Structural Open Reading Frame*). A NS-ORF codifica as proteínas não estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. O asterisco representa um códon de terminação após a região codificadora de nsp3. A partir da S-ORF, é produzido um RNA subgenômico (sgRNA), do qual são traduzidas as proteínas estruturais CP, E1, E2, E3, TF e 6K. Adaptado de CHEN *et al.*, 2018.

O vírion, que possui aproximadamente 70 nm de diâmetro, é formado por um envelope e um nucleocapsídeo envolvendo o RNA genômico (Figura 1.2). O envelope contém uma bicamada lipídica oriunda da membrana plasmática do hospedeiro, onde se localizam as glicoproteínas virais E1 e E2. Essas proteínas se organizam em 80 espículas presentes na superfície do vírion. As espículas são geradas através da formação de heterodímeros de E1 e E2, que posteriormente se agrupam em trímeros.

A proteína E2, além de se associar com E1, interage com a proteína do capsídeo (Cp) através de seu domínio citoplasmático, contribuindo para a estrutura rígida do vírion. O nucleocapsídeo é formado por 240 unidades da proteína Cp, organizadas em uma estrutura com simetria icosaédrica T=4 (KUHNS, 2013; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

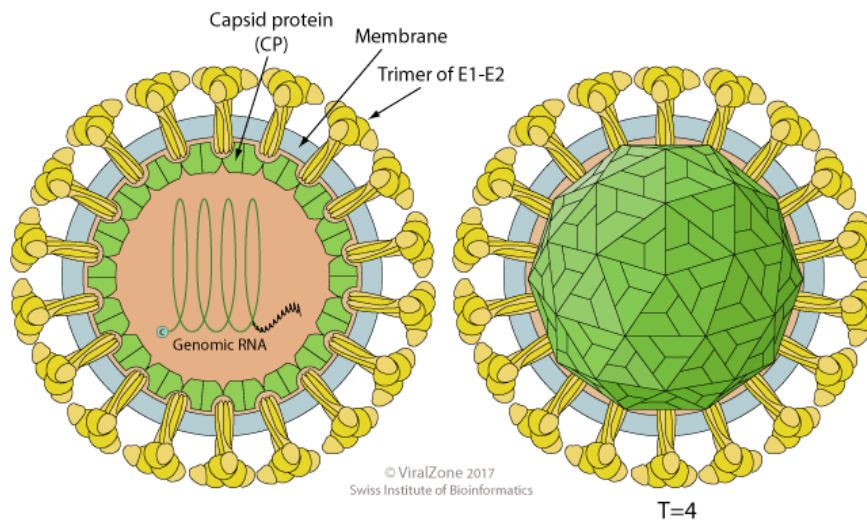


Figura 1.2 - Representação de uma partícula viral de alphavirus. O vírion é formado pelo envelope, onde localizam-se os dímeros de proteínas de envelope E1 e E2 organizados em trímeros, e o capsídeo, onde se localiza o RNA genômico do vírus. As proteínas do capsídeo (Cp) se organizam em estrutura icosaédrica T=4. Fonte: HULO *et al.*, 2010.

1.3.2 Ciclo de replicação dos alphavirus

A entrada do vírus na célula ocorre pela interação da proteína E2 das espículas com receptores da superfície celular, desencadeando um processo de endocitose mediada por clatrina (Figura 1.3). Posteriormente, a acidificação do pH endossomal resulta na dissociação de E1 e E2, e culmina na fusão (mediada por E1) das membranas do envelope e do endossomo e a liberação do capsídeo viral no citoplasma da célula. O capsídeo se dissocia liberando o RNA genômico, possibilitando a tradução da ORF não estrutural, a qual pode gerar duas poliproteínas: p1234 ou p123. Os mecanismos responsáveis pela dissociação do capsídeo não foram elucidados, mas podem ser dependentes da interação com ribossomos (WENGLER; WÜRKNER; WENGLER, 1992). Outros estudos sugerem que a exposição do vírion ao pH ácido do endossomo poderia preparar o capsídeo para sua dissociação. Isso ocorreria pois é possível que as proteínas E1 e 6K atuem como canais iônicos, permitindo que o capsídeo tenha contato com o pH baixo ainda dentro do endossomo e se torne instável (JOSE; SNYDER; KUHNS, 2009).

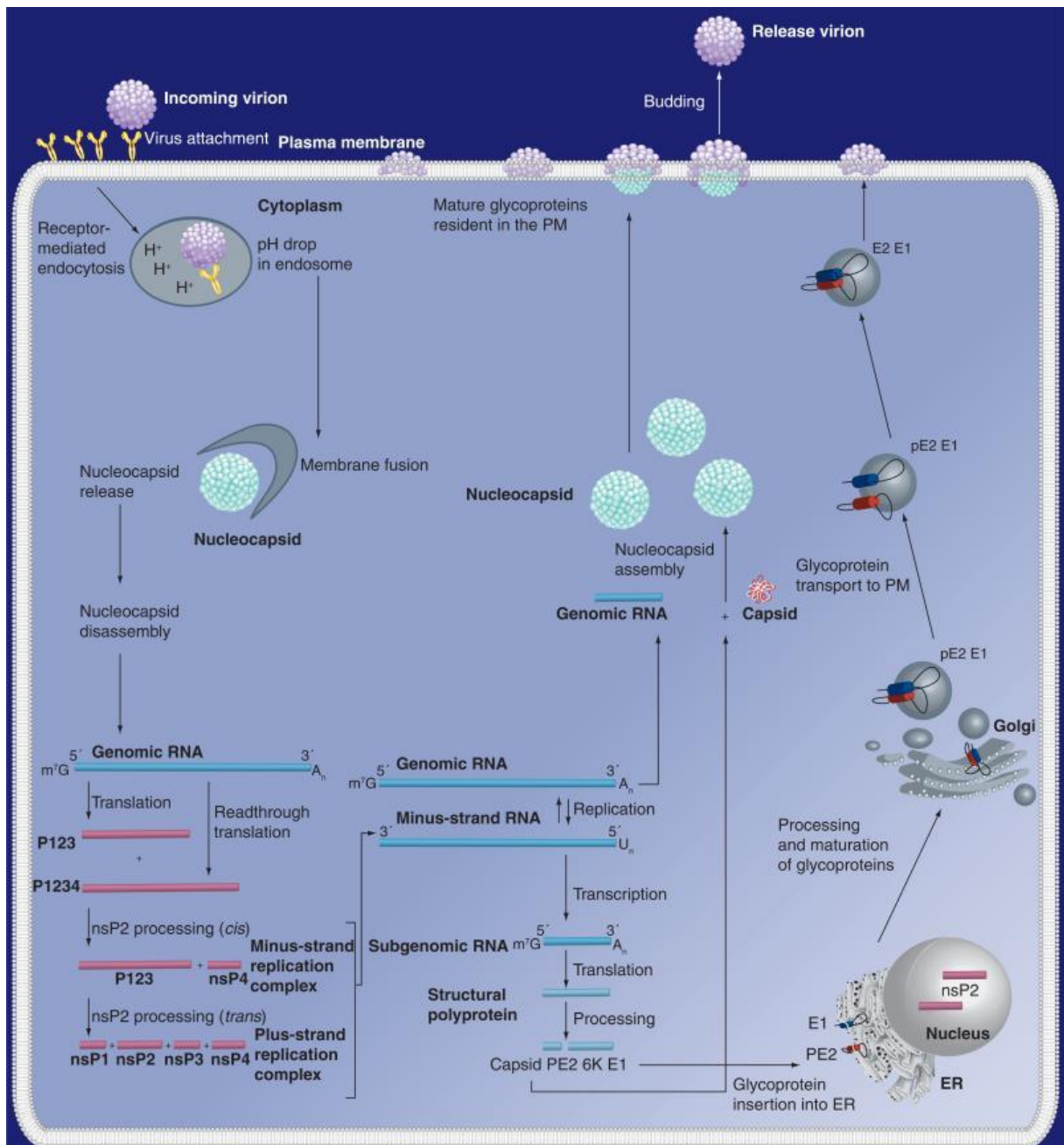


Figura 1.3 - Representação esquemática do ciclo de infecção de alphavirus. A entrada do vírus na célula ocorre através da ligação do vírião ao receptor de superfície celular. Posteriormente, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, a dissociação do capsídeo e liberação do RNA viral genômico no citoplasma. A partir do RNA genômico são traduzidas as proteínas não estruturais e é produzido o RNA subgenômico, do qual são traduzidas as proteínas estruturais. As glicoproteínas virais são direcionadas à membrana plasmática, onde se associam com o nucleocapsídeo para o brotamento das novas partículas virais. Fonte: JOSE; SNYDER; KUHN, 2009.

Na maioria dos alphavirus, a poliproteína p1234 (contendo nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4) é traduzida em menor quantidade devido à presença de um códon de terminação após a região codificadora de nsp3, que é lido em alta frequência (80%-90%). Sendo assim, p123 é gerada em maior quantidade. Acredita-se que a clivagem total da poliproteína, assim como a geração de intermediários de clivagem sejam

responsáveis por regular a síntese dos diferentes RNAs virais (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

A tradução das proteínas não estruturais culmina na formação dos complexos de replicação, que são responsáveis pela síntese dos RNAs virais. A proteína nsp1 possui atividade de guanina-7-metiltransferase e guaniltransferase, necessárias para o capeamento do RNA viral genômico e subgenômico. Além disso, a nsp1 pode atuar na iniciação da síntese de moléculas de RNA de polaridade negativa e, por ser uma proteína associada a membrana, é capaz de ancorar os complexos de replicação. A proteína nsp2 tem atividade de protease e helicase, agindo respectivamente no processamento das poliproteínas não estruturais e na dissociação de possíveis duplex de RNA que se formam durante a replicação. A função proteolítica de nsp2 está ativa tanto na sua forma individual quanto fazendo parte da poliproteína. A atividade de nsp3 não foi completamente elucidada. Todavia, estudos indicam que a proteína é necessária para a síntese do RNA genômico e subgenômico, além de possivelmente estar envolvida no desenvolvimento de neurovirulência (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; PARK; GRIFFIN, 2009). A proteína nsp4 possui domínio RNA polimerase dependente de RNA, constituindo assim um componente essencial do complexo replicativo (STRAUSS; STRAUSS, 1994; KUHN, 2013).

No início da infecção, ocorre a tradução de p123 e p1234 a partir da ORF não estrutural. Visto que nsp2 é capaz de clivar em cis apenas na junção nsp3/nsp4, há uma predominância de p123 e nsp4. Esse contexto favorece a produção de um RNA complementar de polaridade negativa a partir do RNA genômico. Conforme a produção de RNA negativo procede, ocorre também um acúmulo de p123, que possibilita a clivagem em trans da poliproteína por nsp2. A geração das proteínas não estruturais individuais marca a sinalização (*switchover*) para a síntese de RNAs de polaridade positiva. Assim, o RNA complementar produzido anteriormente serve como molde para gerar mais RNA genômico, além do RNA subgenômico que codifica as proteínas estruturais. Estas são então traduzidas em uma poliproteína (C-pE2-6K-E1), que é processada por proteases virais e do hospedeiro. A primeira proteína estrutural traduzida é a do capsídeo e, por ter atividade auto-proteolítica, é liberada no citoplasma onde formará os nucleocapsídeos contendo o RNA genômico (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009).

A poliproteína restante (pE2-6K-E1) possui um sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático (RE), onde é processada liberando pE2, 6K e E1. Além dessa forma de processamento da poliproteína, uma troca de fase de leitura na região

codificadora de 6K ocorre em baixa frequência, resultando na formação da proteína TF (do inglês - *Transframe*) e na ausência da produção de E1. Ainda no RE, pE2 e E1 formam heterodímeros e sofrem modificações pós-traducionais, seguindo pela via secretora. No complexo de Golgi, são formados trímeros de pE2-E1 e, antes de alcançar a membrana plasmática, furinas e signalases do hospedeiro clivam pE2 em E2 e E3. Essa etapa é essencial para a formação de novas partículas infecciosas pois E3 atua na estruturação das espículas virais. Assim, as espículas chegam à membrana plasmática do hospedeiro, onde interagem com o nucleocapsídeo através de E2 e onde ocorre o brotamento do vírion (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; MULVEY; BROWN, 1996).

Embora os mecanismos não tenham sido completamente elucidados, sabe-se que as proteínas 6K e TF são importantes para o brotamento do vírion. É provável que 6K atue como espaçador dentro da célula para promover o brotamento, mediando a interação entre C e E2 durante a formação das espículas. Essa hipótese é apoiada por estudos com mutantes de 6K que demonstraram que a ausência dessa proteína resulta em uma maturação menos eficaz das espículas. Já a proteína TF é incorporada em pequenas quantidades no vírion e sua função nessas partículas liberadas permanece desconhecida. Entretanto, foi demonstrado em diversos vírus como o Sindbis (SINV) e CHIKV que a proteína TF pode ser um fator de virulência em infecções animais (RAMSEY; MUKHOPADHYAY, 2017).

1.3.3 Hospedeiros de alphavirus

Os vírus do gênero *Alphavirus* são capazes de infectar uma grande variedade de hospedeiros. A maioria se mantém na natureza através de ciclos alternados entre hospedeiros vertebrados e vetores artrópodes, que controlam sua dispersão geográfica (KUHN, 2013). Embora mosquitos, sobretudo do gênero *Aedes* e *Culex*, sejam os principais vetores, diversos alphavirus foram isolados de outros insetos hematófagos como piolhos, carrapatos e ácaros (STRAUSS; STRAUSS, 1994; LWANDE *et al.*, 2013; LINTHICUM *et al.*, 1991; LA LINN *et al.*, 2001; SHAH *et al.*, 1960). Os hospedeiros vertebrados são geralmente aves ou mamíferos, incluindo humanos, primatas não-humanos, equinos e roedores. Além disso, existem alphavirus capazes de infectar mamíferos marinhos e peixes, como salmão e truta (GRIFFIN, 2013; KUHN, 2013; LA LINN *et al.*, 2001; DEPERASINSKA; SCHULZ; SIWICKI, 2018; VILLOING *et al.*, 2000). Apesar de a maioria dos alphavirus alternar entre a infecção

de artrópodes e vertebrados, recentemente foram identificados alphavirus inseto-específicos, classificados assim por serem incapazes de infectar células de vertebrados e não possuírem hospedeiros vertebrados conhecidos (NASAR *et al.*, 2012; HERMANNNS *et al.*, 2017; TORII *et al.*, 2018; HERMANNNS *et al.*, 2020).

A capacidade dos alphavirus de infectar uma grande diversidade de hospedeiros é determinada em grande parte pelos receptores celulares nos quais se ligam, uma vez que essa é a primeira etapa para a entrada do vírus na célula. Conforme citado anteriormente, esse processo é mediado pela proteína viral E2. É possível que essa proteína tenha múltiplos sítios de ligação a receptores celulares, o que poderia explicar a habilidade de infectar células de diferentes organismos. Outras hipóteses sugerem que E2 se ligue em uma única molécula evolutivamente conservada entre espécies, permitindo que, através dela, seja capaz de infectar hospedeiros diferentes como vertebrados e insetos (GRIFFIN, 2013).

A partir dessas hipóteses, diversos estudos têm buscado identificar os receptores celulares usados pelos alphavirus. Um dos primeiros identificados foi o heparan sulfato, um glicosaminoglicano de superfície celular ao qual o SINV demonstrou ser capaz de se ligar em células de hamster da linhagem BHK. Entretanto, essa afinidade parece ser resultante de uma adaptação do vírus ao cultivo celular (KLIMSTRA; RYMAN, 1998). Além dessa molécula, o complexo principal de histocompatibilidade, lectinas, a chaperona hsp70 e a proteína laminina também foram propostas como receptores para SINV (VANCINI; HERNANDEZ; BROWN, 2015).

Em vírus artritogênicos como CHIKV, Mayaro, Ross River e Onyong-nyong, a molécula de adesão celular MXRA8 foi identificada como possível receptor. Entretanto, a ocorrência de infecção residual em células *knockout* para MXRA8 e a ausência de ortólogos para essa molécula em mosquitos apontam para a existência de outros fatores que contribuem para a entrada do vírus nas células (ZHANG *et al.*, 2018). Embora muitas moléculas tenham sido propostas como receptores para alphavirus, a identificação das mesmas é dificultada pela capacidade dos vírus de se adaptar quando cultivados *in vitro* e pela interação transiente das partículas virais com outros fatores do hospedeiro. Portanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos que conferem aos alphavirus a capacidade de infectar uma gama diversa de hospedeiros (VANCINI; HERNANDEZ; BROWN, 2015).

1.4 Mosquitos como vetores para alphavirus

Conforme citado anteriormente, mosquitos constituem os principais vetores dos alphavirus. Um fator essencial para que possam transmitir esses vírus com sucesso é o estabelecimento de uma infecção produtiva no mosquito vetor. Segundo o modelo proposto por Hardy *et al.* (1983), o vírus ingerido pela alimentação em um indivíduo virêmico infecta primeiramente as células epiteliais do intestino médio. Posteriormente, ocorre a disseminação e amplificação da infecção em órgãos secundários e, finalmente, o vírus infecta as glândulas salivares, sendo transmitido pela saliva no próximo repasto sanguíneo (Figura 1.4). O período compreendido entre a alimentação do sangue virêmico até o mosquito se tornar apto para transmitir o vírus é denominado período de incubação extrínseco (PIE) (HARDY *et al.*, 1983).

A habilidade de um vetor de adquirir uma infecção, sustentar a replicação viral e transmitir o vírus é definida como competência vetorial. Diversos fatores influenciam na competência de um vetor, como a temperatura ambiental, diferenças genéticas entre espécies ou cepas virais e barreiras biológicas presentes nos mosquitos (Figura 1.4) (LIM *et al.*, 2018; FRANZ *et al.*, 2015).

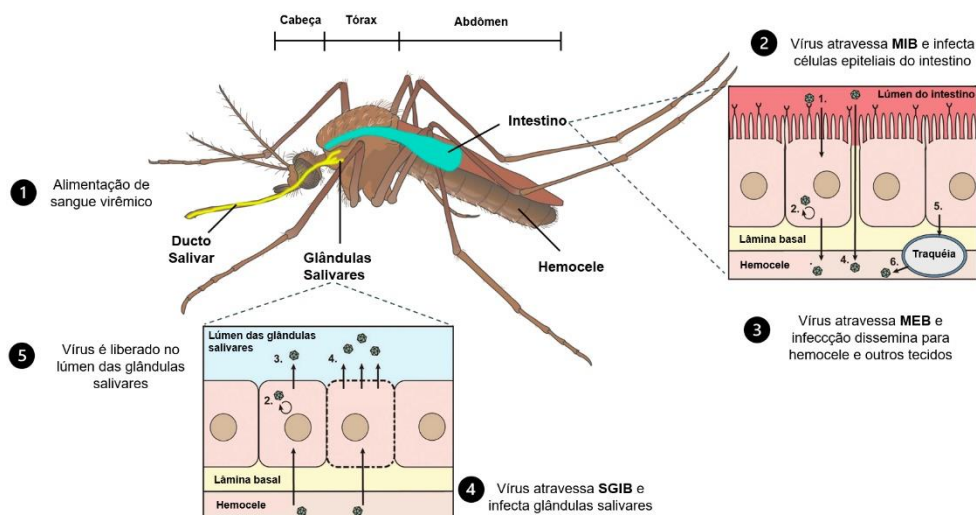


Figura 1.4 - Representação esquemática do ciclo de infecção viral em mosquitos. Após repasto sanguíneo em um indivíduo ou animal infectado, o vírus precisa superar a barreira de infecção do intestino (MIB) para infectar as células epiteliais do intestino médio. Para que possa se disseminar para outros tecidos e células como o corpo gorduroso e hemócitos, é necessário atravessar a barreira de escape do intestino médio (MEB). Após a infecção de tecidos secundários, o vírus pode infectar as glândulas salivares ao superar a barreira de infecção das glândulas (SGIB). Por fim, as partículas virais podem ser transmitidas no próximo repasto sanguíneo se atravessarem a barreira de escape das glândulas salivares (SGEB). Fonte: adaptado de Vogels *et al.* (2017) e Lim *et al.* (2018).

A primeira barreira ao vírus após ingestão pelo mosquito é a barreira de infecção do intestino (MIB - *Midgut Infection Barrier*), que compreende os

mecanismos que afetam a capacidade do vírus de infectar as células epiteliais do intestino médio. Entre os principais exemplos de MIB, pode-se citar a inativação viral por enzimas digestivas do intestino do inseto e a retenção do vírus no lúmen por uma matriz peritrófica secretada pelas células epiteliais durante a digestão do sangue. Outro mecanismo que pode impedir a infecção é a ausência ou incompatibilidade de receptores na superfície apical das células epiteliais, já que a entrada do vírus ocorre por endocitose mediada por receptores (FRANZ *et al.*, 2015). Nesse sentido, a proteína viral E2 possui um papel importante no estabelecimento da infecção de alphavirus no intestino médio dos vetores. Embora estudos tenham identificado receptores de reconhecimento padrão e a proteína NRAMP (do inglês - *natural resistance-associated macrophage protein*) como potenciais receptores de alphavirus em mosquitos, estes ainda não foram completamente caracterizados (ROSE *et al.*, 2011; KLIMSTRA *et al.*, 2003).

Após a replicação nas células epiteliais do intestino médio, é necessário que o vírus se dissemine para outros tecidos, os quais são acessados sobretudo através da hemolinfa. Para que isso ocorra, o vírus deve atravessar possíveis barreiras de escape do intestino (MEB - *Midgut Escape Barrier*). Nesse sentido, a lâmina basal que circunda o intestino médio constitui um importante mecanismo de MEB, por ser uma matriz porosa capaz reter as partículas virais (FRANZ *et al.*, 2015). Embora as vias de escape do vírus não estejam completamente elucidadas, a observação de anormalidades na morfologia da lâmina basal após a infecção de alguns vírus, como do vírus da encefalite equina do leste (EEEV) em *Culiseta melanura*, sugere o remodelamento dessa estrutura como possível mecanismo (WEAVER *et al.*, 1988). Ao ultrapassar a MEB, o vírus se dissemina para outros locais, sendo os mais frequentes o corpo gorduroso, hemolinfa, hemócitos e tecidos nervosos e, em alguns casos, tecidos musculares e ovários (permitindo transmissão vertical) (FRANZ *et al.*, 2015).

Após a infecção de tecidos secundários, o vírus infecta as glândulas salivares e é liberado nos dutos salivares para transmissão durante o próximo repasto sanguíneo. Em algumas combinações de vírus e mosquito, como a infecção do vírus da encefalite equina do oeste (WEEV) em *Culex tarsalis* e de EEEV em *Aedes albopictus*, foram observadas barreiras de infecção das glândulas salivares (SGIB - *Salivary Glands Infection Barrier*) (KRAMER *et al.*, 1981; SCOTT *et al.*, 1990). Nesses casos, o vírus se dissemina do intestino para outros tecidos, porém não infecta as glândulas. Embora os mecanismos moleculares desse fenômeno não tenham sido

ainda esclarecidos, hipóteses sugerem que a lâmina basal envolvendo as glândulas e os receptores de superfície celular desse órgão possam ter um papel importante (FRANZ *et al.*, 2015).

Por fim, em casos esporádicos, como na infecção de SINV em algumas espécies de *Aedes*, foram descritas barreiras de escape das glândulas salivares (SGEB - *Salivary Glands Escape Barrier*). Nesse caso, o vírus é capaz de infectar e se replicar nas glândulas salivares, porém não é transmitido oralmente. Assim como em SGIB, os mecanismos de SGEB ainda não foram esclarecidos (JUPP, 1985; KUMAR *et al.*, 2018; FRANZ *et al.*, 2015).

A capacidade de ultrapassar as barreiras citadas e estabelecer uma infecção produtiva ocorre apenas em determinadas combinações de espécies de vírus e mosquitos, o que contribui para a especificidade da relação arbovirus-vetor. Essa especificidade, a qual pode ser também a nível de cepa viral, sugere que os arbovirus e seus vetores passam por um processo constante de co-evolução (LIM *et al.*, 2018; FRANZ *et al.*, 2015).

1.5 Vírus Inseto-Específicos

Os vírus inseto-específicos (ISVs) infectam naturalmente insetos e se replicam em linhagens celulares derivadas de insetos, porém são incapazes de se replicar em células de vertebrados (BOLLING *et al.*, 2015). O primeiro vírus inseto-específico descrito foi o CFAV (do inglês - *Cell Fusing Agent Virus*), pertencente à família *Flaviviridae*. O vírus foi isolado em 1975 a partir do sobrenadante de cultivo de uma linhagem celular de *Aedes aegypti*, o qual causava a formação de sincícios quando inoculado em células de *Aedes albopictus*. Entretanto, quando inoculado em linhagens de vertebrados como hamster (BHK), macaco (Vero) e humanos (KB), o vírus não provocava fusão celular ou se replicava, sugerindo ser inseto-específico (STOLLAR; THOMAS, 1975). Desde então, houve um aumento significativo na identificação dos ISVs, devido a avanços em técnicas de identificação viral como metagenômica e sequenciamento de nova geração, assim como o crescente interesse pelo microbioma de insetos vetores. Embora muitos pertençam à família *Flaviviridae*, diversos vírus inseto-específicos já foram classificados em outras famílias como *Togaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Mesoniviridae*, *Tymovirida* e *Birnaviridae* (BOLLING *et al.*, 2015).

A dinâmica de transmissão e manutenção dos ISVs na natureza ainda é pouco conhecida. Para os arbovirus, sabe-se que ocorre a transmissão horizontal através da infecção alternada em hospedeiros vertebrados e nos insetos que deles se alimentam. Em contrapartida, ISVs não são capazes de infectar vertebrados. Sendo assim, acredita-se que, sobretudo no caso de vírus inseto-específicos com genoma de RNA, o principal modo de transmissão seja vertical (da fêmea adulta para progênie). Essa hipótese é sustentada por estudos que mostraram a capacidade de diversos ISVs serem transmitidos verticalmente e a detecção de ISVs em larvas e adultos machos, os quais não se alimentam de sangue (LUTOMIAH *et al.*, 2007; SAIYASOMBAT *et al.*, 2011; BOLLING *et al.*, 2012; HADDOW *et al.*, 2013; BOLLING *et al.*, 2011). Entretanto, essas evidências experimentais foram obtidas com flavivirus e podem não ser representativas de ISVs de outras famílias. Em vírus inseto-específicos com genoma de DNA e alguns de RNA, existem estudos que exploram a possibilidade da transmissão horizontal, através da alimentação ou do contato com água de criadouros (AGBOLI *et al.*, 2019).

A descoberta dos ISVs e de sua grande diversidade possibilitou expandir os atuais conhecimentos sobre a origem e evolução dos vírus. Embora existam ISVs filogeneticamente distantes de vírus patogênicos, muitos pertencem ao mesmo clado de arbovirus de importância médica e veterinária, sugerindo uma relação evolutiva entre esses grupos de vírus (ÖHLUND; LUNDÉN; BLOMSTRÖM, 2019). Parte dessa relação pode ser compreendida através do estudo da evolução de ISVs com seus artrópodes. Estudos filogenéticos indicam que ISVs das famílias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae* co-evoluíram e se diversificaram com seus insetos hospedeiros. Ademais, a ocorrência de transmissão vertical em alguns ISVs, somado a evidências de integração do material genético viral no genoma dos artrópodes sustentam a hipótese de que esses vírus estiveram em contato com insetos há muito tempo (BOLLING *et al.*, 2015).

Em vista desses fatores, diversos estudos sugerem que arbovirus podem ter evoluído a partir de ISVs (MARKLEWITZ *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015). Essa hipótese foi proposta pela primeira vez nas décadas 50 e 60, sugerindo que os arbovirus se originaram de vírus de artrópodes que adquiriram a capacidade de infectar os animais dos quais seus insetos hospedeiros se alimentavam (ANDREWES, 1957; MATTINGLY, 1960). Visto que artrópodes se alimentam de uma grande diversidade de animais, adaptações que permitam ISVs infectar novos hospedeiros poderiam ser vantajosas pois possibilitariam sua expansão geográfica. Além disso, a

maior parte dos ISVs são vírus de RNA, o que confere maior plasticidade genética, uma vez que esses vírus geralmente não possuem mecanismos de *proofreading* e apresentam maiores taxas de mutação. Essas características, somadas a estudos sobre a filogenia e diversidade dos ISVs, suportam a possibilidade de que eles tenham sido um *hotspot* para o surgimento de arbovirus (ÖHLUND; LUNDÉN; BLOMSTRÖM, 2019; BOLLING *et al.*, 2015).

Essa hipótese foi investigada em diversas famílias de vírus. Análises visando identificar hospedeiros ancestrais de bunyavírus indicaram artrópodes como os hospedeiros localizados nos nós mais basais da árvore filogenética. Os dados obtidos no estudo sugerem que os arbovirus dessa família se originaram de ISVs, os quais em diversos momentos da evolução adquiriram o tropismo por células de vertebrados (MARKLEWITZ *et al.*, 2015). Essa hipótese também foi proposta ao analisar flavivirus inseto-específicos (ISF - *Insect-Specific Flaviviruses*), os quais são agrupados em dois clados. O clado dos ISFs clássicos, denominados assim por estarem filogeneticamente distantes dos flavivirus *dual-host*, ocupam uma posição basal em relação ao gênero *Flavivirus*. Através desta análise, diversos estudos sugerem que os arbovirus desse gênero tenham se originado de vírus de artrópodes (ÖHLUND; LUNDÉN; BLOMSTRÖM, 2019; COOK *et al.*, 2012). Entretanto, ainda não se sabe a origem do segundo clado de ISFs, que se encontra mais próximo filogeneticamente dos arbovirus. Portanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer se esses ISFs mantiveram a restrição de infectar insetos como os ISFs clássicos ou se surgiram de arbovirus e perderam a capacidade de infectar vertebrados.

Para os alphavirus, pouco se sabe sobre a relação evolutiva entre ISVs e os arbovirus devido ao número restrito de ISVs descritos no gênero. Atualmente, existem apenas cinco alphavirus inseto-específicos descritos, todos agrupando filogeneticamente próximos a arbovirus: Eilat virus (EILV), Taï Forest alphavirus (TALV), Mwinilunga alphavirus (MWAV), Agua Salud alphavirus (ASALV) e Yada Yada virus (YYV) (NASAR *et al.*, 2012; HERMANNNS *et al.*, 2017; TORII *et al.*, 2018; HERMANNNS *et al.*, 2020; BATOVSKA *et al.*, 2020). EILV, o primeiro destes a ser descrito, encontra-se próximo ao complexo da encefalite equina do oeste (WEE) e possui reatividade cruzada com diversos vírus do complexo. Esses fatores sugerem a possibilidade de que EILV tenha surgido de um vírus ancestral *dual-host*, possivelmente do complexo WEE, que perdeu a habilidade de infectar vertebrados, sofrendo adaptações específicas para seu inseto hospedeiro (NASAR *et al.*, 2012). No entanto, devido à baixa amostragem de ISVs em alphavirus, essa hipótese não foi

confirmada. Assim, é possível que outros ISVs ainda não descritos representem linhagens ancestrais (de forma similar aos ISVs clássicos de flavivirus), das quais evoluíram os alphavirus capazes de infectar vertebrados (NASAR *et al.*, 2014).

A descoberta de novos alphavirus inseto-específicos pode possibilitar uma melhor compreensão sobre a origem dos alphavirus, a qual ainda não foi esclarecida. É possível que os alphavirus tenham surgido como vírus artritogênicos no Velho Mundo e posteriormente tenham sido introduzidos no Novo Mundo ou vice e versa (POWERS *et al.*, 2001). Além disso, existem estudos que sugerem uma origem em vertebrados marinhos para os vírus desse gênero (FORRESTER *et al.*, 2011). Diante dessa hipótese, a descoberta do ASALV sugere que os ISVs possam ajudar a esclarecer a transição evolutiva dos alphavirus aquáticos para os alphavirus com hospedeiros terrestres pois alphavirus marinhos não possuem vetores artrópodes conhecidos e se replicam em baixas temperaturas (até 15°C). Por outro lado, o ISV ASALV é capaz de se replicar em temperaturas mais altas, porém, ainda possui restrição em temperaturas acima de 30°C. Ademais, todos os alphavirus inseto-específicos descritos foram isolados ou ao menos detectados em espécies *Culex*, as quais também se alimentam de animais ectotérmicos. Sendo assim, foi proposto que ISVs podem representar intermediários entre hospedeiros marinhos e alphavirus de vertebrados terrestres com *dual hosts*, apresentando adaptações a temperaturas mais altas, que são necessárias para infectar mamíferos e aves (HERMANNNS *et al.*, 2020).

A relação filogenética próxima de certos ISVs com arbovirus e a detecção de ISVs em espécies de artrópodes vetores de arbovirus de importância clínica sugere que esses vírus podem ter um papel na modulação da transmissão de arboviroses. Grande parte dos estudos que investigam a interferência dos ISVs na competência vetorial são realizados com flavivirus, por ser o gênero com maior número de ISVs descritos e, possuir arbovirus de relevância médica causando surtos e epidemias em várias áreas do globo (BOLLING *et al.*, 2015). Estudos com infecção persistente de *Culex flavivirus* (CxFV) em mosquitos *Culex pipiens* demonstraram uma supressão da infecção pelo vírus do oeste do Nilo (WNV - do inglês *West Nile Virus*) (BOLLING *et al.*, 2012). Entretanto, estudos com outras espécies de mosquitos *Culex* infectados pela via intratorácica com CxFV não mostraram diminuição na transmissão de WNV (KENT; CRABTREE; MILLER, 2010). Os resultados contraditórios sugerem que a modulação da transmissão de arboviroses por ISVs pode variar de acordo com a cepa viral e espécie do vetor.

Inúmeras aplicações biotecnológicas têm sido propostas para os ISVs, devido à característica particular de serem incapazes de infectar vertebrados, embora frequentemente sejam evolutivamente próximos a vírus patogênicos. Conforme discutido anteriormente, estudos têm sugerido que ISVs podem ser capazes de modular a transmissão de arbovirus, o que possibilitaria sua utilização como ferramenta de controle biológico. A provável transmissão vertical de muitos ISVs garantiria sua permanência na população de mosquitos vetores, tornando-a incapaz de transmitir o arbovirus alvo de maneira eficiente (BOLLING *et al.*, 2015). No entanto, grande parte das evidências experimentais acerca das dinâmicas de interferência dos ISVs na transmissão de arboviroses são preliminares. As interferências observadas também parecem ser específicas às espécies de vetores e cepas virais, não havendo evidências ainda de um ISV capaz de restringir a infecção de um grande número de arbovirus de diferentes famílias (AGBOLI *et al.*, 2019). Portanto, estudos adicionais são necessários para melhor elucidar os mecanismos de interação entre os vírus inseto-específicos, os arbovirus e seus vetores antes que essa estratégia de controle possa ser adotada.

Alternativamente, o controle da transmissão de arboviroses poderia ser feito utilizando vírus inseto-específicos geneticamente modificados. Os ISVs poderiam expressar moléculas que modulam negativamente ou positivamente o sistema imune ou que inibem diretamente a infecção do arbovirus. A modulação negativa do sistema imune inibiria a resposta habitual que gera uma infecção persistente, levando à patogenicidade do arbovirus no mosquito e, conseqüentemente, à morte do mesmo. Em contrapartida, a modulação positiva estimularia o sistema imune a desenvolver uma resposta antiviral mais eficiente, resultando na eliminação completa do arbovirus. Por fim, a inibição direta da infecção poderia ocorrer pela expressão de ligantes a receptores importantes para a entrada da partícula viral na célula (AGBOLI *et al.*, 2019).

A modificação genética de vírus inseto-específicos possibilita também sua utilização como sistema de expressão e como plataforma para o desenvolvimento de vacinas. Alguns ISVs são capazes de se replicar rapidamente atingindo títulos altos, o que permitiria níveis significativos de expressão. Além disso, o fato de serem incapazes de replicar em vertebrados garantiria a segurança do sistema. Já o desenvolvimento de vacinas baseia-se na geração de vírus quiméricos contendo os genes das proteínas não estruturais de um ISV e os genes estruturais do vírus patogênico que se deseja criar imunidade. Dessa forma, o vírus quimérico seria

antigenicamente idêntico ao patogênico e, portanto, eficiente na elicitação de uma resposta imune. Ao mesmo tempo, a restrição da replicação em vertebrados se manteria e, portanto, permaneceria seguro para ser aplicado como vacina (AGBOLI *et al.*, 2019; BOLLING *et al.*, 2015).

Essa estratégia foi explorada com EILV, o qual possui restrição na infecção de células de vertebrados tanto a nível de entrada quanto de replicação do RNA (NASAR *et al.*, 2014). Quimeras de EILV com os alphavirus patogênicos CHIKV e VEEV foram produzidos e avaliados em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Os estudos indicaram que os vírus EILV/VEEV e EILV/CHIKV se replicaram a níveis semelhantes ou maiores que EILV em células de mosquito. Além disso, os vírus quiméricos eram estruturalmente idênticos aos seus respectivos vírus patogênicos, segundo análises de microscopia crioeletrônica. Por outro lado, mantiveram a incapacidade de infectar vertebrados. Foi observado em células de linhagem de vertebrado que as proteínas estruturais de CHIKV e VEEV permitiam a entrada dos vírus, porém as proteínas não estruturais de EILV restringiam a replicação do RNA viral. Quando avaliados em modelo murino, os vírus quiméricos permaneceram não patogênicos e a administração de doses únicas resultou em 100% de proteção contra desafio letal (ERASMUS *et al.*, 2016; ERASMUS *et al.*, 2017; ERASMUS; WEAVER, 2017). Portanto, a utilização de vírus inseto-específicos para a geração de quimeras demonstra ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas contra arboviroses.

A produção de vírus quiméricos de ISVs com arbovirus pode ser aplicada também no desenvolvimento de testes diagnósticos. De forma similar às VLPs (*Virus-Like Particles*), os vírus quiméricos podem ser empregados como antígenos para a detecção de anticorpos contra arbovirus pois os vírus quiméricos podem apresentar melhor eficiência na montagem das partículas e produzi-las em maior quantidade, além de não necessitarem de células de vertebrados. Também apresentam vantagens quando comparados a outros sistemas de produção de antígenos, pois diferentemente de vírus patogênicos, os vírus quiméricos não precisam ser manipulados em laboratórios com altos níveis de contenção. Ademais, os antígenos podem ser produzidos sem necessitar de muitas etapas de concentração e purificação (AGBOLI *et al.*, 2019). Além da aplicação como vacina, o vírus quimérico EILV/CHIKV descrito anteriormente foi avaliado como antígeno em ensaio tipo ELISA para a detecção de anticorpos anti-CHIKV no soro de pacientes infectados. Os estudos indicaram 100% de especificidade e sensibilidade, apresentando melhor desempenho que os kits comerciais avaliados. Portanto, os resultados demonstram que a utilização de

quimeras de ISVs representa uma alternativa vantajosa para a produção de antígenos de alta qualidade e o desenvolvimento de testes diagnósticos (ERASMUS *et al.*, 2015; ERASMUS; WEAVER, 2017).

1.6 Justificativa

Nas últimas décadas, uma crescente emergência de doenças infecciosas tem sido observada, fenômeno que tem reforçado a importância da vigilância epidemiológica para identificação de novos vírus. Recentemente, um novo alphavirus, nomeado Caaingua, foi isolado de mosquitos coletados no Paraná durante um surto de doença sem etiologia definida (TSCHÁ *et al.*, 2019). Embora até o momento um vínculo epidemiológico não tenha sido estabelecido entre o vírus e o surto, estudos adicionais são necessários para esclarecer o ciclo do novo vírus e sua manutenção na natureza.

Uma vez que pouco se sabe sobre o ciclo de transmissão de CAAV e sobre as espécies que atuam como seu vetor, é de suma importância investigar a susceptibilidade de mosquitos à infecção pelo vírus. Entre as espécies com grande impacto na saúde pública, mosquitos *Aedes albopictus* se destacam por possuírem competência vetorial para transmitir ao menos 26 arbovirus e por serem vetores para CHIKV e DENV (PAUPY *et al.*, 2009). Sendo assim, a realização de estudos para caracterizar a replicação de CAAV em mosquitos dessa espécie pode contribuir para o entendimento do ciclo de transmissão do vírus na natureza, de seu papel epidemiológico e relevância para saúde pública.

Devido à identificação recente de CAAV como um novo alphavirus, há uma carência por insumos que possam ser aplicados em estudos para a caracterização do vírus. Nesse sentido, anticorpos monoclonais (mAbs) representam ferramentas promissoras e versáteis, pois podem ser utilizados em inúmeros ensaios, como imunofluorescência, citometria de fluxo, ELISA, imunohistoquímica, entre outros. Desse modo, o desenvolvimento de hibridomas produtores de mAbs anti-CAAV possibilita a obtenção de quantidades praticamente ilimitadas de insumos específicos capazes de reconhecer epítomos do vírus. Esses insumos podem ser usados não apenas para ampliar a caracterização de CAAV, mas também no desenvolvimento de testes diagnósticos caso a infecção pelo vírus seja associada a manifestação de doenças em humanos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver insumos para ampliar a caracterização de um novo alphavirus denominado Caaingua (CAAV) *in vitro* e em mosquitos.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir e caracterizar hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (mAbs) específicos contra o vírus Caaingua.
- Avaliar a infecção pelo vírus Caaingua em colônia de *Aedes albopictus* de modo a caracterizar a replicação e disseminação do vírus em tecidos de mosquitos dessa espécie.

3. METODOLOGIA

3.1 Linhagens Celulares e Vírus

3.1.1 Linhagens celulares

A linhagem celular C6/36 (derivada de células de larva de *Aedes albopictus*, ATCC CRL-1660) foi utilizada durante a seleção e caracterização dos anticorpos monoclonais anti-CAAV. Adicionalmente, foi usada para produção dos estoques virais de CAAV. As células foram cultivadas em meio L-15 (Leibovitz's) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (SBF) inativado (Gibco), 25 µg/mL de gentamicina (Gibco) e 0,26% (m/v) de triptose e foram mantidas a 28°C.

A linhagem celular P3X63Ag8.653 (derivada de mieloma murino, ATCC CRL-1580) foi utilizada para a fusão com esplenócitos murinos e geração dos hibridomas. As células foram mantidas em estufa com atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ e foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo (suplementado com 20% (v/v) de SBF, 0,2 mM de L-glutamina, 1,0 mM de piruvato de sódio, 9,6 mM de HEPES, 23,8 mM de bicarbonato de sódio e os seguintes antibióticos: 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B). Os hibridomas produzidos foram cultivados nas mesmas condições.

3.1.2 Vírus

O vírus Caaingua (CAAV) utilizado no trabalho foi isolado de um *pool* de mosquitos do gênero *Culex* coletado no Paraná e identificado como MS681 (TSCHÁ *et al.*, 2019).

O vírus Chikungunya (CHIKV) utilizado no trabalho foi o isolado CHIKV BR/2015/15010 e representa um isolado clínico humano do Brasil, obtido a partir de uma amostra de soro de paciente da região nordeste do Brasil coletado em janeiro de 2015.

O vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) usado foi a cepa vacinal TC83 (BERGE; BANKS; TIGERTT, 1961).

O vírus Mayaro (MAYV) foi gentilmente cedido pela Dra. Ana Maria Bispo de Filippis do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz-RJ. Baseado no sequenciamento de um

fragmento de 453 pb da região estrutural E2/E3, houve semelhança superior a 98% com sequências homólogas pertencentes ao genótipo D.

O vírus Aura (AURAV) usado no estudo foi o isolado BR/P05 (MOSIMANN *et al.*, 2018).

3.2 Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais anti-CAAV

3.2.1 Preparo do Antígeno

O antígeno viral para imunização dos camundongos foi preparado a partir de 100 mL do sobrenadante de células C6/36 infectadas com CAAV. O sobrenadante foi concentrado por precipitação com polietilenoglicol (PEG) 8000/NaCl e purificado por sedimentação em colchão de sacarose (GOULD *et al.*, 1986). Para tanto, células C6/36 foram infectadas com CAAV em multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 e mantidas em estufa a 28 °C durante 6 dias. Após a coleta do sobrenadante das células infectadas, adicionou-se a este 7% (p/v) de PEG 8000 (Sigma-Aldrich) e 2,3% (p/v) de NaCl (Merck) e incubou-se *overnight* a 4°C sob agitação branda. A suspensão viral foi então centrifugada a 10000 rpm durante 30 min a 4°C e o precipitado foi recuperado em tampão STE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl e 1 mM EDTA pH 8.0). O precipitado viral foi transferido para um tubo contendo 3,5 mL de sacarose a 60% e 4,5 mL de sacarose a 30% em tampão TNE (20 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl e 2 mM EDTA). O tubo foi centrifugado a 39000 rpm por 2 horas a 4 °C e a fração contendo as partículas virais foi coletada.

As partículas virais purificadas foram então quantificadas pela técnica de titulação viral por imunodeteção de foco (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993). Placas de cultivo celular de 24 poços contendo 1×10^5 células da linhagem C6/36 por poço foram mantidas em estufa a 28°C por 16-24 horas. Posteriormente, o meio de cultivo foi retirado e foram adicionados, em duplicata, 400 µL de diluições seriadas (com fator de diluição 10) da solução viral sobre as células. Após uma hora de incubação em estufa a 28°C, o inóculo viral foi retirado e foram adicionados 500 µL de uma solução *overlay*, composta por meio L-15 com 5% de SFB, 0,26% de triptose, 25 µg/mL de gentamicina e 1,6% (m/v) de carboximetilcelulose (CMC). O *overlay* foi retirado após 7 dias de incubação a 28 °C e os poços foram lavados três vezes com PBS (solução salina tamponada). O tapete celular foi então fixado com 500 µL/poço de uma solução de paraformaldeído 3% (m/v) em PBS durante 20 minutos à

temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram permeabilizadas por 4 minutos com 200 µL/poço de 0,5% (m/v) de Triton X-100 em PBS. A detecção dos focos foi realizada utilizando o mAb comercial alphavirus específico (MAB8754 - Merck) seguido por um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Promega). Ambas as incubações foram realizadas a 37°C durante 1 hora. Foram realizadas três lavagens com PBS entre as etapas de fixação, permeabilização e marcação. Os focos foram revelados com a adição de solução de substrato/cromógeno contendo BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) e NBT (cloreto de tetrazólio azul) (Promega).

3.2.2 Imunização dos Camundongos

Todos os procedimentos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz sob nº de protocolo LW-27/19. Para a geração de hibridomas produtores de anticorpos anti-CAAV, três camundongos isogênicos da linhagem Balb/C com aproximadamente 45 dias de idade, mantidos no Biotério do Instituto Carlos Chagas, foram imunizados com o vírus. O protocolo de imunização consistiu na aplicação de quatro doses, com duas semanas de intervalo entre as doses. As três primeiras foram administradas pela via intraperitoneal (I.P.) com 10^7 ffu de CAAV e a última pela via endovenosa (E.V.) com 10^6 ffu de CAAV. Antes da primeira imunização e 5 dias após a terceira dose, realizou-se a punção da veia caudal dos animais para obtenção do soro pré-imune e pós-imune, respectivamente. O sangue foi mantido à temperatura ambiente até sua coagulação e posteriormente foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para coleta do soro.

3.2.3 Obtenção dos Esplenócitos e Preparo das Células de Mieloma

Três dias após a última dose, os camundongos foram anestesiados com 0,1 mL/10g de peso animal de solução de 100 mg/kg de cloridrato de quetamina e 1 mg/kg de cloridrato de xilazina por via I.P. Após a coleta do soro pós-imune por punção cardíaca, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, submersos em etanol 70% e transferidos para uma cabine de segurança biológica para remoção asséptica dos baços. Os baços foram macerados em placa de petri contendo meio RPMI 1640 utilizando-se a parte fosca de lâminas de microscopia. A suspensão celular resultante foi filtrada em filtros de *nylon* e transferida para tubo cônico para

centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. O *pellet* celular foi recuperado em tampão de lise de hemácias (166 mM NH₄Cl, 9M EDTA e 95 mM NaHCO₃) gelado e incubado por 5 min. Após a lise das hemácias, a suspensão celular foi submetida a duas lavagens, com a adição de 45 mL de RPMI 1640 e centrifugação por 10 min a 1500 rpm. Por fim, as células foram recuperadas em 10 mL de meio RPMI 1640. A concentração de células viáveis foi determinada em câmara de *Neubauer* pelo método de exclusão por Azul de Tripán a 0,4% (Gibco).

Células de mieloma da linhagem P3X63Ag8.653 foram descongeladas duas semanas antes da fusão em meio RPMI 1640 completo. No dia anterior à fusão, as células foram expandidas para garrafas de cultivo de 75 cm² com o objetivo de alcançarem a fase logarítmica de crescimento, fator considerado importante para uma fusão bem sucedida (LAFON, 1996). No dia da fusão, as células foram transferidas para tubo cônico, centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min e o *pellet* celular foi recuperado em 10 mL de meio RPMI 1640. Assim como os esplenócitos, a concentração de células viáveis foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Tripán 0,4%.

3.2.4 Fusão

Os esplenócitos foram misturados com as células de mieloma na proporção 6:1 em tubo cônico, e o tubo foi centrifugado durante 10 minutos a 1500 rpm. Após desprezar o sobrenadante, foi adicionado gota a gota sobre o precipitado celular 1 mL de PEG 4000 (Sigma-Aldrich) a 50% (v/v) diluído em meio RPMI 1640, durante 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado gota a gota mais 1 mL de RPMI 1640 durante um minuto e finalmente 7 mL de RPMI 1640 durante dois minutos. As células foram centrifugadas e recuperadas em meio RPMI 1640 completo de modo a se obter uma concentração celular final de $2,5 \times 10^6$ células/mL. Foram então distribuídos 100 µL/poço da suspensão celular em placas de cultivo 96 poços. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂ (MAZZAROTTO *et al.*, 2009).

A seleção das células híbridas foi realizada adicionando-se meio RPMI 1640 completo suplementado com HAT (0,1 mM de hipoxantina, 4 µM de aminopterina e 0,16 mM de timidina - Sigma-Aldrich) 24 horas após a fusão. As células foram mantidas em meio HAT durante 14 dias, seguida por cultivo em meio RPMI 1640 completo suplementado com HT (Sigma-Aldrich) durante 5 dias e em meio RPMI 1640

completo sem HAT ou HT a partir do 20º dia (YOKOYAMA *et al.*, 2006). Os poços que apresentaram crescimento celular durante o período de seleção foram submetidos a triagem para verificar a produção de anticorpos anti-CAAV.

3.2.5 Triagem dos Hibridomas e Obtenção de Anticorpos Monoclonais

A triagem dos hibridomas produtores de anticorpos contra CAAV foi realizada por imunofluorescência indireta (IFI). Células C6/36 foram infectadas com CAAV em MOI de 3 em placas de 96 poços a $1,5 \times 10^4$ células/poço. Após 6 dias, os poços foram fixados com solução de metanol:acetona 1:1 (v/v) e mantidos a -20°C durante no mínimo 1 hora antes de sua utilização. Como controle, também foram cultivadas e fixadas células C6/36 não infectadas (MOCK). Os sobrenadantes de cultivo dos hibridomas foram coletados e adicionados puros aos poços como anticorpo primário. Um anticorpo comercial alphavirus específico (MAB8754 - Merck) na diluição 1:400 foi usado como controle positivo e um anticorpo flavivirus específico (produzido pelo hibridoma D1-4G2-4-15, ATCC HB-112) na diluição 1:300 foi usado como controle negativo. Em seguida, os poços foram incubados com um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen) na diluição 1:600 juntamente com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para visualização dos núcleos. As incubações foram realizadas a 37°C durante 40 min e entre elas, foram realizadas três lavagens com PBS. As placas foram visualizadas em microscópio óptico invertido de fluorescência associado a *software* de deconvolução (LEICA AF6000 Modular System).

Os hibridomas positivos na triagem foram expandidos e submetidos a dois ciclos de congelamento e descongelamento. Para isso, a concentração de células viáveis foi determinada em câmara de *Neubauer* pelo método de exclusão por Azul Tripán a 0,4%. O volume correspondente a 3×10^6 células foi transferido para tubo cônico e centrifugado a 2000 rpm por 5 min. O *pellet* celular foi recuperado em meio de congelamento, composto por 10% DMSO (Dimetilsulfóxido - Sigma-Aldrich) e 90% de SFB (Gibco). A suspensão celular foi transferida para tubo criogênico e estes foram armazenados *overnight* em ultra freezer em recipiente Mr. Frosty® (Nalgene - Thermo Scientific), que providencia o resfriamento de $1^\circ\text{C}/\text{min}$. Os tubos foram então armazenados em nitrogênio líquido até o descongelamento. Para o descongelamento dos hibridomas, os criotubos foram aquecidos a 37°C por cerca de 2 min. O conteúdo dos criotubos foi transferido para tubo cônico contendo 5 mL de meio RPMI 1640

completo e foi centrifugado a 2000 rpm por 5 min. O *pellet* celular foi então recuperado em meio RPMI 1640 completo e transferido para garrafa de cultivo celular de 25 cm².

Os hibridomas que mantiveram a secreção de anticorpos estável foram clonados por dois ciclos de diluição limitante para a obtenção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais (mAbs). Para isso, foram transferidas 200 células/poço para a primeira coluna de placas de 96 poços. A partir desses poços, foram realizadas diluições seriadas nas colunas seguintes (fator de diluição 2) e os poços contendo apenas uma célula foram identificados após visualização em microscópio óptico invertido. Eles foram monitorados durante 10 dias e os hibridomas que apresentaram crescimento tiveram a secreção de mAbs anti-CAAV verificada por IFI.

3.2.6 Caracterização dos Anticorpos

A especificidade dos mAbs obtidos foi avaliada por IFI em células infectadas com outros alphavirus. Células C6/36 foram cultivadas em placas de 96 poços a $1,5 \times 10^4$ células/poço e foram infectadas separadamente com CHIKV (MOI 0,5), VEEV (MOI 0,5), AURAV (MOI 0,01) e MAYV (MOI 0,5). Adicionalmente, células MOCK foram cultivadas como controle. Após 72 horas, descartou-se o sobrenadante de cultivo e as placas foram fixadas com solução de metanol:acetona 1:1. A IFI foi realizada conforme descrito anteriormente, utilizando-se como anticorpo primário o sobrenadante de cultivo dos hibridomas, um anticorpo alphavirus específico (MAB8754 - Merck) como controle positivo e um anticorpo flavivirus específico (produzido pelo hibridoma D1-4G2-4-15, ATCC HB-112) como controle negativo.

Além de avaliar a especificidade dos mAbs anti-CAAV, o isotipo dos mesmos foi identificado. Para tal fim, foi realizado um ensaio imunoenzimático do tipo ELISA de captura com o kit *SBA Clonotyping HRP System* (Southern Biotech), seguindo o protocolo do fabricante.

3.2.7 Concentração e Purificação dos mAbs

Os mAbs caracterizados foram concentrados por precipitação com sulfato de amônio (PERRIN, 1996). O cultivo dos hibridomas foi expandido para garrafas de cultivo de 300 cm² e o sobrenadante foi coletado até completar volume de 600 mL. Sob agitação constante, adicionou-se lentamente ao sobrenadante um volume igual

de solução gelada saturada de sulfato de amônio (Sigma-Aldrich). O sobrenadante foi mantido a 4°C por uma hora, centrifugado a 5000 x g durante 45 minutos e o precipitado foi recuperado em 20 mL de PBS gelado. Com o objetivo de eliminar o sulfato de amônio, os mAbs foram submetidos à diálise contra 2L de PBS usando membranas de celulose de 10K MWCO (SnakeSkin™ Dialysis Tubing - Thermo Scientific). Após quatro trocas do tampão de diálise, os mAbs foram coletados das membranas e armazenados a - 20°C para posterior purificação.

A purificação dos mAbs concentrados foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando a coluna *HiTrap Protein G* (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante. As frações da eluição foram quantificadas pelo espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Scientific) e as mais concentradas foram misturadas para uso nos ensaios posteriores. O êxito das etapas de precipitação e purificação dos mAbs foi avaliado por IFI em células C6/36 infectadas com CAAV. A IFI foi realizada de acordo com o protocolo descrito anteriormente, utilizando como anticorpo primário alíquotas dos mAbs das diferentes etapas do processo de purificação.

O mAb purificado mais promissor foi testado por citometria de fluxo para avaliar a detecção da infecção em comparação com o anticorpo alphavirus específico (MAB8754 - Merck). Células C6/36 foram cultivadas em garrafas de cultivo de 25 cm² a 5 x 10⁵ células/garrafa e foram infectadas com CAAV em MOI 10 por 72h. Uma garrafa com células não infectadas (MOCK) foi cultivada como controle. O sobrenadante das garrafas foi desprezado e foi adicionada uma solução de bloqueio (5% (v/v) de SFB em PBS). Após 20 minutos de bloqueio, as células foram transferidas para um tubo cônico e centrifugadas. Elas foram fixadas com 1 mL de Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences) durante 20 min a 4 °C, novamente centrifugadas e recuperadas em 1 de Perm/Wash™ (BD Biosciences). A suspensão celular teve então seu volume igualmente distribuído em 6 poços de uma placa de 96 poços com fundo U. A placa foi centrifugada e as células foram incubadas com 100 µL/poço do mAb 5F4/F6/A10 ou do anticorpo comercial nas diluições 1:200, 1:400 e 1:800 durante 30 minutos a 37°C. Após a incubação, adicionou-se 100 µL/poço de Perm/Wash™, a placa foi centrifugada e lavada com 200 µL/poço de Perm/Wash™. Posteriormente, os poços foram incubados com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa fluor 488 durante 30 min a 37°C. Adicionou-se então 100 µL/poço de Perm/Wash™, a placa foi centrifugada e lavada com 200 µL/poço de Perm/Wash™. Todas as centrifugações foram realizadas a 2000 rpm por 5 minutos. Por fim, as células foram

recuperadas em 200 µL/poço de paraformaldeído 1,5% em PBS. A leitura da placa foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II Cell Analyzer (BD Biosciences) e os dados obtidos foram analisados no *software* FlowJo (BD Biosciences).

3.3 Avaliação da infecção por CAAV em *Aedes albopictus*

3.3.1 Manejo dos Mosquitos

Mosquitos da espécie *Aedes albopictus* foram mantidos no insetário do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) de acordo com as recomendações de Gerberg (1970). Os mosquitos adultos foram alimentados *ad libitum* com solução de sacarose 10% e mantidos em fotoperíodo de 12h claro/12h escuro à temperatura de 27° C e umidade relativa do ar de 70-80%. Os ovos dos mosquitos foram colocados para eclosão em recipientes contendo água filtrada e desaerada e as larvas foram transferidas para recipientes de plástico e alimentadas com ração.

3.3.2 Infecção dos Mosquitos com CAAV

Os procedimentos de infecção foram realizados pelo Prof. Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira do Laboratório de Interação Mosquito-Vírus da UFSC conforme descrito por Oliveira e Talyuli *et al.* (2017). Todos experimentos utilizaram mosquitos fêmeas da espécie *Aedes albopictus* com 3-10 dias de vida. A solução para as infecções foi preparada a partir do sangue de camundongos, que foi centrifugado para descarte do soro e coleta das células vermelhas. Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob nº de protocolo 8787141117. O lavado de células vermelhas foi misturado na proporção 1:1 com o sobrenadante de células C6/36 infectadas com CAAV (contendo $7,2 \times 10^7$ ffu/mL). À mistura foi adicionado o fagoestimulante ATP 1 mM, pH 7.

A solução foi usada para infecção dos mosquitos por via oral. Para esse fim, os mosquitos foram privados de alimentação com sacarose por 18h-24h. Posteriormente, a solução preparada foi fornecida aos mosquitos durante 1 hora através de alimentador artificial de vidro aquecido a 37°C. Após a alimentação com sangue

infeccioso, apenas as fêmeas totalmente ingurgitadas foram coletadas, conforme especificado abaixo.

Visando investigar a infecção e disseminação do CAAV nos mosquitos, foram realizados dois experimentos. No primeiro, mosquitos foram alimentados com o preparado de eritrócitos + CAAV, coletados nos dias 0, 4, 7, 14 e 21 após a alimentação e congelados a seco a -80°C. No segundo experimento, mosquitos foram alimentados da mesma forma, coletados nos dias 0, 7, 14 e 21 após a alimentação e foram dissecados em cabeça, tórax e abdômen para avaliar a dispersão viral. Mosquitos alimentados com o preparado de eritrócitos sem o vírus (MOCK) foram coletados no tempo 0 e dissecados da mesma forma. Os órgãos dissecados em cada tempo foram imersos em TRIzol (Invitrogen) e congelados em ultrafreezer a -80°C.

3.3.3 Extração de RNA

Foram utilizadas soluções e microtubos livres de RNases em todas as etapas. As extrações de RNA dos mosquitos do primeiro experimento de infecção foram realizadas utilizando o QIAamp® *Viral RNA Mini Kit* (Qiagen) e as dos *pools* de mosquitos do segundo experimento foram realizadas utilizando TRIzol.

Nas extrações realizadas com o kit comercial, os mosquitos infectados foram individualmente macerados em 400 µL de PBS utilizando o equipamento Precellys® 24 Tissue Homogenizer (Bertin Instruments). Os lisados foram centrifugados por 10000 rpm durante 5 min e foram transferidos 140 µL dos sobrenadantes para microtubos novos. As extrações foram então realizadas seguindo as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram recuperadas em 60 µL de tampão TE 10.1 (10 mM de Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) e armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

Nas extrações realizadas com TRIzol, as amostras foram maceradas em 500 µL de TRIzol utilizando o equipamento Precellys® 24 Tissue Homogenizer. O homogeneizado foi centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos e 250 µL de sobrenadante foram transferidos para microtubo para a extração do RNA. Foram adicionados ao sobrenadante mais 750 µL de TRIzol e os microtubos foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. A fim de se obter uma separação da amostra nas fases aquosa (contendo RNA), interfase e orgânica (DNA e proteínas), foram adicionados 200 µL de Clorofórmio (Merck). Após 3 minutos de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000 xg por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. O RNA foi precipitado *overnight* a -20°C com dois

volumes de etanol absoluto (Merck) e 0,1 volume de uma solução de acetato de sódio a 3M e pH 5,2. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 4°C em velocidade máxima de rotação e, a fim de remover resquícios de TRIzol e outros contaminantes, realizou-se uma lavagem com etanol 70% (v/v). Após evaporação total do etanol, o RNA foi recuperado em 60 µL de solução TE 10.1 e armazenado em ultrafreezer a -80°C.

3.3.4 RT-qPCR

As amostras de RNA foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop One. As reações de transcrição reversa e PCR em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas com 20 ng de RNA utilizando o kit GoTaq 1-Step RT-qPCR (Promega), seguindo as condições descritas na Tabela 3.1 e Tabela 3.2. As reações foram realizadas utilizando o termociclador LightCycler 96 (Roche).

Tabela 3.1 - Concentrações dos reagentes e RNA usados em cada reação de RT-qPCR.

Reagente	Volume	Concentração final
GoTaq® qPCR Master Mix	10 µl	1x
GoScript™ RT Mix (50X)	0,4 µl	1x
<i>Primer Forward</i>	0,3 µl	150 nM
<i>Primer Reverse</i>	0,3 µl	150 nM
Água <i>nuclease-free</i>	4 µl	-
RNA	5 µl	-
Volume Final	20 µl	-

Tabela 3.2 - Condições de ciclagem utilizadas para as reações de RT-qPCR.

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (s)
Transcrição reversa	1	42	900
Inativação da transcrição reversa e ativação da GoTaq® Polimerase	1	95	600
Desnaturação		95	10
Anelamento	45	61	30
Extensão e coleta de dados		72	30

A detecção do RNA viral foi realizada com iniciadores específicos para CAAV, desenhados contra a região nsp4 do genoma viral (Tabela 3.3). Ademais, foram avaliados dois conjuntos de iniciadores para detecção de genes endógenos de *A. albopictus*: *RPL32* (proteína ribossomal 32) (OLMO, 2015) e *RPS17* (proteína ribossomal S17) (DZAKI; AZZAM, 2018).

Tabela 3.3 - Sequências e alvos dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR para detecção de CAAV e genes endógenos de *A. albopictus*.

Nomes	Gene Alvo	Sequência (5' - 3')
RPL32-F	Proteína Ribossomal	AGCCGCGTGTGTTGACTCTG
RPL32-R	L32	ACTTCTTCGTCCGCTTCTTG
RPS17-F	Proteína Ribossomal	GAACGACAGCAGCGAAACTT
RPS17-R	S17	GTCACGAAACCAGCGATCTT
CAAV-F	Proteína não estrutural 4	GCTGATGGCGGATAGGTG
CAAV-R	(nsp4) de CAAV	ACTCCGTCACACATACCGC

Com a finalidade de avaliar se houve infecção por CAAV nos mosquitos após alimentação, foi analisada a variação dos níveis de RNA de CAAV nos mosquitos coletados nos dias 4, 7, 14 e 21 relativos ao tempo 0. Para o cálculo de quantificação relativa, foi utilizada uma adaptação do método $\Delta\Delta CT$ de Livak e Schmittgen (2001), descrita por Pfaffl (2001) e a média do Cq (ciclo de quantificação) dos mosquitos infectados no tempo 0 foi usada como calibrador. Brevemente, subtraiu-se os valores de Cq de CAAV de cada amostra da média dos Cq de CAAV dos mosquitos coletados no tempo 0 para obtenção do ΔCq_{alvo} . Igualmente, os valores de Cq obtidos para o gene *RPL32* foram subtraídos da média dos Cq de *RPL32* dos mosquitos coletados no tempo 0 para obtenção do $\Delta Cq_{endógeno}$. Por fim, os valores de ΔCq obtidos e as eficiência dos iniciadores (E) foram aplicados na fórmula abaixo para obtenção dos níveis relativos de RNA de CAAV:

$$\text{Razão} = (E_{alvo})^{\Delta Cq_{alvo}} / (E_{endógeno})^{\Delta Cq_{endógeno}}$$

Além da quantificação relativa ao tempo 0, foi realizada a quantificação absoluta para estimar os níveis de unidades formadoras de foco (ffu) de CAAV presentes nas amostras. A concentração viral foi calculada a partir de uma curva padrão feita com RNA de CAAV com concentração conhecida. Para obtenção dessa curva, RNA foi extraído a partir do sobrenadante de células C6/36 infectadas por CAAV previamente titulado (em concentração de $5,75 \times 10^7$ ffu de CAAV/mL). O RNA foi submetido a diluições seriadas (com fator de diluição 10) partindo de 10^6 ffu a 10^1 ffu e as diluições foram usadas nas reações de RT-qPCR em conjunto com as amostras.

Os dados foram analisados com auxílio do programa Microsoft Excel e dos softwares LightCycler® 96 System (Roche) e Prism 6.0 (Graphpad® Software).

4. RESULTADOS

4.1 Produção de Anticorpos Monoclonais anti-CAAV

Para a produção de mAbs contra o vírus Caaingua, camundongos da linhagem Balb/c foram imunizados com o vírus purificado. Foram coletadas alíquotas de soro antes da primeira dose (soro pré-imune) e após a terceira dose para avaliar a resposta imune dos animais frente às imunizações (Figura 4.1). A IFI em células C6/36 infectadas com CAAV indicou que o soro pré-imune não reagiu contra o vírus ou componentes celulares, conforme esperado. O soro pós-imune, no entanto, teve reatividade contra as células infectadas assim como células MOCK (Figura 4.1), apresentando em ambos os casos títulos de anticorpos iguais a 320. Os camundongos foram então submetidos a uma última dose e sacrificados para a geração de hibridomas.

O protocolo de fusão gerou 1952 poços, dos quais 1574 (80%) apresentaram crescimento de hibridomas e foram triados por IFI para detecção de anticorpos anti-CAAV. A triagem resultou inicialmente em 118 poços que apresentaram secreção de anticorpos específicos para o vírus, não reagindo contra componentes celulares. Estes hibridomas tiveram o cultivo expandido e os que apresentaram crescimento celular e mantiveram a secreção de anticorpos foram submetidos a dois ciclos de congelamento e descongelamento. A partir dos 118 hibridomas inicialmente positivos, apenas três (5F4, 8A11 e 7D11) apresentaram crescimento e estabilidade na secreção de anticorpos após a expansão e descongelamento (Figura 4.2).

Os três hibridomas foram submetidos a dois ciclos de diluição limitante para obtenção de anticorpos de origem monoclonal. No entanto, apenas o hibridoma 5F4 gerou clones positivos, resultando em 15 mAbs. Com base no crescimento e estabilidade de secreção de anticorpos, dois foram selecionados para maior caracterização e posterior purificação: 5F4/F6/A10 e 5F4/H6/D6.

A especificidade dos mAbs para o vírus Caaingua foi avaliada testando-os contra outros vírus do gênero *Alphavirus*. A IFI de células infectadas com CHIKV, VEEV, AURAV e MAYV revelou que os mAbs anti-CAAV não apresentaram reatividade cruzada contra os vírus mencionados (Figura 4.3). O isotipo dos anticorpos monoclonais foi determinado através de um ELISA de captura e indicou que ambos possuem cadeia pesada IgG2a e cadeia leve *kappa*.

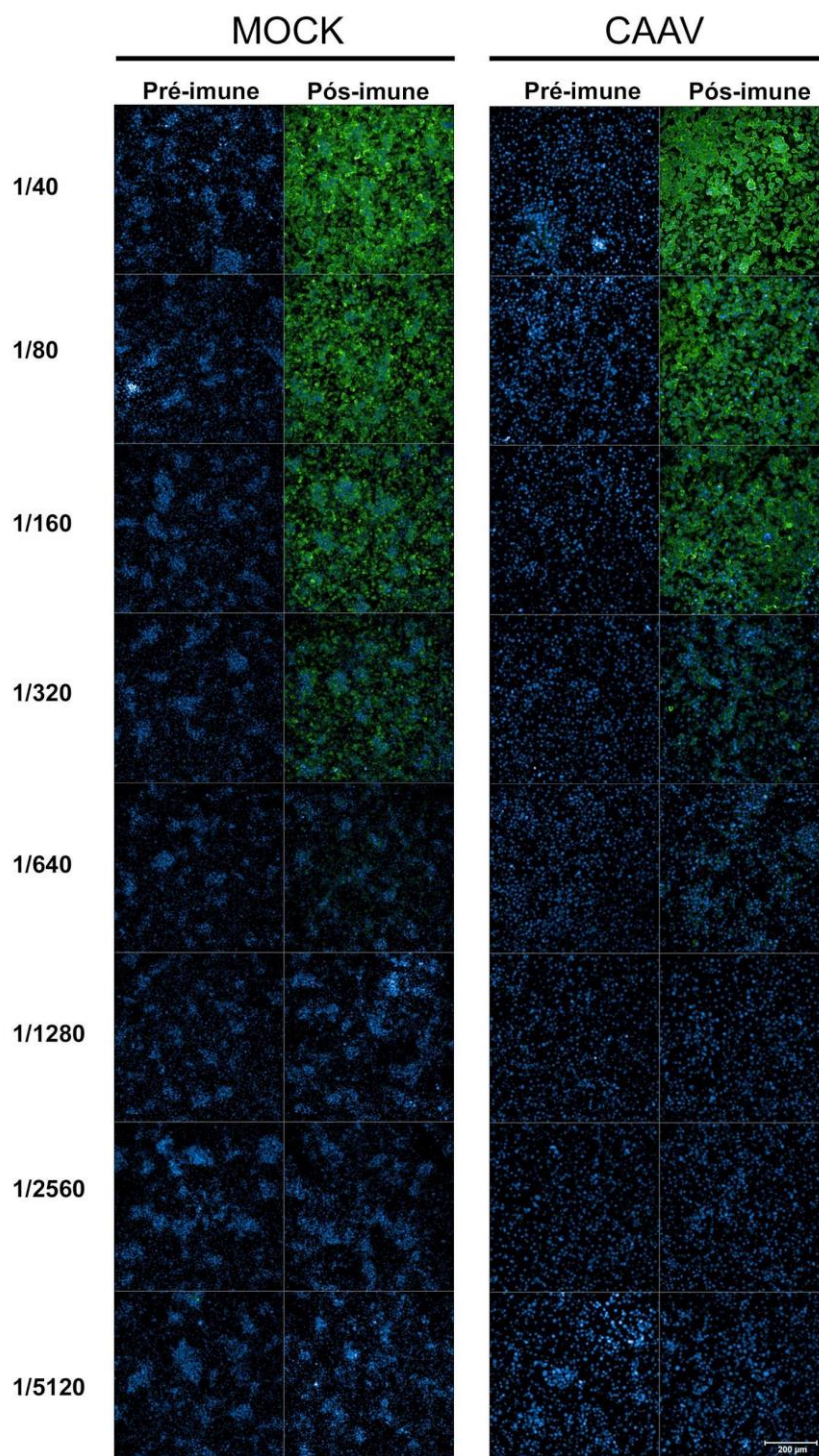


Figura 4.1 - Soroconversão de camundongos Balb/C imunizados com CAAV. Um *pool* contendo os soros pré-imune dos camundongos e um *pool* com os soros pós-imune foi submetido a diluições seriadas em PBS partindo de 1:40 até 1:5120. Cada diluição dos soros foi adicionada a culturas de células C6/36 infectadas com CAAV (MOI 1, 6 d.p.i.) e células C6/36 não infectadas (MOCK). A marcação foi visualizada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 e os núcleos foram marcados com DAPI. As imagens foram adquiridas com o sistema automatizado Operetta CLS (Perkin Elmer) no aumento de 20X. Barra de escala: 200 μ m.

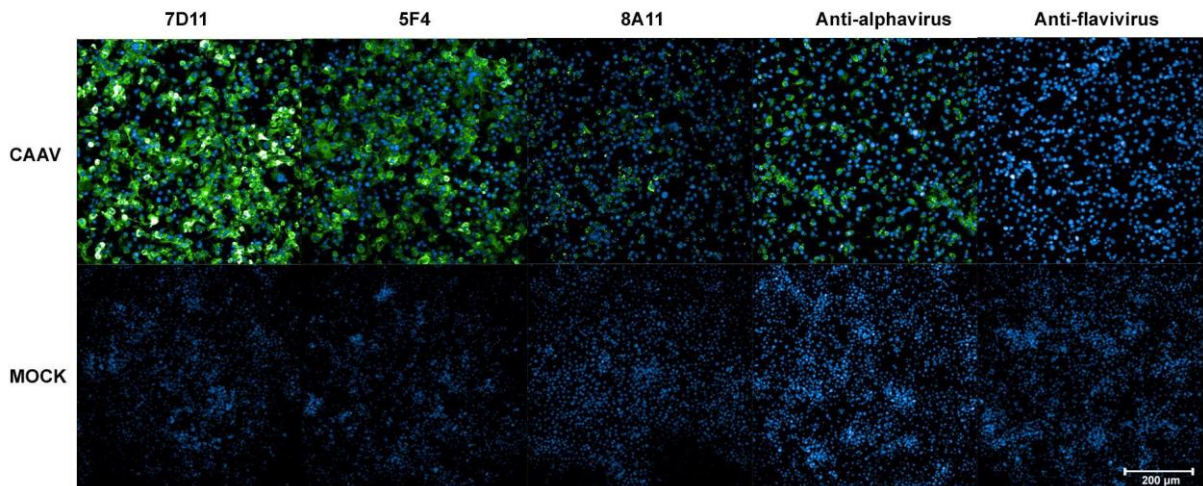


Figura 4.2 - Ensaio de imunofluorescência indireta dos hibridomas policlonais secretores de anticorpos anti-CAAV. Células C6/36 infectadas com CAAV em MOI=1, 6 d.p.i. foram incubadas com o sobrenadante dos hibridomas. Em seguida, foram incubadas com um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa fluor 488 e DAPI para visualização dos núcleos. Um mAb anti-alphavirus específico (MAB874 - Merck) e um anticorpo flavivirus específico (4G2) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. As imagens foram adquiridas com o sistema automatizado Operetta CLS no aumento de 20X. Barra de escala: 200 µm.

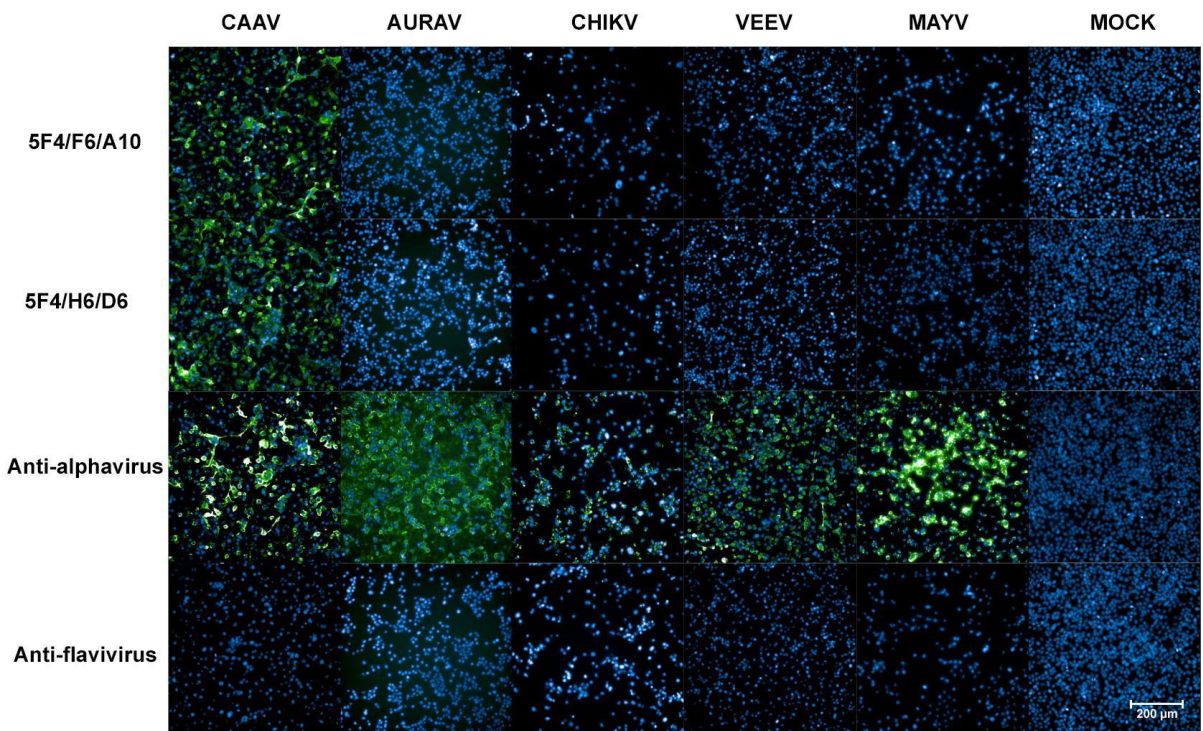


Figura 4.3 - Reatividade cruzada dos mAbs anti-CAAV contra outros alphavirus. Células C6/36 foram infectadas separadamente com CAAV, CHIKV, VEEV, MAYV e AURAV e foram marcadas com os mAbs 5F4/F6/A10 e 5F4/H6/D6. A marcação foi visualizada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 e os núcleos foram marcados com DAPI. Um mAb anti-alphavirus específico (MAB874 - Merck) e um anticorpo flavivirus específico (4G2) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. As imagens foram adquiridas com o sistema automatizado Operetta CLS (Perkin Elmer) no aumento de 20X. Barra de escala: 200 µm.

Os hibridomas produtores dos mAbs 5F4/F6/A10 e 5F4/H6/D6 tiveram o cultivo expandido para a coleta do sobrenadante e precipitação dos anticorpos com solução de sulfato de amônio. Os mAbs concentrados foram purificados por cromatografia de afinidade com coluna de proteína G e as amostras finais foram testadas por IFI para confirmar se não houve perda de atividade após os processos descritos (Figura 4.4). A IFI indicou que os mAbs continuaram reativos contra as células infectadas após cada etapa, não havendo saturação da coluna ou perda de amostra durante a purificação, evidenciado pela ausência de fluorescência nas amostras *flow-through* (coletada na etapa de ligação do anticorpo à coluna) e *column wash* (coletada na lavagem da coluna). Os mAbs purificados apresentaram títulos de anticorpos maior ou igual a 2.000 para o mAb 5F4/F6/A10 e igual a 1.500 para o mAb 5F4/H6/D6. A concentração dos mesmos foi avaliada por dosagem no espectrofotômetro Nanodrop One e indicou uma concentração de 2,348 mg/mL para o 5F4/F6/A10 e 1,366 mg/mL para o 5F4/H6/D6.

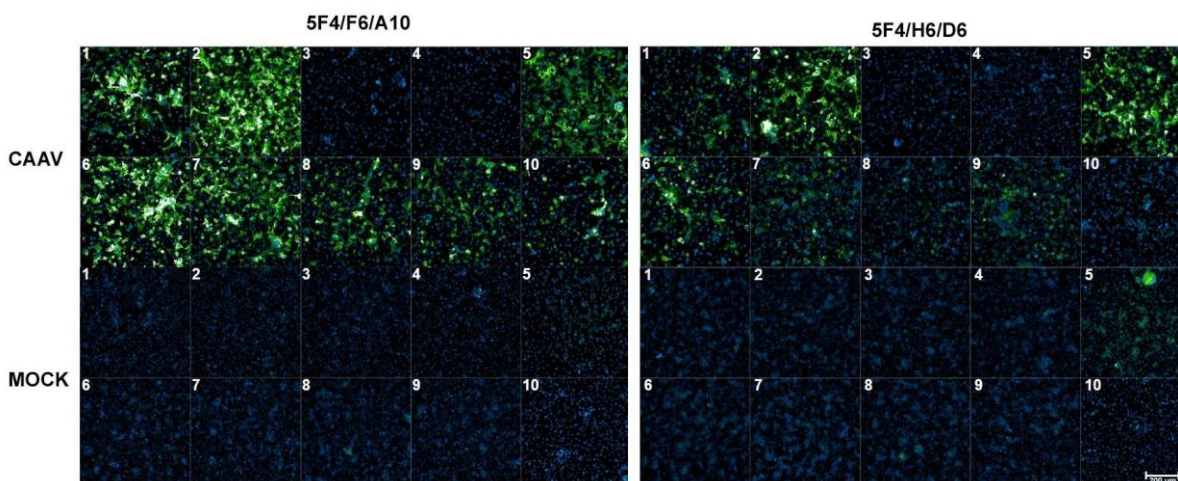


Figura 4.4 - Purificação dos mAbs anti-CAAV 5F4/F6/A10 e 5F4/H6/D6. Células C6/36 foram infectadas com CAAV (MOI=3, 6.d.p.i.) e marcadas com as amostras: (1) sobrenadante de cultivo dos hibridomas, (2) mAb precipitado, (3) *flow-through* da purificação, (4) *column wash* da purificação, (5) mAb purificado puro e (6-10) mAb purificado nas diluições 1:100, 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000. A marcação foi visualizada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 e os núcleos foram marcados com DAPI. As imagens foram adquiridas com o sistema automatizado Operetta CLS (Perkin Elmer) no aumento de 20X. Barra de escala: 200 µm.

Por apresentar maior título e concentração, o mAb 5F4/F6/A10 foi testado em ensaio de citometria de fluxo com células C6/36 infectadas com CAAV (Figura 4.5). As células foram avaliadas quanto a complexidade (SSC-A) e intensidade de fluorescência (Alexa fluor 488) e foram demarcados *gates* com base nas células MOCK para o cálculo da porcentagem de células infectadas. Assim como na IFI, o mAb foi capaz de detectar o vírus em todas as diluições testadas. Além disso,

demonstrou desempenho semelhante ao anticorpo comercial alphavirus específico utilizado como controle, como exemplificado pela diluição 1/800 na qual foi observada uma porcentagem de infecção de 96,3% em comparação com 99% do anticorpo comercial. Deste modo, o mAb se mostrou adequado como reagente para avaliar a infecção de células C6/36 por CAAV por esta técnica.

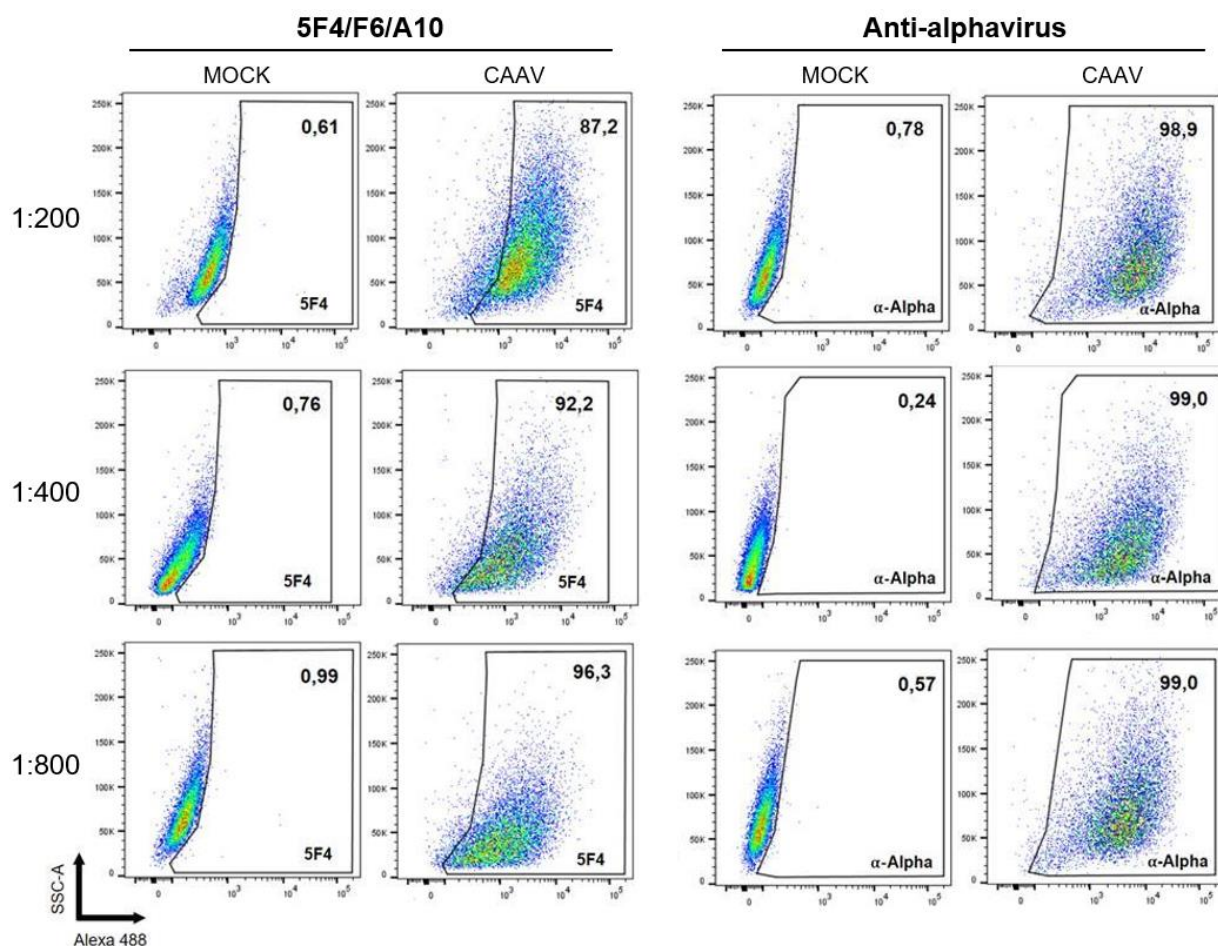


Figura 4.5 - Avaliação do mAb 5F4/F6/A10 em células C6/36 infectadas com CAAV (MOI=10, 1 d.p.i.). As células foram marcadas com o mAb 5F4/F6/A10 purificado ou anticorpo alphavirus específico (MAB 8754 - Merck) nas diluições 1:200, 1:400, 1:800, seguido de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488.

4.2 Infecção por CAAV em mosquitos *A. albopictus*

4.2.1 Padronização da RT-qPCR

4.2.1.1 Otimização da temperatura de hibridização (*annealing*)

Visando otimizar a temperatura de hibridização dos iniciadores ao molde de ácido nucleico para amplificação do genoma de CAAV, foram realizadas reações de RT-qPCR com gradiente de temperatura entre 53°C e 63°C. Para tanto, foram

utilizados RNAs extraídos das seguintes amostras: mosquitos não infectados aos quais adicionou-se 10^4 ffu de CAAV na etapa de extração (identificados como “mosquitos+CAAV”) e mosquitos não infectados (identificados como “mosquitos MOCK”) como controle. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.1 e Figura 4.6.

Tabela 4.1 - RT-qPCR feita com diferentes temperaturas de hibridização para iniciadores de CAAV. Foram utilizados nas reações RNAs de mosquitos MOCK e mosquitos + CAAV da espécie *A. albopictus*.

Temperatura	Amostra	Média Cq	Desvio Padrão
53°C	Mosquitos MOCK	33,52	0,806
	Mosquitos+CAAV	21,03	0,587
57°C	Mosquitos MOCK	34,66	0,467
	Mosquitos +CAAV	21,60	0,219
60 °C	Mosquitos MOCK	34,79	2,454
	Mosquitos+CAAV	21,02	0,035
61°C	Mosquitos MOCK	33,90	1,725
	Mosquitos+CAAV	20,60	0,113
62°C	Mosquitos MOCK	35,68	0,467
	Mosquitos+CAAV	20,63	0,035
63°C	Mosquitos MOCK	36,23	0,948
	Mosquitos+CAAV	20,97	0,170

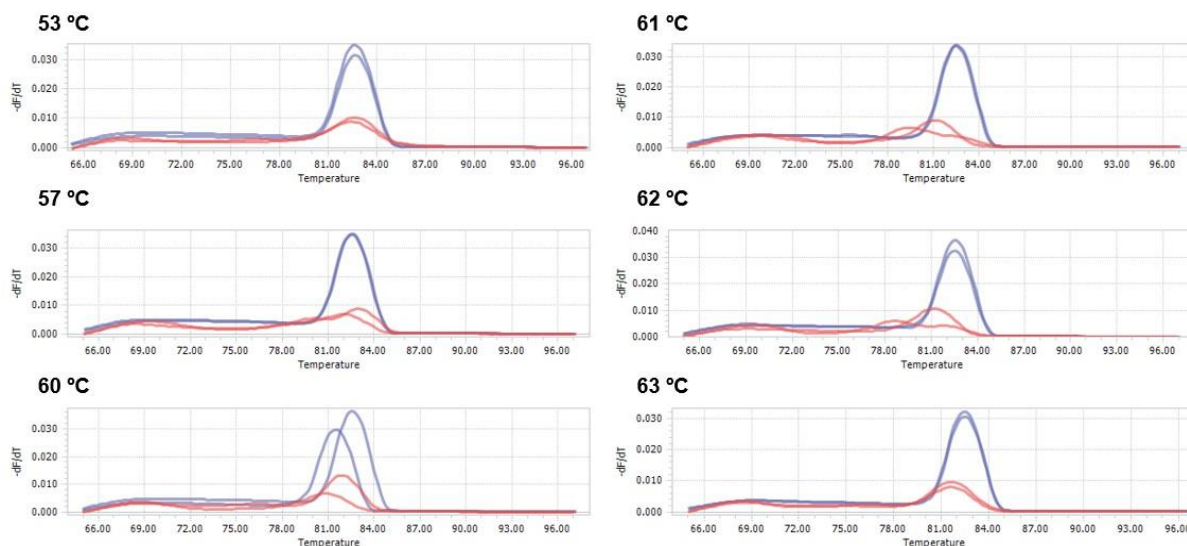


Figura 4.6 - Curvas de dissociação de RT-qPCR feita com diferentes temperaturas de hibridização para iniciadores de CAAV. Em azul estão representadas as amostras de mosquitos+CAAV e em vermelho as amostras de mosquitos MOCK.

Os Cqs das amostras de mosquitos+CAAV apresentaram pouca variação, mantendo-se entre 20,60 e 21,60 e suas curvas de dissociação apresentaram picos semelhantes em todas as temperaturas, com temperatura de dissociação entre 82°C e 83°C. Diferente do esperado, as amostras de mosquitos MOCK também

amplificaram e esse resultado foi observado mesmo em temperaturas maiores. Produtos inespecíficos podem de fato ser detectados ao utilizar o sistema SYBR uma vez que esse é um corante intercalante com afinidade a ácidos nucleicos de fita dupla. Sendo assim, a emissão de fluorescência não é específica à sequência alvo. Entretanto, os Cqs das amostras de mosquitos MOCK mantiveram-se altos, variando entre 32,52 e 36,23. Uma vez que em temperaturas menores (53°C e 57°C), as curvas de dissociação apresentaram picos próximos aos das amostras de mosquitos+CAAV, foi definido 61°C como a temperatura da reação.

4.2.1.2 Comparação dos métodos de extração de RNA

Inicialmente, as extrações de RNA foram realizadas utilizando o QIAamp® *Viral RNA Mini Kit*. No entanto, visto que as amostras do experimento com dissecação dos órgãos dos mosquitos foram armazenadas em TRIzol, foi feita uma comparação entre os protocolos de extração de RNA (utilizando o QIAamp® *Viral RNA Mini Kit* e utilizando TRIzol). Para uma melhor comparação, mosquitos MOCK e mosquitos+CAAV (quatro mosquitos por grupo) foram macerados em 500 µL de PBS ou TRIzol e 140 µL dos lisados foram usados para extração conforme descrito em 3.3.3. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.2 e Figura 4.7.

Tabela 4.2 - Resultado da RT-qPCR feita com RNA de mosquitos *A. albopictus* extraído utilizando o QIAamp® *Viral RNA Mini Kit* ou pelo método com TRIzol.

Método	Amostra	Média Cq	Desvio Padrão
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Mosquitos MOCK	32,68	0,035
	Mosquitos+CAAV	21,84	0,049
TRIzol	Mosquitos MOCK	32,07	0,813
	Mosquitos+CAAV	21,86	0,021

As amostras de mosquitos+CAAV extraídas pelos dois protocolos apresentaram Cqs próximos na RT-qPCR (Tabela 4.2), indicando que o método de extração de RNA não interferiu na detecção do vírus. Os RNAs amplificados pelos dois métodos apresentaram curvas de dissociação semelhantes, com pico específico de CAAV em torno de 82°C, diferente do observado para os mosquitos MOCK.

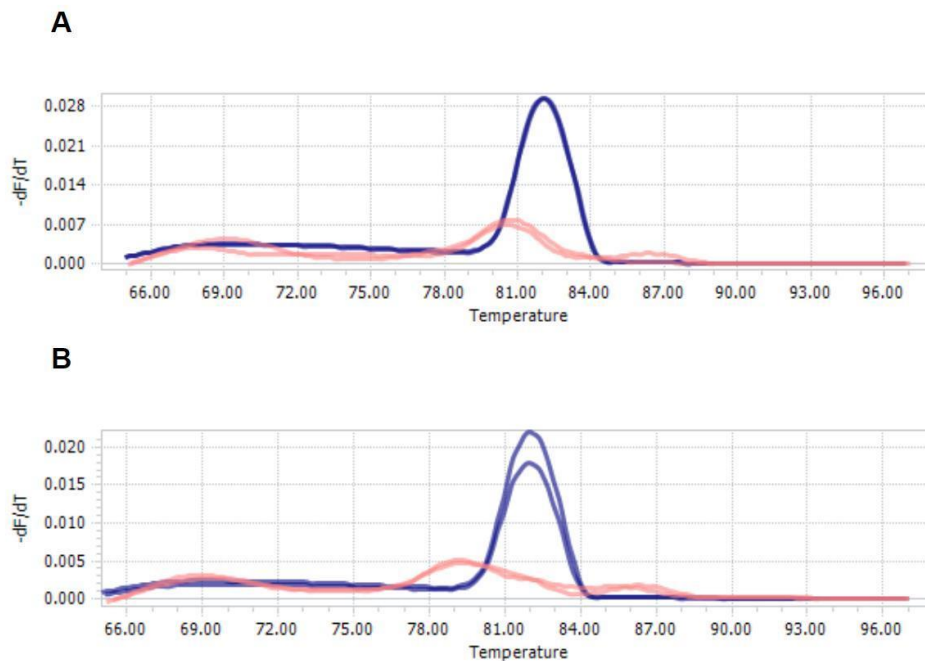


Figura 4.7 - Curvas de dissociação da reação de RT-qPCR feita com RNA extraído por dois protocolos: **(A)** com o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* e **(B)** com TRIZol. Em azul estão representadas as amostras de mosquitos+CAAV e em vermelho as amostras de mosquitos MOCK.

4.2.1.3 Validação de gene endógeno

A quantificação relativa depende da normalização dos níveis de RNA do gene alvo a um gene endógeno, cuja expressão deve ser invariante entre os grupos ou condições analisadas (PFAFFL, 2001). A escolha do gene endógeno é, portanto, crucial para a obtenção de níveis relativos de RNA precisos. Diversos estudos demonstram que genes endógenos comumente utilizados podem ter a expressão regulada em decorrência das condições experimentais empregadas (CHANG *et al.*, 1998). Sendo assim, o seu uso deve ser validado para cada desenho experimental.

Os iniciadores para amplificação dos genes *RPS17* e *RPL32* foram utilizados em RT-qPCR com as amostras de mosquitos infectados da Tabela 4.3 e sua estabilidade foi avaliada pela ferramenta RefFinder. A ferramenta integra os programas mais utilizados para comparar e classificar a estabilidade de genes endógenos (geNorm, BestKeeper, Normfinder) e gera uma classificação global. A análise revelou que o gene *RPL32* apresentou expressão mais estável e, portanto, seria mais apropriado para normalização dos dados no presente estudo (Figura 4.8).

Genes Geomean of ranking values
RPL32 1.19
RPS17 1.41

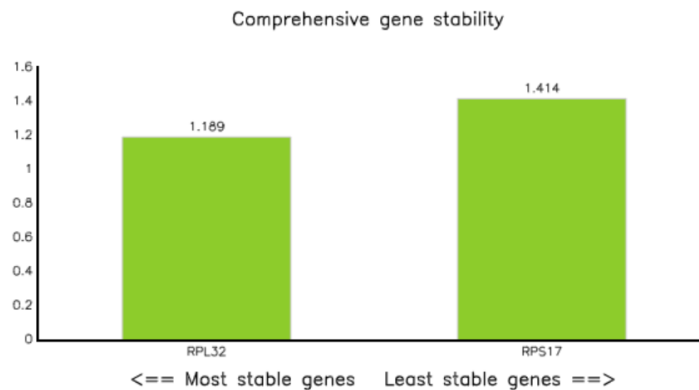


Figura 4.8 - Análise de estabilidade dos genes endógenos *RPL32* e *RPS17* pela ferramenta RefFinder.

Outro fator importante para a validação de genes endógenos é a análise das eficiências de amplificação para guiar a escolha do método de quantificação relativa. Um dos modelos mais conhecidos para quantificação relativa é o método $\Delta\Delta CT$, publicado por Livak e Schmittgen (2001), o qual assume que as eficiências de amplificação do gene alvo e gene endógeno são iguais a 100%. Sendo assim, as eficiências de amplificação de CAAV e dos iniciadores *RPL32* e *RPS17* foram determinadas através de curvas padrão (Figura 4.9). Diluições seriadas da amostra de RNA de mosquitos+CAAV foram utilizadas em reações RT-qPCR com cada par de iniciadores e as eficiências de amplificação foram calculadas conforme a fórmula abaixo (onde o *slope* representa o coeficiente angular das retas demonstradas na Figura 4.9):

$$[\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1]$$

Entre os genes endógenos analisados, os iniciadores para amplificação do gene *RPL32* apresentaram eficiência mais adequada (100%) que os iniciadores para amplificação do gene *RPS17* (127%). Além disso, a eficiência foi mais próxima a dos iniciadores de CAAV (108%). Uma vez que o gene *RPL32* também apresentou expressão mais estável no desenho experimental analisado, ele foi utilizado para a quantificação relativa dos níveis de RNA de CAAV. Os cálculos foram realizados seguindo o modelo de Pfaffl (2001) (descrito na seção 3.3.4), uma adaptação do método de Livak que permite a correção das eficiências de amplificação do gene alvo e endógeno para aumentar a precisão da quantificação.

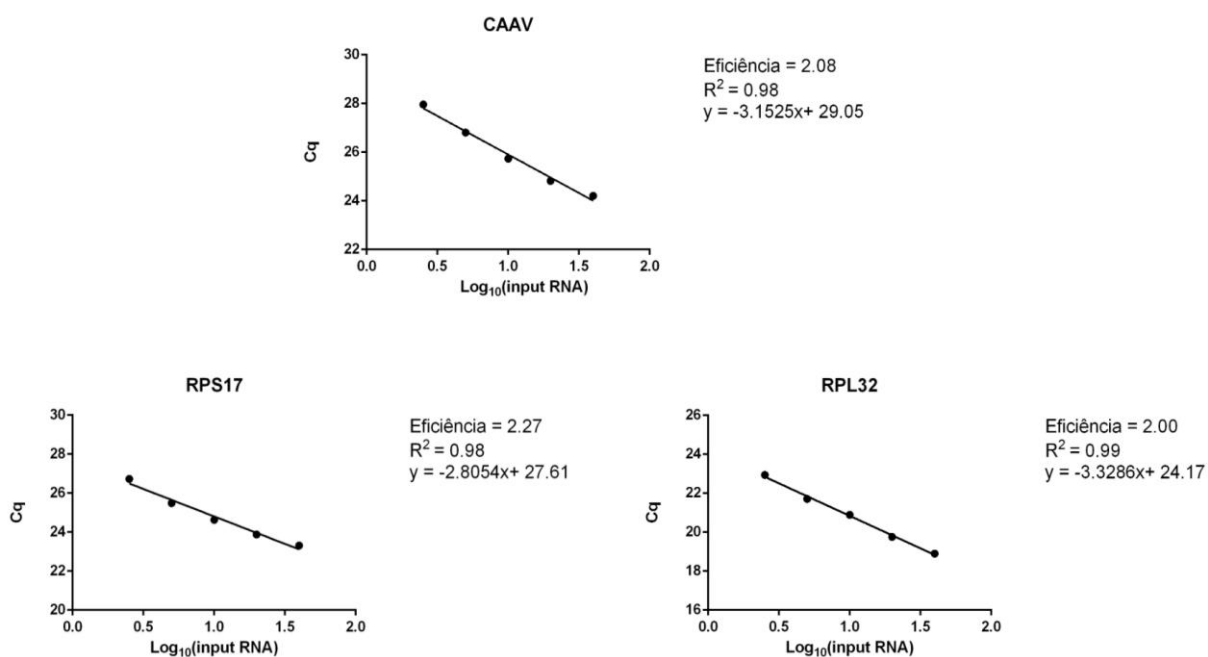


Figura 4.9 - Curvas padrão utilizadas para a análise da eficiência de amplificação dos iniciadores CAAV, RPL32 e RPS17.

4.2.2 Infecções em *A. albopictus*

Visando caracterizar a replicação do vírus Caaingua em mosquitos *Aedes albopictus*, foram realizadas infecções pela via oral em mosquitos mantidos em insetário. No primeiro experimento, foram realizadas coletas 0, 4, 7, 14 e 21 dias após a infecção, totalizando 35 mosquitos (Tabela 4.3). Mosquitos não infectados também foram coletados como controle (MOCK). Os resultados da quantificação relativa e absoluta do RNA de CAAV nos mosquitos infectados estão apresentados na Figura 4.10.

Tabela 4.3 - Número de mosquitos coletados 0, 4, 7, 14 e 21 dias após infecção de mosquitos *A. albopictus* com CAAV.

Tempo (dias)	Nº Mosquitos
0	9
4	6
7	8
14	6
21	6
Total	35

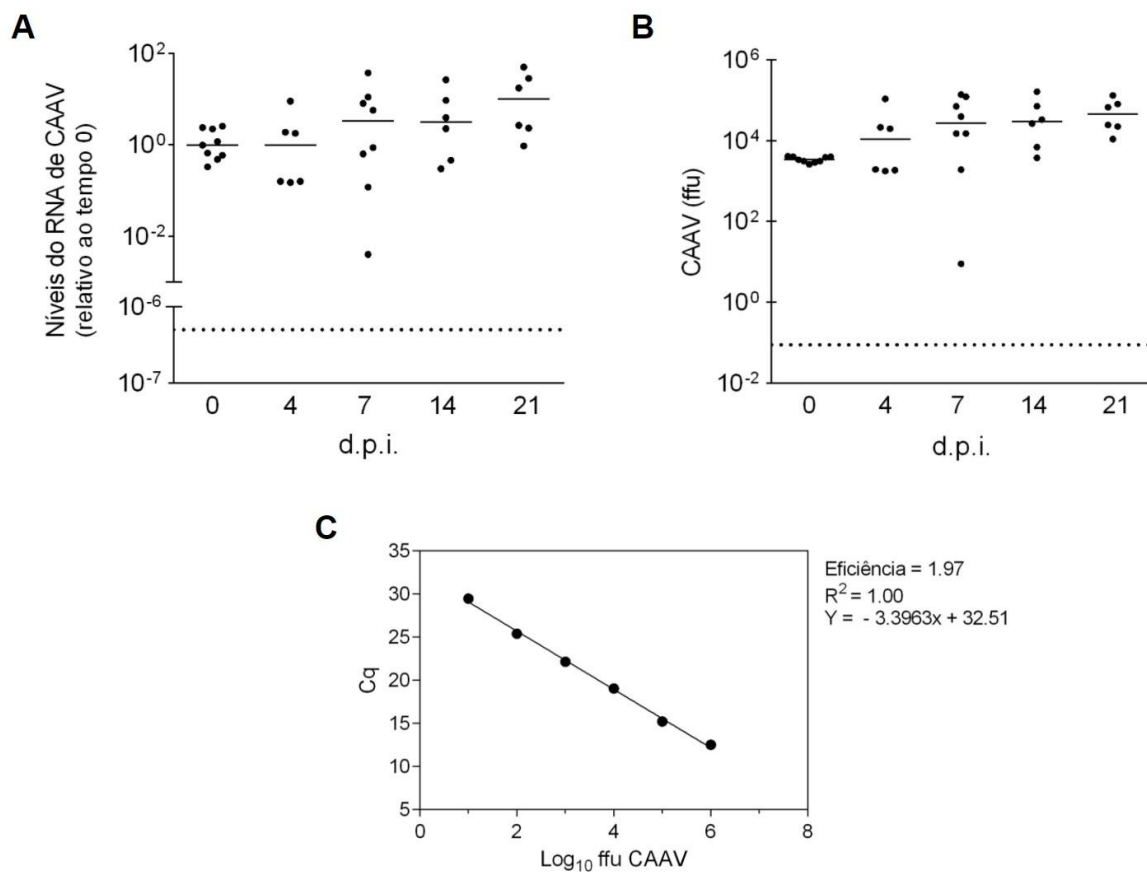


Figura 4.10 - Cinética de mosquitos *A. albopictus* infectados por CAAV e coletados após 0, 4, 7, 14 e 21 dias. **(A)** Níveis de RNA de CAAV relativos ao tempo 0 e normalizados pelo gene endógeno RPL32. **(B)** Quantificação de unidades formadoras de foco (ffu) de CAAV por mosquito. **(C)** Curva padrão utilizada para quantificação de ffu em B. As barras horizontais em A e B representam as medianas de cada tempo. As linhas tracejadas representam os valores de corte estabelecidos a partir do MOCK.

Os resultados da RT-qPCR indicaram que todos os mosquitos coletados no tempo 0 se alimentaram ingerindo o sangue infeccioso (detecção do RNA viral em 100% dos mosquitos analisados, Figura 4.10 B). Adicionalmente, a prevalência de infecção por CAAV nos mosquitos coletados nos demais tempos foi de 100%, uma vez que houve detecção do RNA viral em todos os mosquitos testados.

Para ambos os métodos de quantificação, houve uma visível variação nos níveis de RNA de CAAV ou de ffu detectados dentro dos grupos (d.p.i.), indicando para a presença de mosquitos com diferentes cargas virais (Figura 4.10 A e B). Apesar dessa diferença, observou-se uma tendência de aumento na carga viral ao longo dos primeiros dias após a infecção. No tempo 0 d.p.i., os mosquitos apresentaram média de $3,5 \times 10^3$ ffu de CAAV por mosquito, enquanto em 4 d.p.i. essa média foi de $2,6 \times 10^4$ ffu de CAAV por mosquito (Figura 4.10 B). Em 7 d.p.i., a carga viral média atingiu $5,0 \times 10^4$ ffu por mosquito e se manteve relativamente estável até 21 dias após a infecção. Os dados de quantificação relativa (Figura 4.10 A) também sugerem esse

aumento dos níveis de RNA de CAAV nos mosquitos infectados, sobretudo a partir de 7 d.p.i.

Com o intuito de caracterizar a dispersão de CAAV nos órgãos dos mosquitos, no segundo experimento, os mosquitos foram coletados em *pools* nos dias 0, 7, 14 e 21 após a infecção e foram dissecados em cabeça, tórax e intestino. Mosquitos não infectados (MOCK) também foram coletados e dissecados no tempo 0 como controle. Cada tempo de coleta resultou em 3 *pools* de 5 mosquitos, com exceção de 21 d.p.i. que teve 2 *pools*. A partir da análise dos *pools* de mosquitos MOCK, foram estabelecidos para cada órgão valores de corte para definir as amostras positivas (Figura 4.11).

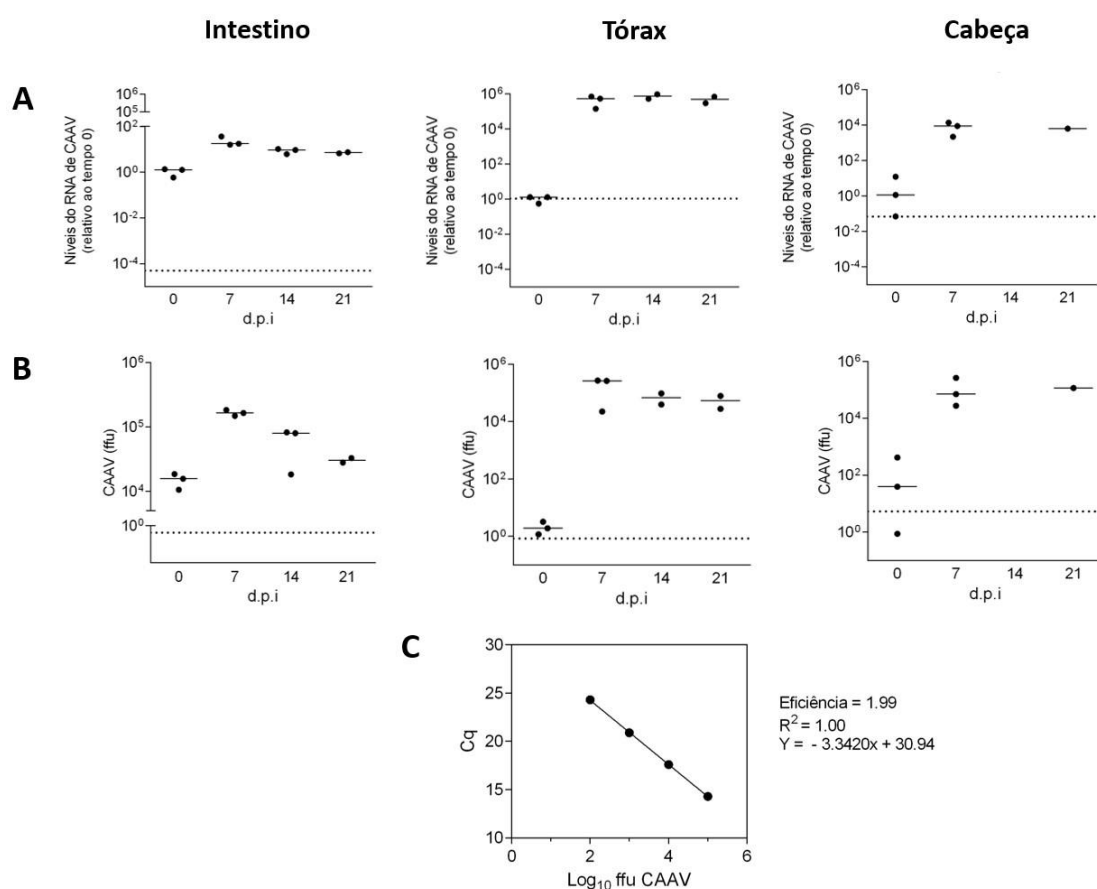


Figura 4.11 - Cinética da infecção por CAAV no intestino, tórax e cabeça de mosquitos *A. albopictus* coletados após 0, 7, 14 e 21 dias. **(A)** Níveis de RNA de CAAV relativos ao tempo 0 e normalizados pelo gene endógeno *RPL32*. **(B)** Quantificação de ffu de CAAV por *pool* de mosquito. **(C)** Curva padrão utilizada para quantificação de ffu em B. As barras horizontais em **A** e **B** representam as medianas de cada tempo. As linhas tracejadas representam os valores de corte estabelecidos a partir do MOCK.

A análise dos *pools* de mosquitos em 0 d.p.i. indica que nesse tempo o vírus foi detectado sobretudo no intestino (Figura 4.11 A e B). As amostras do tórax apresentaram valores iguais ou muito próximos ao valor de corte e, portanto, foram

identificadas como negativas. Na cabeça, duas amostras apresentaram valores acima e uma abaixo do valor de corte. Possivelmente, o RNA viral detectado na cabeça destes mosquitos representa um resquício da alimentação. Já no intestino, o RNA viral detectado foi visivelmente maior que o valor de corte e é indicativo do inóculo ingerido. A quantificação absoluta no intestino nesse tempo resultou em uma média de $1,5 \times 10^4$ ffu de CAAV por *pool* (Figura 4.11 B).

Após 7 dias, foi observado no intestino um aumento de ao menos 10 vezes nos níveis relativos de RNA de CAAV (Figura 4.11 A), evidenciado também pelos cálculos de quantificação absoluta que indicaram média de $1,6 \times 10^5$ ffu por *pool*. Nesse tempo, também houve detecção do vírus no tórax e cabeça, sugerindo que houve uma disseminação da infecção do intestino para outras partes do mosquito. No tórax, observou-se em todos os *pools* um aumento de 10^5 vezes nos níveis RNA de CAAV em relação ao tempo 0 (Figura 4.11 A), com uma carga viral média de $1,8 \times 10^5$ ffu por *pool*. Já na cabeça, observou-se um aumento de 10^3 vezes nos níveis relativos de RNA de CAAV e uma média de $1,2 \times 10^3$ ffu por *pool*.

A partir de 14 d.p.i., houve uma tendência de queda nos níveis relativos de RNA de CAAV no intestino (Figura 4.11 A), com pouca variação entre 14 e 21 d.p.i. e médias de $6,0 \times 10^4$ e $3,0 \times 10^4$ ffu por *pool*, respectivamente. No tórax, a quantificação relativa indicou níveis estáveis de RNA viral entre os tempos 7, 14 e 21 d.p.i. Já a quantificação absoluta mostrou uma queda discreta da carga viral entre 7 e 14 d.p.i. e níveis estáveis entre 14 e 21 d.p.i., com médias de $6,8 \times 10^4$ e $5,3 \times 10^4$ ffu por *pool*, respectivamente (Figura 4.11 B). Na cabeça, não foi possível analisar se houve infecção nos *pools* em 14 d.p.i. e em um dos *pools* de 21 d.p.i. uma vez que não houve amplificação do RNA viral ou do gene endógeno, possivelmente devido a uma limitação técnica no processamento das amostras. No *pool* em 21 d.p.i. em que foi possível analisar a infecção, foram observados níveis de RNA de CAAV semelhantes a 7 d.p.i.

5. DISCUSSÃO

5.1 Produção de anticorpos monoclonais

Em 1975, Köhler e Milstein desenvolveram uma técnica que permite a propagação por tempo indefinido de células secretoras de anticorpos, denominadas hibridomas. Os hibridomas resultam da fusão de células de mieloma com linfócitos B de animais imunizados com um antígeno de interesse, sendo os camundongos os animais mais utilizados para obtenção dessas células (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Os linfócitos B, que naturalmente perdem viabilidade após 2 semanas em cultivo, expressam os genes para secreção de anticorpos enquanto as células de mieloma expressam os genes que viabilizam a propagação contínua em cultivo. Sendo assim, a geração de hibridomas pode ser extremamente vantajosa por permitir a produção de anticorpos de forma praticamente ilimitada. Por envolver etapas de triagem e clonagem, a tecnologia possibilita a obtenção de anticorpos monoespecíficos inclusive a partir da imunização de animais com antígenos complexos ou impuros (GREENFIELD, 2014).

A seleção dos hibridomas baseia-se na utilização de linhagens de mieloma com mutação no gene *HGPRT* e/ou *TK*. Esses genes codificam enzimas essenciais (a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase e timidina quinase, respectivamente) para a produção de nucleotídeos e timidilato por vias de salvamento, que são ativadas quando a via principal chamada *de novo* é bloqueada (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Após a fusão, as células são tratadas com meio contendo drogas antifolato, como a aminopterina, que inibem a via *de novo*. Nessas condições, as células de mieloma morrem em cultivo pois não são capazes de utilizar as vias de salvamento para produção de nucleotídeos e timidilato. Os hibridomas, no entanto, expressam as enzimas HGPRT e TK (proveniente do genoma dos esplenócitos) e sobrevivem em cultivo. Sendo assim, são selecionadas apenas as células híbridas, e essas são triadas para a produção de anticorpos contra o antígeno de interesse (GREENFIELD, 2014).

Desde o desenvolvimento da tecnologia de produção de hibridomas, anticorpos monoclonais têm sido amplamente produzidos para o estudo de arbovirose. A produção de mAbs contra alphavirus se tornou uma abordagem importante para investigar a relação antigênica entre os vírus desse gênero (BLACKBURN; BESSELAAR; GIBSON, 1995; SALEH *et al.*, 2004). Esses reagentes também têm sido

úteis para caracterizar a ação de proteínas virais em etapas do ciclo replicativo e elucidar mecanismos de patogênese viral (ROMAN-SOSA; KIELIAN, 2011; STANLEY *et al.*, 1985). Ademais, inúmeros estudos descrevem a aplicação de mAbs no desenvolvimento de imunoenaios para o diagnóstico e vigilância epidemiológica de alphavirus de importância médica e veterinária (BROWN *et al.*, 2001; TUEKPRAKHON *et al.*, 2018; DAMLE *et al.*, 2016; KANG *et al.*, 2012; ROMERO-VIVAS *et al.*, 1998).

No presente estudo, foram produzidos, caracterizados e purificados anticorpos monoclonais contra um novo alphavirus. Em virtude de sua identificação recente, não há descrição na literatura sobre a produção de mAbs contra o CAAV. Uma vez que a geração de hibridomas permite a produção de quantidades ilimitadas de anticorpos específicos contra o vírus, representa uma alternativa financeiramente mais acessível para o estudo de CAAV que o uso de anticorpos adquiridos comercialmente.

Uma etapa importante na produção de hibridomas é o preparo do antígeno. A imunização dos animais pode ser realizada com diversos compostos, como proteínas e peptídeos purificados ou parcialmente purificados, células e vírus (STAHL *et al.*, 1983). Embora seja possível obter anticorpos específicos contra um antígeno a partir de misturas complexas ou impuras, de modo geral, a purificação de antígenos aumenta a especificidade da resposta imune e a frequência de hibridomas que secretam o anticorpo de interesse (LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005; YOKOYAMA *et al.*, 2006).

O protocolo de purificação viral utilizado no presente trabalho, no entanto, não eliminou todos os contaminantes celulares presentes na suspensão viral, como evidenciado pela reatividade do soro pós-imune dos camundongos contra as células não infectadas (Figura 4.1). A linhagem celular C6/36, além de usada nos protocolos de IFI para avaliação do soro e triagem de hibridomas, foi utilizada na produção dos estoques virais usados nas imunizações. Sendo assim, possivelmente os componentes celulares que permaneceram na suspensão contendo as partículas virais foram imunogênicos. Já foi reportado que algumas impurezas, mesmo que presentes em quantidades pequenas (<1%) podem ser imunodominantes, resultando na produção de anticorpos contra epítomos indesejados (LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005). Apesar de ser ter observado uma resposta imune contra os componentes celulares no soro pós-imune, as etapas de triagem permitiram a obtenção de hibridomas secretores de anticorpos específicos anti-CAAV.

O protocolo de imunização representa outro aspecto que tem forte influência nas características dos anticorpos obtidos. Frequentemente, protocolos com baixo número de doses (1-2) resultam na obtenção de anticorpos com afinidade mais baixa que protocolos com número maior de doses, como o usado no presente estudo (GUSTAFSSON, 1990). Geralmente, intervalos mais longos entre as doses também resultam na produção de anticorpos com maior afinidade pois menos antígenos estarão presentes por um longo tempo após a imunização, resultando na circulação apenas de células com maior afinidade (YOKOYAMA *et al.*, 2006). No caso de compostos pouco imunogênicos, é comum o uso de adjuvantes nas imunizações para desencadear uma resposta mais potente (LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005).

O processo de fusão gerou 1574 poços que apresentaram crescimento de hibridomas e a etapa de triagem resultou inicialmente em 118 poços positivos para a produção de anticorpos contra o vírus. O rendimento e sucesso da fusão é influenciado por inúmeras variáveis, como o agente fusogênico escolhido, o protocolo de mistura de células, a proporção de células de mieloma e esplenócito usada, os tampões e meios utilizados e o tempo de fusão (IGARASHI; BANDO, 1990, LAMBERT, 1997). O tempo de retirada do baço após a última dose também é um fator que afeta o sucesso da fusão e a proporção de hibridomas secretores de anticorpos gerados. O tempo considerado ideal é em torno de três dias após a última dose, pois nesse período há uma maior frequência de células B antígeno-específicas no baço (STAHL *et al.*, 1983; YOKOYAMA *et al.*, 2006).

O número de poços positivos após a triagem correspondeu a 7,5% e 6% dos hibridomas triados e gerados, respectivamente. Essa proporção encontra-se acima da porcentagem esperada, a qual é estimada entre <1-5% (YOKOYAMA *et al.*, 2006). A taxa de hibridomas positivos acima do esperado também foi obtida em outros estudos realizados pelo grupo, a exemplo de Zanluca *et al.* (2014) que observaram uma taxa de 13% de hibridomas produtores de anticorpos contra DENV.

Durante as etapas de expansão do cultivo e criopreservação, muitos hibridomas deixaram de apresentar crescimento ou cessaram a secreção de anticorpos. Fatores extrínsecos como as condições de cultivo e fatores intrínsecos como a instabilidade genética dos hibridomas podem afetar significativamente o crescimento, viabilidade e eficiência da produção de anticorpos dessas células.

O processo de fusão dos esplenócitos com as células de mieloma gera inicialmente um hibridoma com heterocarion instável. Durante as divisões celulares seguintes, perdas cromossômicas podem ocorrer durante a segregação até ocorrer a

estabilização do genoma do hibridoma, o qual tipicamente apresenta número de cromossomos ligeiramente menor do que a soma das células parentais (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Se as perdas cromossômicas envolverem os genes marcadores de seleção para o meio de cultivo HAT, o hibridoma perde a viabilidade (GREENFIELD, 2014; TAGGART; SAMLOFF, 1983). A estabilização dos hibridomas ocorre entre 20 e 30 dias após a fusão, e até então pode ocorrer uma grande variabilidade no crescimento dos hibridomas, como foi observado no presente trabalho (NELSON, 2000).

A reorganização dos cromossomos durante a estabilização dos hibridomas também pode acarretar na perda dos genes responsáveis pela expressão das cadeias leves e/ou pesadas das imunoglobulinas (TAGGART; SAMLOFF, 1983). Estima-se que cerca de 50% dos hibridomas inicialmente positivos sofrem perdas cromossômicas que interrompem a secreção de anticorpos (CLARK; MILSTEIN, 1981). Fenotipicamente, esse fenômeno pode ser observado pela diminuição dos títulos de anticorpos no sobrenadante ao longo do tempo (GREENFIELD, 2014). Antes da etapa de clonagem, esse fenótipo também pode ser ocasionado pela presença de células híbridas que não secretam anticorpos e crescem de modo acelerado, em detrimento dos hibridomas que produzem o anticorpo desejado (YOKOYAMA *et al.*, 2006).

Condições de cultivo como a suplementação do meio, pH e tensão de oxigênio também afetam diretamente o crescimento dessas células e a produção de anticorpos (MCCULLOUGH; SPIER, 2009). De modo geral, células híbridas possuem altas taxas de consumo de glicose e glutamina e, portanto, esses nutrientes podem ser fatores limitantes para o crescimento celular (FITZPATRICK; JENKINS; BUTLER, 1993). Já foi demonstrado que a privação de glicose no meio cultivo de hibridomas e, similarmente, baixas concentrações de glutamina desencadeiam o processo de morte celular por apoptose (YEO *et al.*, 2006). A presença de hibridomas em apoptose afeta diretamente as células viáveis próximas, exercendo um efeito inibitório sobre a produção de anticorpos (GREGORY *et al.*, 2009).

Neste trabalho, embora muitos hibridomas inicialmente positivos tenham cessado a produção de anticorpos ou perdido a viabilidade em cultivo, foi possível obter três hibridomas estáveis produtores de anticorpos anti-CAAV (Figura 4.2). A partir desses hibridomas, foram gerados 15 mAbs dos quais dois (5F4/F6/A10 e 5F4/H6/D6) foram caracterizados. Os resultados demonstraram que os mAbs são

reagentes promissores para uso em técnicas como IFI e citometria de fluxo para estudos de caracterização de CAAV.

Embora diversas linhagens celulares de vertebrados sejam refratárias à infecção por CAAV, análises em culturas primárias de PBMC por citometria de fluxo sugerem que essas células são susceptíveis à infecção *in vitro* (TSCHA *et al.*, 2019). Sendo assim, estudos adicionais são necessários para melhor elucidar a susceptibilidade de células humanas à infecção por CAAV, para esclarecer as células alvo do hospedeiro durante seu ciclo de transmissão na natureza. O mAb 5F4/F6/A10 produzido no presente trabalho se mostrou promissor para essa finalidade, uma vez que foi avaliado por citometria de fluxo e teve desempenho comparável ao anticorpo alphavirus comercial específico utilizado como controle (Figura 4.5).

O monitoramento da circulação de CAAV em espécies vetores na natureza também representa um aspecto importante para caracterizar a transmissão do vírus. Nesse sentido, diversos estudos demonstram que mAbs representam insumos promissores e acessíveis para esse fim. A aplicação de mAbs na vigilância dos alphavirus EEEV e Highlands J Virus (HJV) foi explorada por Brown *et al.* (2001) e Hildreth e Beaty (1984), através do desenvolvimento de ensaios de EIA (ensaio imunoenzimático) para detecção viral em mosquitos. Testes de ELISA de captura e IFI foram usados por Arunachalam *et al.* (2009) para avaliar a prevalência do vírus da encefalite japonesa (JEV) em diferentes espécies de mosquitos na Índia. O desenvolvimento de ensaio de IFI também foi demonstrado por Romero-Vivas *et al.* (1998), que realizaram a detecção e identificação de sorotipos de DENV em mosquitos coletados em região endêmica usando mAbs sorotipo-específicos. Uma vez que as espécies vetores de CAAV assim como sua circulação na região de Marilena são pouco descritas, os mAbs anti-CAAV obtidos no presente trabalho podem ser aplicados para melhor caracterizar sua dinâmica de transmissão na natureza.

Os mAbs produzidos neste estudo não apresentaram reatividade cruzada contra os alphavirus CHIKV, MAYV, AURAV e VEEV (Figura 4.3). A especificidade representa uma característica importante para as aplicações citadas, já que há uma intensa co-circulação de arbovírus no país e, especificamente, na região em que o CAAV foi isolado (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; TSCHÁ *et al.*, 2019). Diante da possibilidade do CAAV ser associado com a manifestação de doenças em humanos, a disponibilidade de reagentes para detecção do vírus de forma específica também é crucial para o desenvolvimento de testes diagnósticos.

Considerando-se a incidência de CAAV em regiões endêmicas para outros arbovirus e o pouco conhecimento sobre suas espécies vetores, é possível que nessas regiões sejam detectados mosquitos co-infectados. Já foi sugerido por diversos autores que co-infecções possivelmente podem alterar a competência vetorial e conseqüentemente, a dinâmica de transmissão de arboviroses (BOLLING *et al.*, 2015; COUPANEC *et al.*, 2017). Estudos com células de *A. albopictus* demonstraram que a infecção prévia com o alphavirus EILV (inseto-específico) reduziu entre 10 e 10.000 vezes o título da infecção pelos arbovirus SINV, VEEV, EEEV, WEEV e CHIKV. A infecção prévia de mosquitos *Aedes aegypti* com EILV retardou a disseminação de CHIKV do intestino médio para outros órgãos e tecidos (NASAR *et al.*, 2015). Sendo assim, os mAbs gerados nesse estudo podem ser úteis para investigar se co-infecções com CAAV e arbovirus de importância médica alteram a dinâmica de replicação desses vírus em modelo de mosquitos.

Em síntese, anticorpos monoclonais são ferramentas valiosas para estudos de caracterização viral. Os mAbs produzidos no presente trabalho reconhecem de maneira específica o vírus Caaingua e podem ser aplicados em inúmeras técnicas como IFI, citometria de fluxo, ELISA, entre outras. Portanto, representam insumos promissores para melhor elucidar a transmissão de CAAV na natureza, seu papel epidemiológico e relevância para saúde pública.

5.2 Infecção de mosquitos *A. albopictus* por CAAV

A emergência de arboviroses é fortemente afetada pelas interações entre os vírus e seus vetores. Esse fenômeno pode ser exemplificado pela epidemia de CHIKV em 2004, onde a ocorrência de uma mutação na proteína E1 do vírus favoreceu sua transmissão por mosquitos *Aedes albopictus* em regiões onde o principal vetor (*A. aegypti*) é pouco encontrado, como a Ilha da Reunião (LAMBALLERIE *et al.*, 2008). Eventos como esses destacam o impacto da competência vetorial de mosquitos na ocorrência de epidemias e reforçam a importância de estudos para caracterizar as interações entre vírus e seus vetores.

Mosquitos *Aedes albopictus* representam uma das espécies mais invasivas do mundo. Originária do sudeste asiático, a espécie se dispersou rapidamente nas últimas décadas, impulsionada por eventos de migração e pelo aumento do comércio global (PAUPY *et al.*, 2009). Atualmente, a espécie colonizou todos os continentes, com exceção da Antártica. No Brasil, a presença desses mosquitos foi relatada pela

primeira vez em 1986 no Rio de Janeiro e desde então, foi registrada em quase todos estados do território nacional (SANTOS, 2003).

O impacto dos mosquitos *A. albopictus* na saúde pública advém de seu papel como vetor para arboviroses de grande importância médica, como DENV e CHIKV (LAMBALLERIE *et al.*, 2008; PAUPY *et al.*, 2009). Embora seu impacto na ecologia e transmissão de outras arboviroses ainda não esteja claro, estudos em laboratório demonstraram que mosquitos dessa espécie são capazes de transmitir ao menos 26 arbovirus. Além disso, muitos arbovirus foram detectados ou isolados a partir de mosquitos coletados em campo, como como EEEV, WNV e JEV (PAUPY *et al.*, 2009).

O presente estudo avaliou a replicação e disseminação de CAAV em mosquitos da espécie *Aedes albopictus*. O vírus Caaingua foi recentemente identificado durante um surto de doença artrítogênica de etiologia desconhecida no município de Marilena PR, sendo isolado a partir de *pools* de mosquitos coletados na região (TSCHÁ *et al.*, 2019). Embora o vírus não tenha sido incriminado como o agente etiológico do surto, estudos para caracterizar sua replicação em espécies vetores podem contribuir para a elucidação de seu papel epidemiológico.

Para avaliar a susceptibilidade de *A. albopictus* à infecção por CAAV, no primeiro experimento mosquitos da espécie foram alimentados com o vírus e a detecção do RNA viral foi realizada por RT-qPCR após 0, 4, 7, 14 e 21 dias. A técnica de RTq-PCR é amplamente usada para a detecção de ácidos nucleicos devido à sua alta sensibilidade, rapidez e especificidade (MACKAY, 2002). Diante dessas vantagens, inúmeros estudos de competência vetorial a utilizam para avaliar a cinética da replicação viral em espécies de mosquitos (ARIAS-GOETA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2017; TESLA *et al.*, 2018).

Os resultados do presente trabalho sugerem que mosquitos *A. albopictus* são susceptíveis à infecção por CAAV. No primeiro experimento, houve detecção do vírus em todas amostras e tempos analisados (0, 4, 7, 14, 21 e d.p.i), apontando um sucesso de infecção em 100% das amostras testadas (Figura 4.10). A partir de 7 d.p.i, foi observada uma alta variabilidade nos níveis de RNA de CAAV dentro dos grupos, com mosquitos apresentando níveis semelhantes a 0 d.p.i e mosquitos apresentando níveis até 30 vezes maior que a média de 0 d.p.i. (Figura 4.10 A). Essa variação aponta para a existência de diferentes níveis de resistência e susceptibilidade à infecção dentro da população analisada. Estudos com infecção por DENV em populações homogêneas de *A. aegypti* observaram que em condições iguais de repasto sanguíneo foram identificados mosquitos infectados e resistentes, indicando

que variações de suscetibilidade podem ocorrer não apenas a nível de população, mas também a nível individual (OLMO, 2015).

É importante destacar que no tempo 0 a detecção do RNA viral é reflexo da alimentação dos mosquitos, não sendo possível diferenciar quais foram realmente infectados uma vez que o inóculo viral ainda não foi digerido. Nesse tempo, houve baixa variabilidade entre as amostras nos níveis de RNA viral detectados (Figura 4.10 A e B), indicando que todos mosquitos se alimentaram com volumes próximos e, portanto, com títulos virais semelhantes. A quantificação da carga viral por RT-qPCR sugere que a dose ingerida foi de aproximadamente 1×10^4 ffu por mosquito. Embora essa análise não seja uma medida direta dos títulos virais, diversos estudos mostram uma correlação positiva entre a detecção do RNA viral com a presença de partículas infecciosas (OLMO, 2015; FALSEY *et al.*, 2003; SANTHOSH *et al.*, 2007).

Após alimentação, inicia-se a digestão do sangue. Embora a duração da digestão possa variar de acordo com a espécie e população de mosquitos, estudos com DENV, ZIKV e CHIKV indicam que em *A. albopictus* o sangue virêmico é completamente digerido entre 2 e 4 dias após alimentação (DONG *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2013). Portanto, a detecção do RNA de CAAV a partir de 4 d.p.i deve ser proveniente da replicação viral, apontando para uma infecção produtiva. Sendo assim, a amplificação do RNA viral observada no primeiro experimento até 21 d.p.i sugere que mosquitos *A. albopictus* sejam suscetíveis à infecção por CAAV (Figura 4.10 A e B).

A susceptibilidade à infecção é apenas um dos fatores associados à competência vetorial. Espécies de mosquito competentes não são apenas suscetíveis, mas são capazes de sustentar a replicação viral de forma persistente e transmitir o vírus. Para que isso ocorra, o vírus ingerido pela alimentação do vetor deve se replicar no intestino, se disseminar em órgãos secundários e finalmente infectar as glândulas salivares para que seja transmitido através da saliva ao hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo (HARDY *et al.*, 1983). Durante esse processo, o vírus pode ter impedimentos de se dispersar nos tecidos por barreiras biológicas presentes nos órgãos dos mosquitos, como barreiras de infecção e escape do intestino (MIB e MEB), barreiras de infecção das glândulas salivares (SGIB) e, em casos esporádicos, barreiras de escape das glândulas salivares (SGEB) (FRANZ *et al.*, 2015). Sendo assim, para caracterizar a disseminação da infecção por CAAV em *A. albopictus*, no segundo experimento mosquitos foram infectados por via oral e foram dissecados em intestino, tórax e cabeça nos tempos em 0, 7, 14 e 21 d.p.i. (Figura 4.11).

Após a alimentação, o sangue virêmico é direcionado ao lúmen intestinal, que representa o primeiro órgão alvo da infecção. Portanto, para que ocorra a infecção sistêmica no mosquito, as partículas virais devem ser capazes de infectar as células epiteliais do intestino antes da secreção da matriz peritrófica durante a digestão (FRANZ *et al.*, 2015). No presente estudo, houve detecção de CAAV no intestino não apenas em 0 d.p.i., indicando que os mosquitos ingeriram sangue virêmico, mas também em todos os *pools* dos tempos posteriores analisados (7, 14 e 21 d.p.i.) sugerindo que o vírus foi capaz de ultrapassar as barreiras biológicas presentes nesse órgão para estabelecer uma infecção produtiva (Figura 4.11 A e B).

Por constituir a primeira barreira à infecção, o intestino pode apresentar um papel importante na determinação da suscetibilidade à infecção e, conseqüentemente, na capacidade de transmissão viral. Estudos com CHIKV observaram que a variante do vírus (E1-226V) associada à maior transmissão por *A. albopictus* apresentou maior infectividade no intestino e disseminação em mosquitos dessa espécie do que a variante E1-226A, cuja transmissão ocorre majoritariamente pela espécie *A. aegypti*. Quando as variantes do vírus foram inoculadas pela via intratorácica ao invés de por via oral, as diferenças não foram mais observadas, demonstrando o papel da barreira do intestino na seleção da variante emergente E1-226V (ARIAS-GOETA *et al.*, 2013).

A análise dos *pools* de mosquitos coletados a partir de 7 dias após infecção com CAAV indicou a presença do vírus no tórax e na cabeça, apontando para a disseminação da infecção do intestino (Figura 4.11 A e B). Diversos estudos demonstram que esse fenômeno pode ser fortemente influenciado por fatores como a temperatura e a carga viral do inóculo. Estudos de infecção por DENV-2 em *A. albopictus* mostraram que em temperaturas baixas (18°C) a proporção de mosquitos infectados foi menor que em temperaturas maiores e não houve disseminação da infecção para órgãos secundários (LIU *et al.*, 2017). Já na infecção por ZIKV em *A. aegypti*, foi observado que a dose mínima para a ocorrência de disseminação da infecção foi de 10^4 ffu/ml. Além disso, doses maiores não apenas aumentaram a proporção de mosquitos com infecção disseminada, mas também diminuíram o tempo em que ocorreu a disseminação (TESLA *et al.*, 2018). Uma vez que no presente estudo foram utilizados títulos virais fixos para a infecção dos mosquitos, ainda precisamos determinar se diferentes doses de inóculo poderiam afetar a dinâmica de disseminação da infecção de mosquitos *A. albopictus* por CAAV.

A detecção do RNA viral de CAAV na cabeça dos mosquitos a partir de 7 dias é indicativo de que a infecção viral possivelmente tenha se disseminado nas glândulas

salivares. Dubrulle *et al.* (2009) avaliaram a disseminação da infecção de CHIKV em *A. albopictus* e *A. aegypti* e observaram uma forte correlação entre a presença do vírus na cabeça por IFI e sua excreção na saliva, que foi detectada a partir de 2 d.p.i. A infecção das glândulas salivares é um parâmetro crucial para avaliar o potencial de transmissão do vírus e seu período de incubação extrínseco (PIE), já que a transmissão ocorre através da saliva durante o repasto sanguíneo (FRANZ *et al.*, 2015). Uma vez que diversos alphavirus como CHIKV e VEEV apresentam PIE curtos como 2 d.p.i em mosquitos do gênero *Aedes* (DUBRULLE *et al.*, 2009; GAIDAMOVICH *et al.*, 1973), a análise da infecção por CAAV em intervalos entre 0 e 7 d.p.i. é importante para definir o tempo preciso para o vírus infectar a cabeça e, potencialmente, as glândulas salivares.

É importante destacar que já foi demonstrada a existência de *SGIB* em populações de mosquitos *A. albopictus* para vírus como ZIKV, em que foi observada infecção disseminada, porém sem atingir as glândulas salivares (HERNÁNDEZ-TRIANA *et al.*, 2019). Além disso, em alguns casos, a capacidade do vírus de ultrapassar *SGIB* pode ser dependente do título viral alcançado nos outros órgãos (FRANZ *et al.*, 2015; KRAMER *et al.*, 1981). Sendo assim, a infecção das glândulas salivares por CAAV em mosquitos *A. albopictus* ainda deve ser confirmada com a dissecação desses órgãos para detecção do vírus diretamente nas glândulas salivares e através da coleta da saliva.

Embora o RNA de CAAV tenha sido detectado na cabeça e tórax em todos os *pools* de mosquitos e tempos analisados a partir de 7 d.p.i., a análise dos mosquitos agrupados em *pools* representa uma limitação do trabalho, uma vez que os níveis de RNA viral observados podem não ser representativos de todos os mosquitos do *pool*. Sendo assim, estudos adicionais com a análise individual dos mosquitos são necessários para definir de modo mais preciso a taxa de disseminação da infecção (proporção de mosquitos com infecção disseminada pelo total de mosquitos com intestinos infectados).

A presença do RNA de CAAV em até 21 d.p.i pode ser indicativo de que o vírus é capaz de estabelecer uma infecção persistente nos mosquitos, característica considerada importante na relação entre os arbovirus e seus vetores. Ao contrário do que ocorre em humanos, com a manifestação frequente de doenças severas, a infecção viral em vetores não gera efeitos significativos na sobrevivência dos mesmos e de modo geral, mosquitos são considerados tolerantes à infecção (CHENG *et al.*, 2016; LAMBRECHTS; SALEH, 2019). No contexto da infecção viral em mosquitos,

essa tolerância representa um atributo essencial para esses invertebrados serem vetores eficientes. A replicação viral sem afetar a sobrevivência do mosquito assegura a transmissão eficiente do vírus. Nesse contexto, diversos mecanismos que possam contribuir para a tolerância foram descritos em modelos de *Drosophila melanogaster* e em mosquitos do gênero *Aedes*. Entre eles, as vias de RNA de interferência (RNAi) possuem um papel fundamental na imunidade antiviral de mosquitos, modulando a replicação viral a níveis não patogênicos para o mosquito, porém que ainda permitem a transmissão do vírus (OLIVEIRA *et al.*, 2020; LAMBRECHTS; SALEH, 2019; GOULD *et al.*, 2010).

O presente trabalho representa primeiro estudo realizado para caracterizar a replicação do vírus Caaingua em espécies de mosquitos vetores. De modo geral, as análises sugerem que mosquitos *A. albopictus* são susceptíveis à infecção por CAAV, e esta infecção não apenas é sustentada no intestino, mas se dissemina para órgãos secundários e para a cabeça. Estudos adicionais são necessários para avaliar a infecção das glândulas salivares e confirmar a competência vetorial de mosquitos dessa espécie na transmissão de CAAV.

6. CONCLUSÕES

- Foram produzidos 3 hibridomas secretores de anticorpos contra CAAV (5F4, 8A11 e 7D11);
- A partir do hibridoma 5F4, foram obtidos quinze mAbs anti-CAAV, dos quais dois foram caracterizados (5F4/F6/A10 e 5F4/H6/D6);
- Ambos os mAbs 5F4/F6/A10 e 5F4/H6/D6 são do isotipo IgG2a com cadeia leve *kappa* e não apresentaram reatividade cruzada contra os alphavirus CHIKV, MAYV, VEEV e AURAV;
- O mAb 5F4/F6/A10 apresentou desempenho semelhante a um anticorpo comercial alphavirus específico em ensaio de citometria de fluxo;
- Os ensaios de RT-qPCR sugerem que mosquitos da espécie *A. albopictus* foram suscetíveis à infecção por CAAV, sendo o RNA viral detectado até 21 dias após a infecção;
- Os ensaios de RT-qPCR sugerem que a infecção por CAAV em mosquitos *A. albopictus* é capaz de se disseminar do intestino para a cabeça e tórax em até 7 dias após a infecção.

7. PERSPECTIVAS

- Caracterizar os alvos proteicos dos mAbs anti-CAAV através de ensaios de *western blotting* e/ou imunoprecipitação;
- Conjugar os mAbs anti-CAAV com corantes fluorescentes ou com a enzima peroxidase para utilização em ensaios de citometria de fluxo e/ou IFI e em ensaios imunoenzimáticos, respectivamente;
- Avaliar atividade neutralizante dos mAbs anti-CAAV;
- Infectar *A. albopictus* com diferentes concentrações de CAAV para avaliar se há uma relação de dose-dependência na incidência da infecção;
- Realizar a dissecação das glândulas salivares, bem como a coleta da saliva de mosquitos *A. albopictus* infectados por CAAV para avaliar a presença do vírus e seu potencial de transmissão pela espécie;
- Avaliar individualmente por RT-qPCR a presença do vírus no intestino, cabeça e tórax de mosquitos infectados para determinar as taxas de infecção, disseminação e competência vetorial;
- Realizar a titulação por imunodeteção de foco de mosquitos infectados para confirmar a produção de partículas infectivas e os títulos virais;
- Avaliar a infecção por CAAV e competência vetorial em outras espécies de mosquitos, a exemplo de mosquitos do gênero *Culex*;
- Realizar nova coleta de mosquitos na cidade de Marilena (PR) para avaliar a circulação do CAAV na região.

8. REFERÊNCIAS

- A TSETSARKIN, Konstantin *et al.* Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. **Current Opinion In Virology**, v. 1, n. 4, p.310-317, 2011.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2003.
- AGBOLI *et al.* Mosquito-Specific Viruses—Transmission and Interaction. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 873-899, 2019.
- ANDREWES, C.H.. Factors in Virus Evolution. **Advances In Virus Research**, p. 1-24, 1957.
- ARIAS-GOETA, Camilo *et al.* Dissemination and Transmission of the E1-226V Variant of Chikungunya Virus in *Aedes albopictus* Are Controlled at the Midgut Barrier Level. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. 57548-57549, 2013.
- ARUNACHALAM, N. *et al.* Longitudinal Studies of Japanese Encephalitis Virus Infection in Vector Mosquitoes in Kurnool District, Andhra Pradesh, South India. **Journal Of Medical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 633-639, 2009.
- BATOVSKA, Jana *et al.* Coding-Complete Genome Sequence of Yada Yada Virus, a Novel Alphavirus Detected in Australian Mosquitoes. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 2, p. 01476-01479, 2020.
- BERGE, T.; BANKS, I.; TIGERTT, W. Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea-pig heart cells. **American journal of hygiene**, v. 73, p. 209–218, 1961.
- BLACKBURN, N.K.; BESSELAAR, T.G.; GIBSON, G.. Antigenic relationship between chikungunya virus strains and o'nyong nyong virus using monoclonal antibodies. **Research In Virology**, v. 146, n. 1, p. 69-73,1995.
- BOLLING, Bethany *et al.* Insect-Specific Virus Discovery: significance for the arbovirus community. Significance for the Arbovirus Community. **Viruses**, v. 7, n. 9, p. 4911-4928, 2015.
- BOLLING, Bethany G. *et al.* Insect-Specific Flaviviruses from *Culex* Mosquitoes in Colorado, with Evidence of Vertical Transmission. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 85, n. 1, p. 169-177, 2011.
- BOLLING, Bethany G. *et al.* Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. **Virology**, v. 427, n. 2, p. 90-97, 2012.
- BROWN, T M *et al.* Detection of eastern equine encephalitis virus in infected mosquitoes using a monoclonal antibody-based antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 65, n. 3, p. 208-213, 2001.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. *In*: MONATH, TP (ed.). **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. CRC Press, 1988. v. 1, p. 19-57.

CASSADOU, S *et al.* Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20752-20760, 2014.

CHANG, T J *et al.* Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. **Oncology Reports**, p. 1-10, 1998.

CHEN, Rubing *et al.* **ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae**. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 6, p.761-762, 2018.

CHENG, Gong *et al.* Mosquito Defense Strategies against Viral Infection. **Trends In Parasitology**, v. 32, n. 3, p. 177-186, 2016.

CLARK, M. R.; MILSTEIN, C.. Expression of spleen cell immunoglobulin phenotype in hybrids with myeloma cell lines. **Somatic Cell Genetics**, v. 7, n. 6, p. 657-666, 1981.

COOK, Shelley *et al.* Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. **Journal Of General Virology**, v. 93, n. 2, p. 223-234, 2012.

COUPANEC, Alain Le *et al.* Co-Infection of Mosquitoes with Chikungunya and Dengue Viruses Reveals Modulation of the Replication of Both Viruses in Midguts and Salivary Glands of *Aedes aegypti* Mosquitoes. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1708, 2017.

DAMLE, R. G. *et al.* Diagnostic potential of monoclonal antibodies against the capsid protein of chikungunya virus for detection of recent infection. **Archives Of Virology**, v. 161, n. 6, p. 1611-1622, 2016.

DENNEHY, John J.. Evolutionary ecology of virus emergence. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 1389, n. 1, p. 124-146, 2016.

DEPERASINSKA, Izabela; SCHULZ, Patrycja; SIWICKI, Andrzej K.. Salmonid alphavirus (SAV). **Journal Of Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p.1-6, 2018.

DESPRÈS, P.; FRENKIEL, M.P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, v. 196, n. 1, p. 209–219, 1993.

DONG, Shengzhang *et al.* Chikungunya virus dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* is associated with temporal basal lamina degradation during bloodmeal digestion. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1-10, 2017.

DRAKE, J. W.. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 90, n. 9, p. 4171-4175, 1993.

DUBRULLE, Mathieu *et al.* Chikungunya Virus and *Aedes* Mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. **Plos One**, v. 4, n. 6, p. 5895-5896, 2009.

DZAKI, Najat; AZZAM, Ghows. Assessment of *Aedes albopictus* reference genes for quantitative PCR at different stages of development. **Plos One**, v. 13, n. 3, p. e0194664, 2018.

ELENA, Santiago F.; SANJUÁN, Rafael. Virus Evolution: insights from an experimental approach.: Insights from an Experimental Approach. **Annual Review Of Ecology, Evolution, And Systematics**, v. 38, n. 1, p. 27-52, 2007.

ERASMUS, Jesse H *et al.* A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. **Nature Medicine**, v. 23, n. 2, p. 192-199, 2016.

ERASMUS, Jesse H. *et al.* Novel insect-specific Eilat virus-based chimeric vaccine candidates provide durable, mono- and multi-valent, single dose protection against lethal alphavirus challenge. **Journal Of Virology**, p. 01274-17, 2017.

ERASMUS, Jesse H. *et al.* Utilization of an Eilat Virus-Based Chimera for Serological Detection of Chikungunya Infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 0004119-19, 2015.

ERASMUS, Jesse H.; WEAVER, Scott C.. Biotechnological Applications of an Insect-Specific Alphavirus. **Dna And Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 1045-1049, 2017.

FALSEY, A. R. *et al.* Comparison of Quantitative Reverse Transcription-PCR to Viral Culture for Assessment of Respiratory Syncytial Virus Shedding. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4160-4165, 2003.

FITZPATRICK, L.; JENKINS, H. A.; BUTLER, M.. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 93-116, 1993.

FORRESTER, N. L. *et al.* Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. **Journal Of Virology**, v. 86, n. 5, p. 2729-2738, 2011.

FRANZ, Alexander *et al.* Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 7, p.3741-3767, 2015.

GAIDAMOVICH, Sophia Ya. *et al.* Immunofluorescent Staining Study of the Salivary Glands of Mosquitoes Infected with Group A Arboviruses. **Intervirology**, v. 1, n. 3, p. 193-200, 1973.

GERBERG, E. J; BARNARD, D. R.; WARD, R. A. **Manual for mosquito rearing and experimental techniques**. 5. ed. American Mosquito Control Association, Inc., 1970.

GOULD, E.A. *et al.* Understanding the alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 111-124, 2010.

GOULD, E.A; Clegg, J.C.S. Growth, titration and purification of togaviruses. In: Mahy BVJ (ed). **Virology: a practical approach**. Oxford University Press, 1986, p. 43-88.

- GOULD, E.A. *et al.* Emerging arboviruses: Why today?. **One Health**, v. 4, p.1-13, 2017.
- GREENFIELD, Edward A.. Generating Monoclonal Antibodies. In: GREENFIELD, Edward A.. **Antibodies: A Laboratory Manual**. 2. ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014. Cap. 7. p. 201-221.
- GREGORY, Christopher D. *et al.* Inhibitory effects of persistent apoptotic cells on monoclonal antibody production in vitro. **Mabs**, v. 1, n. 4, p. 370-376, 2009.
- GRIFFIN, Diane E.. Alphaviruses. In: KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M.. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. Cap. 23. p. 651-686.
- GUBLER, Duane J.; CLARK, Gary G.. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: the emergence of a global health problem. : The Emergence of a Global Health Problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55-57,1995.
- GUSTAFSSON, Björn. Immunizing Schedules for Hybridoma Production. **Animal Cell Culture**, p. 597-600, 1990.
- HADDOW, Andrew D. *et al.* First isolation of Aedes flavivirus in the Western Hemisphere and evidence of vertical transmission in the mosquito Aedes (Stegomyia) albopictus (Diptera: culicidae). **Virology**, v. 440, n. 2, p. 134-139, 2013.
- HARDY, J L *et al.* Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. **Annual Review of Entomology**, v. 28, n. 1, p.229-262, 1983.
- HERMANNNS, Kyra *et al.* Agua Salud alphavirus defines a novel lineage of insect-specific alphaviruses discovered in the New World. **Journal of General Virology**, v. 101, n. 1, p.96-104, 2020.
- HERMANNNS, Kyra *et al.* Discovery of a novel alphavirus related to Eilat virus. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p.43-49, 2017.
- HERNÁNDEZ-TRIANA, Luis M. *et al.* Evidence for infection but not transmission of Zika virus by Aedes albopictus (Diptera: culicidae) from Spain. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2019.
- HILDRETH, Stephen W.; BEATY, Barry J.. Detection of Eastern Equine Encephalomyelitis Virus and Highlands J Virus Antigens within Mosquito Pools by Enzyme Immunoassay (EIA). **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 33, n. 5, p. 965-972, 1984.
- HOLMES, Edward C.. The Evolutionary Genetics of Emerging Viruses. **Annual Review Of Ecology, Evolution, And Systematics**, v. 40, n. 1, p. 353-372, 2009.
- HULO, Chantal *et al.* ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 1, p. 576-582, 2010.

IGARASHI, Muneo; BANDO, Yuki. Enhanced efficiency of cell hybridization by neuraminidase treatment. **Journal Of Immunological Methods**, v. 135, n. 1-2, p.91-93, 1990.

JOSE, Joyce; SNYDER, Jonathan e; KUHN, Richard J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiology**, v. 4, n. 7, p.837-856, 2009.

JUPP, P G. *Culex theileri* and Sindbis virus; salivary glands infection in relation to transmission. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v., n., p. 374-376, 1985.

KANG, Xiaoping *et al.* Development of an ELISA-array for simultaneous detection of five encephalitis viruses. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 56-60, 2012.

KAUR, Gurvinder; DUFOUR, Jannette M.. Cell lines. **Spermatogenesis**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2012.

KENT, Rebekah J.; CRABTREE, Mary B.; MILLER, Barry R.. Transmission of West Nile Virus by *Culex quinquefasciatus* Say Infected with *Culex* Flavivirus Izabal. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, p. 671-690, 2010.

KING, Andrew M.Q.; ADAMS, Michael J.; CARSTENS, Eric B.; LEFKOWITZ, Elliot J. (ed.). **Virus Taxonomy**: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Oxford: Elsevier Academic Press, 2012.

KLIMSTRA, W. B. *et al.* DC-SIGN and L-SIGN Can Act as Attachment Receptors for Alphaviruses and Distinguish between Mosquito Cell- and Mammalian Cell-Derived Viruses. **Journal Of Virology**, v. 77, n. 22, p.12022-12032, 2003.

KLIMSTRA, William B.; RYMAN, Kate D.. Adaptation of Sindbis Virus to BHK Cells selects for use of Heparan Sulfate as an Attachment Receptor. **Journal Of Virology**: ROBERT E. JOHNSTON, v. 72, n. 9, p. 7357-7366, 1998.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C.. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KRAMER, Laura D. *et al.* Dissemination Barriers for Western Equine Encephalomyelitis Virus in *Culex Tarsalis* Infected after Ingestion of Low Viral Doses. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 30, n. 1, p. 190-197, 1981.

KUHN, Richard J. **Togaviridae**. In: KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M.. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. Cap. 22. p. 629-650.

KUMAR, Ankit *et al.* Mosquito Innate Immunity. **Insects**, v. 9, n. 3, p. 95-124, 2018.

LAFON, M. Techniques for the production, screening and characterization of monoclonal antibodies. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.).

- Laboratory techniques in rabies.** 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 133–144.
- LALINN, M. *et al.* Arbovirus of Marine Mammals: a New Alphavirus Isolated from the Elephant Seal Louse, *Lepidophthirus macrorhini*. **Journal Of Virology**, v. 75, n. 9, p.4103-4109, 2001.
- LAMBALLERIE, Xavier de *et al.* Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come?. **Virology Journal**, v. 5, n. 1, p. 33-45, 2008.
- LAMBERT, N.; MERTEN, O.W. Effect of serum-free and serum-containing medium on cellular levels of ER-based proteins in various mouse hybridoma cell lines. **Biotechnological Bioengineer**, v. 54, p. 165–180, 1997.
- LAMBRECHTS, Louis; SALEH, Maria-carla. Manipulating Mosquito Tolerance for Arbovirus Control. **Cell Host & Microbe**, v. 26, n. 3, p.309-313, 2019.
- LAURING, Adam S.; ANDINO, Raul. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 7, p. 1001-1005, 2010.
- LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C. F. M.. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: evaluation and recommendations. **Ilar Journal**, v. 46, n. 3, p. 269-279, 2005.
- LI, Ci-xiu *et al.* Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. **Elife**, v. 4, p. 1-2, 2015.
- LIM, Elisa *et al.* Mosquitoes as Suitable Vectors for Alphaviruses. **Viruses**, v. 10, n. 2, p.84-100, 2018.
- LINTHICUM, K. J. *et al.* Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus Infection in and Transmission by the Tick *Amblyomma cajennense* (Arachnida: Ixodidae). **Journal Of Medical Entomology**, v. 28, n. 3, p.405-409, 1991.
- LIU, Zhuanzhuan *et al.* Temperature Increase Enhances *Aedes albopictus* Competence to Transmit Dengue Virus. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p. 1-10, 2017.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D.. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOPES, Nayara; NOZAWA, Carlos; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho. Características gerais e epidemiologia dos arbovirus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.
- LUTOMIAH, Joel J. L. *et al.* Infection and Vertical Transmission of Kamiti River Virus in Laboratory Bred *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Journal Of Insect Science**, v. 7, n. 55, p. 1-7, 2007.

LWANDE, Olivia Wesula *et al.* Isolation of Tick and Mosquito-Borne Arboviruses from Ticks Sampled from Livestock and Wild Animal Hosts in Ijara District, Kenya. **Vector-borne And Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 9, p.637-642, 2013.

MACKAY, I. M.. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MARKLEWITZ, Marco *et al.* Evolutionary and phenotypic analysis of live virus isolates suggests arthropod origin of a pathogenic RNA virus family. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 112, n. 24, p. 7536-7541, 2015.

MARKLEWITZ, Marco; JUNGLIN, Sandra. Evolutionary and ecological insights into the emergence of arthropod-borne viruses. **Acta Tropica**, v. 190, p. 52-58, 2019.

MATTINGLY, P.f. Ecological aspects of the evolution of mosquito-borne virus diseases. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 97-112, 1960.

MAZZAROTTO, Giovanni A.C.A. *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of Araucaria hantavirus. **Journal Of Virological Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 96-100, 2009.

MCCULLOUGH, Kenneth C.; SPIER, Raymond E.. Factors affecting successful hybridoma production. **Monoclonal Antibodies In Biology And Biotechnology: theoretical and practical aspects**, p. 138-184, 2009.

MONATH, Thomas P.; VASCONCELOS, Pedro F.c.. Yellow fever. **Journal Of Clinical Virology**, v. 64, p. 160-173, 2015.

MOSIMANN, Ana Luiza Pamplona *et al.* A new Aura virus isolate in Brazil shows segment duplication in the variable region of the nsP3 gene. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, 2018.

MULVEY, Matthew; BROWN, Dennis T.. Assembly of the Sindbis Virus Spike Protein Complex. **Virology**, v. 219, n. 1, p.125-132, 1996.

NASAR, F. *et al.* Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 109, n. 36, p.14622-14627, 2012.

NASAR, Farooq *et al.* Eilat Virus Host Range Restriction Is Present at Multiple Levels of the Virus Life Cycle. **Journal Of Virology**, v. 89, n. 2, p. 1404-1418, 2014.

NASAR, Farooq *et al.* Eilat virus induces both homologous and heterologous interference. **Virology**, v. 484, p. 51-58, 2015.

NELSON, P N. Demystified ...: monoclonal antibodies. **Molecular Pathology**, v. 53, n. 3, p. 111-117, 2000.

ÖHLUND, Pontus; LUNDÉN, Hanna; BLOMSTRÖM, Anne-lie. Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. **Virus Genes**, v. 55, n. 2, p. 127-137, 2019.

OLIVEIRA, José Henrique *et al.* Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, e0005525, 2017.

OLIVEIRA, José Henrique *et al.* How are arbovirus vectors able to tolerate infection? **Developmental & Comparative Immunology**, v. 103, p. 103514-103515, 2020.

OLMO, Roenick Proveti. **Análise da resposta do vetor *Aedes aegypti* à infecção por Dengue vírus: foco na barreira do intestino**. 2015. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Bioinformática, Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2015.

PARK, Eunhye; GRIFFIN, Diane E.. The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. **Virology**, v. 388, n. 2, p. 305-314, 2009.

PAUPY, C. *et al.* *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. **Microbes And Infection**, v. 11, n. 14-15, p. 1177-1185, 2009.

PERRIN, P. Techniques for the preparation of rabies conjugates. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 433–444.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45-45, 2001.

POWERS, Ann M. *et al.* Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. **Journal Of Virology**, v. 75, n. 21, p. 10118-10131, 2001.

RAMSEY, Jolene; MUKHOPADHYAY, Suchetana. Disentangling the Frames, the State of Research on the Alphavirus 6K and TF Proteins. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 228-249, 2017.

ROMAN-SOSA, G.; KIELIAN, M.. The Interaction of Alphavirus E1 Protein with Exogenous Domain III Defines Stages in Virus-Membrane Fusion. **Journal Of Virology**, v. 85, n. 23, p. 12271-12279, 2011.

ROMERO-VIVAS *et al.* Determination of dengue virus serotypes in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Colombia. **Medical And Veterinary Entomology**, v. 12, n. 3, p. 284-288, 1998.

ROSE, Patrick p. *et al.* Natural Resistance-Associated Macrophage Protein Is a Cellular Receptor for Sindbis Virus in Both Insect and Mammalian Hosts. **Cell Host & Microbe**, v. 10, n. 2, p.97-104, 2011.

SAIYASOMBAT, Rungrat *et al.* Evidence of Efficient Transovarial Transmission of Culex Flavivirus by Culex pipiens (Diptera: culicidae). **Journal Of Medical Entomology**, v. 48, n. 5, p. 1031-1038, 2011.

SALEH, Suha M *et al.* Antigenic and genetic typing of Whataroa viruses in Australia. **American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 3, n. 71, p. 262-267, 2004.

SÁNCHEZ-SECO, M.P. *et al.* Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. **Journal Of Virological Methods**, v. 126, n. 1-2, p. 101-109, 2005.

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

SANTHOSH, S.R. *et al.* Development and evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantification of Chikungunya virus. **Journal Of Clinical Virology**, v. 39, n. 3, p. 188-193, 2007.

SANTOS, Roseli La Corte dos. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. 671-673, 2003.

SCOTT, Thomas W. *et al.* Susceptibility of *Aedes albopictus* to infection with eastern equine encephalomyelitis virus. **Journal of The American Mosquito Control Association**, v. 6, n. 2, p. 274-278, 1990.

SEMENZA, Jan C; MENNE, Bettina. Climate change and infectious diseases in Europe. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 6, p. 365-375, 2009.

SHAH, K. V. *et al.* Isolation of Five Strains of Sindbis Virus in India. **Indian Journal Of Medical Research**, v. 48, n. 3, p.300-308, 1960.

SHI, Mang *et al.* Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses. **Journal Of Virology**, v. 90, n. 2, p. 659-669, 2015.

STAHL, C; STAEHELIN, T; MIGGIANO, V. Spleen cell analysis and optimal immunization for high-frequency production of specific hybridomas. **Methods in Enzymology**, v. 92, p.26-36, 1983.

STANLEY, J *et al.* Alphavirus neurovirulence: monoclonal antibodies discriminating wild-type from neuroadapted sindbis virus. **Journal Of Virology**, v. 56, n. 1, p. 110-119, 1985.

STOLLAR, Victor; THOMAS, Virginia L.. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. **Virology**, v. 64, n. 2, p. 367-377, 1975.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The Alphaviruses : gene expression, replication, and evolution. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.

TAGGART, R.; SAMLOFF, I.. Stable antibody-producing murine hybridomas. **Science**, v. 219, n. 4589, p. 1228-1230, 1983.

TESLA, Blanka *et al.* Estimating the effects of variation in viremia on mosquito susceptibility, infectiousness, and R0 of Zika in *Aedes aegypti*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. 0006733-0006734, 2018.

- TORII, Shiho *et al.* Discovery of Mwinilunga alphavirus: A novel alphavirus in *Culex* mosquitoes in Zambia. **Virus Research**, v. 250, p.31-36, 2018.
- TSCHÁ, Marcel Kruchelski *et al.* Identification of a novel alphavirus related to the encephalitis complexes circulating in southern Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p.920-933, 2019.
- TUEKPRAKHON, Aekkachai *et al.* Broad-spectrum monoclonal antibodies against chikungunya virus structural proteins: promising candidates for antibody-based rapid diagnostic test development. **Plos One**, v. 13, n. 12, e0208851, 2018.
- VANCINI, Ricardo; HERNANDEZ, Raquel; BROWN, Dennis. Alphavirus Entry into Host Cells. **The Molecular Basis Of Viral Infection**, p. 33-62, 2015.
- VILLOING, Stéphane *et al.* Rainbow Trout Sleeping Disease Virus Is an Atypical Alphavirus. **Journal Of Virology**, v. 74, n. 1, p. 173-183, 2000.
- VOGELS, Chantal Bf *et al.* Vector competence of European mosquitoes for West Nile virus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2017.
- WEAVER, Scott C *et al.* Togavirus-associated pathologic changes in the midgut of a natural mosquito vector. **Journal of Virology**, v. 62, n. 6, p. 2083-2090, 1988.
- WENGLER, Gerd; WÜRKNER, Detlef; WENGLER, Gisela. Identification of a sequence element in the alphavirus core protein which mediates interaction of cores with ribosomes and the disassembly of cores. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 880-888, 1992.
- WONG, Pei-Sze Jeslyn *et al.* *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse): a potential vector of zika virus in singapore. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. 1-10, 2013.
- XIAO, Fang-Zhen *et al.* The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in *Aedes albopictus*. **Archives Of Virology**, v. 159, n. 11, p. 3053-3057, 2014.
- YACTAYO, Sergio *et al.* Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **Journal Of Infectious Diseases**, v. 214, n. 5, p. 441-445, 2016.
- YEO, Jessna H. M. *et al.* Glutamine or Glucose Starvation in Hybridoma Cultures Induces Death Receptor and Mitochondrial Apoptotic Pathways. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 18, p. 1445-1452, 2006.
- YOKOYAMA, Wayne M. *et al.* Production of Monoclonal Antibodies. **Current Protocols In Immunology**, v. 74, n. 1, p. 10-20, 2006.
- ZANLUCA, Camila *et al.* Development, Characterization and Application of Monoclonal Antibodies against Brazilian Dengue Virus Isolates. **Plos One**, v. 9, n. 11, p.e110620, 2014.
- ZANLUCA, Camila *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p.569-572, 2015.
- ZANLUCA, Camila; SANTOS, Claudia Nunes Duarte dos. Zika virus – an overview.

Microbes And Infection, v. 18, n. 5, p.295-301, 2016.

ZHANG, Rong *et al.* Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570-574, 2018.