

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

ESTUDO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO ENTRE FLAVIVÍRUS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E
FLAVIVÍRUS EXCLUSIVOS DE INSETOS

GISIANE EMANUELE GRUBER DORL

CURITIBA/PR
2020



INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

GISIANE EMANUELE GRUBER DORL

Estudo *In Vitro* Da Interação Entre Flavivírus De Importância Médica E Flavivírus Exclusivos De Insetos

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

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

CURITIBA/PR
2020

Gruber Dorl, Gisiane Emanuele.

ESTUDO IN VITRO DA INTERAÇÃO ENTRE FLAVIVÍRUS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E FLAVIVÍRUS EXCLUSIVOS DE INSETOS / Gisiane Emanuele Gruber Dorl. - Curitiba, 2020.

98 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2020.

Orientadora: Camila Zanluca.

Co-orientadora: Claudia Nunes Duarte dos Santos.

Bibliografia: f. 85-98

1. Flavivirus. 2. Coinfecções. 3. Vírus exclusivos de insetos. 4. Isolamento viral. 5. Anticorpo monoclonal. I. Título.

Aos meus pais, José e Maria Elena,
a minha irmã, Gislaine
aos meus sobrinhos, Heitor e Heloisa
e ao meu marido João Guilherme
que me motivam e inspiram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois Ele tem me sustentado e guiado nos caminhos certos.

A minha orientadora, Dra. Camila Zanluca, pela dedicação e oportunidade de aprendizado. Agradeço por sempre encontrar um tempo para se dedicar ao meu mestrado mesmo em meio a tantas responsabilidades e desafios.

A minha co-orientadora e chefe de laboratório, Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos, pela orientação e oportunidade de fazer parte do laboratório desde a minha iniciação científica. Agradeço por esses 4 anos de muito aprendizado que será um legado sempre presente em minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Molecular, pelo convívio agradável e pelas colaborações no decorrer dos trabalhos desenvolvidos.

Aos funcionários do ICC que possibilitaram de alguma maneira o melhor desenvolvimento das atividades diárias, em especial ao pessoal do preparo de materiais pela grande colaboração.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Letusa Albrecht, Dra. Alessandra Abel Borges, Dra. Magda C. V. C. Ribeiro, Dra. Lia Carolina Medeiros e Dra. Daisy Maria Strottmann, pela disponibilidade e dedicação nas correções deste trabalho.

Ao Instituto Carlos Chagas ICC/Fiocruz-PR, em especial a pós-graduação que permitiu a realização deste projeto de mestrado.

A Fiocruz, CAPES e CNPq pelo financiamento.

A minha família que sempre me incentivaram me dando amor e conforto quando necessário. Agradeço por todo o encorajamento e direcionamento ao longo da minha vida acadêmica. Agradeço também, ao meu marido João Guilherme, por todo o amor e paciência.

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

ESTUDO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO ENTRE FLAVIVÍRUS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E FLAVIVÍRUS EXCLUSIVOS DE INSETOS

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gisiane Emanuele Gruber

O gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae, inclui vírus de importância médica, como os vírus Zika (ZIKV) e dengue (DENV), além de flavivírus específicos de insetos (ISFs), como o *Culex flavivirus* (CxFV) e o *Sabethes flavivirus* (SbFV). O ZIKV e o DENV são vírus globalmente relevantes que podem ser transmitidos para humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados. Além disso, pode haver transmissão sexual e transmissão vertical do ZIKV de gestantes para o feto, podendo resultar em malformações fetais. Os ISFs são altamente prevalentes em mosquitos na natureza e têm sua replicação exclusiva em insetos, não sendo patogênicos para mamíferos. No entanto, pouco se sabe sobre a interação entre os ISFs e os flavivírus de relevância médica. Estudos indicam que a coinfeção com vírus de um mesmo gênero pode levar a uma interação entre os vírus e ocorrer uma competição interferindo na replicação viral. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito que ISFs têm na infecção pelos vírus ZIKV e DENV no contexto de coinfeções. Para tanto, foram selecionados os ISFs *Culex flavivirus* e *Sabethes flavivirus*. O CxFV foi isolado em células AP61 a partir de mosquitos *Culex* spp. infectados e teve parte de seu genoma sequenciado; o SbFV foi recentemente isolado a partir de mosquitos *Sabethes belisarioi*. Uma linhagem de células C6/36 persistentemente infectada com o SbFV (nomeada C6/36-SbFV), um anticorpo monoclonal (AcM) anti-SbFV (nomeado 7A2/G11/G3) e dois AcM anti-CxFV (nomeados 3G11/G9/G10 e 15B11/D7/A9) foram desenvolvidos para uso como ferramentas nesse estudo. Foram avaliadas as cinéticas de infecção dos vírus SbFV, ZIKV e DENV em células C6/36, definindo-se a multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 e os tempos de 3 e 6 dias pós-infecção, para realização dos ensaios de coinfeção. A infecção por CxFV causou muito efeito citopático nas células, inviabilizando o uso desse vírus nos ensaios subsequentes. Os ensaios de coinfeção foram realizados: (1) com infecção simultânea pelos vírus SbFV e ZIKV ou SbFV e DENV em células C6/36, (2) com infecção pelo ZIKV ou DENV três dias após a infecção pelo SbFV e (3) em células C6/36-SbFV. Houve uma redução nos títulos de ZIKV e DENV em células C6/36 coinfectadas por SbFV. Em C6/36-SbFV infectadas por ZIKV ou DENV, ocorreu uma redução no percentual de células infectadas pelo SbFV. Considerando-se a importância do ZIKV e DENV para saúde pública e a alta prevalência de mosquitos infectados por ISFs na natureza, conclui-se que a redução de partículas infecciosas de ZIKV e DENV após infecção por SbFV é um resultado promissor para um possível uso do SbFV como controle biológico. Mais estudos, no entanto, são necessários. O estudo das interações entre esses vírus pode ainda contribuir para a compreensão dos mecanismos de infecção em mosquitos e da dinâmica de transmissão do ZIKV e DENV.

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

ESTUDO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO ENTRE FLAVIVÍRUS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA E FLAVIVÍRUS EXCLUSIVOS DE INSETOS

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IN VITRO STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN FLAVIVIRUSES OF MEDICAL IMPORTANCE AND INSECT-SPECIFIC FLAVIVIRUSES

The Flavivirus genus, Flaviviridae family, includes viruses of medical importance, such as Zika (ZIKV) and dengue (DENV), in addition to insect-specific flaviviruses (ISFs), such as Culex flavivirus (CxFV) and Sabethes flavivirus (SbFV). ZIKV and DENV are globally relevant viruses transmitted to humans through the bite of infected *Aedes* spp. mosquitoes. Furthermore, it is reported sexual transmission and vertical transmission of ZIKV from pregnant women to the fetus, which may result in Congenital Zika Syndrome. On the other hand, ISFs are highly prevalent in mosquitoes in nature and replicate exclusively in insects, not being pathogenic to mammals. However, little is known about the interaction between ISFs and flaviviruses of medical relevance. Studies have indicated that co-infection with viruses of the same genus can lead to interaction between viruses and competition that interferes with the viral replication. Thus, the present study aimed to analyze the effect of ISFs on ZIKV and DENV viruses in the context of co-infections. The ISFs, Culex flavivirus and Sabethes flavivirus, were selected. CxFV was isolated in AP61 cells from Culex spp. and part of the genome was sequenced; SbFV was isolated from *Sabethes belisarioi* mosquitoes. Some tools like a C6/36 cell line persistently infected with SbFV (named C6/36-SbFV), an anti-SbFV monoclonal antibody (MAb – named 7A2/G11/G3) and two anti-CxFV MAbs (named 3G11/G9/G10 and 15B11/D7/A9) were produced. Infection kinetics in C6/36 cells infected with SbFV, ZIKV and DENV viruses were assessed, setting the multiplicity of infection (MOI) of 0.1 and three- and six-days post-infection for the co-infection assays. CxFV infection resulted in an extensive cytopathic effect in the cells, therefore the use of this virus in the subsequent assays was not viable. The coinfection assays were performed: 1) simultaneous infection by SbFV and ZIKV or by SbFV and DENV in C6/36 cells; 2) ZIKV and DENV infection three days after the SbFV infection; 3) on C6/36-SbFV cells. There was a reduction on the ZIKV and DENV titers in C6/36 cells coinfecting with SbFV. In C6/36-SbFV cells, there was a reduction in the percentage of cells infected by SbFV. Considering the importance of ZIKV and DENV for public health and the high prevalence of mosquitoes infected by ISFs in the nature, it is concluded that the reduction of infectious particles of ZIKV and DENV after infection by SbFV is a promising result for a possible use of SbFV as a biological control. Further studies, however, are needed. The study of the interactions between these viruses can also contribute to understanding the mechanisms of infection in mosquitoes and the transmission dynamics of ZIKV and DENV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura de uma partícula viral madura dos flavivírus.....	17
Figura 2 - Organização do genoma dos flavivírus.....	18
Figura 3 – Representação esquemática das principais etapas da entrada e replicação de um flavivírus.....	20
Figura 4 – Taxa de incidência de Dengue nos estados do Brasil no período da semana epidemiológica 1 a 3 de 2020.....	24
Figura 5 – Ciclos de transmissão do vírus dengue.....	26
Figura 6 – Esquema representando os modos de transmissão do ZIKV.....	29
Figura 7 – Sintomas clínicos da infecção pelo ZIKV.....	31
Figura 8 – A competência de transmissão de arbovírus por mosquitos pode ser afetada por fatores extrínsecos e intrínsecos.....	34
Figura 9 – Ciclos de amplificação da RT-PCR genérica para flavivírus.....	43
Figura 10 – Esquema utilizado para realizar as coinfeções entre os vírus SbfV e ZIKV ou DENV-1.....	50
Figura 11 – Resultados das RT-PCR para confirmação do isolamento de CxFV em células AP61.....	53
Figura 12 – Morfologia das placas do Culex flavivirus (CxFV) MS367 passagens 3 e 4 em células C6/36.....	54
Figura 13 – Caracterização do vírus CxFV MS367.....	55
Figura 14 – Imunofluorescência indireta realizada com os soros pré-ímmunes e pós-ímmunes dos camundongos imunizados com o vírus SbfV.....	57
Figura 15 – Imunofluorescência indireta para avaliação da reatividade do anticorpo monoclonal anti-SbfV 7A2/G11/G3 contra os vírus CxFV, ZIKV, DENV sorotipos 1, 2, 3 e 4, YFV e o MOCK – C6/36.....	59
Figura 16 – Imunofluorescência indireta realizada com os soros pré-ímmunes e pós-ímmunes dos camundongos que foram imunizados com o vírus CxFV.....	61
Figura 17 – Imunofluorescência indireta para avaliação da reatividade dos anticorpos monoclonais anti-CxFV 3G11/G9/G10 e 15B11/D7/A9 contra os vírus CxFV, SbfV, ZIKV, DENV sorotipos 1, 2, 3 e 4, YFV e o MOCK - C6/36.....	63
Figura 18 – Resultado da cinética de infecção dos vírus SbfV, ZIKV e DENV-1 em células C6/36.....	64
Figura 19 – Resultado da cinética de infecção do vírus CxFV em células C6/36.....	65
Figura 20 – Resultado do monitoramento da infecção persistente por SbfV em células C6/36.....	67
Figura 21 – Titulação e morfologia das placas de lise formadas após infecção de células C6/36 com o sobrenadante de células persistentemente infectadas com o Sabethes flavivirus (C6/36-SbfV) passagem 30.....	67

Figura 22 – Imagens representativas dos resultados de imunofluorescência indireta obtidos nos ensaios de coinfeção com os vírus SbfV e ZIKV em células C6/36 e C6/36-SbfV.....	69
Figura 23 – Resultado dos ensaios de coinfeção pelos vírus SbfV e ZIKV nas células C6/36 e C6/36-SbfV.....	70
Figura 24 – Resultado dos ensaios de infecção pelo ZIKV após infecção prévia pelo SbfV	71
Figura 25 – Resultado dos ensaios de coinfeção pelos vírus SbfV e DENV-1 em células C6/36 e C6/36-SbfV	73
Figura 26 – Resultado dos ensaios de infecção pelo DENV-1 após infecção prévia pelo SbfV.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AcM	Anticorpos monoclonais
CxFV	Vírus Culex Flavivirus
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DENV	Vírus dengue
DMEM F12	Meio Dulbecco modificado por Eagle/ Nutriente HAM F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECP	Efeito citopático
ffu	Unidade formadora de foco
HAT	Hipoxantina, aminopterina, timidina
HT	Hipoxantina, timidina
IFI	Imunofluorescência indireta
ISF	Vírus específico de inseto (do inglês <i>insect specific virus</i>)
MOCK	Controle negativo de infecção
MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês <i>multiplicity of infection</i>)
PBS	Solução salina tamponada (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PEG	Polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase associada à transcrição reversa
SBF	Soro bovino fetal
SbFV	Vírus Sabethes Flavivirus
YFV	Vírus da febre amarela (do inglês <i>Yellow fever virus</i>)
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 ARBOVÍRUS.....	15
1.2 O GÊNERO FLAVIVIRUS.....	16
1.2.1 Classificação e partícula viral.....	16
1.2.2 Replicação intracelular.....	18
1.2.3 Proteínas virais.....	20
1.2.4 Flavivírus com relevância médica transmitidos por mosquitos.....	22
1.2.4.1 Vírus dengue.....	23
1.2.4.1.1 Histórico e epidemiologia.....	23
1.2.4.1.2 Ciclos de transmissão.....	25
1.2.4.1.3 Patogênese da infecção.....	26
1.2.4.2 Vírus Zika.....	27
1.2.4.2.1 Histórico e epidemiologia.....	27
1.2.4.2.2 Ciclos de transmissão.....	28
1.2.4.2.3 Patogênese da infecção.....	29
1.2.5 Vírus específicos de insetos (ISVs).....	31
1.2.5.1 História.....	31
1.2.5.2 Manutenção dos ISVs na natureza.....	32
1.2.5.3 Aplicação biológica para vírus específicos de insetos.....	33
1.3 COINFECCÕES.....	34
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3 METODOLOGIA.....	37
3.1 SOLUÇÕES, TAMPÕES E MEIOS DE CULTURA.....	37
3.2 LINHAGENS CELULARES.....	38
3.3 VÍRUS UTILIZADOS.....	38

3.4	TÉCNICAS GERAIS.....	39
3.4.1	Estoque viral.....	39
3.4.2	Imunofluorescência indireta.....	39
3.4.3	Titulação viral.....	40
3.4.4	Extração de RNA viral.....	41
3.4.5	Síntese de cDNA	41
3.5	OBTENÇÃO DE VÍRUS ESPECÍFICO DE INSETO.....	42
3.5.1	Isolamento viral.....	42
3.5.2	Confirmação do isolamento viral por RT-PCR.....	42
3.5.3	Caracterização viral.....	44
3.5.3.1	Sequenciamento do genoma viral.....	44
3.5.3.2	Análise da infecção em diferentes linhagens celulares.....	44
3.6	OBTENÇÃO DOS HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ISFS.....	45
3.6.1	Imunização dos camundongos.....	45
3.6.2	Fusão.....	46
3.6.3	Triagem dos hibridomas.....	46
3.6.4	Clonagem e congelamento dos hibridomas.....	47
3.6.5	Caracterização dos anticorpos monoclonais.....	48
3.6.6	Concentração dos anticorpos monoclonais.....	48
3.7	PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE COINFEÇÃO	48
3.7.1	Avaliação da cinética de crescimento dos vírus.....	48
3.7.2	Geração de células persistentemente infectadas por SbFV.....	49
3.8	COINFEÇÕES ENTRE O VÍRUS SbFV COM OS VÍRUS ZIKV OU DENV.....	49
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	ISOLAMENTO VIRAL.....	52
4.2	OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ISFs.....	57
4.2.1	Produção e caracterização de AcM anti-SbFV.....	57
4.2.2	Produção e caracterização de AcM anti-CxFV.....	60
4.3	PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE COINFEÇÃO.....	64
4.3.1	Avaliação da cinética de crescimento dos vírus.....	64

4.3.2	Geração de células persistentemente infectadas por SbFV.....	65
4.4	ENSAIOS DE COINFECÇÃO.....	67
5	DISCUSSÃO.....	75
5.1	ISOLAMENTO VIRAL.....	75
5.2	OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ISFs.....	77
5.3	COINFECÇÕES.....	78
6	CONCLUSÕES.....	83
7	PERSPECTIVAS.....	84
8	REFERÊNCIAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVÍRUS

No início do século XX, poucos arbovírus (*arthropod borne virus*) eram conhecidos, dentre eles os vírus da febre amarela (YFV) e dengue (DENV) (SHOPE, 1994). Atualmente, são conhecidos aproximadamente 500 diferentes arbovírus, dos quais cerca de 130 podem infectar humanos. Os arbovírus são agrupados nas famílias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae* (RUST, 2012; SCHERER, 2017). Esses vírus possuem ciclo de vida complexo envolvendo replicação nos hospedeiros invertebrados e vertebrados, podendo ser transmitidos para humanos e outros animais através da picada de artrópodes hematófagos (GUBLER, 1998; POWERS, 2009; RUST, 2012). Para alguns arbovírus, como DENV, YFV e Zika (ZIKV), os humanos fazem parte do ciclo de transmissão. Para muitos arbovírus, no entanto, humanos são hospedeiros acidentais, devido à baixa viremia insuficiente para a manutenção do ciclo de transmissão (LORD et al., 2006). Outros meios de transmissão também podem ocorrer, como por meio de transfusão de sangue, transplante de órgãos, leite materno, transmissão sexual, congênita ou perinatal (FOY et al., 2011; BESNARD et al., 2014; MOTTA et al., 2016; ZANLUCA et al., 2018). As infecções por esses vírus podem ser assintomáticas ou oligossintomáticas. Quando sintomáticas, podem resultar em síndromes clínicas, variando desde doença febril branda até febres hemorrágicas e complicações neuroinvasivas (BRASIL, 2016). A infecção por arbovírus é sazonal e muitos fatores podem influenciar na prevalência desses vírus, incluindo clima – chuvas e temperatura – competência e densidade dos vetores e transporte dos vírus para lugares distantes através de pessoas infectadas (SHOPE, 1994).

No decorrer da história da pesquisa na área de virologia, pouca importância foi dada aos arbovírus. No entanto, no último século, a emergência de muitas arboviroses mudou a percepção sobre a sua contribuição para a morbidade e mortalidade no mundo (GUBLER; CLARK, 1995; MURRAY et al., 2015). Há uma crescente busca pelo controle da transmissão de arboviroses, porém mesmo com os avanços da ciência, esses vírus continuam a causar epidemias e doenças em animais e humanos. Alguns arbovírus causam surtos ou epidemias esporádicas em áreas onde haviam sido previamente reportados. Outro tipo de surto ou epidemia ocorre quando os vírus são reportados em regiões novas e se estabelecem nesses novos nichos ecológicos. Há também vírus que sofrem alterações em novos territórios mudando

seu padrão de sintomas da doença que causa e, por último, existem os surtos e epidemias que acontecem devido a vírus ainda desconhecidos (POWERS, 2009).

A emergência e disseminação global dos arbovírus podem ser resultado do crescimento populacional, da mudança climática, urbanização e aumento do tráfego humano e comércio internacional nas últimas décadas (Murray et al., 2015; WHO, 2009; WILDER-SMITH et al., 2017). O Brasil tem clima predominantemente tropical, com vastas florestas distribuídas ao longo do seu território, sendo um local adequado para o surgimento de arboviroses devido às condições propícias que oferece para o desenvolvimento dos vetores (FIGUEIREDO, 2000).

1.2 O GÊNERO *FLAVIVIRUS*

1.2.1 Classificação e partícula viral

A família *Flaviviridae* pode ser dividida em quatro gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* e *Hepacivirus* (SIMMONDS et al., 2017). O gênero *Flavivirus* possui mais de 70 vírus atualmente conhecidos (KUNO et al., 1998; FORRESTER et al., 2015; SCHERER, 2017). Esse gênero foi dividido em quatro grupos baseados nas suas características ecológicas, análise filogenética, especificidade do vetor e comportamento do vírus nas células hospedeiras – flavivirus transmitidos por mosquitos, flavivirus transmitidos por carrapatos, flavivirus com vetor desconhecido e flavivírus inseto-específicos. A classificação desse gênero é difícil pois esses vírus estão distribuídos em áreas geográficas extensas e há uma diversidade de vetores artrópodes ou hospedeiros vertebrados associados com o ciclo de transmissão (CHEN et al., 2012; KUNO et al., 1998).

A maioria dos flavivirus pertence ao grupo dos flavivirus transmitidos por mosquitos. O segundo grupo engloba os vírus transmitidos por carrapatos, que são subdivididos de acordo com a especificidade do hospedeiro. Os vírus que não possuem vetor conhecido – *no-known vector flaviviruses* (NKVFs) – são associados a morcegos, roedores e infectam vertebrados sem, aparentemente, a transmissão por vetores artrópodes. O último grupo compreende os flavivírus inseto-específicos – *insect-specific flaviviruses* (ISFs) – com replicação exclusiva em invertebrados (PETTERSSON et al., 2014; GRABOWSKI et al., 2017).

As partículas dos vírus do gênero *Flavivirus* possuem diâmetro de aproximadamente 50 nm e genoma de RNA fita simples não segmentado com senso positivo e aproximadamente 11 kb. O RNA viral está contido no nucleocapsídeo, o qual é envolvido por uma bicamada lipídica

onde estão ancoradas as proteínas virais de superfície – de envelope (E) e de membrana (M) (Figura 1) (ULOHA; LIALIKAU, 2003).

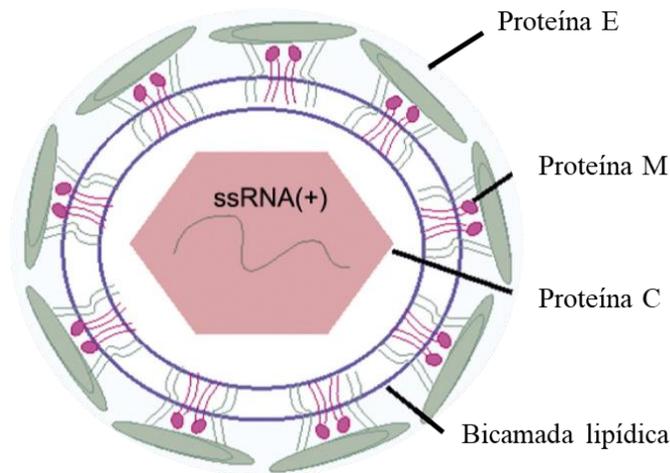


Figura 1 - Representação da estrutura de uma partícula viral madura dos flavivirus. Estão representados o material genético (ssRNA), as três proteínas estruturais (C, M e E) e bicamada lipídica. Fonte: Adaptado de KROL et al. (2019).

A eficiência da tradução do genoma é determinante para a infectividade dos flavivirus. O genoma possui uma única janela aberta de leitura (*open reading frame* - ORF), que codifica uma poliproteína, a qual é clivada por enzimas virais e da célula hospedeira, resultando nas proteínas estruturais – proteína de capsídeo (C), pré membrana/membrana (prM/M) e envelope (E) – e não estruturais – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (CHAMBERS, 1990) (Figura 2). O genoma possui uma extremidade 5' com capeamento do tipo I ($m^7GpppAmpN_2$) a qual serve como sítio de iniciação para a síntese da fita positiva durante a replicação do RNA. A extremidade 3' não possui cauda de poliadenina e, apesar de possuir grande variabilidade, possui sequências padrões e estruturas secundárias conservadas entre os flavivírus (FREED et al., 2013).

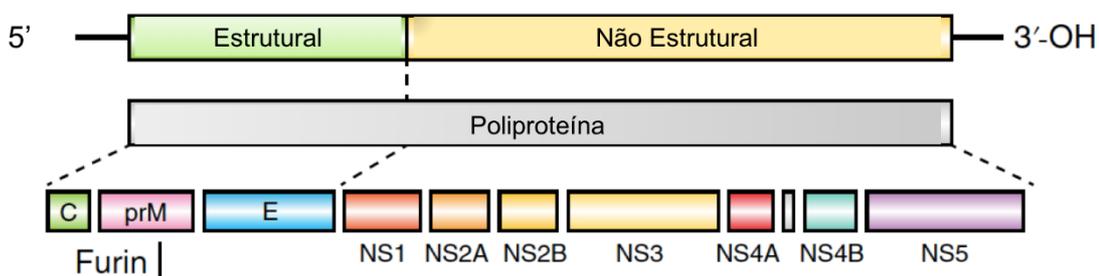


Figura 2 - Organização do genoma dos flavivírus. O RNA genômico possui duas regiões não codificadoras (5' e 3' UTR) em suas extremidades, além dos genes que codificam para as proteínas estruturais (C, prM/M e E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Fonte: CAMPOS et al., 2018.

1.2.2 Replicação intracelular

Algumas espécies de flavivírus são capazes de infectar células de mosquitos, aves e mamíferos, portanto, o receptor celular para a proteína de envelope deve ser comum a uma variedade de células (WESTAWAY, 1987).

O primeiro relato sobre a iniciação da infecção celular por flavivírus foi feito por Gollins e Porterfield (1985), no qual foi descrita a entrada no vírus do Oeste do Nilo (WNV) na linhagem celular de macrófagos P388D1. Flavivírus são depositados na epiderme durante a picada do vetor e são capazes de causar infecção quando encontram células suscetíveis, como queratinócitos e células dendríticas da pele (células de Langerhans) (NUTTALL; LABUDA, 2003; ROBERTSON et al., 2009; BRIANT et al., 2014). As células dendríticas em particular parecem ser um alvo em comum entre diversos flavivírus. Quando infectadas, essas células migram para os órgãos linfoides, onde a replicação viral acontece permitindo a disseminação das partículas virais na circulação sanguínea e aos órgãos internos (PIERSON et al., 2014).

Mosquitos são altamente suscetíveis à infecção por flavivírus, podendo o vírus se replicar em vários tecidos e células desses artrópodes (SALAZAR et al., 2007). É provável que o mecanismo de entrada nas células de vertebrados e invertebrados seja conservado, devido aos flavivirus possuírem apenas uma proteína de envelope e aos receptores celulares identificados nas células de mosquitos serem similares aos encontrados nas células de mamíferos (VEGA-ALMEIDA et al., 2013). Uma variedade de receptores celulares tem sido relacionada à entrada de flavivírus nas células hospedeiras (PERERA-LECOIN et al., 2013). Dentre esses receptores, os melhores caracterizados até o momento incluem integrinas $\alpha_v\beta_3$, receptores de lectina tipo C (DC-SIGN/L-SIGN, receptor de manose, CLEC5A, entre outros), receptores de fosfatidilserina TIM (*T-cell immunoglobulin and mucin domain*) e TAM (TYRO3, AXL e MER) (LAURETI et al., 2018, PERERA-LECOIN et al., 2013).

A entrada do vírus na célula se inicia com a sua ligação a receptores na superfície celular, mediada pela proteína E, seguida de endocitose mediada por receptor (Figura 4). A fusão das membranas viral e do hospedeiro é ativada pelo pH baixo do compartimento do endossomo, o qual promove uma reorganização da proteína E com exposição do peptídeo de fusão, levando à liberação do nucleocapsídeo e, posteriormente, do RNA viral no citoplasma. A tradução do RNA gera uma poliproteína que é processada pela serino-protease do vírus, NS2B/NS3, e por proteases da célula hospedeira, produzindo as três proteínas estruturais (C-prM-E) e sete não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (RICE et al., 1985; LINDENBACH et al., 2003).

As proteínas NS3 e NS5 possuem atividades enzimáticas que são necessárias para a replicação viral. O primeiro passo desse processo é a síntese da fita complementar de RNA, que serve como molde para a síntese de novas fitas de polaridade positiva. Em seguida, múltiplas cópias de proteína C se associam ao RNA viral formando o nucleocapsídeo, o qual é então revestido pelo envelope viral (proteínas E e prM associadas a uma bicamada lipídica), formando uma partícula viral imatura que brota do lúmen do RE até o complexo de Golgi. A maturação da partícula viral ocorre na rede *trans* de Golgi onde a prM é clivada em M por uma furina celular. Finalmente, a partícula viral madura é liberada por exocitose da célula hospedeira (Figura 3) (KHROMYKH; WESTAWAY, 1996; MACKENZIE; WESTAWAY, 2002; COLLINS, 2007; LI et al., 2008).

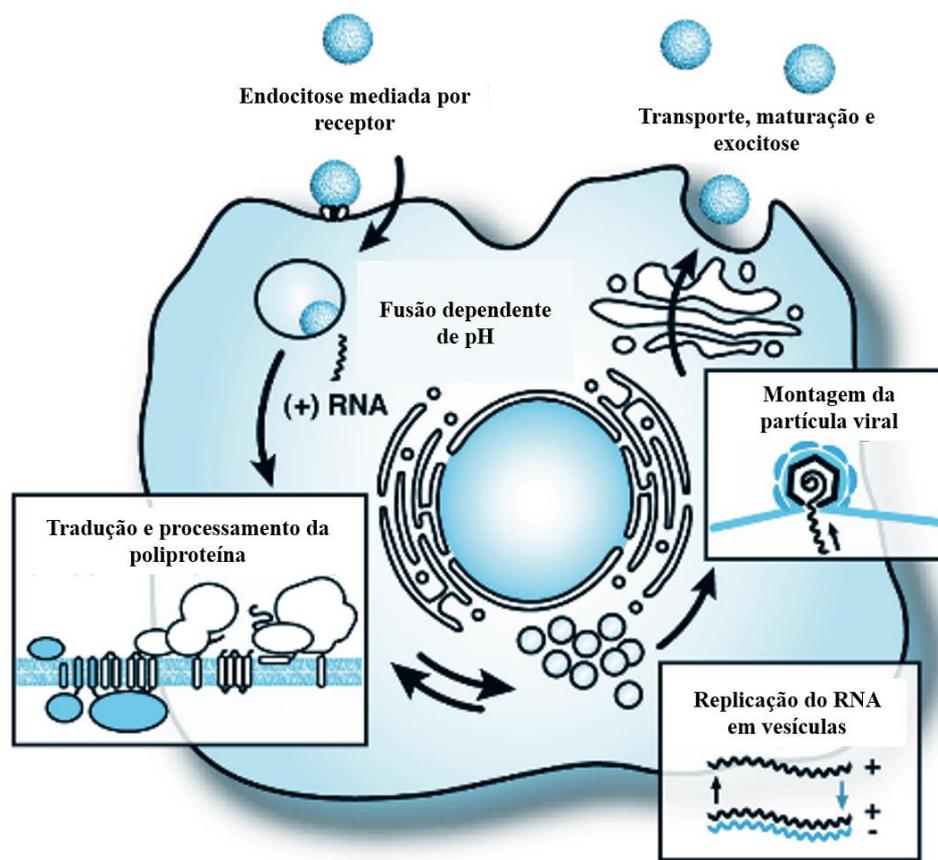


Figura 3 – Representação esquemática das principais etapas da entrada e replicação de um flavivírus. A primeira etapa consiste na adsorção do vírus a receptores na superfície celular e endocitose mediada por receptor. Em pH baixo no endossomo formado, ocorre a fusão das membranas viral e celular, seguida pelo desnudamento do vírus e liberação do RNA viral para o citoplasma. O RNA viral é então traduzido em uma poliproteína e posteriormente clivado nas proteínas estruturais e não estruturais; a replicação do RNA ocorre associada a vesículas. Por último, a montagem das partículas virais é feita no retículo endoplasmático (RE) e as partículas virais são liberadas através de exocitose na membrana da célula hospedeira. FONTE: Adaptado de COLLINS et al., (2007)

1.2.3 Proteínas virais

As proteínas estruturais são necessárias para a entrada do vírus na célula e formação da partícula viral. Apesar de as proteínas não estruturais não estarem presentes na partícula viral, elas estão relacionadas com a replicação do RNA (COLLINS, 2007).

A proteína C possui 11 kDa e interage diretamente com o genoma viral, formando o nucleocapsídeo. Essa proteína possui uma região interna hidrofóbica e serve como um peptídeo sinal para a translocação da prM para o RE (MA et al., 2004; COLLINS, 2007).

A proteína prM possui 26 kDa e sua associação com a proteína E produz partículas virais imaturas. Além disso, a associação dessas duas proteínas forma um heterodímero nas partículas

imaturas protegendo o peptídeo de fusão da proteína E de uma fusão prematura (LI et al., 2008; YU et al., 2008).

A proteína E tem 53 kDa e sua forma dimérica madura é o maior componente da superfície viral. Suas funções englobam a ligação do vírus na superfície celular, fusão de membranas e entrada do vírus nas células do hospedeiro. Como mencionado anteriormente, o dobramento correto, estabilização em pH baixo e ancoragem na superfície da partícula dependem da coexpressão com a prM. Cada subunidade da proteína E é composta por três domínios: I, II e III. O *loop* de fusão está localizado no domínio II e é o responsável pela fusão da membrana viral com a endossomal, permitindo a liberação do nucleocapsídeo no interior da célula. Já o domínio III está envolvido com a ligação ao receptor da célula hospedeira e também é conhecido por ser um dos principais alvos de anticorpos neutralizantes, sendo que esses anticorpos podem inibir um passo após a ligação do vírus ao receptor das células (COLLINS, 2007).

A glicoproteína NS1 tem aproximadamente 46 kD e é clivada da proteína E por uma peptidase do hospedeiro. A NS1 pode ser retida dentro das células infectadas, estar localizada na superfície celular ou ser secretada de células infectadas. Durante a infecção, uma resposta humoral robusta é feita pelo hospedeiro contra essa proteína e anticorpos contra ela podem mediar a lise das células infectadas (FLAMAND et al., 1999; COLLINS, 2007).

A proteína NS2 é clivada em duas subunidades, NS2A e NS2B. Essas duas proteínas possuem cerca de 22 kDa e 14 kDa, respectivamente, e estão relacionadas com a replicação. A NS2B juntamente com a NS3 forma um complexo que tem atividade de protease (CHAMBERS et al., 1993). Além dessa função, são essenciais para a produção da partícula viral devido a sua interação com outras proteínas não estruturais durante o processo de produção da partícula viral (MURRAY et al., 2008).

A proteína NS3 possui 70 kDa e é importante para a replicação e processamento da poliproteína dos flavivirus. A atividade de protease da NS3 é essencial para a replicação viral e é responsável pela clivagem das ligações entre NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A e NS4B-NS5. A função de helicase da NS3 é responsável pelo desenrolamento da estrutura secundária do RNA, sendo essa etapa essencial para a replicação do RNA (LEUNG et al., 2001; TAKEGAMI et al., 1995).

As proteínas NS4A e NS4B possuem 16 kDa e 27 kDa, respectivamente, e são consideradas hidrofóbicas. A NS4A pode ter um papel na replicação do RNA devido a sua localização junto a complexos de replicação. A proteína NS4B está envolvida na produção da

partícula madura do vírus, já que facilita a clivagem da proteína C pela NS3 (AMBERG et al., 1994; LOBIGS, 2006; COLLINS, 2007).

Finalmente, a proteína NS5 é uma proteína grande de 103 kDa e altamente conservada entre os flavivirus. Essa proteína contém uma metiltransferase na região N-terminal (ZHAO et al., 2015) que metila o RNA viral e também o distingue para prevenir o reconhecimento do RNA pelo hospedeiro (DAFFIS et al., 2010; HYDE; DIAMOND, 2015). A região C-terminal da NS5 inclui a RNA polimerase RNA dependente (RdRp) responsável pela replicação do RNA viral (COLLINS, 2007).

1.2.4 Flavivírus com relevância médica transmitidos por mosquitos

Os vírus do gênero *Flavivirus* possuem em seu ciclo de transmissão mosquitos como vetores e hospedeiros vertebrados, que podem ser mamíferos ou aves. Alguns vírus que infectam humanos, chamam a atenção devido aos sintomas, as complicações que as infecções podem causar e ao índice de pessoas infectadas. Dentre eles podem ser destacados os vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), da febre amarela (YFV) e com especial importância os vírus dengue sorotipos 1, 2, 3 e 4 (DENV-1 a 4) e Zika (ZIKV), que possuem ampla circulação no Brasil (Tabela 1) (VEDOVELLO et al., 2015; DONALISIO et al., 2017).

Tabela 1 – Exemplos de Flavivirus patogênicos para humanos, ano, local e fonte de isolamento, distribuição geográfica, principal vetor e hospedeiro. Adaptado de Gould et al. (2008), CDC (2019a) e Hotta et al. (1952).

Vírus	Ano de isolamento	Local de isolamento	Fonte de isolamento	Distribuição geográfica	Vetor principal	Hospedeiro principal
Dengue 1	1943	Japão	Humanos	Trópicos e subtropicais	<i>Aedes aegypti</i>	Humanos
Dengue 2	1944	Nova Guiné	Humanos	Trópicos e subtropicais	<i>Aedes aegypti</i>	Humanos
Dengue 3	1957	Filipinas	Humanos	Trópicos e subtropicais	<i>Aedes aegypti</i>	Humanos
Dengue 4	1957	Filipinas	Humanos	Trópicos e subtropicais	<i>Aedes aegypti</i>	Humanos
Encefalite de Saint Louis	1933	EUA	Humanos	América do Sul, do Norte e Central	<i>Culex spp.</i>	Aves
Febre Amarela	1927	Gana	Humanos	Africana Subsariana, América do Sul e Caribe	<i>Aedes aegypti</i>	Macacos
Zika	1947	Uganda	Macacca mulatto	América do Sul, África, Ásia	<i>Aedes spp.</i>	Macacos, humanos

1.2.4.1 Vírus Dengue

1.2.4.1.1 Histórico e epidemiologia

O DENV apresenta quatro sorotipos (DENV-1, -2, -3 e -4) (COLLINS, 2007). O ancestral desse vírus pode ter se originado há aproximadamente 1000 anos em um ciclo de infecção envolvendo primatas não humanos e mosquitos e a infecção para humanos deve ter ocorrido apenas depois de alguns séculos (HOLMES et al., 2003; WANG et al., 2000). Apenas em 1943 no Japão e em 1944 em Nova Guiné os primeiros vírus dengue foram isolados – DENV-1 e DENV-2, respectivamente (HOTTA et al., 1952). Nesse momento da história, epidemias de dengue já estavam sendo reportadas em regiões da Índia até as Ilhas do Pacífico. Na metade do século XX, a transmissão de DENV ocorreu juntamente com a dispersão do seu principal vetor, o *Aedes aegypti*. Além desse fator, a transmissão foi acelerada também pela urbanização e globalização (GUBLER, 2011). Na tentativa de prevenir a transmissão do YFV nas Américas, a organização Pan Americana de Saúde (OPAS) organizou uma campanha para erradicar o vetor *Ae. aegypti*, e obteve sucesso com a erradicação desse vetor em diversos países

entre 1955 e o início da década de 1970. Como resultado, essa campanha também desacelerou a transmissão de DENV durante o período de 1950-1960. No entanto, com a descontinuação do programa de erradicação, gradualmente a população desses mosquitos aumentou novamente. Até meados de 1994, os quatro sorotipos de DENV já estavam em circulação no território americano (GUBLER et al., 1995).

Atualmente, o DENV é um dos principais vírus transmitidos por artrópodes a humanos (ROTH et al., 2014). A incidência de dengue tem aumentado nas últimas décadas, sendo estimado que ocorram por ano 390 milhões de infecções. Esse vírus se tornou um problema de saúde pública global, se propagando em regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2012). A transmissão do DENV ocorre no Mediterrâneo Oriental, Américas, Sudoeste Asiático, Pacífico Ocidental e nas regiões Africanas, com novos casos ocorrendo em regiões não endêmicas nos Estados Unidos (WHO, 2019b). Diversos fatores podem levar à alta propagação global de DENV, incluindo as mudanças climáticas, falha na erradicação do vetor e chuvas, contribuindo para o número de casos reportados no Brasil (Figura 4) (PAHO, 2019; REZZA, 2014).

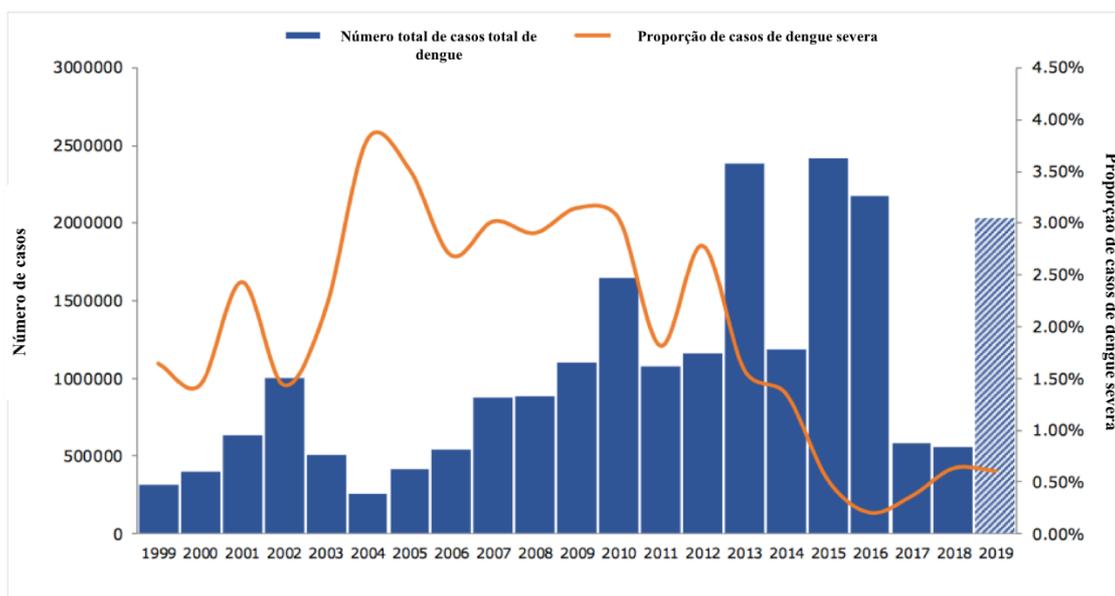


Figura 4 – Casos reportados de dengue (barras azuis) e proporção de dengue severa (linha laranja) por ano de reporte na Região das Américas entre 1999 até agosto de 2019. FONTE: Adaptado de PAHO (2019).

No Brasil, após a campanha para erradicação do *Ae. Aegypti*, a circulação do DENV foi contida até 1981, quando houve um surto de dengue em Roraima. Durante esse surto, os sorotipos de DENV-1 e 4 foram isolados. O surto foi contido, porém, em 1986, houve a reintrodução de DENV-1 no Rio de Janeiro e em algumas capitais do Nordeste. Posteriormente

também foram introduzidos os sorotipos de DENV-2 e -3 no RJ e o DENV-4 em RR (OSANAI et al., 1983; SALLES et al., 2018). Desde a reintrodução do DENV no Brasil, todos os anos há relatos de infecções, principalmente nas áreas mais populosas do país, tendo como característica a situação de hiperendemicidade, na qual ocorrem epidemias anuais com menor ou maior magnitude (FIGUEIREDO, 2000; SALLES et al., 2018).

1.2.4.1.2 Ciclos de transmissão

O DENV é transmitido a humanos através da picada de mosquitos infectados. Mosquitos da espécie *Aedes aegypti* são o principal vetor, se alimentam preferencialmente de sangue humano e habitam em climas tropicais e subtropicais. Como vetor secundário do DENV, pode-se citar o *Aedes albopictus* (SIVAN et al., 2016).

A infecção do mosquito começa quando as fêmeas se alimentam do sangue virêmico de um hospedeiro. Após um período de incubação de 7-14 dias, os vetores podem transmitir o vírus através da picada (WATTS et al., 1987). O *Ae. aegypti* é um mosquito adaptado ao ambiente urbano, deposita seus ovos em recipientes que contenham água limpa e parada, tornando cuidados em não deixar objetos como vasos, pneus, potes vazios ou qualquer outro recipiente que possa acumular água uma das principais medidas de controle do vetor (SILVA et al., 2008).

O ciclo de transmissão do DENV possui diferentes cenários. O ciclo silvestre acontece em regiões de floresta e envolve mosquitos do gênero *Aedes* e primatas não humanos. No entanto, o principal ciclo de transmissão do ponto de vista de saúde pública é o urbano, no qual mosquitos são infectados através da ingestão de sangue de humanos infectados e podem transmitir para outros humanos, permitindo assim a disseminação do vírus à população saudável (Figura 5) (GUBLER, 1988; HALSTEAD, 2017).

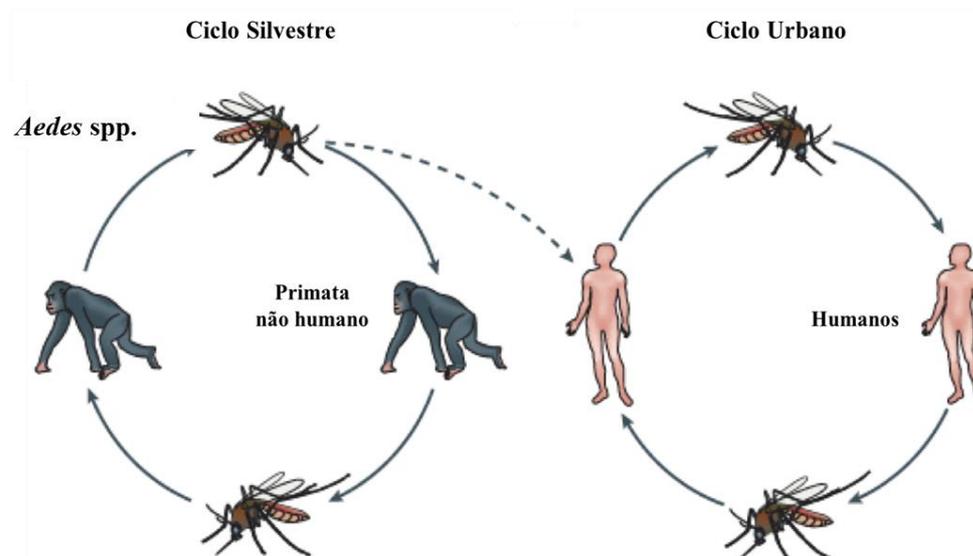


Figura 5 – Ciclos de transmissão do vírus dengue. O ciclo silvestre acontece em áreas de floresta, na qual o mosquito pode transmitir o vírus para primatas não humanos. No ciclo urbano, DENV é transmitido principalmente através da picada dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, que se reproduzem em ambientes domésticos e peridomésticos, aumentando a frequência do contato entre mosquitos e humanos. FONTE: Adaptado de WHITEHEAD et al. (2007).

1.2.4.1.3 Patogênese da infecção

A infecção pelo DENV é assintomática ou oligossintomática na maioria dos casos, mas pode resultar em uma variedade de sintomas clínicos (HARRIS et al., 2000). Os seus sintomas principais são febre alta, dores de cabeça, dor nos músculos e articulações, dor retroorbital, vômito e *rash* cutâneo e duram de 2 a 7 dias. A infecção pelo DENV também pode levar a um quadro de sintomas mais severo que é chamado de dengue com sinais de alarme ou até à dengue grave, na qual pode ocorrer extravasamento plasmático e hemorragia (WHO, 2017).

A dengue pode ser incapacitante e caracterizada pelo rápido desenvolvimento de febre alta, que pode chegar aos 40°C, em combinação com dores de cabeça, desconforto gastrointestinal, dor retroorbital, mialgia, artralgia e exantema. Casos de hemorragia podem se manifestar através de sangramento da gengiva, petéquias na pele e sangramento pelo nariz (GUILARDE et al., 2008). Já na dengue com sinais de alarme, no período de defervescência, o paciente apresenta um ou mais dos sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua ou dor a palpação do abdômen, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural, hepatomegalia maior que 2 cm, aumento progressivo do hematócrito.

Nos casos de dengue grave, por sua vez, pode haver choque, sangramento grave ou comprometimento grave de órgãos como coração, pulmões, rins, fígado ou sistema nervoso

central (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Quando ocorre a evolução para choque, há extravasamento de plasma associado a queda de temperatura, que é caracterizada por batimentos cardíacos rápidos e fracos com diminuição da pressão e extremidades frias no estágio inicial do choque. Se os pacientes não recebem atendimento imediato e tratamento adequado, um estágio de choque profundo pode acontecer, no qual pressão e batimentos cardíacos se tornam indetectáveis (WHO, 1997).

1.2.4.2 Vírus Zika

1.2.4.2.1 Histórico e epidemiologia

O vírus Zika é um vírus emergente, transmitido por mosquitos e que constitui um sério problema de saúde pública devido às recentes epidemias e à forma como ele se disseminou rapidamente pelos territórios.

O ZIKV foi descoberto na Floresta de Zika em Uganda durante uma pesquisa conduzida para estudar o ciclo silvestre da Febre Amarela e para identificar novas arboviroses. Durante este estudo, um dos macacos Rhesus sentinela monitorados em jaulas desenvolveu febre e viremia, levando ao isolamento do ZIKV em abril de 1947 por meio da inoculação intracraniana do seu sangue em camundongos. Em janeiro de 1948, o ZIKV foi isolado de mosquitos *Aedes africanus* coletados no mesmo local do macaco Rhesus (DICK, 1952). A primeira caracterização da doença em humanos ocorreu na Nigéria em 1954 (MACNAMARA, 1954). Esses pacientes apresentaram sintomas como febre, dores de cabeça e nas articulações. Dois anos após, foi realizado um experimento em um voluntário vacinado contra febre amarela, no qual o indivíduo foi infectado com a sexta passagem do ZIKV feita em cérebro de camundongos. Como resultado, o paciente desenvolveu sintomas como dores de cabeça brandas e febre (BEARCROFT, 1956). Durante os anos seguintes, o ZIKV foi associado apenas a infecções esporádicas em humanos.

Apenas em 2007, na Ilha de Yap, na Micronésia, foi descrito o surto de uma doença caracterizada por sintomas clínicos de *rash*, conjuntivite, febre, artralgia e artrite. Embora três pacientes apresentassem IgM anti-DENV, acreditou-se ser uma doença clinicamente diferente de dengue. Em junho de 2007, soros de pacientes com a doença aguda foram enviados ao Laboratório de Diagnóstico e Referência em Arboviroses no Centro de Controle de Doenças (CDC). Em dez das 71 amostras enviadas foi detectado o RNA de ZIKV por reação em cadeia de polimerase associada a transcrição reversa (RT-PCR) (DUFFY et al., 2009). Posteriormente, em 2013, na Polinésia Francesa, uma epidemia foi registrada em áreas com cocirculação de

ZIKV e DENV. Pela primeira vez foram notificados casos com complicações neurológicas e doenças autoimunes associadas ao ZIKV (IOOS et al., 2014).

Em maio de 2015, no Brasil, foram confirmados os primeiros casos de transmissão autóctone do ZIKV na região nordeste (ZANLUCA et al., 2015). Em 2016, foram notificados mais de 200 mil casos suspeitos e, em 2017, aproximadamente 17 mil casos, incluindo relatos de mortes decorrentes da infecção pelo ZIKV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). No Brasil, houve uma redução do número de casos, mas ainda foram registrados mais de dois mil casos entre 2018 e 2019 (BRASIL, 2019). Devido à maioria das infecções por ZIKV serem assintomáticas ou com sintomas brandos e inespecíficos, esse número deve ser ainda maior. Até julho de 2019, um total de 87 países e territórios reportaram casos de transmissão autóctone do ZIKV. Muitos países não possuem sistemas de vigilância rotineiros, portanto, na ausência de epidemias, a informação disponível é frequentemente baseada em reportes clínicos, casos de viajantes e pesquisa científica (WHO, 2019a).

1.2.4.2.2 Ciclos de transmissão

A transmissão do ZIKV a humanos tem sido associada principalmente ao vetor *Aedes spp.* Duas outras espécies de *Aedes* – *Aedes hensilli* e *Aedes polynesiensis* – podem ter sido vetores nos surtos que ocorreram na Micronésia e na Polinésia Francesa, respectivamente (LEDERMANN et al., 2014; MUSSO et al., 2014). O *Ae. aegypti* é amplamente distribuído no mundo, frequentemente pica múltiplos humanos e vive em associação próxima ao *habitat* dos humanos (GUBLER, 1988).

Além da transmissão vetorial, sabe-se que pode haver transmissão sexual e transmissão vertical do ZIKV de mulheres grávidas para o feto, podendo resultar em malformações congênitas (MINER et al., 2016; CDC, 2017; DUGGAL et al., 2017). A transmissão sexual foi primeiramente reportada em 2008 nos EUA (FOY et al., 2011) e em 2013 foi detectado o RNA do ZIKV em sêmen de pacientes infectados durante a epidemia na Polinésia Francesa (MUSSO et al., 2015). Além disso, o vírus já foi encontrado em secreções vaginais (BESNARD et al., 2014; MUSSO; ROCHE; ROBIN; NHAN; TEISSIER; CAO-LORMEAU, V.-M., 2015; PENOT et al., 2017). Até 2018, foram registrados 36 casos de transmissão sexual, dos quais 34 foram resultados da transmissão do homem para a mulher (COUNOTTE et al., 2018) As recomendações da Organização Mundial da Saúde são para que homens infectados com ZIKV ou que apresentem sintomas da infecção esperem pelo menos 3 meses e mulheres oito semanas após a exposição ao vírus para terem relações sexuais desprotegidas (PETERSEN et al., 2016; WHO, 2019).

A transmissão materno-fetal do ZIKV foi associada com problemas aos fetos e recém-nascidos, incluindo complicações como microcefalia, anormalidades no cérebro e deficiências visuais e auditivas (FRANÇA et al., 2016; MARTINES et al., 2016; REYNOLDS et al., 2017).

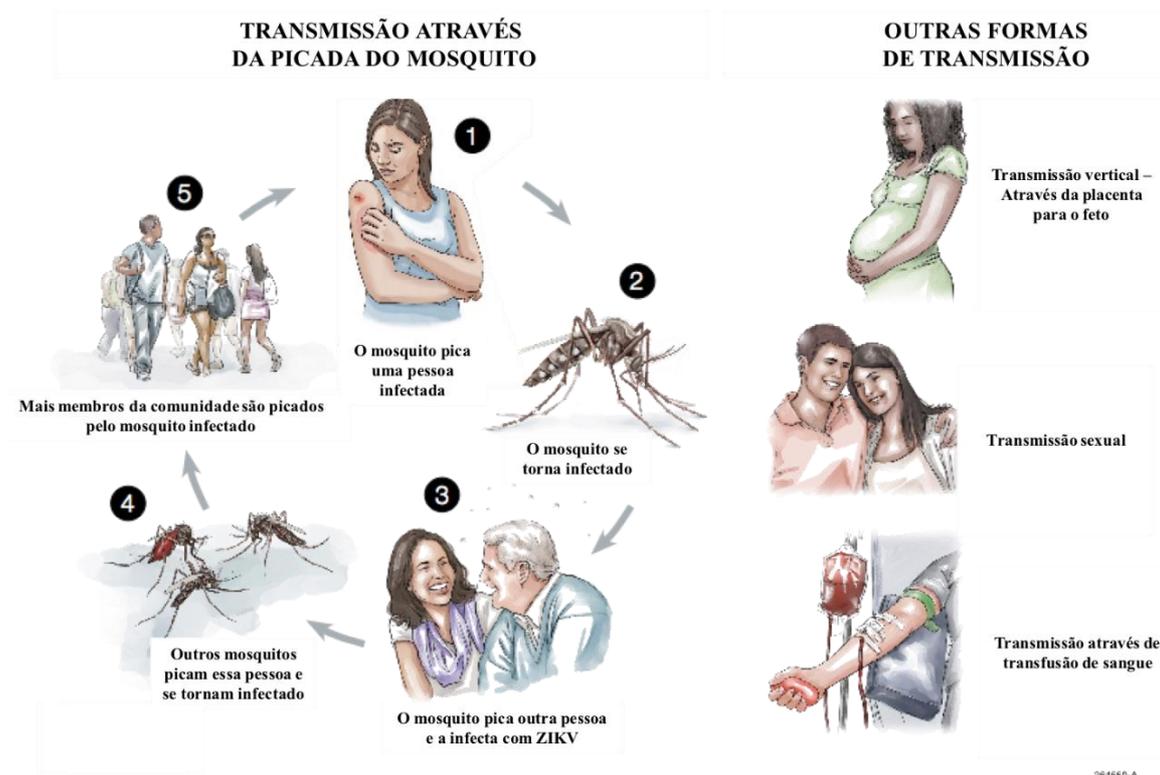


Figura 6 – Esquema representando os modos de transmissão do ZIKV. A infecção do mosquito ocorre após picar uma pessoa infectada (1) e (2); esse mosquito se torna capaz de transmitir o ZIKV para outras pessoas (3), sendo possível que outros mosquitos se tornem infectados (4) e se reinicie o ciclo de transmissão (5) e (1). Outros tipos de transmissão incluem a transmissão vertical, sexual e por transfusão de sangue infectado. FONTE: Adaptado de CDC (2019b).

1.2.4.2.3 Patogênese da infecção

A patogênese da infecção pelo ZIKV ainda é pouco entendida e envolve a interação entre fatores virais e do hospedeiro. O ZIKV também pode ter efeitos teratogênicos em humanos, incluindo microcefalia, calcificação intracranial e morte fetal (MLAKAR et al., 2016; LAURETI et al., 2018). Em humanos, a infecção por ZIKV pode ser assintomática ou apresentar sintomas que duram de 2 a 7 dias, incluindo *rash* cutâneo, geralmente pruriginoso, febre moderada, conjuntivite, dores musculares e nas articulações, dor de cabeça e tonturas (Figura 7) (DUFFY et al., 2009; ZANLUCA et al., 2016). A viremia é tipicamente baixa, embora altas cargas virias e viremia prolongada podem ocorrer (LANCIOTTI et al., 2008;

DRIGGERS et al., 2017). Além disso, o vírus é excretado na urina, saliva e outros fluidos corporais (BESNARD et al., 2014; GOURINAT et al., 2015; PRISANT et al., 2016).

O ZIKV apresenta tropismo por células do sistema nervoso central (SNC) e pode causar neurodegeneração particularmente das células neurais progenitoras, sendo esse um dos potenciais mecanismos para o desenvolvimento da microcefalia (DANG et al., 2016; ONORATI et al., 2016; TANG et al., 2016). Essa capacidade do ZIKV de infectar e causar danos às células progenitoras pode contribuir para o impacto no neurodesenvolvimento. A inoculação do ZIKV diretamente no cérebro de fetos de camundongos resultou em infecção e redução da densidade cortical, inibição da diferenciação das células neuroprogenitoras e microcefalia (LI et al., 2016). Em amostras humanas, o ZIKV foi detectado no tecido materno e fetal, incluindo sistema nervoso central de fetos e natimortos, em células de Hofbauer e no líquido amniótico (CALVET et al., 2016; BHATNAGAR et al., 2017; NORONHA et al., 2018; ZANLUCA et al., 2018). Além disso, a infecção por ZIKV tem sido relacionada ao desenvolvimento de síndrome de Guillain-Barré em uma porcentagem pequena de indivíduos (OEHLER et al., 2014; CAO-LORMEAU et al., 2016). Essa síndrome é uma doença inflamatória aguda mediada pela resposta imune ao vírus que acomete os neurônios causando parestesia, fraqueza e dor, mas que pode progredir para paralisia e morte (SANTOS et al., 2016; DIRLIKOV et al., 2017).

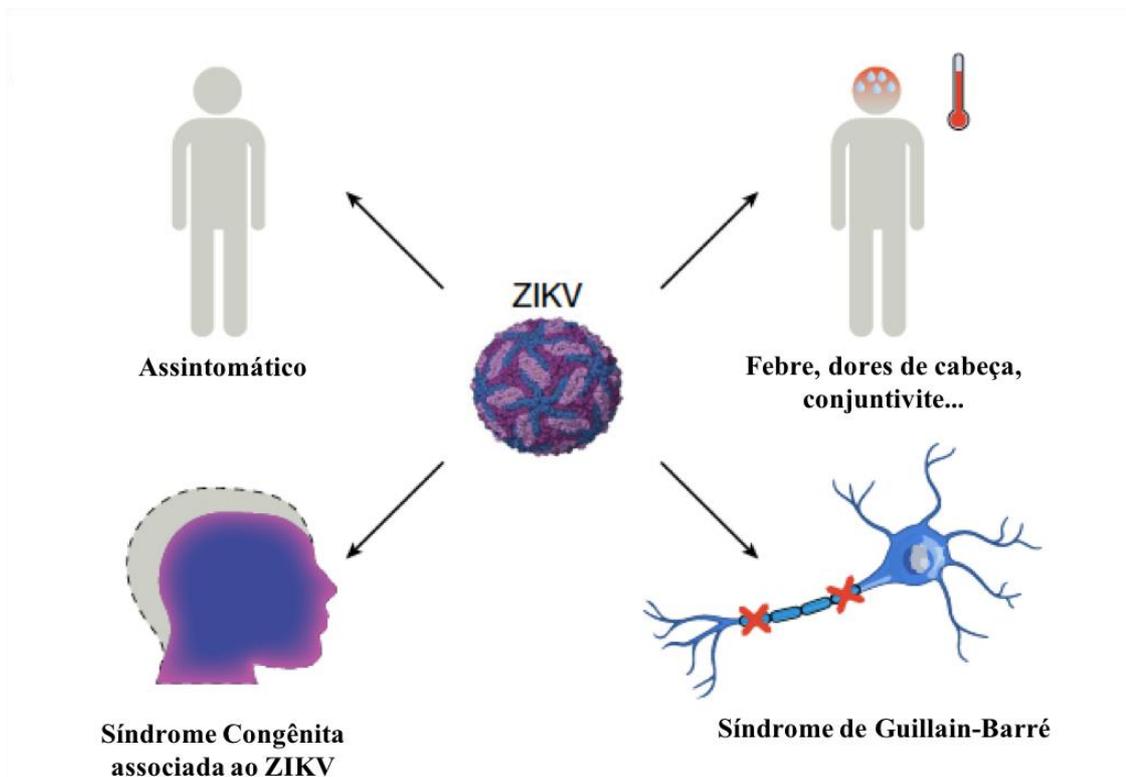


Figura 7 – Sintomas clínicos da infecção pelo ZIKV. A maioria das infecções são assintomáticas. Dentre os casos sintomáticos, os pacientes podem apresentar febre, *rash*, conjuntivite, dores de cabeça e dores musculares. Durante a gestação, a infecção do feto pelo ZIKV pode resultar em microcefalia, síndrome congênita associada ao ZIKV e abortos. Em alguns adultos, pode haver complicações como síndrome de Guillain-Barré, que pode resultar em fraqueza muscular e paralisia. FONTE: Adaptado de LAZEAR et al. (2016).

1.2.5 Vírus específicos de insetos (ISVs)

1.2.5.1 História

Os organismos presentes no microbioma dos mosquitos têm sido identificados com frequência após a introdução e uso em larga escala da tecnologia molecular e ferramentas de bioinformática. Essas descobertas resultaram na identificação de uma nova classe de vírus que são exclusivos de insetos (ROUNDY et al., 2017). A maioria desses vírus tem sido descoberta em mosquitos, provavelmente, por estar inserida no contexto da vigilância de arboviroses de relevância médica (VASILAKIS; TESH, 2015).

O *Cell-fusing agent virus* (CFAV) foi o primeiro ISV caracterizado. Esse vírus foi isolado quando o sobrenadante de cultivo de células de *Ae. Aegypti* (estabelecida por Peleg (1968)) foi inoculado em uma linhagem celular de *Ae. albopictus* (C6/36), resultando em efeito citopático nessas células, mas não em três linhagens celulares de vertebrados (BHK-21, KB e Vero) (STOLLAR et al., 1975). Anos mais tarde, o genoma desse vírus foi sequenciado e foi descoberto que o CFAV pertencia ao gênero *Flavivirus* apesar de ser geneticamente distante

dos Flavivirus conhecidos naquele tempo (CAMMISA-PARKS et al., 1992). Somente em 2003, outro ISV foi caracterizado, o *Kamiti River virus* (KRV). Diferente do CFAV, o KRV foi isolado de mosquitos coletados na natureza. O KRV também causou efeito citopático em células de *Ae. albopictus* e não foi capaz de se replicar em células de vertebrados (CRABTREE et al., 2003). Um terceiro ISV pertencente ao gênero *Flavivirus*, o *Culex flavivirus* (CxFV), foi detectado em 2007 em mosquitos *Culex* spp. coletados no Japão (HOSHINO et al., 2007). O CxFV é amplamente distribuído mundialmente, tendo sido isolado na Guatemala, México, Estados Unidos, Itália, Uganda, Europa, China, Brasil, Tailândia e Argentina (MORALES-BETOULLE et al., 2008; COOK et al., 2009; FARFAN-ALE et al., 2009; KIM et al., 2009; NEWMAN, CHRISTINA M. et al., 2011; SAIYASOMBAT et al., 2011; BOLLING et al., 2012; MACHADO et al., 2012; FERNANDES et al., 2016). Com os avanços na detecção de vírus e a ampliação da pesquisa de campo por arboviroses de relevância médica, novos ISVs têm sido descobertos (YAMAOKA et al., 2009; CALZOLARI et al., 2012; HOSHINO et al., 2012; PARREIRA et al., 2012; KOLODZIEJEK et al., 2013; MARKLEWITZ et al., 2013). Dentre os ISVs isolados nos últimos anos, inclui-se o Sabethes Flavivirus (SbFV), isolado recentemente em células C6/36 a partir de amostras de mosquitos *Sabethes belisarioi* coletados no Brasil (GRAVINA et al., 2019).

1.2.5.2 Manutenção dos ISVs na natureza

O ciclo transmissão dos arbovírus tem três componentes essenciais: o vírus, o vetor artrópode e o hospedeiro vertebrado, com o vírus se replicando no vetor invertebrado e no hospedeiro vertebrado (WOODRING et al., 1996). Em contraste, os vírus específicos de insetos não possuem essa habilidade de se replicar em células de vertebrados, sendo a maioria dos ISVs isolados usando células C6/36 (de *Ae. albopictus*) (BOLLING et al., 2015). Estudos têm demonstrado que além da transmissão horizontal, ISVs podem ser transmitidos verticalmente, através da fêmea adulta para sua prole (LUTOMIAH et al., 2007; SAIYASOMBAT et al., 2011; BOLLING et al., 2012).

Diferente do sistema imune dos mamíferos, os mosquitos não possuem sistema imune adaptativo e são dependentes da resposta imune inata para combater infecções virais. Como resultado, o reconhecimento do vírus pelo mosquito ativa vias da resposta imune inata que levam à transcrição de genes responsáveis por respostas antivirais (LEE et al., 2019). Entre essas vias, a principal resposta a infecções virais é por meio da ativação da via de RNAs de interferência (RNAi). Essa via de RNAi produz pequenos RNAs que marcam o RNA viral para degradação e portanto reduzindo a replicação viral (GOIC et al., 2016; LEE et al., 2019). Apesar

dessa ativação da resposta imune inata em mosquitos durante infecções virais, os vírus não são completamente eliminados dos mosquitos. Dessa forma, uma infecção persistente, com pouca ou nenhuma interferência na competência vetorial, pode ser estabelecida em mosquitos, o que os torna vetores eficientes para arboviroses (LEE et al., 2019). O mecanismo pelo qual esses vírus se mantêm nos mosquitos ainda é pouco entendido, no entanto estudos recentes têm demonstrado que essa característica pode estar relacionada à geração de genomas virais defectivos (POIRIER et al., 2018)

Na literatura não há dados suficientes que descrevam a dinâmica de transmissão dos ISVs na natureza e os efeitos das infecções nos mosquitos. Portanto a descoberta e caracterização desses vírus pode fornecer informações valiosas sobre os mecanismos pelos quais há a restrição de sua transmissão para hospedeiros vertebrados e seu impacto no alcance de hospedeiros. Devido a sua incapacidade de infectar células de vertebrados, os ISVs têm um enorme potencial como agentes de controle biológico de viroses patogênicas e seus vetores.

1.2.5.3 Aplicação biológica para vírus específicos de insetos

Medidas de controle biológico envolvem o uso de predadores naturais ou de patógenos para reduzir a população de mosquitos ou a competência de transmissão do vetor. Um exemplo de controle biológico consiste no uso da bactéria *Wolbachia* para inibir a transmissão de determinados vírus (HEDGES et al., 2008).

Estudos têm demonstrado que alguns ISVs podem alterar a susceptibilidade de mosquitos a certas arboviroses. Em alguns casos, essa coinfeção leva à redução da infecção pelo arbovírus como foi demonstrado por Baidaliuk e colaboradores quando analisaram a coinfeção do ISV CFAV com os vírus ZIKV e DENV (KENT et al., 2010; BOLLING et al., 2012; HOBSON-PETERS et al., 2013; BAIDALIUK et al., 2019).

Além do potencial para uso no controle da transmissão de arboviroses, os ISVs também podem ser usados como plataformas para o desenvolvimento de vacinas ou diagnósticos. O alphavirus Eilat (EILV), por ex., não é capaz de se replicar em células de vertebrados. Essa característica foi explorada através de tecnologia de DNA recombinante para gerar uma quimera de EILV com um alphavirus patogênico. Esse vírus quimérico foi capaz de entrar em células de vertebrado, mas não foi capaz de se replicar, tornando-se portanto não infeccioso para vertebrados (NASAR et al., 2012, 2015). Um estudo mostrou que uma quimera feita entre os vírus EILV e chikungunya se mostrou eficiente para ser usada em ensaios de imunoabsorção

enzimática (ELISA), sendo um insumo mais seguro por não se replicar em células de vertebrados (ERASMUS et al., 2015).

1.3 COINFECÇÕES

Estudos recentes indicam que a simbiose bacteriana com mosquitos pode alterar a competência de transmissão de arboviroses pelos mosquitos (ROCHA et al., 2019). Além da presença de bactérias, também foi descoberta a presença de vírus específicos de insetos na microbiota dos mosquitos (CALISHER et al., 2018). A cocirculação de ISVs e arbovírus patogênicos para humanos é comumente observada devido à ampla disseminação de insetos em todo o mundo e o compartilhamento do mesmo nicho ecológico, porém pouco se sabe sobre a interação entre estes grupos de vírus.

A dinâmica de um vírus dentro do hospedeiro pode ser afetada por diversos fatores, como fatores ambientais, parentais e também da presença em sua microbiota de outros microrganismos capazes de infectar esse hospedeiro (Figura 8) (Bolling et al., 2012; PEPIN et al., 2008). Nesse contexto, a interferência decorrente de uma coinfeção por dois vírus em células de insetos tem sido estudada visando entender se a infecção por um vírus não transmissível a humanos pode alterar a infecção pelo vírus patogênico (BURIVONG et al., 2004).

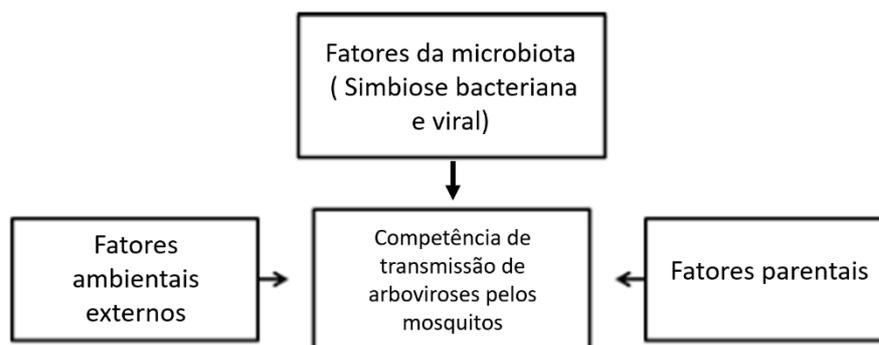


Figura 8 – A competência de transmissão de arbovírus por mosquitos pode ser afetada por fatores extrínsecos e intrínsecos. Fonte: Adaptado de Bolling et al. (2012).

A competição entre os vírus em uma coinfeção pode ser influenciada pelo intervalo de tempo em que as infecções ocorreram, podendo ser simultâneas ou em momentos diferentes, e pode resultar em uma redução ou aumento da replicação de um dos vírus (PEPIN et al., 2008). O processo no qual um hospedeiro infectado com um vírus não suporta uma replicação produtiva do mesmo vírus ou similar é chamada de exclusão por superinfecção e tem sido reportada para uma variedade de vírus (FARFAN-ALE et al., 2009). A competição pode ocorrer

inclusive entre sorotipos diferentes do mesmo vírus. No caso, culturas de células de mosquitos infectadas com um sorotipo de DENV podem ser menos suscetíveis à infecção por um segundo sorotipo (PEPIN; et al., 2008).

Já foi demonstrado que a coinfeção entre ISFs e arbovírus de relevância médica pode interferir na replicação de um dos vírus (BOLLING et al., 2012). Isso pode indicar um desafio para a interpretação de padrões epidemiológicos dos arbovírus, já que os ISVs podem interferir na capacidade vetorial de mosquitos para estes arbovírus. Além disso, se ocorrer a interferência na coinfeção entres ISVs e outros arbovírus, as áreas nas quais os ISVs são altamente prevalentes podem apresentar um risco aumentado ou resistência a um possível surto dependendo dos vírus envolvidos.

Dessa forma, o presente trabalho visou ampliar os conhecimentos sobre a interação do ZIKV e DENV com ISFs *in vitro*. Este estudo tem relevância dentro do contexto epidemiológico atual e pode resultar em um melhor entendimento sobre a replicação e a dinâmica de transmissão do ZIKV e do DENV em mosquitos, considerando-se uma possível coinfeção com outro flavivírus com replicação exclusiva em insetos, como os vírus *Culex flavivirus* e *Sabethes flavivirus*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito de flavivírus específicos de insetos na infecção pelos vírus ZIKV e DENV *in vitro* no contexto de coinfeções.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar ISFs a partir de mosquitos naturalmente infectados;
- Produzir e caracterizar anticorpos monoclonais contra os ISFs;
- Padronizar modelos *in vitro* de coinfeção por ISFs e pelos vírus ZIKV ou DENV;
- Avaliar os efeitos *in vitro* da coinfeção por ISF na infecção por ZIKV ou DENV em células de mosquito, analisando a susceptibilidade das células a estas infecções e o efeito sobre a geração de novas partículas virais, em comparação com as mesmas infecções separadamente.

3 METODOLOGIA

3.1 SOLUÇÕES, TAMPÕES E MEIOS DE CULTURA

- Tampão fosfato (PBS 1x): Cloreto de sódio 0,137 M; cloreto de potássio 2,7M; fosfato dissódico 10M; fosfato monopotássico 1,8M; pH 7,2-7,6.
- Meio L-15 completo: Meio Leibovitz-15 suplementado com 25 µg/mL de gentamicina, 0,26% de triptose e 5% de soro bovino fetal (SBF) inativado.
- Meio L-15 incompleto: Meio Leibovitz-15 suplementado com 25 µg/mL de gentamicina e 0,26% de triptose.
- Meio DMEM F12: Meio Dulbecco modificado por Eagle/Nutriente HAM F12 suplementado com 14,0 mM de bicarbonato de sódio, 10% de SBF inativado, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.
- Meio RPMI-1640 completo: Meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF inativado, 23,8 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de L-glutamina, 1,0 mM de piruvato de sódio, 9,6 mM de HEPES, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B.
- Meio HAT: meio RPMI-1640 suplementado com 20% de SBF inativado, 23,8 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de L-glutamina, 1,0 mM de piruvato de sódio, 9,6 mM de HEPES, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B, 0,1 mM de hipoxantina, 0,0004 mM de aminopterina e 0,016 mM de timidina.
- Meio Schneider's: Meio segundo Schneider suplementado com 7% de SBF inativado, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina.
- Meio semi-sólido (*overlay*): 50% de meio L-15 suplementado com 10% de SBF, 0,52% de triptose e 50 µg/mL de gentamicina e 50% de carboximetilcelulose (CMC) 3,2% (v/v).
- Tampão STE: 10 mM de Tris HCl pH 7,5, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA pH 8,0.
- Solução de lise de hemácias: 166,4 mM de cloreto de amônio, 9,5 mM de bicarbonato de potássio, 1,16 mM de EDTA em água bidestilada; pH 7,4.

3.2 LINHAGENS CELULARES

- Células P3X63Ag8.653: linhagem de mieloma murino; utilizadas para a geração de hibridomas. As células P3X63Ag8.653 e os hibridomas foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.
- Células C6/36: derivadas de larvas de mosquito *Aedes albopictus* e mantidas a 28°C em meio L-15 completo.
- Células AP61: Células derivadas de larvas de mosquito *Aedes pseudoscutellaris*; mantidas a 28°C em meio L-15 completo, porém com 10% de SBF.
- Células Aag-2: Células isoladas de *Aedes aegypti* mantidas a 28°C em meio Schneider's completo.
- Células Vero E6: Clone das células Vero 76, derivadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Foram cultivadas em meio DMEM F12 e mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.
- Células Huh7.5: Clone da linhagem Huh7, células derivadas de hepatocarcinoma humano. Foram cultivadas nas mesmas condições da célula Vero E6.
- Células BHK-21: Células derivadas de fibroblastos de rim de hamster recém-nascidos e mantidas nas condições descritas para as células Vero E6.
- Células UMNSAH/DF-1: Células derivadas de fibroblasto embrionário de galinha, mantidas nas mesmas condições descritas para Vero E6.

3.3 VÍRUS UTILIZADOS

- Vírus dengue: Foram utilizados o DENV-1 13400, isolado viral obtido a partir do soro de um paciente do estado do Paraná em 2013; DENV-2 (BR/01-01), DENV-3 (290-02) e DENV-4 (TVP 360). O sobrenadante de estoque da passagem 4 foi coletado 6 dias pós-infecção (d.p.i).
- YFV: Foi utilizado a cepa vacinal 17DD (Biomanguinhos, Fiocruz). O sobrenadante foi obtido após três passagens em células Vero.
- ZIKV ZV BR 2015/15261 (GenBank MF073358): Isolado de ZIKV obtido a partir do soro de um paciente do Rio Grande do Norte em 2015 (STROTTMANN et al., 2019). O sobrenadante da passagem 4 foi coletado 6 d.p.i.
- SbfV MS42 (GenBank MH899446): O vírus SbfV foi isolado a partir de um *pool* de mosquitos *Sabethes belisarioi* (GRAVINA et al., 2019). O vírus causa efeito citopático (ECP) nas células C6/36, portanto seu sobrenadante foi coletado 4 d.p.i.

- CxFV MS367: O vírus CxFV foi isolado e caracterizado no decorrer deste trabalho. O vírus foi utilizado na passagem 4 e, devido à geração de ECP nas células C6/36, o sobrenadante foi coletado 3 d.p.i.

3.4 TÉCNICAS GERAIS

3.4.1 Estoque viral

A fim de obter os estoques virais, células C6/36 foram plaqueadas em garrafas para cultivo de células na densidade de 1×10^7 células/300cm² em meio de cultivo L-15 completo no dia anterior à infecção. No dia seguinte, o meio de cultivo foi retirado e adicionado o inóculo com vírus na multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 preparado em 5 ml de meio L-15 incompleto. As células foram mantidas durante 1 hora a 28°C e então o inóculo foi retirado e foram adicionados 100 ml de meio L-15 completo. O sobrenadante das células foi coletado em tempos diferentes para cada vírus, aliquotado e armazenado a -80 °C para posterior titulação.

3.4.2 Imunofluorescência indireta

Para a técnica de imunofluorescência indireta (IFI), as células infectadas foram fixadas por adição de 50 µL/poço de metanol:acetona (1:1) e incubação a -20°C por no mínimo 30 minutos. Após a fixação, a solução de metanol:acetona foi devidamente descartada e os poços secos.

As células foram incubadas com o anticorpo primário de interesse (50 µL/poço) durante 1 h a 37°C, seguido de lavagem com PBS 1x e incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 na diluição de 1:400 em PBS 1x. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x e incubados com 4'-6-diamidino-2-fenolindol (DAPI) a 0,3 µM em PBS durante 10 min para visualização do núcleo celular. Após essa incubação, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x e preparados para leitura em microscópio de fluorescência com adição de 50 µL/poço de PBS 1x. As imagens foram adquiridas no *Operetta CLS high-content imaging system* (PerkinElmer) com uma objetiva de 20x e a quantificação foi realizada usando o *software Harmony High-Content Imaging and Analysis* (PerkinElmer).

3.4.3 Titulação viral

O sobrenadante das células infectadas foi diluído em meio L-15 incompleto nas diluições de 10^{-1} a 10^{-11} . O inóculo (400 μL /poço) foi adicionado em células C6/36 (1×10^5 células/poço), em placa de 24 poços, por 1h a 28°C para adsorção do vírus. Como controle negativo, foi utilizado o meio L-15 incompleto. Após o período de incubação, o inóculo foi retirado e foi adicionado *overlay*. A placa foi incubada por até 7 dias a 28°C e então a revelação foi realizada por detecção de unidades formadoras focos ou por coloração de placas de lise, para os vírus que apresentam ECP (KENT et al., 2010).

Para detectar os focos virais, após a retirada do *overlay*, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído a 3% (500 μL /poço por 20 minutos a temperatura ambiente) e permeabilizadas por adição de 200 μL /poço de Triton™ X-100 a 0,5% em PBS 1x por 4 min a temperatura ambiente. Após esse tempo, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x e 200 μL /poço do anticorpo primário contra o vírus analisado foram adicionados e incubados durante 1 h a 37°C . Depois da incubação, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x com posterior adição de 200 μL /poço do anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina), com incubação por 1 h a 37°C . A revelação foi realizada por meio da adição de solução contendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e cloreto nitro-azul de tretazólio (NBT) a temperatura ambiente e no escuro durante 30 min. A reação foi interrompida quando houve o aparecimento dos focos por meio da lavagem dos poços com água desmineralizada. O título viral foi expresso em unidades formadoras de focos por mL (FFU/mL), utilizando-se a fórmula 1 para o cálculo.

Para realizar a contagem por unidades formadoras de placas, após a fixação das células com paraformaldeído, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x e incubados com 200 μL /poço do corante cristal violeta durante 30 min a temperatura ambiente. Após a incubação, o corante foi devidamente descartado e os poços foram lavados com água corrente cuidadosamente para não descolar a monocamada celular. Após a completa secagem dos poços, as placas de lise foram contadas e o resultado aplicado à fórmula 1. O título foi expresso em unidades formadoras de placas por ml (PFU/ml).

Fórmula 1 – Cálculo para obtenção do título viral.

$$\frac{\text{Média do número de focos ou placas}}{\text{Volume do inóculo}} \times \text{Diluição}$$

3.4.4 Extração de RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada a partir do sobrenadante das células infectadas utilizando o *kit QIAamp Viral RNA mini* (QIAGEN) procedimento *Mini spin*. Primeiramente, 140 µL do sobrenadante foram diluídos em 560 µL do tampão “AVL” – tampão de lise contendo “RNA carrier” – seguido por homogeneização e incubação a temperatura ambiente durante 10 min. Então foram adicionados 560 µL de etanol absoluto e, após homogeneização, 630 µL desta solução foram transferidos para uma coluna com membrana de sílica fornecida pelo fabricante, sobre um tubo coletor de 2 mL. Realizou-se a centrifugação da solução por 1 min a 8.000 rpm e posteriormente o tubo coletor foi descartado e substituído por um novo; essa etapa foi repetida até que todo o volume da amostra foi centrifugado. Após esse processo, foram adicionados 500 µL do *Buffer AW1* à coluna, seguido de centrifugação por 1 min a 8.000 rpm. Novamente o tubo coletor foi descartado e substituído por um novo. Em seguida, 500 µL do *Buffer AW2* foram adicionados à coluna e seguiu-se com centrifugação por 14.000 rpm durante 3 min. Seguindo as recomendações do fabricante para melhores resultados, uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 1 min foi realizada e então, para a etapa de eluição, o tubo coletor foi substituído por um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados 60 µL do tampão *AVE* à coluna, e foi realizada a centrifugação a 8.000 rpm por 1 min. O RNA eluído foi armazenado a -80°C.

3.4.5 Síntese de cDNA

A partir do RNA viral, foi realizada a transcrição reversa para síntese do cDNA utilizando *random primer*. Foram adicionados a um microtubo de 1,5 mL livre de RNAses 5,6 µL de RNA e 2,5 µL de *random primer* (100 pmol/µL) seguido de aquecimento por 5 min a 70°C. Posteriormente, adicionou-se 11,9 µL da mistura de tampão e enzimas preparada previamente (4,0 µL de tampão de reação 5X (Promega) 2,4 µL de MgCl₂ (25 mM, Promega), 4 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de RNase out, 1 µL de transcriptase reversa (Improm II, Promega) e seguiu-se para uma nova incubação durante 5 min a 25°C e 42°C durante 1 h.

3.5 OBTENÇÃO DE VÍRUS ESPECÍFICO DE INSETO

3.5.1 Isolamento viral

Os isolamentos de ISFs foram realizados a partir dos homogeneizados de mosquitos identificados com ES09, ES42 e MS367, que foram coletados na natureza recebidos e previamente testados no Laboratório de Referência em Virose Emergentes do ICC/Fiocruz-PR. A infecção por flavivírus foi confirmada pela técnica de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos genéricos (SÁNCHEZ-SECO et al., 2005).

A inoculação foi feita nas células C6/36, AP61 e/ou Aag-2, semeadas 24h antes do experimento na concentração $1,0 \times 10^6$ células, em garrafas de cultivo de 25 cm² com o respectivo meio de cultivo. No dia da infecção, o meio de cultivo foi removido e o homogeneizado de mosquitos foi diluído (1:10, em volume final de 500 µL) em meio de cultivo sem SBF, filtrado em 0,22 µm e adicionado sobre o tapete celular. Como controle negativo, filtrou-se apenas o meio L-15 para as células C6/36 e AP61 e o Schneider's para a célula Aag-2. Após essa etapa, as garrafas foram incubadas durante 1h em estufa de *Biological Oxygen Demand* (B.O.D.), a 28°C e homogeneizadas a cada 20 min.

Após a incubação, foram adicionados 4,5 ml do respectivo meio de cultivo para cada célula. As garrafas foram mantidas a 28°C por 14 dias ou até que fosse observado ECP, sinalizando o isolamento viral. Foram realizadas até três passagens a partir de 500 µL do sobrenadante das células da passagem anterior para cada tentativa de isolamento (HOSHINO et al., 2007). A confirmação do isolamento foi feita por RT-PCR para detecção de genoma de flavivírus (SÁNCHEZ-SECO et al., 2005) utilizando-se RNA extraído a partir do sobrenadante de cultivo celular.

3.5.2 Confirmação do isolamento viral por RT-PCR

As reações de *nested* RT-PCR para teste dos isolamentos foram realizadas com os oligonucleotídeos genéricos para *Flavivirus* descritos por Sánchez-Seco et al. (2005) (Tabela 2). Para tanto, preparou-se um *mix* contendo 5,0 µL de tampão de reação 10X (Invitrogen®), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen®), 5 µL de dNTPs a 2,5 mM (Invitrogen®), 4 µL de cada oligonucleotídeo (Flavi 1+ e Flavi 1- para a primeira reação de amplificação – PCR1 – ou Flavi 2+ e Flavi 2- para a segunda reação – PCR2) a 10 pmol/µL, q.s.p. 50 µL de água livre de nucleases (Invitrogen®), 1 µL de Taq DNA polimerase a 5 U/µL e 5 µL do cDNA previamente preparado (para a PCR1) ou do produto da PCR1 (para a PCR2). Os ciclos de amplificação

estão representados na Figura 9. As reações foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCRsystem 9700 (ThermoFisher Scientific©). Como controles, foram utilizados RNA extraído do MOCK da infecção (controle negativo), água livre de nucleases (branco) e RNA de DENV-1 13400 (controle positivo). Para visualização, 5 µL dos produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-PCR genérica para detecção de flavivírus. Os símbolos (+) e (-) correspondem aos iniciadores *forward* e *reverse*, respectivamente. As posições indicadas correspondem ao genoma de YFV cepa 17DD (número de acesso no GenBank: U17066). Fonte: Adaptado de SÁNCHEZ-SECO et al. (2005).

Iniciador	Sequência
Flavi1+	5' ₇₈₇₁ GAYYTIGGITGYGGIIGIGGIRGITGG ₇₈₉₇ 3'
Flavi1-	5' ₉₂₅₅ TCCCAICCGCIRTRTCRTCIGC ₉₂₃₃ 3'
Flavi2+	5' ₈₉₈₇ YGYRTIYAYAWCAYSATGGG ₉₀₀₆ 3'
Flavi2-	5' ₉₁₃₀ CCARTGITCYKYRTTIAIRAAICC ₉₁₀₇ 3'

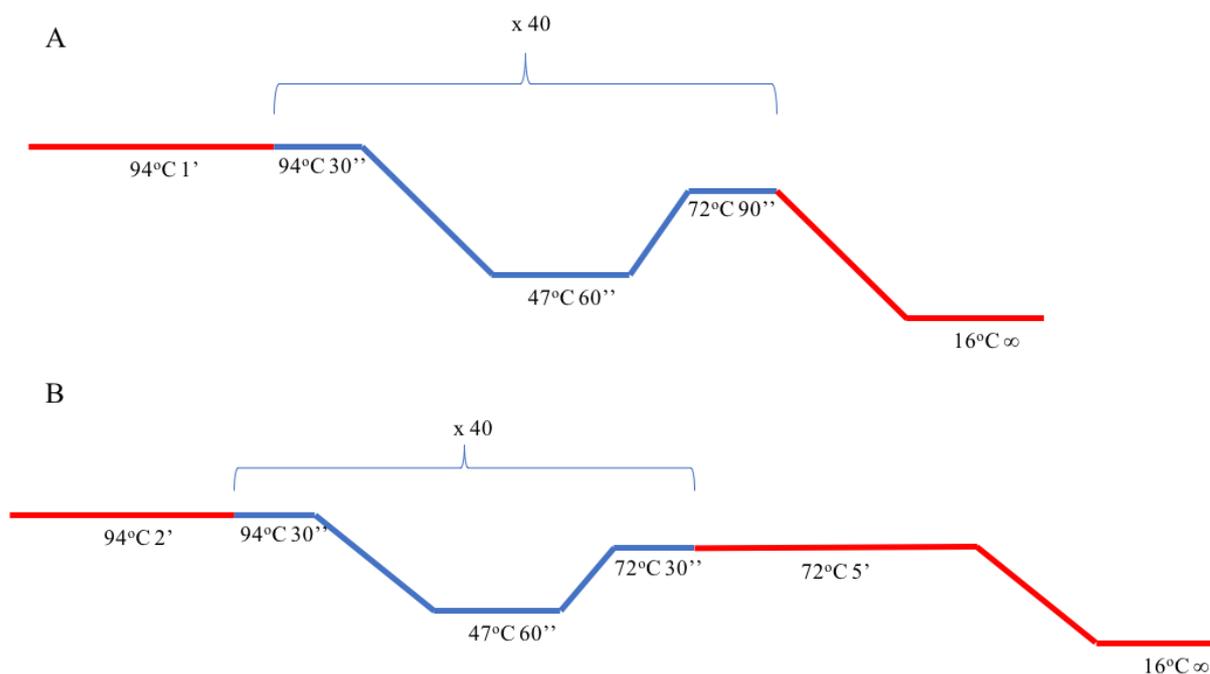


Figura 9 – Ciclos de amplificação da RT-PCR genérica para flavivírus. (A) Ciclo da primeira reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos Flavi1+ e Flavi1- (B) Ciclo da *nested*-PCR, utilizando os iniciadores Flavi2+ e Flavi2-.

3.5.3 Caracterização viral

A caracterização viral foi realizada com base no protocolo estabelecido por Wang e colaboradores (2017).

3.5.3.1 Sequenciamento do genoma viral

Para confirmar a identidade do vírus isolado, o produto da PCR1 descrita no item 3.6.1 foi purificado utilizando o *QIAquick® Gel Extraction (Qiagen)* seguindo as recomendações do fabricante. O produto de PCR purificado juntamente com os oligonucleotídeos Flavi1+ e Flavi1- descritos na Tabela 2 foram enviados para sequenciamento no IOC/FIOCRUZ.

Adicionalmente, foi realizada uma reação de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para CxFV (Newman et al., 2011). Para tanto, preparou-se um *mix* contendo 5 µL do cDNA previamente preparado, 5,0 µL de tampão de reação 10X (Invitrogen®), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen®), 1 µL de dNTPs a 10 mM (Invitrogen®), 4 µL de cada oligonucleotídeo (CxFV_8880_F e CxFV_9538_R) a 10 mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase a 5 U/µL, e q.s.p. 50 µL de água livre de nucleases (Invitrogen®). A amplificação foi realizada de acordo com o seguinte: 94°C durante 4 minutos para desnaturação seguida de 35 ciclos (94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, e 72 °C por 1 minuto) e de incubação a 72 °C durante 5 minutos para extensão final. Para visualização, 5 µL dos produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio. O produto dessa PCR foi purificado e enviado para sequenciamento, da mesma forma que descrito acima.

A identidade dos vírus foi confirmada utilizando a ferramenta BLAST.

3.5.3.2 Análise da infecção em diferentes linhagens celulares

Para comprovação de que o vírus é um ISF, foi avaliada a capacidade de infecção de linhagens celulares derivadas de diferentes espécies de mosquitos e de vertebrados. Para tanto, o vírus foi utilizado para infecção de células C6/36, AP61 e Aag-2, além das células BHK-21, UMNSAH/DF-1, Huh7.5 e Vero E6.

Para tanto, as células foram semeadas em placas de 24 poços 18-24h antes da infecção nas seguintes concentrações: C6/36 (1 x 10⁵ células/poço), AP61 (2 x 10⁵ células/poço), Aag-2 (2 x 10⁵ células/poço), BHK-21 (1 x 10⁵ células/poço), UMNSAH/DF-1 (0,5 x 10⁵ células/poço), Huh7.5 (1 x 10⁵ células/poço) e Vero E6 (1 x 10⁵ células/poço). As células foram infectadas com CxFV a um MOI de 0,1, com inóculo de 400 µL/poço preparado em meio L-15 incompleto. Como controle positivo da infecção, foi utilizado o vírus DENV-1 a um MOI de 0,5; como controle negativo (MOCK), foi utilizado meio de cultivo celular. As placas foram

incubadas com o inóculo durante 1 hora a 28 °C, e então foram lavadas três vezes com PBS 1x com posterior adição de meio L-15 completo. O experimento avaliou a infecção nos tempos 0 horas pós-infecção (h.p.i.) e 72 h.p.i. por meio de IFI com leitura no *Operetta CLS*.

3.6 OBTENÇÃO DOS HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ISFS

3.6.1 Imunização dos camundongos

Para a produção dos anticorpos monoclonais (AcMs), foram utilizados os vírus SbfV e CxFV purificados por colchão de sacarose. Para tanto, 1 litro do sobrenadante de cultura de células C6/36 infectadas com o SbfV ou com o CxFV foi precipitado por meio da adição de 7% de polietilenoglicol 8000 (PEG, PM = 8000) e 2,3% de NaCl com agitação *overnight* a 4°C. No dia seguinte, essa suspensão viral foi centrifugada durante 30 minutos a 10.000 rpm a 4°C, o precipitado resultante foi ressuscitado em 3,0 ml do tampão STE e purificado por centrifugação em colchão de sacarose 30/60% durante 2 horas a 39.000 rpm e 10°C. O material purificado foi armazenado no freezer -70°C e posteriormente titulado como descrito no item 3.4.2.

Camundongos *Mus musculus* da linhagem isogênica Balb/c com 30 a 45 dias de idade foram imunizados com os vírus purificados. Para tanto, os camundongos receberam quatro doses com $1,0 \times 10^6$ PFU/ml de SbfV ou $8,75 \times 10^4$ PFU/ml de CxFV por via intraperitoneal utilizando Alu-Gel-S (Serva) como adjuvante, seguindo de uma dose reforço por via endovenosa, sem adjuvante, com intervalo de 14 dias entre cada dose. A última dose foi administrada três dias antes da fusão para que houvesse uma elevação na produção de anticorpos.

Após a terceira dose, foi coletada uma alíquota de sangue dos camundongos. O soro foi utilizado para verificar se houve produção de anticorpos policlonais, por meio de imunofluorescência indireta, utilizando células infectadas com o SbfV ou CxFV e células não infectadas (MOCK). No dia da fusão, foi coletado sangue por punção cardíaca com o intuito de obter maior volume para uso do soro policlonal como controle positivo nos ensaios necessários. Devido à utilização de animais nesses experimentos, este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fiocruz, sendo aprovado sob os protocolos LW-2/17 e LW-27/19.

3.6.2 Fusão

Três dias após a última dose, os animais foram anestesiados, sacrificados e transportados para o laboratório imersos em álcool 70%. O baço de cada animal foi retirado dentro de cabine de segurança biológica por meio de incisão cirúrgica e macerados com o auxílio de lâminas estéreis de ponta fosca. A suspensão foi filtrada utilizando ponteiras estéreis de 1000 µL com filtro de nylon. Após a filtração, o material foi transferido para tubo cônico contendo 30 ml de meio RPMI-1640 sem SBF e centrifugado a 1500 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em solução de lise das hemácias gelada, com incubação por 5 min, seguida da adição de 45 ml meio RPMI-1640 sem SBF, e novamente centrifugado a 1500 rpm durante 10 min. Esse procedimento foi repetido duas vezes e então as células foram contadas em câmara de *Neubauer*.

Em paralelo, as células de mieloma P3X63Ag8.653 foram transferidas para um tubo cônico, centrifugadas e ressuspensas com meio RPMI-1640. Esse procedimento foi realizado três vezes, sendo que na última, as células foram recuperadas em 10 ml de RPMI-1640 incompleto e contadas em câmara de *Neubauer*.

Para a fusão, as células de mieloma e esplenócitos foram misturados na proporção 1:5 a 1:20. Foi adicionada solução de polietilenoglicol 4000 (PEG – Sigma-Aldrich) a 50% em meio RPMI-1640 para que houvesse a fusão entre as células, com posterior neutralização com meio RPMI-1640 e centrifugação. As células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 completo (com 20% SBF) em volume suficiente para obter a concentração $2,5 \times 10^6$ células/ml. As células foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços (100 µl/poço) e mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ (YOKOYAMA et al., 2013).

3.6.3 Triagem dos hibridomas

A seleção das células híbridas foi realizada por meio do cultivo em meio HAT (YOKOYAMA et al., 2013). No dia posterior à fusão, foram adicionados 100 µl de meio HAT por poço e, a cada 48 h, foram retirados 100 µl do meio de cultivo e adicionados 100 µl de meio novo. No 15º dia o meio HAT foi substituído por meio HT (meio HAT sem aminopterina) para que as células se adaptassem à retirada da aminopterina. A partir do 20º dia, foi utilizado meio RPMI-1640 com 20% de SBF e antibióticos.

O crescimento das células foi acompanhado visualmente utilizando microscópio óptico. Nos primeiros dias após a fusão, foi possível notar a presença dos dois tipos de células utilizadas na fusão – esplenócitos e mielomas. No entanto, devido à presença do meio HAT, que torna inviável a sobrevivência das células de mieloma, e da incapacidade de esplenócitos

sobreviverem *in vitro* por longos períodos de tempo, somente as células híbridas sobreviveram. Quando o crescimento das células híbridas foi notado pela presença de várias células juntas sem sinais de morte celular e apresentando ~75% de confluência, foram iniciados os testes de triagem por IFI. Para tanto, foi realizada a infecção de células C6/36 com SbfV ou CxFV em placas de 96 poços e, após 72 h, seguiu-se com a IFI, conforme descrito no item 3.4.1. 100 µl dos sobrenadantes de cultura dos hibridomas apresentando crescimento foram utilizados como anticorpo primário. Nenhum controle positivo foi utilizado, já que se tratava de um vírus recentemente isolado e, portanto, ainda não possuía anticorpos comerciais específicos, nem foi reconhecido pelo anticorpo anti-flavivirus 4G2; como controle negativo, foi utilizado um anticorpo não relacionado (anti-hantavírus). Os hibridomas positivos nesta primeira triagem foram transferidos para uma placa de 24 poços contendo 1 ml de meio de cultivo.

3.6.4 Clonagem e congelamento dos hibridomas

Os hibridomas com reação positiva na triagem descrita anteriormente foram submetidos a diluição limitante em placas de 96 poços para obtenção de anticorpos monoclonais. Para isto, adicionou-se 100 µL/poço de meio RPMI-1640 suplementado com 20% de SBF em placas de 96 poços. As células foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas para uma concentração de 100 células/100µL. Foram então adicionados 200 µL/poço das células na primeira coluna da placa previamente preparada com 100 µL/poço de meio de cultivo. Após essa etapa foi realizada uma diluição seriada, passando 100 µL da suspensão celular do poço com células para o poço seguinte. Os poços contendo apenas uma célula por poço foram identificados. As placas foram mantidas em condições de cultivo até que foi observado o crescimento celular a partir de um único clone. Esses poços contendo crescimento monoclonal foram expandidos e novamente submetidos a diluição limitante para garantir a secreção de anticorpos monoclonais. Após a segunda diluição limitante, os hibridomas foram expandidos e congelados em nitrogênio líquido (meio de congelamento: 90% SBF + 10% DMSO). Após 7 dias do congelamento, cada hibridoma foi descongelado e teve sua estabilidade testada através de IFI nas mesmas condições usadas para triagem dos hibridomas.

3.6.5 Caracterização dos Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos tiveram seus isotipos e subtipos definidos utilizando o *kit* comercial *SBA Clonotyping™ System/HRP* (Southern Biotech), seguindo as instruções do fabricante.

A especificidade dos anticorpos monoclonais foi avaliada por IFI utilizando células C6/36 infectadas com os vírus SbfV MS42, CxFV MS367, DENV-1 13400, DENV-2 BR/01-01, DENV-3 290-02 ou DENV-4 TVP 360, e células HuH7.5 infectadas com YFV 17DD a um MOI de 0,75 por 72 h, além de células não infectadas (MOCK). A IFI foi realizada conforme descrito no item 8.4.2.

3.6.6 Concentração dos anticorpos monoclonais

A partir do sobrenadante de cultivo dos hibridomas, os anticorpos foram concentrados por meio da precipitação com sulfato de amônio a 50%, seguindo o protocolo descrito por Perrin et al. (1996), e dialisados contra PBS 1x *overnight* a 4°C. Os AcM foram testados por IFI em células infectadas com o respectivo vírus para avaliar qual a melhor diluição a ser usada em futuros experimentos. As diluições testadas foram 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400.

3.7 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE COINFECCÃO

3.7.1 Avaliação da cinética de crescimento dos vírus

Para padronizar o MOI e tempo de infecção que seriam utilizados nos experimentos de coinfeccção, foi realizada uma cinética com cada um dos vírus utilizados: ZIKV, DENV-1, SbfV e CxFV.

A cinética foi realizada utilizando células C6/36 ($1,25 \times 10^4$ células/poço), plaqueadas 24 h antes da infecção em placas de 24 poços. No dia da infecção, foi preparado o inóculo com os vírus nos MOIs de 0,01, 0,1 e 1 em meio L-15 incompleto. O meio das células foi retirado e 400 µL do inóculo foi cuidadosamente adicionado, evitando danificar a monocamada de células. As placas foram incubadas a 28 °C durante 1h. Após a incubação, o inóculo foi retirado dos poços e foi realizada uma lavagem com 500 µL de PBS 1x para garantir a total remoção do inóculo. Então, 1 mL de meio L-15 completo foi adicionado às células. As infecções foram avaliadas a cada 24 h, nos dias 0 a 6 pós infecção, por meio de IFI com leitura no *Operetta CLS* para avaliar a cinética de crescimento de cada vírus. Foram selecionadas as condições de infecção necessárias para ter aproximadamente 50% das células infectadas.

3.7.2 Geração de células persistentemente infectadas com SbFV

Para mimetizar o que ocorre na natureza, células C6/36 infectadas com SbFV foram submetidas a sucessivas passagens visando a obtenção de uma infecção persistente antes de serem infectadas com ZIKV ou DENV. O protocolo para o estabelecimento de infecção persistente foi definido com base nos artigos de Puff et al. (2009), Kuwata et al. (2015), Luwanika et al. (2015) e OH et al. (2016). Resumidamente, as células foram infectadas com SbFV a um MOI de 0,1 (passagem 0) com posterior realização de 30 passagens para estabelecimento da linhagem persistentemente infectada. Para cada passagem, as células foram recuperadas por raspagem e 1/10 da suspensão celular foi transferido para uma nova garrafa de cultivo celular contendo meio L-15 completo. A infecção foi monitorada por RT-PCR, conforme descrito no item 3.5.2, utilizando o RNA extraído do sobrenadante das células em cultivo (ver item 3.5). A infecção persistente foi confirmada ainda por IFI (presença de proteínas virais no meio intracelular) e titulação viral (secreção de partículas virais infecciosas).

3.8 COINFECCÕES ENTRE O VÍRUS SbFV COM OS VÍRUS ZIKV OU DENV-1

Conforme os resultados obtidos na padronização, os ensaios de coinfeção foram realizados em placas de 24 poços com células C6/36 ($1,25 \times 10^4$ células/poços). Para realizar as coinfeções, foram utilizados diferentes intervalos de tempo entre a infecção das células com os diferentes vírus (Figura 10). Para tanto, as células foram infectadas com o SbFV (MOI 0,1) no dia 0, seguido de DENV-1 (MOI 0,1) ou ZIKV (MOI 0,1) nos dias 0 ou 3, com coleta e análise do sobrenadante nos dias 0, 3 e 6. Em paralelo, as infecções por DENV-1 e ZIKV foram realizadas nas células C6/36 com infecção persistente pelo SbFV.

As análises foram realizadas por IFI para avaliar o percentual de células infectadas e titulação viral para quantificação de partículas infecciosas.

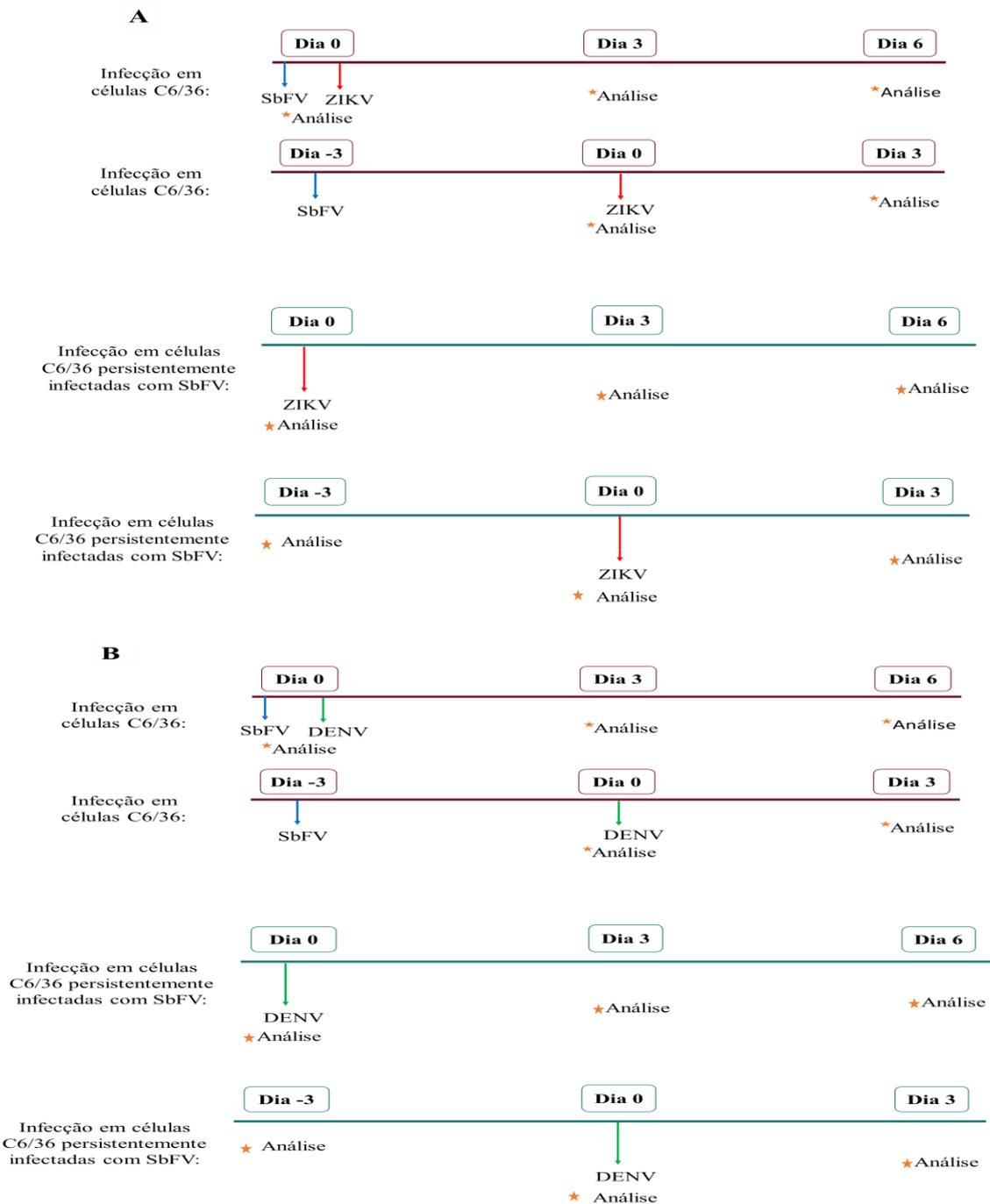


Figura 10 - Esquema utilizado para realizar as coinfeções entre os vírus SbFV e ZIKV ou DENV-1. Em (A) está representado o esquema para o vírus ZIKV. Em vermelho está representado o experimento utilizando a linhagem celular de C6/36, que foi coinfectedada no dia 0 do experimento com SbFV e ZIKV (primeiro esquema) ou infectada no dia 0 com SbFV e, posteriormente, no dia 3, com ZIKV (segundo esquema). Em verde está representado o experimento com a linhagem celular de C6/36 persistentemente infectada com SbFV (obtida nesse trabalho), que foi infectada com ZIKV no dia 0 (primeiro esquema) ou no dia 3 (segundo esquema). Na figura B está representado o esquema para o vírus DENV-1, que seguiu os mesmos parâmetros definidos em (A). A análise está indicada nos dias que houve coleta de sobrenadante para titulação viral e fixação das células para análise por IFI.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicatas, com cada réplica realizada em duplicata. Para análise estatística, as diferenças entre as médias dos grupos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (*Two-Way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de comparação de Turkey, utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4 RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO VIRAL

Os isolamentos dos vírus foram realizados a partir de *pools* de amostras de mosquitos do gênero *Culex* spp. coletados nos estados do Espírito Santo e do Paraná. Primeiramente foram utilizadas as amostras ES42 e ES09 para realizar os isolamentos. Para ambas as amostras, não foi possível detectar o vírus na primeira passagem em células C6/36 por meio da visualização de ECP ou de RT-PCR. Na literatura é sugerido que para isolamentos de ISFs sejam feitas quatro passagens “às cegas” para garantir que haja RNA suficiente para ser extraído e detectado através de RT-PCR (HOSHINO et al., 2007; ROIZ et al., 2012; HADDOW et al., 2013). Portanto, seguimos o mesmo protocolo até a passagem 4. Contudo, não houve detecção viral.

Devido às dificuldades encontradas no isolamento do vírus a partir das amostras ES42 e ES09 em células C6/36, outras linhagens de células de mosquitos, AP61 e Aag2, foram incluídas na tentativa de isolamento a partir da amostra MS367 que é uma amostra composta por mosquitos do gênero *Culex* spp. coletados no estado do Paraná. Esta estratégia permitiu isolar o CxFV em células AP61 a partir do *pool* MS367. Neste isolamento, foi visualizado ECP 72 h após a realização da passagem 1. Um resumo dos dados das tentativas de isolamento de ISFs está resumido na Tabela 4.

Tabela 4 – Resumo dos isolamentos virais realizados.

Identificação do homogeneizado de mosquito	Local de coleta dos mosquitos	Linhagem celular utilizada para o isolamento	Resultado da RT-PCR para teste do isolamento
ES42	ES	C6/36	Negativo
ES09	ES	C6/36	Negativo
MS367	PR	C6/36, AP61 e Aag2	Positivo em AP61

Para confirmação da infecção pelo novo isolado viral, foi realizada RT-PCR genérica para flavivírus (Figura 11 A). Além disso, foi realizada RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para CxFV – 8880F e 9538R (NEWMAN et al., 2011), confirmando a identidade do vírus (Figura 11 B).

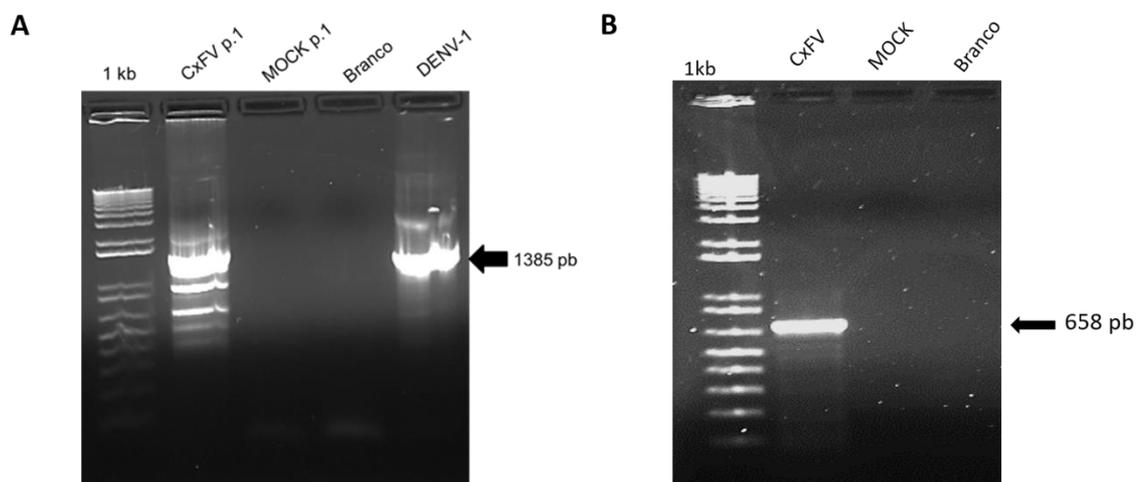


Figura 11 – Resultados das RT-PCR para confirmação do isolamento de CxFV em células AP61. (A) Resultado da amplificação por RT-PCR genérica para flavivírus utilizando os oligonucleotídeos Flavi 1+ e Flavi 1-. (B) Resultado da amplificação por RT-PCR realizada com os oligonucleotídeos específicos para CxFV 8880F e 9538R. Como controle positivo, foi utilizado RNA de DENV-1 13400 (A) e, como branco da reação, água livre de nucleases (A) e (B). Adicionalmente, foi utilizado como controle negativo o RNA extraído das células não infectadas (MOCK). 1 kb: marcador de tamanho molecular *1 kb plus DNA ladder* (Invitrogen). Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (1 µg/mL em TBE).

A identidade do vírus isolado também foi confirmada por sequenciamento do fragmento de DNA obtido a partir da primeira etapa de amplificação (PCR1) genérica para flavivirus. O alinhamento do fragmento gênico de 1018 pares de base (pb) obtido com o sequenciamento apresentou maior identidade com a sequência CxFV_BR/MT_CbaAr1256p2/2013 isolada de *Culex quinquefasciatus* obtido no Mato Grosso (95%) (GenBank: KY349933).

O CxFV isolado apresentou ECP em C6/36, o que tornou possível a titulação a partir da contagem das placas de lise formadas 7 d.p.i. Conforme protocolo estabelecido pelo Laboratório de Virologia Molecular, devem ser realizadas três passagens para geração de estoques virais, sendo a passagem 4 usada para realizar os experimentos. Portanto, foram realizadas quatro passagens do vírus, sendo obtidos os seguintes títulos: Passagem 1 – $9,2 \times 10^6$ pfu/mL; Passagem 2 – $4,6 \times 10^5$ pfu/mL; Passagem 3 – $2,3 \times 10^5$ pfu/mL; Passagem 4 – 5×10^4 pfu/mL. No entanto, a partir da quarta passagem, houve uma mudança no fenótipo das placas com a formação de placas maiores, quando comparado com a passagem 3 (Figura 12). Em função disso, foi necessária uma nova padronização da titulação. Para tanto, a titulação foi realizada com revelação nos tempos 7, 5 e 3 d.p.i., sendo esse último tempo selecionado para a revelação e contagem das placas de lise (Figura 12).

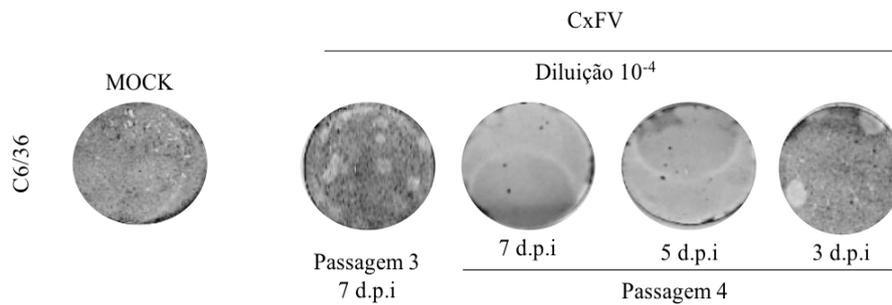
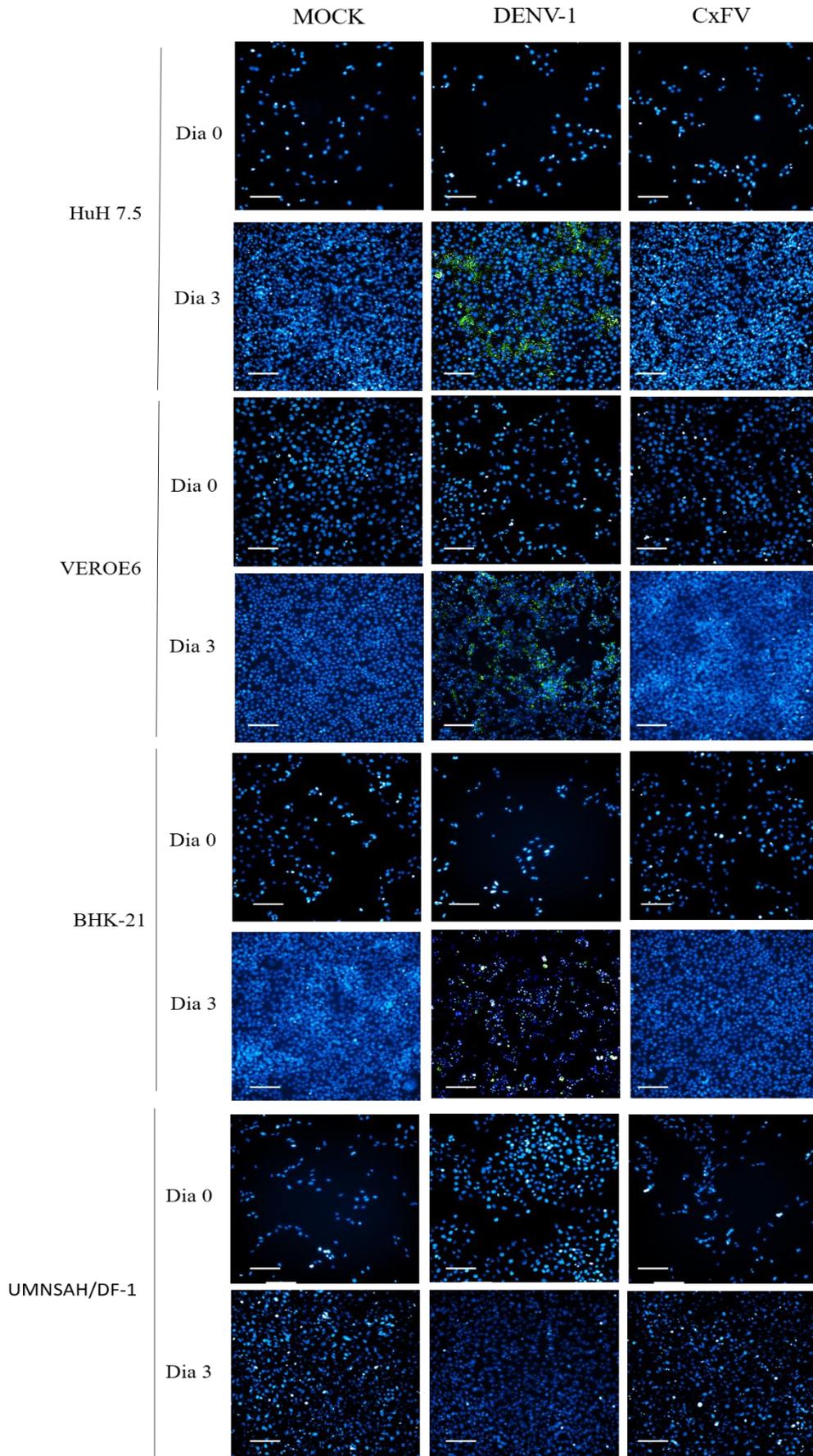


Figura 12 – Morfologia das placas do Culex flavivirus (CxFLV) MS367 passagens 3 e 4 em células C6/36. Como controle foi utilizado o meio de cultura (MOCK).

Para a caracterização biológica do vírus CxFLV MS367, foi realizada a infecção em células de invertebrados (C6/36, AP61 e Aag2) e vertebrados (Huh7.5, Vero E6, BHK-21 e UMNSAH/DF-1), com análise por IFI nos dias 0 e 3 após a infecção. Como resultado, apenas as células de inseto foram permissivas à infecção pelo CxFLV MS367, conforme observado na Figura 13, no tempo de 3 d.p.i. As células de vertebrado testadas foram refratárias à infecção pelo CxFLV. A infecção pelo DENV-1 (utilizado como controle) foi detectada nas células HuH7.5, VeroE6 e BHK-21, demonstrando a permissividade destas células à infecção por flavivírus (Figura 13). Embora a infecção pelo DENV-1 13400 não tenha sido detectada em células UMNSAH/DF-1, outros trabalhos do grupo têm demonstrado sua permissividade à infecção por flavivírus (dados não mostrados).

CÉLULAS DE VERTEBRADOS



CÉLULAS DE INVERTEBRADOS

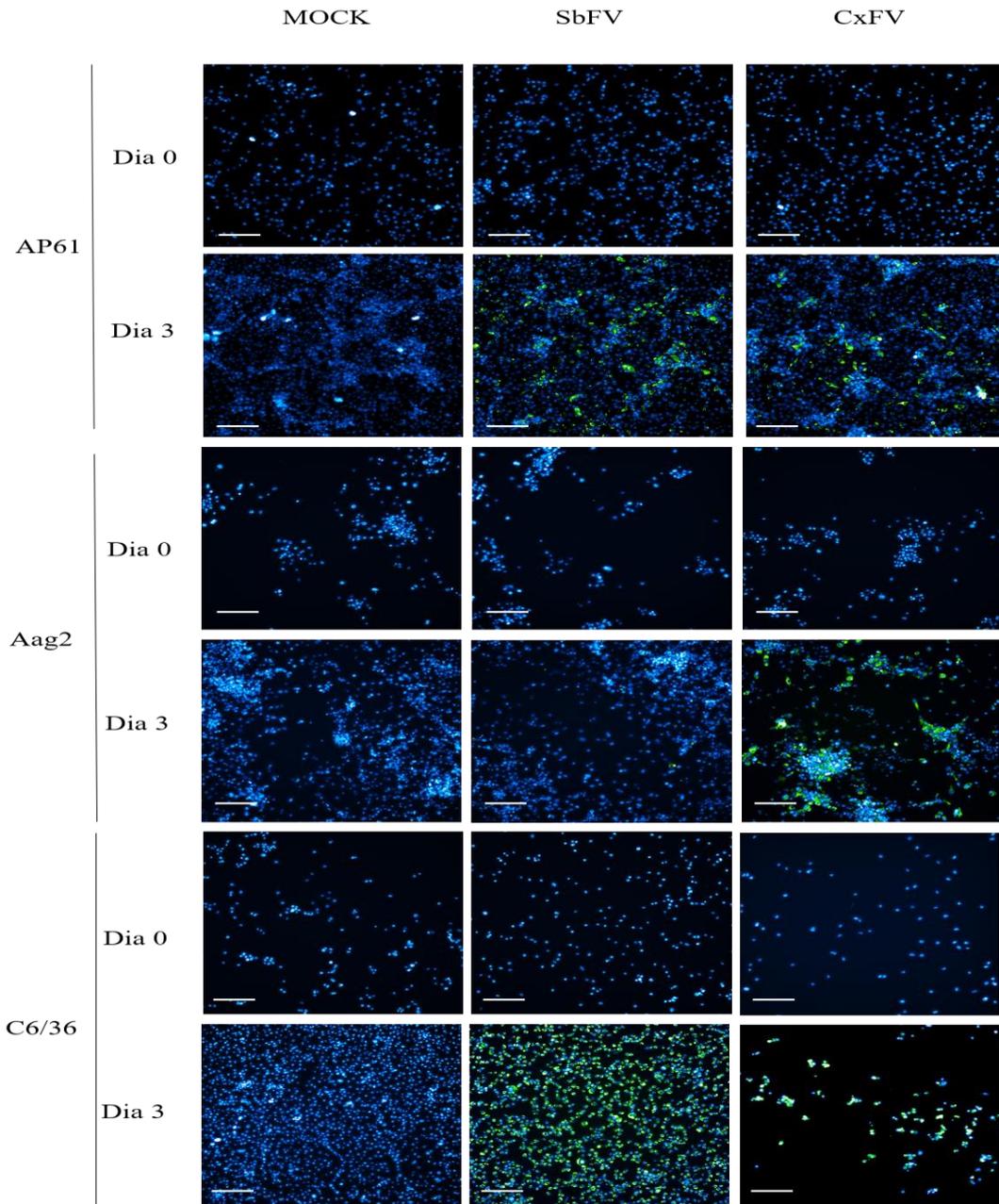


Figura 13 - Caracterização do vírus CxFV MS367. Imunofluorescência indireta em células de invertebrados (C6/36, Aag2 e AP61) e vertebrados (Huh7.5, VeroE6, BHK-21 e UMNSAH/DF-1) infectadas com CxFV. Como controle positivo, as células de invertebrados foram infectadas com o vírus SbFV e as de vertebrados com DENV-1; células não infectadas (MOCK) foram utilizadas como controle negativo. As células infectadas com o SbFV e DENV-1 foram marcadas com o anticorpo anti-SbFV 7A2/G11/G3 e 4G2, respectivamente, e as células infectadas com o CxFV foram marcadas com o anticorpo anti-CxFV 3G11/G9/G10 como anticorpo primário. Anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 foi utilizado como anticorpo secundário e DAPI para coloração dos núcleos celulares. A análise foi realizada nos tempos 0 e 3 após a infecção. A leitura foi realizada no *Operetta CLS* com objetiva de 20x. As barras de escala correspondem a 100 μ m.

4.2 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ISFs

4.2.1 Produção de AcM anti-SbFV

Durante o processo de imunização dos camundongos, foram coletados os soros pré-imune (antes do início da imunização) e pós-imune (coletados 7 dias após a terceira dose) para avaliar a eficácia da imunização e se os camundongos teriam eventualmente sido expostos previamente ao vírus. Os soros dos camundongos foram testados por IFI em células C6/36 infectadas com SbFV e MOCK e, conforme esperado, o soro pré-imune não apresentou reatividade contra o vírus, nem contra o MOCK. O soro pós-imune, no entanto, apresentou reatividade contra o MOCK em todas as diluições testadas. Apesar de ser observada uma intensidade de fluorescência um pouco maior nas células infectadas, não foi possível diferenciá-las do MOCK. O vírus utilizado para a imunização foi previamente purificado por colchão de sacarose com o intuito de reduzir esta reatividade inespecífica. Essa purificação, no entanto, não elimina todos os contaminantes do meio no qual foi produzido, conforme verificado pela reação direcionada contra antígenos celulares (Figura 14).

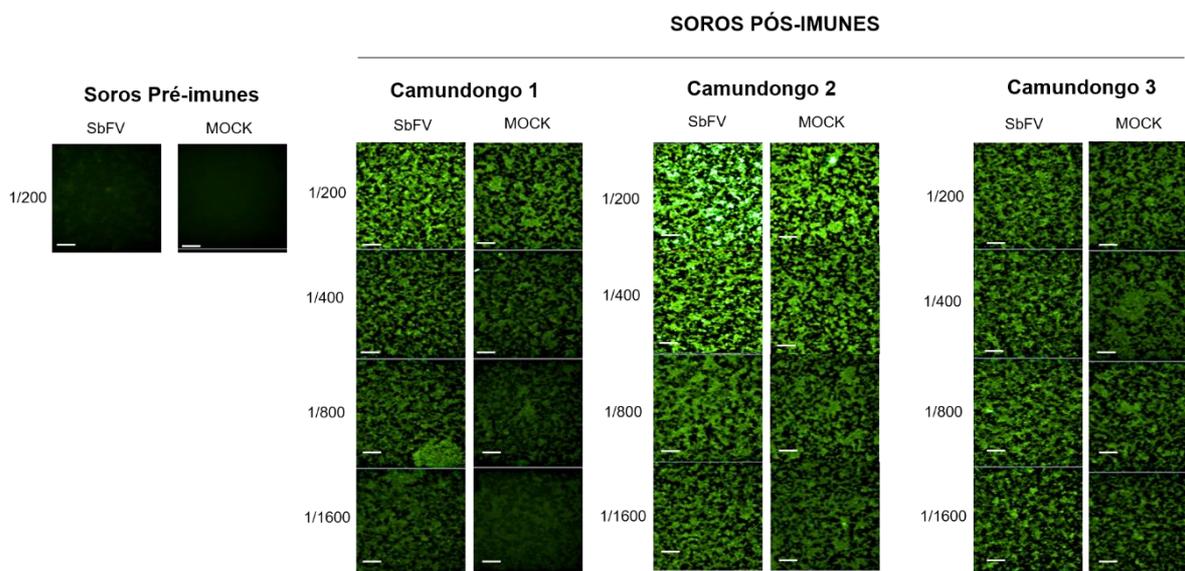


Figura 14 – Imunofluorescência indireta realizada com os soros pré-íunes e pós-íunes dos camundongos imunizados com o vírus SbFV. A reação foi realizada em células C6/36 infectadas com o SbFV e células não infectadas (MOCK). As células foram marcadas com os soros dos camundongos como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 como anticorpo secundário. Os soros foram utilizados nas diluições de 1/200 (pré-íunes – mistura dos soros dos três camundongos) e 1/200 até 1/1600 (pós-íunes – camundongos 1, 2 e 3). Não houve detecção do vírus ou células MOCK pelo soros pré-íunes, no entanto os soros pós-íunes dos três camundongos reagiram contra o vírus e contra o MOCK. A leitura foi realizada no *Operetta CLS* com objetiva de 20x. As barras de escala representam 100 µm.

A fusão para geração de AcM anti-SbFV gerou 1152 poços, dos quais apenas 407 poços (~32 % do total) apresentaram crescimento de hibridomas e seguiram para triagem por IFI em células C6/36 infectadas com SbFV e não infectadas (MOCK). Destes, oito hibridomas apresentaram resultado positivo na IFI, sendo apenas um deles específico para o vírus, ou seja, não reagiu com o MOCK. Esse hibridoma foi submetido à clonagem por diluição limitante, resultando no clone 7A2/G11/G3. A estabilidade do hibridoma foi confirmada após dois ciclos de congelamento/descongelamento e o isotipo do AcM secretado foi determinado como IgG1 com cadeia leve κ . Posteriormente, o AcM foi concentrado por precipitação com sulfato de amônio a partir de 1 L de sobrenadante de cultivo do hibridoma. O AcM precipitado foi titulado por IFI, sendo definida a diluição de 1/400 para uso nos ensaios seguintes.

Avaliou-se a especificidade do AcM 7A2/G11/G3 por IFI em células C6/36 infectadas com SbFV, CxFV, ZIKV ou DENV sorotipos 1, 2, 3 e 4, em células HuH7.5 infectadas com YFV e MOCK. O anticorpo reagiu apenas com o SbFV mostrando a sua especificidade para este vírus (Figura 15).

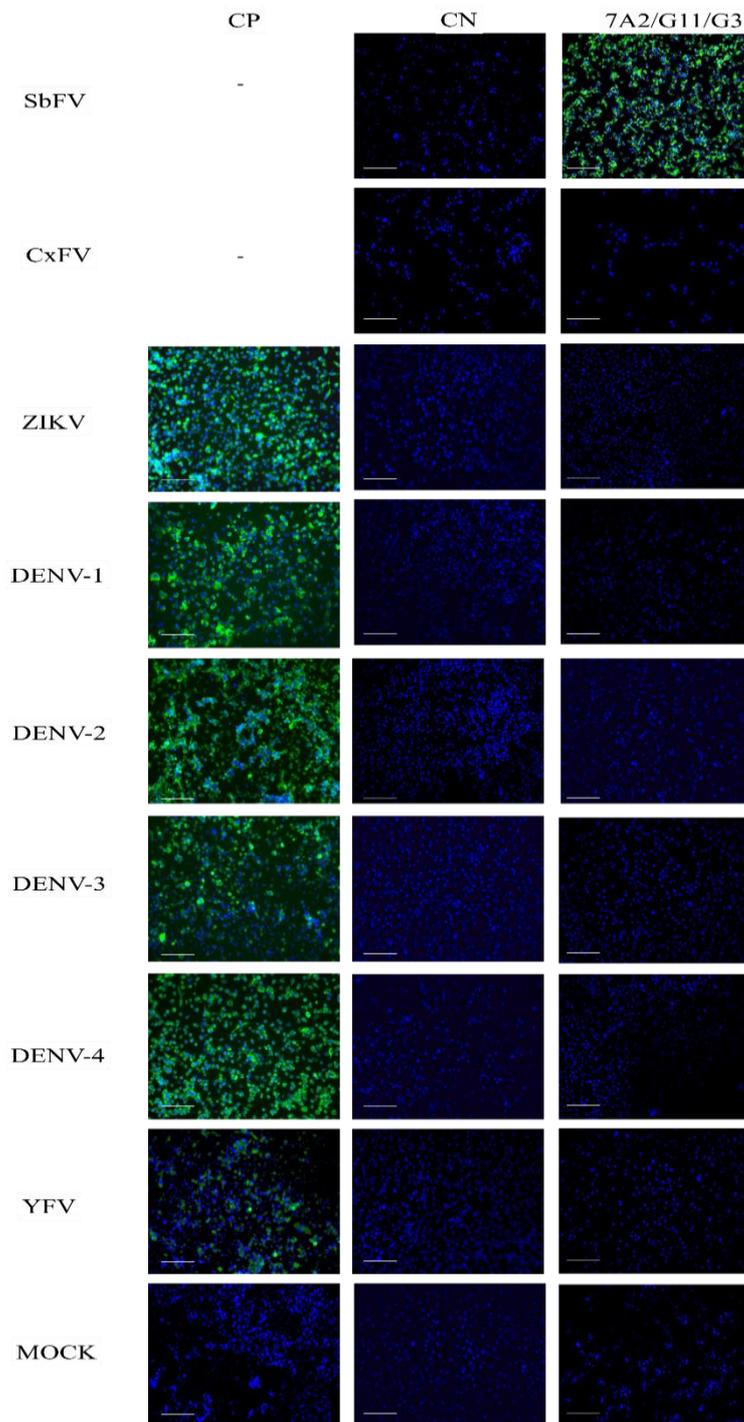


Figura 15 - Imunofluorescência indireta para avaliação da reatividade do anticorpo monoclonal anti-SbFV 7A2/G11/G3 contra os vírus CxFV, ZIKV, DENV sorotipos 1, 2, 3 e 4, YFV e o MOCK – C6/36. As células foram marcadas com o anticorpo anti-SbFV 7A2/G11/G3, 4G2 (controle positivo para ZIKV, DENV e YFV) ou 1G1 (anticorpo contra o vírus Chikungunya (CHIKV), usado como controle negativo) como anticorpos primários, com anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 como anticorpo secundário e com DAPI para coloração dos núcleos celulares. Embora não houvesse um controle positivo anti-CxFV quando a IFI foi realizada, a infecção pode ser verificada pelo efeito citopático gerado nas células. CP: controle positivo; CN: controle negativo. A leitura foi realizada no *Operetta CLS* com objetiva de 20x. As barras de escala representam 100 µm.

4.2.2 Produção de AcM anti-CxFV

Seguindo o mesmo protocolo que foi utilizado para a produção de AcM anti-SbFV, durante a imunização de camundongos com o CxFV, os soros pré-imune e pós-imune dos camundongos foram coletados e testados por IFI em células C6/36 infectadas com o CxFV e MOCK. Como resultado, os soros pré-ímenes dos três camundongos não reconheceram o vírus, nem o MOCK. Os soros pós-ímenes, no entanto, reconheceram ambos, CxFV e MOCK. O vírus CxFV utilizado para imunização dos camundongos foi previamente purificado por colchão de sacarose, porém essa purificação não eliminou todos os componentes celulares (Figura 16).

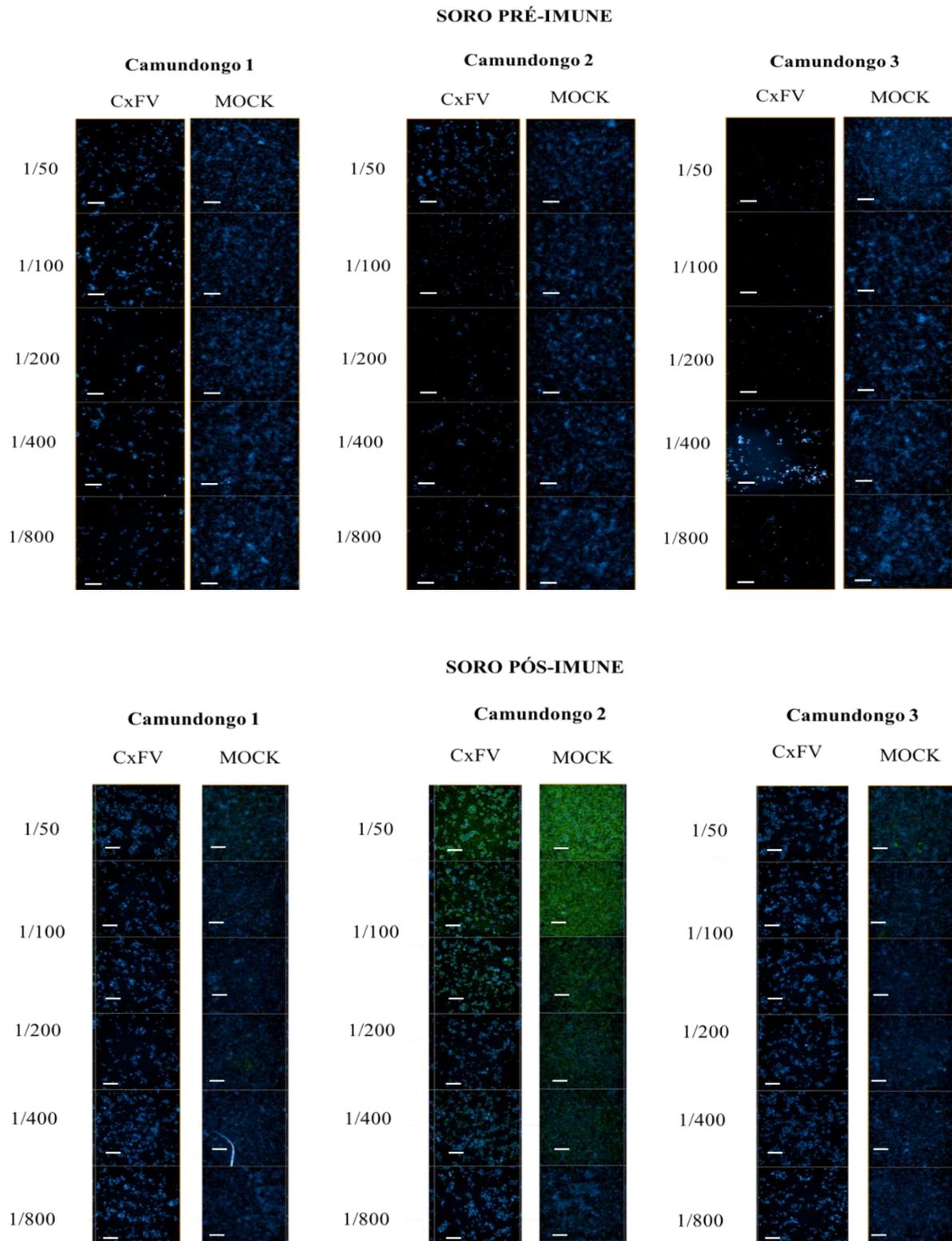


Figura 16 – Imunofluorescência indireta realizada com os soros pré-ímenes e pós-ímenes dos camundongos que foram imunizados com o vírus CxFV. Células C6/36 foram infectadas com o CxFV ou não infectadas (MOCK). As células foram marcadas com o soro dos camundongos nas diluições 1/50 a 1/800 como anticorpo primário e com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488. Os núcleos celulares foram corados com DAPI. A leitura foi realizada no *Operetta CLS* com objetiva de 20x. As barras de escala representam 100 μm .

A fusão para geração de AcM anti-CxFV gerou 2208 poços, dos quais 1050 poços (~47 % do total) apresentaram crescimento de hibridomas e foram triados por IFI em células C6/36 infectadas com CxFV e MOCK. Dos poços triados, quatro apresentaram hibridomas secretores de anticorpos reativos contra o CxFV. Esses hibridomas foram submetidos à dois ciclos de clonagem por diluição limitante, no entanto, após a clonagem, apenas dois hibridomas continuaram secretando anticorpos contra o vírus, resultando nos clones 3G11/G9/G10 e 15B11/D7/A9. A estabilidade dos hibridomas foi confirmada após dois ciclos de congelamento/descongelamento e o isotipo de ambos AcMs secretados foi determinado como IgG1 com cadeia leve κ .

A especificidade dos AcMs anti-CxFV foi avaliada por IFI em células C6/36 infectadas com CxFV, SbfV, ZIKV ou DENV sorotipos 1, 2, 3 e 4, células HuH7.5 infectadas com YFV e MOCK. Os anticorpos reconheceram apenas o vírus CxFV mostrando a sua especificidade para este vírus (Figura 17).

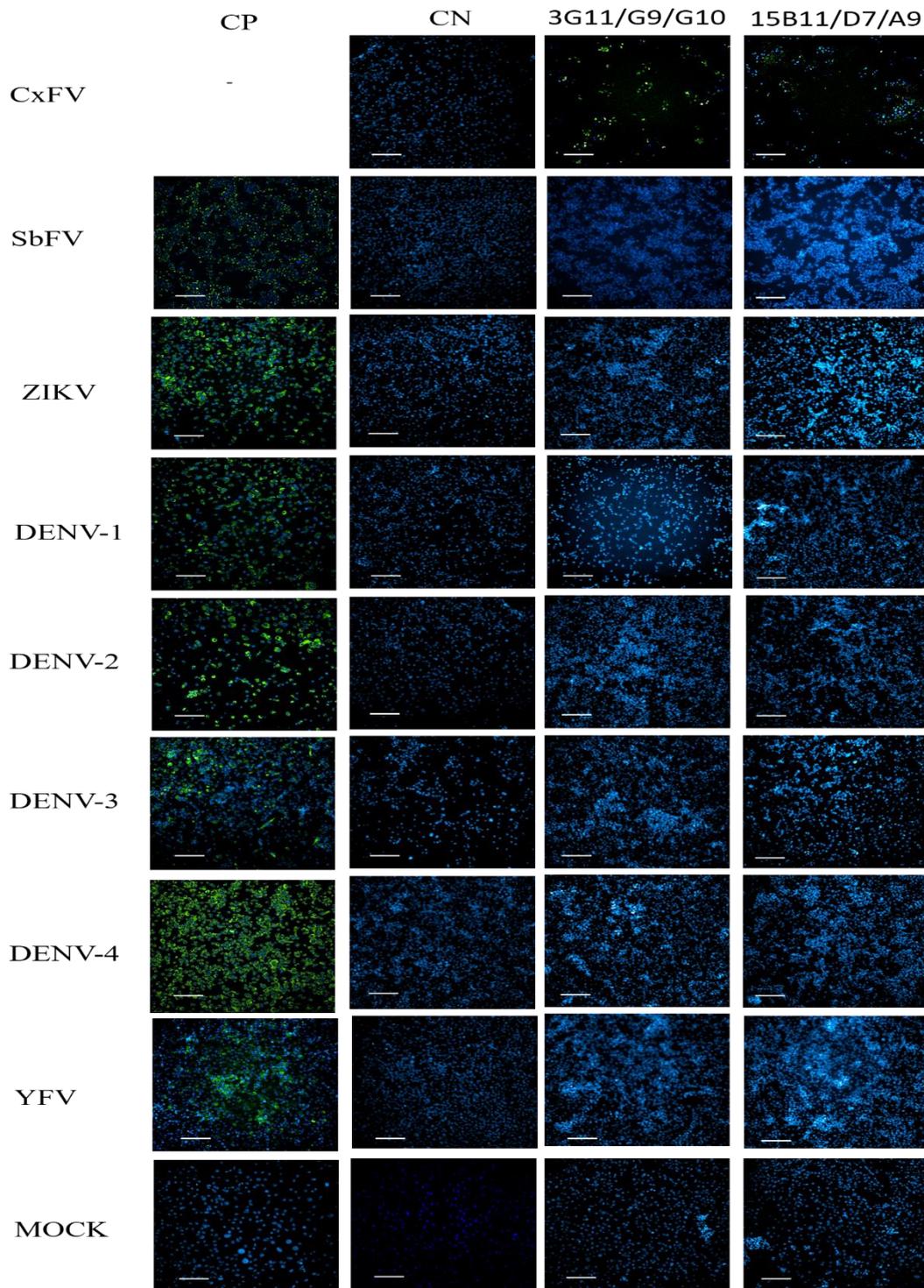


Figura 17 - Imunofluorescência indireta para avaliação da reatividade dos anticorpos monoclonais anti-CxFV 3G11/G9/G10 e 15B11/D7/A9 contra os vírus CxFV, SbFV, ZIKV, DENV sorotipos 1, 2, 3 e 4, YFV e o MOCK - C6/36. As células foram marcadas com os anticorpos anti-CxFV 3G11/G9/G10 e 15B11/D7/A9, 4G2 (controle positivo para os vírus ZIKV, DENV e YFV), 7A2/G11/G3 (controle positivo para o SbFV) ou anti-CHIKV (controle negativo) como anticorpos primários, anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 como anticorpo secundário e com DAPI para coloração dos núcleos celulares. CP: controle positivo; CN: controle negativo. A leitura foi realizada no *Operetta CLS* com objetiva de 20x. As barras de escala representam 100 μ m.

4.3 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE COINFEÇÃO

4.3.1 Avaliação da cinética de crescimento dos vírus

A cinética de infecção do ZIKV, DENV-1 e SbfV foi realizada em células C6/36, utilizando MOIs de 0,01, 0,1 e 1, com análise por IFI nos dias 0 a 6 pós-infecção. Para estabelecer uma infecção ideal para os testes de coinfeção entre os vírus buscou-se definir o tempo e MOI que resultassem em aproximadamente 50% das células infectadas. Nessa condição, o sistema não estaria saturado, sendo possível avaliar um possível aumento ou redução de infecção. Como resultado, para os vírus ZIKV, DENV-1 e SbfV, foi selecionado o MOI 0,1 (Figura 18).

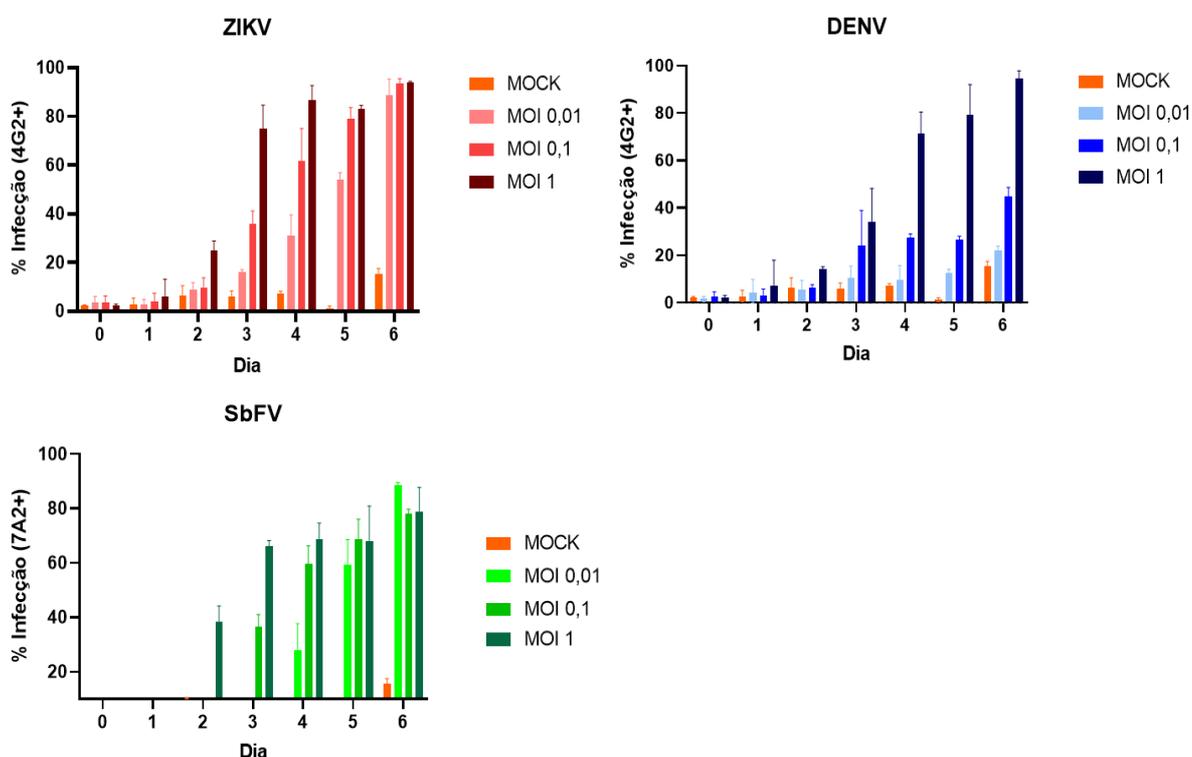


Figura 18 – Resultado da cinética de infecção dos vírus SbfV, ZIKV e DENV-1 em células C6/36. Foram testados os MOIs 0,01, 0,1 e 1 e o MOCK durante 6 dias. As células infectadas com ZIKV e DENV-1 foram marcadas com o anticorpo anti-flavivirus 4G2 e as células infectadas com o SbfV, com o anticorpo anti-SbfV 7A2/G11/G3 como anticorpos primários. Anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 foi utilizado como anticorpo secundário e DAPI para coloração dos núcleos celulares. As infecções foram avaliadas a cada 24 h por meio de IFI com leitura no *Operetta CLS* e analisadas utilizando-se o *software Harmony High-Content Imaging and Analysis* (PerkinElmer). A porcentagem de células infectadas foi obtida e normalizada em relação ao MOCK.

Para o vírus CxFV foi necessário realizar uma cinética com parâmetros diferentes dos utilizados para os demais vírus, devido ao extenso efeito citopático gerado nas células analisadas. Foram utilizadas diferentes concentrações de células por poço (2×10^5 e 5×10^5) e MOIs (0,1 e 0,01). Como resultado, foi obtido um percentual de infecção entre 20 e 50% a partir do segundo dia após a infecção. No entanto, foi observado um intenso efeito citopático em todas as condições analisadas, como pode ser observado pela redução do número de células quando comparado ao MOCK (Figura 19), inviabilizando o uso desse vírus para os ensaios de coinfeção.

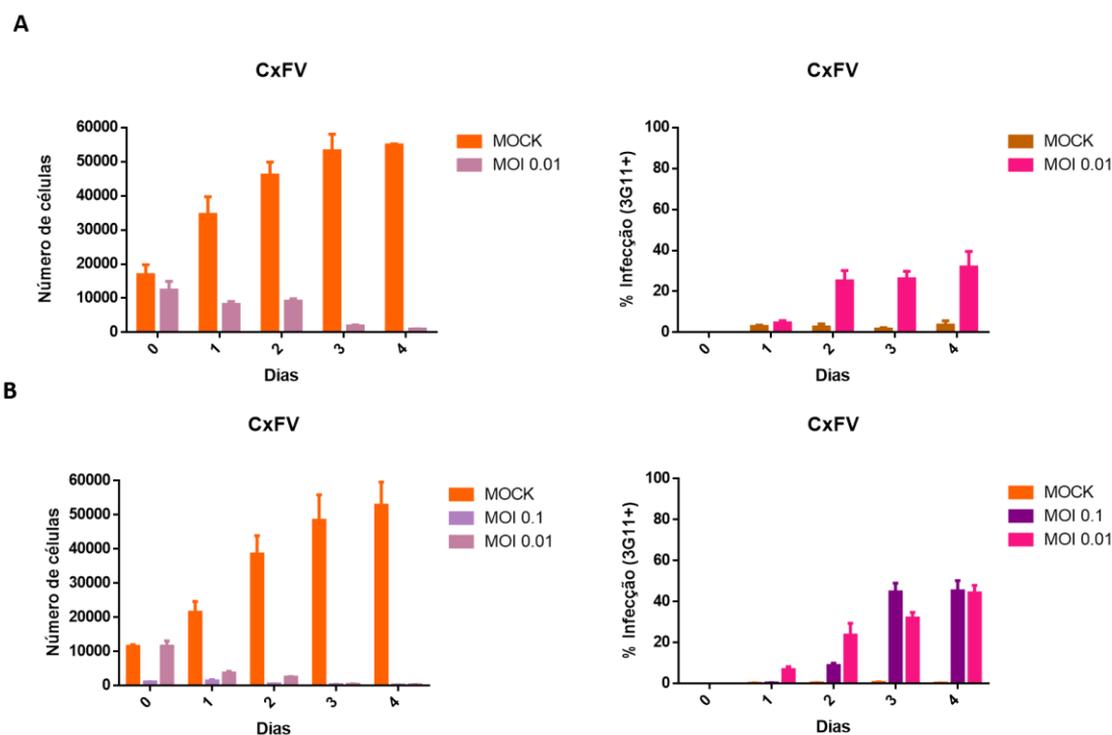


Figura 19 – Resultado da cinética de infecção do vírus CxFV em células C6/36. Foram testados os MOIs 0,01 e 0,1 e o MOCK. (A) e (B) Resultado da contagem de células e porcentagem de infecção no experimento com 5×10^5 células por poço (A) e 2×10^5 células por poço (B). As células infectadas foram marcadas com o anticorpo anti-CxFV 3G11/G9/G10, seguido de anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 como anticorpo secundário e DAPI para coloração dos núcleos celulares. As infecções foram avaliadas a cada 24 h por meio de IFI com leitura no *Operetta CLS* e analisadas utilizando-se o *software Harmony High-Content Imaging and Analysis* (PerkinElmer). A porcentagem de células infectadas foi obtida e normalizada em relação ao MOCK.

4.3.2 Geração de células persistentemente infectadas com SbFV

Foi estabelecida uma infecção persistente por SbFV em células C6/36. As células persistentemente infectadas com o vírus SbFV foram nomeadas de C6/36-SbFV para facilitar a compreensão dos resultados. Durante o estabelecimento desta linhagem, foi observado CPE, três dias após a infecção das células C6/36 com o vírus SbFV nas passagens 1 e 2. Após a

terceira passagem, no entanto, não foi mais observado CPE, sugerindo uma adaptação do vírus a essa linhagem celular. Como prosseguimento do processo de adaptação, até a passagem 4 a infecção foi monitorada por RT-PCR genérica para flavivírus (Figura 20 A). Para as passagens subsequentes, a infecção foi monitorada através de IFI uma vez que foi obtido o AcM anti-SbFV (Figura 20 B).

Além do monitoramento da persistência da infecção ao longo das passagens, as células C6/36-SbFV foram congeladas e descongeladas para verificar a estabilidade da infecção. Para tanto, foi gerado um estoque de células C6/36-SbFV, congeladas na passagem 25. Essas células foram descongeladas e mantidas até a passagem 30, quando foram testadas por IFI, confirmando a presença do vírus e, portanto, a persistência da infecção (Figura 20 B). Para averiguar se partículas infecciosas de SbFV eram secretadas pelas células C6/36-SbFV, foi realizada uma titulação a partir do sobrenadante das células da passagem 30 em células C6/36 (Figura 21). Como resultado foi obtido um título de $7,0 \times 10^6$ pfu/mL, demonstrando que o vírus presente nas células infectadas continua sendo secretado.

Para o vírus CxFV, foram realizadas tentativas de geração de uma linhagem persistentemente infectada a partir de células C6/36, AP61 e Aag2. Devido ao intenso CPE, no entanto, as células não sobreviveram, não sendo possível realizar passagens para o estabelecimento da infecção persistente.

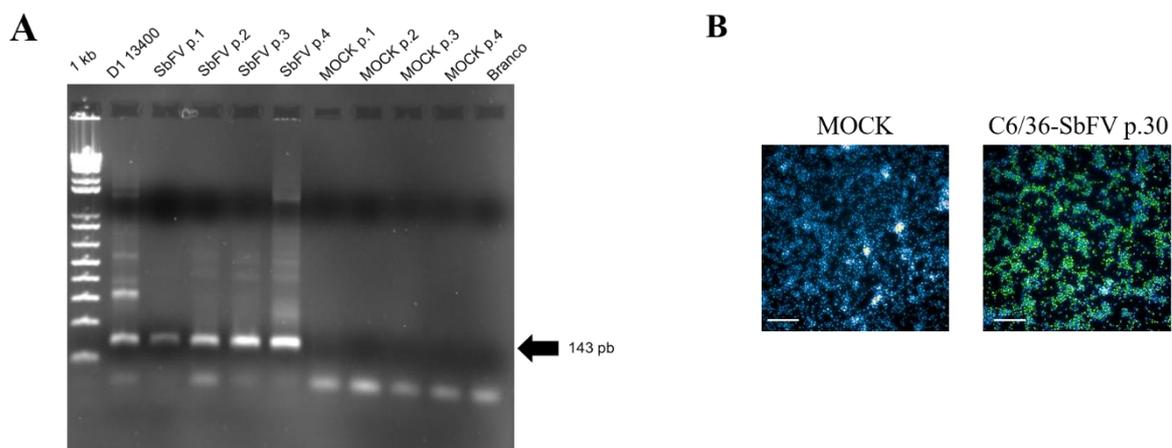


Figura 20 – Resultado do monitoramento da infecção persistente por SbFV em células C6/36. (A) Passagens 1 a 4 para estabelecimento da linhagem celular C6/36-SbFV – Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em TBE) mostrando os resultados da amplificação por *nested* RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos genéricos Flavi 2+ e Flavi - 2. Como controle positivo da reação, foi utilizado RNA de DENV-1 13400 e como branco da reação, água livre de nucleases. Adicionalmente, foi utilizado como controle negativo da infecção, o RNA extraído do meio de cultivo das células não infectadas (MOCK passagens 1 a 4). 1 kb: marcador de tamanho molecular *1 kb plus DNA ladder* (Invitrogen). (B) Imunofluorescência indireta realizada para detecção do vírus SbFV nas células C6/36-SbFV na passagem 30. Células C6/36 não infectadas foram utilizadas como controle negativo (MOCK). As células foram marcadas com o anticorpo anti-SbFV 7A2/G11/G3 como anticorpo primário, anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 como anticorpo secundário e com DAPI para coloração dos núcleos celulares. A leitura foi realizada no *Operetta CLS* com objetiva de 20x. As barras de escala correspondem a 100 μm .

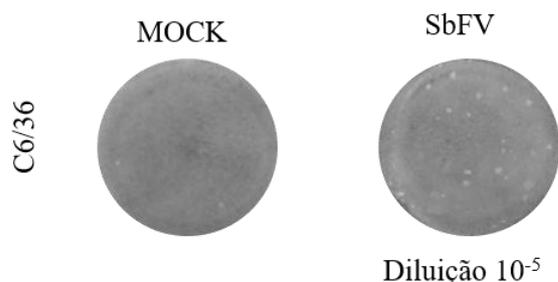


Figura 21 – Titulação e morfologia das placas de lise formadas após infecção de células C6/36 com o sobrenadante de cultivo de células persistentemente infectadas com o Sabethes flavivirus (C6/36-SbFV) passagem 30. Como controle (MOCK) foram utilizadas células C6/36 não infectadas.

4.4 ENSAIOS DE COINFECCÃO

Os ensaios de coinfeccção foram realizados com os vírus SbFV e ZIKV ou DENV-1 com infecção nas células C6/36 e C636-SbFV. De acordo com o protocolo definido pelas cinéticas de infecção, MOI de 0,1 foi utilizado com avaliação do percentual de células infectadas e quantidade de partículas virais infecciosas secretadas nos dias 0, 3 e 6 pós-infecção. As células

infectadas foram analisadas através de IFI, ou seja, por meio da detecção de proteína viral; os sobrenadantes coletados, por titulação viral. Na figura 22 está representado o padrão das imagens obtidas por IFI nos ensaios de coinfeção entre ZIKV e SbfV. Esse mesmo padrão de marcação se repetiu nas análises das coinfeções entre DENV-1 e SbfV.

Nos ensaios de coinfeção entre ZIKV e SbfV, quando ambos os vírus foram adicionados simultaneamente ou a infecção pelo ZIKV foi realizada após uma infecção persistente pelo SbfV, não houve diferenças estatisticamente significativas no percentual de células infectadas pelo ZIKV (Figura 23 C). No entanto, na titulação viral observou-se uma redução significativa do título de ZIKV quando as células foram coinfectadas com o SbfV (Figura 23 D). A análise realizada através de IFI demonstrou ainda uma redução de aproximadamente 50% na infecção pelo SbfV nas células C6/36 persistentemente infectadas por este vírus após coinfeção pelo ZIKV em ambos os tempos analisados (3 e 6 d.p.i.) (Figura 23 E – C6/36-SbfV + ZIKV). No entanto, não houve diferença na porcentagem de células infectadas pelo SbfV quando a infecção pelo ZIKV foi realizada simultaneamente (Figura 23 E – SbfV + ZIKV). Adicionalmente, na titulação viral não foram verificadas diferenças significativas na quantidade de partículas viáveis de SbfV secretadas pelas células após a coinfeção por ZIKV (Figura 23 F).

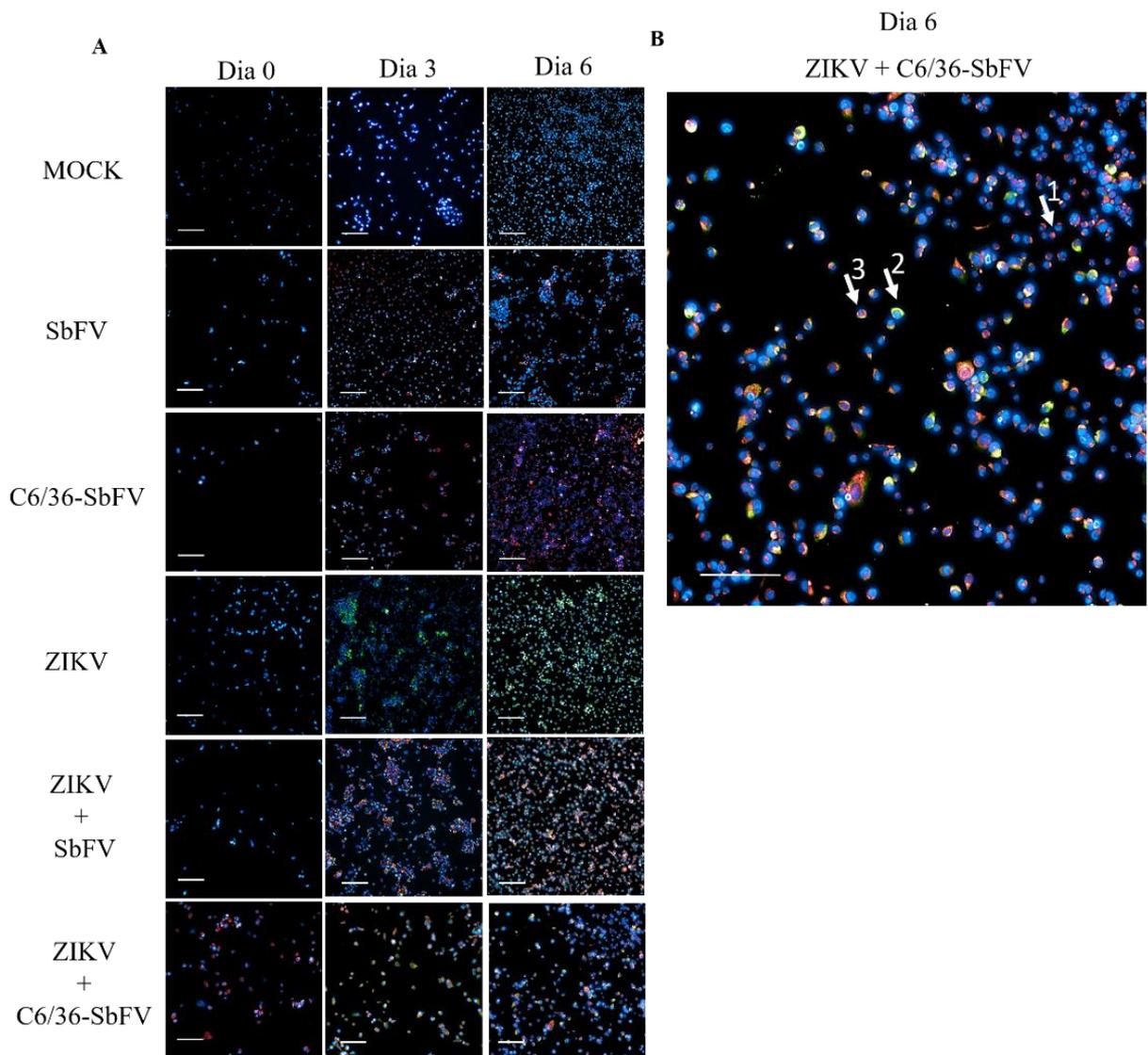


Figura 22 – Imagens representativas dos resultados de imunofluorescência indireta obtidos nos ensaios de coinfeção com os vírus SbFV e ZIKV em células C6/36 e C6/36-SbFV. (A) Representação dos padrões de marcação com os anticorpos nas células C6/36 não infectadas ou infectadas com SbFV e/ou ZIKV e nas células C6/36-SbFV com ou sem infecção pelo ZIKV. As infecções foram avaliadas nos dias 0, 3 e 6 após a infecção por meio de IFI para detecção de ZIKV e SbFV. Para a reação de imunofluorescência, o ZIKV foi marcado com o anticorpo anti-flavivirus 4G2 conjugado com FITC; o SbFV foi marcado com o AcM 7A2/G11/G3 como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 633 como anticorpo secundário. Os núcleos celulares foram corados com DAPI. A leitura foi realizada no *Operetta CLS* com objetiva de 20x. (B) Aumento da imagem da infecção ZIKV+C6/36-SbFV no dia 6 para melhor visualização da marcação de cada vírus. A seta 1 está indicando uma célula infectada pelo SbFV, a seta 2 indica uma célula infectada pelo ZIKV e a seta 3 indica uma célula coinfectada pelos vírus SbFV e ZIKV. As barras de escala representam 100 μm .

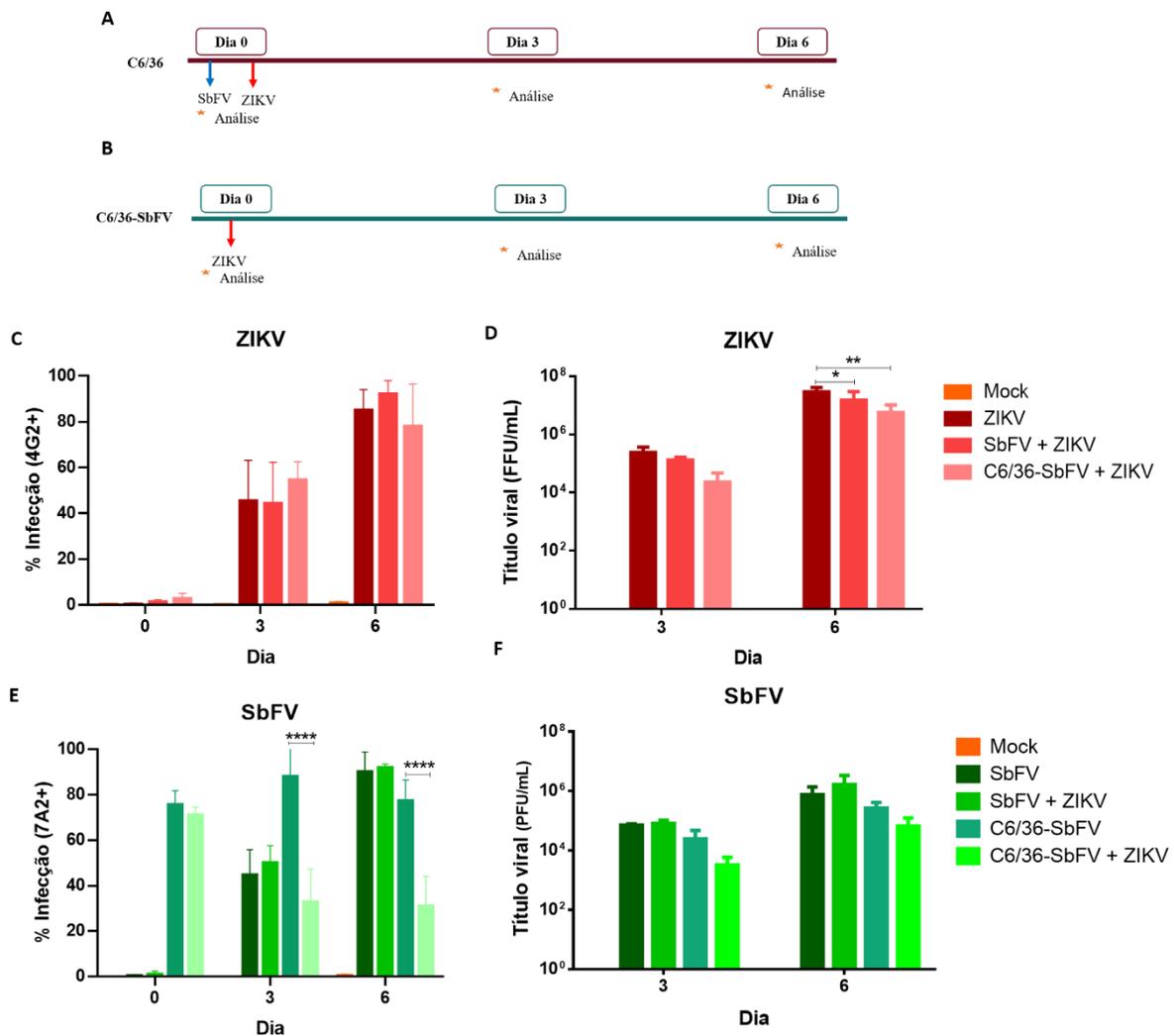


Figura 23 – Resultado dos ensaios de coinfeção pelos vírus SbFV e ZIKV nas células C6/36 e C6/36-SbFV. Esquema utilizado para coinfeção por ZIKV e SbFV em células C6/36 (A) e C6/36-SbFV (B). As infecções foram avaliadas nos dias 0, 3 e 6 após a infecção por meio de IFI para detecção de ZIKV (C) e SbFV (E), com leitura no *Operetta CLS* e por titulação dos vírus ZIKV (D) e SbFV (F). Para avaliação do percentual de infecção (C) e (E), as células infectadas com ZIKV foram marcadas com o anticorpo anti-flavivirus 4G2 conjugado com FITC e as células infectadas com o SbFV, com o anticorpo 7A2/G11/G3 como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 633 como anticorpo secundário. Os núcleos celulares foram corados com DAPI. (D) A titulação foi realizada através de marcação de unidades formadoras de foco (FFU) utilizando o anticorpo anti-flavivirus 4G2 e para (F) através da coloração de unidades formadora de placa (PFU). A análise estatística foi realizada utilizando o teste *two-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Quando o ZIKV foi inoculado nas células três dias após a infecção com o SbFV, houve um aumento de aproximadamente 20% na porcentagem de células infectadas pelo ZIKV (Figura 24 C). No entanto, na avaliação desta mesma condição de infecção através da titulação viral houve uma redução no título de ZIKV nas células C6/36, tanto na infecção recente por SbFV (três dias antes da infecção) quanto na infecção persistente (células C6/36-SbFV) (Figura

24 D), corroborando o resultado apresentado na Figura 23. Na análise por IFI para detecção do SbFV nas células C6/36-SbFV identificou-se uma redução de aproximadamente 50% na porcentagem de células persistentemente infectadas com o SbFV três dias após infecção pelo ZIKV, no entanto não houve alteração no título viral (Figura 24 E e F).

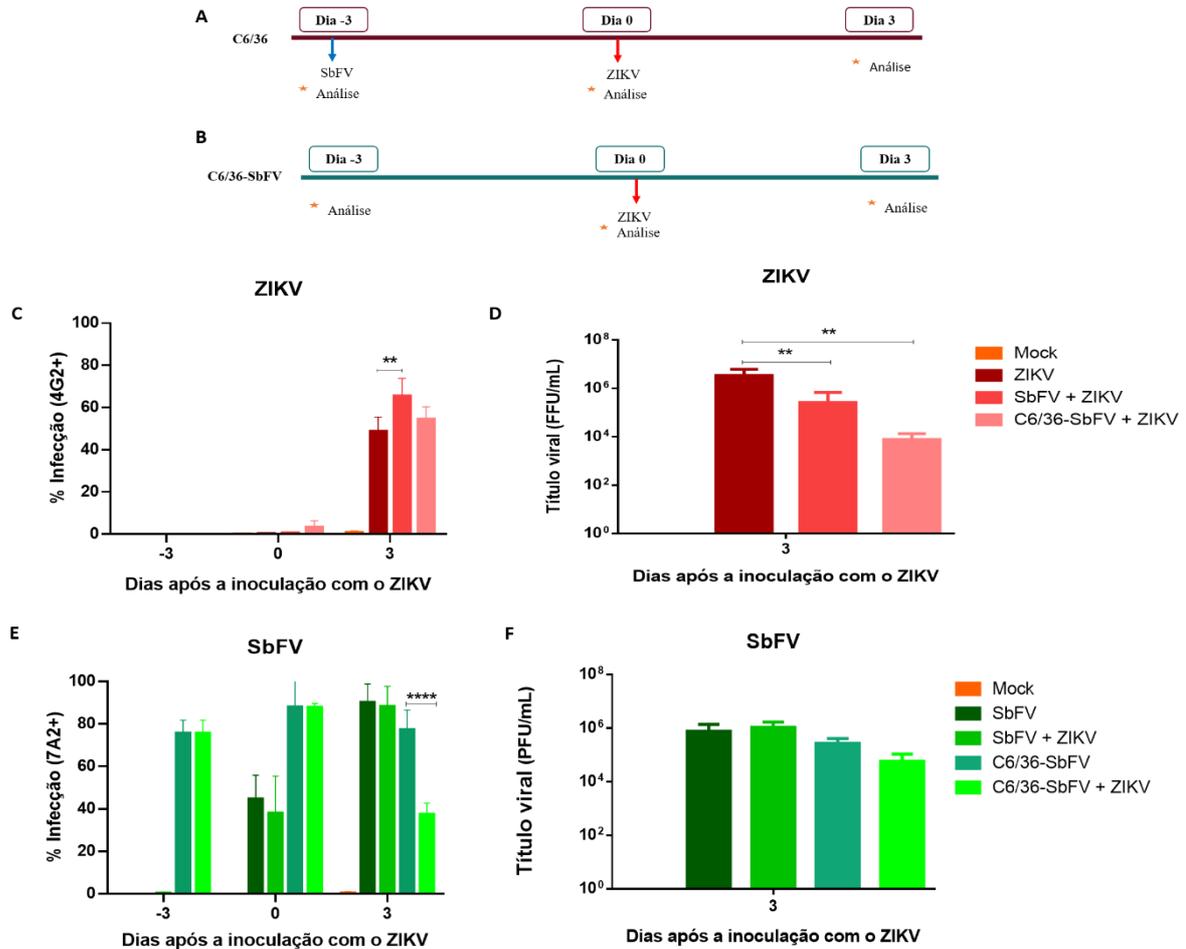


Figura 24 – Resultado dos ensaios de infecção pelo ZIKV após infecção prévia pelo SbFV. Esquema utilizado para inoculação do SbFV no tempo -3 e do ZIKV no tempo 0 em células C6/36 (A) e C6/36-SbFV (B). As infecções foram avaliadas nos dias -3, 0 e 3 após infecção pelo ZIKV por meio de IFI com leitura no *Operetta CLS* (C) e (E) e de titulação viral (D) e (F). As células infectadas com ZIKV foram marcadas com o anticorpo anti-flavivirus 4G2 conjugado com FITC e as células infectadas com o SbFV com o anticorpo 7A2/G11/G3 como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 633 como anticorpo secundário. Os núcleos celulares foram corados com DAPI. (D) A titulação foi realizada através de marcação de unidades formadoras de foco (FFU) utilizando o anticorpo anti-flavivirus 4G2 e para (F) através da coloração de unidades formadora de placa (PFU). A análise estatística foi realizada utilizando o teste *two-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Nos ensaios de coinfeção entre DENV-1 e SbfV, quando os vírus foram adicionados simultaneamente ou a infecção pelo DENV-1 foi realizada após uma infecção persistente pelo SbfV, não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de células infectadas pelo DENV-1. No entanto, houve uma redução significativa no título do DENV-1 após a coinfeção com o SbfV ou com o SbfV das células persistentemente infectadas (Figura 25 C e D). Para o SbfV infectando as células C6/36-SbfV, ocorreu uma redução de aproximadamente 50% na porcentagem de células infectadas 3 e 6 dias após a infecção por DENV (Figura 25 E). Por outro lado, quando a infecção pelo DENV-1 foi realizada simultaneamente, não houve diferença no percentual de células infectadas pelo SbfV (Figura 25 E). Adicionalmente, a titulação viral não demonstrou diferenças significativas na quantidade de partículas viáveis de SbfV secretadas pelas células após a coinfeção por DENV-1 (Figura 25 F).

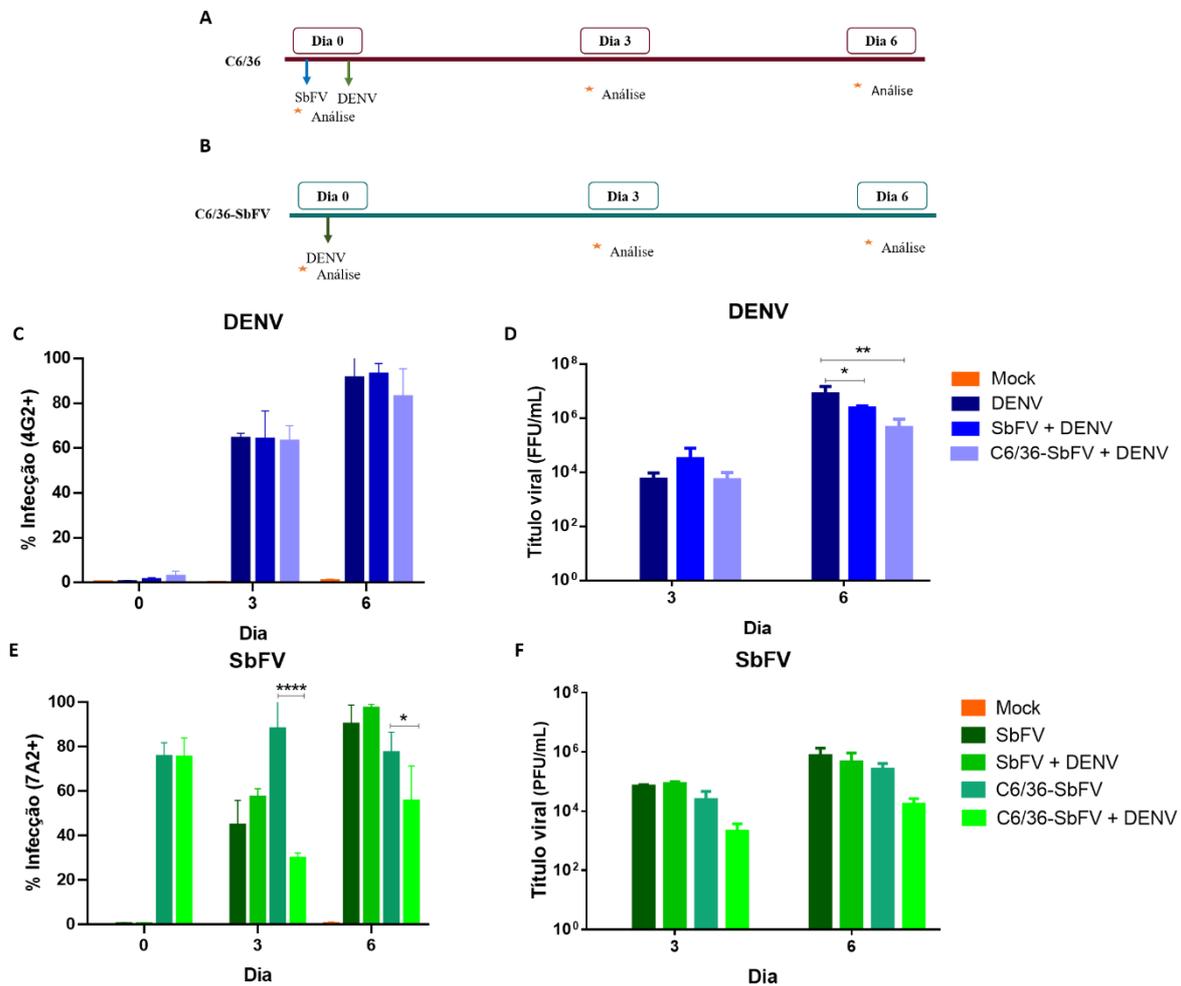


Figura 25 – Resultado dos ensaios de coinfeção pelos vírus SbFV e DENV-1 em células C6/36 e C6/36-SbFV. Esquema utilizado para inoculação do DENV-1 em células C6/36 (A) e C6/36-SbFV (B). As infecções foram avaliadas nos dias 0, 3 e 6 por imunofluorescência indireta com leitura no *Operetta CLS* (C) e (E) e por titulação viral (DENV – D) e (SbFV – F). Para a imunofluorescência, as células infectadas com DENV-1 foram marcadas com o anticorpo anti-flavivírus 4G2 conjugado com FITC e as células infectadas com o SbFV, com o anticorpo anti-SbFV 7A2/G11/G3 como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 633 como anticorpo secundário. Foi utilizado DAPI para coloração dos núcleos celulares. (D) A titulação foi realizada através de marcação de unidades formadoras de foco (FFU) utilizando o anticorpo anti-flavivirus 4G2 e para (F) através da coloração de unidades formadora de placa (PFU). A análise estatística foi realizada utilizando o teste *two-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Quando a infecção pelo DENV foi realizada após uma infecção pelo SbFV, não houve diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de células infectadas (Figura 26 C). Contudo, semelhante ao ocorrido para ZIKV, houve uma redução no título de DENV-1 nas células C6/36 previamente infectadas por SbFV, tanto na infecção recente (três dias antes da infecção) quanto na infecção persistente (células C6/36-SbFV) (Figura 26 D). A análise realizada através de IFI demonstrou ainda uma redução de aproximadamente 50% na infecção pelo SbFV

nas células C6/36 persistentemente infectadas por este vírus, mas não nas células com infecção recente, após coinfeção pelo DENV-1 (Figura 26 E). Por outro lado, na avaliação por titulação viral, verificou-se um aumento no título de SbFV em células C6/36 previamente infectadas por SbFV três dias antes da infecção por DENV-1 (Figura 26 F).

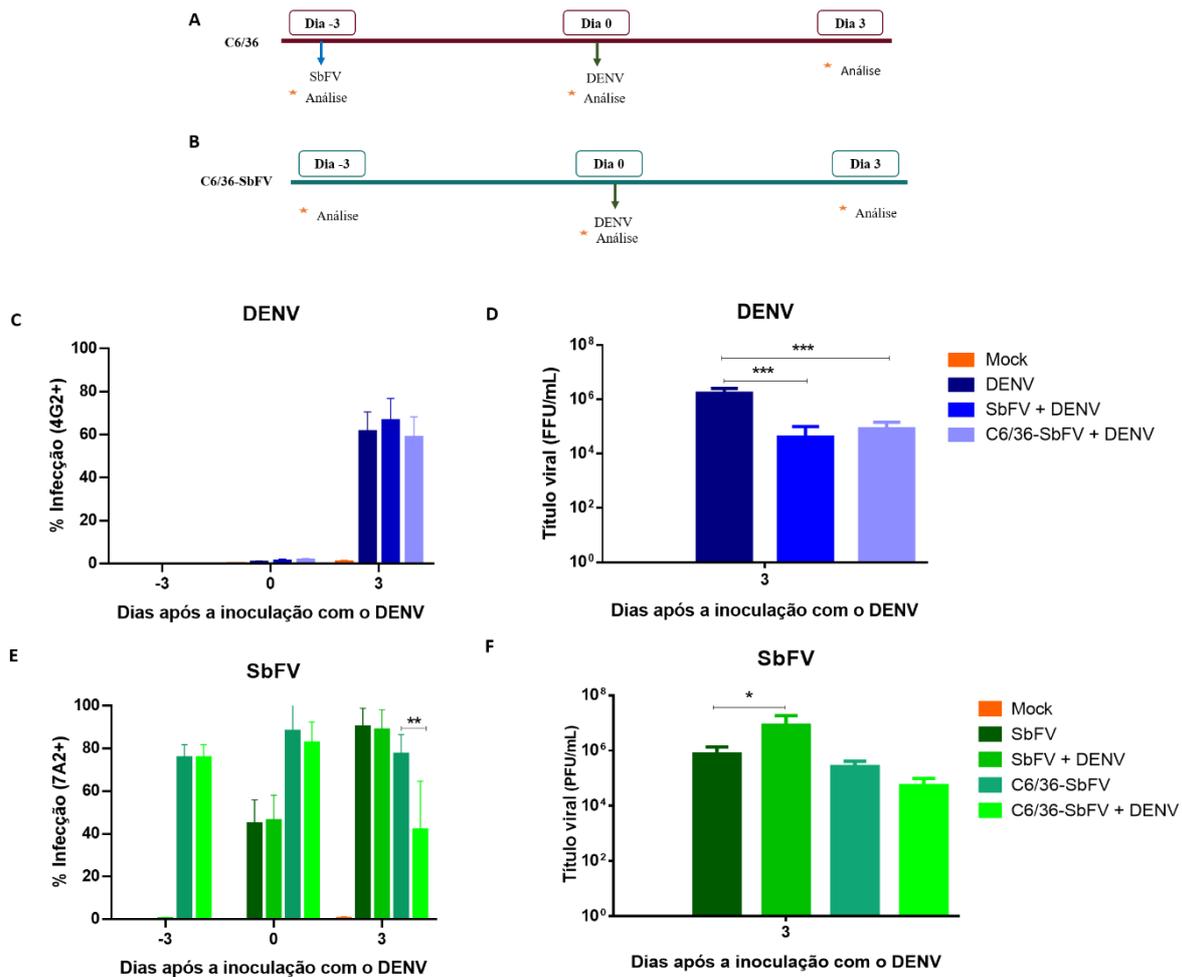


Figura 26 – Resultado dos ensaios de infecção pelo DENV-1 após infecção prévia pelo SbFV. Esquema utilizado para inoculação do SbFV no tempo -3 e do DENV-1 no tempo 0 em células C6/36 (A) e C6/36-SbFV (B). As infecções foram avaliadas nos dias -3, 0 e 3 após infecção pelo DENV-1 por meio de IFI com leitura no *Operetta CLS* (C) e (E) e de titulação viral (DENV – D) e (SbFV – F). As células infectadas por DENV-1 foram marcadas com o anticorpo anti-flavivírus 4G2 conjugado com FITC e as células infectadas pelo SbFV, com o anticorpo anti-SbFV 7A2/G11/G3 como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 633 como anticorpo secundário. Os núcleos celulares foram corados com DAPI. (D) A titulação foi realizada através de marcação de unidades formadoras de foco (FFU) utilizando o anticorpo anti-flavivirus 4G2 e para (F) através da coloração de unidades formadora de placa (PFU). A análise estatística foi realizada utilizando o teste *two-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO VIRAL

No presente trabalho foram realizadas tentativas de isolamento a partir de três diferentes *pools* de mosquito infectados pelo CxFV. No entanto, apenas foi possível o isolamento a partir de um desses *pools*, o MS367. Como descrito no manual para isolamento viral feito por Dunn e colaboradores (2015) essa dificuldade em isolar esse vírus pode estar relacionada a uma possível baixa carga viral ou a amostra pode ter sido mal conservada. Devido a esta dificuldade, optamos por utilizar diferentes linhagens celulares (C6/36, AP61 e Aag2) para o isolamento do vírus a partir de um *pool* de mosquitos *Culex* spp. coletados no estado do Paraná e desta forma foi obtido um isolado viral de CxFV.

Inicialmente, o acompanhamento dos isolamentos foi realizado por IFI utilizando o anticorpo anti-flavivirus 4G2 para detecção das infecções. Os resultados, no entanto, foram todos negativos. Posteriormente, com a obtenção do isolado viral, pode-se confirmar que o AcM 4G2, que reconhece a maior parte dos membros do gênero *Flavivirus*, não foi capaz de reconhecer o CxFV. Este dado foi corroborado em outros experimentos do Laboratório de Virologia Molecular do ICC/Fiocruz-PR, nos quais outros ISFs também não foram reconhecidos pelo AcM 4G2. Conseqüentemente, os testes para detecção da infecção durante os isolamentos passaram a ser realizados por RT-PCR com o uso de oligonucleotídeos genéricos para flavivirus, seguindo o protocolo descrito por Sánchez-Seco et al. (2005).

O CxFV é o ISF mais frequentemente reportado na literatura. Todos os isolados foram obtidos a partir de *pools* de mosquitos *Culex* spp. A detecção desse vírus, no entanto, também foi descrita em amostras de *Aedes spcapularis* (GRAVINA et al., 2019), sendo um indício de que este vírus não está restrito à população de *Culex* spp.

Os primeiros isolados de CxFV foram obtidos em 2007 no Japão e Indonésia a partir de mosquitos *Culex tritaeniorhynchus* e *Cx. quinquefasciatus*, respectivamente (HOSHINO et al., 2007). Outros isolados foram posteriormente obtidos de *Cx. quinquefasciatus* na Guatemala (MORALES-BETOULLE et al., 2008) e México (FARFAN-ALE et al., 2009), *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. restuans* nos EUA (KIM et al., 2009), de *Cx. quinquefasciatus* em Uganda (COOK et al., 2009) e *Cx. quinquefasciatus* em São Paulo, Mato Grosso do Sul e São José do Rio Preto, Brasil (MACHADO et al., 2012; FERNANDES et al., 2016; MORAES et al., 2019a). Não foi possível a identificação a nível de espécie dos mosquitos a partir dos quais foi obtido o isolado MS367 utilizado neste estudo.

A sequência de 1018 pb do genoma de CxFV MS367 apresentou 95% de identidade com a sequência CxFV_BR/MT_CbaAr1256p2/2013 isolado por MORAES et al. (2019). De acordo com Kuno et al. (1998) uma sequência nucleotídica com identidade superior a 84% pode ser considerada filogeneticamente do mesmo grupo, portanto a identidade do vírus isolado neste estudo foi confirmada como CxFV. Embora pertencentes ao mesmo grupo, MORAES et al. (2019) não observaram efeito citopático nas células infectadas com o isolado CxFV_BR/MT_CbaAr1256p2/2013, sugerindo que existem diferenças entre os dois vírus, pois as células C6/36 infectadas com o CxFV MS367 apresentaram efeito citopático a partir do segundo d.p.i. Essa possível diferença entre as cepas identificadas no Brasil poderá ser esclarecida com o sequenciamento completo do genoma do CxFV isolado, pois marcadores moleculares no genoma viral durante o processo de isolamento podem estar relacionados a diferenças fenotípicas (HURRELBRINK et al., 2001; MONATH et al., 2002). Nossos resultados estão de acordo com os de Wang e cols., que observaram ECP a partir de 3-4 d.p.i em células C6/36 infectadas por um CxFV isolado na China (WANG et al., 2012).

A caracterização das células permissivas à infecção pelo CxFV MS367, demonstrou a capacidade desse vírus de infectar as células de mosquitos testadas (C6/36, AP61 e Aag2), mas não as células de vertebrados (Huh7.5, Vero E6, BHK-21 e UMNSAH/DF-1). Esse resultado reforça que o CxFV MS367 se trata de um vírus inseto-específico.

Não foi encontrado na literatura descrição de dificuldades para a titulação do CxFV em células C6/36. No presente trabalho, no entanto, durante a titulação da passagem 4 do CxFV, foi observado um aumento no tamanho das placas de lise formadas, provavelmente devido ao extenso efeito citopático, tornando inviável a contagem das unidades formadoras de placas. Essa alteração de fenótipo pode estar relacionada a mutações no genoma que ocorrem devido ao processo de adaptação do vírus à célula (HURRELBRINK et al., ; MONATH et al., 2002). Kato e colaboradores (2017), por ex., demonstraram que a substituição de um nucleotídeo adenina por guanina na posição 796 do genoma pode resultar em diferenças no tamanho das placas formadas por duas variantes de ZIKV. É possível que a falta de dados em relação à titulação de CxFV se deva ao fato de que algumas cepas desse vírus não apresentam efeito citopático, impossibilitando a titulação por coloração das placas de lise. Nesses casos, a titulação é realizada por quantificação de RNA viral por RT-PCR em tempo real (HOSHINO et al., 2007; MORALES-BETOULLE et al., 2008; COOK et al., 2009; FARFAN-ALE et al., 2009; MACHADO et al., 2012; FERNANDES et al., 2016; MORAES et al., 2019a). Essa

dificuldade poderia ser solucionada com a produção de anticorpos específicos contra o CxFV, tornando possível a titulação por detecção de unidades formadoras de foco.

Esse é o primeiro relato de isolamento do CxFV no sul do Brasil, embora o vírus já tenha sido isolado a partir de mosquitos coletados em outros estados do país. Além disso, recentemente o nosso grupo descreveu a circulação de CxFV nos estados de ES e PR e no Paraguai. Nesse estudo, 76% dos *pools* de mosquitos analisados foram positivos para ISFs, demonstrando uma alta prevalência de ISFs nessas regiões (GRAVINA et al., 2019). No entanto, a distribuição e frequência do CxFV ainda é desconhecida, e futuros estudos identificando CxFV em mosquitos são importantes para ajudar a elucidar o potencial de infecção desses vírus em insetos e também sua interferência na transmissão de arbovírus patogênicos para humanos. Foi reportado por Moraes e colaboradores (2019b) a detecção de CxFV e DENV-4 em um mesmo *pool* de mosquitos, mostrando que a coinfeção acontece na natureza. Mesmo que não haja evidências de que esses flavivirus específicos de insetos causem doenças em humanos, a alta prevalência e a possibilidade de coinfeção em mosquitos com flavivirus patogênicos mostram a importância do estudo envolvendo a interação destes vírus. Devido ao intenso efeito citopático causado pelo isolado de CxFV obtido neste trabalho não foi possível a realização de ensaios de coinfeção.

5.2 OBTENÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-ISFs

A tecnologia de produção de anticorpos monoclonais através de hibridomas foi revolucionária, pois permitiu que linfócitos B fusionados com células tumorais se tornassem imortais. Apesar dessa tecnologia ter sido desenvolvida há mais de 40 anos, ela continua sendo amplamente utilizada (KÖHLER et al., 1975; TOMITA et al., 2011).

A produção de AcM por meio da geração de hibridomas é laboriosa e requer em torno de dois a três meses para as imunizações e mais de dois meses para a triagem e caracterização dos AcM. Muitas vezes o anticorpo desejado não é encontrado na primeira tentativa de fusão, sendo necessário reiniciar o processo de imunização. Outro obstáculo encontrado é a identificação do anticorpo com a especificidade desejada (YOKOYAMA et al., 2013). Durante a fusão, muitos hibridomas são gerados. Muitos deles, no entanto, não reconhecem o antígeno de interesse, como ocorreu durante o processo para obtenção de AcM contra os vírus SbFV e CxFV, no qual muitos anticorpos secretados pelos hibridomas reconheceram componentes da célula hospedeira e apenas um foi específico para o SbFV e quatro para o CxFV. Portanto, a etapa da triagem é determinante para o sucesso da obtenção dos anticorpos monoclonais de

interesse. Foi descrito por Yokoyama et al. (2013) que a obtenção de anticorpos contra o antígeno de interesse tende a ser baixa (<1% a 5%). Neste trabalho obteve-se positividade para 0,25% (1/407) e 0,4% (4/1050) dos hibridomas testados para SbFV e CxFV, respectivamente. Mesmo que sejam identificados hibridomas que secretam os anticorpos desejados, eles podem perder a estabilidade e deixar de secretar o anticorpo ou não sobreviverem após os ciclos de congelamento, a exemplo do que ocorreu com dois dos hibridomas produzidos contra CxFV. Além disso, a obtenção desses AcM específicos está relacionada ao número de linfócitos B ativados no momento da fusão (STÄHLI et al., 1980; YOKOYAMA et al., 2013). Neste trabalho, ao final do processo de triagem, clonagem por diluição limitante e congelamento/descongelamento para avaliar a estabilidade dos hibridomas, foram obtidos um hibridoma secretor de AcM anti-SbFV (7A2/G11/G3) e dois secretores de AcM anti-CxFV (3G11/G9/G10 e 15B11/D7/A9).

Assim como foi observado no presente trabalho, Hobson-Peters et al. (2013) também não obtiveram sucesso no reconhecimento de ISFs com o uso de anticorpos que são pan-reativos para flavivirus como o AcM 4G2, confirmando que os ISFs são antigenicamente distintos dos outros membros do gênero *Flavivirus*. Sendo assim, foi crucial o desenvolvimento de anticorpos anti-SbFV e anti-CxFV como ferramenta para análise dos ensaios de coinfeções. O AcM 7A2/G11/G3 não reconheceu nenhum dos flavivirus capazes de infectar vertebrados testados. Os AcMs 3G11/G9/G10 e 15B11/D7/A9 também não reconheceram nenhum vírus testado além do CxFV e dados preliminares sugerem que esse anticorpo não reconhece outros ISFs. Até o momento, somente um trabalho foi publicado com a produção de anticorpo monoclonal anti-ISF por Hobson-Peters et al. (2013) no qual foram obtidos três anticorpos monoclonais contra o flavivirus Palm Creek.

5.3 COINFEÇÕES

Na natureza, há circulação simpátrica de diversas arboviroses (ERGÜNAY et al., 2017; FANG et al., 2018; GRAVINA et al., 2019). Nesse contexto, inclui-se a presença de ISFs na microbiota de mosquitos vetores para arbovírus com relevância médica, conforme descrito por Calisher et al. (2018). Sabe-se que a coinfeção ocorre espontaneamente na natureza, no entanto, pouco se sabe sobre a interferência dessas coinfeções sobre os diferentes arbovírus. Neste estudo investigamos a hipótese de haver interferência durante a infecção com os vírus SbFV e os vírus patogênicos ZIKV e DENV-1 no contexto de coinfeção *in vitro* em células C6/36. Na literatura, a interferência viral foi primeiramente descrita por Johnston e colaboradores (1974) como um fenômeno que consiste na incapacidade de um vírus se replicar

em uma célula ou organismo com uma infecção previamente estabelecida. Outro fenômeno também descrito é o efeito de exclusão por superinfecção, que é definido como um fenômeno no qual uma infecção já existente previne que uma infecção secundária aconteça. Esse acontecimento pode estar relacionado a mecanismos de interferência relacionados a ligação a receptores, internalização nas células ou pela competição por fatores celulares envolvidos na tradução e replicação de vírus secundários (LEE et al., 2005; FOLIMONOVA, 2012).

Nos ensaios de coinfeção realizados neste trabalho, os vírus ZIKV, DENV-1 e SbfV foram utilizados em um MOI de 0,1, concentração na qual foram capazes de infectar cerca de 50% das células no terceiro dia após a infecção. Essa condição foi determinada para evitar a saturação do sistema. Similarmente, estudos realizados com flavivirus de importância médica, como os conduzidos por Bolling et al. (2012) e Baidaliuk et al. (2019), definiram o uso de MOIs baixos (0,01-0,1) nos ensaios de coinfeção, no entanto, não há dados indicando a cinética realizada para o estabelecimento desse MOI.

Vírus específicos de insetos são geralmente mantidos em populações de mosquitos por transmissão vertical, portanto esse efeito de superinfecção pode ocorrer durante infecções persistentes com o vírus primário seguido por infecção secundária por outro ISF ou arbovírus patogênico (BOLLING et al., 2012; KENT et al., 2010; SAIYASOMBAT et al., 2011). Para se avaliar os efeitos da interação de diferentes vírus no curso da infecção, foi gerada uma linhagem de células de mosquito (C6/36) persistentemente infectada com SbfV para se estudar coinfeções com ZIKV e DENV-1.

O estabelecimento de uma subcultura de células C6/36 persistentemente infectadas por flavivirus específicos de insetos apresenta uma série de restrições devido aos efeitos citopáticos que ISVs causam nas células, como o observado durante as tentativas de estabelecer uma cultura de células persistentemente infectadas pelo CxFV (KENT et al., 2010). Diferentemente do CxFV, neste trabalho foi possível estabelecer uma linhagem de C6/36 com infecção persistente pelo SbfV, com realização de 30 passagens antes do seu uso nos experimentos de coinfeção. A infecção persistente pelo SbfV nessas células foi confirmada através de IFI, titulação e RT-PCR garantindo que o vírus continua infectando e sendo secretado pelas células. As células persistentemente infectadas não exibiam mais efeito citopático a partir da passagem 3. Esse fenômeno pode estar relacionado a mutações e adaptação do vírus à célula.

Já foi demonstrado que a produção de partículas defectivas pode estar relacionada ao estabelecimento de infecção persistente por vírus de RNA (HUANG et al., 1970). Partículas defectivas são geralmente geradas em passagens de vírus muito altas. Nesses casos, o genoma viral apresenta deleções, mantendo a produção das proteínas estruturais com informação

suficiente para replicação e incorporação em uma partícula viral madura. No entanto, essas partículas defectivas não podem se replicar sozinhas sendo necessário a presença de um vírus com genoma completo para ajudar na replicação dessas partículas (HUANG; BALTIMORE, 1970; SCHLESINGER et al., 1977; MANZONI et al., 2018). Muitos estudos envolvendo células persistentemente infectadas já identificaram a produção de partículas defectivas (RANDOLPH et al., 1988; TSAI et al., 2007; JUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2013). Neste trabalho, foi demonstrado que células C6/36-SbFV continuam secretando partículas virais infecciosas. No entanto, para verificar possíveis mutações no genoma viral, será necessário o sequenciamento completo do genoma do SbFV obtido das células C6/36-SbFV.

Nos ensaios de coinfeccção entre os vírus ZIKV/DENV-1 e SbFV, foram avaliados diversos parâmetros e condições. Quando houve a adição simultânea do ZIKV ou DENV-1 e de SbFV (infecção recente e persistente), não ocorreram diferenças estatísticas na avaliação do percentual de células infectadas, no entanto, houve uma redução no título destes vírus. Esse resultado pode sugerir que está ocorrendo interferência do SbFV na formação e/ou liberação de partículas infecciosas de ZIKV ou DENV-1.

Muitos estudos têm demonstrado resultados similares aos encontrados em nossos ensaios de coinfeccção. O grupo de Kenney et al. (2014) e Goenaga et al. (2015) demonstraram uma redução no título viral do WNV quando coinfectado com o flavivirus exclusivo de inseto Nhumirim (NHUV). Também foi demonstrada a redução do título dos vírus JEV e SLEV (Kenney et al., 2014) e ZIKV (ROMO et al., 2018) quando coinfectados com NHUV. Já Hallmendelin et al. (2016) realizaram ensaios de coinfeccção em células C6/36 entre os vírus *Palm Creek* e WNV, resultando na redução do título de WNV. O grupo de Bolling et al. (2012) realizou ensaios *in vivo* e *in vitro* de coinfeccção entre os vírus CxFV e WNV. Nestes ensaios, o vírus CxFV foi inoculado 7 dias antes do inóculo com WNV em *Culex quinquefasciatus* ou em células C6/36 e, em ambas as condições, houve redução no título de WNV.

Quando avaliada a infecção pelos vírus ZIKV ou DENV três dias após a infecção pelo SbFV, ou seja, após uma infecção recente pelo SbFV, não foram verificadas diferenças no percentual de células infectadas com DENV. Nas infecções com ZIKV, houve um discreto aumento no percentual de células infectadas, mas uma redução do título de ZIKV nesses mesmos ensaios. Essa redução no título viral também foi observada para DENV e corrobora com os resultados obtidos nos ensaios de infecção simultânea. Assim como os ensaios realizados nesse trabalho, o estudo feito por Baidaliuk et al. (2019) usou o *cell fusing agent virus* (CFAV) para avaliar os efeitos de uma coinfeccção com os vírus ZIKV e DENV. Nessa pesquisa foram conduzidos ensaios com infecção simultânea entre CFAV e ZIKV ou DENV,

ou com infecção por ZIKV ou DENV três dias após a infecção por CFAV. Os resultados obtidos foram similares aos encontrados nesse trabalho: houve a redução do título de ZIKV e de DENV em todas as condições analisadas. Nos ensaios conduzidos por Hobson-Peters et al. (2013), o vírus PCV foi inoculado previamente em células C6/36 e após 6-7 dias os vírus *Murray Valley encephalitis virus* (MVEV) ou WNV foram adicionados. Os resultados mostraram que os títulos dos vírus MVEV e WNV foram significativamente reduzidos.

Essa redução nos títulos de ZIKV e de DENV-1 observada nos ensaios de coinfeção com o SbfV foi maior nas células persistentemente infectadas do que quando as células foram infectadas simultaneamente pelos dois vírus. Essa diferença pode estar relacionada ao fenômeno de interferência viral, no qual uma célula pode se tornar menos permissiva à entrada ou replicação por um vírus, neste caso ZIKV e DENV-1, após uma infecção prévia por outro vírus, como SbfV. Uma outra hipótese para esse fenômeno é a montagem de partículas defectivas de SbfV produzidas pelas células persistentemente infectadas. Estudos têm demonstrado que essas partículas defectivas podem interferir com a produção viral ou pela competição com partículas infectivas pelos receptores celulares (SALAS-BENITO et al., 2015). Devido ao genoma das partículas defectivas ser menor, aparentemente essas partículas são preferencialmente replicadas, impedindo que um vírus de infecção secundária se replique em grandes concentrações (PERRAULT, 1981; KARPF et al., 1997). No estudo conduzido por Burivong et al. (2004) também foi relacionada a redução do título de DENV com a produção de partículas defectivas por uma linhagem celular persistentemente infectada com *Aedes albopictus* densovirus (AalDENV).

Quando a infecção pelo SbfV foi avaliada, houve uma redução no percentual de células infectadas pelo SbfV na linhagem de C6/36 persistentemente infectada por este vírus após a coinfeção com ZIKV ou DENV-1. Curiosamente, isso não foi observado quando a infecção pelo ZIKV ou DENV-1 ocorreu simultaneamente ou após uma infecção recente pelo SbfV. As mutações e/ou adaptações do SbfV à C6/36 durante o estabelecimento da infecção persistente podem ter alterado o fenótipo viral e causado essa diferença.

Resumidamente, os ensaios de coinfeção demonstraram uma redução na porcentagem de células infectadas pelo SbfV, no entanto, sem alteração no título viral. O oposto foi observado para os vírus ZIKV e DENV-1: redução no título viral sem alteração no percentual de células infectadas por estes vírus. Como demonstrado na imagem representativa com marcação dos vírus por imunofluorescência (Fig. 23), algumas células estão coinfectadas pelo SbfV e ZIKV/DENV-1, enquanto outras permanecem infectadas apenas por SbfV ou ZIKV/DENV-1. Pode-se especular, com base nesses dados que o percentual de células

infectadas por ZIKV ou DENV-1 não tenha sofrido mudanças, mas que as células coinfetadas com SbfV apresentem menos secreção de ZIKV ou DENV-1. Igualmente, a redução do título dos vírus ZIKV e DENV-1 quando coinfetados com o SbfV das células persistentemente infectadas, pode ser resultado do mecanismo de exclusão por superinfecção envolvendo a competição ou modificação dos fatores celulares que, como demonstrado por Lee e colaboradores (2005), resulta na redução da replicação do RNA viral quando ocorre a coinfecção. Estudo realizado por Zou et al. (2009), usando WNV e células BHK-21, identificou um mecanismo de exclusão por superinfecção entre flavivirus durante a síntese do RNA viral, no qual houve o sequestro de fatores celulares envolvidos na replicação do RNA para beneficiar a replicação do vírus com infecção primária na célula. Estudos adicionais são necessários para se elucidar os mecanismos pelos quais esta interferência está ocorrendo no caso de coinfecção entre SbfV e ZIKV/DENV-1.

Considerando que a maioria dos experimentos conduzidos para estudar a competência viral utilizaram células C6/36, de *Aedes albopictus*, e que essa linhagem celular apresenta um resposta antiviral deficiente (BRACKNEY et al., 2010), é necessária a execução desses experimentos de coinfecção em diferentes linhagens celulares, assim como a realização de estudos *in vivo* para garantir a validade biológica dos resultados.

Os resultados apresentados nesse trabalho, com redução na liberação de partículas infecciosas de ZIKV e DENV-1 após infecção por SbfV são promissores. Embora a infecção por ZIKV e DENV-1 não tenha sido totalmente bloqueada, este trabalho pode servir de base para a utilização de ISFs como interferentes no ciclo viral de arbovírus patogênicos nos vetores. Considerando que novas estratégias para controle biológico devem apresentar custo reduzido, efetividade, não interferirem com o meio ambiente, serem seguras e autossustentáveis, o possível uso de ISFs como ferramenta para o controle de arbovírus de importância médica tem o potencial de cumprir esses requisitos, demonstrando a necessidade de se ampliar as pesquisas relacionadas a ISFs e interação com outros vírus e com os vetores.

6 CONCLUSÕES

- O vírus CxFV MS367 foi isolado a partir de mosquitos naturalmente infectados e teve sua identidade confirmada por sequenciamento;
- Foi produzido um AcM anti-SbFV, nomeado 7A2/G11/G3 do isotipo IgG1 com cadeia leve κ e dois anti-CxFV nomeados 3G11/G9/G10 e 15B11/D7/A9, ambos IgG1 com cadeia leve κ . Os AcM anti-SbFV e anti-CxFV se mostraram específicos até o momento para SbFV e CxFV, respectivamente;
- Os ensaios de padronização de coinfeção foram realizados para SbFV, ZIKV e DENV e estabeleceu-se o MOI de 0,1 e os tempos de 3 e 6 dias pós-infecção para as análises. Para o vírus CxFV MS367, verificou-se através da cinética de infecção, a sua inviabilidade para uso nos ensaios de coinfeção devido ao intenso efeito citopático;
- Foi gerada uma linhagem de células C6/36 persistentemente infectadas pelo SbFV;
- Não ocorreu diferença significativa na porcentagem de células infectadas por ZIKV ou DENV na coinfeção com o SbFV;
- Houve redução no título de ZIKV e DENV quando as células foram coinfectados com SbFV;
- A porcentagem de células persistentemente infectadas com o SbFV sofreu uma redução quando coinfectadas com ZIKV ou DENV.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar os ensaios de caracterização biológica do vírus CxFV MS367 em células de vertebrados por tempos mais prolongados;
- Sequenciar o genoma do vírus CxFV MS367 finalizando sua caracterização;
- Determinar que proteínas são reconhecidas pelos AcM produzidos;
- Sequenciar o genoma do SbFV das células persistentemente infectadas para verificar possíveis mutações que poderiam explicar a mudança de fenótipo;
- Realizar a análise dos ensaios de coinfeções por RT-PCR em tempo real (qPCR) para quantificação dos genomas virais;
- Incluir outros vírus – outros ISFs e vírus da febre amarela, por ex. – nos ensaios de coinfeção.

8 REFERENCIAS

- AMBERG, S. M.; NESTOROWICZ, A.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies. **Journal of virology**, v. 68, p. 3794–3802, 1994.
- BAIDALIUK, A.; MIOT, E. F.; LEQUIME, S.; et al. Cell-Fusing Agent Virus Reduces Arbovirus Dissemination in Aedes aegypti Mosquitoes In Vivo. **Journal of Virology**, v. 93, p. e00705-19, 2019.
- BEARCROFT, W. G. C. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 5, p. 442-448 1956.
- BESNARD, M.; LASTÈRE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V. M.; MUSSO, D. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20751, 2014.
- BHATNAGAR, J.; RABENECK, D. B.; MARTINES, R. B.; et al. Zika virus RNA replication and persistence in brain and placental tissue. **Emerging Infectious Diseases** v. 19, n. 13, p. 20751, 2017.
- BOLLING, B. G.; OLEA-POPELKA, F. J.; EISEN, L.; MOORE, C. G.; BLAIR, C. D. 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.
- BOLLING, B. G.; WEAVER, S. C.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. Insect-specific virus discovery: Significance for the arbovirus community. **Viruses**, v. 7, n. 09, p. 2851, 2015.
- BRACKNEY, D. E.; SCOTT, J. C.; SAGAWA, F.; et al. C6/36 Aedes albopictus cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10 p. 856, 2010.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 3. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasil.**, v. 51, n. 5, 2020.
- BRASIL, M. DA S. Boletim Epidemiológico 13: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasil.**, 2019.
- BRIANT, L.; DESPRÈS, P.; CHOUMET, V.; MISSÉ, D. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. **Virology**, v. 06, n. 23, 2014.
- BURIVONG, P.; PATTANAKITSAKUL, S. N.; THONGRUNGIAT, S.; MALASIT, P.; FLEGEL, T. W. Markedly reduced severity of Dengue virus infection in mosquito cell cultures persistently infected with Aedes albopictus densovirus (AalDENV). **Virology**, v. 329, n. 2, p. 261–269, 2004.

CALISHER, C. H.; HIGGS, S. The Discovery of Arthropod-Specific Viruses in Hematophagous Arthropods: An Open Door to Understanding the Mechanisms of Arbovirus and Arthropod Evolution? **Annual Review of Entomology**, v. 63, n. 87, p. 103, 2018.

CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. S. O.; et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6 p. 653-660, 2016.

CALZOLARI, M.; ZÉ-ZÉ, L.; RŮŽEK, D.; et al. Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 6, p 1215-1225, 2012.

CAMMISA-PARKS, H.; CISAR, L. A.; KANE, A.; STOLLAR, V. The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): Homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. **Virology**, v. 182, n. 2, p. 511-24, 1992.

CAO-LORMEAU, V. M.; BLAKE, A.; MONS, S.; et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, v. 387, p. 1531-1539, 2016.

CDC. Zika Virus - Transmission & Risks. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/transmission/>>. Acesso em: 17/4/2017.

CDC. Zika virus: Clinical evaluation and disease. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/preparing-for-zika/clinicalevaluationdisease.html>>. Acesso em: 16/9/2019.

CHAMBERS, T. Flavivirus Genome Organization, Expression, And Replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649-88, 1990.

CHAMBERS, T. J.; NESTOROWICZ, A.; AMBERG, S. M.; RICE, C. M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. **Journal of Virology**, v. 67, n. 11, p. 6797-807, 1993.

CHEN, Y. P.; BECNEL, J. J.; VALLES, S. M. RNA viruses infecting pest insects. **Insect Pathology**, n. 5, p. 133-170, 2012.

COLLINS, A. Fields Virology. **Immunological Investigations**, v. 6, p. 2456-598, 2007.

COOK, S.; MOUREAU, G.; HARBACH, R. E.; et al. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of Culex flavivirus (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 11, p. 2669, 2009.

COUNOTTE, M. J.; KIM, C. R.; WANG, J.; et al. Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. **PLoS Medicine**, v. 15, n. 7, 2018.

CRABTREE, M. B.; SANG, R. C.; STOLLAR, V.; DUNSTER, L. M.; MILLER, B. R. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. **Archives of Virology**, v. 178. n. 6, p. 1095-118, 2003.

DAFFIS, S.; SZRETTTER, K. J.; SCHRIEWER, J.; et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. **Nature**, v. 469, n. 7322, p. 452-6, 2010.

DANG, J.; TIWARI, S. K.; LICHINCHI, G.; et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, 2016.

DICK, G. W. A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DIRLIKOV, E.; MEDINA, N. A.; MAJOR, C. G.; et al. Acute zika virus infection as a risk factor for Guillain-Barré syndrome in Puerto Rico. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 318, n. 15, p. 1498-1500, 2017.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviroses emergentes no Brasil : desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 30, p. 10–15, 2017.

DRIGGERS, R. W.; HO, C.-Y.; KORHONEN, E. M.; et al. Zika Virus Infection With Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **Obstetric Anesthesia Digest**, , v. 374, n. 22, p. 2142-51, 2017.

DUFFY, M. R.; CHEN, T.-H.; HANCOCK, W. T.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-43, 2009.

DUGGAL, N. K.; RITTER, J. M.; PESTORIUS, S. E.; et al. Frequent Zika Virus Sexual Transmission and Prolonged Viral RNA Shedding in an Immunodeficient Mouse Model. **Cell Reports**, v. 18, n. 7, p. 1751–1760, 2017.

DUNN, J. J. Specimen Collection, Transport, and Processing: Virology*. **Manual of Clinical Microbiology**, 11th Edition, 2015.

ERASMUS, J. H.; NEEDHAM, J.; RAYCHAUDHURI, S.; et al. Utilization of an Eilat Virus-Based Chimera for Serological Detection of Chikungunya Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, 2015.

ERGÜNAY, K.; LITZBA, N.; BRINKMANN, A.; et al. Co-circulation of West Nile virus and distinct insect-specific flaviviruses in Turkey. **Parasites and Vectors**, v. 10, p. 149, 2017.

FANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, Z. BIN; et al. Co-circulation of Aedes flavivirus, Culex flavivirus, and Quang Binh virus in Shanghai, China. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 7, n. 75, 2018.

FARFAN-ALE, J. A.; LOROÑO-PINO, M. A.; GARCIA-REJON, J. E.; et al. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 1, p. 85–95, 2009.

FERNANDES, L. N.; PAULA, M. B. DE; ARAÚJO, A. B.; et al. Detection of Culex flavivirus and Aedes flavivirus nucleotide sequences in mosquitoes from parks in the city of São Paulo, Brazil. **Acta Tropica**, v. 157, p. 73-83, 2016.

- FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, 2000.
- FLAMAND, M.; MEGRET, F.; MATHIEU, M.; et al. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 6104-10, 1999.
- FOLIMONOVA, S. Y. Superinfection Exclusion Is an Active Virus-Controlled Function That Requires a Specific Viral Protein. **Journal of Virology**, v. 86, n. 10, p. 5554-61, 2012.
- FORRESTER, N. L.; COOK, S.; CHARREL, R. N.; et al. New Insights into Flavivirus Evolution, Taxonomy and Biogeographic History, Extended by Analysis of Canonical and Alternative Coding Sequences. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0117849, 2015.
- FOY, B. D.; KOBYLINSKI, K. C.; FOY, J. L. C.; et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880-2, 2011.
- FRANÇA, G. V. A.; SCHULER-FACCINI, L.; OLIVEIRA, W. K.; et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **The Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 891-7, 2016.
- GOENAGA, S.; KENNEY, J. L.; DUGGAL, N. K.; et al. Potential for co-infection of a mosquito-specific flavivirus, nhumirim virus, to block west nile virus transmission in mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 5801-12, 2015.
- GOIC, B.; STAPLEFORD, K. A.; FRANGEUL, L.; et al. Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. **Nature Communications**, v. 7, p. 12410, 2016.
- GOLLINS, S. W.; PORTERFIELD, J. S. Flavivirus infection enhancement in macrophages: An electron microscopic study of viral cellular entry. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 9, p. 1969-82, 1985.
- GOULD, E.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500-9, 2008.
- GOURINAT, A. C.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; GOARANT, C.; DUPONT-ROUZEYROL, M. Detection of zika virus in urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 84-86, 2015.
- GRABOWSKI, J. M.; HILL, C. A. A Roadmap for Tick-Borne Flavivirus Research in the "Omics" Era. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.
- GRAVINA, H. D.; SUZUKAWA, A. A.; ZANLUCA, C.; et al. Identification of insect-specific flaviviruses in areas of Brazil and Paraguay experiencing endemic arbovirus transmission and the description of a novel flavivirus infecting *Sabethes belisarioi*. **Virology**, v. 527, p. 98–106, 2019.
- GUBLER, D. J. Epidemiology of arthropod-borne viral diseases. **CRC Press Inc**, p. 223–260, 1988.
- GUBLER, D. J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerging*

- Infectious Diseases. **Emerg Infect Dis.**, v. 4, n. 3, p. 442-450, 1998.
- GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. **Tropical Medicine and Health** v. 39, n. 4, p. 3-11, 2011.
- GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 55-7, 1995.
- GUILARDE, A. O.; TURCHI, M. D.; JR., J. B. S.; et al. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 817-24, 2008.
- HADDOW, ANDREW D; GUZMAN, H.; POPOV, V. L.; 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.
- HALL-MENDELIN, S.; MCLEAN, B. J.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; et al. The insect-specific Palm Creek virus modulates West Nile virus infection in and transmission by Australian mosquitoes. **Parasites and Vectors**, v. 9, p. 414, 2016.
- HALSTEAD, S. M. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Handbook of Zoonoses, Second Edition, Section B: Viral Zoonoses**, 2017.
- HARRIS, E.; VIDEA, E.; PÉREZ, L.; et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 1-2, p. 5-11, 2000.
- HEDGES, L. M.; BROWNLIE, J. C.; O'NEILL, S. L.; JOHNSON, K. N. Wolbachia and virus protection in insects. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 702, 2008.
- HOBSON-PETERS, J.; YAM, A. W. Y.; LU, J. W. F.; et al. A New Insect-Specific Flavivirus from Northern Australia Suppresses Replication of West Nile Virus and Murray Valley Encephalitis Virus in Co-infected Mosquito Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.
- HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 100, n. 11, p. 1587-1592, 2003.
- HOSHINO, K.; ISAWA, H.; TSUDA, Y.; et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from Culex pipiens mosquito in Japan. , v. 359, p. 405–414, 2007.
- HOSHINO, K.; TAKAHASHI-NAKAGUCHI, A.; ISAWA, H.; et al. Entomological Surveillance for Flaviviruses at Migratory Bird Stopover Sites in Hokkaido, Japan, and a New Insect Flavivirus Detected in Aedes galloisi (Diptera: Culicidae) . **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 1, p. 175-82, 2012.
- HOTTA, S. Experimental Studies on Dengue: I. Isolation, Identification and Modification of the Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 90, n. 1, p. 1–9, 1952.
- HUANG, A. S.; BALTIMORE, D. Defective Viral Particles and Viral Disease Processes. **Nature**, v. 226, n. 5243, p. 325-7, 1970.
- HURRELBRINK, R. J.; MCMINN, P. C. Attenuation of Murray Valley Encephalitis Virus by

Site-Directed Mutagenesis of the Hinge and Putative Receptor-Binding Regions of the Envelope Protein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 16, p. 7692-702, 2001.

HYDE, J. L.; DIAMOND, M. S. Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O methylation. **Virology**, v. 66, n. 74, 2015.

IOOS, S.; MALLET, H. P.; LEPARC GOFFART, I.; et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.

JOHNSTON, R. E.; WAN, K.; BOSE, H. R. Homologous Interference Induced by Sindbis Virus. **Journal of Virology**, v. 14, n. 5, p. 1076-82, 1974.

JUÁREZ-MARTÍNEZ, A. B.; VEGA-ALMEIDA, T. O.; SALAS-BENITO, M.; et al. Detection and sequencing of defective viral genomes in C6/36 cells persistently infected with dengue virus 2. **Archives of Virology**, v. 158, n. 3, 2013.

KARPF, A. R.; LENCHES, E.; STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H.; BROWN, D. T. Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with Sindbis virus. **Journal of virology**, v. 71, n. 9, p. 7119–7123, 1997.

KATO, F.; TAJIMA, S.; NAKAYAMA, E.; et al. Characterization of large and small-plaque variants in the Zika virus clinical isolate. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16160, 2017.

KENNEY, J. L.; SOLBERG, O. D.; LANGEVIN, S. A.; BRAULT, A. C. Characterization of a novel insect-specific flavivirus from Brazil: Potential for inhibition of infection of arthropod cells with medically important flaviviruses. **Journal of General Virology**, v. 95, n. 12, p. 2796-2808, 2014.

KENT, R. J.; CRABTREE, M. B.; MILLER, B. R. Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with culex flavivirus izabal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, 2010.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin. **Archives of Virology**, v. 141, n. 3-4, p. 685-99, 1996.

KIM, D. Y.; GUZMAN, H.; BUENO, R.; et al. Characterization of *Culex* Flavivirus (Flaviviridae) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. **Virology**, v. 386, n. 1, p. 154-9, 2009.

KROL, E.; BRZUSKA, G.; SZEWCZYK, B. Production and Biomedical Application of Flavivirus-like Particles. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 11, p. 1202-1216, 2019.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 174, n. 5, p. 2453-5, 1975.

KOŁODZIEJEK, J.; PACHLER, K.; BIN, H.; et al. Barkedji virus, a novel mosquito-borne flavivirus identified in *Culex perexiguus* mosquitoes, Israel, 2011. **Journal of General Virology**, v. 9544, n. 11, p. 2449-457, 2013.

KUNO, G.; CHANG, G. J.; TSUCHIYA, K. R.; KARABATSOS, N.; CROPP, C. B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.

- LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.
- LAURETI, M.; NARAYANAN, D.; RODRIGUEZ-ANDRES, J.; FAZAKERLEY, J. K.; KEDZIERSKI, L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2180, 2018.
- LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **Journal of Virology**, v. 90, n. 10, p. 7864-875, 2016.
- LEDERMANN, J. P.; GUILLAUMOT, L.; YUG, L.; et al. Aedes hensilli as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.
- LEE, W. S.; WEBSTER, J. A.; MADZOKERE, E. T.; STEPHENSON, E. B.; HERRERO, L. J. Mosquito antiviral defense mechanisms: A delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 165, 2019.
- LEE, Y.-M.; TSCHERNE, D. M.; YUN, S.-I.; FROLOV, I.; RICE, C. M. Dual Mechanisms of Pestiviral Superinfection Exclusion at Entry and RNA Replication. **Journal of Virology**, v. 79, n. 6, p. 3231-42, 2005.
- LEUNG, D.; SCHRODER, K.; WHITE, H.; et al. Activity of Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Protease in the Presence of a Truncated NS2B Co-factor, Small Peptide Substrates, and Inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, 2001.
- LI, C.; XU, D.; YE, Q.; et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 130-6, 2016.
- LI, L.; LOK, S. M.; YU, I. M.; et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: Structure and maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1830-4, 2008.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. Molecular biology of flaviviruses. **Adv Virus Res.**, v. 59, p. 23–61, 2003.
- LOBIGS, M. Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 13, p. 6218-22, 2006.
- LORD, C. C.; RUTLEDGE, C. R.; TABACHNICK, W. J. Relationships Between Host Viremia and Vector Susceptibility for Arboviruses. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 3, p. 623-30, 2006.
- LUTOMIAH, J. J. L.; MWANDAWIRO, C.; MAGAMBO, J.; SANG, R. C. Infection and Vertical Transmission of Kamiti River Virus in Laboratory Bred Aedes aegypti Mosquitoes. **Journal of Insect Science**, v. 7, p. 1-7, 2007.
- MA, L.; JONES, C. T.; GROESCH, T. D.; KUHN, R. J.; POST, C. B. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 10, p. 3414-9, 2004.
- MACHADO, D. C.; MONDINI, A.; SANTOS SANTANA, V. DOS; et al. First identification

of culex flavivirus (flaviviridae) in brazil. **Intervirolgy**, v. 55, n. 6, p. 475-83, 2012.

MACKENZIE, J. M.; WESTAWAY, E. G. Assembly and Maturation of the Flavivirus Kunjin Virus Appear To Occur in the Rough Endoplasmic Reticulum and along the Secretory Pathway, Respectively. **Journal of Virology**, v. 75, n. 22, p. 10787-99, 2002.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139-75, 1954.

MANZONI, T. B.; LÓPEZ, C. B. Defective (interfering) viral genomes re-explored: Impact on antiviral immunity and virus persistence. **Future Virology**, v. 13, n. 7, p. 493-503, 2018.

MARKLEWITZ, M.; ZIRKEL, F.; RWEGO, I. B.; et al. Discovery of a Unique Novel Clade of Mosquito-Associated Bunyaviruses. **Journal of Virology**, v. 87, n. 23, p. 12850-65, 2013.

MARTINES, R. B.; BHATNAGAR, J.; KEATING, M. K.; et al. *Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses — Brazil, 2015*. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 6, p. 159-60, 2016.

MINER, J. J.; CAO, B.; GOVERO, J.; et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise Article Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico 2017 SE 51**. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue diagnóstico e manejo clínico adulto e criança**. 2016.

MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N.; et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, p. 951-958, 2016.

MONATH, T. P.; ARROYO, J.; LEVENBOOK, I.; et al. Single Mutation in the Flavivirus Envelope Protein Hinge Region Increases Neurovirulence for Mice and Monkeys but Decreases Viscerotropism for Monkeys: Relevance to Development and Safety Testing of Live, Attenuated Vaccines. **Journal of Virology**, v. 76, n. 4, p. 1932-43, 2002.

MORAES, O. S.; CARDOSO, B. F.; PACHECO, T. A.; et al. Natural infection by Culex flavivirus in Culex quinquefasciatus mosquitoes captured in Cuiabá, Mato Grosso Mid-Western Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, n. 3, p. 397-406, 2019.

MORALES-BETOULLE, M. E.; PINEDA, M. L. M.; SOSA, S. M.; et al. Culex Flavivirus Isolates from Mosquitoes in Guatemala. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1187-90, 2008.

MOTTA, I. J. F.; SPENCER, B. R.; SILVA, S. G. C. DA; et al. Evidence for transmission of zika virus by platelet transfusion. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 11, p. 1101-3, 2016.

MURRAY, C. J. L.; BARBER, R. M.; FOREMAN, K. J.; et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990-2013: Quantifying the epidemiological transition. **The**

Lancet, v. 386, p. 2145-91, 2015.

MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: Roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 699-708, 2008.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V.-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, 2014.

MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN, T.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V. M. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. 595-6, 2014.

NASAR, F.; GORCHAKOV, R. V.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Eilat Virus Host Range Restriction Is Present at Multiple Levels of the Virus Life Cycle. **Journal of Virology**, v. 89, n. 2, p. 1404-18, 2015.

NASAR, F.; PALACIOS, G.; GORCHAKOV, R. V.; et al. Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 36, p. 14622-7, 2012.

NEWMAN, CHRISTINA M.; CERUTTI, F.; ANDERSON, T. K.; et al. Culex Flavivirus and West Nile Virus Mosquito Coinfection and Positive Ecological Association in Chicago, United States. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1099–1105, 2011.

NORONHA, L. DE; ZANLUCA, C.; BURGER, M.; et al. Zika virus infection at different pregnancy stages: Anatomopathological findings, target cells and viral persistence in placental tissues. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2266, 2018.

NUTTALL, P. A.; LABUDA, M. Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface. **Advances in Virus Research**, v. 60, p. 233-72, 2003.

OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P.; et al. Zika virus infection complicated by guillain-barre syndrome: case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 9, 2014.

ONORATI, M.; LI, Z.; LIU, F.; et al. Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. **Cell Reports**, 2016.

OSANAI, C. H.; ROSA, A. P.; TANG, A. T.; et al. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima Nota previa. / Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-4, 1983.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological Update: Dengue. February, p. 14, 2019.

PARREIRA, R.; COOK, S.; LOPES, Â.; et al. Genetic characterization of an insect-specific flavivirus isolated from Culex theileri mosquitoes collected in southern Portugal. **Virus Research**, v. 167, n. 2, p. 152-61, 2012.

PELEG, J. Growth of arboviruses in monolayers from subcultured mosquito embryo cells. **Virology**, v. 35, n. 4, p. 617-9, 1968.

- PENOT, P.; BRICHLER, S.; GUILLEMINOT, J.; et al. Infectious Zika virus in vaginal secretions from an HIV-infected woman, France, August 2016. **Eurosurveillance**, v. 54, p. 2546-570, 2017.
- PEPIN, K. M.; LAMBETH, K.; HANLEY, K. A. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1–10, 2008.
- PERERA-LECOIN, M.; MEERTENS, L.; CARNEC, X.; AMARA, A. Flavivirus entry receptors: An update. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 69-88, 2013.
- PERRAULT, J. Origin and replication of defective interfering particles. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 93, p. 151-207, 1981.
- PETERSEN, E. E.; MEANEY-DELMAN, D.; NEBLETT-FANFAIR, R.; et al. Update: Interim Guidance for Preconception Counseling and Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus for Persons with Possible Zika Virus Exposure — United States, September 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 36, p. 1077-81, 2016.
- PETTERSSON, J. H. O.; FIZ-PALACIOS, O. Dating the origin of the genus Flavivirus in the light of Beringian biogeography. **Journal of General Virology**, v. 95, n. PART 9, p. 1969–1982, 2014.
- PIERSON, T. C.; KIELIAN, M. Flaviviruses: Braking the entering. , **Curr Opin Virol**. v. 3, n. 1, p. 3–12, 2014.
- POIRIER, E. Z.; GOIC, B.; TOMÉ-PODERTI, L.; et al. Dicer-2-Dependent Generation of Viral DNA from Defective Genomes of RNA Viruses Modulates Antiviral Immunity in Insects. **Cell Host and Microbe**, v. 14, n. 23, p. 353-365, 2018.
- POWERS, A. M. Overview of emerging arboviruses. **Future Virology**, v. 31, n. 1 2009.
- PRISANT, N.; BUJAN, L.; BENICHO, H.; et al. Zika virus in the female genital tract. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1000-1001, 2016.
- RANDOLPH, V. B.; HARDY, J. L. Phenotypes of St Louis encephalitis virus mutants produced in persistently infected mosquito cell cultures. **The Journal of general virology**, v. 69, n. 9, p. 2199-207, 1988.
- REYNOLDS, M. R.; JONES, A. M.; PETERSEN, E. E.; et al. Vital Signs: Update on Zika Virus–Associated Birth Defects and Evaluation of All U.S. Infants with Congenital Zika Virus Exposure — U.S. Zika Pregnancy Registry, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 13, p. 366-373, 2017.
- REZZA, G. Dengue and chikungunya: long-distance spread and outbreaks in naïve areas. **Pathogens and Global Health**, v. 108, n. 8, p. 349-55, 2014.
- RICE, C. M.; LENCHES, E. M.; EDDY, S. R.; et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 726-33, 1985.
- ROBERTSON, S. J.; MITZEL, D. N.; TAYLOR, R. T.; BEST, S. M.; BLOOM, M. E. Tick-borne flaviviruses: Dissecting host immune responses and virus countermeasures.

Immunologic Research, v. 43, n. 1-3, p. 172-86, 2009.

ROCHA, M. N.; DUARTE, M. M.; MANSUR, S. B.; et al. Pluripotency of Wolbachia against Arboviruses: the case of yellow fever. **Gates Open Research**, v. 3, n. 161, 2019.

ROIZ, D.; VÁZQUEZ, A.; ROSSO, F.; et al. Detection of a new insect flavivirus and isolation of Aedes flavivirus in Northern Italy. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, 2012.

ROMO, H.; KENNEY, J. L.; BLITVICH, B. J.; BRAULT, A. C. Restriction of Zika virus infection and transmission in Aedes aegypti mediated by an insect-specific flavivirus. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 181, 2018.

ROTH, A.; MERCIER, A.; LEPERS, C.; et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and zika virus infections – An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 41, 2014.

ROUNDY, C. M.; AZAR, S. R.; ROSSI, S. L.; WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Insect-Specific Viruses: A Historical Overview and Recent Developments. **Advances in Virus Research**, v. 98, p. 119-146, 2017.

RUST, R. S. Human Arboviral Encephalitis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 19, n. 3, p. 130-51, 2012.

SAIYASOMBAT, R.; BOLLING, B. G.; BRAULT, A. C.; BARTHOLOMAY, L. C.; BLITVICH, B. J. Evidence of Efficient Transovarial Transmission of Culex Flavivirus by Culex pipiens (Diptera: Culicidae) . **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 5, p. 1031-8, 2011.

SALAS-BENITO, J. S.; NOVA-OCAMPO, M. DE. Viral interference and persistence in mosquito-borne flaviviruses. **Journal of Immunology Research**, v. 2015: 873404, 2015.

SALAZAR, M. I.; RICHARDSON, J. H.; SÁNCHEZ-VARGAS, I.; OLSON, K. E.; BEATY, B. J. Dengue virus type 2: Replication and tropisms in orally infected Aedes aegypti mosquitoes. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 9, 2007.

SALLES, T. S.; ENCARNAÇÃO SÁ-GUIMARÃES, T. DA; ALVARENGA, E. S. L. DE; et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: A review. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, 2018.

SÁNCHEZ-SECO, M. P.; ROSARIO, D.; DOMINGO, C.; 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.

SANTOS, T. DOS; RODRIGUEZ, A.; ALMIRON, M.; et al. Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 16, p. 1598-1601, 2016.

SCHERER, W. F. International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, n. 2, p. 372-440, 2017.

SCHLESINGER, R. W.; STOLLAR, V.; GUILD, G. M.; et al. The significance and nature of

defective interfering viruses. **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften**, v. 33, n. 4–6, p. 229–42, 1977.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação. , p. 176, 2016.

SHOPE, R. E. The Discovery of Arbovirus Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 740, p. 138-45, 1994.

SILVA, J. S.; MARIANO, Z. D. F.; SCOPEL, I. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*: da tentativa da erradicação às políticas de controle. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 3, n. 6, p. 163-165, 2008.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2-3, 2017.

SIVAN, A.; SHRIRAM, A. N.; SUGUNAN, A. P.; et al. Natural transmission of dengue virus serotype 3 by *Aedes albopictus* (Skuse) during an outbreak in Havelock Island: Entomological characteristics. **Acta Tropica**, v. 156, p. 122-9, 2016.

SLON CAMPOS, J. L.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. R. The immune response against flaviviruses. **Nature Immunology**, v. 11, n. 1, 2018.

STÄHLI, C.; STAEHELIN, T.; MIGGIANO, V.; SCHMIDT, J.; HÄRING, P. High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. **Journal of Immunological Methods**, v. 32, n. 3, p. 397-304, 1980.

STOLLAR, V.; THOMAS, V. L. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. **Virology**, v. 64, n. 2, p. 367-77, 1975.

STROTTMANN, D. M.; ZANLUCA, C.; MOSIMANN, A. L. P.; et al. Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates from different Brazilian regions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.

TAKEGAMI, T.; SAKAMURO, D.; FURUKAWA, T. Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. **Virus Genes**, v. 9, n. 2, p. 105-12, 1995.

TANG, H.; HAMMACK, C.; OGDEN, S. C.; et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587-90, 2016.

TEUNISSEN, E. A.; RAAD, M. DE; MASTROBATTISTA, E. Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 1, p. 305-321, 2013.

TOMITA, M.; TSUMOTO, K. Hybridoma technologies for antibody production. **Immunotherapy**, v. 21, n. 1, 2011.

TSAI, K. N.; TSANG, S. F.; HUANG, C. H.; CHANG, R. Y. Defective interfering RNAs of Japanese encephalitis virus found in mosquito cells and correlation with persistent infection. **Virus Research**, v. 124, n. 1-2, p. 139-150, 2007.

- ULOHA, A. I.; LIALIKAU, S. A. [The relationship between insulin-dependent diabetes mellitus and acute infections in children]. **Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw.** v. 9, n. 2, p. 73-6, 2003.
- VASILAKIS, N.; TESH, R. B. Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. **Current Opinion in Virology**, v. 15, p. 69-74, 2015.
- VEDOVELLO, D.; DRUMOND, B. P.; MARQUES, R. E.; et al. First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, n. 5, p. 1189–1195, 2015.
- VEGA-ALMEIDA, T. O.; SALAS-BENITO, M.; NOVA-OCAMPO, M. A. DE; ANGEL, R. M. DEL; SALAS-BENITO, J. S. Surface proteins of C6/36 cells involved in dengue virus 4 binding and entry. **Archives of Virology**, v. 158, n. 6, p. 1189–1207, 2013.
- WANG, E.; NI, H.; XU, R.; et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of virology**, v. 74, n. 7, p. 3227-324, 2000.
- WANG, HUANYU; WANG, HAIYAN; FU, S.; et al. Isolation and identification of a distinct strain of Culex Flavivirus from mosquitoes collected in Mainland China. **Virology Journal**, v. 9, n. 73 2012.
- WANG, Y.; XIA, H.; ZHANG, B.; LIU, X.; YUAN, Z. Isolation and characterization of a novel mesonivirus from Culex mosquitoes in China. **Virus Research**, v. 240, n. August, p. 130–139, 2017.
- WATTS, D. M.; BURKE, D. S.; HARRISON, B. A.; WHITMIRE, R. E.; NISALAK, A. Effect of temperature on the vector efficiency of Aedes aegypti for dengue 2 virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, n. 1, p. 143-52, 1987.
- WESTAWAY, E. G. Flavivirus replication strategy. **Advances in Virus Research**, v. 33, p. 45-90, 1987.
- WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-28, 2007.
- WHO. Dengue and severe dengue. **WHO Fact Sheet**, 2017.
- WHO. Zika epidemiology update., p. 1–14, 2019.
- WHO. Epidemiological Update Dengue. November, p. 1–14, 2019.
- WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D. J.; WEAVER, S. C.; et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 101-106, 2017.
- WOODRING, J. L.; HIGGS, S.; BEATY, B. J. Natural cycles of vector borne pathogens. **Biology of Disease Vectors**, v. 3, n. 4, p. 561-569, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANISATION. WHO | WHO guidelines for the prevention of sexual transmission of Zika virus. **WHO**, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd edition. **WHO**, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; WHO. Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020. **WHO**, 2012.

YAMAO, T.; ESHITA, Y.; KIHARA, Y.; et al. Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). **Archives of Virology**, v. 154, n. 1, p. 153-8, 2009.

YOKOYAMA, W. M., CHRISTENSEN, M., SANTOS, G. D., MILLER, D., HO, J., WU, T., DZIEGELEWSKI, M. AND NEETHLING, F. A. Production of Monoclonal Antibodies. **Current Protocols in Immunology**, p. 1–17, 2013.

YU, I. M.; ZHANG, W.; HOLDAWAY, H. A.; et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1834-7, 2008.

ZANLUCA, C.; DUARTE DOS SANTOS, C. N.; NORONHA, L. DE. Maternal-fetal transmission of the zika virus: An intriguing interplay. **Tissue Barriers** v. 6(1): e1402143, 2018.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A. DE; MOSIMANN, A. L. P.; et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZHAO, Y.; SOH, T. S.; LIM, S. P.; et al. Molecular basis for specific viral RNA recognition and 2'-O-ribose methylation by the dengue virus nonstructural protein 5 (NS5). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 48, p. 14834-14839, 2015.

ZOU, G.; ZHANG, B.; LIM, P.-Y.; et al. Exclusion of West Nile Virus Superinfection through RNA Replication. **Journal of Virology**, v. 83, n. 22, p. 11765-11776, 2009.