

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

José Valter Joaquim Silva Júnior

**GENÉTICA REVERSA DE ARBOVÍRUS: CHIKUNGUNYA, FEBRE AMARELA E
DENGUE**

**RECIFE
2018**

JOSÉ VALTER JOAQUIM SILVA JÚNIOR

**GENÉTICA REVERSA DE ARBOVÍRUS: CHIKUNGUNYA, FEBRE AMARELA E
DENGUE**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para
a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dr^a. Laura Helena Vega Gonzales Gil

Coorientador: Dr. Giovani Rota Bertani

RECIFE

2018

JOSÉ VALTER JOAQUIM SILVA JÚNIOR

**GENÉTICA REVERSA DE ARBOVÍRUS: CHIKUNGUNYA, FEBRE AMARELA E
DENGUE**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para
a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 30 de janeiro 2018

BANCA EXMINADORA

Dr^a. Laura Helena Vega Gonzales Gil

IAM/Fiocruz

Dr. Lindomar José Pena

IAM/Fiocruz

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

IAM/Fiocruz

Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva

UFPE

Dr. Renato Antonio dos Santos Oliveira

UFPE

As Elis(z)as, Thaísa, aos amigos e amores

AGRADECIMENTOS

Às coisas que aconteceram, às que não aconteceram, ao que veio, ao que foi, ao que recebeu, ao que perdeu e ao que não viu; agradeça a tudo, porque em tudo há motivo e razão de ser. Agradeça ao que arrou e a tudo que foi retirado para se fazer buraco, porque em terra plana e contínua não há cultivo.

Por isso e por tudo que é grande demais para ser escrito, agradeço a Deus e a toda pluralidade de seu Nome.

Agradeço as Elis(z)as, mãe e avó, porque tudo que é humano tem origem e de lugar algum eu poderia vir, senão delas.

A Thaísa, porque de todos os sustentos que se pode ter, não há nada mais forte do que aquilo que se constrói com hastes de amor e companheirismo.

A todos os professores e em especial à professora Laura, porque tudo que é ensinado só pode vir de algo que está acima daquele que se predispõe ao aprendizado.

Ao querido professor Giovani, porque o afeto vai além das formalidades das hierarquias.

Ao meu pai, porque há coisas mais profundas do que aquilo que é expresso.

Ao meu primo Alexandre, porque antes do presente, há um passado que deve se permanecer vivo em tudo que foi vivido com sinceridade.

Aos amigos, principalmente àqueles que não precisam ser citados, porque é imperativo que convenhamos que nomes são apenas alegorias necessárias ao reconhecimento; e entre nós, meus estimados, a identificação vem pelos abraços, pelos sorrisos, pelas lágrimas, pelos xingamentos e principalmente pela cerveja.

Aos artistas e a toda arte que através da experiência da imortalidade nos faz andar com mais resiliência e dignidade independente da qualidade do solo sobre o qual nos apoiamos.

Ao Instituto Aggeu Magalhães e a Capes, porque não importa o que se use para erguer uma obra, há sempre de se ter ferramentas e matéria para que se faça a construção.

- Das universalidades -

A.: Onde está a Ciência?

B.: A Ciência só pode estar lá, nunca cá;

A.: ?

B.: Há mais Ciência no homem que endeusa o trovão do que no trovão que afirma ser deus.

(JVJr)

SILVA JÚNIOR, José Valter Joaquim. **Genética reversa de arbovírus: chikungunya, febre amarela e dengue**. 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

Epidemias e endemias causadas pelos vírus chikungunya (*Chikungunya virus*, CHIKV), febre amarela (*Yellow fever virus*, YFV) e dengue (*Dengue virus*, DENV) têm resultado em elevadas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Atualmente, não há fármacos licenciados contra CHIKV, YFV e DENV e as vacinas aprovadas contra YFV e DENV são restritas quanto à distribuição e público-alvo. Nesse contexto, plataformas de genética reversa viral têm sido demandadas principalmente para o desenvolvimento de vacinas e avaliação em larga escala de compostos antivirais. Os sistemas de genética reversa disponíveis para CHIKV e YFV, no entanto, usam protocolos onerosos e laboriosos de clonagem em *Escherichia coli*. Em adição, genomas de alguns flavivírus, a exemplo do DENV, frequentemente apresentam considerável instabilidade quando mantidos em bactérias. Para contornar esses vieses, o presente trabalho objetivou a construção e caracterização de sistemas de genética reversa por recombinação homóloga em levedura para CHIKV, YFV e DENV. O sistema de genética reversa para CHIKV gerou o vírus recombinante IC-CHIKV-99659 e também foi usado para o desenvolvimento da linhagem celular BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659, essa expressando o gene repórter da *Gaussia* luciferase (GLuc) sob o comando do subgenoma do CHIKV-99659. O IC-CHIKV-99659 se mostrou infectivo e replicativo e a linhagem BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 apresentou-se estável para a expressão dos genes heterólogos. Em relação à genética reversa para YFV e DENV, os vírus YFV-GLuc e pSVJS01-DENV2, previamente obtidos por recombinação homóloga em levedura, foram caracterizados genética- e fenotipicamente. O YFV-GLuc conservou o gene GLuc íntegro ao longo de seis passagens e apresentou cinética de replicação correlacionada à expressão do gene repórter. O pSVJS01-DENV2 apresentou cinética de replicação semelhantes ao vírus parental e ausência de mutação na região do envelope. Assim, ao desenvolver e caracterizar sistemas estáveis de genética reversa em levedura para CHIKV, YFV e DENV, o presente trabalho fornece uma plataforma alternativa à desenvolvida em bactéria para a manipulação de diferentes genomas virais.

Palavras-chave: Vírus Chikungunya. Vírus da Febre Amarela. Vírus da Dengue; Genética Reversa

SILVA JÚNIOR, José Valter Joaquim. **Reverse Genetics of Arbovirus: Chikungunya, Yellow fever and Dengue viruses.** 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

ABSTRACT

Epidemics and endemics caused by Chikungunya (CHIKV), Yellow fever (YFV) and Dengue (DENV) viruses have resulted in high rates of morbidity and mortality, mainly in tropical and subtropical regions. Currently, there are no licensed drugs against CHIKV, YFV and DENV, and vaccines available for YFV and DENV are restricted in terms of distribution and target audience. In this context, viral reverse genetics platforms have been demanded especially for the development of vaccines and high-throughput assay for screening of antiviral compounds. The reverse genetics systems available for CHIKV and YFV, however, use costly and apply laborious cloning protocols in *Escherichia coli*. Moreover, flavivirus genome, such as DENV, are often unstable when maintained in bacteria. To overcome these biases, the present study aimed the construction and characterization of reverse genetics systems by homologous recombination in yeast for CHIKV, YFV and DENV. The reverse genetics system for CHIKV generated the recombinant virus IC-CHIKV-99659 and was also used for the development of the BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 cell line, which expressed the *Gaussia* luciferase reporter gene (GLuc) under CHIKV subgenome. IC-CHIKV-99659 was shown to be infective and replicative, and the BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 cell line was stable for expression of heterologous genes. Regarding the reverse genetics for YFV and DENV, the YFV-GLuc and pSVJS01-DENV2 viruses, previously obtained by homologous recombination in yeast, were genetically and phenotypically characterized. The YFV-GLuc retained intact the GLuc gene over six cell passages and exhibited replication kinetics correlated to reporter gene expression. The pSVJS01-DENV2 showed replication kinetics similar to the parental virus and lack of mutation in the envelope region. Finally, the present work developed and characterized stable systems of reverse genetics in yeast for CHIKV, YFV and DENV, providing an alternative platform to that developed in bacteria for the manipulation of different viral genomes.

Key words: Chikungunya virus. Yellow fever virus. Dengue. Reverse Genetics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Óbitos por febre chikungunya confirmados e em investigação no ano de 2017	28
Figura 2 - Distribuição dos casos prováveis de febre chikungunya nos anos de 2015, 2016 e 2017	28
Figura 3 - Mapa-múndi com a distribuição das linhagens do vírus chikungunya e dos vetores <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	29
Figura 4 - Vírus chikungunya	30
Figura 5 - Genoma do vírus chikungunya	30
Figura 6 - Ciclo de replicação do vírus chikungunya	32
Figura 7 - Formas de transmissão do vírus chikungunya	35
Figura 8 - Erupção cutânea de paciente em estágio agudo da febre chikungunya	36
Figura 9 - Estágio crônico da infecção pelo vírus chikungunya	37
Figura 10 - Caso de retinite decorrente da infecção pelo vírus chikungunya	38
Figura 11 - Alopecia apresentada por paciente na fase crônica da infecção pelo vírus chikungunya	38
Figura 12 - Lesões bolhosas em bebê infectado pelo vírus chikungunya	39
Quadro 1 - Sinais e sintomas da infecção pelos vírus chikungunya, dengue e zika	40
Figura 13 - Cronologia da viremia e resposta imune humoral pós-infecção pelo vírus chikungunya	42
Figura 14 - Geração de vírus recombinantes de RNA de orientação positiva	47
Figura 15 - Organização do genoma do vírus chikungunya recombinante apresentando o sítio de entrada interno do ribossomo	49
Figura 16 - Genoma do vírus quimérico Eliat/chikungunya	51
Figura 17 - Clonagem do genoma completo do vírus chikungunya em	53

Escherichia coli

Figura 18 - Clonagem do genoma do vírus dengue sorotipo 2 por recombinação homóloga em levedura	54
Figura 19 - Clonagem do genoma do vírus da diarreia viral bovina por recombinação homóloga em levedura	54
Figura 20 - Clonagem do subgenoma repórter do vírus da febre amarela por recombinação homóloga em levedura	55
Figura 21 - Casos de infecção em humanos e primatas não humanos entre julho de 2017 até 14 de janeiro de 2018, Brasil	58
Figura 22 - Áreas da África recomendadas para vacinação contra febre amarela	59
Figura 23 - Áreas da América recomendadas para vacinação contra febre amarela	60
Figura 24 - Representação esquemática da estrutura dos flavivírus	61
Figura 25 - Organização do genoma dos flavivírus	61
Figura 26 - Ciclo de replicação dos flavivírus	65
Figura 27 - Ciclos de transmissão do vírus da febre amarela	66
Figura 28 - Indicação de testes de diagnóstico para febre amarela de acordo com os dias de sintoma	70
Figura 29 - Plataforma ChimeriVax de genética reversa viral	75
Figura 30 - Local e ano de entrada dos sorotipos do vírus dengue no Brasil	78
Figura 31 - Casos prováveis de dengue no Brasil em 2015, 2016 e 2017	80
Figura 32 - Suscetibilidade de diferentes regiões à infecção pelo vírus da dengue	81
Figura 33 - Distribuição geográfica do <i>Aedes aegypti</i> e do <i>Aedes albopictus</i> no Brasil	82
Figura 34 - Ciclo urbano de transmissão do vírus dengue	83
Quadro 2 - Diagnóstico diferencial clínico-laboratorial de dengue,	86

chikungunya e zika

Figura 35 - Teste de diagnóstico de dengue de acordo com o tempo de infecção	87
Quadro 3 - Oligonucleotídeos usados na clonagem e recuperação do vírus recombinante IC-CHIKV-99659	100
Figura 36 - Diagrama da estratégia usada para construção do clone infeccioso IC-CHIKV-99659	102
Figura 37 - Diagrama da estratégia usada para construção do replicon repórter do vírus chikungunya, Rep-GLuc-nsP-CHIKV-99659	104
Quadro 4 - Oligonucleotídeos usados para a clonagem e recuperação do replicon RepT7-GLuc-nsP-CHIKV-99659	105
Quadro 5 - Oligonucleotídeos usados para o sequenciamento do gene da glicoproteína do envelope dos vírus dengue 2	117
Figura 38 - Digestão do vetor pBSC-HDR usado para a construção do clone infeccioso e replicon do vírus chikungunya	118
Figura 39 - Amplificação do genoma do vírus chikungunya em dois fragmentos complementares e parcialmente homólogos	119
Figura 40 - Seleção dos clones infecciosos do vírus chikungunya	119
Figura 41 - Amplificação dos fragmentos gênicos necessários à construção do replicon do vírus chikungunya	120
Figura 42 - Confirmação e seleção dos clones do replicon do vírus chikungunya	120
Figura 43 - Amplificação do genoma dos clones infecciosos do vírus chikungunya	121
Figura 44 - Amplificação do subgenoma dos replicons expressando o gene repórter <i>Gaussia luciferase</i>	121
Figura 45 - Efeito citopático dos vírus IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17 em células Vero	122
Figura 46 - Infecção dos vírus IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659	122

clone 17 em células C6/36

Figura 47 - Infecção dos vírus IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17 em células BHK-21	123
Figura 48 - Ensaio de placa dos vírus recombinantes IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17	123
Figura 49 - Curva de replicação do vírus IC-CHIKV-99659	124
Figura 50 - Atividade da <i>Gaussia</i> luciferase ao longo do cultivo da linhagem celular BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659	125
Figura 51 - Cinética de replicação dos vírus YFV-17D e YFV-GLuc	126
Figura 52 - Curva de atividade da <i>Gaussia</i> luciferase do vírus YFV-GLuc	127
Figura 53 - Correlação linear entre as curvas de atividade da <i>Gaussia</i> luciferase e de replicação do vírus YFV-GLuc	127
Figura 54 - Amplificação do gene da <i>Gaussia</i> luciferase na sexta passagem celular do vírus YFV-GLuc	128
Figura 55 - Curva de replicação dos vírus DENV2 BR-3808 e psVJS01-DENV2	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos confirmados, óbitos e taxas de letalidade por febre amarela de transmissão silvestre no Brasil entre 2000 e 2012	57
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Alanina
a.C.	Antes de Cristo
ADE	<i>Antibody dependent enhancement</i>
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
Ape	<i>A plasmid Editor</i>
ATF6	<i>Activation transcription factor 6</i>
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BDAA	<i>Benzodiazepine acetic acid</i>
BHK-21	<i>Baby hamster kidney</i>
BRC	Bromocriptina
BVDV	<i>Bovine viral diarrhea virus</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
CHIKF	<i>Chikungunya fever</i>
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
D	Aspartato
d.C.	Depois de Cristo
DC-SIGN	<i>Adhesion molecule of dendritic cells</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNAcv	<i>Viral complementary deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade óptica
E	Glutamato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBOV	<i>Ebola virus</i>
ECP	Efeito citopático
ECSA	<i>East/Central/South African lineage</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>

EILT	<i>Eilat virus</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FLuc	<i>Firefly luciferase</i>
G	Glicina
GAG	Glicosaminoglicano
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GLuc	<i>Gaussia luciferase</i>
GRP78	<i>78-kDa glucose-regulated protein</i>
H	Histidina
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HEK-293-T	<i>Human embryonic kidney 293 cells T</i>
<i>Hg.</i>	<i>Haemagogus</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HMEC-1	<i>Human dermal microvascular endothelial cells</i>
I	Isoleucina
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IBDV	<i>Infectious bursal disease virus</i>
IC	<i>Infectious clone</i>
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IMPDH	<i>Inosine monophosphate dehydrogenase</i>
IOL	<i>Indian Ocean lineage</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
ISA	<i>Infectious-subgenomic-amplicons</i>
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
K	Lisina
LAMP	<i>Lysosome-associated membrane proteins</i>
LAV	<i>Lassa virus</i>
LB	Meio Lúria Bertani
LiAc	<i>Lithium acetate</i>
MAC ELISA	<i>IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay</i>

MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MTL	<i>Methyltransferase-like</i>
MVA	<i>Modified Vaccinia Ankara</i>
N	Asparagina
NAAT	<i>Nucleic acid amplification tests</i>
NCT	<i>National Clinical Trials</i>
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
NS, nsP	<i>Nonstructural proteins</i>
NTPase	<i>Nucleoside 5' triphosphatase</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
p	Passagem
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
P	Prolina
PBMC	<i>Human peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDK	<i>Primary dog kidney</i>
PEG	Polietilenoglicol
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
PIV	<i>Pseudoinfectious virus</i>
PRNT	<i>Plaque reduction neutralization test</i>
Proteína C	Proteína do capsídeo
Proteína E	Proteína do envelope
Proteína M	Proteína de membrana
Proteína prM	Proteína precursora de membrana
qRT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>
R	Arginina

RLU	<i>Relative light units</i>
RLuc	<i>Renilla luciferase</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA de interferência
RNAv	RNA viral
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
RT-LAMP	<i>Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification</i>
RTPase	<i>5' RNA triphosphatase</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
S.	<i>Saccharomyces</i>
S	Serina
Sa.	<i>Sabethes</i>
SCID-HuH-7	<i>Severe combined immunodeficient mice transplanted with human hepatoma cells</i>
SE	Semana epidemiológica
SFB	Soro fetal bovino
SFV	<i>Semliki forest virus</i>
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SINV	<i>Sindbis virus</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T	Treonina
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i>
TE	Tampão com tris-HCl e ácido etilenodiaminotetracético
TIM-I	<i>T-cell immunoglobulin and mucin domain protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Ubi-Neo	Região de ubiquitinação e gene da neomicina fostotransferase
UTR	<i>Untranslated regions</i>
V	Valina
VEEV	<i>Venezuelan equine encephalitis virus</i>
VLP	<i>Virus-like particles</i>
W	Triptofano

WA	<i>West African lineage</i>
WMV	<i>Watermelon mosaic virus</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
XBP1	Células de fibroblastos embrionários de ratos deficientes em XBP1 (proteína de ligação X-box 1, X-box <i>binding protein</i> 1)
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Vírus chikungunya	25
2.1.1 Aspectos históricos e epidemiológicos	25
2.1.2 Virologia molecular e replicação viral	29
2.1.3 Transmissão	33
2.1.4 Sinais e sintomas clínicos	35
2.1.5 Diagnóstico	39
2.1.6 Tratamento	42
2.1.7 Vacinas	44
2.1.8 Genética reversa	46
2.1.8.1 <i>Virologia básica</i>	48
2.1.8.2 <i>Vacinas</i>	49
2.1.8.3 <i>Avaliação de compostos anti-chikungunya</i>	51
2.1.9 Genética reversa em <i>Escherichia coli</i> vs. levedura	52
2.2 Vírus da febre amarela	55
2.2.1 Aspectos históricos e epidemiológicos	55
2.2.2 Virologia molecular e replicação dos flavivírus	60
2.2.3 Transmissão	66
2.2.4 Sinais e sintomas clínicos	68
2.2.5 Diagnóstico	69
2.2.6 Tratamento	70
2.2.7 Vacinas	72
2.2.8 Genética reversa	74

2.3 Vírus dengue	76
2.3.1 Aspectos históricos e epidemiológicos	76
2.3.2 Transmissão	81
2.3.3 Sinais e sintomas clínicos	84
2.3.4 Diagnóstico	85
2.3.5 Tratamento	88
2.3.6 Vacinas	90
2.3.7 Genética reversa	93
3 JUSTIFICATIVA	96
4 OBJETIVOS	98
4.1 Objetivo geral	98
4.2 Objetivos específicos	98
5 MATERIAIS E MÉTODOS	99
5.1 Sistema de genética reversa para o vírus chikungunya	99
5.1.1 Cultivo de células	99
5.1.2 Construção do clone infeccioso IC-CHIKV-99659 e replicon Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659	99
5.1.2.1 Clone infeccioso IC-CHIKV-99659	99
5.1.2.2 Replicon Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659	103
5.1.3 Recombinação homóloga em levedura	106
5.1.4 Transformação de <i>Escherichia coli</i> cepa DH10B com os clones selecionados	107
5.1.5 Amplificação do genoma completo dos clones infecciosos e replicons	108
5.1.6 Transcrição <i>in vitro</i>	108
5.1.7 Transfecção do RNA em células BHK-21	108
5.1.8 Recuperação do clone infeccioso IC-CHIKV-99659	109

5.1.9 Caracterização fenotípica do IC-CHIKV-99659	109
5.1.9.1 Ensaio de placa	109
5.1.9.2 Cinética de replicação viral	110
5.1.10 Infecção do vírus recombinante IC-CHIKV-99659 em células BHK-21 e C6/36	110
5.1.11 Linhagem celular BHK-21 -T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659	110
5.1.12 Leitura da atividade da <i>Gaussia</i> luciferase	111
5.2 Sistema de genética reversa para o vírus da febre amarela	111
5.2.1 Células e vírus	111
5.2.2 Titulação viral	112
5.2.3 Cinética de replicação viral	112
5.2.4 RT-PCR em tempo real	112
5.2.5 Cinética de atividade da <i>Gaussia</i> luciferase	113
5.2.6 Estabilidade do vírus repórter YFV-GLuc	113
5.3 Sistema de genética reversa para o vírus dengue	114
5.3.1 Células e vírus	115
5.3.2 Titulação viral	115
5.3.3 Cinética de replicação	115
5.3.4 RT-PCR em tempo real	116
5.3.5 Análise da sequência gênica da glicoproteína do envelope	116
6 RESULTADOS	118
6.1 Sistema de genética reversa para o vírus chikungunya	118
6.1.1 Clonagem do clone infeccioso IC-CHIKV-99659 e replicon Rep-GLuc-nsP-CHIKV-99659	118
6.1.2 Amplificação e transcrição do genoma completo dos clones infecciosos e replicons repórter do vírus chikungunya	120

6.1.3 Recuperação do clone infeccioso	122
6.1.4 Caracterização fenotípica do IC-CHIKV-99659	123
6.1.4.1 <i>Ensaio de placa</i>	123
6.1.4.2 <i>Cinética de replicação viral</i>	123
6.1.5 Desenvolvimento da linhagem celular recombinante BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659	124
6.2 Sistema de genética reversa para o vírus da febre amarela	125
6.2.1 Curva de replicação do YFV-GLuc vs. YFV-17D	125
6.2.2 Correlação entre atividade da <i>Gaussia</i> luciferase e a replicação do YFV-GLuc	126
6.2.3 Estabilidade e integridade da <i>Gaussia</i> luciferase	128
6.3 Sistema de genética reversa para o vírus dengue	128
6.3.1 Cinética de replicação	128
6.3.2 Sequenciamento gênico da glicoproteína do envelope	129
7 DISCUSSÃO	130
7.1 Sistema de genética reversa para o vírus chikungunya	130
7.2 Sistema de genética reversa para o vírus febre amarela	135
7.3 Sistema de genética reversa para o vírus dengue	138
8 CONCLUSÕES	142
9 PERSPECTIVAS	143
REFERÊNCIAS	144
APÊNDICE A - <i>Reverse genetics for Caribbean strain of Chikungunya virus: generation of infectious clone and replicon by homologous recombination in yeast</i>	178
APÊNDICE B - <i>Construction and characterization of a recombinant yellow fever virus stably expressing <i>Gaussia</i> luciferase</i>	190

APÊNDICE C - *Full-length infectious clone of a low passage dengue virus serotype 2 from Brazil*

202

1 INTRODUÇÃO

O termo arbovírus, apesar de não ser uma unidade taxonômica, frequentemente é usado em referência aos vírus transmitidos por insetos vetores. Atualmente, mais de 500 arbovírus já foram identificados, sendo cerca de 150 responsáveis por causar infecção em humanos e a maioria pertencente às famílias *Peribunyaviridae*, *Nairoviridae*, *Phenuiviridae*, *Flaviviridae* e *Togaviridae* (BLITVICH, 2016; *INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES*, 2016; LANCIOTTI, 2016).

Entre os membros dessas famílias, o togavírus chikungunya (*Chikungunya virus*, CHIKV) e os flavivírus febre amarela (*Yellow fever virus*, YFV) e dengue (*Dengue virus*, DENV) são alguns dos arbovírus emergentes e re-emergentes de importância em saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do globo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018a, 2018b, 2018c).

As sugestões de controle das arboviroses envolvem desde estratégias políticas e ações de controle populacional do vetor até campanhas de imunização ao agente infeccioso (ISHIKAWA; YAMANAKA; KONISHI, 2014; ZARA et al., 2016). Em relação ao controle vetorial, a medida frequentemente encontra diversos obstáculos, como a urbanização descontrolada, resistência a inseticidas químicos e limitações éticas sobre o uso de insetos transgênicos (LIANG; GAO; GOULD, 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016; RESNIK, 2014). Por outro lado, a ausência de vacinas licenciadas para CHIKV e a restrita disponibilidade de vacinas contra YFV e DENV também contribui para a manutenção e propagação dessas arboviroses (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017; CAPE Ding et al., 2014; CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2017a; SMALLEY et al., 2016; VILLAR et al., 2015). A limitação dessas duas estratégias profiláticas somada à globalização das relações sociais talvez sejam as principais causas de suas epidemias e endemias (IMPERATO, 2016).

Nesse contexto, a manipulação de genomas virais em sistemas de genética reversa tem sido demandada e usada sobretudo como ferramenta biotecnológica tanto para a construção de vírus recombinantes para fins vacinais quanto para a construção de plataformas baseadas em subgenomas replicativos virais (replicons), expressando genes repórteres, e usadas principalmente na triagem em larga escala de compostos antivirais (KATO; HISHIKI, 2016; STOBART; MOORE, 2014). Ademais, genética reversa viral também tem sido empregada para elucidação da interação vírus-hospedeiro e estudos sobre a biologia, patogênese e evolução viral (CHAN; GACK, 2016; TERAMOTO et al., 2017; TSETSARKIN

et al., 2011).

Nos sistemas atuais de genética reversa para CHIKV e YFV, os genomas virais são manipulados por protocolos convencionais de clonagem em *Escherichia coli*, os quais envolvem seriadas reações de amplificação, digestão e ligação *in vitro* (BREDENBEEK et al., 2003; JIANG et al., 2015; TSETSARKIN et al., 2006). Além das condições onerosas e laboriosas para as subclonagens em *E. coli*, alguns genomas virais, a exemplo do DENV, vírus da encefalite japonesa (*Japanese encephalitis virus*, JEV), vírus do Nilo Ocidental (*West Nile virus*, WNV) e do vírus do mosaico da melancia (*Watermelon mosaic virus*, WMV), podem apresentar instabilidade quando mantidos em bactérias, resultando em alterações nucleotídicas, como deleções e inserções (DESBIEZ et al., 2012; PU et al., 2011; RUGGLI; RICE 1999; VANDERGAAST; FREDERICKSEN, 2016; ZHENG et al., 2017).

Como alternativa às clonagens em *E. coli*, vários genomas virais já têm sido manipulados de forma simples e eficaz em sistemas de genética reversa baseados em levedura (ARENHART et al., 2016; DESBIEZ et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SILVA Jr et al., 2014). Nessa técnica, a manipulação do genoma viral ocorre por recombinação homóloga, em que o inserto e o vetor, com extremidades homólogas entre si, são introduzidos na levedura e clonados em uma única reação *in vivo*. Somada à independência de vários sítios de restrição e de seguidas etapas de subclonagem, a clonagem por recombinação homóloga em levedura também possui a vantagem de garantir maior estabilidade dos genomas virais clonados (DESBIEZ et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

Dessa forma, ao reconhecer a importância das arboviroses para a saúde pública, as diversas aplicações em virologia dos sistemas de genética reversa e as vantagens desses sistemas quando desenvolvidos em levedura, o presente trabalho objetivou a construção e caracterização de vírus e replicon recombinantes de CHIKV e a caracterização de sistemas de genética reversa para YFV e DENV.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Vírus chikungunya

Os tópicos a seguir descrevem os principais aspectos relacionados à infecção por CHIKV.

2.1.1 Aspectos históricos e epidemiológicos

Sinais clínicos e sintomas relacionados à infecção por CHIKV, como febre, artralgia, artrite e erupção cutânea, já têm sido descritos desde 1824 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018). No entanto, foi apenas 128 anos depois, em 1952, no território que hoje compreende a Tanzânia, que tiveram início as epidemias reconhecidamente causadas por CHIKV (LUMSDEN, 1955). Inicialmente, o espectro clínico da doença foi associado às infecções pelo DENV, mas em 1953, a partir do isolamento do vírus de soro de pacientes infectados e de *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Culex spp.*, o agente etiológico pode ser identificado e então incluído no grupo A das arboviroses e adiante na família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* e complexo antigênico do vírus da floresta de Semliki (*Semliki forest virus*, SFV) (CALISHER; KARABATSOS, 1988; *INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES*, 2016; KARABATSOS, 1985; ROSS, 1956).

Desde sua identificação, CHIKV tem causado infecções ao longo do território africano, inicialmente na região central da África (Uganda) e em seguida na região sul do continente (África Subsaariana) (WEINBREN; HADDOW; WILLIAMS, 1958). A análise gênica dos isolados dessas regiões resultou no agrupamento desses vírus dentro da linhagem leste, centro e sul africano (*East/Central/South African*, ECSA); referência à localização geográfica dos CHIKV sequenciados (POWERS et al., 2000; VOLK et al., 2010).

O sequenciamento e investigação filogenética de outras cepas de CHIKV isoladas durante os surtos da Ásia no intervalo de 1958 a 1973 resultou no agrupamento desses vírus em uma outra unidade monofilética, nomeada, também em decorrência de sua localização, de linhagem asiática; aparentemente sem circulação atual na Índia, mas responsável por eventuais surtos do sudoeste asiático (POWERS et al., 2000; VOLK et al., 2010).

No final do século XX, uma nova linhagem do CHIKV, denominada linhagem oeste africana (*West African lineage*, WA), foi identificada em Senegal e, quando comparada à distribuição das linhagens ECSA e da linhagem asiática, mostrou-se mais restrita em relação

à expansão geográfica (POWERS et al., 2000; VOLK et al., 2010).

Em 2004, após um período de pequenos surtos por CHIKV, uma grande epidemia foi reportada na costa do Quênia pela linhagem ECSA (SERGON et al., 2008; THIBERVILLE et al., 2013). O surto no Quênia marcou o início do período de disseminação do vírus para as ilhas do oceano Índico, Índia e partes do sudeste asiático (SERGON et al., 2007, 2008).

No ano seguinte, 2005, um surto de CHIKV foi descrito na União das Comores, na costa oriental da África, momento em que se pensou tratar de infecções por DENV, devido à semelhança com surtos anteriores ocorridos nos anos de 1948, 1984 e 1993. No entanto, testes sorológicos identificaram o CHIKV como agente etiológico, levando a estimativa de que aproximadamente 215.000 pessoas tenham sido infectadas por CHIKV apenas nesse ano (SERGON et al., 2007).

Após o surto na União das Comores, outros surtos de CHIKV foram reportados em Seychelles, Madagascar, no oeste da Índia e em ilhas do oceano Índico, como as ilhas Maurícias e ilha da Reunião, essa última sendo um território sob o domínio francês, mas localizado nas proximidades do continente africano (HIGGS, 2006; JOSSERAN et al., 2006; PISTONE et al., 2009).

O relato de infecções por CHIKV na ilha da Reunião se iniciou na primavera de 2005 e até janeiro de 2006 o número de casos relatados era considerado baixo. Porém, do início de 2006 em diante, houve um aumento substancial dos casos notificados, chegando a um quantitativo de mais de 40.000 casos por semana e uma estimativa de que aproximadamente 255.000 infecções tenham ocorrido entre 1 de março de 2005 e 30 de abril de 2006 (CIRE, 2008; JOSSERAN et al., 2006).

No entanto, diferente da União das Comores e do Quênia, em que a densidade populacional do *Ae. aegypti* era alta, na ilha da Reunião, a densidade desse vetor era baixa, levando à sugestão de que o *Ae. albopictus* fosse o responsável pelo grande número de casos (REITER; FONTENILLE; PAUPY, 2006). Assim, em um estudo desenvolvido por Schuffenecker et al. (2006) foi possível identificar uma mutação não sinonímia referente à substituição de uma alanina por uma valina no aminoácido 226 da glicoproteína E1 do envelope viral, E1-A226V, em 90% dos isolados provenientes da ilha da Reunião. A fim de testar a hipótese de que talvez essa mutação fosse a responsável pela melhora da infecção do *Ae. albopictus* ao CHIKV, experimentos de genética reversa, como discutido mais adiante (tópico 2.1.8.1), confirmaram a importância da mutação E1-A226V para o *fitness* viral em *Ae. albopictus*. Essa mutação, ocorrida na cepa de CHIKV emergida do Quênia em 2004, resultou

em uma linhagem descendente da ECSA, a linhagem do Oceano Índico (*Indian Ocean Lineage*, IOL), responsável, a seguir, por vários surtos nas ilhas do oceano Índico, Índia e Ásia entre 2005 e 2014 (NUNES et al., 2015; TSETSARKIN et al., 2011).

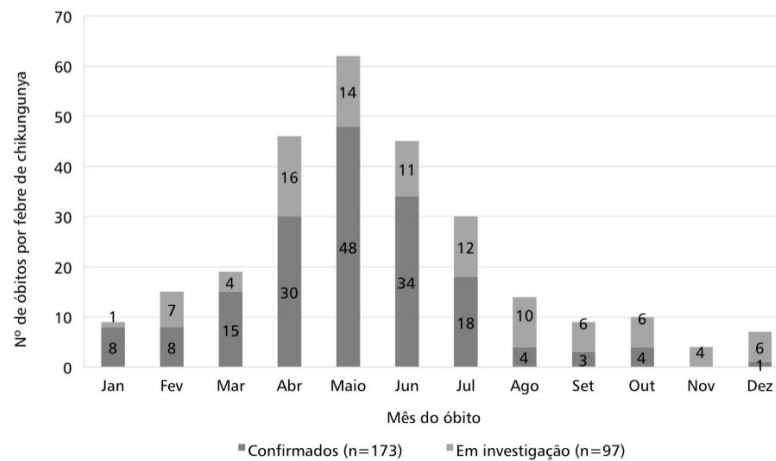
Em 2007, o CHIKV alcançou o continente europeu pelo norte da Itália através de um viajante infectado advindo da Índia. Em 2010, o vírus causou doença na Índia, na Indonésia, no Myanmar, na Tailândia, nas Maldivas e reapareceu na ilha da Reunião. Também em 2010, casos importados por viajantes provenientes da Indonésia, da ilha da Reunião, da Índia e do sudoeste asiático foram identificados em Taiwan, na França, nos Estados Unidos e no Brasil, respectivamente (BRASIL, 2014; REZZA et al., 2007; THIBERVILLE et al., 2013).

Em 2013, o CHIKV foi introduzido no continente americano pelo Caribe, acreditando-se ter chegado ao Brasil em 2014. Os CHIKV circulantes no Brasil pertencem às linhagens da Ásia e África (ECSA) e teriam provavelmente entrado no país pelo Oiapoque (Amapá) e por Feira de Santana (Bahia), respectivamente (NUNES, 2015).

No ano de sua entrada, até a Semana Epidemiológica (SE) 53, 3.195 casos autóctones suspeitos de febre chikungunya (*chikununya fever*, CHIKF) foram notificados, desses 2.196 foram confirmados (BRASIL, 2015). No ano seguinte, 2015, até a SE 52, 38.499 casos prováveis de CHIKF foram notificados, dos quais 17.971 foram confirmados. Nesse mesmo ano, foram confirmadas 14 mortes por CHIKF, sendo cinco óbitos na Bahia, dois em Sergipe e sete em Pernambuco (BRASIL, 2017a).

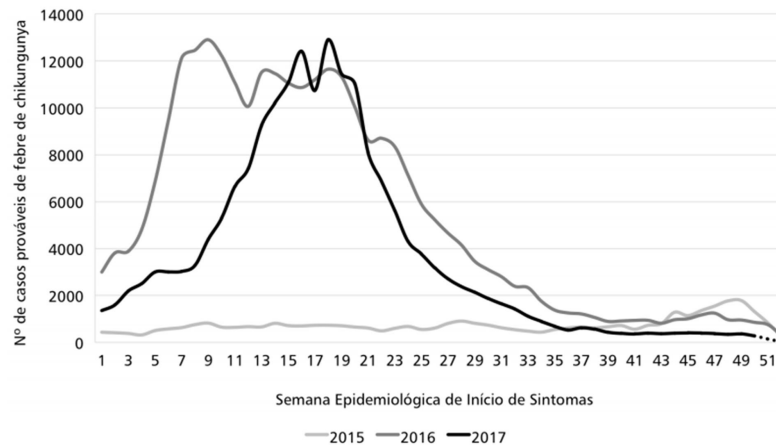
No ano de 2016, até a SE 52, foram notificados 271.824 casos prováveis de CHIKF no país, desses 151.318 foram confirmados. A taxa de incidência reportada foi de 133 casos a cada 100 mil habitantes, sendo a taxa na região Nordeste de 415,7 casos a cada 100 mil habitantes, a maior dentre as regiões geográficas do Brasil. Ainda em 2016, 196 óbitos por CHIKF foram descritos nos seguintes estados: Pernambuco (58), Rio Grande do Norte (37), Paraíba (34), Ceará (26), Rio de Janeiro (13), Alagoas (10), Maranhão (8), Bahia (5), Sergipe (2), Piauí (1), Amapá (1) e Distrito Federal (1) (BRASIL, 2017a).

Até a SE 52 de 2017, foram notificados 185.737 casos prováveis de CHIKF, com 151.966 confirmados. Dentre as regiões do Brasil, a região Nordeste apresentou novamente o maior número de casos prováveis de CHIKF, perfazendo um total de 142.131 casos notificados. Após o Nordeste, as regiões com maior número de notificações foram as regiões Sudeste, com 22.984 casos, e a região Norte com 16.570 casos notificados. Em 2017, 173 óbitos associados à infecção por CHIKV foram confirmados laboratorialmente e 97 ainda estão em investigação (Figura 1) (BRASIL, 2018).

Figura 1 - Óbitos por febre chikungunya confirmados e em investigação no ano de 2017

Fonte: Brasil (2018)

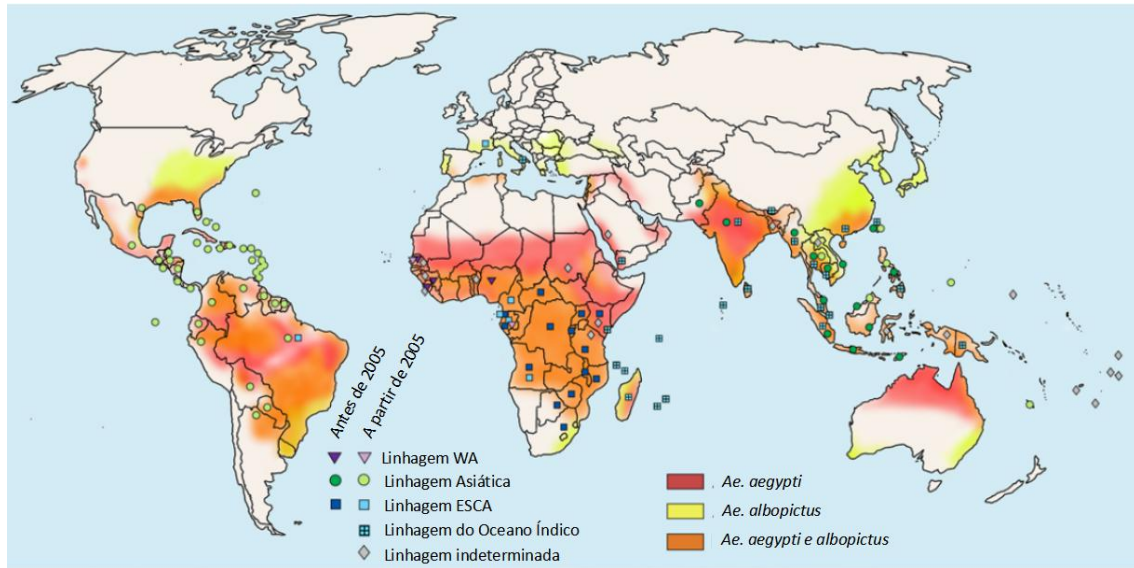
Uma análise da distribuição dos casos prováveis de CHIKF por SE no triênio 2015, 2016 e 2017 mostra, em todos esses anos, um aumento do número de notificação de infecção por CHIKV entre a SE 11 e 21, referente aos meses de março a maio (Figura 2).

Figura 2 - Distribuição dos casos prováveis de febre chikungunya nos anos de 2015, 2016 e 2017

Fonte: Brasil (2018)

Atualmente, casos de infecção por CHIKV têm sido descritos em todos os continentes, com exceção da Antártida, com o último surto reportado em 27 de fevereiro de 2018 em Mombasa, Quênia (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018a). A figura 3 mostra, resumidamente, as regiões onde já foram relatados surtos de CHIKV, identificando também as linhagens dos vírus responsáveis por cada epidemia, além de identificar as áreas com a presença de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

Figura 3 - Mapa-múndi com a distribuição das linhagens do vírus chikungunya e dos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

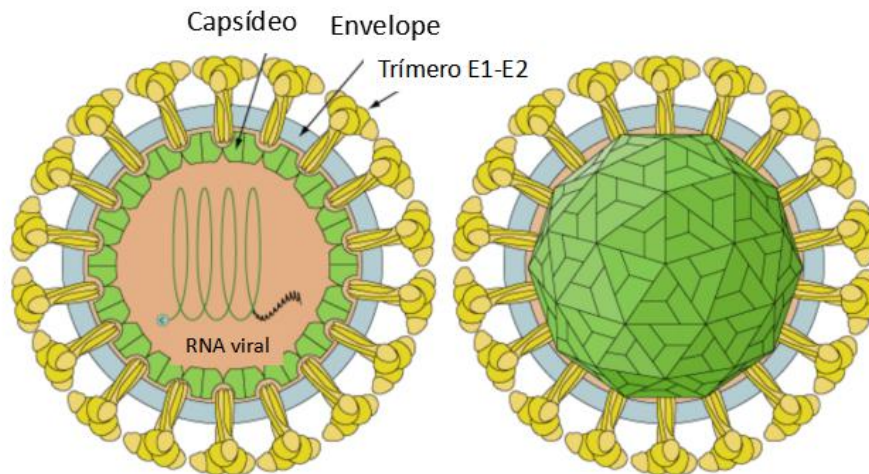


Fonte: Adaptado de Silva e Dermody (2017)

Por fim, ao se fazer uma leitura da cronologia dos surtos e epidemias por CHIKV é possível observar uma variação sazonal e períodos de silenciamento epidemiológico que variam de anos a décadas. Acredita-se que esse comportamento intermitente seja de origem multicausal e fatores como diferentes suscetibilidades à infecção em humanos e vetores, o aumento da densidade de vetores, bem como mudanças na capacidade de transmissão do CHIKV auxiliem no perfil epidemiológico apresentado pelo vírus (MOHAN et al., 2010).

2.1.2 Virologia molecular e replicação viral

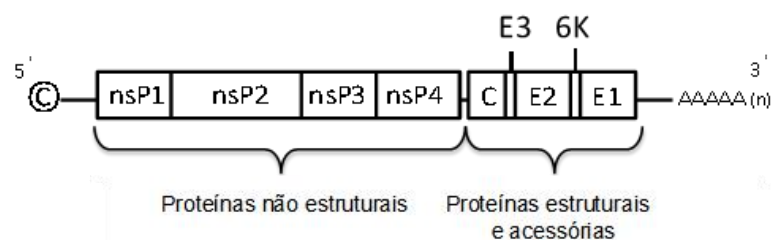
O CHIKV se apresenta como um vírus envelopado com diâmetro de 70nm. O nucleocapsídeo de simetria icosaédrica e diâmetro de 40nm ocupa um pouco mais que a metade do volume do vírus completo e é formado por 240 cópias da proteína do capsídeo (C) (KUHN et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4 - Vírus chikungunya

Fonte: Adaptado de ViralZone (2017)

Nota: O chikungunya se apresenta como vírus de capsídeo icosaédrico, envelopado e composto por trimeros das glicoproteínas E1 e E2. O genoma do vírus é representado por um RNA, fita simples, orientação positiva, com cap em 5' e cauda poli-A na extremidade 3'.

O genoma do vírus consiste de uma única molécula de RNA de fita simples com senso positivo, de aproximadamente 12kb, que apresenta um 7-metilguanossina (cap) na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3', ambos ladeados por uma região não traduzida (*Untranslated regions*, UTR) (KHAN et al., 2002). O genoma do CHIKV contém duas matrizes de leitura (*Open reading frame*, ORF): a ORF 5', traduzida a partir do RNA genômico (49S) e codificante para quatro proteínas não estruturais (*Nonstructural proteins*, nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4); e a ORF 3', traduzida a partir de um RNA subgenômico (26S) e codificante para uma poliproteína posteriormente clivada na proteína do capsídeo, duas proteínas do envelope (E1 e E2) e dois pequenos peptídeos E3 e 6k (Figura 5) (THIBERVILLE et al., 2013).

Figura 5 - Genoma do vírus chikungunya

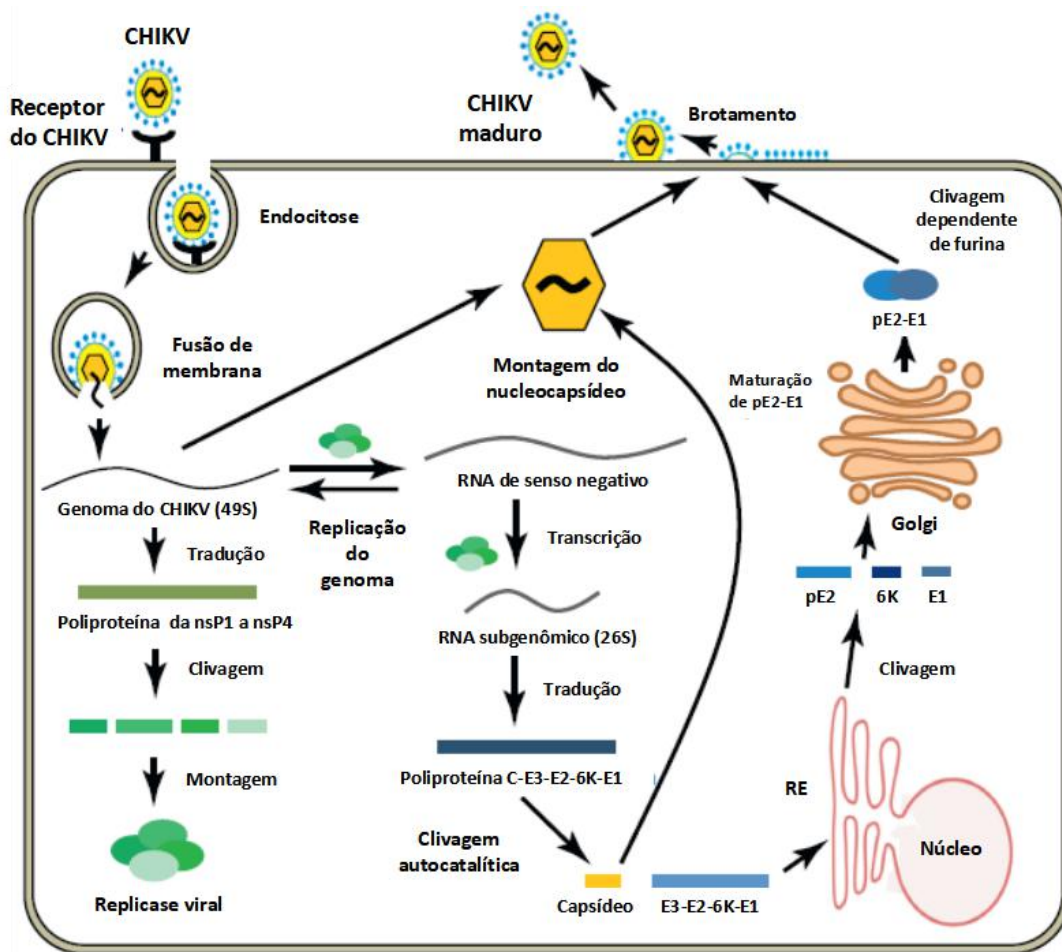
Fonte: Do autor, 2018

Nota: O genoma do vírus chikungunya se apresenta como um RNA fita simples, polaridade positiva, com cap (©) e cauda poli-A nas extremidades 5' e 3', respectivamente. O genoma viral se encontra ainda dividido em uma região codificante de proteínas não estruturais e outra de proteínas estruturais e acessórias, essas ocupando aproximadamente dois terços e um terço do genoma viral, respectivamente.

Apesar do conhecimento sobre algumas células de hospedeiro vertebrado que são passíveis de infecção por CHIKV, como as células epiteliais e endoteliais, o tropismo do CHIKV nos seres humanos ainda não está completamente definido (GRIFFIN et al., 2013).

A figura 6 esquematiza o ciclo de replicação do CHIKV. No início do ciclo de replicação do vírus, sabe-se que a adsorção à célula hospedeira se inicia com a ligação da glicoproteína do envelope E2 a receptores celulares ainda não totalmente elucidados. Alguns receptores têm sido sugeridos, como a proibitina, que foi identificada como proteína de ligação do CHIKV em células da glia (WINTACHAI et al., 2015). Em cultivo celular, outros receptores, como os glicosaminoglicanos (GAG), a exemplo do sulfato de heparana, já tem seu papel de receptor elucidado para outros alfavírus, como o vírus da encefalite equina venezuelana (*Venezuelan Equine Encephalitis virus*, VEEV) (BERNARD; KLIMSTRA; JOHNSTON, 2000). Em relação a CHIKV, foi visto que a expressão de GAG aumenta a eficácia de ligação e infecção de algumas cepas de CHIKV a células de ovário de hamster chinês (*Chinese hamster ovary*, CHO) (VAN DUIJL-RICHTER et al., 2015).

Figura 6 - Ciclo de replicação do vírus chikungunya



Fonte: Adaptado de Kaur e Chu (2013)

Nota: No ciclo de replicação do vírus chikungunya (CHIKV), a replicação do vírus ocorre no citoplasma da célula hospedeira e envolve a formação de dois RNAs, um RNA genômico e um RNA subgenômico, responsáveis pela tradução das proteínas não estruturais e estruturais, respectivamente. Após a replicação do RNA viral e expressão e maturação das proteínas estruturais, novos vírus são formados e liberados por brotamento da célula hospedeira.

Após a adsorção, a internalização do vírus se dá por endocitose mediada por receptores, em um mecanismo dependente de clatrina (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009). No endossomo, E1-E2 que antes estavam associados em heterodímeros, são dissociados em um mecanismo dependente da redução do pH. A E1, dissociada de E2, expõe seu peptídeo de fusão, o qual se associa com a face interna do endossomo em um processo dependente de colesterol, levando à trimerização da E1, formação de poros endossomais e liberação do capsídeo no citoplasma da célula hospedeira. No citoplasma, ocorre o desnudamento do capsídeo, seguido da liberação do RNA viral (RNA_v) e início dos processos de transcrição e tradução vírica a partir do RNA ribossomal 60S em interação com a proteína C (VAN DUILL-RIECHTER et al., 2015).

O RNA_v inicialmente serve como molde para a tradução das proteínas não

estruturais organizadas nas poliproteínas nsP123 e nsP1234. Após a tradução, a poliproteína é clivada e as proteínas não estruturais individualizadas se organizam compondo o complexo de replicação do RNA_v com função de RNA polimerase dependente de RNA e adenililtransferase terminal (nsP4), guanina-7-metiltransferase e guaniltransferase (nsP1), helicase, trifosfatase de nucleósídeos e protease (nsP2) e fosfatase de ADP-ribose 1^o-fosfato (nsP3); a nsP2 ainda pode agir inibindo a via de sinalização do IFN-I e II (FROS et al., 2010; KUHN et al., 2013). Durante a replicação do RNA_v, o RNA do vírus atua como molde para a transcrição de um RNA complementar de senso negativo (3'-5'), que funciona como matriz temporária para a formação de mais RNA_v. Esse processo é mediado pelo complexo de replicação formado pelas proteínas não estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 (KUHN et al., 2013).

Com a continuidade do ciclo de replicação do CHIKV, na fase tardia da infecção, o complexo de replicação sintetiza, a partir do RNA senso negativo anteriormente transcrito, um RNA_v subgenômico, responsável pela tradução da poliproteína estrutural C-pE2-6K-E1, a qual é clivada inicialmente por proteínas víricas e depois por proteases da célula hospedeira. A porção da proteína C possui atividade de autoprotease, permitindo sua clivagem e separação do cassete de proteínas estruturais. Em seguida, a região N-terminal exposta do restante da poliproteína estrutural funciona como sinal de translocação das proteínas estruturais para o retículo endoplasmático. No retículo, as regiões pE2, 6K e E1 são clivadas e individualizadas. A pE2 e E1 são então organizadas em heterodímeros que são maturados por glicosilação no complexo de Golgi. Ao sair do Golgi, e seguindo a via secretória celular, pE2-E1 são clivados por furinas, originando as glicoproteínas E1, E2 e E3 (SOLIGNAT et al., 2009).

Ao final do ciclo de replicação, após a associação do RNA_v recém-replicado com as proteínas do capsídeo, o vírus sai por brotamento, herdando o envelope com as proteínas E2 e E1 até então ancoradas da membrana plasmática da célula infectada. A depender do tipo celular infectado, a liberação do vírus é acompanhada de um extenso efeito citopático (ECP) associado à indução de apoptose (KUHN et al., 2013; LI et al., 2013).

2.1.3 Transmissão

Na África foram descritos dois ciclos de transmissão do CHIKV, o ciclo enzoótico ou silvestre e o ciclo urbano. Em relação ao silvestre, o ciclo envolve a participação de vários vetores do gênero *Aedes*, como o *Ae. furcifer*, *Ae. vittatus* e *Ae. fulgens*, tendo como

reservatório primatas não humanos (CAGLIOTI et al., 2013). Sobre o ciclo urbano, estudos de competência vetorial apontam o *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* como principais vetores, embora mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles* infectados por CHIKV também já tenham sido encontrados na África (Senegal) entre 1972 e 1996 e sua participação como vetores também tenha sido sugerida (DIALLO et al., 1999). No Brasil, casos de transmissão de CHIKV têm sido relacionados aos vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (BRASIL, 2016).

Em humanos, a transmissão via vetor tem início quando as fêmeas do gênero *Aedes* infectadas, durante o repasto sanguíneo, inoculam o vírus em um humano suscetível. No indivíduo infectado, inicia-se o período de incubação intrínseca, estendendo-se de um a 12 dias, com média de três a sete dias, e que compreende o intervalo entre a aquisição do vírus e o início da viremia; sendo essa última frequentemente associada ao aparecimento dos sinais e sintomas clínicos (BRASIL, 2014).

Ao entrar em contato com o hospedeiro em período virêmico, a fêmea do gênero *Aedes* pode adquirir o CHIKV e após o período de incubação extrínseca, com duração média de dez dias, e que se refere ao tempo necessário para o vírus se replicar no vetor e alcançar novamente as glândulas salivares, o vírus pode então ser retransmitido e dar continuidade ao ciclo de infecção (BRASIL, 2014).

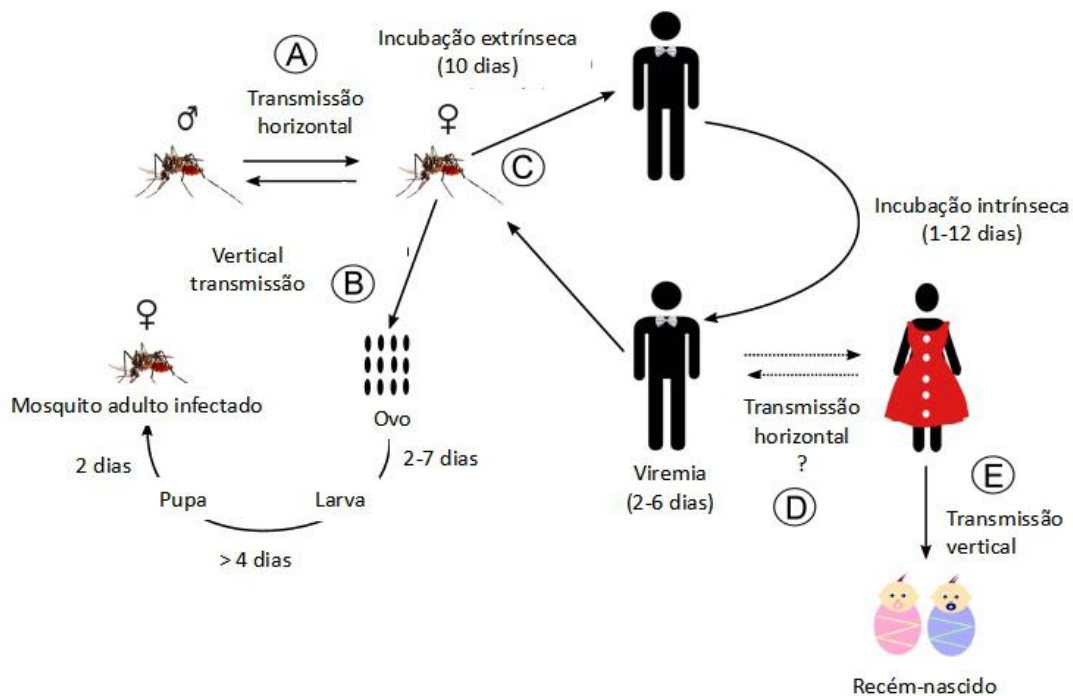
Interessantemente, e importante sobretudo para as regiões com cocirculação de CHIKV, DENV e vírus zika (*Zika virus*, ZIKV), um estudo de coinfeção experimental de *Ae. aegypti* com os três vírus mostrou que o vetor pode transmitir simultaneamente todos esses arbovírus, sendo as taxas de infecção, disseminação e transmissão apenas ligeiramente influenciadas pela coinfeção (RÜCKERT et al., 2017).

Apesar da transmissão via artrópode ser a principal forma de transmissão do CHIKV aos humanos, a transmissão vertical também já foi relatada e casos de encefalite neonatal secundários à infecção por CHIKV foram reportados durante a epidemia ocorrida no Brasil em 2016 (LYRA et al., 2016; MOHAN et al., 2010). Em contrapartida, a transmissão de CHIKV através do aleitamento materno não foi descrita e embora conste relatos de RNA de CHIKV em sêmen 30 dias após o aparecimento dos sintomas, a transmissão horizontal entre humanos ainda não foi observada (BANDEIRA et al., 2016; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Em relação à transmissão a partir de transfusão sanguínea, embora seja teoricamente possível, até o momento nenhum caso foi reportado (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2016). Entre vetores *Aedes*, a transmissão horizontal já foi descrita e supõe-se que ela funcione como um reservatório viral natural contribuindo para o início de novos ciclos de infecção (MAVALE et al., 2010) e a vertical em

ensaios experimentais quanto em condições naturais, acreditando-se que essa via seja também importante para a manutenção do vírus em períodos não epidêmicos (CHOMPOOSRI et al., 2016).

Resumidamente, a figura 7 esquematiza as possibilidades de transmissão de CHIKV entre vetor-vetor, humano-humano e vetor-humano.

Figura 7 - Formas de transmissão do vírus chikungunya



Fonte: Do autor, 2018

Nota: Apesar da transmissão do vírus chikungunya em humanos ocorrer principalmente via inseto vetor, casos de infecção vertical também já foram reportados e atualmente não há registro de transmissão horizontal. Em relação à transmissão entre os vetores, transmissão horizontal e vertical já foram descritas, sendo essas importantes sobretudo para a manutenção do vírus na natureza em períodos de silenciamento epidemiológico.

2.1.4 Sinais e sintomas clínicos

As infecções por CHIKV frequentemente apresentam um período de incubação de três a sete dias e aproximadamente 70% dos indivíduos acometidos são sintomáticos (BRASIL, 2017b). Na fase aguda da infecção, após o período de incubação, a viremia segue com o aparecimento abrupto de sinais e sintomas clínicos, como febre acima de 38°C (em 92% dos pacientes), poliartralgia (87%), dor nas costas (67%), dor de cabeça (62%) e fadiga (THIBERVILLE et al., 2013). Dentre esses, a poliartralgia é considerado o sintoma mais comum e característico da CHIKF, sendo observado em aproximadamente 98% dos pacientes;

a dor se caracteriza por ser poliarticular, bilateral, acometendo principalmente articulações periféricas (tornozelos, punhos e falanges) e algumas das grandes articulações (joelhos e cotovelos) (MORRISON, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008).

Manifestações cutâneas são relatadas em cerca de 50% dos casos agudos e se caracterizam por uma erupção macular ou maculopapular transitória, às vezes edematosa ou pruriginosa, observada principalmente nas extremidades do corpo, como palmas das mãos, solas dos pés, tronco e rosto (Figura 8) (SIMON et al., 2011; THIBERVILLE et al., 2013). Outras alterações cutâneas e mucosas já foram relatadas no estágio agudo da doença, como fotossensibilidade, estomatite, úlceras bucais, esfoliação, lesões bolhosas e púrpura (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008). Sintomas no trato gastrointestinal, como diarreia, vômitos, náuseas ou dor abdominal ocorrem de 15 a 47% dos casos durante a fase aguda (THIBERVILLE et al., 2013).

Figura 8 - Erupção cutânea de paciente em estágio agudo da febre chikungunya



Fonte: Simon et al. (2011)

Nota: Mulher apresentando erupção cutânea na face durante a fase aguda da infecção pelo vírus chikungunya.

Após a fase aguda, alguns pacientes têm os sinais clínicos e sintomas prolongados, apresentando fadiga, dor nas articulações e poliartrite, levando ao comprometimento da qualidade de vida dos infectados (SIMON et al., 2011). Essa extensão do quadro clínico é observada principalmente em indivíduos com idade acima de 40 anos e na presença de doenças reumáticas previamente existentes (Figura 9) (SISSOKO et al., 2009).

Figura 9 - Estágio crônico da infecção pelo vírus chikungunya



Fonte: Simon et al. (2011)

Nota: Homem de 55 anos com inflamação e mãos rígidas após cinco anos de infecção pelo vírus chikungunya.

A poliartralgia pode persistir de semanas a meses, com relatos de duração de até cinco anos, dependendo das populações estudadas. Dentre as hipóteses para persistência da poliartralgia na fase crônica da infecção, destaca-se a elevada carga viral durante a fase aguda da doença, o atraso da eliminação viral e a persistência dos antígenos virais e da resposta imune nas articulações (BORGHERINI et al., 2008; HOARAU et al., 2010; SIMON et al., 2011; SISSOKO et al., 2009). Estudo realizado em amostras de líquido sinovial de pacientes hospitalizados na ilha da Reunião mostrou a presença de macrófagos com material genético e proteínas do CHIKV e a migração dessas células para o tecido sinovial em um paciente infectado cronicamente (18 meses de infecção) (HOARAU et al., 2010).

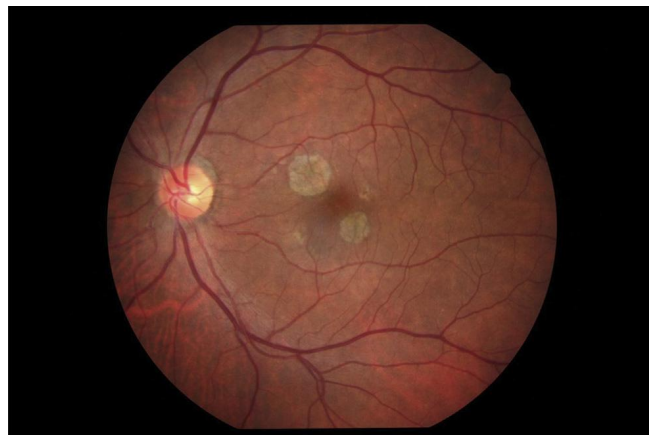
Em adição, em primatas não humanos, o CHIKV também persistiu cronicamente em órgãos linfóides, fígado, articulações e músculos e foi encontrado três meses após a infecção em macrófagos (LABADIE et al., 2010). A ocorrência de artrite reumatoide posterior a CHIKV também foi relatada em alguns estudos, ainda que marcadores inflamatórios não tenham sido encontrados em indivíduos na forma crônica da doença (SCHILTE et al., 2013; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009).

A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma doença autoimune caracterizada como polineuropatia inflamatória desmielinizante aguda fortemente associada a processos de infecção, como os por CHIKV (LEBRUN et al., 2009; OEHLER et al., 2015); aproximadamente dois terços dos casos de SGB são secundários a infecções virais, como as provocadas por DENV e WNV, ou bacterianas, a exemplo das provocadas por *Campylobacter jejuni* (VAN DEN BERG et al., 2014). Sobre a patogênese da SGB, uma das hipóteses se refere à perda da autotolerância após a infecção, com linfócitos, macrófagos e anticorpos

perdendo a capacidade de diferenciar os antígenos próprios dos não próprios e passando a reagir cruzadamente contra antígenos da bainha de mielina. Outra hipótese sugere que após a infecção, proteínas das células do sistema nervoso mudem estruturalmente e dessa forma se apresentem como antígenos estranhos e passíveis de serem eliminados (NINDS, 2017).

Durante os surtos mais recentes de CHIKV, comprometimento oftalmológico, como uveíte e retinite, também foram descritos (Figura 10) (MARTÍNEZ-PULGARÍN et al., 2016). A alopecia, redução total ou parcial de pelos/cabelos em determinada área do corpo, também tem sido observada nas infecções mais recentes, especialmente em pacientes do sexo feminino na fase crônica da infecção, como demonstrado na figura 11 (CUNHA; TRINTA, 2017).

Figura 10 - Caso de retinite decorrente da infecção pelo vírus chikungunya



Fonte: Martínez-Pulgarín et al. (2016)

Nota: Paciente de 30 anos, apresentando retinite, artralgia grave e IgM anti-chikungunya

Figura 11- Alopecia apresentada por paciente na fase crônica da infecção pelo vírus chikungunya



Fonte: Cunha e Trinta (2017)

Nota: Alopecia em paciente do sexo feminino com aproximadamente 18 meses de doença. A manifestação é um dos achados clínicos mais frequentes na fase crônica da infecção, especialmente entre mulheres adultas.

Quanto à infecção congênita, estudos com bebês recém-nascidos descreveram sinais como febre, falta de apetite, apneia, edema distal e manifestações da pele, inchaço e hemorragia cerebral, que podem progredir e causar incapacidades permanentes (GOPAKUMAR; RAMACHANDRAN, 2012). Comprometimento cardíaco, gastrointestinal e lesões cutâneas, que apareceram em até dois dias após o início da febre, também foram relatados em recém-nascidos e crianças infectadas pelo CHIKV (ERNOULD et al., 2008).

O aparecimento de várias lesões bolhosas associadas à infecção pelo CHIKV foi relatado por Robin et al. (2010) em bebês com cerca de 4 meses. As bolhas começaram em média dois dias após o início da febre e atingiram cerca de 20% da superfície corporal das crianças (Figura 12).

Figura 12 - Lesões bolhosas em bebê infectado pelo vírus chikungunya



Fonte: Robin et al. (2010)

Nota: Bebê infectado pelo vírus chikungunya, apresentando inúmeras lesões bolhosas nos membros inferiores e nádegas.

As mortes decorrentes da infecção por CHIKV eram consideradas raras, mas desde as últimas epidemias a taxa de mortalidade associada à infecção aumentou consideravelmente, provavelmente decorrente de acometimentos neurológicos, especialmente em recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos (BANDEIRA et al., 2016; CHUSRI et al., 2011; KEE; YANG; TAMBYAH, 2010; RAMPAL; SHARDA; MEENA, 2007).

2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da infecção por CHIKV é dificultado pela ausência de sintomas patognomônicos e a consequente semelhança dos sinais e sintomas clínicos com outras viroses, principalmente as decorrentes dos arbovírus DENV e ZIKV (Quadro 1). Em adição, segundo o Ministério da Saúde, a depender do perfil epidemiológico da região, a

suspeita clínica de CHIKV também deve ser diferenciada das infecções por outros agentes febris, como as de origem bacteriana (por *Leptospira*) ou protozoária (por *Plasmodium falciparum*) (BRASIL, 2017b).

Quadro 1 - Sinais e sintomas da infecção pelos vírus chikungunya, dengue e zika

Sinais/Sintomas	Arbovírus		
	CHIKV	DENV	ZIKV
Febre	> 38°C	> 38°C	≤ 38°C
Duração	2-3 dias	4-7 dias	1-2 dias
Erupção cutânea	Aparecimento no segundo ao quinto dia de infecção	Aparecimento a partir do quarto dia de infecção	Aparecimento no primeiro ao segundo dia de infecção
Frequência	50% dos casos	30-50% dos casos	90-100% dos casos
Mialgia	+	+++	++
Artralgia	+++	+	++
Intensidade de dor na articulação	++/+++	+	+ / ++
Inchaço das articulações	++/+++	Raro	+
Conjuntivite	30% dos casos	Raro	50-90% dos casos
Dor de cabeça	++	+++	++
Linfadenopatia	++	+	+++
Discrasia hemorrágica	+	++	Ausente
Comprometimento neurológico	++	+	+++

Fonte: Adaptado de Brito e Cordeiro (2016)

Legenda: + = intensidade do achado clínico; + = baixa; ++ = moderada; +++ = alta.

Nesse cenário epidemiológico, os testes laboratoriais podem auxiliar na confirmação do diagnóstico. Nos exames laboratoriais de rotina, a exemplo do hemograma, as alterações são inespecíficas, entretanto, pacientes com CHIKF frequentemente apresentam leucopenia e linfopenia com número de linfócitos abaixo de 1.000 células/mm³. Contagem de plaquetas abaixo 100.000 células/mm³ é rara e a velocidade de hemossedimentação e proteína C reativa geralmente estão elevadas (BRASIL, 2016).

O diagnóstico específico pode ser realizado, a depender do tempo de infecção, através do isolamento viral, biologia molecular ou sorologia. O isolamento do CHIKV é

considerado padrão ouro no diagnóstico da infecção, sendo realizado em linhagens de células de inseto (C6/36), de mamífero (células Vero, BHK-21, HeLa) e camundongos com posterior confirmação através de RT-PCR ou imunofluorescência (DASH; MOHANTY; PADHI, 2011; BRASIL, 2014; SINGH, 2015). No entanto, a necessidade que a amostra de soro seja coletada nos primeiros sete dias da doença e o tempo necessário para o isolamento, cerca de 48 horas, além da exigência de mão de obra especializada e infraestrutura adequada, fazem com que outras técnicas, como as baseadas em biologia molecular (RT-PCR, qRT-PCR, RT-LAMP), sejam preferíveis para o diagnóstico (LAKSHMI et al., 2008; LANCIOTTI et al., 2007; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009)

Em comparação ao isolamento viral, os diagnósticos por biologia molecular apresentam maior velocidade, sensibilidade e especificidade, permitindo também a identificação da cepa e linhagem do vírus analisado, inclusive alguns dias após o limite da detecção pelo isolamento vírico. No ano de 2008, testes de qRT-PCR foram disponibilizados comercialmente, incluindo ensaios baseados nos desenvolvidos pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009).

A técnica de amplificação isotérmica mediada por *loop* (RT- LAMP) também tem sido sugerida no diagnóstico do CHIKV, apresentando como vantagens, em relação às amplificações de genoma por técnicas convencionais, a não necessidade de equipamento como termocicladores e transiluminadores, sendo a reação colorimétrica e passível de ser observada a olho nu (LAKSHMI et al., 2008; YAREN et al., 2017).

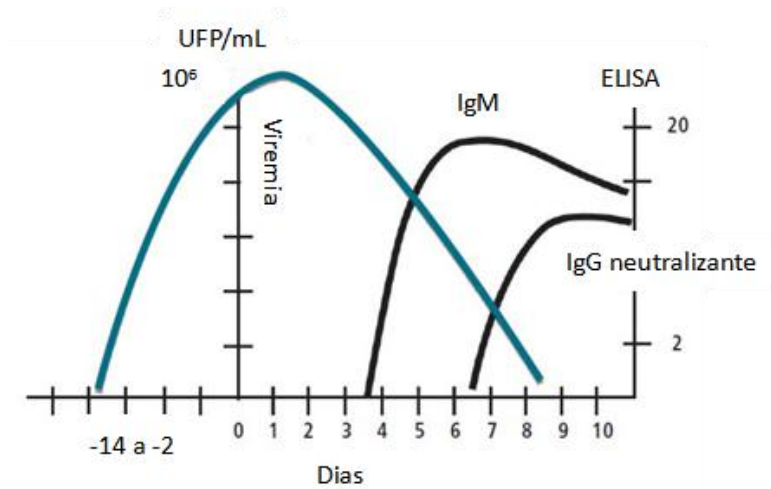
Atualmente, ensaios multiplex capazes de diferenciar CHIKV de outros agentes infecciosos de espectro clínico semelhantes têm sido apresentados. Dentre esses, RT-LAMP capaz de diferenciar ZIKV-CHIKV-DENV e qRT-PCR capaz de diferenciar ZIKV-CHIKV-DENV e CHIKV-DENV-*Leptospira* são descritos com sucesso na literatura (GIRY et al., 2017; PABBARAJU et al., 2016; YAREN et al., 2017).

No que se refere à sorologia, o diagnóstico é realizado através do ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) para detecção de imunoglobulina M (IgM), na fase aguda da infecção, e imunoglobulina G (IgG), na fase convalescente/crônica. A IgM começa a ter seus níveis séricos detectáveis após cinco a sete dias da doença e pode permanecer detectável de algumas semanas a três meses. A IgG, por sua vez, começa a ser detectável em torno do sétimo dia após o aparecimento dos sintomas e persiste por anos (GRIVARD et al., 2007; PIALOUX et al., 2007). O ELISA para CHIKV é bastante específico e apresenta pouca reação cruzada com outros alfavírus. Eventualmente,

outras técnicas baseadas na reação antígeno-anticorpo podem ser utilizadas no diagnóstico, como imunofluorescência indireta, inibição da hemaglutinação e soroneutralização (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009).

Na figura 13 é possível observar a cronologia da infecção por CHIKV, relacionando-a à viremia e resposta humoral, de forma a possibilitar a escolha do diagnóstico ideal para o curso da infecção.

Figura 13 - Cronologia da viremia e resposta imune humoral pós-infecção pelo vírus chikungunya



Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (BRASIL, 2014)

Nota: Após a infecção pelo vírus chikungunya, o hospedeiro vertebrado passa por um período de incubação intrínseca, após o qual se inicia a viremia, sendo essa diminuída a partir do desenvolvimento da resposta imune humoral, inicialmente mediada por IgM e adiante por IgG. Os períodos de viremia e resposta imune humoral devem assim ser considerados quando da escolha pelo diagnóstico laboratorial direto ou indireto da infecção. UFP/mL: unidade formadora de placa por mL.

2.1.6 Tratamento

No momento não há tratamento específico licenciado para controlar a replicação do CHIKV, conseqüentemente, a estratégia terapêutica usada é de suporte e sintomática (BRASIL, 2017b; JAIN; RAI; CHAKRAVARTI, 2008; KAUR; CHU, 2013). Fármacos como paracetamol e anti-inflamatórios não esteroides são indicados para alívio do quadro febril e dores decorrentes da artralgia. Medicamentos que atuem secundariamente nas plaquetas ou nos mecanismos de coagulação, como aspirina, devem ser evitados e a ingestão de líquido entra como terapia de suporte aos pacientes com CHIKF (BRASIL, 2017b).

Entre as drogas em avaliação contra CHIKV estão compostos que têm como alvo de ação desde a entrada do vírus na célula hospedeira, a tradução da proteína vírica, a proteína nsP2, a replicação do genoma viral e a maturação das glicoproteínas do vírus até

moduladores da resposta imune (BRIOLANT et al., 2004; KAUR et al., 2013; KHAN et al., 2010; LANI et al., 2015; OZDEN et al., 2008; POHJALA et al., 2011; TURNER et al., 2014; WINTACHAI et al., 2015).

A cloroquina compreende uma droga licenciada para tratamento da malária que também tem revelado atividade antiviral, sobretudo em relação ao vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*, HIV), coronavírus e SFV (HELENIUS et al., 1982; SAVARINO et al., 2004; WELLEMS; PLOWE, 2001; KEYAERTS et al., 2004). Acredita-se que o mecanismo de ação antiviral da cloroquina seja na fase inicial da infecção, em um momento pós-adsorção, dificultando a endocitose e/ou acidificação do endossomo. Apesar de um estudo piloto sugerir a contribuição da cloroquina no tratamento da artralgia na fase crônica da infecção por CHIKV, sua utilidade terapêutica na fase aguda é alvo de discussão (BRIGHTON, 1984; DE LAMBALLERIE et al., 2008; KHAN et al., 2010). Em camundongos, Maheshwari, Srikantan e Bhartiyaet (1991) observaram um aumento da replicação de outro alfavírus, o SFV, e também do vírus da encefalomiocardite (*Encephalomyocarditis virus*, ECMV) após o tratamento com cloroquina.

Em continuidade aos compostos potenciais para inibição da entrada do CHIKV na célula hospedeira, encontra-se o arbidol, um fármaco antiviral já licenciado na Rússia e China para uso contra influenza (*Influenza virus*) (WANG et al., 2017). Quando em avaliação de seus efeitos sobre a infecção de CHIKV *in vitro*, o arbidol apresentou forte atividade inibitória sobre a replicação do vírus em célula Vero e em fibroblasto de pulmão humano (MRC-5) (DELOGU et al., 2011). Compostos ligantes de proibirina, identificado como provável receptor para CHIKV (como comentado no tópico 2.1.2), também têm sido avaliados com sucesso para inibição da infecção e redução da replicação viral (WINTACHAI et al., 2012; WINTACHAI et al., 2015). Uma outra droga, a imipramina, foi capaz de inibir a fusão e replicação de CHIKV e adicionalmente também agiu contra ZIKV, DENV e WNV (WICHIT et al., 2017).

A harringtonina, um alcalóide de cefalotaxina, mostrou inibir a expressão das proteínas virais nsP3 e E2 e formação de RNA positivo e negativo de CHIKV, diminuindo, assim, a formação de partículas infecciosas de CHIKV e também mostrando atividade inibitória sobre a replicação do vírus Sindbis (*Sindbis virus*, SINV) (KAUR et al., 2013). A eficiência de replicação de CHIKV e a expressão das proteínas víricas associadas à replicação viral foi também diminuída com o uso do flavonóide similarina (LANI et al., 2015).

O uso de ribavirina, antiviral já licenciado para o tratamento do vírus sincial respiratório (*Respiratory syncytial virus*, RSV) e para o tratamento do vírus da hepatite C

(*Hepatitis C virus*, HCV), mostrou participação na redução do inchaço em articulações e tecidos moles decorrentes da infecção por CHIKV (PALUMBO, 2011; TURNER et al., 2014). Quando em associação com interferon alfa (IFN- α), a ribavirina inibiu a replicação de CHIKV e SFV em células Vero (BRIOLANT et al., 2004).

Alguns outros candidatos, como os que agem na maturação da glicoproteína E2 e na replicação viral, como o decanoil-RVCR-clorometil cetona (inibidor de furina) e de compostos com 5,7-di-hidroxi-flavona, respectivamente, também têm demonstrado atividade anti-CHIKV (OZDEN et al., 2008; POHJALA et al., 2011).

2.1.7 Vacinas

Apesar da existência de um único sorotipo de CHIKV ser apontada como uma “facilidade” vacinal, acreditando-se que uma formulação desenvolvida contra uma cepa do vírus possa fornecer proteção cruzada a todos CHIKV. Até o momento, também não há uma vacina licenciada contra CHIKV (SILVA Jr et al., 2018; SMALLEY et al., 2016).

Por outro lado, a elevada virulência do CHIKV, com apenas aproximadamente 30% das infecções sendo assintomáticas, talvez represente o principal obstáculo para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus (BRASIL, 2017b; SILVA Jr et al., 2018). Essa elevada morbidade das infecções causadas por CHIKV resulta na necessidade de um refinado equilíbrio entre imunogenicidade e virulência, de forma que o atendimento de um desses critérios não comprometa a eficácia do outro. Por exemplo, vacinas de vírus atenuado, apesar de serem comumente mais imunogênicas que as manipulações de vírus inativado, apresentam segurança diminuída, sobretudo para os grupos de risco, como indivíduos imunocomprometidos. No outro extremo, as vacinas de vírus inativado, embora se destaquem pela segurança de sua formulação, frequentemente necessitam de seriadas doses e reforços (ERASMUS et al., 2017).

Diante desses ponderamentos, mais de 18 estratégias vacinais contra CHIKV já têm sido sugeridas, como o uso de partículas semelhantes a vírus (*Virus-like particles*, VLPs), vírus inativados e atenuados, vacinas de DNA e de vírus quiméricos (ERASMUS et al., 2017; SMALLEY et al., 2016).

A estratégia de inativação viral foi a primeira a ser usada no desenvolvimento de vacina anti-CHIKV. Vírus chikungunya foram amplificados em culturas celulares e em seguida inativados por formalina, éter ou com uso de uma molécula azida hidrofóbica fotoativa [1,5 *iodonaphthyl azide* (INA)], todos levando à formação de anticorpos

neutralizantes (ECKELS; HARRISON; HETRICK, 1970; SHARMA; GUPTA; MAHESHWARI, 2012; TIWARI et al., 2009). A inativação com formalina estimulou ainda a produção de resposta imune celular, com a produção de citocinas anti e pró-inflamatórias (TIWARI et al., 2009). O uso de INA, embora tenha contornado o problema da virulência associada às vacinas vivas atenuadas, resultou em uma capacidade reduzida de ligação dos anticorpos neutralizantes anti-E2 (SHARMA; GUPTA; MAHESHWARI, 2012).

Ainda com objetivo de contornar a virulência das infecções por CHIKV, Akahata et al. (2010) sugeriram o uso vacinal de VLPs expressando as proteínas estruturais do CHIKV. A vacina baseada em VLP, VRC-CHKVLP059-00-VP, foi obtida por transfecção de plasmídeo expressando as proteínas C e E do CHIKV cepa 37997. A vacina estimulou a produção de anticorpos neutralizantes contra a proteína E de diferentes cepas de CHIKV e garantiu a proteção de macacos quando desafiados com 10^{10} unidades formadoras de placa (*plaque-forming unit*, PFU) de CHIKV 15 semanas após a última imunização (AKAHATA et al., 2010). Adiante, testes adicionais em humanos também mostraram a eficácia imunogênica da vacina; após a primeira dose, anticorpos foram detectados em 100% dos pacientes que receberam 10 μ g e 40 μ g da vacina e 80% no grupo de 20 μ g. Sobre a segurança do uso da vacina, apesar de 36% (9/25) e 40% (10/25) dos indivíduos vacinados apresentaram reatividade local leve (dor ao toque) e reatividade sistêmica leve, respectivamente, não houve relatos de artralgia após a vacinação (CHANG et al., 2014). A VRC-CHKVLP059-00-VP compreende uma das estratégias em estágio mais avançado de avaliação, estando atualmente na fase II de ensaio clínico [*National Clinical Trials* (NCT) 02562482].

Vacinas de DNA também têm sido uma outra estratégia utilizada e plasmídeo expressando sequências consenso das proteínas C, E1 e E2 de CHIKV demonstraram uma robusta resposta imune celular e formação de elevados títulos de anticorpos capazes de reconhecer antígenos selvagens (MUTHUMANI et al., 2008). Em outra abordagem, a imunização de camundongos com vacina de DNA contendo todo o genoma do CHIKV atenuado clone 181/25 resultou na geração de vírus recombinantes *in vivo* e na formação de anticorpos neutralizantes, além de garantir proteção após o desafio com CHIKV neurovirulento (TRETZYAKOVA et al., 2014).

As estratégias vacinais com vírus inativado, VLPs e vacinas de DNA estimulam prioritariamente a resposta imune humoral, tipo de resposta apontada como um dos principais mecanismos para a prevenção e controle das infecções por CHIKV (LUM et al., 2013). No entanto, vacinas de vírus atenuado empiricamente ou construídas por meio de genética reversa, capazes de induzir resposta imune celular e humoral, também têm sido sugeridas para a

prevenção das infecções por CHIKV (ERASMUS et al., 2017; GARCÍA-ARRIAZA et al., 2014; GORCHAKOV et al., 2012; LEVITT et al., 1986; PLANTE et al., 2011; WANG et al., 2008, 2011).

A vacina TSI-GSD-218 se baseia na atenuação empírica da cepa CHIKV 15561, isolada do soro de um paciente durante um surto de CHIKV em 1962, na Tailândia. A cepa foi atenuada por 18 passagens em MRC-5 e os critérios usados para a escolha do protótipo vacinal, o CHIKV 181/clone 25, foram: tamanho da placa, sensibilidade à temperatura, diminuição da virulência em camundongos em fase de amamentação, redução da virulência em macaco, indução de anticorpos neutralizantes e proteção contra desafio (LEVITT et al., 1986). Ao final de sua avaliação da fase clínica II, 98% dos indivíduos vacinados apresentaram anticorpos neutralizantes, 85% permaneceram soroconvertidos um ano após a vacinação e 8,47% (5/59) apresentaram artralgia temporária.

Uma comparação de CHIKV 181/clone 25 e sua cepa parental 15561 identificou cinco diferenças de aminoácidos. O uso de genética reversa para a construção de vírus recombinantes com essas mutações sugeriu que duas localizadas na proteína E2, uma troca de treonina por isoleucina no aminoácido 122 (T12I) e de uma glicina por arginina no aminoácido 84 (G84R), foram responsáveis pela atenuação da cepa vacinal. Interessantemente, já foi mostrado a possibilidade de reversão natural dessas mutações, talvez explicando as reações adversas reportadas durante o ensaio de fase II (GORCHAKOV et al., 2012)

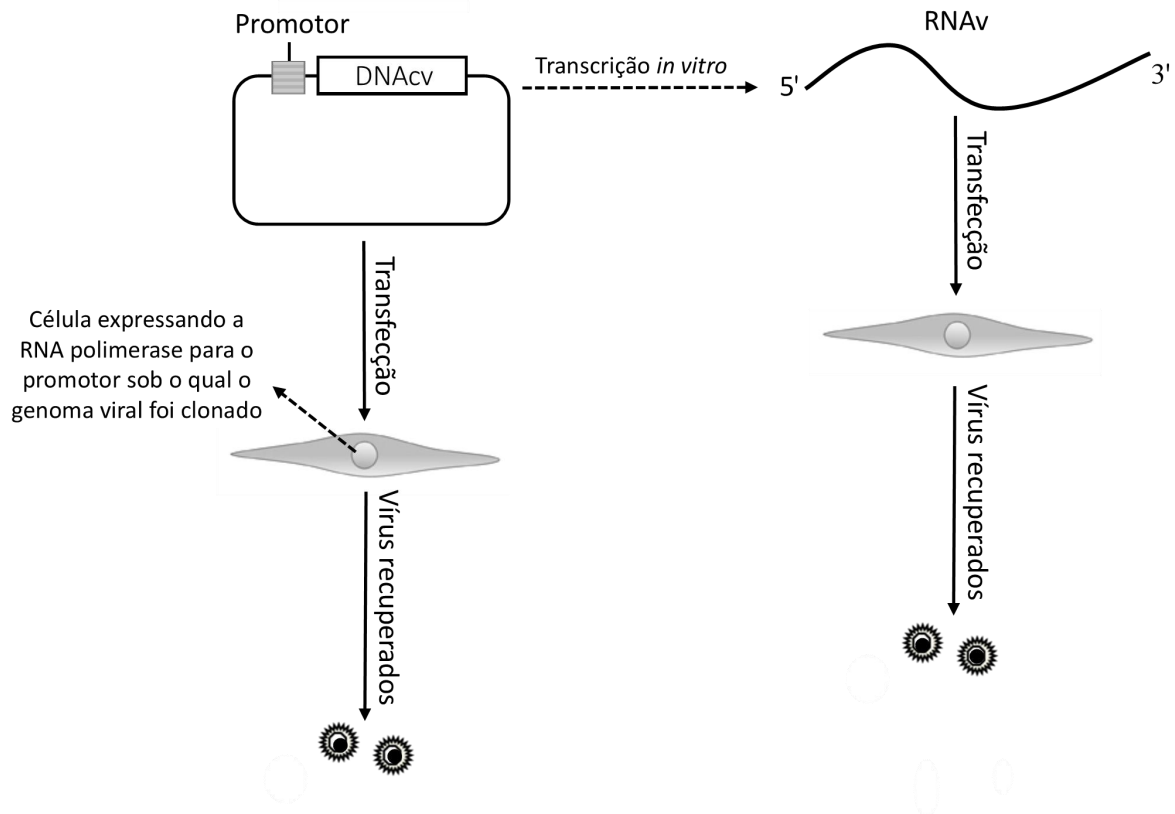
Em adição às estratégias comentadas acima, sistemas de genética reversa também têm sido empregados como plataformas para a construção de vírus recombinantes atenuados ou quiméricos vacinais e serão comentadas no tópico 2.1.8.2 (ERASMUS et al., 2017; GARCÍA-ARRIAZA et al., 2014; PLANTE et al., 2011; VAN DEN DOEL et al., 2014; WANG et al., 2008, 2011).

2.1.8 Genética reversa

No âmbito da virologia molecular, entende-se por genética reversa a recuperação/geração de partículas virais por meio da transfecção de células eucariotas com o DNA complementar viral (DNA_{cv}) ou RNA_v transcrito *in vitro* (BOYER; HENNI, 1994; SILVA Jr, 2012). Em relação aos vírus de genoma de RNA de orientação positiva, a exemplo dos membros da família *Togaviridae* e *Flaviviridae*, a recuperação dos vírus recombinantes pode ser feita principalmente de duas formas, ou pela transfecção do RNA_v transcrito *in vitro* (a partir do genoma viral previamente clonado) ou pela transfecção direta do DNA_{cv} clonado

em célula expressando o promotor sob o qual o genoma vírico foi clonado (BREDENBEEK et al., 2003; JIANG et al., 2015; TSETSARKIN et al., 2006) (Figura 14).

Figura 14 - Geração de vírus recombinantes de RNA de orientação positiva



Fonte: Do autor, 2018

Nota: Após a clonagem do DNA complementar viral (DNAcv), o vírus recombinante pode ser recuperado ou através da transfecção direta do clone em célula que expresse a RNA polimerase para o promotor sob o qual o genoma viral clonado ou pela transfecção do RNA viral (RNAv) transcrito *in vitro*.

Nos sistemas atuais de genética reversa para CHIKV, a recuperação do vírus recombinante é feita pela transfecção de RNAv transcrito *in vitro* via RNA polimerase T7 ou SP6 ou de amplicons subgenômicos infecciosos e parcialmente homólogos (*Infectious-subgenomic-amplicons*, ISA) (AUBRY et al., 2014; KÜMMERER et al., 2012; TSETSARKIN et al., 2006). Os vírus recombinantes recuperados são então direcionados a aplicações tanto em virologia básica, como os estudos sobre função proteica e evolução viral, ou para virologia aplicada, como protótipos para construção de vacinas ou direcionados à triagem em larga escala de compostos anti-CHIKV (LANI et al., 2015; PLANTE et al., 2011; TSETSARKIN et al., 2011). Os tópicos a seguir exemplificam os usos de diversos sistemas de genética reversa para CHIKV em pesquisa básica e em biotecnologia.

2.1.8.1 Virologia básica

Uma das principais funções dos sistemas de genética reversa viral é a elucidação das funções das proteínas víricas e a investigação dessas na interação vírus-hospedeiro, de forma que clones infecciosos de vários vírus já têm sido manipulados e usados com essas finalidades (BUCHHOLZ; FINKE; CONZELMANN, 1999; DE BORBA et al., 2012; ISKEN et al., 2014; MCELROY et al., 2005; RAUSALU et al., 2016; TAYLOR et al., 2017; YUAN et al., 2017).

A atividade de cisteína protease da proteína nsP2, por exemplo, e sua participação na infectividade do CHIKV, na replicação do RNA_v e no processamento da poliproteína não estrutural foi recentemente identificada através de mutação sítio-dirigida em clones infecciosos de CHIKV (RAUSALU et al., 2016). A participação da nsP2 na inibição da via de sinalização de IFN I e II, bem como sua influência no fenótipo citopático do vírus também foram comprovados por experimentos de genética reversa (FROS et al., 2010, 2013).

Em outra investigação, para corroborar a influência da mutação E1-A226V sobre o aumento da infectividade de CHIKV para o vetor *Ae. albopictus*, clones infecciosos de CHIKV foram construídos com alanina ou valina na posição 226 da proteína viral E1 (TSETSARKIN et al., 2007). Após uso de ambos os vírus em ensaio de infecção de *Ae. albopictus*, observou-se que a mutação E1-A226V foi responsável por um aumento significativo da infectividade do CHIKV para o vetor, levando a uma mais eficiente disseminação do vírus em órgãos secundários do mosquito e aumentando a transmissão do vírus a camundongos. Acredita-se que devido à proximidade do aminoácido 226 ao peptídeo de fusão em E1, responsável pela saída do CHIKV do endossomo durante os estágios iniciais da infecção, a substituição E1-A226V favoreça a infecção do vírus nas células do intestino médio do *Ae. albopictus* (TSETSARKIN et al., 2007). Mutações anteriormente identificadas em outros alfavírus, como no SFV e SINV, ocorridas na mesma posição da glicoproteína E1 ou em sua adjacência, também foram avaliadas por genética reversa e revelaram melhora da capacidade de infecção e transmissão dos vírus mutantes em células de *Ae. albopictus* (C6/36) (LU; CASSESE; KIELIAN, 1999).

Vírus recombinantes de CHIKV expressando genes repórteres também têm sido empregados em estudos sobre interação vírus-hospedeiro. Um vírus repórter de CHIKV expressando proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP) e contendo a mutação E1-A226V foi descrito como ferramenta para estudos de interação CHIKV-*Aedes* e um CHIKV expressando o gene repórter da *Renilla* luciferase (RLuc) foi empregado como

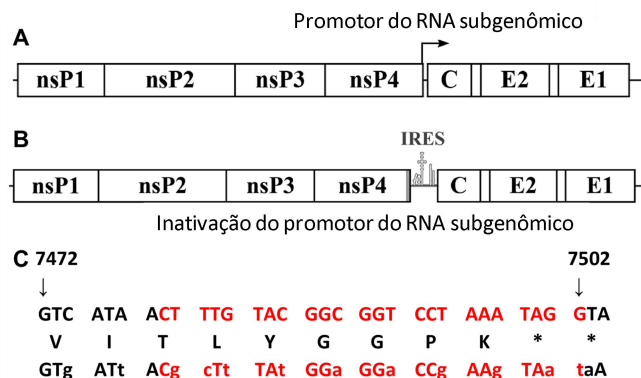
auxílio no entendimento da interação entre CHIKV e proteínas humanas (BOURAI et al., 2012; TSETSARKIN et al., 2007).

2.1.8.2 Vacinas

Genética reversa viral também tem sido direcionada para a confecção de vacinas contra várias viroses mediante a construção de vírus recombinantes atenuados ou quiméricos (BONALDO; SEQUEIRA; GALLER, 2014; GUIRAKHOO et al., 2001; HENAO-RESTREPO et al., 2015; KIRKPATRICK et al., 2016; TAKEDA et al., 2017).

Para a prevenção das infecções por CHIKV, uma das abordagens recombinantes é a desenvolvida por Plante et al. (2011) (Figura 15). Nessa estratégia, o promotor do RNA subgenômico do CHIKV foi tornado não funcional pela inserção de 13 mutações sinonímias. Em seguida, uma sequência IRES (*Internal ribosome entry site*, sítio de entrada interno do ribossomo) do ECMV foi adicionada como novo promotor para a transcrição do RNA subgenômico (PLANTE et al., 2011).

Figura 15 - Organização do genoma do vírus chikungunya recombinante apresentando o sítio de entrada interno do ribossomo



Fonte: Adaptado de Plante et al. (2011)

Nota: Um vírus chikungunya atenuado e incapaz de se replicar em células de mosquito foi construído pela inserção de um sítio de entrada interno do ribossomo (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES) e pela inserção de 13 mutações sinonímias (nucleotídeos em letra minúscula) responsáveis pela inativação do promotor subgenômico original do vírus (escrito em letra vermelha)

Essa abordagem traz a vantagem de conservar a estrutura original do vírus, garantindo assim sua antigenicidade, além de garantir a estabilidade da atenuação, muitas vezes diminuída nas formas clássicas de atenuação por passagem celular. Como células de mosquito são incapazes de reconhecer o IRES, o vírus quimérico CHIKV/IRES fica impossibilitado de se replicar em células de mosquito, impedindo que a cepa vacinal seja

transmitida pelo vetor a indivíduos considerados como grupo de risco à vacinação, a exemplo dos imunocomprometidos. Experimentalmente, a vacina CHIKV/IRES exibiu um alto grau de atenuação em modelo murino ausente de resposta de IFN-I e estimulou o desenvolvimento de resposta imune humoral e celular (PLANTE et al., 2011).

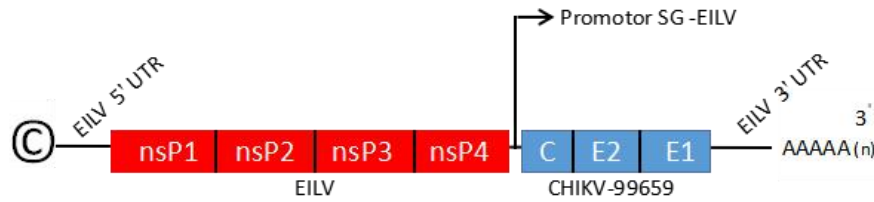
Outras quimeras virais também foram sugeridas como estratégia vacinal anti-CHIKV. Nessas construções, a cepa atenuada TC-38 do VEEV, uma cepa naturalmente atenuada do vírus da encefalite equina oriental (*Eastern equine encephalitis virus*, EEEV), ou o SINV foram usados para expressar as proteínas estruturais do CHIKV. Todas as quimeras, principalmente as feitas a partir do vírus TC-38 e do EEEV, foram imunogênicas, estimulando a produção de anticorpos neutralizantes e garantindo a proteção de camundongos contra doença e viremia após o desafio (WANG et al., 2008).

Um vetor de adenovírus não competente para replicação também foi usado para expressão da ORF codificante da poliproteína estrutural do CHIKV. Uma única administração da vacina induziu a formação de elevados títulos de anticorpos capazes de neutralizar CHIKV da linhagem Asiática e IOL e forneceu proteção para camundongos contra a viremia e artrite após o desafio com os isolados de ambas linhagens (WANG et al., 2011).

Em outra construção quimérica, o vírus da vaccinia modificado Ankara (*Modified Vaccinia Ankara*, MVA) expressando a glicoproteína E2 ou o cassete com as proteínas E3-E2-6K-E1 estimulou a produção de anticorpos neutralizantes em camundongos sem expressão de receptores para IFN-I (IFN α/β) e II (IFN- γ) (camundongo AG129), protegendo-os contra infecção letal (VAN DEN DOEL et al., 2014).

Recentemente, foi reportada uma vacina promissora desenvolvida por genética reversa viral e baseada na quimera do vírus Eilat (*Eilat virus*, EILV) com CHIKV (ERASMUS et al., 2017). O EILV/CHIKV possui a maquinaria de replicação formada pelas proteínas não estruturais do EILV e o cassete de proteínas estruturais e acessórias do CHIKV-99659 (Figura 16). Como o EILV é um alfavírus de tropismo específico para insetos, o vírus EILV/CHIKV foi incapaz de replicar em hospedeiros vertebrados, proporcionando assim um alto grau de segurança em sua administração. Ensaios de imunização em primatas não humanos com o vírus quimérico foi capaz de estimular resposta imune, garantindo a proteção do animal contra a viremia (ERASMUS et al., 2017).

Figura 16 - Genoma do vírus quimérico Eilat/chikungunya



Fonte: Adaptado de Erasmus et al. (2017)

Nota: A região codificante da poliproteína estrutural do vírus Eilat (EILV), sob o comando do promotor subgenômico (SG), foi substituída pelo cassete de proteínas estruturais do vírus chikungunya 99659, resultando na construção de um vírus quimérico atenuado, imunogênico e incapaz de se replicar em organismos vertebrados.

2.1.8.3 Avaliação de compostos anti-chikungunya

Na virologia tradicional, a avaliação de compostos antivirais é feita convencionalmente por laboriosos e demorados ensaios de placa. Alguns compostos candidatos anti-CHIKV apresentados no tópico 2.1.6, como os ligantes de proibitina (WINTACHAI et al., 2015), harringtonina (KAUR et al., 2013) e imipramina (WICHIT et al., 2017) tiveram sua eficácia avaliada pela redução na formação de placas.

Como alternativa, principalmente quando da triagem em larga escala de compostos antivirais, têm-se sugerido o uso de RNAs subgenômicos replicativos (replicons) associados a um gene repórter. A abordagem recombinante permite, via quantificação da expressão do gene repórter manipulado, avaliar indiretamente a eficácia antiviral da substância candidata, com a vantagem de associar uma alta sensibilidade e facilidade de execução da técnica. Replicons de vários vírus, como os de DENV, ZIKV e HCV, expressando os genes repórteres da *Firefly* luciferase (FLuc), *Renilla* luciferase (RLuc), *Gaussia* luciferase (GLuc), já têm sido usados para a triagem em larga escala de vários compostos antivirais (KATO; HISHIKI, 2016; ROBINSON, et al., 2010; XIE et al., 2016).

Em relação ao CHIKV, replicons e linhagens celulares recombinantes têm sido desenvolvidos expressando diferentes genes repórteres, como proteína fluorescente verde de expressão aumentada (*enhanced green fluorescent protein*, eGFP) e RLuc e usados na avaliação de candidatos anti-CHIKV (POHJALA et al., 2011). Pohjala et al. (2011) triaram 356 candidatos, de compostos naturais a drogas clinicamente aprovadas, através de linhagens celulares recombinantes expressando replicon de CHIKV com eGFP e RLuc. Em seguida, todos os compostos triados pela linhagem celular recombinante e que revelaram inibição dos genes repórteres também inibiram a replicação de um CHIKV recombinante expressando RLuc. O flavonóide silimarina também teve sua ação anti-CHIKV avaliada por uma linhagem

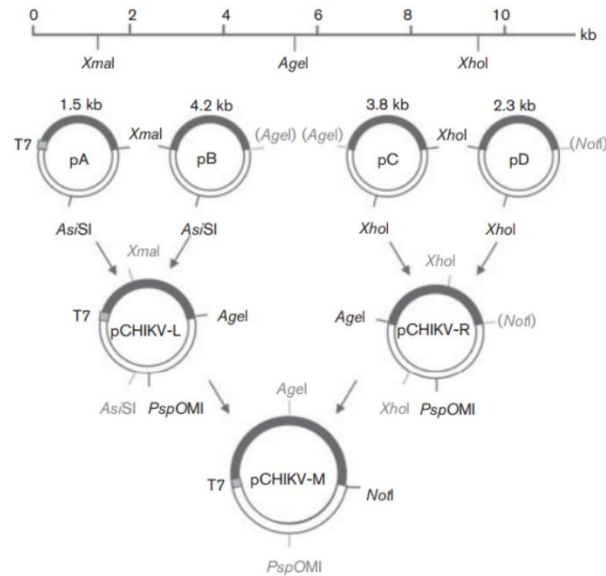
celular de replicon de CHIKV expressando RLuc (LANI et al., 2015).

Além de oferecer uma alternativa capaz de acelerar a triagem em larga escala de compostos antivirais, replicons e clones infecciosos de CHIKV também têm sido usados na investigação de mutações responsáveis pela evasão do vírus a determinados candidatos anti-CHIKV (DELANG et al., 2014; MOUNCE et al., 2017). Por exemplo, estruturas poliamínicas presentes na célula são importantes tanto para a replicação de vírus de DNA quanto de RNA, conseqüentemente, compostos que atuem na depleção de poliaminas podem limitar a replicação viral e podem ser sugeridos como agentes antivirais. Para avaliação da resistência de CHIKV a esses agentes depresores, uma linhagem celular expressando replicon de CHIKV com RLuc foi usada para análise da influência de mutações em nsP1 e em nsP4 sobre a evasão do CHIKV a compostos depresores de poliamina (MOUNCE et al., 2017).

Favipiravir, ou T-705, compreende outra molécula com função anti-CHIKV já avaliada. Porém, ao sequenciar variantes de CHIKV com resistência ao composto foi possível identificar prováveis mutações responsáveis pelo fenótipo de resistência. Dentre elas, a substituição de uma lisina por uma arginina no aminoácido 291 (K291R), presente no domínio da RNA polimerase dependente de RNA do CHIKV, foi consenso entre todos sequenciados. A construção de CHIKV recombinantes com a mutação K291R, por fim, confirmou a participação da substituição dos nucleotídeos no fenótipo de resistência ao favipiravir (DELANG et al., 2014).

2.1.9 Genética reversa em *Escherichia coli* vs. levedura

Todos replicons e vírus recombinantes de CHIKV usados na elaboração de estratégias vacinais, estudos de função proteica, de interação vírus-hospedeiro, ensaios de soroneutralização, avaliação de mutação responsável pela evasão a compostos antivirais e em triagem de candidatos anti-CHIKV foram construídos em protocolos convencionais de clonagem em *E. coli*. Esses protocolos possuem a desvantagem de dependerem de vários sítios de restrição e seriadas reações de digestão e ligação *in vitro* para a clonagem do genoma viral, como exemplificado na figura 17 (KÜMMERER et al., 2012).

Figura 17 - Clonagem do genoma completo do vírus chikungunya em *Escherichia coli*

Fonte: Kümmerer et al. (2012)

Nota: Para a geração do vírus chikungunya recombinante rCHIKV, o genoma do vírus chikungunya foi clonado após seis subclonagens em *Escherichia coli*, cada qual contendo uma sequência parcial do genoma viral, e com uso de várias enzimas de digestão e seguidas reações de ligação *in vitro*.

Em adição, alguns genomas virais, como o de DENV, JEV e WMV podem conter promotores crípticos de bactérias que levam à tradução de proteínas tóxicas ao microrganismo e a consequentes mutações do genoma viral clonado, como deleções e inserções (DESBIEZ et al., 2012; PU et al., 2011; RUGGLI; RICE 1999).

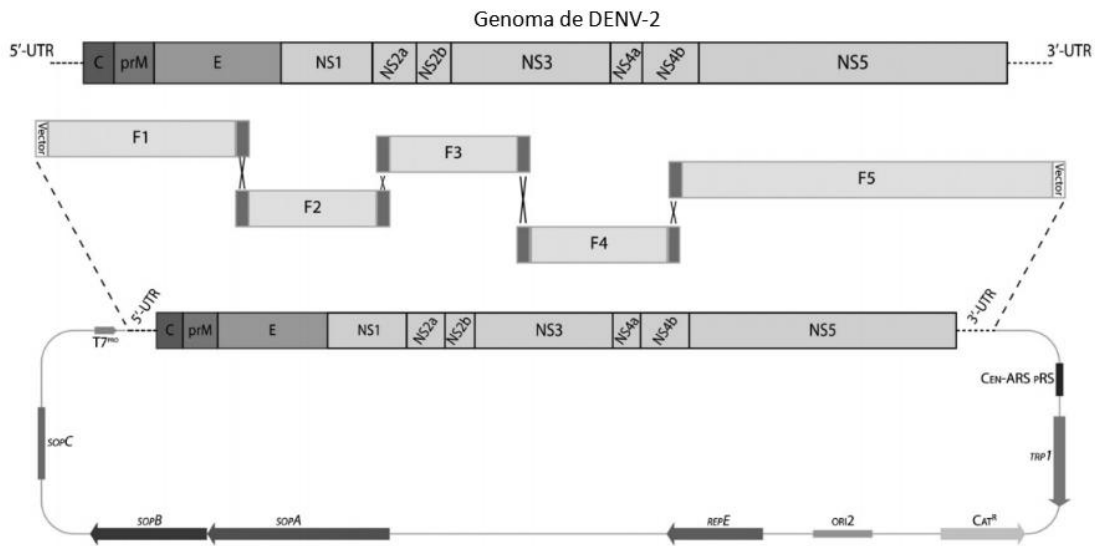
Em reconhecimento a essas características e limitações da clonagem de genomas virais em *E. coli*, sistemas de genética reversa viral desenvolvidos por recombinação homóloga em levedura têm se apresentado como alternativa para a construção de vírus e replicons recombinantes. A técnica já tem sido empregada para a manipulação de vários genomas virais, como do vírus da doença infecciosa da bursa/vírus da doença de Gumboro (*Infectious bursal disease virus*, IBDV), vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus*, BVDV), YFV e DENV (ARENHART et al., 2016; DESBIEZ et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SILVA Jr et al., 2014).

Na clonagem por recombinação homóloga em levedura, o inserto e o vetor, com extremidades homólogas, são introduzidos na levedura e clonados em uma única reação de ligação *in vivo*. Além da ausência de necessidade de vários sítios de restrição e diversas etapas de subclonagem, a recombinação homóloga em levedura garante ainda uma maior estabilidade dos genomas virais clonados (DESBIEZ et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

As figuras 18, 19 e 20 esquematizam a clonagem por recombinação homóloga em

levadura de genomas de vírus da família *Flaviviridae* para construção tanto de vírus recombinantes quanto de replicons repórteres, ilustrando a independência das subclonagens comuns às manipulações em *E. coli*.

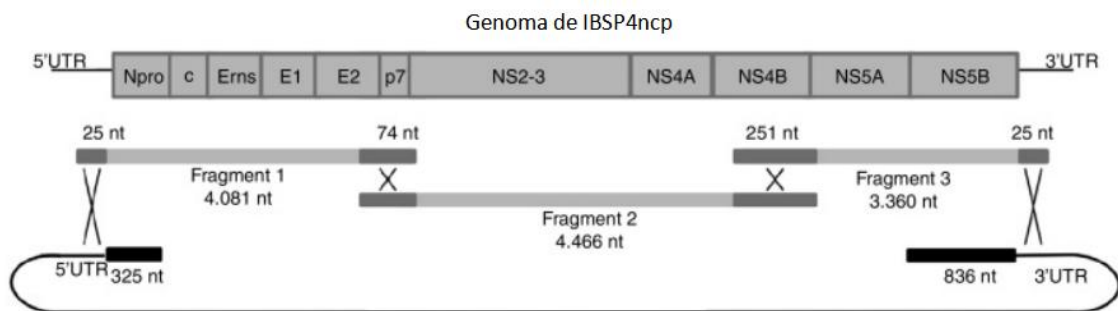
Figura 18 - Clonagem do genoma do vírus dengue sorotipo 2 por recombinação homóloga em levedura



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2015)

Nota: A geração do vírus dengue recombinante sorotipo 2, pSVJS01-DENV2, foi antecedida pela clonagem *in vivo* e em uma única etapa de cinco fragmentos gênicos complementares e parcialmente homólogos do vírus parental através de recombinação homóloga em levedura. As regiões com "X" representam a sequência de homologia entre os insertos e entre inserto e vetor.

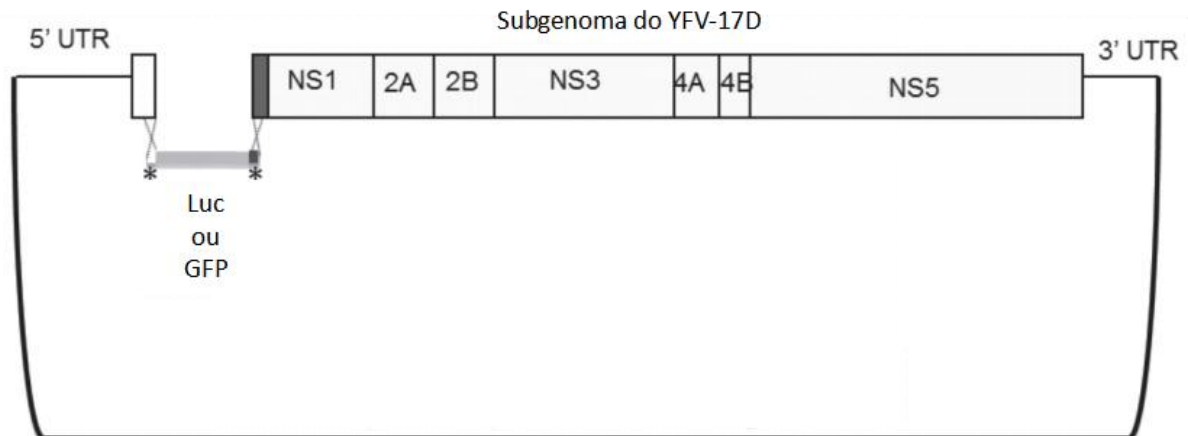
Figura 19 - Clonagem do genoma do vírus da diarreia viral bovina por recombinação homóloga em levedura



Fonte: Adaptado de Arenhart et al. (2016)

Nota: O vírus quimérico recombinante do vírus da diarreia viral bovina, chi-NADL/IBSP4ncp, foi construído pela recombinação homóloga entre as regiões não traduzidas (*Untranslated regions*, UTR) da cepa NADL e a matriz de leitura da cepa IBSP4ncp em uma única reação de ligação *in vivo*. As regiões com "X" representam a sequência de homologia entre os insertos e entre inserto e vetor.

Figura 20 - Clonagem do subgenoma repórter do vírus da febre amarela por recombinação homóloga em levedura



Fonte: Adaptado de Queiroz et al. (2013)

Nota: O subgenoma do vírus da febre amarela expressando os genes repórteres da luciferase (Luc) ou da proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP) foram construídos em uma única reação de ligação *in vivo* através da recombinação homóloga em levedura. As regiões com “X” representam a sequência de homologia entre os insertos e entre inserto e vetor.

2.2 Vírus da febre amarela

2.2.1 Aspectos históricos e epidemiológicos

Acredita-se que a febre amarela tenha se originado nas florestas tropicais do continente africano há 3.000 anos antes de Cristo (a.C.) (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2018). No entanto, foi apenas no início do século XVI, possivelmente através de navios negreiros oriundos do oeste africano, que o YFV chegou no hemisfério ocidental (BARRETT; MONATH, 2003; BRASIL, 2004).

É sugerido também que os primeiros casos de febre amarela no ocidente ocorreram em São Domingo, República Dominicana, no ano de 1498. Em seguida, epidemias do YFV foram relatadas entre 1647 e 1649 em Barbados, Cuba e México (BARRETT; MONATH, 2003). No que se refere às primeiras epidemias detalhadas do YFV no continente americano, manuscritos maias descrevem um surto da doença no ano de 1648 em Iucatã, México (CARTER, 1931; CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2018).

Em 1700, o YFV alcança o continente europeu, causando uma das primeiras epidemias em 1730 na cidade de Cádiz, sul da Espanha, com cerca de 2.200 mortes, e em seguida levando a vários surtos no litoral francês e britânico (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2018). Entre os séculos XVII e XX, diversos surtos de febre

amarela ocorreram na Europa, nos territórios da Itália, Espanha, França e Inglaterra (TOMLINSON; HODGSON, 2005).

Nesse mesmo período, também foram reportados os primeiros surtos de febre amarela na América do Norte, precisamente em Nova Iorque (1668), Boston (1691) e Charleston (1699), além de epidemias na costa da América do Sul, nas ilhas do Caribe (Cuba), República Dominicana e Porto Rico. De 1620 a 1900, apenas no território do Caribe, foram descritas cerca de 83 epidemias; e entre 1762 até o início do século XXI, vários relatos de infecções por YFV também foram feitos em Havana (Cuba). Adiante, de 1839 a 1860, surtos anuais ocorreram em Nova Orleans, levando a mais de 26 mil casos de febre amarela. Em 1898, na guerra hispano-americana, em Cuba, acredita-se que a febre amarela tenha dizimado mais soldados dos EUA do que o próprio confronto armado (BRASIL, 2004; CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2018).

No Brasil, o primeiro relato de infecção por YFV ocorreu em Pernambuco, no ano de 1685, onde o vírus permaneceu por dez anos consecutivos. No ano seguinte, 1686, a febre amarela foi detectada na Bahia, com 25.000 casos de infecção e 900 óbitos (BRASIL, 2004).

Após aproximadamente 164 anos de silenciamento epidemiológico, a febre amarela voltou a aparecer no Brasil no ano de 1849 em Salvador, causando 2.800 mortes. Nesse mesmo ano, o YFV causou mais de 9.600 infecções e um total de 4.160 óbitos no estado do Rio de Janeiro. Nos anos seguintes, 1850 a 1899, casos de febre amarela começaram a ser descritos em praticamente todo o território nacional, do Amazonas ao Rio Grande do Sul (BRASIL, 2004).

Interessantemente, em grande parte desses surtos e epidemias, o comportamento do YFV como uma arbovirose ainda era desconhecido, sendo até então imaginado que a transmissão do vírus acontecesse via contato direto ou através de objetos contaminados. A transmissão do YFV através de inseto vetor só começou a ser sugerida em 1848 pelo médico americano Josiah Clark Nott, sendo em seguida defendida pelas observações do médico francês Louis Beaupérthuy em 1858 e pelo médico cubano Carlos Finlay em 1881 (BRASIL, 2004).

No entanto, foi apenas em 1900/1901 que Walter Reed e colaboradores demonstraram experimentalmente a transmissão do YFV por *Ae. aegypti*. Com a descoberta do *Ae. aegypti* como vetor foram iniciadas as campanhas para o controle ou erradicação do mosquito que resultaram na ausência de casos de febre amarela em alguns centros urbanos, como Havana, Santos e Rio de Janeiro (MAHY; REGENMORTELL, 2009)

Em 1958, o certificado de erradicação do *Ae. aegypti* foi outorgado ao Brasil e

em menos de dez anos, em 1967, foi confirmada a reintrodução do *Ae. aegypti* no país. O vetor então voltou a ser eliminado em 1973 e em 1976 foi de novo introduzido, permanecendo até o momento (BRAGA; VALLE, 2007; COUTO-LIMA et al., 2017).

A primeira vacina contra o YFV foi desenvolvida em 1937, por Theiler e Smith, nos laboratórios da Fundação Rockefeller (THEILER; SMITH, 1937a, 1937b). A cepa vacinal correspondia a um vírus atenuado empiricamente e que em 1937 passou a ser produzida e fornecida no Brasil pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Desde então, a vacina passou a ser distribuída em áreas endêmicas de forma sistemática a fim de controlar as infecções por YFV (BRASIL, 2014).

Até o momento, o último registro de febre amarela urbana no Brasil aconteceu em 1942, na cidade de Sena Madureira (Acre), 12 anos após a última descrição da doença urbana em Pernambuco (1930). No continente americano, os últimos casos urbanos de febre amarela ocorreram em 1954, em Trinidad (BRASIL, 2004).

De 2000 até 2012, no Brasil, foram confirmados 326 casos de febre amarela silvestre e 156 óbitos, com o maior número deles acontecendo em Minas Gerais (101 casos, 41 óbitos), Goiás (77 casos, 39 óbitos) e São Paulo (32 casos, 15 óbitos) (Tabela 1) (CAVALCANTE; TAUIL, 2016). Um outro estudo, realizado entre 2000 e 2010, reafirmou o quantitativo de casos em São Paulo, com 32 registros durante três surtos de febre amarela silvestre autóctones no intervalo da investigação (SAAD; BARATA, 2016).

Tabela 1 - Casos confirmados, óbitos e taxas de letalidade por febre amarela de transmissão silvestre no Brasil entre 2000 e 2012

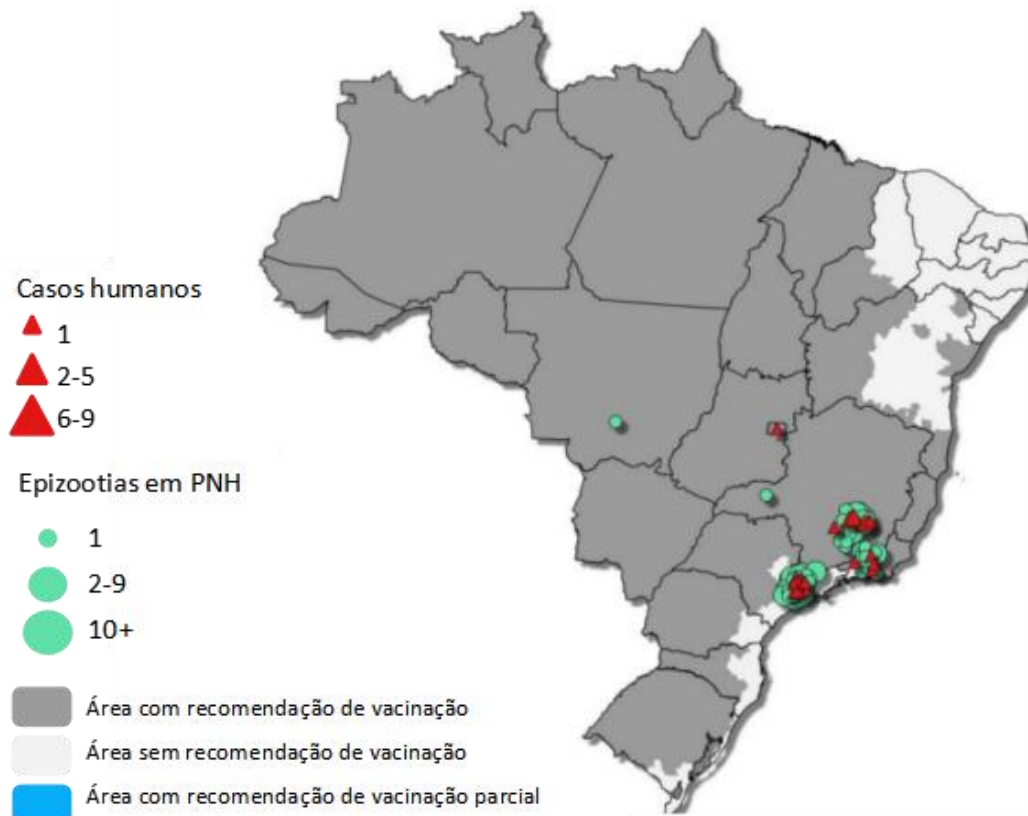
Unidade da Federação	Nº de casos confirmados	Nº de óbitos	Taxa de letalidade (%)
Minas Gerais	101	41	40,6
Goiás	77	39	50,6
São Paulo	32	15	46,9
Rio Grande do Sul	21	9	42,9
Mato Grosso	20	11	55,0
Amazonas	18	11	61,1
Pará	14	8	57,1
Bahia	10	3	30,0
Mato Grosso do Sul	10	3	30,0
Distrito Federal	8	6	75,0
Tocantins	6	4	66,7
Roraima	5	4	80,0
Paraná	2	1	50,0
Acre	1	–	–
Rondônia	1	1	100,0
Total	326	156	47,8

Fonte: Cavalcante e Tauil (2016)

Em 2017, os últimos surtos de febre amarela foram reportados em Suriname (março), na Guiana Francesa (agosto), Brasil (novembro) e Nigéria (dezembro). Nesse último, foram descritos 341 casos suspeitos, com 65,9% atingindo jovens de até 20 anos. Ao total, foram 45 mortes (entre casos suspeitos e confirmados) e em nove delas a associação com a infecção por YFV foi ratificada (MONATH; VASCONCELOS, 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018b).

Em relação ao Brasil, entre julho de 2017 até janeiro de 2018, foram notificados 470 casos de febre amarela, sendo 290 descartados, 145 ainda em investigação e 35 confirmados. Dentre os casos confirmados, 20 ocorreram em São Paulo, 11 em Minas Gerais, três no Rio de Janeiro e um no Distrito Federal. No mesmo período, foram reportados ao todo 20 óbitos decorrentes da doença, sendo 11 em São Paulo, sete em Minas Gerais, um no Rio de Janeiro e um no Distrito Federal, além de 411 epizootias confirmadas (Figura 21) (BRASIL, 2018). O último surto de YFV foi reportado em 27 de fevereiro de 2018 no Brasil (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018b).

Figura 21 - Casos de infecção em humanos e primatas não humanos entre julho de 2017 até 14 de janeiro de 2018, Brasil



Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (BRASIL, 2018)

Legenda: PNH - primatas não humanos.

Atualmente, o YFV é endêmico em áreas da América do Sul e África. Essa mais recente situação epidemiológica retrata as áreas de vacinação recomendadas pelo CDC: grande parte do território da América do Sul e região central da África (Figura 22 e 23) (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2017a). Entre elas, a América do Sul tem o menor quantitativo de casos, o que é explicado em parte pela melhor implementação de campanhas de imunização em resposta à identificação de surtos da doença. Por outro lado, fatores como o deslocamento de indivíduos suscetíveis a regiões florestais onde há circulação do YFV e a crescente urbanização da doença ajudam a explicar a periodicidade desses surtos em grande parte da América do Sul (BARNETT, 2007).

Figura 22 - Áreas da África recomendadas para vacinação contra febre amarela



Fonte: Adaptado de Centros de Controle e Prevenção de Doenças (2017)

Nota: Recomendações atualizadas em janeiro de 2017

Figura 23 - Áreas da América recomendadas para vacinação contra febre amarela

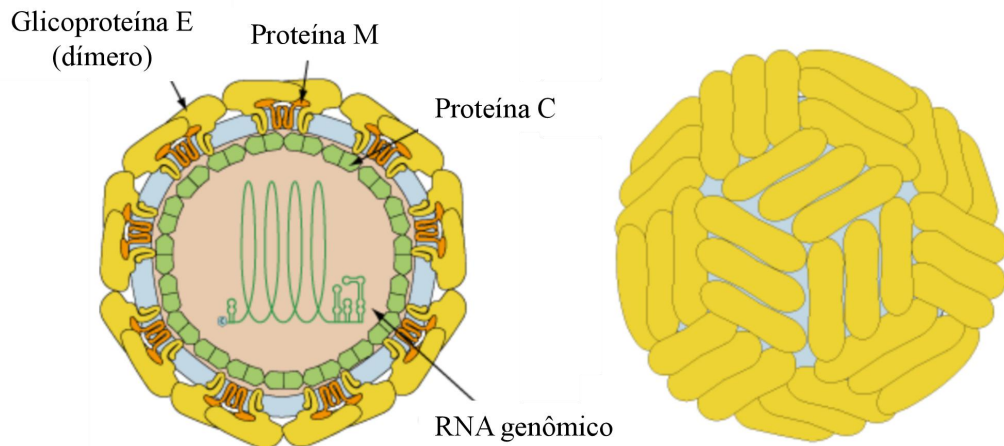
Fonte: Adaptado de Centros de Controle e Prevenção de Doenças (2017)

Nota: Recomendações atualizadas em janeiro de 2017

2.2.2 Virologia molecular e replicação dos flavivírus

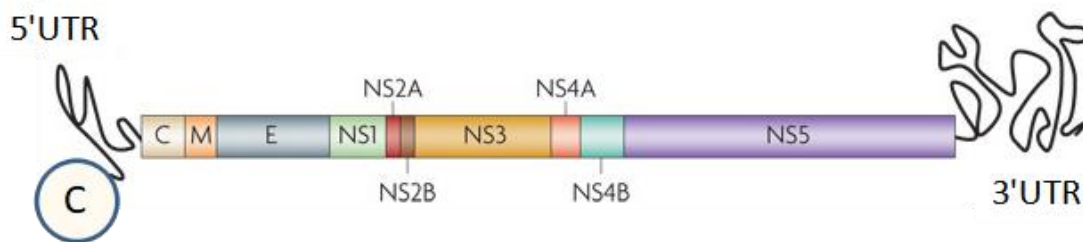
O gênero *Flavivirus* é o mais numeroso da família *Flaviviridae*, possuindo 53 espécies, com algumas apresentando grande importância médica, sobretudo em territórios tropicais e subtropicais, como YFV, DENV, ZIKV, WNV, vírus da encefalite de São Luis (*Saint Louis encephalitis virus*, SLEV) e o vírus da encefalite transmitida por carrapato (*Tick-borne encephalitis virus*, TBEV). Na mesma família, também são encontrados os gêneros *Hepacivirus* (14 espécies), *Pegivirus* (11 espécies) e *Pestivirus* (4 espécies) (*INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES*, 2016).

As partículas dos flavivírus são envelopadas, de diâmetro entre 40-60nm, possuem capsídeo de simetria icosaédrica e genoma de RNA de fita simples, senso positivo, de aproximadamente 11kb, com cap na extremidade 5' e ausência de cauda poli-A na 3' (Figura 24 e 25). O genoma viral possui apenas uma ORF que codifica uma poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos, a qual é clivada por proteases virais e do hospedeiro, resultando em três proteínas estruturais maduras [proteína do capsídeo (C), membrana (M) e do envelope (E)] e sete proteínas não estruturais (*Nonstructural proteins*, NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 25) (KAUFMANNA; ROSSMANN, 2011; LINDENBACH et al., 2013).

Figura 24 - Representação esquemática da estrutura dos flavivírus

Fonte: Adaptado de ViralZone (2016)

Nota: Os flavivírus são vírus envelopados, de simetria icosaédrica, com genoma de RNA fita simples, polaridade positiva, com cap em 5' e ausência de cauda poli-A na extremidade 3'. Estruturalmente, o vírion maduro é formado pelo RNA viral e pelas proteínas estruturais do envelope (E), capsídeo (C) e membrana (M).

Figura 25 - Organização do genoma dos flavivírus

Fonte: Adaptado de Guzman et al. (2010)

Nota: O genoma dos flavivírus compreende um RNA fita simples, polaridade positiva, com cap (©) em 5' e ausência de cauda poli-A na extremidade 3', ambos ladeados por uma região não traduzida (*Untranslated regions*, UTR). O genoma viral apresenta apenas uma matriz de leitura que codifica para uma poliproteína, que durante a maturação viral é clivada e processada em três proteínas estruturais [proteína do capsídeo (C), pré-membrana (prM) e do envelope (E)] e sete proteínas não estruturais (*Nonstructural proteins*, NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B E NS5). A porção estrutural é responsável por aproximadamente 1/3 do genoma viral e os 2/3 restantes pela sequência das proteínas não estruturais.

A proteína C é uma proteína básica que possui aproximadamente 11kDa. Além de compor o capsídeo do vírion, a proteína contém uma região hidrofóbica C-terminal que atua como peptídeo de sinalização para translocação da prM para o retículo endoplasmático. A proteína C madura se dobra em um dímero compacto, com cada monômero contendo quatro α -hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) conectadas por pequenos *loops*. A α -hélice mais longa, anfipática, está localizada na região C terminal, enquanto o N terminal não é estruturado e pode ser removido sem afetar a integridade da proteína (JONES et al., 2003; LINDENBACH et al., 2013).

A proteína precursora de membrana (prM), de aproximadamente 26kDa, é uma

glicoproteína que possui duas hélices transmembranares. Antes da maturação da partícula viral, na qual a prM é clivada gerando o peptídeo pr e a proteína M, a prM pode atuar como uma chaperona para a formação da proteína E. Em adição, a prM evita o rearranjo da proteína E e a fusão precoce do vírus com as membranas celulares durante a via de secreção (LINDENBACH et al., 2013; LORENZ et al., 2002).

A proteína E, com aproximadamente 53kDa, é a maior proteína de superfície dos flavivírus e apresenta três domínios em sua conformação: o domínio I, (domínio central), que é flanqueado pelos domínios II e III, os quais apresentam, respectivamente, o peptídeo de fusão e o sítio de ligação ao receptor. Entre os flavivírus, há uma semelhança de 40% nos aminoácidos das proteínas E (LORENZ et al., 2002; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

Dentre as proteínas não estruturais, a NS1, de aproximadamente 46kDa, é uma das que atua mais precocemente no ciclo de replicação viral. A forma solúvel dessa proteína é formada de partículas lipoproteicas hexaméricas com aproximadamente 10nm que estão presente em níveis elevados no soro e em tecidos humanos e pode ser utilizada para o diagnóstico da infecção por flavivírus em estágio inicial. Além disso, a NS1 também tem função de evasão da resposta imune do hospedeiro (LINDENBACH et al., 2013).

A NS2A é uma pequena proteína transmembrana, hidrofóbica, com aproximadamente 22kDa, que atua no complexo de replicação e na montagem/secreção das partículas virais (KÜMMERER; RICE, 2002; LEUNG et al., 2008; LIU et al., 2004). A proteína NS2B possui aproximadamente 14kDa, é hidrofóbica e atua como cofator para a NS3, além de ser um fator essencial para a atividade proteolítica da NS2B-NS3 (LINDENBACH et al., 2013). Diferente das demais proteínas citadas, a NS3 é uma proteína grande, de aproximadamente 70kD, com dois domínios funcionais, a saber, protease na região N terminal e helicase na região C terminal, atuando na replicação do RNA e maturação das proteínas virais (LE BRETON et al., 2011; LINDENBACH et al., 2013).

As NS4A e NS4B são proteínas pequenas com 16kDa e 27 kDa, respectivamente. A NS4A age na replicação do genoma através da interação com a NS1 e complexo de replicação. A NS4B, por sua vez, é uma proteína que interage com NS3, participando da replicação do genoma. A proteína NS5 tem aproximadamente 103kDa e é formada por dois domínios distintos, o domínio N-terminal, com atividade metiltransferase/RNA *capping*, e o C-terminal, que apresenta a atividade de RNA polimerase RNA dependente (LE BRETON et al., 2011; LINDENBACH et al., 2013).

Além da participação na replicação do genoma do vírus e na montagem da

partícula viral, as proteínas não estruturais atuam também na evasão da resposta imune através da inibição da via de indução ou sinalização do IFN. Em DENV, por exemplo, as proteínas NS2A e NS3 podem degradar moléculas de sinalização celular, inibindo a indução de IFN-I. As proteínas virais NS2A, NS4A, NS4B e NS5 podem inibir a via de sinalização IFN-I ao bloquear a fosforilação das moléculas de sinalização e transdução de sinal 1 e 2 (*Signal transducer and activator of transcription 1 and 2*, STAT-1 e STAT-2); a NS5 pode participar também da degradação de STAT-2 via proteassoma celular (CASTILLO; URCUQUI-INCHIMA, 2015).

A figura 26 resume o ciclo de replicação dos flavivírus. Inicialmente, o vírus adsorve à célula hospedeira através da interação da glicoproteína E com os receptores celulares. Para YFV, têm-se sugerido os receptores de sulfato de heparana (GERMI et al., 2002), os receptores de imunoglobulina de células T e proteína de domínio de mucina 1 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain protein 1*, TIM-1) e os receptores da família tirosina quinase (TYRO3, AXL e MER, TAM) (MEERTENS et al., 2012). Para DENV, diversos receptores têm sido apontados, como o sulfato de heparana (CHEN, 1997), molécula de adesão das células dendríticas (*adhesion molecule of dendritic cells*, DC-SIGN) (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003) e receptor de manose dos macrófagos (MILLER et al., 2008), além da possibilidade de uso também de receptores TIM e TAM (MEERTENS et al., 2012).

Após a adesão do vírus a receptores celulares específicos, a partícula viral é endocitada em uma vesícula recoberta por clatrina. No ambiente ácido do endossomo, a proteína E trimeriza, expõe seu peptídeo de fusão e liga-se à face interna da membrana endossomal. Nesse momento, o capsídeo viral é liberado e desnudo no citoplasma, liberando o RNAv. Por apresentar orientação 5'-3', o RNAv é encaminhado diretamente aos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso, sendo traduzido em um mecanismo cap-dependente iniciado a partir do primeiro códon de metionina (AUG) após a 5'UTR (KAUFMANN; ROSSMANN, 2011).

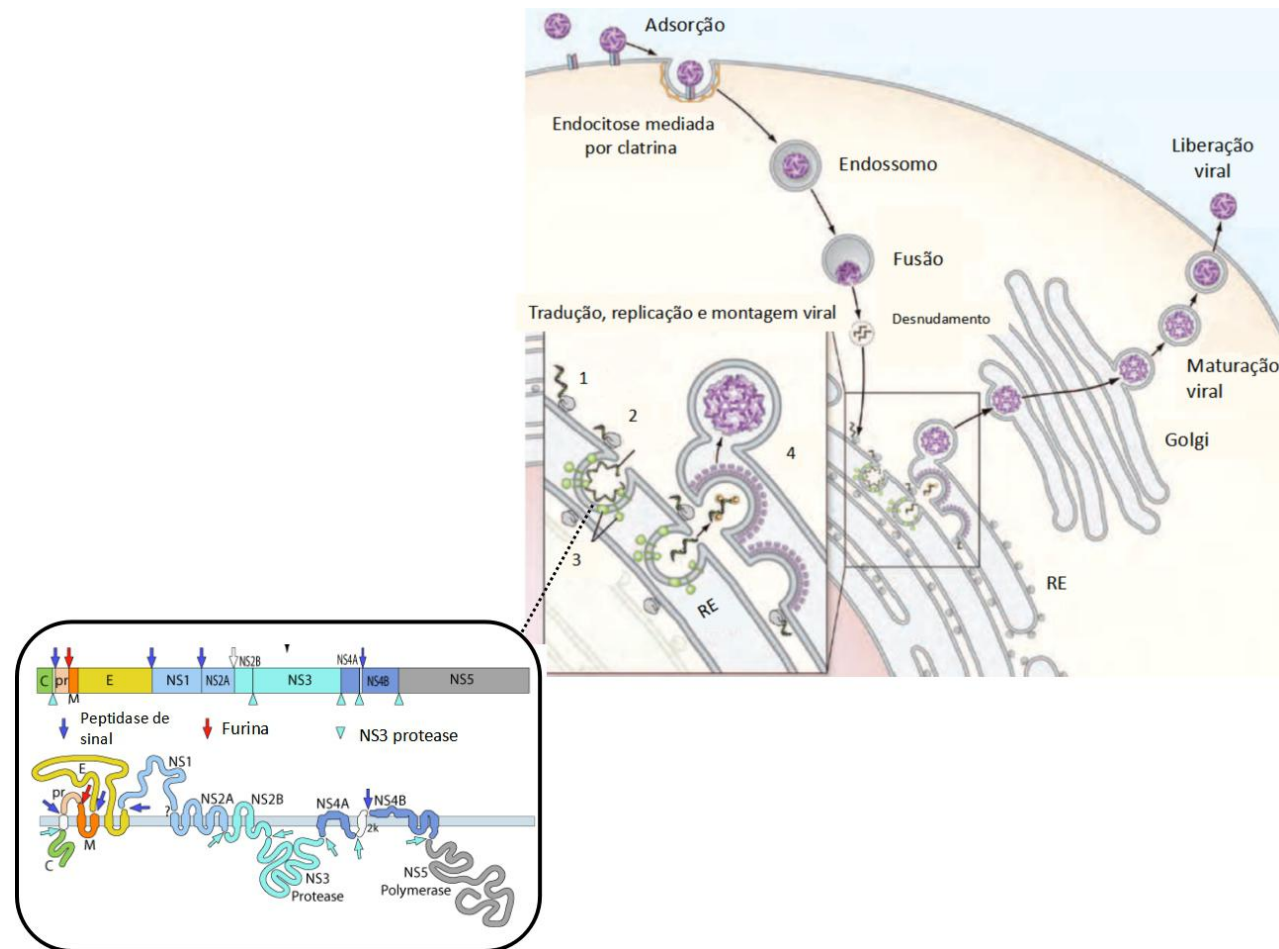
O RNAv é então traduzido em uma poliproteína que é posteriormente clivada por proteases da célula hospedeira e virais, originando as proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, envolvidas na replicação do RNAv e evasão da resposta imune do hospedeiro, e as proteínas C, M e E, participantes da montagem e arquitetura do vírus (KAUFMANN; ROSSMANN, 2011).

Em seguida à tradução das proteínas virais, inicia-se a replicação do RNAv, também associado à membrana do retículo endoplasmático celular. À semelhança de vírus de RNA senso positivo, como os alfavírus apresentados anteriormente, a replicação do RNA

genômico dos flavivírus é mediada pela formação temporária de uma RNA de orientação negativa (3'-5'), que serve como matriz para a formação de mais RNA genômico viral. Essa replicação de RNA_v, realizada pelo complexo de replicação formado pelas proteínas virais NS3 e NS5 mais fatores do hospedeiro, é assimétrica e a síntese de RNA positivo excede a produção de RNA negativo (KAUFMANN; ROSSMANN, 2011; LINDENBACH et al., 2013).

O RNA_v recém-formado pode ser redirecionado à maquinaria de tradução para a síntese de mais proteínas virais ou para a formação das novas partículas víricas. Nesse último caso, ainda no retículo endoplasmático, as proteínas do capsídeo se unem ao RNA_v sintetizado, formando então o nucleocapsídeo, posteriormente envelopado a partir da membrana do retículo endoplasmático. No envelope, estão contidos os heterodímeros compostos pelas proteínas E e a proteína prM. Ao chegarem no complexo de Golgi, a prM é clivada via furina, originando a proteína madura de membrana (proteína M), o heterodímero prM-E é desfeito e a proteína E é organizada em homodímeros presentes no envelope viral (Figura 25). Ao final do ciclo, o vírus maduro segue a via secretória celular, sendo então liberado por exocitose (LINDENBACH et al., 2013).

Figura 26 - Ciclo de replicação dos flavivírus



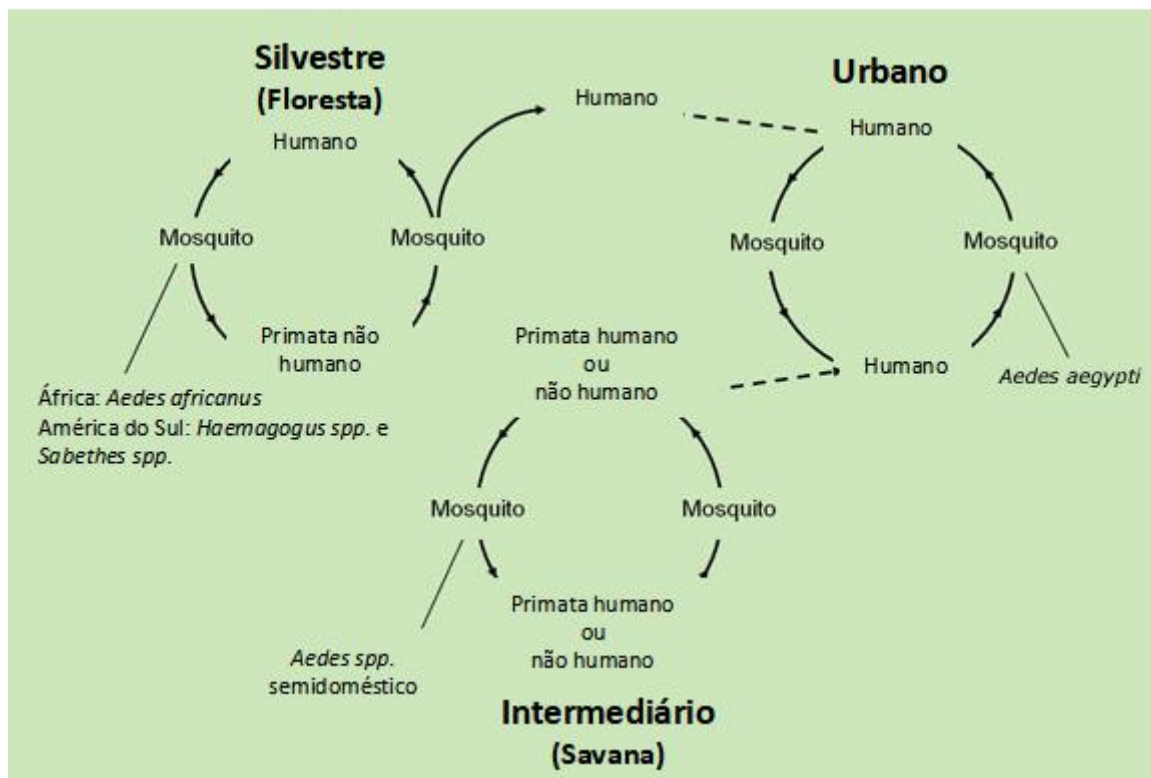
Fonte: Adaptado de Pierson e Diamond (2013) e ViralZone (2016)

Nota: Após a adsorção do flavivírus à célula hospedeira, a partícula é internalizada por endocitose mediada por clatrina. No ambiente ácido do endossomo, a proteína do envelope trimeriza, expõe o peptídeo de fusão e se liga à região interna da membrana endossomal. O capsídeo viral é liberado, desnudo e o RNA viral (RNAv) é liberado no citoplasma. No ribossomo, o RNAv é traduzido na poliproteína viral, sendo adiante clivada nas proteínas estruturais e não estruturais por proteases virais e do hospedeiro (1-3). O RNAv é replicado por proteínas não estruturais e então encapsulado pelas proteínas estruturais amadurecidas durante a migração do vírus do retículo endoplasmático (4) ao completo de Golgi. Ao final, o vírus é liberado seguindo a via secretória da célula infectada. RE: retículo endoplasmático

2.2.3 Transmissão

O YFV é responsável por causar infecções nas áreas tropicais da América e África, em humanos e primatas não humanos. Nesses continentes, a transmissão do vírus pode acontecer em três ciclos: o ciclo silvestre, o ciclo rural ou intermediário e o ciclo urbano (Figura 27) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

Figura 27 - Ciclos de transmissão do vírus da febre amarela



Fonte: Adaptado de Centros de Controle e Prevenção de Doenças (2015)

O ciclo silvestre envolve a transmissão do YFV entre mosquitos selvagens e primatas não humanos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014). Na África, esse ciclo é mantido pelo *Ae. africanus*, *Ae. neoafricanus*, *Ae. opok* e *Ae. pseudoafricanus*, enquanto que no sul da América, os vetores incriminados pertencem ao gênero *Haemagogus* (*Hg. janthinomys*, *Hg. albomaculatus*, *Hg. Leucocelaenus*) e *Sabethes* (*Sa. chloropterus*, *Sa. glaucodaemon*, *Sa. soperi* e *Sa. cyaneus*). Nesse ciclo, o humano é hospedeiro acidental, sendo infectado ao entrar em áreas com circulação do vírus (CARDOSO et al., 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

O ciclo rural ou intermediário ocorre em áreas de transição entre florestas e

ambiente urbano, como aldeias rurais da savana africana e limites florestais, onde espécies do gênero *Aedes*, como o *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer*, *Ae. taylori* e *Ae. bromeliae* são abundantes. Nesse ciclo, também estão envolvidos o *Ae. aegypti* e vetores silvestres ativos em ambiente doméstico e peridoméstico, como o *Ae. vittatus* e *Ae. keniensis*, que migram dos vilarejos para florestas e eventualmente podem entrar em contato com humanos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014). Os indivíduos infectados no ciclo rural são os principais focos para circulação urbana do YFV. Nas últimas décadas, o ciclo intermediário tem sido o mais comum no continente africano (GARDNER; RYMAN, 2010).

A despeito de todas essas possíveis áreas de infecção por YFV, o ciclo urbano é a principal preocupação em relação aos ambientes de transmissão do vírus. No ciclo urbano, os seres humanos são os principais hospedeiros e o mosquito responsável pela transmissão é o *Ae. aegypti*; de maneira que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), qualquer situação de transmissão de YFV que venha a ter como vetor o *Ae. aegypti* é considerada uma transmissão urbana. O ciclo urbano tem início com o vírus sendo introduzido em áreas com alta densidade populacional humana e com circulação de mosquitos competentes para YFV capazes de mediar a transmissão humano-humano (GARDNER; RYMAN, 2010).

A transmissão urbana ocorre quando, durante o repasto sanguíneo, um inseto competente entra em contato com um humano infectado; estando esse com um a dois dias antes do aparecimento dos sintomas até o terceiro a quinto dia sintomático. No vetor, o vírus infecta as células epiteliais do intestino, de onde é liberado para a hemolinfa e outros tecidos, principalmente o trato reprodutor e glândulas salivares. Após um período de incubação extrínseco de sete a dez dias, o vetor torna-se apto a transmitir o vírus durante toda sua vida, dando continuidade ao ciclo de transmissão. A infecção do trato reprodutor do mosquito também permite a transmissão vertical do vírus e os insetos machos congenitamente infectados podem transmitir horizontalmente o vírus às fêmeas através da cópula (CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU, 2018).

De maneira atípica, em indivíduos vacinados, a cepa YFV-17DD mostrou ser capaz de ser transmitida através da amamentação e transfusão sanguínea (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2010a, 2010b; CHEN et al., 2010). Além disso, RNA de YFV tem sido detectado em urina e sêmen de indivíduos convalescentes, embora a transmissão sexual do vírus ainda não tenha sido reportada (BARBOSA et al., 2018).

2.2.4 Sinais e sintomas clínicos

A febre amarela se apresenta como uma típica virose hemorrágica, compartilhando sinais e sintomas clínicos com outras infecções virais também caracterizadas por quadros hemorrágicos, como febre hemorrágica da dengue, a febre de lassa e febre hemorrágica da Crimeia-Congo (GARDNER; RYMAN, 2010). As infecções por YFV também apresentam um extenso espectro clínico, indo desde uma infecção subclínica, passando por uma auto-resoluta até o quadro severo da doença, com comprometimento sistêmico, levando a icterícia, hemorragia e insuficiência renal (BARNETT, 2007).

Nas infecções sintomáticas, o início do quadro clínico pode ser leve, com presença de febre e dor de cabeça e os pacientes se recuperando em poucos dias e sem sequelas duradouras. Nos casos mais graves, o indivíduo pode apresentar além de febre e dor de cabeça, calafrios, mal-estar, dor nas costas, mialgia generalizada, náuseas e tonturas, muitas vezes acompanhados de um aumento da temperatura com simultânea diminuição do pulso (sinal de Faget). Essa fase é frequentemente seguida por um "período de remissão", que pode durar de um a dois dias, com diminuição das manifestações clínicas, incluindo redução da febre. Nesse momento, grande parte das infecções se resolvem e esses pacientes se recuperam sem desenvolver icterícia (BARNETT, 2007; VASCONCELOS, 2003).

No entanto, em aproximadamente 15-25% dos pacientes, a doença reaparece de forma mais severa, caracterizando o chamado "período de intoxicação", com o vírus deixando de ser encontrado no sangue e passando a ser achado no fígado, baço, coração, linfonodos e outros órgãos (BARRETT; STANBERRY, 2008; VASCONCELOS, 2003). Nessa fase, o quadro clínico é marcado por febre alta, dor epigástrica, prostração, desidratação, icterícia, insuficiência renal e uma diátese hemorrágica estimulada por uma coagulopatia de origem hepática e que inclui petéquias, equimoses, epistaxis e hemorragia gastrointestinal com hematêmese. Em fase mais tardia da infecção também podem ser observadas manifestações do sistema nervoso central, como confusão, convulsão e coma (BARRETT; STANBERRY, 2008).

Por fim, 20-50% dos pacientes com comprometimento do fígado e renal vêm a óbito, geralmente precedido por alterações como hipotensão, delírio, acidose metabólica, hipercalemia, hipoglicemia e hipotermia (MONATH, 2008).

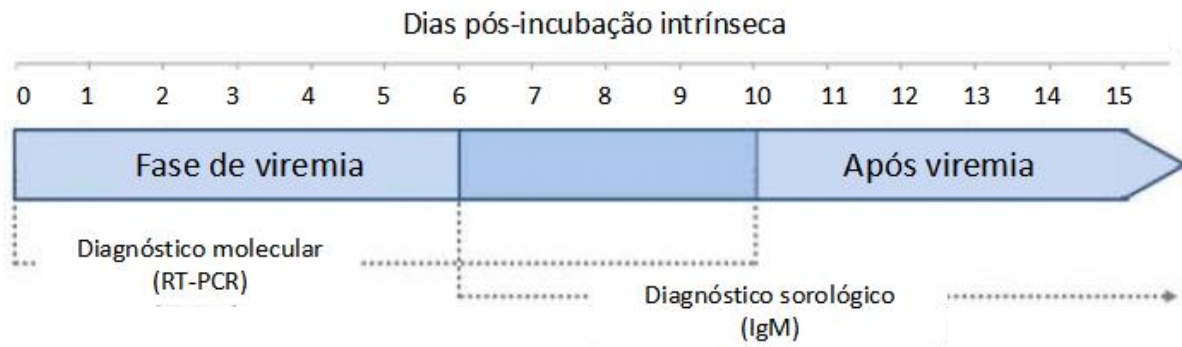
2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico em caso de suspeita de febre amarela baseia-se, inicialmente, em abordagem clínico-epidemiológica com uma avaliação sindrômica das características clínicas do paciente e um estudo sobre o histórico de estadia ou viagens para áreas endêmicas para YFV (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018).

Em caso de epidemia, o aumento do número de casos facilita a associação dos sinais e sintomas clínicos à febre amarela. No entanto, em caso de suspeita de infecção por YFV fora do período epidêmico deve-se realizar o diagnóstico diferencial com outras doenças de origem infecciosa ou não. Em relação ao diagnóstico diferencial com doenças infecciosas, deve ser considerada a possibilidade de infecção por malária, hepatites virais, febre tifoide, dengue hemorrágica e septicemias. Para as enfermidades não infecciosas, a púrpura trombocitopênica idiopática e algumas formas de envenenamento capazes de levar a hemorragias, como a picada de cobras peçonhentas, também devem ser analisadas (BRASIL, 2004).

Como auxílio ao diagnóstico clínico, testes laboratoriais de rotina podem reforçar a suspeita de infecção por YFV. Nos primeiros dias da doença, podem ocorrer leucopenia, com neutropenia e linfocitose, que na ausência de outros agentes infecciosos tende a se agravar durante o curso da doença. A série vermelha comumente se encontra normal, excetuando nos quadros de sangramento, em que se observa uma diminuição do hematócrito e hemoglobina. Os fatores de coagulação, principalmente a protrombina, o fator VIII e a tromboplastina, também se apresentam com dosagem alterada e exames de urina são marcados por uma elevada proteinúria (VASCONCELOS, 2003).

Embora a suspeita clínica somada à epidemiologia e as alterações nos exames laboratoriais de rotina sejam sugestivos da infecção e necessários para o avanço da investigação, testes laboratoriais específicos são imperativos para o fechamento do diagnóstico e identificação do agente etiológico. Durante a fase virêmica da infecção, pode ser realizado o diagnóstico molecular para detecção do RNA_v, por RT-PCR ou qRT-PCR, em amostras de soro coletadas principalmente durante os primeiros dez dias a partir do início dos sintomas (Figura 28) (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018). Alternativamente, tem-se sugerido a detecção de RNA de YFV em amostras de sêmen e urina, com relatos de positividade na fase convalescente da doença (BARBOSA et al., 2018).

Figura 28 - Indicação de testes de diagnóstico para febre amarela de acordo com os dias de sintoma

Fonte: Adaptado de Organização Pan-Americana da Saúde (2018).

Para a diagnóstico direto, também pode ser feito o isolamento viral, recomendado principalmente em estudos complementares à vigilância da saúde pública, através da inoculação da amostra suspeita no cérebro de camundongos recém-nascidos ou em cultivo celular, como de células Vero ou C6/36 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018). Em caso de óbito, a técnica “ouro” para o diagnóstico é a análise histopatológica mediante reação de imuno-histoquímica em cortes de fígado ou outros tecidos potencialmente infectados (BRASIL, 2004).

Em relação à sorologia, o diagnóstico de fase aguda pode ser feito pela detecção de IgM anti-YFV em ensaios de captura de IgM (*IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay*, MAC ELISA). No entanto, frequentemente os testes de IgM anti-YFV apresentam reação cruzada com outros flavivírus, o que é particularmente importante em áreas de cocirculação desses vírus, sobretudo de DENV e ZIKV. Nesse contexto, ensaios de neutralização e redução de placa (*Plaque reduction neutralization test*, PRNT) oferecem maior especificidade e podem ser usados, embora reação cruzada entre flavivírus também tenha sido detectada nessa plataforma (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018). Como alternativa para tentar diminuir as reações cruzadas nos ensaios para YFV, ensaios de *multiplex* baseados em nanopartículas de prata foram recentemente sugeridos para diagnóstico diferencial de YFV, DENV e vírus Ebola (*Ebola virus*, EBOV) (YEN et al., 2015).

2.2.6 Tratamento

À semelhança dos outros arbovírus discutidos neste trabalho, ainda não há um

fármaco licenciado anti-YFV. Dessa forma, a terapia é de suporte, baseando-se na administração de medicamentos para alívio dos sintomas, como antitérmicos, analgésicos, além da reposição de fluidos. Medicamentos anti-inflamatórios não esteróides (como ibuprofeno e naproxeno) devem ser evitados devido a chance de aumento do risco de sangramento (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2015).

Dentre as drogas ainda em experimentação para tratamento da febre amarela, estão os compostos com ação direta sobre proteínas estruturais e não estruturais do vírus e candidatos com função modeladora da resposta imune do hospedeiro (FIORAVANTI et al., 2017; GUO et al., 2016; JULANDER et al., 2010; LEYSSEN et al., 2005; LEYSSEN; DE CLERCQ; NEYTS, 2006; MASTRANGELO et al., 2012; MAYHOUB et al., 2011; SBRANA et al., 2004).

Uma série de análogos de terceira geração de 4-di(bromometil)-2-(4-clorofenil) tiazol-5-carboxilato tem sido avaliada quanto sua capacidade de ligação à glicoproteína E do YFV e a consequente inibição da adsorção e infecção viral. Um desses compostos, o 1-(4-di(bromometil)-2-(4-clorofenil) tiazol-5-il) etanona foi consideravelmente não citotóxico e inibiu em 99,6% a infecção do vírus em células BHK-21 (MAYHOUB et al., 2011).

Uma outra droga, a ivermectina, já licenciada para o combate a helmintos, demonstrou ação na proteína NS3 do YFV e inibiu em 100%, nas concentrações acima de 3nM, durante seis dias, o ECP do vírus em células Vero-B. Em adição, o composto também inibiu, ainda que em menor quantidade, a replicação do DENV, do JEV e do TBEV (MASTRANGELO et al., 2012).

Em hamster, o uso de ribavirina durante os primeiros cinco dias após a infecção por YFV reduziu o dano no fígado e baço, preveniu a esteatose hepatocelular e normalizou os níveis de alanina aminotransferase (SBRANA et al., 2004). A ribavirina também levou a uma inibição da replicação do YFV em células Vero, provavelmente diminuindo a quantidade de GTP intracelular mediante a inibição da enzima inosina monofosfato desidrogenase (*inosine monophosphate dehydrogenase*, IMPDH) (LEYSSEN et al., 2005; LEYSSEN; DE CLERCQ; NEYTS, 2006). No entanto, quando avaliado em macaco rhesus infectados com YFV, o uso de ribavirina não resultou em melhora de sobrevivência (HUGGINS, 1989). Outros candidatos, como os baseados em pirazolina, principalmente os 1,3,5-trifenila-pirazolinas 6a e 6b, inibiram o YFV quando administrados antes ou durante a infecção em células BHK-21 (FIORAVANTI et al., 2017).

Um ácido acético benzodiazepina (*benzodiazepine acetic acid*, BDAA) reduziu a infecção de YFV *in vitro* e *in vivo* ao agir sobre a proteína NS4B. Em células Vero e na

linhagem de célula hepática Huh-7.5 (células de hepatoma humano), o tratamento com BDAA reduziu a produção de partícula viral em mais de 2 logs. Em hamster, a administração oral de BDAA protegeu 90% dos animais da morte, reduziu significativamente a carga viral em mais de 2 logs e atenuou a lesão hepática e a perda de peso decorrentes da infecção (GUO et al., 2016).

O composto 2'-C-metilcitidina apresentou efeito anti-YFV quando avaliado em cultivo celular e em hamster. Em células Vero, o composto inibiu a replicação do YFV mesmo quando adicionado 16 horas após a infecção. *In vivo*, ao ser administrado quatro horas antes do desafio, aumentou significativamente a sobrevivência do animal, além de diminuir o título do vírus no fígado e melhorar os níveis de alanina aminotransferase (JULANDER et al., 2010)

2.2.7 Vacinas

O protótipo vacinal da febre amarela, o YFV-17D, foi desenvolvido após a atenuação empírica da cepa YFV Asibi, isolada em 1927 a partir da inoculação do sangue do paciente Asibi em macacos rhesus (STOKES; BAUER; HUDSON, 1928).

Em 1935, o YFV Asibi foi adaptado ao crescimento em tecido embrionário de camundongo e após 17 passagens o vírus foi renomeado para YFV-17D, sendo em seguida cultivado até a passagem de número 58 em tecido embrionário de galinha e depois até a passagem 114 em tecido embrionário desnervado de galinha (GALLER et al., 1997; LLOYD; THEILER; RICCI, 1936; THEILER; SMITH, 1937a). Nesse momento, Theiler e Smith (1937a) demonstraram uma redução considerável do viscerotro- e neurotropismo do vírus quando inoculado intracerebralmente em macacos. Esse vírus foi ainda subcultivado até as passagens 227 e 229 e então utilizado para imunizar oito voluntários, os quais soroconverteram em duas semanas e não apresentaram reações adversas (THEILER; SMITH, 1937b). Desse momento em diante, a imunização anti-YFV passou a ser realizada no Brasil (GALLER et al., 1997). Acredita-se que a redução do neuro- e viscerotropismo da cepa vacinal tenha sido decorrente da substituição de 32 aminoácidos e seis nucleotídeos na região 3'UTR do RNA_v do YFV (HAHN et al., 1987).

Atualmente, a cobertura de vacinação em países considerados de risco para febre amarela varia de 100% em partes do estado do Amazonas, Brasil, a 0% de cobertura em partes da África central e oriental. Na África, as áreas com risco para YFV e ausentes de cobertura vacinal incluem grande parte do centro e do leste africano e partes da Nigéria, Níger,

Serra Leoa, Libéria e Guiné-Bissau. Na América Latina, baixa cobertura vacinal foi reportada na Guiana, Suriname, Guiana Francesa e Colômbia. No Brasil, a cobertura foi alta durante as décadas de 70-80 e ligeiramente diminuída na década de 90, tornando a elevar-se no país no ano de 2016 (WILDER-SMITH, 2017). Segundo a OMS, no ano de 2016, a vacina contra a febre amarela foi introduzida em programas de vacinação infantil em 35 dos 42 países e territórios de risco para febre amarela na África e na América, perfazendo uma cobertura vacinal de aproximadamente 45% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018d).

Até o momento, existem seis vacinas anti-YFV licenciadas pela OMS e que são baseadas em passagens celulares das três subcepas do YFV-17D: YFV-17DD, YFV-17D-204 e YFV-17D-213. Entre essas, a vacina YFV-17DD (passagem celular 286) é desenvolvida e distribuída pela Bio-Manguinhos (Fiocruz), Brasil, e a vacina YFV-17D-213 (passagem 239) é desenvolvida pelo Centro Federal Chumakov, na Rússia. Em relação à subcepa YFV-17D-204, foram construídas as vacinas YF-VAX (passagem 237, Sanofi Pasteur, Estados Unidos das Américas, EUA), Stamaril (passagem 235, Sanofi Pasteur, França), a Amaril Stabilisé (passagem 235, Instituto Pasteur, Senegal) e a ARILVAX (passagem 235, Chiron/Novartis, Reino Unido) (BARRETT, 2017; GALLER et al., 1997; MONATH, 2005; SILVA Jr et al., 2018).

Apesar da eficácia historicamente demonstrada das vacinas anti-YFV, poucos casos de doenças neuro- e viscerotrópicas têm sido relatados associadas à administração de vacinas atenuadas anti-YFV. Estima-se que a incidência de doença neurotrópica associada à vacina da febre amarela é de 9,9 casos a cada 100.000 doses de vacina, enquanto que para a doença viscerotrópica a incidência varia de 0,3 a 0,5 casos a cada 100.000 doses distribuídas (BARRETT; TEUWEN, 2009; GUIMARD et al., 2009). Dentre os grupos de risco à vacina anti-amarílica, encontram-se mulheres grávidas, crianças menores de seis anos, indivíduos com reações de hipersensibilidade a proteínas do ovo e indivíduos imunossuprimidos, como aqueles com doença do timo, com HIV/aids e sob terapias imunossupressoras (THOMAS, 2016).

Como tentativa de aumentar a segurança da vacina e o público passível de vacinação contra a febre amarela, diversas alternativas têm sido sugeridas, como vacinas de vírus inativado, vacinas de DNA e de vírus recombinante (MACIEL et al., 2015; MONATH et al., 2011; SCHÄFER et al., 2011). Dentre essas, a vacina desenvolvida a partir da cepa YFV-17D inativada (XRX-001) protegeu camundongos, hamsters e macacos contra YFV e induziu anticorpos neutralizantes em 100% candidatos que receberam 4,8µg de antígeno no ensaio clínico de fase I (MONATH et al., 2011). Em outra estratégia, uma vacina de DNA

contendo a proteína de envelope completa fundida com o sinal da proteína de membrana associada ao lisossoma (*Lysosome-Associated Membrane Proteins*, LAMP) também conferiu 100% de proteção contra YFV em camundongos desafiados (MACIEL et al., 2015).

Em duas outras sugestões vacinais com vírus quiméricos, os genes prM/E do YFV foram inseridos no vírus Ankara ou no vírus da vaccínia D4R defectivos, resultando em MVA-YFV e dVV-YFV, respectivamente. Em camundongos, esses candidatos vacinais levaram a uma proteção total contra o desafio letal e uma taxa de sobrevivência de 100% após a administração intracerebral de 10^7 TCID₅₀ do YFV (SCHÄFER et al., 2011). Atualmente, a MVA-BN-YFV é produzida pela empresa dinamarquesa Bavarian Nordic, em colaboração com o Instituto Nacional de Alergias e Doenças Infecciosas (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, NIAID), e está sendo submetida à fase clínica I (NCT02743455).

2.2.8 Genética reversa

Dentre os sistemas de genética reversa desenvolvidos para flavivírus, os direcionados para YFV foram os primeiros a serem descritos (RICE et al., 1989). Embora apresente maior estabilidade em comparação aos genomas do WNV, JEV e DENV quando esses são mantidos em bactéria, Rice et al. (1989) também reportou a instabilidade do genoma do YFV quando clonado em *E. coli*, provavelmente em decorrência da síntese de proteínas tóxicas ao microrganismo. Assim, como alternativa para a manipulação do YFV, o genoma viral foi inicialmente clonado de forma dividida em dois plasmídeos, sendo depois ligados *in vitro* e usados para a transcrição do genoma inteiro e recuperação da partícula viral (RICE et al., 1989).

A estratégia de dois plasmídeos para a manipulação do genoma do YFV passou então a ser usada para diversas finalidades, como a construção de vacinas terapêuticas para quadros neoplásicos, expressão de epítomos imunodominantes para malária, de epítomos humorais e de células T e para construção de YFV repórteres (BONALDO et al., 2002, 2005, 2007; MCALLISTER et al., 2000). Adiante, clones infecciosos de YFV também foram obtidos em *E. coli* através do uso de vetor *low-copy number*, a exemplo do plasmídeo pACNR1181, capaz de conservar de forma estável todo o genoma do YFV (BREDENBEEK et al., 2003; MCELROY et al., 2005). Esses clones infecciosos de YFV foram obtidos em *E. coli* e recuperados a partir da transfecção de RNA_v transcrito *in vitro* pela RNA polimerase SP6 (BREDENBEEK et al., 2003; FRANCO et al., 2010; MCELROY et al., 2005).

Em outras estratégias, o genoma do YFV também tem sido clonado em BAC sob

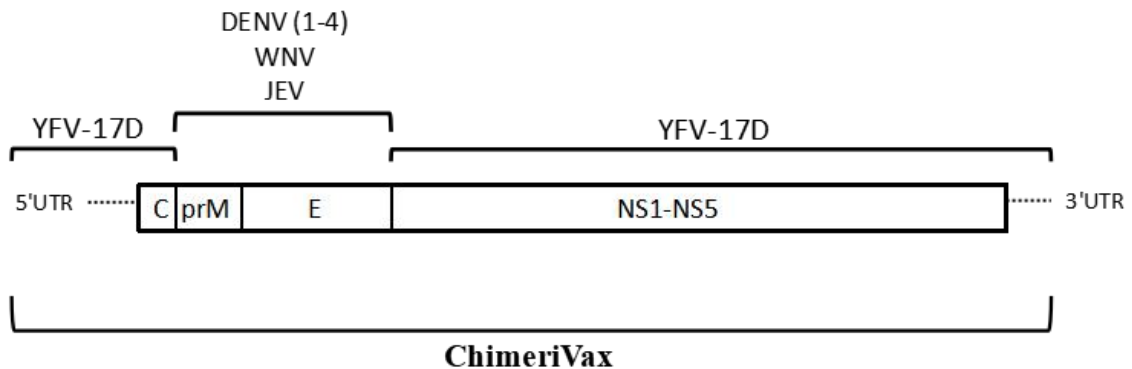
o comando do promotor do citomegalovírus (*cytomegalovirus*, CMV) e recuperado através da transfecção direta do DNAcv (JIANG et al., 2015). A recuperação de YFV recombinantes mediante a transfecção de ISA também já foi reportada (AUBRY et al., 2014).

Recentemente, foi descrito um YFV repórter expressando a GLuc, YFV-GLuc, construído através de recombinação homóloga em levedura e recuperado pela transfecção do RNAv transcrito *in vitro* com a enzima RNA polimerase T7 (KASSAR et al., 2017). Essa publicação faz parte dos objetivos deste trabalho e será discutida ao longo da metodologia, resultado e discussão.

De posse desses sistemas, diversas manipulações têm sido feitas sobre o genoma do YFV, sobretudo a partir do vírus protótipo da espécie, a cepa vacinal YFV-17D (BONALDO; SEQUEIRA; GALLER, 2014). Os vírus ou replicons recombinantes obtidos desses sistemas de genética reversa vêm sendo utilizados principalmente para a construção de vírus quiméricos e vetores virais, para o desenvolvimento de plataforma repórter para triagem em larga escala de candidatos anti-YFV e para elucidação das funções das proteínas víricas (ARROYO et al., 2004; CHAMBERS et al., 1999; JONES; PATKAR; KUHN, 2005; MAYHOUB et al., 2011).

Para fins vacinais, a principal estratégia usada é a ChimeriVax. Nessa estratégia de genética reversa, a região gênica prM/E do YFV-17D é substituída pela sequência análoga de outro flavivírus, de forma que a quimera viral resultante carregue a região imunogênica do vírus-alvo e a maquinaria de replicação do YFV atenuado, contribuindo para a imunogenicidade e segurança da vacina (ARROYO et al., 2004; CHAMBERS et al., 1999; GUIRAKHOO et al., 2001) (Figura 29).

Figura 29 - Plataforma ChimeriVax de genética reversa viral



Fonte: Do autor (2018)

Nota: As regiões gênicas codificantes para as proteínas prM/E do vírus da febre amarela cepa 17-D, YFV-17D, podem ser substituídas pelas sequências correspondentes de outros flavivírus, como vírus da dengue (DENV), vírus do oeste do Nilo (WNV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV), resultando em vírus quiméricos passíveis de serem usados para fins de imunização.

A vacina licenciada anti-DENV, a CYD-TVD (ChimeriVax-DENV), por exemplo, comentada em detalhes no tópico 2.3.6, consiste na combinação de quatro vírus quiméricos YFV/DENV, em que cada quimera corresponde a um YFV-17D que teve sua região prM/E substituída pela sequência correspondente de cada sorotipo do DENV (GUIRAKHOO et al., 2001). Na mesma estratégia, vacinas quiméricas também têm sido sugeridas contra WNV (ChimeriVax-WNV) e JEV (ChimeriVax-JEV), ambas com a fase clínica 2 já finalizada (ARROYO et al., 2004; CHAMBERS et al., 1999).

Vírus recombinantes de YFV também têm sido usados como vetores virais para a expressão de sequências heterólogas de protozoários, como *Plasmodium yoelii*, *Trypanosoma cruzi*, *P. falciparum* e *P. yoelii*, de outros vírus, a exemplo do influenza, HIV e vírus Lassa (*Lassa virus*, LAV), ou de epítopos de linfócitos T para fins vacinais ou de terapia experimental (BONALDO; SEQUEIRA; GALLER, 2014).

Apesar de modelos *in vivo*, como hamster, primatas não humanos e camundongos sem expressão de receptores para IFN α e β (camundongos A129) serem frequentemente usados para a avaliação de compostos anti-YFV, vírus, partículas pseudo infecciosas (*Pseudoinfectious virus*, PIV) e replicons repórter de YFV também têm sido empregados com sucesso para a triagem de compostos antivirais (JONES; PATKAR; KUHN, 2005; MAYHOUB et al., 2011; MEIER et al., 2009; PATKAR et al., 2009). No estudo de Mayhoub et al. (2011), 37 compostos tiveram sua função anti-YFV avaliada pela leitura do gene repórter Luc inserido no YFV, YFV-IRES-Luc, quando esse foi inoculado em células BHK-21. Com uso de PIV de YFV carreando um replicon expressando RLuc, Patkar et al. (2009) também investigaram a função anti-YFV de seis candidatos antivirais.

Sistemas de genética reversa para YFV também têm sido direcionados para elucidação de função de proteínas virais, como o uso de PIVs repórteres para estudos da participação das proteínas C, NS1 e NS3 no processo de empacotamento do genoma viral (JONES; PATKAR; KUHN, 2005; PATKAR et al., 2007).

2.3 Vírus dengue

2.3.1 Aspectos históricos e epidemiológicos

Os primeiros registros compatíveis com sintomas de dengue foram encontrados em uma enciclopédia médica chinesa em 992 depois de cristo (d.C.), embora os dados tenham sido publicados originalmente pela Dinastia Chin séculos antes (265-420d.C.) (GUBLER,

1998). Desse momento em diante, acredita-se que as primeiras epidemias sabidamente causadas pelo DENV tenham acontecido esporadicamente no final do século XVIII na Ásia e nas Américas e a disseminação do vírus nas áreas tropicais e subtropicais do globo tenha ocorrido apenas a partir no final do século XIX e início do século XX (HAYES; GUBLER, 1992; MONATH, 1994).

Nas Américas, as primeiras epidemias suspeitas de DENV ocorreram em Martinica e Guadalupe (Caribe) em 1635 (SCHNEIDER; DROLL, 2001). Em 1780, na Filadélfia e EUA, ocorreram as primeiras epidemias do continente americano com curso clínico caracterizado e compatível com os sintomas da dengue clássica (RUSH, 1951).

No século XIX, surtos de dengue começaram a ser frequentes e associados a atividades comerciais em cidades portuárias das Américas do Norte, Sul e Central (GUZMÁN; KOURÍ, 2003). No mesmo século, em 1818, um grande surto foi relatado no Peru, atingindo aproximadamente 50.000 pessoas. De 1824 a 1828, uma pandemia de DENV iniciada nas Ilhas Virgens, atingiu Cuba, Jamaica, Venezuela, Caribe, cidades portuárias dos EUA (Pensacola, Charleston, Savannah e Nova Orleans), Golfo do México e teve seu fim na cidade de Veracruz, México (SCHNEIDER; DROLL, 2001).

Em 1845, teve início uma nova pandemia por DENV, desta vez alcançando o estado do Rio de Janeiro, Brasil. Nos anos seguintes, em 1846-1848 e entre 1851-1853 outras epidemias também foram reportadas no país. De 1853 a 1982 apenas dois surtos foram relatados, um no ano de 1916 e um outro em 1923 (PINHEIRO; NELSON, 1997; SCHNEIDER; DROLL, 2001).

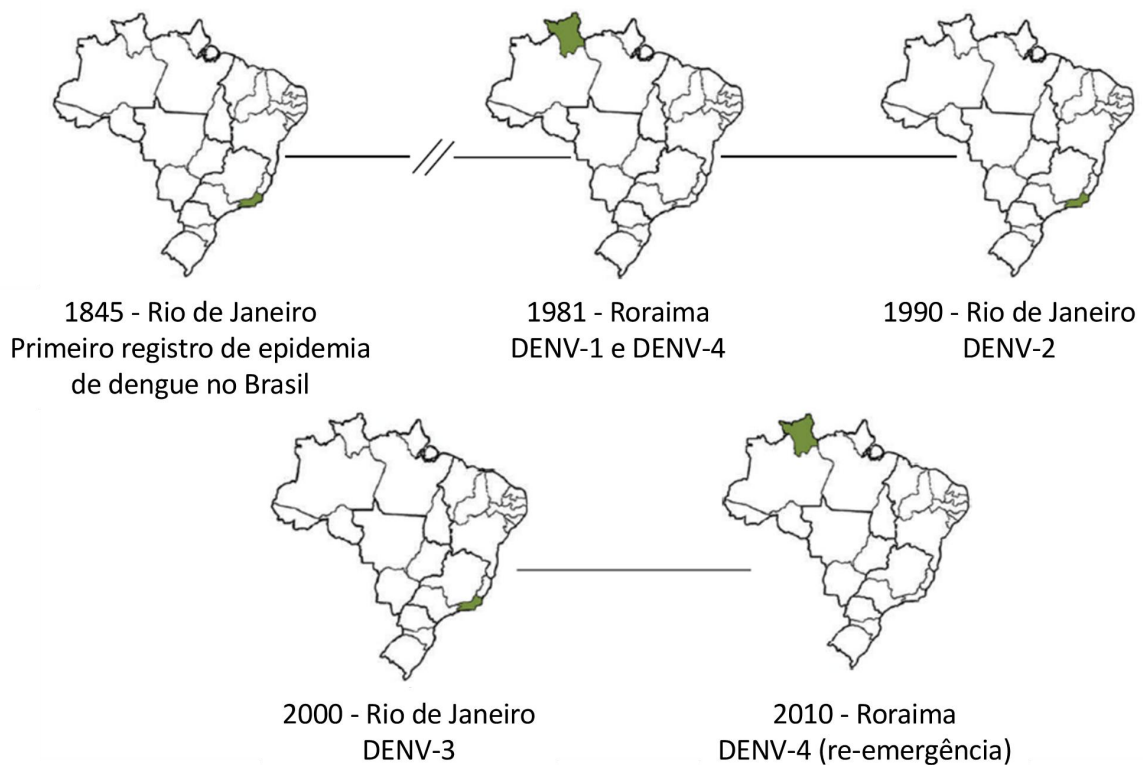
Em decorrência das epidemias causadas por YFV, em 1947 o governo do Brasil solicitou ao Conselho Diretor da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) a erradicação do vetor *Ae. aegypti* em todo o continente americano. Entre idas e vindas de erradicação e reintrodução do vetor (como apresentado no tópico 2.2.1), em 1976 o *Ae. aegypti* foi identificado na área portuária de Salvador, sendo reintroduzido definitivamente no Brasil (FARES et al., 2015; TEIXEIRA; BARRETO, 1996).

Após 1976, a primeira epidemia por DENV é datada em 1981 na cidade de Boa Vista, Roraima, sendo também a primeira epidemia descrita no Brasil com a presença de dois sorotipos, o DENV sorotipo 1 (DENV-1) e o DENV-4 (OSANAI et al., 1983; SCHNEIDER; DROLL, 2001). Nos anos de 1986-1987, o DENV-1 foi introduzido no Rio de Janeiro, afetando mais de um milhão de indivíduos, e em seguida causando epidemias no Ceará (1986), em Alagoas (1986) e no estado de Pernambuco em 1987 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; SCHATZMAYR; NOGUEIRA; TRAVASSOS, 1986; SIQUEIRA et al., 2005).

No Brasil, o DENV-2 foi identificado pela primeira vez em 1990 no Rio de Janeiro, disseminando-se posteriormente para as demais regiões do país (ROMANO et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2009). No decorrer dos anos 90, a disseminação do DENV-1 e DENV-2 foi intensificada causando surtos no sudeste e nordeste do Brasil (NOGUEIRA et al., 1991; VASCONCELOS et al., 1995). Acredita-se que tanto o DENV-1 quanto o DENV-2 introduzidos no Brasil foram originados do continente africano (PINHEIRO; NELSON, 1997).

O sorotipo 3 do DENV (DENV-3) foi identificado pela primeira vez no Brasil no ano de 2000, também no estado do Rio de Janeiro, causando no ano de 2002 um dos maiores surtos já relatados no país, com uma taxa de incidência de 696.472 casos por 100.000 habitantes e 91 óbitos (GUILARDE et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2009). Em 2010, foram descritos surtos causados por diferentes sorotipos de DENV que atingiram 21 estados do Brasil, além da re-emergência do DENV-4 após 28 anos de silenciamento (TEMPORÃO et al., 2011). Na figura 30 é possível observar o ano e local de entrada de cada sorotipo de DENV no Brasil.

Figura 30 - Local e ano de entrada dos sorotipos do vírus dengue no Brasil



Fonte: Adaptado de Fares et al. (2015)

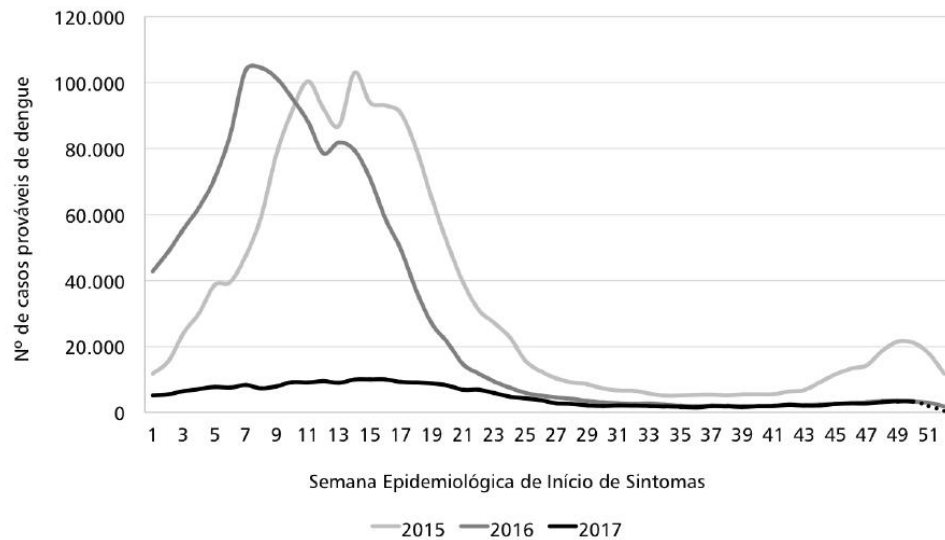
A partir de 2010 a preocupação com a dengue foi intensificada. Nesse ano, a transmissão local de DENV foi relatada pela primeira vez na França e na Croácia e casos importados ocorreram em outros países europeus (GOULD et al., 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Em 2012, um surto de DENV nas ilhas da Madeira, Portugal, resultou em mais de 2 mil casos locais e 81 casos exportados para a Europa continental (LOURENÇO; RECKER, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

Em 2013, a dengue continuou a ocorrer na América do Sul e casos de infecção foram descritos também no condado de Martin, Flórida (EUA), e na província de Yunnan, China (REY, 2014; ZHANG et al., 2014). Em 2014, após um intervalo de mais de 70 anos, casos de infecção por DENV foram descritos em Tóquio, Japão (QUAM et al., 2016). Em 2015, em Deli, Índia, registrou-se mais de 15 mil casos; seu pior surto desde 2006 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

O ano de 2016 foi marcado por grandes surtos de dengue em todo o mundo, com mais de 2,38 milhões de casos apenas no continente americano. Na região do Pacífico Ocidental foram descritos mais de 375.000 casos suspeitos de dengue. Nas Ilhas Salomão um surto levou a mais 7.000 suspeitas de casos de dengue e na região africana de Burkina Faso foi descrito um surto com 1.061 prováveis casos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

Nesse mesmo ano, no Brasil, até a SE 52, 1.500.535 casos foram notificados, com a região Sudeste registrando o maior número de casos prováveis, 858.273, 57,2% do total de casos. Também foram confirmados 861 casos de dengue grave, 8.402 casos de dengue com sinais de alarme e 642 óbitos por dengue. Pernambuco e Alagoas tiveram as maiores proporções de óbitos, 37,1% e 31,8%, respectivamente, em relação ao total de casos de dengue grave ou com sinais de alarme (BRASIL, 2017a).

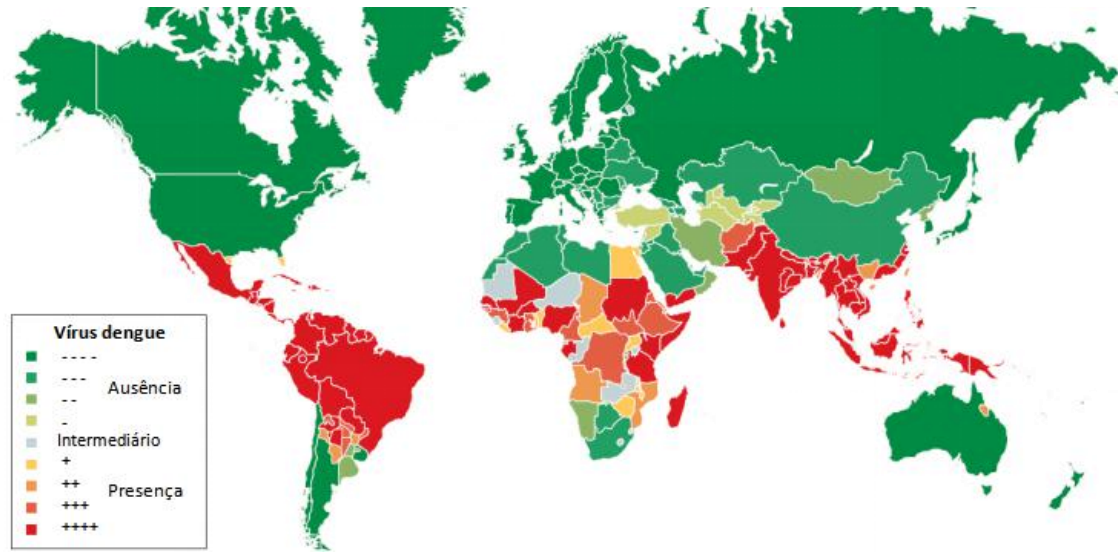
Ainda no Brasil, em 2017, foram 252.054 casos notificados até a SE 52 e a região Nordeste apresentou 86.386 casos prováveis de dengue, o maior número em relação ao restante do país, seguida pela região Centro-Oeste (78.729 casos), Sudeste (59.601 casos), Norte (22.660 casos) e Sul (4.678 casos); ao todo foram confirmados 141 óbitos por dengue (BRASIL, 2018). A figura 31 mostra o número de casos prováveis de dengue no Brasil nos anos 2015, 2016 e 2017.

Figura 31 - Casos prováveis de dengue no Brasil em 2015, 2016 e 2017

Fonte: Brasil (2018)

Em 2017, segundo a OMS, ocorreram surtos de DENV em julho no Sri Lanka, onde 80.732 casos e 215 mortes foram descritas. Em agosto do mesmo ano, 192 casos de dengue foram confirmados na Costa do Marfim, dos quais 66% das amostras apresentaram DENV-2, 29% o DENV-3 e 5% o DENV-1. O último surto de 2017 foi relatado em Burkina Faso, com um total de 9.029 casos e 18 mortes, com 72 amostras sendo analisadas para identificação do sorotipo: 58 sendo positivas para DENV-2, 12 positivas para DENV-3 e duas positivas para DENV-1 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

As áreas de risco para dengue, bem como a chance de infecção em cada região são apresentadas na figura 32.

Figura 32 - Suscetibilidade de diferentes regiões à infecção pelo vírus da dengue

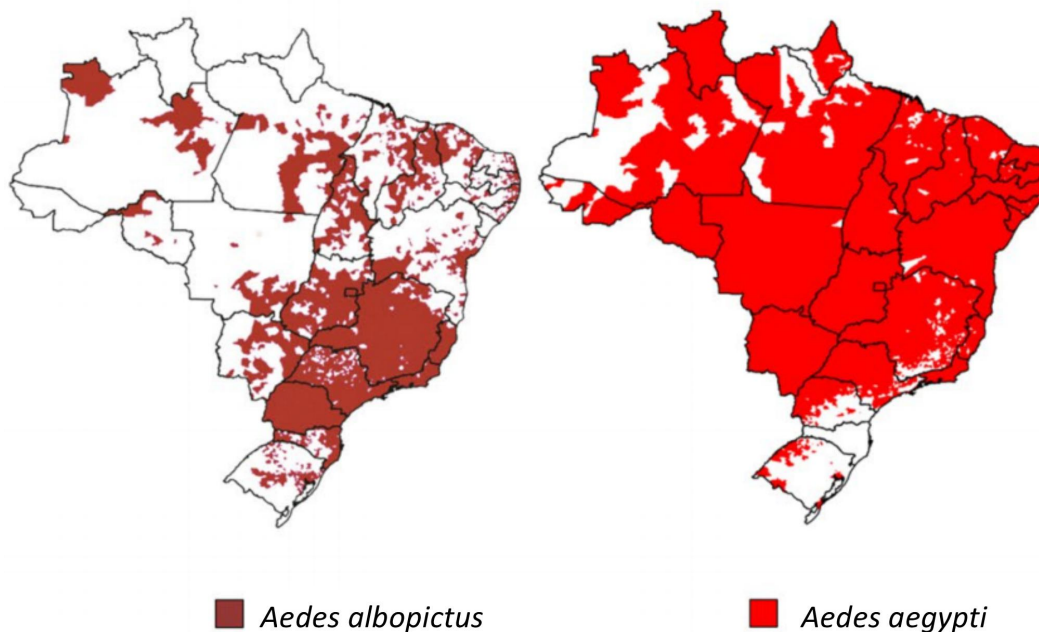
Fonte: Adaptado de Guzman et al. (2016)

Nota: O mapa mostra as diferentes regiões do globo em uma escala de presença (+) e ausência (-) de infecções pelo vírus dengue.

2.3.2 Transmissão

O DENV apresenta dois ciclos de transmissão: o silvestre, presente apenas na África e Ásia, e que ocorre entre inseto vetor e primatas não humanos, e o ciclo urbano, entre vetor e humanos (DEGALLIER et al., 2001).

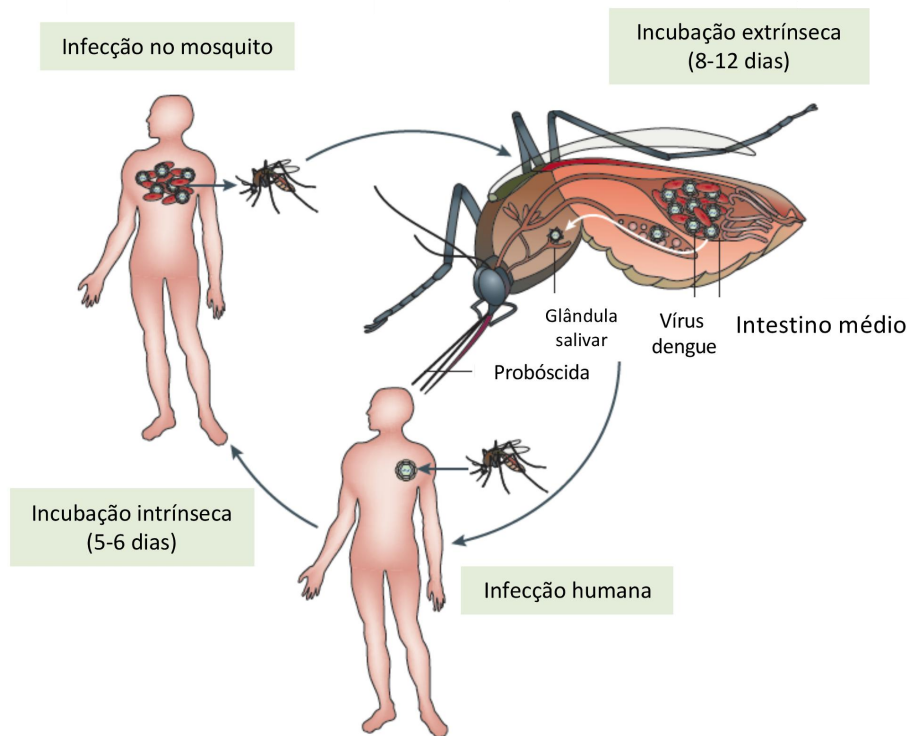
Na Ásia, o ciclo silvestre está associado principalmente à transmissão entre primatas não humanos dos gêneros *Macaca* e *Presbytis spp.* e mosquitos do gênero *Ochlerotatus*, com o *Ae. albopictus* estando associado à transmissão de DENV em ambiente peridoméstico (RODHAIN, 1991). Na África, o ciclo silvestre do DENV se mantém entre os macacos *Erythrocebus patas* e diversos vetores do gênero *Aedes*, incluindo os mosquitos *Ae. taylori-furcifer*, *Ae. luteocephalus* e *Ae. opok* (GUBLER, 1998; PEIRIS; DITTUS; RATNAYAKE, 1993; RODHAIN, 1991; WANG et al., 2000). No Brasil, apesar de larvas e pupas coletadas em área urbana terem originado fêmeas do *Ae. albopictus* infectadas pelos sorotipos DENV-1 e DENV-2, a transmissão do DENV a humanos por esse vetor ainda não foi confirmada (BRASIL, 2002; MARTINS et al., 2012). A figura 33 mostra a distribuição do *Ae. aegypti* e do *Ae. albopictus* no Brasil.

Figura 33 - Distribuição geográfica do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* no Brasil

Fonte: Couto-Lima et al. (2017)

Nas Américas, o *Ae. aegypti* é o vetor de maior importância epidemiológica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). O mosquito possui elevada suscetibilidade à infecção pelos quatro sorotipos do DENV e é altamente adaptado ao ambiente urbano. Em relação a sua distribuição, o *Ae. aegypti* é amplamente disseminado nas regiões tropicais e subtropicais do globo (GUBLER, CLARK, 1995; MORRISON et al., 2008; WILDER-SMITH, GUBLER, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

No ciclo urbano, a transmissão do DENV ocorre durante o repasto sanguíneo, quando as fêmeas do gênero *Aedes* infectadas pelo DENV inoculam o vírus em um hospedeiro humano suscetível. Após a infecção, inicia-se no humano o período de incubação intrínseco, com duração de três a 15 dias, com média de cinco a seis dias. Com o término da incubação, o humano infectado entra em viremia, a qual se estende de um dia antes do aparecimento da febre até o sexto dia da doença. Nesse período, se exposto novamente à fêmea do vetor, essa adquire o vírus, iniciando o período de incubação extrínseco, com duração de oito a 12 dias. Após a incubação extrínseca, o vetor torna-se apto a transmitir o vírus, continuando o ciclo de transmissão do DENV (Figura 34) (BRASIL, 2002).

Fonte 34 - Ciclo urbano de transmissão do vírus dengue

Fonte: Adaptado de Guzman et al. (2016)

Nota: Ao entrar em contato com o sangue de um humano em viremia, a fêmea do gênero *Aedes* adquire o vírus dengue (DENV). No vetor, após o período de incubação extrínseca, o vírus retorna à glândula salivar do mosquito, tornando-o apto a retransmitir o DENV a outro humano suscetível. Ao ser infectado, o humano entra em um período de incubação intrínseca, depois do qual segue a viremia e o humano passa a ser uma fonte de infecção a novas fêmeas do gênero *Aedes*.

Além dessa transmissão biológica, também há a possibilidade do vetor *Ae. aegypti* transmitir de forma mecânica o DENV. Essa transmissão ocorre quando o repasto sanguíneo é interrompido e o mosquito, imediatamente, antes de concluir a incubação extrínseca, alimenta-se de hospedeiro suscetível próximo, transmitindo-lhe o vírus recém adquirido (BRASIL, 2002).

A transmissão vertical em humanos também já foi descrita e embora até o momento não se tenha registro de transmissão de DENV via secreção, casos de transmissão do vírus por transfusão sanguínea já têm sido relatados (MAROUN et al., 2008; SABINO et al., 2016).

Entre mosquitos do gênero *Aedes* também se tem descrito transmissão vertical, ainda que modelos matemáticos não confirmem a importância dessa forma de transmissão para a manutenção do vírus na natureza (ADAMS; BOOTS, 2010). No Brasil, a transmissão vertical natural de DENV em *Ae. aegypti* tem sido descrita em Recife (PE) e em Belo Horizonte (MG) (GUEDES et al., 2010; VILELA et al., 2010). Um estudo realizado por

Mourya et al. (2001) também descreveu a transmissão horizontal do DENV-2 entre vetores quando os mosquitos machos eram congenitamente infectados. Análise de microscopia eletrônica do tecido reprodutor de macho de *Ae. aegypti*, revelando a presença de DENV-2 14 dias após a inoculação intratorácica do vírus, já sugeria a possibilidade de transmissão horizontal entre vetores (TU; CHEN; HOU, 1998).

2.3.3 Sinais e sintomas clínicos

A infecção pelo DENV pode ou não apresentar sintomas. Quando sintomáticas, as infecções podem apresentar um espectro clínico que vai de quadros oligossintomáticos até formas graves passíveis de resultar em óbito, embora em cerca de 90% dos casos a doença não ultrapasse uma semana de sintomas (BRASIL, 2002; GUZMAN et al., 2016). Nos quadros sintomáticos, pode-se notar a presença de três fases clínicas, a saber, a fase febril (que ocorre na maioria dos casos), a fase crítica e a fase de recuperação (ou convalescença) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Na fase febril, há o aparecimento abrupto de febre alta (39°C a 40°C) com duração de aproximadamente dois a sete dias, podendo ser acompanhada de rubor facial, exantema (em metade dos casos), dor generalizada, mialgia, artralgia, dor de cabeça, anorexia, náuseas e vômitos. Em alguns casos também pode se observar comprometimento da faringe, da conjuntiva, além de petéquias, hemorragias de mucosa e sangramento gastrointestinal (BALMASEDA et al., 2005; BRASIL, 2002; KALAYANAROOJ et al., 1997; RIGAU-PEREZ et al., 1998).

Alguns pacientes podem ter um agravamento da doença e entrar na fase crítica da infecção, o que comumente acontece entre o terceiro e sétimo dia do início dos sintomas e é simultâneo à diminuição da febre para 37,5-38°C ou menos (NIMMANNITYA et al., 1969; SRIKIATKHACHORN et al., 2007). Na fase crítica, o paciente pode apresentar sinais e sintomas adicionais, como dor abdominal ao toque, ascite, derrame pleural e pericárdico, vômito e hipotensão postural, sendo grande parte desses sinais e sintomas associados ao aumento da permeabilidade vascular, durando de um a dois dias (BRASIL, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Em caso de perda de um volume crítico de plasma, o paciente pode entrar em choque com diminuição do fornecimento sanguíneo aos órgãos e consequente comprometimento de suas funções. Nesse momento, o paciente pode apresentar problemas de coagulação, que embora contribuam para o agravamento da doença, na maioria das vezes não

são suficientes para causar grandes sangramentos. Geralmente, as hemorragias graves estão associadas à trombocitopenia, hipóxia e acidose, que levam à insuficiência de múltiplos órgãos e à coagulação vascular disseminada. A entrada do paciente nesse estado de choque é a responsável pela maioria das mortes decorrentes de infecção por DENV, frequentemente no intervalo de 12 a 24 horas (BRASIL, 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

Na fase crítica, alguns pacientes podem apresentar manifestações neurológicas desde irritabilidade e convulsões a casos de encefalite, mielite e meningite. Casos de meningite relacionados à infecção por DENV, no entanto, são raros e quando ocorrem, são mais frequentes em crianças; tais manifestações têm sido associadas principalmente as infecções pelos sorotipos DENV-2 e DENV-3 (BRASIL, 2002; SOARES et al., 2010).

Se o paciente sobreviver à fase crítica, nas 48-72 horas seguintes ocorre uma reabsorção gradual do líquido extravasado, com a conseqüente melhora do quadro clínico, retorno do apetite e diminuição dos sintomas gastrointestinais (NIMMANNITYA et al., 1969).

2.3.4 Diagnóstico

Durante a investigação das infecções por DENV é necessário revisar a epidemiologia do local com casos suspeitos e realizar diagnóstico diferencial com outras síndromes clínicas decorrentes de processos infecciosos ou não infecciosos. Dentre as suspeitas, pode-se fazer diagnóstico diferencial com: síndromes febris (como malária, influenza, chikungunya, oropouche e zika); síndromes exantemáticas febris (a exemplo da rubéola, sarampo, mayaro e farmacodermias); síndromes hemorrágicas febris (como as decorrentes de infecção por hantavírus, YFV e *Leptospira interrogans*); síndromes dolorosas abdominais (apendicite, obstrução intestinal e abscesso hepático); síndromes do choque (como meningococemia, septicemia e síndrome do choque tóxico) e síndromes meníngeas, como as decorrentes de outras infecções virais e bacterianas (BRASIL, 2016).

Em decorrência da situação epidemiológica do Brasil, atualmente um dos diagnósticos diferenciais mais relevantes para DENV é com as infecções por CHIKV e ZIKV. O quadro 2 resume os parâmetros clínicos e dos testes laboratoriais de rotina que auxiliam nessa investigação.

Quadro 2 - Diagnóstico diferencial clínico-laboratorial de dengue, chikungunya e zika

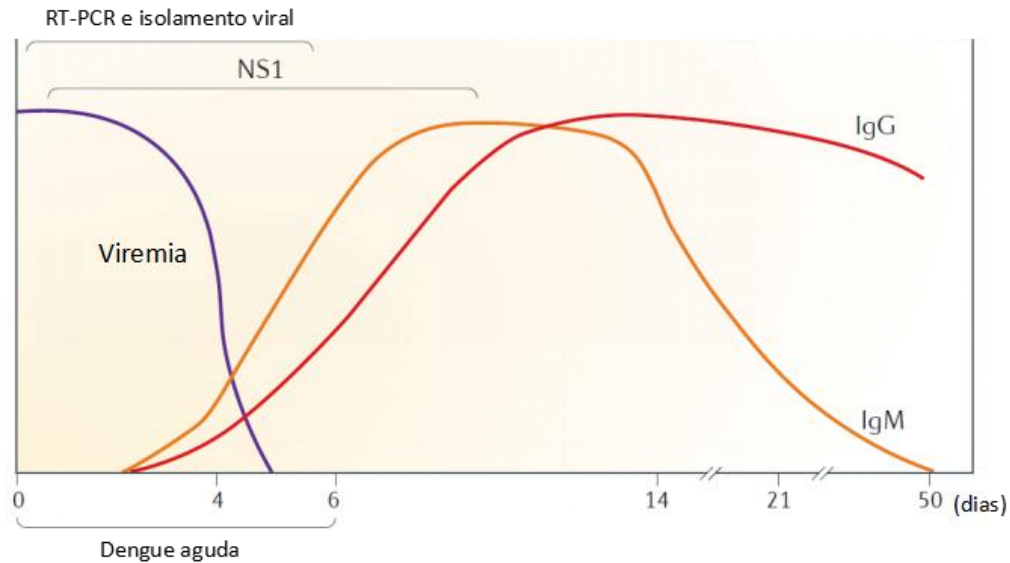
Manifestações clínica-laboratoriais	Dengue	Chikungunya	Zika
Intensidade da febre	++	+++	+/ausente
Exantema	+ (d5-d7*)	++ (d1-d4)	++++ (d2-d3)
Mialgia	++	+	+
Artralgia	+/-	+++	+
Dor retrorbital	+++	+	++
Conjuntivites	+/-	+	+++
Sangramentos	++	+/-	-
Choque	+/-	-	-
Plaquetopenia	+++	+	-
Leucopenia	+++	++	-
Neutropenia	+++	+	+

Fonte: Adaptado de Brasil (2016b)

Nota: *Dias prováveis do início do exantema.

Apesar da importância da avaliação clínico-epidemiológica, é imprescindível a confirmação da identidade do vírus mediante o diagnóstico específico direto ou indireto. Durante a fase de viremia, correspondente aos cinco primeiros dias de sinais e sintomas clínicos, pode-se realizar o diagnóstico direto através do isolamento do vírus em cultivo celular, detecção do RNAv por testes de amplificação de ácido nucleico (*nucleic acid amplification tests*, NAAT) ou detecção de proteínas virais mediante ELISA ou testes rápidos (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2017b; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

No isolamento viral pode ser usada amostra de sangue total, soro ou tecido, com o resultado sendo liberado entre uma e duas semanas. A detecção do RNAv, via biologia molecular, pode ser realizada em tecido, sangue total, soro, plasma e líquido cefalorraquidiano, com o resultado liberado em um ou dois dias. As proteínas virais podem ser detectadas por ELISA para amostras de soro ou através de imuno-histoquímica para amostras de tecido (Figura 35) (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2017b).

Figura 35 - Teste de diagnóstico de dengue de acordo com o tempo de infecção

Fonte: Adaptado de Guzman et al. (2016)

Nota: Durante a fase de viremia, o diagnóstico da dengue é realizado por pesquisa da proteína não estrutural NS1 ou por detecção do RNA viral por testes de biologia molecular. Após a soroconversão, o diagnóstico é indireto, inicialmente por investigação de IgM e depois por pesquisa de IgG.

As técnicas de biologia molecular, principalmente qRT-PCR, podem ainda ser usadas em ensaios multiplex tanto para detecção e sorotipagem do DENV quanto para diagnóstico diferencial entre doenças febris clinicamente indiferenciadas (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2013). Plataformas de qRT-PCR também já têm sido descritas para a diferenciação entre dengue, malária e leptospirose, e entre dengue, zika e chikungunya, essa última sendo passível de ser realizada em vários tipos de amostras biológicas, como soro, plasma, urina, tecido placentário, tecido cerebral e líquido amniótico (PABBARAJU et al., 2016; WAGGONER et al., 2014). Os métodos de amplificação mediados por *loops*, RT-LAMP, também foram descritos, mas seu desempenho em comparação com outros métodos de amplificação de ácido nucleico ainda não é conhecido (PARIDA et al., 2005).

Na viremia, em simultâneo ao diagnóstico por biologia molecular, pode ser realizada a detecção da proteína NS1 solúvel do DENV por ELISA para o intervalo do primeiro ao 18º dia após o aparecimento dos sintomas. A sensibilidade do ELISA para detecção de NS1 foi maior quando comparada a RT-PCR (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2017b; GOWRI SANKAR et al., 2012). No teste rápido, a pesquisa de NS1 apresentou maior sensibilidade que o qRT-PCR durante a fase aguda ou pós-aguda de infecções primárias. Porém, em casos de infecção secundária, o qRT-PCR foi o diagnóstico de maior sensibilidade (TEOH et al., 2016). No mais, a pesquisa de NS1 também

pode ser usada em ensaios mais específicos para diagnósticos diferenciais em regiões de cocirculação de diferentes flavivírus (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2017b).

Após aproximadamente cinco dias da doença, com o término da viremia e o aparecimento de anticorpos específicos anti-DENV, inicia-se o período de convalescença e o diagnóstico passa a ser feito por sorologia. Dentre os ensaios disponíveis, o MAC-ELISA é frequentemente o mais usado, podendo apresentar, a depender do fabricante, uma sensibilidade de aproximadamente 90% e especificidade de aproximadamente 98%. O MAC-ELISA pode ser realizado com amostras de soro, sangue em papel filtro e em amostras de saliva. No entanto, os anticorpos IgM não diferenciam os sorotipos de DENV, além de poderem reagir cruzadamente com outros flavivírus, como JEV, SLEV, WNV e YFV (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2017b).

Pesquisa de IgG é usada na fase de convalescença e pode servir como indicador para a diferenciação de infecção primária ou secundária. Amostras com IgG negativa na fase aguda e uma IgG positiva na fase de convalescença é indicativo de infecção primária por DENV. Por outro lado, teste positivos para IgG na fase aguda e um aumento de 4 vezes no título de IgG na fase de convalescença, após o intervalo de no mínimo uma semana entre as coletas, é indicativo de infecção secundária por DENV. Em áreas de cocirculação de outros flavivírus, o PRNT também é recomendado a fim de aumentar a especificidade do diagnóstico sorológico (CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2017b).

Alternativamente a esses ensaios de diagnóstico convencionais, tem-se sugerido a pesquisa de anticorpos IgA contra DENV em soro para diagnóstico de fase aguda e a dosagem de ferritina sérica para diagnóstico diferencial entre DENV e outras doenças febris infecciosas ou inflamatórias, esse último apresentando uma sensibilidade de 82,6% e uma especificidade de 100% (BALMASEDA et al., 2003; ROY CHAUDHURI et al., 2017).

2.3.5 Tratamento

Semelhante as demais arboviroses, ainda não há um fármaco licenciado e específico para DENV, sendo a terapia apenas de suporte, com a cautela de não favorecer o quadro hemorrágico. Dentre os compostos em fase experimental, encontramos candidatos naturais e sintéticos com ação direta contra DENV e também drogas que atuam tentando minimizar o processo inflamatório envolvido na patogênese da doença (ALHOOT; WANG; SEKARAN, 2012; FARIAS et al., 2014; FARIAS; MACHADO; FONSECA, 2013; KOISHI

et al., 2012; MARTÍNEZ-GUTIERREZ et al., 2014; MARTÍNEZ-GUTIERREZ; CASTELLANOS; GALLEGO-GÓMEZ, 2011; RAJAPAKSE et al., 2014).

Cloroquina, como já discutido no tópico 2.1.6, é uma droga licenciada para o tratamento de malária e investigada sobre sua função antiviral sobre CHIKV, HIV, SFV e coronavírus (BRIGHTON, 1984; DE LAMBALLERIE et al., 2008; HELENIUS et al., 1982; KEYAERTS et al., 2004; KHAN et al., 2010; SAVARINO et al., 2004; WELLEMS; PLOWE, 2001). Em células Vero e em macrófagos humanos (*human macrophage*, U937), o composto inibiu a replicação de DENV-2 e não mostrou toxicidade celular, além de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em U937 e em células dendríticas plasmocitóides (FARIAS et al., 2014; FARIAS; MACHADO; FONSECA, 2013). No entanto, quando avaliada em pacientes com DENV, os resultados de dois estudos independentes indicaram que o uso da cloroquina não levou à melhora significativa da doença (BORGES; CASTRO; FONSECA, 2013; TRICOU et al., 2010).

Outro composto, a lovastatina, levou à inibição da replicação de DENV em células Vero, em células mononucleares do sangue periférico (*human peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), em células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (*human dermal microvascular endothelial cells*, HMEC-1), em células de fibroblastos embrionários de ratos deficientes de XBP1 (proteína de ligação X-box 1, *X-box binding protein 1*), de ATF6 (fator de transcrição de ativação 6, *activation transcription factor 6*) e também em camundongos AG129 ao agir na maturação e saída do vírus na célula hospedeira (MARTÍNEZ-GUTIERREZ et al., 2014; MARTÍNEZ-GUTIERREZ; CASTELLANOS; GALLEGO-GÓMEZ, 2011; PEÑA; HARRIS, 2012; ROTHWELL et al., 2009). Cinquenta extratos de algas marinhas tiveram sua função anti-DENV avaliada por ELISA *in situ*. Desses, oito inibiram a replicação de ao menos um sorotipo de DENV (KOISHI et al., 2012). Outro candidato natural, o bioflavonoide quercetina, inibiu significativamente a replicação de DENV-2 em células Vero (ZANDI et al., 2011). Recentemente, foi reportada também a função inibitória da tradução e/ou replicação do DENV-1 em células BHK-21 por bromocriptina (BRC) (KATO et al., 2016).

O uso de RNA de interferência (RNAi) também tem sido investigado como estratégia anti-DENV em ensaios *in vitro* direcionados ou para genes virais ou para genes de proteínas necessárias ao ciclo de replicação do vírus. O silenciamento do gene de prM de DENV resultou na diminuição da replicação do RNAv e no aumento de sobrevivência de C6/36 pós-infecção. O emprego de RNAi para silenciamento da proteína controlada por glicose de 78 kDa (*78-kDa glucose-regulated protein*, GRP78) e da via de endocitose

mediada por clatrina inibiu a entrada e replicação do DENV em hepatócitos (HepG2) (ALHOOT; WANG; SEKARAN, 2012; WU et al., 2010).

Uma vez que grande parte dos sinais e sintomas da infecção por DENV decorre de um desequilíbrio da resposta inflamatória, pressupõe-se que corticoides possam ser administrados para controle do agravo da doença, reforçado ainda pela constatação, ao menos *in vitro*, que anti-inflamatórios esteroides não aumentam a replicação no DENV (KAPTEIN; NEYTS, 2016). Apesar disso, até o momento não há um consenso sobre as reais melhorias do uso desses anti-inflamatórios tanto para tratamento do choque da DENV e recuperação do número de plaquetas quanto para a prevenção das complicações graves (RAJAPAKSE et al., 2014).

2.3.6 Vacinas

Um dos principais obstáculos da vacina contra DENV é a existência de múltiplos sorotipos do vírus e a possibilidade de que anticorpos resultantes de uma infecção prévia potencializem a infecção por um novo sorotipo, ocorrendo o chamado aumento de infecção dependente de anticorpo (*antibody dependent enhancement*, ADE). Dessa forma, para que se tenha uma estratégia anti-DENV que concilie segurança e imunogenicidade é essencial que a vacina estimule uma resposta imune equivalente aos quatro sorotipos do vírus (SILVA Jr et al., 2018). Recentemente, também foi demonstrado que exposição prévia ao ZIKV aumentou a chance de infecção por DENV-2 em macacos rhesus, o que deve também ser considerado quando da vacinação contra esses arbovírus em áreas de cocirculação (GEORGE et al., 2017; SILVA Jr et al., 2018).

Em 2015, foi licenciada a primeira vacina contra DENV, a CYD-TVD (ChimeriVax-Dengue, Dengvaxia®); atualmente aprovada em 19 países, apesar de ainda não fazer parte do programa nacional de vacinação de nenhum desses (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). Na formulação da CYD-TVD, quatro quimeras virais foram construídas a partir da substituição das proteínas prM/E do YFV-17D pelas correspondentes dos vírus selvagens PUO-359/TVP-1140 (DENV-1), PUO-218 (DENV-2), PaH881/88 (DENV-3) e 1228 (TVP-980) (DENV-4) (GUIRAKHOO et al., 2001).

Na Tailândia, durante o ensaio da fase IIb, a vacina CYD-TVD apresentou uma imunogenicidade de 81,9% contra DENV-3, 90% contra DENV-4, 61,2% contra DENV-1 (61,2%) e uma ausência de eficácia vacinal estatisticamente significativa contra DENV-2 (59%). É possível que a baixa eficácia da vacina contra DENV-2 tenha sido devido à

diferença antigênica ou entre o DENV-2 selvagem sobre o qual foi feita CYD-TVD e o DENV-2 circulante na Tailândia ou entre esse primeiro e o vírus responsável pela infecção na coorte (SABCHAREON et al., 2012).

Os ensaios de fase III, realizados na Indonésia, Malásia, Filipinas, Tailândia e Vietnã, mostraram resultados semelhantes aos do ensaio de fase IIb. A prevenção de infecção observada foi maior que 75% para DENV-3 e DENV-4, 50% para DENV-1 e proteção não estatisticamente significativa para DENV-2 (CAPEDING et al., 2014). Nos testes realizados na América Latina o perfil dos resultados foi semelhante e a vacina mostrou eficácia de 74%, 77,7%, 50,3% e 42,3% para DENV-1 a DENV-4, respectivamente (VILLAR et al., 2015).

No entanto, cumprindo os pré-requisitos de segurança e de não aparecimento de ADE, indivíduos vacinados nos países asiáticos e latino-americanos não apresentaram reações adversas em comparação com o grupo placebo. Apesar disso, houve relato de uma maior frequência de hospitalização causada por DENV entre crianças menores de nove anos três anos após a fase II e III (HADINEGORO et al., 2015). Recentemente, também tem sido descrito um aumento dos casos de dengue severa associados à administração da CYD-TVD em indivíduos soronegativos. Diante disso, no Brasil, a vacina não tem sido indicada para indivíduos sem contato prévio com o DENV (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

Outra abordagem vacinal contra DENV combina várias estratégias de atenuação: quimerização de prM/E entre DENV de diferentes sorotipos, deleção de nucleotídeos em 3'UTR ($\Delta 30$ e $\Delta 30/31$) e atenuação adicional por passagens em camundongos imunodeficientes e transplantados com células de hepatoma (*Severe combined immunodeficient mice transplanted with human hepatoma cells*, SCID-HuH-7), em camundongos imunocompetentes e em macacos rhesus. Ao final das combinações de atenuação, obteve-se oito protótipos vacinais monovalentes, dos quais seis foram selecionados para cinco misturas tetravalentes e avaliados em relação à eficácia vacinal em seres humanos (TV001-TV005) (DURBIN et al., 2011).

Entre essas combinações, a TV003 (DEN1 $\Delta 30$, rDEN2/4 $\Delta 30$, rDEN3 $\Delta 30/31$ e rDEN4 $\Delta 30$) é a mais avançada e se encontra atualmente em fase clínica III. Os resultados da fase I indicaram 100% de proteção quando desafiado com rDEN2 $\Delta 30$ e 100% de soroconversão para DENV-2, -3, -4 e 91,7% para DENV-1 (KIRKPATRICK et al., 2016) (Os resultados da fase II não conseguiram ser acessados até o momento).

A vacina TDV (DENVax) também é uma combinação de vírus quiméricos e atenuados (OSORIO et al., 2011). Nessa vacina, para a imunização contra o DENV-2

utilizou-se um clone infeccioso da cepa PDK-53-V, originada de um DENV-2 isolado de um paciente na Tailândia e atenuado após 53 passagens em células primárias de rim de cachorro (*Primary dog kidney*, PDK). As principais mutações responsáveis por essa atenuação foram localizadas na 5'UTR e nas proteínas não estruturais NS1 e NS3 (BUTRAPET et al., 2000; OSORIO et al., 2011). Para a imunização contra os sorotipos restantes, as proteínas prM/E do DENV-2 PDK-53-V foram substituídas pelas proteínas análogas dos vírus DENV-1 16007, DENV-3 16562 e DENV-4 1036 (OSORIO et al., 2011). A soropositividade do ensaio de fase II foi maior que 95% para DENV-1, -2 e -3 e entre 72,7-100% para DENV-4 (SIRIVICHAYAKUL et al., 2016). Atualmente, a TDV está em fase III de ensaio clínico (NCT02747927).

Apesar de diferentes composições, todas as vacinas anti-DENV mencionadas acima foram feitas por genética reversa e usando as proteínas prM/E como moléculas-alvo. Apesar de serem altamente imunogênicas, essas proteínas possuem regiões conservadas entre os sorotipos, o que pode resultar em reação cruzada entre anticorpos contra vírus de sorotipos distintos, resultando em ADE e no agravamento da dengue (CHOTIWAN et al., 2014; SILVA Jr et al., 2018; SMITH et al., 2015).

Dessa forma, de maneira alternativa, algumas estratégias vacinais tem sugerido a proteína extracelular solúvel NS-1 de DENV como alvo imunogênico (COSTA; FREIRE; ALVES, 2006; WU et al., 2003). A proteína NS-1 solúvel também atua como padrão molecular associado a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), ligando ao receptor semelhante a toll-4 (*toll-like receptor-4*, TLR-4) e levando a uma resposta inflamatória e extravasamento vascular em pacientes com dengue (MODHIRAN et al., 2015). Acredita-se, assim, que vacinas anti-NS1 possam agir na prevenção de quadros de extravasamento de plasma, prevenindo o agravamento da doença. No entanto, já foi relatado que anticorpos anti-NS1 podem reagir de forma cruzada com as proteínas do hospedeiro, inibindo a agregação plaquetária e acarretando a apoptose de células endoteliais (CHENG et al., 2009; LIN et al., 2003).

Outras estratégias vacinas anti-DENV encontram-se em estágio mais inicial de avaliação e envolvem estratégias com vírus atenuado, vírus inativado, vacina de DNA, de subunidade e uso de VLP (AZEVEDO et al., 2011; CHIANG et al., 2011; EDELMAN et al., 1994; FERNANDEZ et al., 2015; HALSTEAD et al., 1984; MARTINEZ et al., 2015; RAVIPRAKASH et al., 2000; SUN et al., 2017; URAKAMI et al., 2017; ZHANG et al., 2011).

2.3.7 Genética reversa

Em comparação aos sistemas de genética reversa para CHIKV e YFV apresentados ao longo deste trabalho, os genomas de DENV apresentam-se como os mais instáveis quando manipulados em protocolos convencionais de clonagem em *E. coli*. Acredita-se que quando os clones de DENV são mantidos nesses procaríotos, o sistema de tradução do microrganismo reconheça promotores crípticos dentro do genoma viral, levando à tradução de peptídeos ou proteínas tóxicas e a conseqüentes alterações nucleotídicas, como inserções ou deleções (PU et al., 2011).

Dentre as alternativas para contorno dessa instabilidade, genomas de DENV têm sido mutados silenciosamente para redução da toxicidade à bactéria ou clonados em cromossomos artificiais de levedura (*Yeast artificial chromosome*, YAC) ou de bactéria (*Bacterial artificial chromosome*, BAC) (DE BORBA et al., 2012; PIERRO et al., 2006; POLO et al., 1997; PU et al., 2011).

Nos sistemas de Polo et al. (1997), vírus DENV-2 recombinantes foram recuperados de forma estável a partir da manipulação do genoma viral em YAC ou em *shuttle vector* para *E. coli* e levedura. Pu et al. (2011) também descreveram a recuperação de clones infecciosos estáveis de DENV-2 mediante a inserção de mutações silenciosas nas regiões pM-E-NS1 capazes de reduzir a atividade críptica dos promotores de bactéria. Pierro et al. (2016) recuperaram DENV-2 recombinante a partir da transcrição *in vitro* do genoma clonado previamente em BAC. Apesar das diferentes estratégias e dos diferentes vetores, todos esses sistemas de genética reversa foram dependentes de transcrição *in vitro* por SP6 ou T7 para a geração da partícula infecciosa.

À semelhança dos sistemas para YFV, DENV recombinantes também foram recuperados: a) através da estratégia de clonagem do genoma em dois plasmídeos (SANTOS et al., 2014); b) transfectando diretamente o genoma viral clonado em BAC sob o comando do promotor do CMV (AUBRY et al., 2014) e; c) pela transfecção de ISA (USME-CIRO et al., 2014).

Com essas ferramentas de clonagem contornando o problema da instabilidade dos clones de DENV, uma das principais aplicações de seus sistemas de genética reversa é a construção de vírus atenuados e quimérico para fins vacinais. Embora haja a sugestão de várias plataformas para a construção de protótipos vacinais para DENV, como vacinas de vírus atenuado e inativado, vacina de DNA, vacina de subunidade, VLP, a única vacina licenciada contra o vírus (CYD-TVD) e as que estão em mais avançada fase de avaliação,

(TV003 e DENVax), foram todas produzidas por genética reversa viral (AZEVEDO et al., 2011; CHIANG et al., 2011; EDELMAN et al., 1994; FERNANDEZ et al., 2015; HALSTEAD et al., 1984; MARTINEZ et al., 2015; RAVIPRAKASH et al., 2000; SUN et al., 2017; URAKAMI et al., 2017; ZHANG et al., 2011).

A despeito da aplicação em vacinas, genoma do DENV também tem sido manipulado para a construção de vírus, replicon e PIVs para avaliação de candidatos antivirais, estudo de função de proteína viral e de mecanismo de replicação do RNA_v (DE BORBA et al., 2015; GEBHARD et al., 2016; HSU et al., 2012; KATO et al., 2016; LEARDKAMOLKARN; SIRIGULPANIT, 2012; MASSÉ et al., 2010; NG et al., 2007; PUIG-BASAGOITI et al., 2006; QING et al., 2010; YANG et al., 2011, 2013).

A função da proteína NS3 na morfogênese da partícula viral, por exemplo, foi elucidada com o uso de vírus repórter de DENV em estudos de mutação sítio-dirigida (GEBHARD et al., 2016). Em outro estudo, DENV repórter também foi usado para investigação de elementos *cis* da região codificadora da proteína C que são importantes para a circularização do genoma do DENV e regulação da replicação viral (DE BORBA et al., 2015).

Em relação à triagem de candidatos antivirais e avaliação de fenótipos de resistência do vírus, são diversos os sistemas de genética reversa para DENV direcionados para esse fim (HSU et al., 2012; LEARDKAMOLKARN; SIRIGULPANIT, 2012; MASSE et al., 2010; NG et al., 2007; PUIG-BASAGOITI et al., 2006; YANG et al., 2011, 2013).

Em um desses estudos, a avaliação da inibição do BRC sobre a replicação viral do DENV foi realizada com o uso de um replicon expressando o gene repórter GLuc. No mesmo trabalho também foi verificada que uma mutação correspondente a troca de uma asparagina por uma histidina no aminoácido 374 da proteína NS3 (N374H) seria responsável por um fenótipo de resistência do vírus a BRC. A verificação da importância dessa mutação sobre resistência viral foi então analisada pela inserção de N374H em um clone infeccioso de DENV-1 e no replicon reporter com GLuc (KATO et al., 2016). Em outra avaliação antiviral, o achado que o triaril pirazolina inibe a replicação de DENV através da supressão da tradução das proteínas víricas foi obtido através do uso de um replicon de DENV-1 expressando o gene repórter RLuc (PUIG-BASAGOITI et al., 2006). Células de carcinoma de pulmão humano (células A549) expressando o replicon de DENV associado ao gene repórter RLuc também foram usadas para avaliação do silenciamento da biossíntese de colesterol sobre a replicação do DENV (ROTHWELL et al., 2009).

Por fim, partículas pseudo-infecciosas repórteres de DENV são exemplos de outras aplicações de genética reversa para o vírus, sendo sugeridas para triagem de candidatos

antivirais que ajam sobre a entrada, tradução e replicação do vírus (QING et al., 2010).

3 JUSTIFICATIVA

Infecções por arbovírus têm sido um motivo de preocupação constante na saúde pública dos países e territórios das regiões tropicais e subtropicais. As infecções por CHIKV, frequentemente sintomáticas, apresentam uma considerável morbidade, principalmente em relação às artralgias durante a fase aguda e crônica da doença. A febre amarela, apesar dos mais de 80 anos do último relato de sua transmissão pelo ciclo urbano no Brasil, ainda se apresenta endêmica para a transmissão silvestre em determinadas áreas, com surtos da infecção também sendo descritos periodicamente em outras regiões. Nas infecções por DENV, embora se observe um amplo espectro clínico e grande parte das doenças cursem apenas uma semana, as complicações decorrentes da hemorragia podem levar uma parcela dos infectados a óbito.

Estrategicamente, as tentativas de controle dos insetos vetores enfrentam vários obstáculos e por si só não são eficazes para conter os surtos e epidemias ou para evitar a expansão dos vírus para áreas originalmente sem circulação do agente. Por outro lado, não há uma vacina licenciada anti-CHIKV e as vacinas disponíveis para YFV e DENV apresentam uma distribuição restrita. Mesmo para a vacina de estágio mais avançado de desenvolvimento contra CHIKV, com fase clínica II concluída, não se tem previsão quanto a sua distribuição. A vacina anti-YFV, apesar do seu uso desde o final dos anos 1930, ainda não apresenta uma cobertura capaz de evitar o surgimento de novos surtos de febre amarela. A vacina CYD-TVD, licenciada contra a DENV em 2015, ainda não faz parte do calendário vacinal de nenhum dos países que aprovaram seu uso. No mais, nenhuma desses arbovírus têm droga licenciada para seu tratamento.

É nesse contexto que os sistemas de genética reversa viral podem ser úteis, podendo ser aplicados para investigação da biologia viral, da interação dos vírus com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados, para a construção de vírus recombinantes vacinais e como ferramenta para triagem de candidatos antivirais. Em adição, faz-se também necessário que esses sistemas sejam desenvolvidos de forma simples e rápida a fim de serem disponibilizados em tempo hábil, principalmente nas áreas endêmicas para arboviroses. Cumprindo esses critérios, a técnica de recombinação homóloga em levedura se apresenta com menos laboriosidade e menos custo em comparação às clonagens convencionais em *E. coli*, podendo ser direcionada para a manipulação de diversos genomas virais.

Dessa forma, ao reconhecer: a) o impacto na saúde pública das infecções por CHIKV, YFV e DENV; b) as limitações de suas estratégias de prevenção e tratamento; e c) as

possibilidades de aplicação seguidas à manipulação dos genomas virais, percebe-se a importância do desenvolvimento e da caracterização dos sistemas de genética reversa em levedura descritos a seguir.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Desenvolver um sistema de genética reversa em levedura capaz de recuperar vírus e replicons recombinantes de CHIKV e caracterizar sistemas de genética reversa para YFV e DENV.

4.2 Objetivos específicos

- a) Construir e caracterizar fenotipicamente o clone infeccioso (*Infectious clone*, IC) IC-CHIKV-99659;
- b) Desenvolver e avaliar a funcionalidade e estabilidade da linhagem celular recombinante expressando o subgenoma do CHIKV e o gene repórter GLuc, BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659;
- c) Caracterizar fenotipicamente e avaliar a estabilidade do vírus recombinante da febre amarela expressando o gene repórter GLuc, YFV-GLuc;
- d) Caracterizar fenotipicamente o vírus recombinante da dengue, pSVJS01-DENV2, e analisar a integridade gênica de sua região do envelope.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Sistema de genética reversa para o vírus chikungunya

Os tópicos adiante descrevem a construção e caracterização do sistema de genética reversa construído para CHIKV.

5.1.1 Cultivo de células

Células BHK-21 (*Baby hamster kidney*) e células Vero foram mantidas em meio MEM (*Minimal essential medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Células de mosquito *Ae. albopictus*, clone C6/36, foram mantidas em meio Leibovitz L15 com 10% de SFB, 2mM L-glutamina a 28°C. Em todos os cultivos, os meios também foram suplementados com 1% de antibiótico (penicilina 10.000U/mL e estreptomicina 10.000µg/mL). Todos os reagentes da Gibco.

5.1.2 Construção do clone infeccioso IC-CHIKV-99659 e replicon Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659

Todas as construções foram feitas por recombinação homóloga em levedura *Saccharomyces cerevisiae* (cepa RFY 206).

5.1.2.1 Clone infeccioso IC-CHIKV-99659

A sequência do genoma da cepa 99659 (GenBank KJ451624), isolada em 2014 nas Ilhas Virgens Britânicas (Caribe), foi quimicamente sintetizada (GenScript) em dois fragmentos, o primeiro fragmento (fragmento 1, correspondente à região codificante das proteínas não estruturais do CHIKV) com 7.489pb (posição do nucleotídeo 1 ao 7.489 do genoma viral) e o segundo (fragmento 2, referente à região codificante das proteínas estruturais e acessórias do CHIKV) com 4.522pb (posição 7.490 ao nucleotídeo final 12.011 do genoma viral); ambos fragmentos após serem sintetizados foram clonados isoladamente no vetor pUC57 pela mesma empresa.

Para a construção do clone infeccioso IC-CHIKV-99659, foi utilizado o plasmídeo pBSC-HDR, um *shuttle vector* previamente construído pela Dr^a Laura Gil, digerido

com a enzima Bam-HI (New England Biolabs) em uma reação de 20µL, nas condições: 1µL de Bam-HI (20.000U/mL), 3µg do vetor pBSC-HDR e 2µL tampão NEB 3.1, por 37°C durante 6 horas.

Em seguida, a fim de diminuir a chance de religação e circularização do vetor e reduzir o número de colônias negativas para clonagem, o vetor foi desfosforilado na extremidade 5' com 1µL de fosfatase (*Calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP, 20U/µL) (Promega) a 37°C por 40 minutos.

A digestão linearizou o vetor e o deixou com extremidades homólogas à extremidade 5' e 3' dos fragmentos 1 e 2, respectivamente, após esses serem amplificados com os oligonucleotídeos de recombinação homóloga pBSC-BamHI-T7Phi2.5-5'CHIKV-F/CHIKV-7515R e CHIKV-7490F/ pBSC-SpeI-3'CHIKV-R, respectivamente (Quadro 3).

A amplificação desses fragmentos foi feita com a enzima *Phusion DNA Polymerase* (New England Biolabs) em uma reação para 50µL: 10µL de 5X *Phusion HF*, 1µL de dNTPs a 10mM, 5µL de oligonucleotídeo *forward* a 5µM, 5µL de oligonucleotídeo *reverse* a 5µM, 0,5µL da enzima *Phusion DNA* e 50ng de DNA. As condições das reações foram: desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, seguido de 32 ciclos (desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 7 minutos) mais uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Quadro 3 - Oligonucleotídeos usados na clonagem e recuperação do vírus recombinante IC-CHIKV-99659

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
^a pBSC-BamHI-T7Phi2.5-5'CHIKV-F	^{c, d} CAAGCATGTAAATATCGTTTGAGTTGGATCCCAGT AATACGACTCACTATTTATGGCTGCGTGAGACACACG TAG
^b CHIKV-7515R	GCAAAATAGGTAGCTGTAGTGCGTACCTATTTAGGAC CGCCGTACAAG
CHIKV-7490F	GTACGCACTACAGCTACCTATTTTGC
pBSC-SpeI-3'CHIKV-R	ATATGCATAGTACCGAGAACTAGAACTAGTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAA ATATTAAAAACAAAATAACATCTCC

Fonte: Do autor, 2018

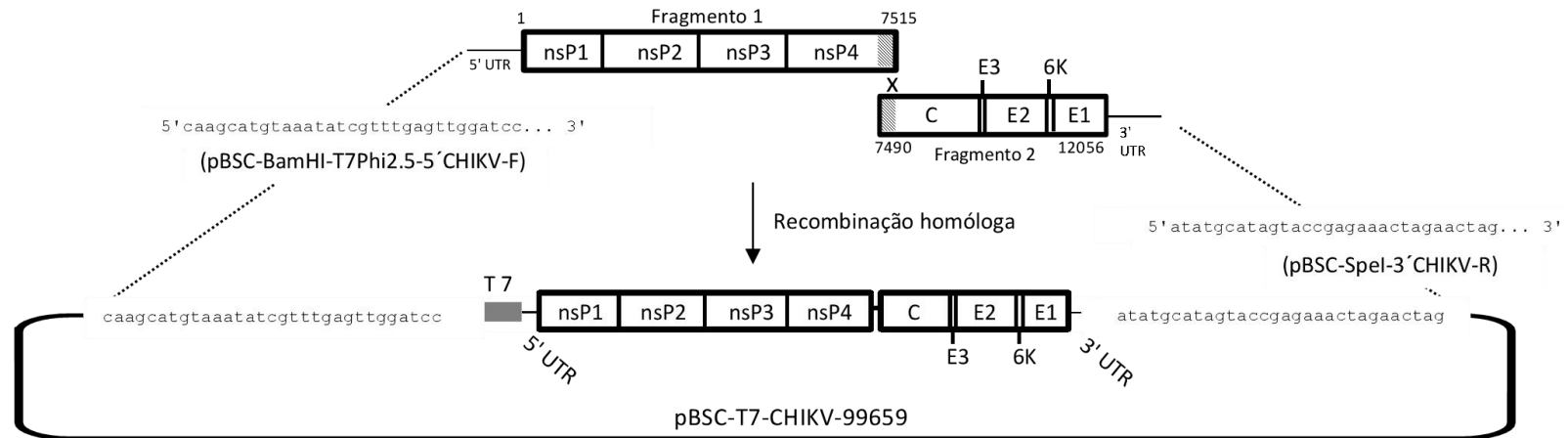
Legenda: ^a Oligonucleotídeo *forward*;

^b Oligonucleotídeo *reverse*;

^c Os nucleotídeos sublinhados correspondem às regiões de homologia usadas na recombinação;

^d Os nucleotídeos em itálico correspondem à sequência promotora da enzima RNA polimerase T7

De posse do vetor pBSC-HDR linearizado e dos fragmentos 1 e 2 do CHIKV-99659 amplificados, a clonagem entre esses foi realizada por recombinação homóloga em levedura (Figura 36), segundo o protocolo descrito no tópico 5.1.3, resultando ao final no plasmídeo pBSC-T7-CHIKV-99659. A confirmação da clonagem foi realizada através da amplificação da região de intersecção entre os fragmentos 1 e 2 com os oligonucleotídeos CHIKV-7300-F (GCTGGCTGATGAAGTAATCAG)/ CHIKV-7796-R (GTATTGTTTCGTGGCGCCTGC).

Figura 36 - Diagrama da estratégia usada para construção do clone infeccioso IC-CHIKV-99659

Fonte: Do autor, 2018

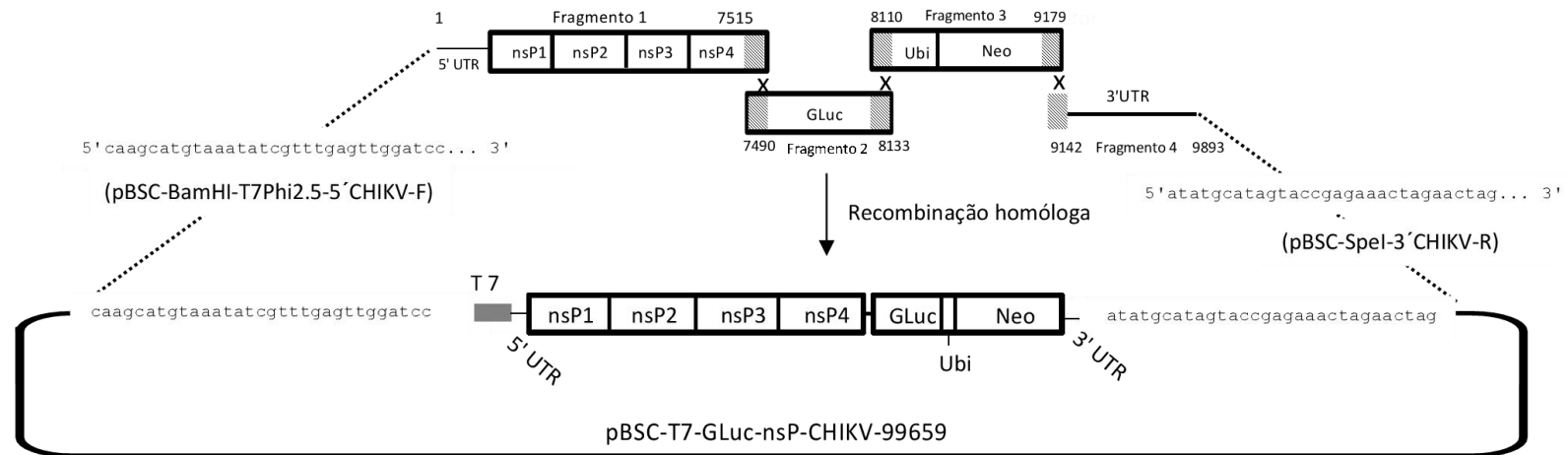
Nota: Após a amplificação dos fragmentos 1 e 2 com os oligonucleotídeos de recombinação homóloga (Quadro 3), as sequências codificantes das proteínas não estruturais e estruturais do vírus chikungunya 99659 puderam ser clonadas por recombinação homóloga em levedura no vetor pBSC-HDR, previamente digerido com a enzima Bam-HI, obtendo-se ao final o plasmídeo pBSC-T7-CHIKV-99659.

5.1.2.2 Replicon Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659

O replicon expressando GLuc, Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659, foi construído pela recombinação homóloga entre quatro fragmentos: a) fragmento 1, responsável pela codificação das proteínas não estruturais do CHIKV-99659 (nsP1-nsP4) e amplificado a partir do fragmento 1 sintetizado quimicamente (Tópico 5.1.2.1); b) fragmento 2, codificando a sequência do gene repórter GLuc e amplificado a partir da construção pGLuc-NS construct (WF10) (cedida gentilmente pelo Dr. Daniel Perez, *University of Georgia*); c) fragmento 3, cassete formado pela região de ubiquitinação e gene da neomicina fostotransferase (Ubi-Neo), amplificado a partir do clone YFVLucNeoIRES (previamente construído no Departamento de Virologia e Terapia Experimental, IAM); e d) fragmento 4, correspondente à sequência 3' UTR do CHIKV-99659, amplificado a partir do fragmento 2 usado para a construção do clone infeccioso IC-CHIKV-99659 (Tópico 5.1.2.1).

A estratégia de recombinação homóloga para a construção do replicon repórter encontra-se esquematizada na figura 37.

Figura 37 - Diagrama da estratégia usada para construção do replicon repórter do vírus chikungunya, Rep-GLuc-nsP-CHIKV-99659



Fonte: Do autor, 2018

Nota: O plasmídeo pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659, contendo o subgenoma repórter do chikungunya 99659 (CHIKV-99659), foi obtido pela recombinação homóloga do vetor pBSC-HDR com quatro fragmentos: fragmento 1 - cassete de proteínas não estruturais do chikungunya 99659; fragmento 2 - gene repórter *Gaussia luciferase* (GLuc); fragmento 3 - região de ubiquitinação, gene da neomicina fosfotransferase; e fragmento 4 - região 3' não traduzida (*untranslated regions*, UTR) do CHIKV-99659. Os oligonucleotídeos de recombinação homóloga usados para cada amplificação de inserto podem ser encontrados no Quadro 4.

Os fragmentos 1, 2, 3 e 4 foram amplificados, respectivamente, com os oligonucleotídeos pBSC-BamHI-T7Phi2.5-5'CHIKV-F/CHIKV-7515R, CHIKV1-GLuc-F/GLuc-Ubiq-R, Ubiq-F/CHIKV1-Neo-R, CHIKV-3UTR-F/pBSC-SpeI-3'CHIKV-R (Quadro 4).

Quadro 4 - Oligonucleotídeos usados para a clonagem e recuperação do replicon RepT7-GLuc-nsP-CHIKV-99659

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
^a pBSC-BamHI-T7Phi2.5-5'CHIKV-F	^{c, d} CAAGCATGTAAATATCGTTTGAGTTGGATCCCAGTAAT ACGACTCACTATTATGGCTGCGTGAGACACACGTAG
^b CHIKV-7515R	GCAAAATAGGTAGCTGTAGTGCGTACCTATTTAGGACCGC CGTACAAG
CHIKV1-GLuc-F	GTACGCACTACAGCTACCTATTTTGCAAAGCCGACAGCA GGTACCTAAATACCAATCAGCCATAATGGGAGTCAAAGTT CTGTTTGCCCTG
pBSC-SpeI-3'CHIKV-R	atatgcatagtaccgagaaactagaactagTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAATATTAA AAACAAAATAACATCTCC
GLuc-Ubiq-R	CACGAAGATCTGCATGTTTAAACCGTCACCACCGGCCCCC TTGATC
Ubiq-F	GGTTTAAACATGCAGATCTTCGTGAAG
CHIKV1-Neo-R	CTTTAGGGACGCGTATGCCTTCATACCTAGTTGTCAAGTC AGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAG
CHIKV-3UTR-F	CTTGACAACACTAGGTATGAAGGCATAC

Fonte: Do autor, 2018

Legenda: ^a Oligonucleotídeo *forward*;

^b Oligonucleotídeo *reverse*;

^c Os nucleotídeos sublinhados correspondem às regiões de homologia usadas na recombinação;

^d Os nucleotídeos em itálico correspondem à sequência promotora da enzima RNA polimerase T7

Todas essas amplificações foram feitas com a enzima *Phusion DNA Polymerase* (New England Biolabs) conforme descrito anteriormente. Os amplicons em seguida foram recombinados no vetor pBSC-HDR linearizado e desfosforizado e o sucesso da clonagem foi confirmado através de uma amplificação da extremidade 3' UTR das construções com os

oligonucleotídeos pBSC-SpeI-3'CHIKV-R e CHIKV-3UTR-F (Quadro 4).

Ao final da recombinação, o clone obtido, pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 (Figura 37), apresentou sob o domínio do promotor genômico o cassete de proteínas não estruturais nsP1-nsP4 do CHIKV-99659 e sob o comando do promotor subgenômico, o cassete formado pelo GLuc, a região de ubiquitinação e gene da neomicina fosfotransferase. A região de ubiquitinação colocada adjacente ao gene repórter é necessária à clivagem e liberação da proteína repórter e o gene da neomicina fosfotransferase foi útil para seleção das células transfectadas durante o desenvolvimento da linhagem celular recombinante BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 (Tópico 5.1.11).

5.1.3 Recombinação homóloga em levedura

Para cada construção, pBSC-T7-CHIKV-99659 e pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659, a levedura *S. cerevisiae* RFY 206 foi crescida em 10mL de meio líquido *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) por 18 horas a 30°C, sob agitação constante. Após esse tempo, foi calculado quanto do volume inicial deveria ser inoculado em 30mL de YPD, a fim de que ao final o volume tivesse uma densidade óptica (DO) de 0,2.

Em seguida, as células foram crescidas até uma DO de 0,6 durante aproximadamente quatro horas de incubação. Após o crescimento, as leveduras foram concentradas por centrifugação (335×g por 5 minutos), lavadas com água milli-Q estéril e transformadas com acetato de lítio (*lithium acetate*, LiAc). Para isso, após a lavagem descrita acima, as células foram novamente concentradas (335×g por 10 minutos) e ressuspensas em 2mL de 1X TE [Tris-HCl, 10M, pH 8,0/*ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA), 1M, pH 8,0]/LiAc, sendo cada 1mL distribuído em dois tubos. Em cada tubo, as células foram lavadas outras duas vezes com 1X TE/LiAc (335×g por 10 minutos). Em seguida, as leveduras foram ressuspensas em solução contendo 2µL de LiAc, 2µL de TE, ambos 1X, 30µg de carreador (*Salmon Sperm*, Invitrogen, aquecido a 100°C por cinco minutos) e insertos e vetor (para as reações de clonagens) ou apenas vetor (como controle negativo). Adiante, 140µL da solução 1X TE/LiAc/Polietilenoglicol (PEG, peso molecular de 3.350) a 50% foi adicionada às suspensões e em seguida foram incubadas por 40 minutos a 30°C.

Passado esse tempo, 20µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados e as

células incubadas a 42°C por 20 minutos. Ao final, as células foram centrifugadas a 335×g por 10 segundos, ressuspensas em 200µL de solução de aminoácidos sem triptofano (-K) e cada suspensão foi plaqueada em meio de seleção [*Yeast Nitrogen Base* (YNB) - K] e mantidas a 30°C por três dias.

As colônias selecionadas foram crescidas em 20mL de meio YNB líquido (-K) por 20 horas a 30°C. Com o término da incubação, as células de RFY 206 foram centrifugadas (335×g por 10 minutos) e lavadas com água milli-Q. Depois da lavagem, as células foram novamente centrifugadas (335×g por 10 minutos) e ressuspensas em 400µL de tampão SCE (1M Sorbitol, 100mM de acetato de sódio, NaAc, e 60mM de EDTA). Ao ressuspensado, foram adicionados 4µL de zimolase (200mg/mL) e 2µL de β-mercaptoetanol. As células foram incubadas a 37°C por uma hora e depois centrifugadas a 335×g por 10 minutos. Terminada essa etapa, a extração do DNA plasmideal seguiu-se com o kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen), segundo instruções do fabricante e a clonagem foi confirmada por amplificação de parte dos insertos, como apresentado nos tópicos 5.1.2.1 e 5.1.2.2.

5.1.4 Transformação de *Escherichia coli* cepa DH10B com os clones selecionados

Após a confirmação dos clones, a fim de adquirir uma maior quantidade de DNA, os plasmídeos foram introduzidos em 50µL de suspensão de *E. coli* cepa DH10B (Invitrogen) com eficiência de 10⁸células/µg de DNA. A transformação foi feita por eletroporação, nas condições: cuvetas de 1mm, 2.750 volts, 99µs e 5 pulsos com intervalo de 1 segundo (eletroporador ECM-830, BTX Harvard Apparatus)

Seguida à eletroporação, as bactérias foram distribuídas em placas com meio Lúria Bertani (LB) com 100µg/mL de cloranfenicol e incubadas a 37°C durante 18 horas. As colônias foram crescidas em 5mL de meio LB com 100µg/mL de cloranfenicol a 37°C, 150rpm, durante 18 horas. Essas células foram então inoculadas em 500mL de meio LB com o antibiótico de seleção e incubadas a 37°C por 18 horas. Ao final, as células foram concentradas por centrifugação (335×g por 10 minutos) e o DNA plasmideal foi extraído utilizando-se o kit *Plasmid Midi* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

5.1.5 Amplificação do genoma completo dos clones infecciosos e replicons

Após a extração do DNA clonal, foi realizada a amplificação completa do genoma do vírus e do replicon repórter contidos nos plasmídeos pBSC-T7-CHIKV-99659 e pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659, respectivamente.

A amplificação ocorreu em uma reação de 50µL utilizando a enzima AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Sigma), nas condições: desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos (desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 65°C por 20 segundos e extensão a 68°C por 13 minutos), mais uma extensão final de 10 minutos a 68°C. Os oligonucleotídeos usados na amplificação foram: pBSC-BamHI-T7Phi2.5-5'CHIKV-F (Quadro 3 e 4)/CHIKV-3'UTR-R (TTGAAATATTA AAAACAAAATAA CATCTCCTACGTCCCTATGGGTAC).

Ao final, o produto do PCR foi purificado com fenol-clorofórmio e precipitado com etanol (ThermoFisher), segundo as condições do fabricante.

5.1.6 Transcrição *in vitro*

Após a purificação e precipitação dos amplicons mencionados acima, o precipitado foi ressuspenso em 5µL de reação de transcrição *in vitro* com o kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production System - T7 (Promega) com: 1µL de T7 Transcription 5X Buffer, 1,5µL de rNTPs (25mM de ATP, CTP, UTP e 3mM de GTP), 0,375µL de Ribo m7G Cap Analog (40mM), 0,5µL de Enzyme Mix e 1,625µL de água livre de nucleases; incubada por quatro horas a 37°C.

5.1.7 Transfecção do RNA em células BHK-21

Para a eletroporação, 2 x 10⁶ células BHK-21, preparadas a partir de um cultivo tripsinizado um dia antes, foram lavadas duas vezes com PBS gelado com centrifugações a 335×g por 10 minutos. Posterior à lavagem, o *pellet* celular foi ressuspenso em 100µL de cytomix (120mM KCl, 0,15mM CaCl₂, 10mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,6, 25mM HEPES pH

7,6, 2mM EGTA, 5mM MgCl₂) e adicionados 2mM de ATP e 5mM glutationa. A suspensão celular foi então colocada em cuvetas de 2mm e eletroporada em 140V com pulso de 25msec de comprimento (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad).

Terminada a eletroporação, as cuvetas foram mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos, para fechamento dos poros da membrana celular, e em seguida as células transfectadas com o RNA do clone infeccioso e do replicon repórter foram transferidas para garrafa T25 e placa de 6 poços, respectivamente, e mantidas nas condições de cultivo mencionadas no tópico 5.1.1. Quatro horas pós-semeio, o meio de cultura de todas as transfecções foi trocado por um novo.

5.1.8 Recuperação do clone infeccioso IC-CHIKV-99659

As células BHK-21 eletroporadas com RNA transcrito *in vitro* a partir do plasmídeo pBSC-T7-CHIKV-99659 foram mantidas em cultivo por quatro dias. Após esse tempo, o vírus recuperado contido no sobrenadante celular foi passado quatro vezes em 10⁶ de células Vero cultivadas em garrafa T25. Na passagem de número quatro foi feito o estoque do vírus e sua caracterização fenotípica.

5.1.9 Caracterização fenotípica do IC-CHIKV-99659

5.1.9.1 Ensaio de placa

Células Vero foram semeadas em placas de 12 poços (10⁵ células/poço) e no dia seguinte foram infectadas com diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁶) do vírus recombinante IC-CHIKV-99659. Após duas horas de adsorção a 37°C, o inóculo foi removido e as células foram cobertas com meio MEM contendo 0,3% de agarose, 5% de SFB e incubadas a 37°C por sete dias. Após a incubação, as células foram fixadas em formalina (10%) e coradas com cristal violeta (0,05%).

5.1.9.2 Cinética de replicação viral

Para determinar a eficiência de replicação do vírus recuperado, células Vero foram semeadas em placa de 24 poços (5×10^4 células/poço) e um dia após foram infectadas com o IC-CHIKV-99659 a uma multiplicidade de infecção (*Multiplicity of Infection*, MOI) de 3. Após duas horas de incubação a 37°C , o inóculo foi removido e a monocamada de células foi lavada três vezes com MEM. Em seguida, meio MEM contendo 5% de SFB foi adicionado e as células foram incubadas a 37°C . Os sobrenadantes foram coletados nos tempos 24, 48, 72, e 96 horas pós-infecção e armazenados a -80°C . Os títulos virais de cada tempo da curva foram então avaliados por ensaio de placa, nas mesmas condições descritas no tópico anterior.

5.1.10 Infecção do vírus recombinante IC-CHIKV-99659 em células BHK-21 e C6/36

Células BHK-21 e C6/36 foram infectadas com o vírus IC-CHIKV-99659 a MOI de 1 e foram acompanhadas até sete dias pós-inóculo para observação do ECP.

5.1.11 Linhagem celular BHK-21 -T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659

Três dias após a transfecção das células BHK-21 com RNA do replicon repórter, RepT7-GLuc-nsP-CHIKV-99659, o meio de cultivo foi suplementado com a droga de seleção geneticina ($700\mu\text{g}/\text{mL}$) (Invitrogen) e mantido por dez dias.

Ao final dos dez dias, as colônias de células selecionadas, identificadas como BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659, foram individualizadas com uso de discos de clonagem estéreis de 3,2mm de diâmetro (Sigma-Aldrich) embebidos de tripsina (Gibco). As células tripsinizadas e aderidas aos discos de clonagem foram transferidas para placa de cultura de 24 poços, mantidas em meio MEM (Tópico 5.1.1), acrescido agora de $500\mu\text{g}/\text{mL}$ de geneticina. As células da linhagem BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 foram então amplificadas e na passagem três e 13 (p3 e p13) foi feita a quantificação da atividade da GLuc. As leituras de ambas passagens foram comparadas pelo teste *T-student* pareado.

5.1.12 Leitura da atividade da *Gaussia* luciferase

Células BHK-21 selvagem e células da linhagem BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 em p3 e p13 foram semeadas em placa de 96 poços (10^5 células/ poço). Dezoito horas pós-semeio, 10 μ L do sobrenadante de cada cultivo foi coletado e a leitura da GLuc foi realizada em luminômetro Mithras LB 940 *Multimode Microplate Reader* (Berthold) com o kit BioLux *Gaussia Luciferase Assay* (New England BioLabs), segundo instruções do fabricante. O resultado final foi apresentado em aumento de unidade relativa de luz (*Relative light units*, RLU) do sobrenadante da linhagem BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 em relação ao controle negativo (células BHK-21 selvagens).

5.2 Sistema de genética reversa para o vírus da febre amarela

Os experimentos descritos adiante foram realizados para a caracterização e avaliação da estabilidade de um YFV recombinante expressando o gene repórter GLuc (YFV-GLuc), construído previamente no Departamento de Virologia e Terapia Experimental (IAM). A metodologia e os resultados aqui apresentados, mais a construção, recuperação e aplicação do YFV-GLuc para a avaliação de compostos antivirais estão contidos no apêndice B deste trabalho, no artigo *Construction and characterization of a recombinant yellow fever virus stably expressing Gaussia luciferase* de Kassir et al. (2017).

5.2.1 Células e vírus

Os experimentos de infecção viral em cultivo celular foram feitos em células BHK-21 mantidas em meio MEM suplementado com 5% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina 10.000U/mL e estreptomicina 10.000g/mL, Gibco).

O vírus repórter YFV-GLuc foi construído a partir da substituição do gene repórter da proteína fluorescente amarela (*Yellow fluorescent protein*, YFP) do vírus YFVYFP-DENV1linker (Gil e Almeida-Queiroz, submetido) pela sequência gênica da GLuc. A construção foi obtida por recombinação homóloga em levedura e os detalhes da clonagem e recuperação da partícula viral podem ser encontrados em Kassir et al. (2017).

O vírus parental YFV-17D, usado para fins de comparação fenotípica com o YFV-GLuc, foi recuperado previamente pela Dr^a Laura Gil através da transfecção de células BHK-21 com o RNA transcrito *in vitro* do YFV-17D.

5.2.2 Titulação viral

Os vírus YFV-17D e YFV-GLuc foram titulados por ensaio de placa. Para isso, células BHK-21, semeadas no dia anterior em placas de 6 poços (3×10^5 células por poço), foram inoculadas com diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) de cada vírus. Após a adsorção de uma hora a 37°C , o inóculo foi removido e as células foram cobertas com meio MEM contendo 1% de agarose, 5% de SFB e incubadas novamente a 37°C . Ao final de cinco dias, as células foram fixadas em formalina (10%) e coradas com cristal violeta (0,05%).

5.2.3 Cinética de replicação viral

Células BHK-21, semeadas um dia antes em placas de 24 poços (8×10^4 células /poço), foram infectadas a uma MOI de 0,1 dos vírus YFV-GLuc e YFV-17D. Posterior ao inóculo, o sobrenadante celular foi coletado em 24, 48 e 72 horas pós-infecção e armazenado a -80°C . A curva foi então construída pela quantidade de moléculas de RNA_v/μL (log) obtidas por qRT-PCR. Estatisticamente, para análise comparativa entre a cinética de replicação dos dois vírus, foi realizado o teste *T-student* pareado.

5.2.4 RT-PCR em tempo real

O RNA_v de cada ponto da curva de replicação foi extraído de 140μL do sobrenadante, utilizando o kit *Viral RNA Isolation* (Macherey-Nagel), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o genoma viral foi amplificado por qRT-PCR com o kit *QuantiTect SYBR Green RT-PCR* (Qiagen), nas seguintes condições: transcrição reversa a 50°C por 30 minutos, 95°C por 15 minutos para ativação da enzima *HotStarTaq DNA Polymerase*, seguido de 35 ciclos (94°C por 15 segundo para a desnaturação inicial, 60°C por 30 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos e extensão a 72°C por 30 segundos). Nas

reações foram utilizados 0,4 μ M do oligonucleídeo *forward* (YFS: AATCGAGTTGCTAGGCAATAAACAC) e do *reverse* (YFAS: TCCCTGAGCTTTACGACCAGA), previamente descritos por Dash et al. (2012) e que anelam na região de intersecção entre a 5'UTR do YFV e a sequência do capsídeo. Todas as reações foram realizadas em duplicata, utilizando o 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM.

Como controle negativo foi realizada uma reação sem a adição de RNA e uma outra a partir de RNA extraído de células BHK-21 não infectadas. Na primeira reação, o controle serviu para confirmar a ausência de contaminação dos reagentes, e na segunda, o controle negativo foi útil para verificar a possibilidade de células previamente contaminadas ou de amplificação inespecífica. Células BHK-21 infectadas com YFV-17D foram usadas como controle positivo das reações. Para a quantificação dos amplificados foi realizada uma curva padrão a partir da diluição seriada de concentração conhecida de um transcrito *in vitro* da região entre 5'UTR e sequência do capsídeo, como comentado acima.

5.2.5 Cinética de atividade da *Gaussia* luciferase

Os sobrenadantes coletados durante a curva replicação do YFV-GLuc foram usados adiante para a quantificação da atividade da GLuc. A leitura do gene repórter foi feita em duplicata no luminômetro Mithras LB 940 *Multimode Microplate Reader* (Berthold) (New England BioLabs) e com o kit BioLux *Gaussia Luciferase Assay* (New England BioLabs) a partir de 10 μ L de cada sobrenadante. Ao final, a fim de avaliar a relação entre atividade do gene repórter e replicação viral, foi feita uma correlação linear (r^2) entre as leituras da GLuc e os resultados da cinética de replicação do YFV-GLuc.

5.2.6 Estabilidade do vírus repórter YFV-GLuc

Para avaliar a estabilidade genética do YFV-GLuc, o vírus recombinante foi passado seis vezes, a MOI de 1, em células BHK-21. Cada passagem foi cultivada aproximadamente por cinco dias, tempo necessário para a visualização do ECP em 70-80% do cultivo celular.

Em p6, foi-se avaliado a integridade do gene repórter GLuc. O RNAv foi extraído de 140µL de sobrenadante com o kit *Viral RNA Isolation* (Macherey-Nagel), seguindo as instruções do fabricante, e a sequência da GLuc foi amplificada com uso do kit *One-Step RT-PCR* (Qiagen), nas condições: transcrição reversa a 50°C por 30 minutos, inativação da enzima RT e ativação da DNA polimerase a 95°C durante 15 minutos e 32 ciclos com desnaturação inicial por 94°C durante 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e extensão a 72°C por mais 1 minuto. Para a reação de RT-PCR foram usados 0,4µM dos oligonucleotídeos YFV-2375-F (ACAAGAAACATGACAATGTCC) e YFVNS1-2502-R (TCTCCGCACTTGAGCTCTC).

A presença de mutação no gene GLuc foi avaliada em seguida por sequenciamento gênico com o par de oligonucleotídeos YFV-2375-F (ACAAGAAACATGACAATGTCC) e YFVNS1-2502-R (TCTCCGCACTTGAGCTCTC). As reações foram realizadas no NPT (IAM) com o kit *BigDye terminator cycle sequencing* (Applied Biosystems) e o produto da reação separado no sequenciador ABI 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa ApE (*A plasmid Editor*) v1.10.4.

A atividade da GLuc após seis passagens do YFV-GLuc também foi avaliada, com o resultado sendo expresso em quantidade de aumento de RLU em relação ao controle negativo, esse correspondente a células BHK-21 não infectadas e mantidas nas mesmas condições de cultivo.

5.3 Sistema de genética reversa para o vírus dengue

Os experimentos a seguir foram realizados a fim de caracterizar o vírus recombinante pSVJS01-DENV2, previamente obtido no departamento de Virologia e Terapia Experimental/IAM. A metodologia e os resultados referentes à construção, recuperação e caracterização do pSVJS01-DENV2 são encontrados no artigo de Santos et al. (2015) *Full-length infectious clone of a low passage dengue virus serotype 2 from Brazil*, apresentado no apêndice C ao final deste trabalho.

5.3.1 Células e vírus

Todas as infecções virais realizadas neste trabalho foram feitas em células BHK-21 mantidas em meio MEM acrescido de 5% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina 10.000U/mL e estreptomicina 10.000g/mL, Gibco).

O vírus pSVJS01-DENV2 usado nos ensaios de caracterização corresponde a um clone infeccioso obtido por recombinação homóloga em levedura a partir do genoma do vírus DENV2 BR-3808. O vírus parental foi isolado durante um surto de DENV em Pernambuco (Brasil) durante o ano de 1995 e antes de ser usado para a construção do clone infeccioso foi cultivado cinco vezes em célula (três vezes em C6/36 e duas vezes em BHK-21). Detalhes sobre a construção e recuperação do pSVJS01-DENV2 podem ser consultados em Santos et al. (2015) (apêndice C).

5.3.2 Titulação viral

Os títulos dos vírus pSVJS01-DENV2 e do DENV2 BR-3808 foram obtidos por ensaio de placa. Células BHK-21 semeadas um dia anterior em placas de 6 poços (3×10^5 células por poço) foram inoculadas com diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) dos vírus pSVJS01-DENV2 e do DENV2 BR-3808. Uma hora após a adsorção a 37°C , o inóculo foi removido e as células foram cobertas com meio MEM contendo 1% de agarose, 5% de SFB e incubadas a 37°C por cinco dias. Após a incubação, as células foram fixadas em formalina (10%) e coradas com cristal violeta (0,05%).

5.3.3 Cinética de replicação

Para a cinética de replicação do vírus pSVJS01-DENV2 e do DENV2 BR-3808, células BHK-21 foram semeadas em placas de 24 poços (6×10^4 células/poço). Um dia após o semeio, as células foram infectadas a uma MOI de 0,1 do vírus recombinante e de seu parental. O sobrenadante do ensaio de infecção foi coletado no tempo zero de infecção e após 24, 48 e 72 horas. Os valores de cada ponto da curva foram expressos em moléculas de RNA_v/μL (log), obtidos por qRT-PCR, como apresentado a seguir.

5.3.4 RT-PCR em tempo real

O RNA_v de cada tempo foi extraído a partir de 150µL de sobrenadante com o kit *QIAamp Viral RNA Mini* (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. Após a extração, o genoma viral foi amplificado por qRT-PCR, utilizando o kit *QuantiTect SYBR Green RT-PCR* (Qiagen), nas condições: 50°C por 30 minutos para a transcrição reversa, 95°C por 15 minutos para ativação da enzima *HotStarTaq DNA Polymerase*, seguido de 35 ciclos (94°C por 15 segundo, para a desnaturação inicial, 60°C por 30 segundos para anelamento dos oligonucleídeos e extensão a 72°C por 30 segundos. Para as reações foram utilizados 0,4µM dos oligonucleídeos *forward* (NS5-F: GGAAGGAGAAGGACTGCACA) e *reverse* (NS5-R: ATTCTTGTGTCCCATCCTGCT), descritos em Kong et al. (2006) e com região de anelamento na sequência codificante da proteína NS5. Todas as reações foram conduzidas em duplicata, utilizando o *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) do NPT (IAM).

Os valores de RNA_v de cada amostra foram calculados através de uma curva padrão construída a partir de uma diluição seriada de concentrações conhecidas do transcrito purificado de NS5. Como controles negativos foram feitas uma reação sem RNA e uma com RNA extraído a partir de células BHK-21 não infectadas, à semelhança do descrito no tópico 5.2.4. Como controle positivo, foi usado o RNA extraído de células BHK-21 infectadas por DENV-2.

5.3.5 Análise da sequência gênica da glicoproteína do envelope

A fim de avaliar a estabilidade gênica do vírus pSVJS01-DENV2, a região codificante para a glicoproteína E foi sequenciada e comparada com a sequência do vírus parental DENV2 BR-3808. As reações de sequenciamento foram realizadas no NPT (IAM) com o kit *BigDye terminator cycle sequencing* (Applied Biosystems) e o sequenciador *ABI 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa ApE (*A plasmid Editor*) v1.10.4. Os oligonucleotídeos usados para o sequenciamento estão listados no quadro 5.

Quadro 5 - Oligonucleotídeos usados para o sequenciamento do gene da glicoproteína do envelope dos vírus dengue 2

Oligonucleotídeos	Sequência (5'-3')
DENV2-558F ^a	CCTTGGTGAATTGTGTGAAGA
DENV2-1000F	GACATAGTCTTAGAACATGGAAG
DENV2-1163F	CACAAGGGGAACCCAGTCTA
DENV2-1240R ^b	CCCATCCTCTGTCTACCATGG
DENV2-1810F	CTACAGCTCAAAGGAATGTCAT
DENV2-1910F	AATATGAAGGGGACGGCTCT
DENV2-2045R	TCTGCTTCTATGTTGACTGGG

Fonte: Do autor, 2018

Legenda: ^aOligonucleotídeo *forward*;

^bOligonucleotídeo *reverse*

6 RESULTADOS

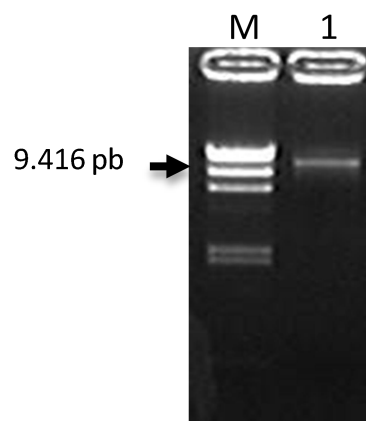
6.1 Sistema de genética reversa para o vírus chikungunya

A seguir são descritos inicialmente os resultados referentes ao sistema de genética reversa desenvolvido para CHIKV.

6.1.1 Clonagem do clone infeccioso IC-CHIKV-99659 e replicon Rep-GLuc-nsP-CHIKV-99659

Para a construção dos clones pBSC-T7-CHIKV-99659, o vetor pBSC-HDR foi linearizado com a enzima Bam-HI (Figura 38) e recombinado com os fragmentos 1 e 2 amplificados com os oligonucleotídeos de recombinação homóloga (Figura 39). Em seguida, a confirmação da clonagem foi realizada através da amplificação da região de intersecção entre os fragmentos 1 e 2 com os oligonucleotídeos CHIKV-7300-F e CHIKV-7796-R. Ao final, foram obtidos as construções pBSC-T7-CHIKV-99659 clone 3, pBSC-T7-CHIKV-99659 clone 13 e pBSC-T7-CHIKV-99659 clone 17 (Figura 40).

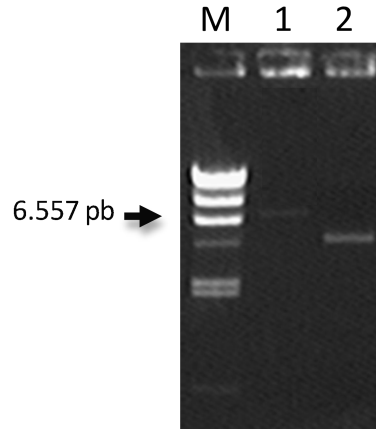
Figura 38 - Digestão do vetor pBSC-HDR usado para a construção do clone infeccioso e replicon do vírus chikungunya



Fonte: Do autor, 2016

Nota: (1) (13.655pb): vetor pBSC-HDR linearizado com a enzima Bam-HI e ficando com extremidades homólogas as dos fragmentos usados para a construção do clone infeccioso e replicon do vírus chikungunya; (M) Marcador Lambda DNA/HindIII (New England Biolabs).

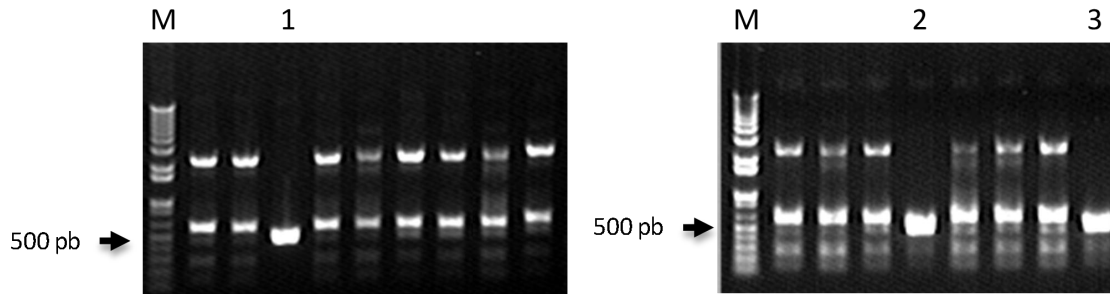
Figura 39 - Amplificação do genoma do vírus chikungunya em dois fragmentos complementares e parcialmente homólogos



Fonte: Do autor, 2016

Nota: O genoma do vírus chikungunya foi amplificado em dois fragmentos complementares e com extremidades homólogas para a clonagem no vetor pBSC-HDR, previamente digerido com Bam-HI. (1) Fragmento 1 - 7.566pb; (2) fragmento 2 - 4.595pb; (M) Marcador Lambda DNA/HindIII (New England Biolabs).

Figura 40 - Seleção dos clones infecciosos do vírus chikungunya

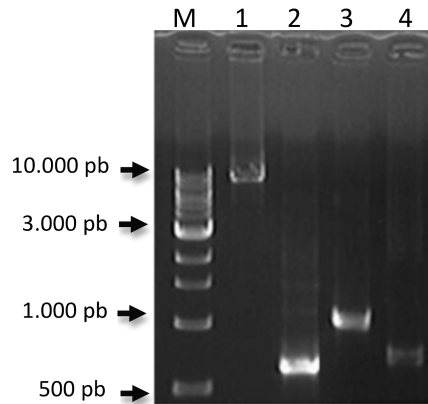


Fonte: Do autor, 2016

Nota: Após a recombinação homóloga do genoma do vírus chikungunya com o vetor pBSC-HDR, a clonagem foi avaliada pela amplificação de uma região de 497pb que intersecciona os fragmentos 1 e 2 usados na clonagem do genoma viral. (1) pBSC-T7-CHIKV-99659 clone 3, (2) pBSC-T7-CHIKV-99659 clone 13; (3) pBSC-T7-CHIKV-99659 clone 17; (M) Marcador 1Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Para os clones pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659, o vetor pBSC-HDR linearizado foi recombinado com os insertos: fragmento 1 (nsP1-nsP4) (7.566pb), fragmento 2 (GLuc) (644pb), fragmento 3 (Ubi-Neo) (1.070pb) e fragmento 4 (3'UTR-CHIKV) (879pb), amplificados com os oligonucleotídeos de recombinação (Figura 41). A clonagem foi confirmada pela amplificação da extremidade 3'UTR das construções, com os oligonucleotídeos pBSC-SpeI-3'CHIKV-R e CHIKV-3UTR-F. Os clones obtidos foram pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 2, pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 3, pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 4 e pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 5 (Figura 42).

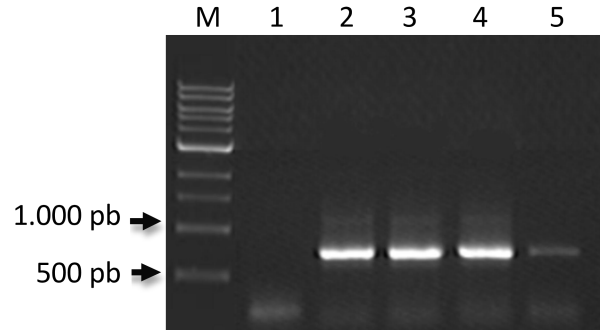
Figura 41 - Amplificação dos fragmentos gênicos necessários à construção do replicon do vírus chikungunya



Fonte: Do autor, 2016

Nota: (1) Fragmento 1 (proteínas nsP1-nsP4, 7.566pb), (2) Fragmento 2 (gene repórter da *Gaussia* luciferase, 644pb), (3) Fragmento 3 (região de ubiquitinação e gene da neomicina fosfotransferase, 1.070pb) e (4) Fragmento 4 (região 3' não traduzida do vírus chikungunya, 879pb); o tamanho de cada amplicon corresponde a sua amplificação com os oligonucleotídeos de recombinação (Quadro 4). (M) Marcador 1kb DNA *Ladder* (New England Biolabs).

Figura 42 - Confirmação e seleção dos clones do replicon do vírus chikungunya



Fonte: Do autor, 2016

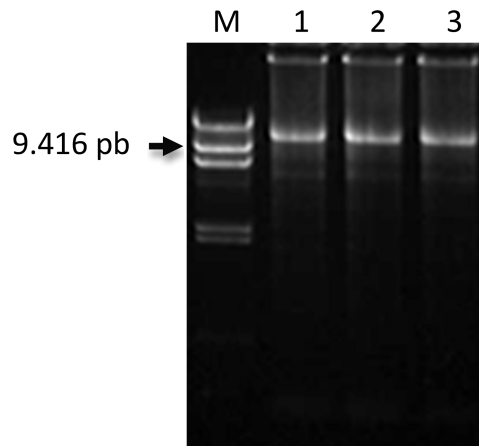
Nota: Após a recombinação homóloga dos amplicons correspondentes ao subgenoma do vírus chikungunya, ao gene repórter da *Gaussia* luciferase, à região de ubiquitinação e gene da neomicina fosfotransferase, a clonagem foi avaliada pela amplificação de uma região de 879pb referente à sequência 3' não traduzida do vírus. (1) colônia negativa, (2) pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 2, (3) pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 3, (4) pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 4; (5) pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 5; (M) Marcador 1 kb DNA *Ladder* (New England Biolabs).

6.1.2 Amplificação e transcrição do genoma completo dos clones infecciosos e replicons repórter do vírus chikungunya

Seguida à seleção dos clones, o genoma do CHIKV-99659 contido nos

plasmídeos pBSC-T7-CHIKV-99659 clones 3, 13 e 17 e o replicon repórter contido nos plasmídeos pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clones 2, 3, 4 e 5 foram amplificados (Figura 43 e 44) e depois transcritos *in vitro*.

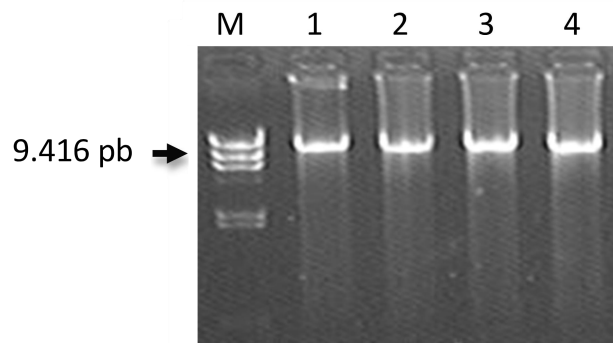
Figura 43 - Amplificação do genoma dos clones infecciosos do vírus chikungunya



Fonte: Do autor, 2016

Nota: O genoma do vírus chikungunya clonado no vetor pBSC-HDR foi amplificado com os oligonucleotídeos pBSC-BamHI-T7Phi2.5-5'CHIKV-F/CHIKV-3'UTR-R, objetivando linearizar o genoma viral e inserir a região promotora da enzima RNA polimerase T7 necessária à futura transcrição *in vitro*. (1-3) Amplificação do genoma do vírus chikungunya contido nos plasmídeos pBSC-T7-CHIKV-99659 clone 3, pBSC-T7-CHIKV-99659 clone 13 e pBSC-T7-CHIKV-99659 clone 17 (10.304pb). (M) Marcador Lambda DNA/HindIII (New England Biolabs).

Figura 44 - Amplificação do subgenoma dos replicons expressando o gene repórter *Gaussia* luciferase



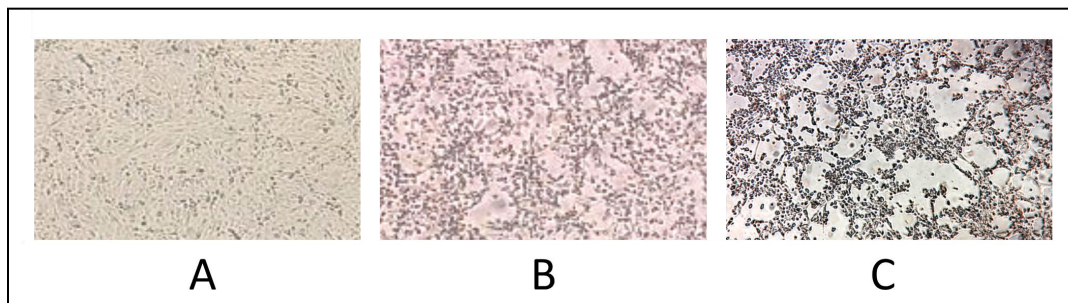
Fonte: Do autor, 2016

Nota: O subgenoma do vírus chikungunya expressando o gene repórter da *Gaussia* luciferase foi amplificado com os oligonucleotídeos pBSC-BamHI-T7Phi2.5-5'CHIKV-F/CHIKV-3'UTR-R, a fim de linearizar o subgenoma viral e inserir a região promotora da enzima RNA polimerase T7 para a transcrição *in vitro*. (1-4) Amplificação do subgenoma repórter do vírus chikungunya contido nos clones pBSC-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clones 2, 3, 4 e 5 (9.944pb). (M) Marcador Lambda DNA/HindIII (New England Biolabs).

6.1.3 Recuperação do clone infeccioso

Os RNAs resultantes das transcrições *in vitro* dos clones 3, 13 e 17 do pBSC-T7-CHIKV-99659 foram usados na eletroporação das células BHK-21. Quatro dias após a transfecção, o sobrenadante foi inoculado em células Vero até a visualização do ECP. Com quatro dias de infecção da passagem 2 (p2), foi observado ECP dos vírus IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17 (Figura 45). Quando inoculados em células C6/36 e BHK-21 a MOI de 1 por sete dias, os vírus IC-CHIKV-99659 clones 3 e 17 não apresentaram citopaticidade (Figura 46 e 47).

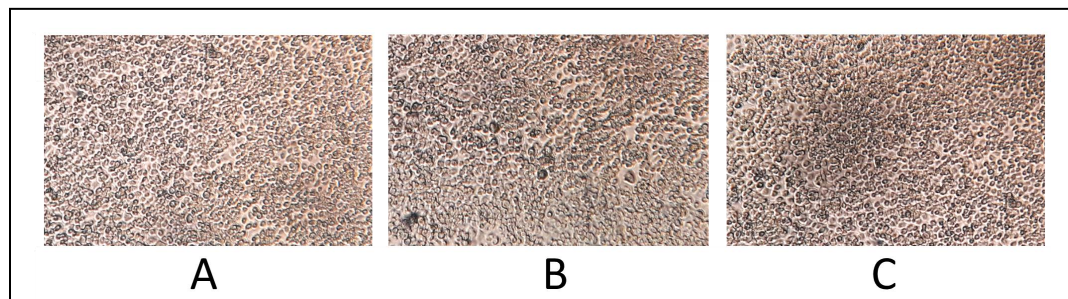
Figura 45 - Efeito citopático dos vírus IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17 em células Vero



Fonte: Do autor, 2017

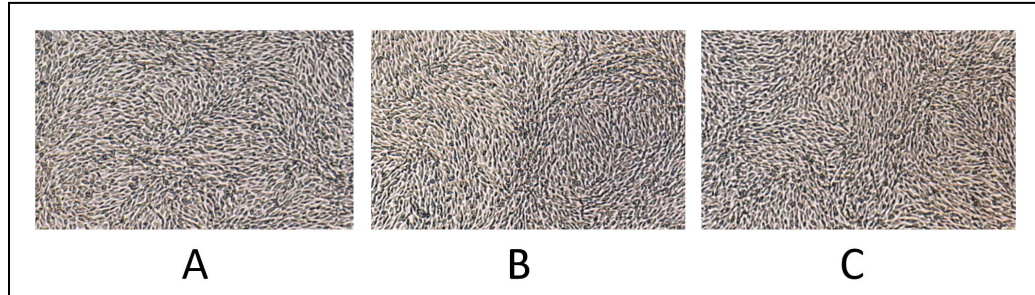
Nota: Os vírus recuperados IC-CHIKV-99659 clones 3 e 17 foram amplificados em células Vero. Quatro dias após a segunda passagem, foi possível observar o efeito citopático dos vírus IC-CHIKV-99659 clone 3 (B) e IC-CHIKV-99659 clone 17 (C). (A) Controle negativo. Aumento de 50x

Figura 46 - Infecção dos vírus IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17 em células C6/36



Fonte: Do autor, 2017

Nota: Os vírus recombinantes IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17 foram inoculados à multiplicidade de infecção de 1 em células C6/36 e o cultivo foi observado diariamente por sete dias. Não foi possível observar efeito citopático nos inóculos dos vírus IC-CHIKV-99659 clone 3 (B) e IC-CHIKV-99659 clone 17 (C). (A) Controle negativo. Aumento de 100x

Figura 47 - Infecção dos vírus IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17 em células BHK-21

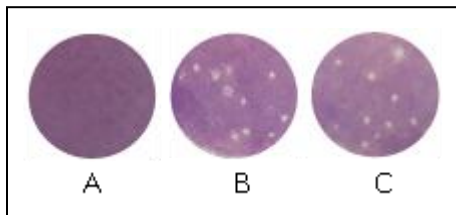
Fonte: Do autor, 2017

Nota: Os vírus IC-CHIKV-99659 clones 3 e 17 foram inoculados à multiplicidade de infecção de 1 em células BHK-21 e o cultivo foi acompanhado por sete dias. Não foi observado efeito citopático dos vírus IC-CHIKV-99659 clone 3 (B) e IC-CHIKV-99659 clone 17 (C). (A) Controle negativo. Aumento de 100x

6.1.4 Caracterização fenotípica do IC-CHIKV-99659

6.1.4.1 Ensaio de placa

Os vírus recuperados IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17 foram caracterizados inicialmente por ensaio de placa em células Vero. O diâmetro médio formado pelas placas de ambos os vírus foi de aproximadamente 1mm (Figura 48).

Figura 48 - Ensaio de placa dos vírus recombinantes IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17

Fonte: Do autor, 2017

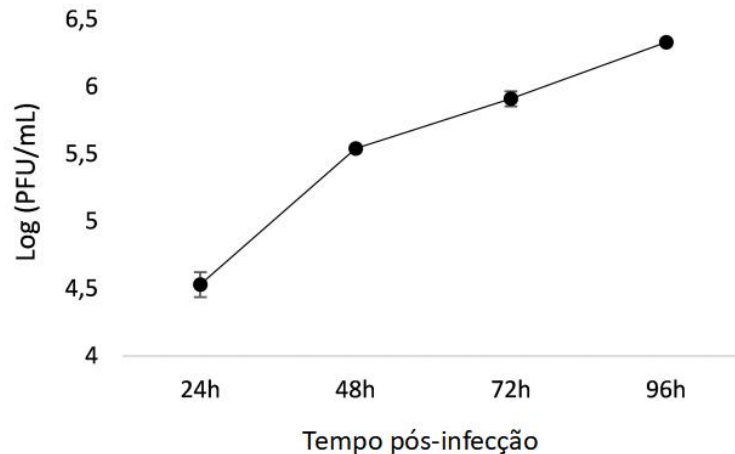
Nota: Células Vero semeadas em placas de 12 poços (1×10^5 células/poço) foram infectadas com diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) dos vírus recombinantes IC-CHIKV-99659 clone 3 e IC-CHIKV-99659 clone 17. A placa foi incubada a 37°C por sete dias. Após a incubação, as células foram fixadas em formalina (10%) e coradas com cristal violeta (0,05%).

6.1.4.2 Cinética de replicação viral

Devido a semelhança do diâmetro das placas formadas pelos vírus IC-CHIKV-99659 clones 3 e 17, o IC-CHIKV-99659 clone 3 foi escolhido para a montagem da curva de

replicação (Figura 49). Daqui em diante, o clone 3 será convencionalmente referido como IC-CHIKV-99549.

Figura 49 - Curva de replicação do vírus IC-CHIKV-99659



Fonte: Do autor, 2017

Nota: Células Vero semeadas em placa de 24 poços (5×10^4 células/poço) foram infectadas com uma multiplicidade de infecção de 3 do IC-CHIKV-99659. Após o inóculo, os sobrenadantes foram coletados nos tempos 24, 48, 72, e 96 horas pós-infecção. Os títulos virais de cada tempo foram determinados por ensaio de placa. PFU: *plaque-forming unit*, unidade formadora de placa.

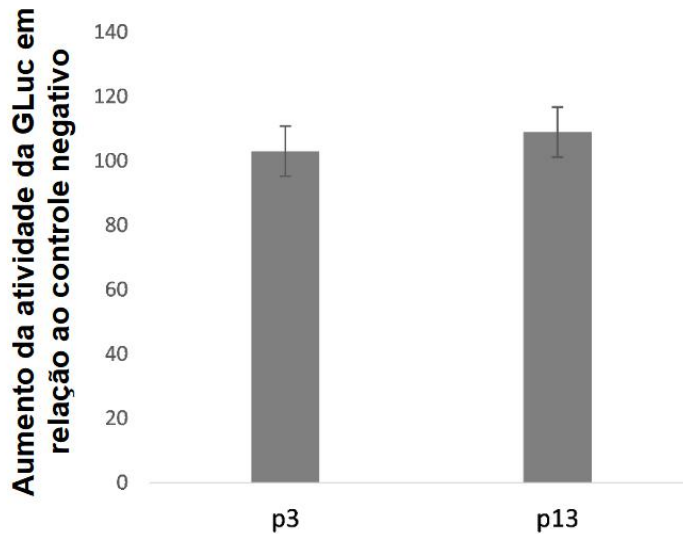
6.1.5 Desenvolvimento da linhagem celular recombinante BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659

Em seguida à transfecção com os RNAs transcritos *in vitro* dos clones do rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659, as células foram selecionadas pela adição de geneticina (Sigma) ($700\mu\text{g/mL}$) ao meio de cultura. Dez dias à adição do antibiótico de seleção, apenas o rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 2 apresentou células selecionadas; duas ilhas de células aqui referidas como clones celulares e nomeados BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 2.1 e BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 2.2.

Os clones celulares foram então amplificados até a passagem 3 (p3), momento em que foi lida a atividade da GLuc. As células continuaram a ser cultivadas e na passagem 13 (p13) uma outra leitura de GLuc foi realizada. Dos clones selecionados, apenas o BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 clone 2.1 mostrou atividade de GLuc. As leituras realizadas em p3 e p13 não se mostraram diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) (Figura 50). Por convenção, o

clone celular BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 2.1 será referido apenas como BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659.

Figura 50 - Atividade da *Gaussia* luciferase ao longo do cultivo da linhagem celular BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659



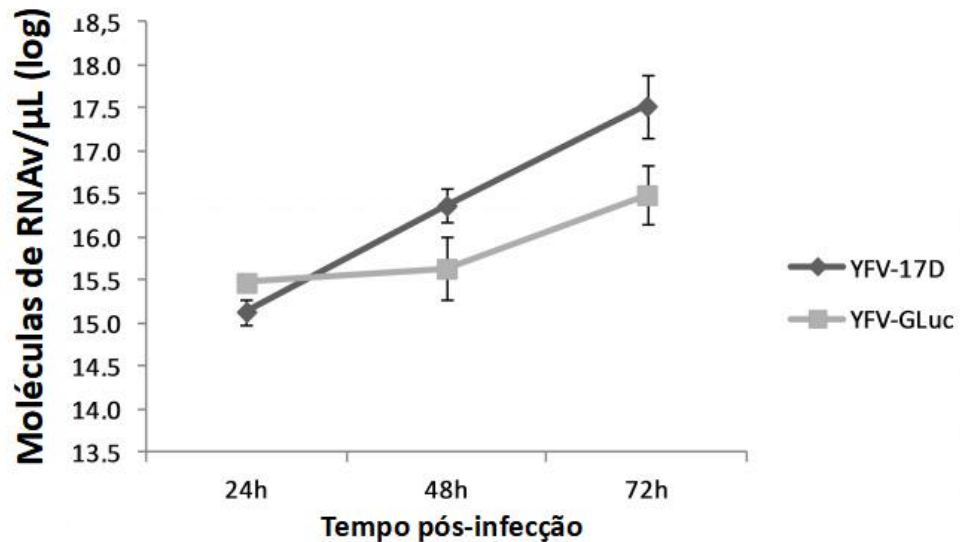
Fonte: Do autor, 2018

Nota: As células da linhagem BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 foram amplificadas até as passagens três e 13 (p3 e p13) e foram semeadas em placa de 96 poços (10^5 células/ poço). Dezoito horas pós-semeio, foi feita a leitura da atividade da *Gaussia* luciferase (GLuc) em duplicata. O resultado final foi apresentado em aumento da atividade da GLuc do sobrenadante da linhagem BHK-21-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 em relação ao controle negativo (células BHK-21 selvagens).

6.2 Sistema de genética reversa para o vírus da febre amarela

6.2.1 Curva de replicação do YFV-GLuc vs. YFV-17D

Não foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a cinética de replicação do vírus recombinante YFV-GLuc e a de seu vírus parental YFV-17D (Figura 51).

Figura 51 - Cinética de replicação dos vírus YFV-17D e YFV-GLuc

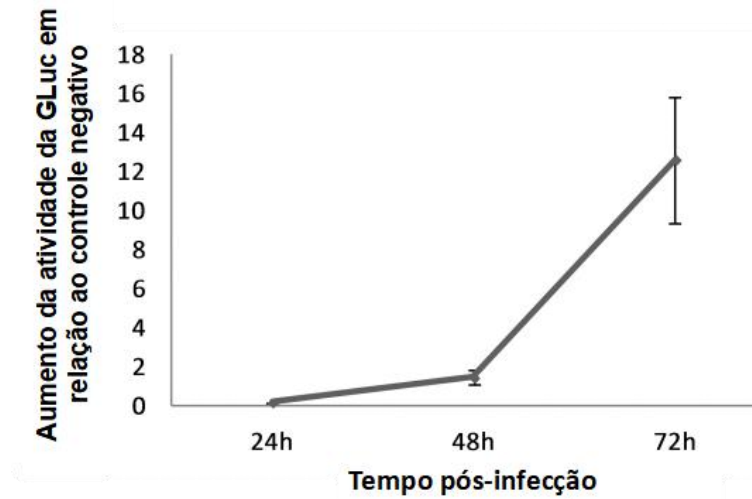
Fonte: Adaptado de Kassir et al. (2017)

Nota: A curva de replicação do vírus repórter e parental da febre amarela, YFV-GLuc e YFV-17D, respectivamente, foi realizada a uma multiplicidade de infecção de 0,1 em células BHK-21 por três dias. O RNA viral de cada ponto da curva foi extraído do sobrenadante celular e quantificado por qRT-PCR.

6.2.2 Correlação entre atividade da *Gaussia* luciferase e a replicação do YFV-GLuc

Ao longo do cultivo do vírus recombinante YFV-GLuc em células BHK-21, a atividade da GLuc foi crescente (Figura 52) e também correlacionada à cinética de replicação do vírus repórter, com coeficiente de correlação linear (r^2) igual a 0,9967 (Figura 52).

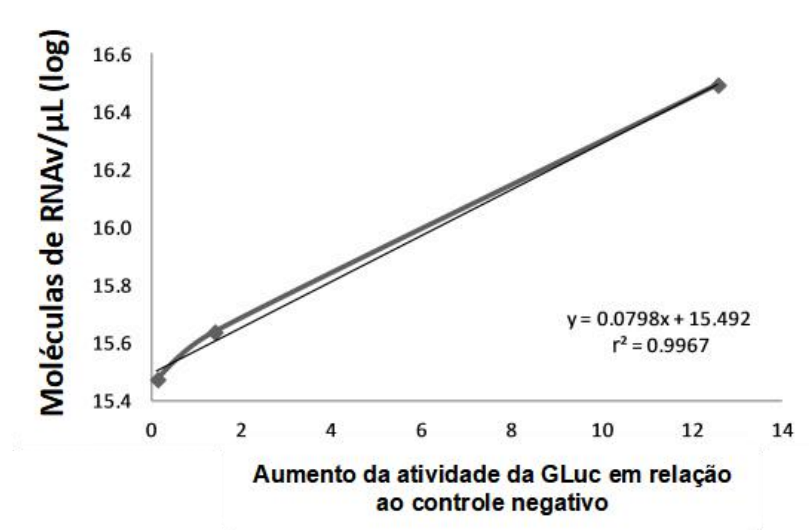
Figura 52 - Curva de atividade da *Gaussia* luciferase do vírus YFV-GLuc



Fonte: Adaptado de Kassari et al. (2017)

Nota: O sobrenadante coletado durante cada ponto da curva de replicação do YFV-GLuc também foi usado para a quantificação da atividade da *Gaussia* luciferase (GLuc). Após juntar os resultados das leituras de GLuc durante os três dias da curva, foi possível traçar uma cinética de expressão do gene repórter. A atividade da GLuc foi expressa como a proporção de unidades relativas de luz, *relative light units* (RLU), em relação ao controle negativo (células não infectadas por YFV-GLuc).

Figura 53 - Correlação linear entre as curvas de atividade da *Gaussia* luciferase e de replicação do vírus YFV-GLuc



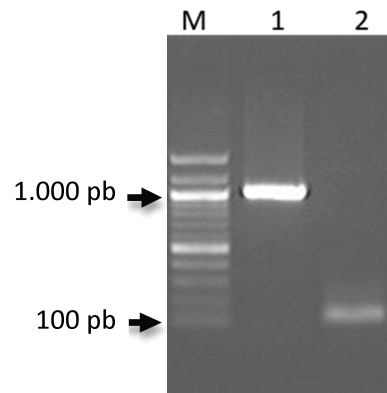
Fonte: Adaptado de Kassari et al. (2017)

Durante a curva de replicação do vírus YFV-GLuc, o sobrenadante coletado para a quantificação das moléculas de RNA viral por μL foi também usado para a leitura da atividade da *Gaussia* luciferase (GLuc). A comparação entre os valores de cada parâmetro confirmou a relação entre a replicação do vírus e a expressão do gene repórter, $r^2 = 0,9967$.

6.2.3 Estabilidade e integridade da *Gaussia* luciferase

A confirmação da conservação do gene repórter ao longo de seis passagens do YFV-GLuc em célula BHK-21 foi feita pela geração de um amplicon de 1.010pb, correspondente à extensão do gene GLuc mais regiões acessórias necessárias a sua expressão e secreção (Figura 54). A análise do sequenciamento gênico feito com o amplicon em p6 também confirmou a ausência de mutações em GLuc. Ao final, a manutenção da expressão da GLuc foi confirmada fenotipicamente pela leitura da atividade da GLuc (p6) 131 vezes maior que o controle negativo.

Figura 54 - Amplificação do gene da *Gaussia* luciferase na sexta passagem celular do vírus YFV-GLuc



Fonte: Adaptado de Kassar et al. (2017)

Nota: (1) amplificação de RNA viral (RNA_v) extraído da passagem 6 do YFV-GLuc (1.010pb); (2) amplificação do RNA_v de células BHK-21 infectadas por YFV-17D (127pb). Ambas amplificações foram feitas com o par de oligonucleotídeos YFV-2375- F e YFV-NS1-2502-R. A diferença de 883pb entre os amplicons deve-se a presença do gene da *Gaussia* luciferase e sequências acessórias a sua expressão no RNA_v do YFV-GLuc. (M) Marcador 100bp DNA *Ladder* (Invitrogen).

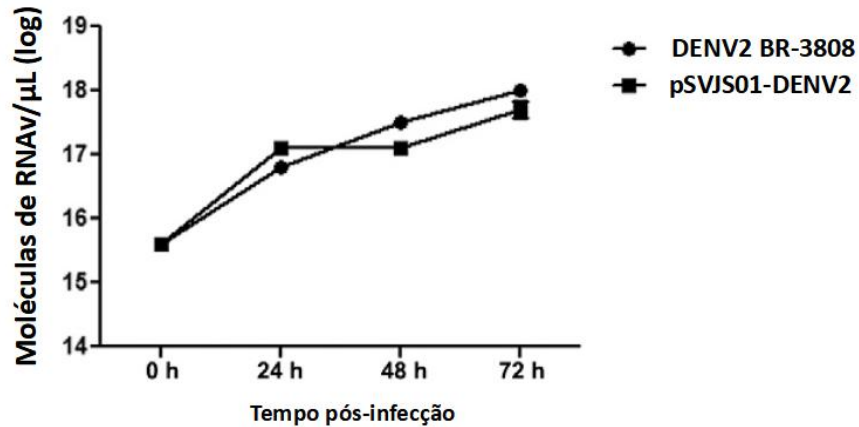
6.3 Sistema de genética reversa para o vírus dengue

6.3.1 Cinética de replicação

A comparação da replicação dos vírus pSVJS01-DENV2 e do DENV2 BR-3808 durante três dias em células BHK-21 revelou um comportamento semelhante dos vírus *in vitro*. A quantidade de RNA_v no tempo zero da infecção e em 24, 48 e 72 horas foram, respectivamente, 15,6, 16,8, 17,5 e 18 moléculas de RNA_v/μL (log) para o pSVJS01-DENV2;

e 15,6, 17,1, 17,1 e 17,7 moléculas de RNAv/ μ L (log) para o DENV2 BR-3808 (Figura 55).

Figura 55 - Curva de replicação dos vírus DENV2 BR-3808 e psVJS01-DENV2



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2015)

Nota: A curva de replicação do vírus recombinante e parental de dengue, psVJS01-DENV2 e DENV2 BR-3808, respectivamente, foi realizada durante três dias em células BHK-21 infectadas com uma multiplicidade de infecção de 0,1. Em cada ponto da curva, o RNA viral foi extraído do sobrenadante e quantificado por qRT-PCR.

6.3.2 Sequenciamento gênico da glicoproteína do envelope

As regiões gênicas da glicoproteína E dos vírus psVJS01-DENV2 e do DENV2 BR-3808 revelaram-se 100% idênticas após a análise dos produtos do sequenciamento.

7 DISCUSSÃO

7.1 Sistema de genética reversa para o vírus chikungunya

Vários sistemas de genética reversa vêm sendo descritos para CHIKV, com empregos que vão desde estudo de função das proteínas virais e interação vírus-hospedeiro até triagem em larga escala de compostos antivirais, ensaios de soroneutralização e confecção de vacinas recombinantes. Apesar das diversas aplicações, toda a manipulação do genoma do CHIKV já reportada foi mediada por protocolos convencionais de clonagem em *E. coli* (BREDENBEEK et al., 2003; DELANG et al., 2014; ERASMUS et al., 2017; FROS et al., 2013; JIANG et al., 2015; PLANTE et al., 2011; SCHOLTE et al., 2013; TSETSARKIN et al., 2006).

Esses sistemas em *E. coli*, no entanto, necessitam de seriadas subclonagens, de vários sítios de restrição compartilhados entre inserto e vetor e de seguidas etapas de ligação *in vitro*, o que torna o processo de clonagem laborioso e oneroso. A construção do plasmídeo pCHIKV-M, por exemplo, contendo o genoma completo do vírus parental e usado na recuperação do vírus recombinante rCHIKV, foi antecedida por seis clonagens, cada qual abrigando sequências parciais do genoma do vírus (KÜMMERER et al., 2012).

Para contornar essas condições e otimizar a manipulação do genoma de CHIKV, as construções recombinantes descritas no presente trabalho, o vírus recombinante IC-CHIKV-99659 e o replicon Rep-GLuc-nsP-CHIKV-99659, foram obtidas por recombinação homóloga em levedura, com uma única reação *in vivo* e usando apenas uma enzima de restrição. Em reconhecimento a essa praticidade das clonagens em levedura, alguns vírus recombinantes, como de IBDV e YFV, os quais já tinham sido obtidos por clonagens em *E.coli*, foram adiante também conseguidos em clonagens mais simples por recombinação homóloga em levedura (KASSAR et al., 2017; SILVA Jr et al., 2014). Apesar de até o momento não haver relatos de mutação do genoma do CHIKV quando clonados em vetores convencionais de *E.coli*, como frequentemente ocorre com genomas de flavivírus, a manutenção de clones em levedura também é reconhecidamente mais estável do que em procarionto (KELLY et al., 2010; POLO et al., 1997; SANTOS et al., 2015).

Assim, após a manipulação do genoma do CHIKV em levedura, foi possível

recuperar o vírus recombinante IC-CHIKV-99659. Em células Vero, a caracterização do vírus por ensaio de placa e pela curva de crescimento confirmaram a infectividade e a competência replicativa do IC-CHIKV-99659. Interessantemente, embora tenha apresentado ECP em Vero, quando o IC-CHIKV-99659 foi mantido em células BHK-21 e em C6/36, não foi possível observar citopaticidade do vírus. De maneira semelhante, a linhagem celular desenvolvida pela transfecção do replicon Rep-GLuc-nsP-CHIKV-99659 em BHK-21 também não apresentou ECP durante todo o tempo em que foi cultivada.

Essa ausência de ECP de alfavírus em células derivadas de mosquitos já tem sido descrita na literatura. Vírus chikungunya e SINV quando inoculados em linhagens celulares de *Ae. albopictus*, a exemplo da U4.4, C7-10 e C6/36, resultaram em uma infecção celular persistente (KARPF et al., 1997, LI et al., 2012). Por outro lado, em relação ao cultivo em células BHK-21, são vários os relatos de ECP por alfavírus do Velho Mundo (SINV, SFV e CHIKV) atribuídos à proteína nsP2 (DRYGA, DRYGA, SCHLESINGER, 1997; FROS et al., 2010, 2013; PERRI et al., 2000; POHJALA et al., 2011; TAMM; MERITS; SARAND, 2008; UTT et al., 2015).

Além da função de replicação, já foi demonstrada a participação da nsP2 na inibição da transcrição e tradução celular. Em detalhes, já se tem identificado, inclusive, as mutações na região de localização nuclear (*Nuclear localization signal*, NLS) ou no domínio semelhante à metiltransferase (*methyltransferase-like*, MTL) da nsP2 que resultam na supressão de ECP e persistência da infecção viral em células de vertebrados (FROS et al., 2010, 2013; POHJALA et al., 2011; UTT et al., 2015).

Sobre os aminoácidos dos alfavírus localizados na proteína nsP2 e que participam como moduladores do ECP, sabe-se que em relação a:

- a) SINV: a substituição de um aminoácido prolina na posição 726 (P726) resultou na perda da citopaticidade do vírus em célula BHK-21 (DRYGA; DRYGA; SCHLESINGER, 1997);
- b) SFV: a troca de prolina por uma glicina ou treonina no aminoácido de posição 718 (P718G ou P718T) ou a troca de arginina nas posições 649 e 650 por aspartato (RR469DD) resultou na diminuição do ECP do vírus também em célula BHK-21 (TAMM;

MERITS; SARAND, 2008);

c) CHIKV: a substituição de uma lisina e uma arginina por duas alaninas nas posições 649 e 650 (KR698AA) resultou em uma supressão do ECP em vírus da linhagem WA. A troca de prolina por serina ou glicina na posição 718 (P718S ou P718G) também foi responsável pela supressão de ECP em CHIKV de mesma linhagem (FROS et al., 2010, 2013). Porém, quando inserida em vírus da linhagem ECSA, a mutação P718 sozinha não alterou o fenótipo citopático do CHIKV. A redução da citopaticidade de CHIKV da linhagem ECSA só foi observada quando a substituição P718 foi acompanhada por outras mutações: a inserção de cinco aminoácidos após a treonina 467 (T467) (glicina, glutamato, glutamato, glicina, serina, GEEGS) ou a troca de um glutamato por uma lisina no aminoácido 116 (E166K) (UTT et al., 2015).

Surpreendentemente, todos os aminoácidos responsáveis não só pelo ECP do CHIKV, mas também do SFV, SINV, encontram-se na sequência do CHIKV-99659 (GenBank KJ451624), a partir da qual o vírus e replicon recombinantes foram construídos. Os estudos sobre essas regiões de nsP2 moduladoras do ECP, no entanto, foram realizados apenas com CHIKV das linhagens ECSA ou WA, não constando, até o momento, nenhum experimento nessa abordagem conduzido com CHIKV da linhagem asiática, a mesma linhagem do CHIKV-99659. Essa é uma ressalva importante e já bem ponderada por Utt et al. (2015) ao comentar que a influência de mutações de perfil não citopático que foram demonstradas em uma linhagem de CHIKV não necessariamente têm as mesmas consequências em vírus de outras linhagens.

Diante dessa consideração, é pertinente também observar que ao contrário da linhagem celular construída neste trabalho, todas as outras linhagens celulares recombinantes expressando replicons de CHIKV descritas na literatura só foram desenvolvidas a partir do subgenoma de CHIKV da linhagem ECSA ou WA. Em adição, todas essas linhagens apenas conseguiram ser cultivadas sem citopaticidade após a inserção dos aminoácidos da proteína nsP2 responsáveis pela supressão do ECP (FROS et al., 2010, 2013; POHJALA et al., 2011; UTT et al., 2015).

Com essas ressalvas, ficamos diante de duas hipóteses para explicar o fenótipo observado nas construções recombinantes: ou o CHIKV-99659 selvagem tem originalmente um perfil citopático reduzido e isso foi conservado no clone infeccioso IC-CHIKV-99659 e no replicon Rep-GLuc-nsP-CHIKV-99659 ou esses mutaram durante sua construção e/ou recuperação e tiveram o ECP atenuado.

Sobre a primeira hipótese, é necessário lembrar que o vírus e o replicon recombinantes reportados neste trabalho foram construídos sobre uma sequência sintetizada quimicamente do CHIKV-99659 e que, atualmente, não temos no laboratório o vírus selvagem. A ausência desse vírus para fins de comparação de fenótipo nos impossibilita concluir se o comportamento observado para o IC-CHIKV-99659 e o Rep-GLuc-nsP-CHIKV-99659 é uma reprodução do comportamento do vírus parental ou resultado de mutação ocorrida durante a clonagem e/ou recuperação do vírus e replicon. Para a resolução dessa questão, o pedido de envio de um CHIKV-99659 selvagem já foi gentilmente atendido pelo Dr. Scott Weaver e o Dr. Kenneth Plante, ambos da *University of Texas Medical Branch*, e o trâmite já está em andamento.

Ainda como elemento para discussão do fenótipo das construções recombinantes, podemos destacar as condições necessárias para a visualização das placas do IC-CHIKV-99659 em células Vero: uso de meio semisólido com 0,3% de agarose e incubação da placa por sete dias antes da sua revelação. Essas condições são consideravelmente diferentes dos ensaios de placa convencionais para CHIKV das linhagens africanas, realizados em células BHK-21 ou Vero, e que são comumente feitos com 0,8%-1% de agarose ou carboximetil celulose (*carboxymethyl cellulose*, CMC) e revelados após 2-4 dias de incubação (AZAMI et al., 2016; LI et al., 2012; MISHRA et al., 2016; NAYAK et al., 2017; ROBERTS et al., 2017; WIKAN et al., 2012).

À semelhança do IC-CHIKV-99659, durante a caracterização do isolado CHIKV/SBY8/10, membro da mesma linhagem do CHIKV-99659 (a asiática), Chalaem et al. (2016) realizaram ensaios de placa em células Vero com 0,3% de agarose. Em seguida, as infecções, imunofluorescência indireta, cinética de replicação e análise de expressão gênica celular pós-infecção realizadas em células Vero ou em célula renal 293 de embrião humano expressando o antígeno T do vírus SV-40 (*human embryonic kidney 293 cells T*, HEK-293-T) foram realizados com MOI de 10 do CHIKV/SBY8/10 (CHALAEM et al., 2016). Essas

condições experimentais sugerem, assim como observado no IC-CHIKV-99659, uma replicação peculiar dessa cepa, talvez refletindo o próprio fenótipo de algumas cepas do CHIKV da linhagem asiática.

Sobre a outra hipótese, a que se refere a eventuais mutações no IC-CHIKV-99659 ou no Rep-GLuc-nsP-CHIKV-99659 que tenham sido responsáveis por uma provável atenuação do ECP, oligonucleotídeos já foram desenhados para o sequenciamento do genoma do clone infeccioso e do subgenoma da linhagem celular BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659. O sequenciamento desse último é particularmente importante devido à possibilidade de mutação do replicon após a transfecção celular que resulte em supressão do ECP, como já descrito na linhagem celular de subgenoma de CHIKV desenvolvida por Utt et al. (2015) e Pohjala et al. (2011). Nessas linhagens, a observação que a inserção de cinco aminoácidos após a posição T467 resulta em atenuação do fenótipo citopático foi um achado após o sequenciamento de células BHK-21 que não apresentaram ECP ao serem transfectadas com replicon de CHIKV.

No entanto, a despeito das questões em aberto sobre as características das construções feita sobre o genoma do CHIKV-99659, o presente sistema de genética reversa construído em levedura, o primeiro para CHIKV desenvolvido por essa plataforma, mostrou-se funcional para a recuperação de clone infeccioso e de replicon repórter. Adicionalmente, até o momento também não há descrição de um clone infeccioso ou replicon desenvolvidos a partir de todo genoma ou subgenoma do CHIKV-99659. A exemplo dos vários usos já feitos com seu vírus parental CHIKV-99659, essas construções podem ter diversas aplicações: i) construção de vacinas quiméricas (ERASMUS et al., (2017); ii) estudos de interação vírus-hospedeiro e ensaios de competência vetorial (RÜCKERT et al., 2017); iii) avaliação de medidas terapêuticas (SMITH et al., 2015); e iv) na avaliação de plataformas multiplex de diagnóstico (YAREN et al., 2017).

Em especial, sobre a linhagem recombinante repórter BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659, além de se mostrar funcional, com as células expressando eficientemente o gene repórter a partir da maquinaria de transcrição do CHIKV, também se apresentou estável, conservando a atividade da GLuc constante ao longo do cultivo celular. Apesar da descrição de várias linhagens com replicons de CHIKV expressando diferentes genes repórteres, esse é o primeiro relato de uma linhagem celular com subgenoma de CHIKV expressando GLuc

(LANI et al., 2015; POHJALA et al., 2011).

Dentre as vantagens do uso de construções repórteres expressando GLuc em relação as com RLuc e FLuc encontra-se: a) a maior sensibilidade dos ensaios com GLuc, aproximadamente 1000 vezes maior do que a RLuc e FLuc; b) a maior estabilidade da GLuc frente a elevadas temperaturas e agentes redutores; c) ao menor tamanho desse gene repórter, possibilitando uma maior flexibilidade de manipulação em sistemas heterólogos; e d) seu caráter solúvel, que permite que sua atividade seja quantificada a partir de amostra coletada no sobrenadante, dispensando a lise celular que é necessária à leitura da RLuc e FLuc (NEB, 2018). O reconhecimento das vantagens da GLuc e da estabilidade de sua atividade na linhagem celular BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 fazem com que essa possa ser usada adiante como plataforma biotecnológica, principalmente para triagem em larga escala de compostos anti-CHIKV e estudos sobre a replicação viral.

Em resumo, no que tange ao CHIKV, o presente trabalho descreveu um sistema de genética reversa alternativo e funcional, capaz de gerar vírus e replicons recombinantes com possibilidades de aplicação tanto em virologia básica quanto aplicada.

7.2 Sistema de genética reversa para o vírus febre amarela

Diversos sistemas de genética reversa, com diferentes estratégias, têm sido construídos para a manipulação de flavivírus, a exemplo dos direcionados para WNV, JEV e DENV (PU et al., 2000; VANDERGAASST; FREDERICKSEN, 2016; ZHENG et al., 2017). Desse conjunto, os desenvolvidos para YFV talvez sejam os de maior aplicação biotecnológica. A estratégia vacinal ChimeriVax, a qual permite que as sequências gênicas das proteínas prM/E do YFV-17D possam ser substituídas por regiões gênicas análogas de outros flavivírus, tem sido usada com frequência em formulações vacinas, como as contra DENV, JEV e WNV (ARROYO et al., 2004; CHAMBERS et al., 1999; GUIRAKHOO et al., 2001). Além da possibilidade de uso para a construção de cepas vacinais quiméricas, o genoma do YFV também tem sido manipulado e usado como vetor para vacinas contra o gênero *Plasmodium*, *Trypanosoma*, influenza e também para terapia experimental (BONALDO; SEQUEIRA; GALLER, 2014).

Por outro lado, apesar dos vários aspectos positivos dos sistemas de genética

reversa para YFV, todos os vírus recombinantes de febre amarela descritos até o momento foram construídos por seguidas reações de digestões e ligações *in vitro* em *E.coli*, tornando o processo de clonagem do genoma viral exaustivo e custoso (BONALDO et al., 2002, 2005, 2007; BREDENBEEK et al., 2003; MCALLISTER et al., 2000; MCELROY et al., 2005; RICE et al., 1989). Uma das formas de se otimizar a obtenção de clones infeccioso e a inserção de sequências heterólogas no YFV é através da técnica de recombinação homóloga em levedura. Nessa, insertos e vetor com extremidades homólogas podem ser clonados de forma estável em uma única reação de ligação *in vivo*, agilizando e simplificando a recuperação do vírus recombinante (SILVA Jr et al., 2014). Em reconhecimento a essas vantagens, o vírus repórter YFV-GLuc, avaliado e caracterizado neste trabalho, foi construído previamente por recombinação homóloga em levedura usando como plataforma o genoma da cepa vacinal YFV-17D (KASSAR et al., 2017).

A preferência por uma construção repórter contendo o gene da GLuc em detrimento de outras proteínas repórteres, como a GFP, YFV, FLuc e RLuc, deve-se a várias vantagens desse primeiro. Como discutido anteriormente, os ensaios com GLuc apresentam mais sensibilidade e estabilidade do que os realizados com os outros genes repórteres. Além disso, a GLuc é uma proteína repórter secretável, capaz assim de ser detectada em sobrenadante de cultivo celular, dispensando a lise da célula para a leitura de sua atividade (NEB, 2018).

Graças a essas características, construções que expressem GLuc, quando introduzidas em modelos animais, podem ter a proteína repórter detectada em secreções e fluidos corporais, como urina e sangue, ou através da formação de imagens por bioluminescência (TANNOUS, 2009). Essa particularidade da GLuc permite seu uso *in vivo* e *ex vivo* para avaliação de infecção, replicação e tropismo viral, além do acompanhamento do crescimento de células tumorais e avaliação da viabilidade de células circulantes (TANNOUS, 2009; WURDINGER, 2008). Uma outra possibilidade de uso da GLuc, refere-se a sua inserção em replicon, PIVs e vírus repórteres para seu emprego na avaliação de compostos antivirais, a exemplo do uso feito com o YFV-GLuc, e em ensaios de soroneutralização (GLÄSKER et al., 2013; KASSAR et al., 2017; KATO et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

No entanto, independente de sua aplicação, é recomendável que a construção recombinante que carregue a GLuc seja estável, possibilitando seu uso por longo tempo e em

condições de reprodutibilidade dos resultados. Diante desse requisito, um dos objetivos deste trabalho foi a análise da estabilidade do YFV-GLuc mediante a investigação da conservação do gene da GLuc e da análise de sua sequência de nucleotídeos após seis passagens do vírus repórter em células BHK-21. Os resultados do RT-PCR e do sequenciamento gênico indicaram, assim, não só que o gene repórter manteve sua extensão durante o cultivo do vírus, como também seu conteúdo de nucleotídeo não foi alterado em relação a sua sequência original.

Apesar do gene da GLuc ser menor que outros genes repórteres, o que facilita sua manipulação em construções recombinantes, vírus repórter que expressem estavelmente a GLuc nem sempre são obtidos. Zhang et al. (2015) descreveram a construção de um WNV expressando GLuc, que embora tenha sido usado em ensaios de soroneutralização, começou a exibir diminuição da expressão do gene repórter ainda na primeira passagem em células BHK-21, não sendo mais possível detectar a atividade da GLuc após a passagem três. De maneira semelhante, Vandergaast et al. (2014) também descreveram a construção de um WNV-GLuc que mostrou deleção da GLuc a partir da passagem dois em células Vero. Em outro sistema de genética reversa, um poliovírus repórter expressando GLuc reteve o gene íntegro durante três passagens celulares, mas depois da passagem de número seis o sinal repórter já era minimamente detectado (SONG; PAUL; WIMMER, 2012)

Um critério adicional para a aplicação de um vírus em ensaios repórteres é que a expressão do gene heterólogo esteja intimamente relacionada à replicação do vírus, de maneira que a quantificação desse primeiro seja uma leitura indireta da atividade do segundo. Em reconhecimento a essa necessidade, o trabalho também investigou a relação entre a atividade da GLuc e a replicação do YFV-GLuc através de uma correlação linear entre a curva de expressão do gene repórter com a curva de replicação do vírus. O valor de 0,9967 obtido para r^2 serviu para confirmar a relação entre expressão de GLuc e replicação viral. No WNV-GLuc descrito por Zhang et al. (2015), a correlação GLuc vs. replicação vírus também foi confirmada, ainda que o valor de r^2 , 0,96126, tenha sido ligeiramente menor do que o observado para o YFV-GLuc.

Os resultados da avaliação antiviral feita com o YFV-GLuc e mostrado em detalhes no artigo de Kassari et al. (2017) (apêndice B) também confirmam os achados da caracterização fenotípica e análise de estabilidade aqui apresentados. Em resumo, a

porcentagem de diminuição da leitura da GLuc observada quando células BHK-21 foram infectadas por YFV-GLuc e tratadas com IFN humano α -2b (1000UI/mL) foi a mesma revelada por ensaio de placa quando células BHK-21 foram infectadas com o vírus parental YFV-17D e tratadas nas mesmas condições.

Uma análise comparativa entre a curva de replicação do YFV-GLuc e de seu vírus parental YFV-17D foi feita adicionalmente a fim caracterizar fenotipicamente o vírus recombinante. Embora não se tenha observado uma diferença estatisticamente significativa entre a curva de replicação dos dois vírus, é possível notar uma tendência à atenuação do YFV-GLuc. Essa tendência pode ser reforçada na comparação entre o ensaio de placa dos dois vírus mostrado em detalhes em Kassar et al. (2017): as placas formadas pelo YFV-GLuc e pelo YFV-17D foram de 5 e 9mm, respectivamente.

Esse comportamento, no entanto, é frequentemente observado quando sequências heterólogas são inseridas em genomas virais. Um YFV expressando as glicoproteínas GP1 ou GP2 do LAV apresentou redução do diâmetro das placas quando essas foram comparadas as de seu vírus parental YFV-17D (JIANG et al., 2012). Em outro estudo, um YFV-17D expressando eGFP também mostrou uma redução na curva de replicação em relação ao vírus parental (BONALDO et al., 2007).

O conjunto desses resultados: i) a simplicidade da técnica de recombinação homóloga para a clonagem do genoma viral; ii) a estabilidade da construção recombinante; e iii) as vantagens do uso da GLuc frente aos outros genes repórteres; aponta a possibilidade de aplicação do YFV-GLuc tanto para pesquisa básica quanto aplicada, como estudos de tropismo viral *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, ensaios de soroneutralização e de triagem de compostos anti-YFV. No mais, é igualmente válido destacar que o YFV-GLuc foi feito a partir da manipulação do genoma do protótipo vacinal para YFV, a cepa atenuada YFV-17D, contribuindo para a biossegurança quando da manipulação do vírus repórter em laboratório.

7.3 Sistema de genética reversa para o vírus dengue

As manipulações dos genomas dos flavivírus quando realizadas em sistemas convencionais de clonagem em *E. coli* apresentam graus diferentes de dificuldades, provavelmente devido à existência de diferentes promotores críticos de bactéria dentro do

genoma do vírus, os quais levam à síntese de peptídeos ou proteínas tóxicas ao microrganismo e a consequente mutação dos genomas clonados (PU et al., 2000).

Vírus recombinantes de febre amarela, por exemplo, podem ser recuperados de forma consideravelmente estável ou a partir de clonagem em *E.coli* com uso de BAC e vetor *low-copy number* ou com o genoma viral clonado de forma dividida em dois plasmídeos (BONALDO; SEQUEIRA; GALLER, 2014; BREDENBEEK et al., 2003; MCELROY et al., 2005; RICE et al., 1989). Genomas de DENV, WNV e JEV, por outro lado, frequentemente apresentam mais instabilidade quando mantidos em sistemas convencionais de *E.coli* e sua recuperação comumente demanda a clonagem do vírus em BAC e YAC ou ainda a inserção de mutações silenciosas que inativem a região promotora crítica (DE BORBA et al., 2012; POLO et al., 1997; PU et al., 2011; VANDERGAAST; FREDERICKSEN, 2016).

Reconhecendo essas dificuldades para a construção de sistemas de genética reversa para DENV, os objetivos finais deste trabalho foram a caracterização e avaliação da estabilidade de um DENV recombinante, pSVJS01-DENV2, previamente construído do Departamento de Virologia e Terapia Experimental do IAM. O sistema foi desenvolvido pela clonagem, por recombinação homóloga em levedura, do genoma do DENV2 BR-3808 com o vetor *low-copy number*, pSVJS01, descrito em Santos et al. (2013), o qual corresponde a um BAC acrescido da origem de replicação e marca de seleção para clonagem em levedura. Detalhes sobre a construção e recuperação do pSVJS01-DENV2 podem ser consultados no artigo de Santos et al. (2015) apresentado no apêndice C deste documento.

O vírus recombinante pSVJS01-DENV2 foi inicialmente caracterizado fenotipicamente através da sua curva de replicação em células BHK-21 durante três dias. O aumento do título do vírus ao longo do cultivo confirmou que o sistema desenvolvido em levedura foi funcional para a geração de partículas virais infecciosas e replicativas de DENV. Em adição, a comparação da cinética de replicação do pSVJS01-DENV2 com a de seu vírus parental DENV2 BR-3808 não mostrou diferença fenotípica entre os vírus avaliados.

Para a caracterização genética do sistema de genética reversa, os vírus pSVJS01-DENV2 e DENV2 BR-3808 tiveram a região gênica da glicoproteína do envelope sequenciada. A comparação entre ambas sequências também confirmou a estabilidade do vírus recombinante, não sendo observadas mutações ao longo do gene. A escolha pelo sequenciamento preferencial da glicoproteína E deve-se a sua função na adsorção viral e a sua

consequente participação no tropismo e fusão viral e também como alvo de anticorpos neutralizantes (KUHN; ROSSMANN, 2005; LORENZ et al., 2002; MUKHOPADHYAY; SCHIEFFELIN et al., 2010); características importantes principalmente na possibilidade de futura aplicação do pSVJS01-DENV2 para estudos de tropismo viral e interação vírus-hospedeiro. Torna-se válido ainda destacar que embora não se tenha sequenciado as regiões não traduzidas, nem as regiões codificantes para outras proteínas do pSVJS01-DENV2, o perfil de replicação do vírus sugere que caso existam alterações nucleotídicas nas regiões não analisadas, essas não resultaram em alteração fenotípica observável.

A técnica de recombinação homóloga também tem sido usada com sucesso em outros sistemas de genética reversa para DENV, como na geração de partículas estáveis de DENV-1 e DENV-2 (POLO et al., 1997; PURI et al., 2000). Porém, ao contrário do pSVJS01-DENV2 que teve sua construção e recuperação com a manutenção do clone apenas em levedura, no trabalho de Polo et al. (1997), clones de DENV-2 obtidos em levedura foram em seguida transformados em *E.coli* devido à baixa quantidade de DNA extraído das colônias. Ao final, embora se tenha obtido vírus recombinantes que conservaram o fenótipo do vírus parental, foi necessário um exaustivo trabalho de triagem para seleção dos clones não mutantes em bactéria.

Adicionalmente, além da necessidade de estabilidade, a depender da aplicação do vírus recombinante, é igualmente importante que ele conserve também as características de um vírus selvagem. Em estudos de competência vetorial, patogênese e resposta imune ao vírus, por exemplo, é essencial que o vírus recombinante reproduza o comportamento de um isolado de campo, de modo que os resultados das análises representem com mais fidelidade as situações de infecções naturais. Para isso, é imperativo que para evitar o surgimento de mutações adaptativas, o vírus selvagem tenha sido passado poucas vezes em laboratório antes de seu genoma ser usado para a construção de um vírus recombinante (LEE; WEIR; DALGARNO, 1997; VASILAKIS et al., 2009).

Vasilakis et al. (2009) identificaram mutações adaptativas na região traduzida e na 3'UTR de DENV após dez passagens do vírus em células C6/36 ou Huh-7 ou alternando entre ambas linhagens. Lee, Weir e Dalgarno (1997) também mostraram o surgimento de mutações adaptativas de DENV em condições de cultivo em *in vitro* ou *in vivo*. Grande parte dessas mutações aconteceram após a quinta passagem em células Vero, C6/36 ou cérebro de

camundongo e foram concentradas principalmente na proteína E e secundariamente na prM, influenciando a capacidade de fusão do vírus à membrana da célula hospedeira (LEE; WEIR; DALGARNO, 1997).

Apesar da demonstrada possibilidade de mutações adaptativas em DENV, são poucos os relatos de vírus recombinantes construídos sobre vírus parentais passados menos que cinco vezes em cultivo celular (SANTOS et al., 2013). Por outro lado, são várias as descrições de DENV recombinantes desenvolvidos ou a partir de isolados sem registo de histórico ou histórico não informado de passagem celular (BLANEY et al., 2004a; 2004b; LAI et al., 1991; SRIBURI et al., 2001; USME-CIRO et al., 2014; ZHU et al., 2007) ou sobre isolados virais passados mais de cinco vezes em cultivo celular (GUALANO et al., 1998; KELLY et al., 2010, 2011; KINNEY et al., 1997; POLO et al., 1997).

Em relação a esse requisito, o vírus recombinante pSVJS01-DENV2 foi construído a partir de um vírus parental passado apenas cinco vezes em cultivo de células, como detalhado em Santos et al. (2015). Essa forma de construção aumenta a possibilidade do pSVJS01-DENV2 preservar as características do vírus selvagem, tornando-o, com isso, útil principalmente aos estudos direcionados à biologia viral e à interação vírus-hospedeiro.

Por fim, ao descrever a construção e caracterização de sistemas de genética reversa para CHIKV, YFV e DENV, o presente trabalho espera contribuir para a virologia molecular, estudos de patogênese, triagem de compostos antivirais e elaboração de estratégias vacinais contra essas arboviroses.

8 CONCLUSÕES

- a) A técnica de recombinação homóloga em levedura é uma plataforma passível de ser usada para a manipulação do genoma do CHIKV;
- b) O sistema de genética reversa desenvolvido em levedura se mostrou funcional para a geração de clone infeccioso e replicon repórter do CHIKV;
- c) O vírus recombinante IC-CHIKV-99659 foi infectivo e replicativo;
- d) A linhagem celular repórter do subgenoma do CHIKV, BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659, foi funcional para a expressão dos genes heterólogos;
- e) A linhagem BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 manteve constante a expressão do gene GLuc ao longo do cultivo celular, indicando a estabilidade do replicon repórter construído;
- f) O vírus repórter YFV-GLuc apresentou replicação semelhante a seu vírus parental, YFV-17D;
- g) A expressão do gene repórter do YFV-GLuc se manteve estável ao longo das passagens celulares;
- h) A expressão de GLuc foi correlacionada à replicação do YFV-GLuc;
- i) O vírus pSVJS01-DENV2 conservou as características de replicação de seu vírus parental DENV2 BR-3808;
- j) O vírus pSVJS01-DENV2 não apresentou mutação na região do envelope.

9 PERSPECTIVAS

- a) Sequenciar o genoma do vírus recombinante IC-CHIKV-99659;
- b) Comparar o fenótipo do IC-CHIKV-99659 ao do seu vírus parental CHIKV-99659;
- c) Usar o IC-CHIKV-99659 para construção de um vírus recombinante atenuado contendo IRES para a expressão do cassete da poliproteína estrutural do CHIKV;
- d) Sequenciar o replicon repórter da linhagem celular BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-9965;
- e) Usar a linhagem celular BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-9965 para a triagem de compostos naturais e sintéticos quanto as suas funções anti-CHIKV.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B.; BOOTS, M. How important is vertical transmission in mosquitoes for the persistence of dengue? Insights from a mathematical model. **Epidemics**, Amsterdã; v. 2, n. 1, p. 1-10, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil) **Vacina da dengue: qual é a recomendação?**, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/web/guest/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/3796622>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- AKAHATA, W. et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. **Nat. Med.**, Nova Iorque, v. 16, n. 3, p. 334-338, 2010.
- ALHOOT, M. A.; WANG, S. M.; SEKARAN, S. D. RNA interference mediated inhibition of dengue virus multiplication and entry in HepG2 cells. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 3, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0034060>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- ARENHART, S. et al. Use of homologous recombination in yeast to create chimeric bovine viral diarrhea virus cDNA clones. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 993-999, 2016
- ARROYO, J. et al. ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. **J. Virol.**, Washington, v. 78, n. 22, p. 12497-12507, 2004.
- ASSENBERG, R. et al. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. **J. Virol.**, Washington, v. 83, n. 24, p. 12895-12906, 2009.
- AUBRY, F. et al. Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 95, n. Pt 11, p. 2462-2467, 2014.
- AVIRUTNAN, P. et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **J. Exp. Med.**, Nova Iorque, v. 207, n. 4, p. 793-806, 2010.
- AZAMI, N. A.; MOI, M. L.; TAKASAKI, T. Neutralization Assay for Chikungunya Virus Infection: Plaque Reduction Neutralization Test. **Methods Mol. Biol.**, Totowa, v. 1426, p. 273-282, 2016.
- AZEVEDO, A. S. et al. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. **PLoS One**, São Francisco, v. 6, n. 7, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020528>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

BALMASEDA, A. et al. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 73, n. 6, p. 1059-1062, 2005.

_____. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 10, n. 2, p. 317-322, 2003.

BANDEIRA, A. C. et al. Prolonged shedding of Chikungunya virus in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. **IDCases**, Amsterdã, v. 6, p. 100-103, 2016.

_____. Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: First report in Brazil. **IDCases**, Amsterdã, v. 5, p. 57-59, 2016.

BARBOSA, C. M. et al. Yellow Fever Virus RNA in Urine and Semen of Convalescent Patient, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 24, n. 1, 2018. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/1/17-1310_article>. Acesso em: 10 fev. 2018.

BARNETT, E. D. Yellow fever: epidemiology and prevention. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 44, n. 6, p. 850-856, 2007.

BARRETT, A. D.; MONATH, T. P. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. **Adv. Virus Res.**, Nova Iorque, v. 61, p. 291-315, 2003.

BARRETT, A. D. T.; STANBERRY, L. **Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases**. Cambridge: Academic Press, 2008.

BARRETT, A. D.; TEUWEN, D. E. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? **Curr. Opin. Immunol.**, Filadélfia, v. 21, n. 3, p. 308-313, 2009.

BARRETT, A. D. T. Yellow fever live attenuated vaccine: A very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. **Vaccine**, Amsterdã, v. 35, n. 44, p. 5951-5955, 2017.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estud. av.**, São Paulo, v. 22, n. 64, p. 53-71, 2008.

BERNARD, K. A.; KLIMSTRA, W. B.; JOHNSTON, R. E. Mutations in the E2 glycoprotein of Venezuelan equine encephalitis virus confer heparan sulfate interaction, low morbidity, and rapid clearance from blood of mice. **Virology**, Nova Iorque, v. 276, n. 1, p. 93-103, 2000.

BLANEY, J. E. et al. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 71, n. 6, p. 811-821, 2004a.

_____. Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. **BMC Infect. Dis.**, Londres, v. 4, p. 39, 2004b. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-4-39>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

BLITVICH, B. Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. Nikos Vasilakis and Duane J. Gubler. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 95, n. 2, p. 488-489, 2016.

BONALDO, M. C. et al. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. **J. Mol. Biol.**, Amsterdã, v. 315, n. 4, p. 873-885, 2002.

_____. Attenuation of recombinant yellow fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface. **J. Virol.**, Washington, v. 79, n. 13, p. 8602-8613, 2005.

_____. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. **Virol J.**, Londres, v. 4, p. 115, 2007. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-4-115>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

BONALDO, M. C.; SEQUEIRA, P. C.; GALLER, R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. **Hum. Vaccin. Immunother.**, Austin, v. 10, n. 5, p. 1256-1265, 2014.

BORGES, M. C.; CASTRO, L. A.; FONSECA, B. A. Chloroquine use improves dengue-related symptoms. **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 5, p. 596-599, 2013.

BORGHERINI, G. et al. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 47, n. 4, p. 469-475, 2008.

BOURAIÏ, M. et al. Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. **J. Virol.**, Washington, v. 86, n. 6, p. 3121-3134, 2012.

BOYER, J. C.; HAENNI, A. L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. **Virology**, Nova Iorque, v. 198, n. 2, p. 415-426, 1994.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. Aedes aegypti: histórico do controle no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue Aspectos Epidemiológicos, Diagnóstico e Tratamento**. Brasília, 2002. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_aspecto_epidemiologicos_diagnostico_tratamento.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela**. Brasília, 2004. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epid_febre_amarela.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Preparação e Resposta à Introdução do Vírus Chikungunya no Brasil**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/preparacao_resposta_virus_chikungunya_brasil.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014**. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002---BE-at---SE-53.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Dengue diagnóstico e manejo clínico adulto e criança**. Brasil, 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/14/dengue-manejo-adulto-crianca-5d.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016**, 2017a. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v--rus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-52--2016.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Chikungunya: Manejo Clínico**, 2017b. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/25/chikungunya-novo-protocolo.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017**, 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

BREDENBEEK, P. J. et al. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 84, n. Pt 5, p. 1261-1268, 2003.

BRIGHTON, S. W. Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study. **S. Afr. Med. J.**, Cidade do Cabo, v. 66, n. 6, p. 217-218, 1984.

BRIOLANT, S. et al. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. **Antiviral Res.**, Amsterdã, v. 61, n. 2, p. 111-1117, 2004.

BRITO, C. A.; CORDEIRO, M. T. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 49, n. 5, p. 537-543, 2016.

BUCHHOLZ, U. J.; FINKE, S.; CONZELMANN, K. K. Generation of bovine respiratory

syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. **J. Virol.**, Washington, v. 73, n. 1, p. 251-259, 1999.

BUTRAPET, S. et al. Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. **J. Virol.**, Washington, v. 74, n. 7, p. 3011-3019, 2000.

CAGLIOTI, C. et al. Chikungunya virus infection: an overview. **New Microbiol.**, Pavia, v. 36, n. 3, p. 211-227, 2013.

CALISHER CH, KARABATSOS N. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In: MONATH, T.P. **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Florida: CRC Press, 1988. p. 19-57.

CAPEDING, M. R. et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **Lancet**, Londres, v. 384, n. 9951, p. 1358-1365, 2014.

CARDOSO, J. A. C. et al. Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, southern Brazil, 2008. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 16, n. 12, p. 1918-1924, 2010.

CARRINGTON, L. B.; SIMMONS, C. P. Human to mosquito transmission of dengue viruses. **Front. Immunol.**, Lausana, v. 5, p. 290, 2014.

CARTER, H. R. **Yellow Fever: An Epidemiological and Historical Study of Its Place of Origin**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1931.

CASTILLO RAMIREZ, J. A.; URCUQUI-INCHIMA, S. Dengue Virus Control of Type I IFN Responses: A History of Manipulation and Control. **J. Interferon Cytokine Res.**, Nova Iorque; v. 35, n. 6, p. 421-430, 2015.

CAVALCANTE, K. R.; TAUIL, P. L. Epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil, 2000-2012. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 11-20, 2016.

CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU. **Febre Amarela**, 2018. Disponível em: <http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/febre_amarela/febre_amarela.htm>. Acesso em: 10 fev. 2018.

CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. **History Timeline Transcript**, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/travel-training/local/HistoryEpidemiologyandVaccination/HistoryTimelineTranscript.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Transmission of Yellow Fever Vaccine Virus Through Breast-Feeding --- Brazil, 2009**, 2010a. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5905a2.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Transfusion-Related Transmission of Yellow Fever Vaccine Virus --- California, 2009**, 2010b. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5902a2.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **CDC DENV-1-4 Real-Time RT-PCR Assay**, 2013. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/realtime.html>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Transmission of Yellow Fever Virus**, 2015. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Chikungunya Virus, Transmission**, 2016. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/chikungunya/transmission/index.html>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Chapter 3 Infectious Diseases Related to Travel**, 2017a. Disponível

em:<<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/yellow-fever>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Laboratory Guidance and Diagnostic Testing**, 2017b. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

CHALAEM, P. et al. Characterization of a Chikungunya virus strain isolated from banked patients' sera. **Virol. J.**, Londres, v. 13, n. 1, 2016. Disponível em:

<<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-016-0606-3>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

CHAMBERS, T. J. et al. Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. **J. Virol.**, Washington, v. 73, n. 4, p. 3095-30101,1999.

CHAN, Y. K.; GACK, M. U. A phosphomimetic-based mechanism of dengue virus to antagonize innate immunity. **Nat. Immunol.**, Nova Iorque, v. 17, n. 5, p. 523-530, 2016.

CHANG, L. J. et al. Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial. **Lancet**, Londres, v. 384, n. 9959, p. 2046-2052, 2014.

CHEN, L. H. et al. Yellow fever virus transmission via breastfeeding: follow-up to the paper on breastfeeding travelers. **J. Travel Med.**, Hamilton, v. 17, n. 4, p. 286-287, 2010.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nat. Med.**, Nova Iorque, v. 3, n. 8, p. 866-871,1997.

CHENG, H. J. et al. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. **Mol. Immunol.**, Oxford, v. 47, n. 2-3, p. 398-406, 2009.

- CHIANG, C. Y. et al. A novel single-dose dengue subunit vaccine induces memory immune responses. **PLoS One**, São Francisco, v. 6, n. 8, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0023319>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- CHOMPOOSRI, J. et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasit. Vectors**, Londres. v. 9, p. 227, 2016. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1505-6>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- CHOTIWAN, N. et al. Molecular determinants of dengue virus 2 envelope protein important for virus entry in FcγRIIA-mediated antibody-dependent enhancement of infection. **Virology**, Nova Iorque, v. 456-457, p. 238-46, 2014.
- CHUSRI, S. et al. Case reports of neuro-Chikungunya in southern Thailand. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 85, n. 2, p. 386-389, 2011.
- CIRE. **Cire La Reunion-Mayotte. Epidemie de chikungunya a la Reunion: point au 1er juin 2006 pour la semaine 21 allant du 22 au 28 mai 2006**, 2006. Disponível em: <http://www.invs.sante.fr/presse/2006/le_point_sur/chikungunya_reunion_020606/chikungunya_reunion_s21.pdf> Acesso em: 10 fev. 2018.
- COSTA, S. M.; FREIRE, M. S.; ALVES, A. M. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. **Vaccine**, Amsterdã, v. 24, n. 21, p. 4562-4564, 2006.
- COUTO-LIMA, D. et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. **Sci. Rep.**, Londres, v.7, n. 4848, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-05186-3>> Acesso em: 10 fev. 2018.
- CRUZ, L. C. et al. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 48, n. 1, p. 18-25, 2015.
- CUNHA, R. V. D.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 8, p. 523-531, 2017.
- DASH, M.; MOHANTY, I.; PADHI, S. Laboratory diagnosis of chikungunya virus: do we really need it? **Indian J. Med. Sci.**, Mumbai', v. 65, n. 3, p. 83-91, 2011.
- DASH, P. K. et al. Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of YFV infection in *Aedes aegypti*. **Viol. J.**, Londres, v. 9, 2012. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-9-27>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- DE BORBA, L. et al. Synergistic interactions between the NS3(hel) and E proteins contribute

to the virulence of dengue virus type 1. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 6, n. 4, 2012. Disponível em:
<<http://journals.plos.org/plosntds/article/related?id=10.1371%2Fjournal.pntd.0001624>>.
Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. Overlapping local and long-range RNA-RNA interactions modulate dengue virus genome cyclization and replication. **J. Virol.**, Washington, v. 89, n. 6, p. 3430-3437, 2015.

DEGALLIER, N. et al. Avaliação do Risco de Transmissão Silvestre da Dengue no Brasil. **Inf. Epidemiol. Sus.**, Brasília, v. 10, p. 13-15, 2001.

DE LAMBALLERIE, X. et al. On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, Nova Iorque, v. 8, n. 6, p. 837-839, 2008.

DELANG, L. et al. Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. **J. Antimicrob. Chemother.**, Londres; v. 69, n. 10, p. 2770-2784, 2014.

DELATTE, H. et al. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Réunion. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, Nova Iorque, v. 10, n. 3, p. 249-258, 2010.

DELOGU, I. et al. In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant. **Antiviral Res.**, Amsterdã, v. 90, n. 3, p. 99-107, 2011.

DESBIEZ, C. et al. A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses. **J. Virol. Methods**, Amsterdã, v. 183, n. 1, p. 94-97, 2012.

DIALLO, M. et al. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 60, n. 2, p. 281-286, 1999.

DRYGA, S. A.; DRYGA, O. A.; SCHLESINGER, S. Identification of mutations in a Sindbis virus variant able to establish persistent infection in BHK cells: the importance of a mutation in the nsP2 gene. **Virology**, Nova Iorque, v. 228, n. 1, p. 74-83, 1997.

DURBIN, A. P. et al. Development and clinical evaluation of multiple investigational monovalent DENV vaccines to identify components for inclusion in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. **Vaccine**, Amsterdã, v. 29, n. 42, p. 7242-7250, 2011.

ECKELS, K. H.; HARRISON, V. R.; HETRICK, F. M. Chikungunya virus vaccine prepared by Tween-ether extraction. **Appl. Microbiol.**, Washington; v. 19, n. 2, p. 321-325, 1970.

EDELMAN, R. et al. A live attenuated dengue-1 vaccine candidate (45AZ5) passaged in primary dog kidney cell culture is attenuated and immunogenic for humans. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 170, n. 6, p. 1448-1455, 1994.

ELSHUBER, S. et al. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by

tick-borne encephalitis virus. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 84, n. Pt 1, p. 183-191, 2003.

ERASMUS, J. H. et al. A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. **Nat. Med.**, Nova Iorque, v. 23, n. 2, p. 192-199, 2017.

ERNOULD, S. et al. [Chikungunya in paediatrics: epidemic of 2005-2006 in Saint-Denis, Reunion Island]. **Arch. Pediatr.**, Paris, v. 15, n. 3, p. 253-262, 2008.

FARES, R. C. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **Biomed Res. Int.**, Nova Iorque, v. 2015, p. 321873, 2015.

FARIAS, K. J.; MACHADO, P. R.; DA FONSECA, B. A. Chloroquine inhibits dengue virus type 2 replication in Vero cells but not in C6/36 cells. **Scientific World Journal**, Nova Iorque, v. 2013, 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/282734/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

FARIAS, K. J. et al. Chloroquine interferes with dengue-2 virus replication in U937 cells. **Microbiol. Immunol.**, Richmond, v. 58, n. 6, p. 318-326, 2014.

FERNANDEZ, S. et al. An adjuvanted, tetravalent dengue virus purified inactivated vaccine candidate induces long-lasting and protective antibody responses against dengue challenge in rhesus macaques. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 92, n. 4, p. 698-708, 2015.

FIORAVANTI, R. et al. Inhibitors of Yellow Fever Virus replication based on 1,3,5-triphenyl-4,5-dihydropyrazole scaffold: Design, synthesis and antiviral evaluation. **Eur. J. Med. Chem.**, Paris, v. 141, p. 15-25, 2017.

FRANCO, D. et al. Evaluation of yellow fever virus 17D strain as a new vector for HIV-1 vaccine development. **Vaccine**, Amsterdã, v. 28, n. 35, p. 5676-5685, 2010.

FROS, J. J. et al. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. **J. Virol.**, Washington, v. 84, n. 20, p. 10877-10887, 2010.

_____. The C-terminal domain of chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, cytopathicity, and inhibition of interferon signaling. **J. Virol.**, Washington, v. 87, n. 18, p. 10394-10400, 2013.

GALLER, R. et al. The yellow fever 17D vaccine virus: molecular basis of viral attenuation and its use as an expression vector. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 157-168, 1997.

GANDINI, M. et al. Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN- α production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 7, n. 6, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002257>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

- GARCÍA-ARRIAZA, J. et al. A novel poxvirus-based vaccine, MVA-CHIKV, is highly immunogenic and protects mice against chikungunya infection. **J. Virol.**, Washington, v. 88, n. 6, p. 3527-3547, 2014.
- GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow fever: a reemerging threat. **Clin. Lab. Med.**, Filadélfia; v. 30, n. 1, p. 237-260, 2010.
- GARDNER, C. L. et al. Interferon-alpha/beta deficiency greatly exacerbates arthritogenic disease in mice infected with wild-type chikungunya virus but not with the cell culture-adapted live-attenuated 181/25 vaccine candidate. **Virology**, Nova Iorque, v. 425, n. 2, p. 103-112, 2012.
- GEBHARD, L. G. et al. A Proline-Rich N-Terminal Region of the Dengue Virus NS3 Is Crucial for Infectious Particle Production. **J. Virol.**, Washington, v. 90, n. 11, p. 5451-5461, 06 2016.
- GEORGE, J. et al. Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. **Sci. Rep.**, Londres, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-10901-1>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- GERMI, R. et al. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology**, Nova Iorque, v. 292, n. 1, p. 162-168, 2002.
- GIRY, C. et al. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. **BMC Microbiol.**, Londres, v. 17, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5415735/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- GLÄSKER, S. et al. Virus replicon particle based Chikungunya virus neutralization assay using *Gaussia luciferase* as readout. **Virol. J.**, Londres, v. 10, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23855906>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- GOPAKUMAR, H.; RAMACHANDRAN, S. Congenital chikungunya. **J. Clin. Neonatol.**, Mumbai, v. 1, n. 3, p. 155-156, 2012.
- GORCHAKOV, R. et al. Attenuation of Chikungunya virus vaccine strain 181/clone 25 is determined by two amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein. **J. Virol.**, Washington, v. 86, n. 11, p. 6084-6096, 2012.
- GOULD, E. A. et al. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 16, n. 12, p. 1702-1704, 2010.
- GOWRI SANKAR, S. et al. Evaluation and use of NS1 IgM antibody detection for acute dengue virus diagnosis: report from an outbreak investigation. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 18, n. 1, p. 8-10, 2012.

GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. Filadélfia, Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 651-686.

GRIVARD, P. et al. Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. **Pathol. Biol. (Paris)**, Paris, v. 55, n. 10, p. 490-494, 2007.

GUALANO, R. C. et al. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 79 (Pt 3), p. 437-446, 1998.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 1, n. 2, p. 55-57, 1995.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUEDES, D. R. et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. **J. Vector Borne Dis.**, Nova Deli, v. 47, n. 2, p. 67-75, 2010.

GUILARDE, A. O. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 197, n. 6, p. 817-824, 2008.

GUIMARD, T. et al. Short report: Incidence of yellow fever vaccine-associated neurotropic disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 81, n. 6, p. 1141-1143, 2009.

GUIRAKHOO, F. et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. **J. Virol.**, Washington, v. 75, n. 16, p. 7290-7304, 2001.

GUO, F. et al. A Novel Benzodiazepine Compound Inhibits Yellow Fever Virus Infection by Specifically Targeting NS4B Protein. **J. Virol.**, Washington, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27654301>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. **Nat. Rev. Dis. Primers**, Londres, v. 2, p. 16055, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27534439>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. Dengue: a continuing global threat. **Nat. Rev. Microbiol.**, Londres, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, 2010.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **J. Clin. Virol.**, Amsterdã, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2003.

HADINEGORO, S. R. et al. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 373, n. 13, p. 1195-1206, 2015.

HAHN, C. S. et al. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D

vaccine strain derived from it. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 84, n. 7, p. 2019-2023, 1987.

HALSTEAD, S. B. et al. Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. IV. Characterization of a vaccine candidate in fetal rhesus lung cells. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 33, n. 4, p. 679-683, 1984.

HAYES, E. B.; GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v. 11, n. 4, p. 311-317, 1992.

HELENIUS, A.; MARSH, M.; WHITE, J. Inhibition of Semliki forest virus penetration by lysosomotropic weak bases. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 58 Pt 1, p. 47-61, 1982.

HENAO-RESTREPO, A. M. et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. **Lancet**, Londres, v. 386, n. 9996, p. 857-866, 2015.

HIGGS, S. The 2005-2006 Chikungunya epidemic in the Indian Ocean. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, Nova Iorque, v. 6, n. 2, p. 115-116, 2006.

HOARAU, J. J. et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 2010.

HSU, Y. C. et al. Identification of a small-molecule inhibitor of dengue virus using a replicon system. **Arch. Virol.**, Nova Iorque, v. 157, n. 4, p. 681-688, 2012.

HUGGINS, J. W. Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v. 11 Suppl 4, p. S750-61, 1989.

IMPERATO, P. J. The Convergence of a Virus, Mosquitoes, and Human Travel in Globalizing the Zika Epidemic. **J Community Health**, Amsterdã, v. 41, n. 3, p. 674-679, 2016.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Virus Taxonomy: 2016 Release. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, 2016>. Acesso em: 24 dez. 2017.

ISHIKAWA, T.; YAMANAKA, A.; KONISHI, E. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. **Vaccine**, Amsterdã, v. 32, n. 12, p. 1326-1337, 2014.

ISKEN, O. et al. Functional characterization of bovine viral diarrhea virus nonstructural protein 5A by reverse genetic analysis and live cell imaging. **J. Virol.**, Washington, v. 88, n. 1, p. 82-98, 2014.

JAIN, M.; RAI, S.; CHAKRAVARTI, A. Chikungunya: a review. **Trop. Doct.**, Londres, v.

38, n. 2, p. 70-72, 2008.

JIANG, X. et al. Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. **Vaccine**, Amsterdã, v. 29, n. 6, p. 1248-1257, 2011.

_____. Molecular and immunological characterization of a DNA-launched yellow fever virus 17D infectious clone. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 96, n. Pt 4, p. 804-814, 2015.

JONES, C. T. et al. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. **J. Virol.**, Washington, v. 77, n. 12, p. 7143-7149, 2003.

JONES, C. T.; PATKAR, C. G.; KUHN, R. J. Construction and applications of yellow fever virus replicons. **Virology**, Nova Iorque, v. 331, n. 2, p. 247-259, 2005.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol.**, Londres, v. 4, n. 7, p. 837-856, 2009.

JOSSERAN, L. et al. Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta; v. 12, n. 12, p. 1994-1995, 2006.

JULANDER, J. G. et al. Efficacy of 2'-C-methylcytidine against yellow fever virus in cell culture and in a hamster model. **Antiviral Res.**, Amsterdã, v. 86, n. 3, p. 261-267, 2010.

KALAYANAROOJ, S. et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 176, n. 2, p. 313-321, 1997.

KAPTEIN, S. J.; NEYTS, J. Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections. **Curr. Opin. Pharmacol.**, Oxford, v. 30, p. 1-7, 10 2016.

KARABATSOS, N. **International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**. San Antonio: American Society of Tropical Medicine and Hygiene for The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses, 1985.

KARPF, A. R. et al. Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with Sindbis virus. **J. Virol.**, Washington, v. 71, n. 9, p. 7119-7123, 1997.

KASSAR, T. C. et al. Construction and characterization of a recombinant yellow fever virus stably expressing Gaussia luciferase. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3 Suppl, p. 2119-2130, 2017.

KATO, F.; HISHIKI, T. Dengue Virus Reporter Replicon is a Valuable Tool for Antiviral Drug Discovery and Analysis of Virus Replication Mechanisms. **Viruses**, Basileia, v. 8, n. 5, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27164125>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

KATO, F. et al. Novel antiviral activity of bromocriptine against dengue virus replication. **Antiviral Res.**, Amsterdã, v. 131, p. 141-147, 2016.

KAUFMANN, B.; ROSSMANN, M.G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. **Microbes Infect.**, Paris, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2011.

KAUR, P.; CHU, J. J. Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges. **Drug Discov. Today**, Oxford, v. 18, n. 19-20, p. 969-83, 2013.

KAUR, P. et al. Inhibition of chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 57, n. 1, p. 155-167, 2013.

KEE, A. C.; YANG, S.; TAMBYAH, P. Atypical chikungunya virus infections in immunocompromised patients. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 16, n. 6, p. 1038-1040, 2010.

KELLY, E. P. et al. Evolution of attenuating mutations in dengue-2 strain S16803 PDK50 vaccine and comparison of growth kinetics with parent virus. **Virus Genes**, Boston, v. 43, n. 1, p. 18-26, 2011.

_____. Identification of mutations in a candidate dengue 4 vaccine strain 341750 PDK20 and construction of a full-length cDNA clone of the PDK20 vaccine candidate. **Vaccine**, Amsterdã, v. 28, n. 17, p. 3030-3037, 2010.

KEYAERTS, E. et al. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 323, n. 1, p. 264-268, 2004.

KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 83, n. Pt 12, p. 3075-3084, 2002.

KHAN, M. et al. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells. **J. Med. Virol.**, Nova Iorque, v. 82, n. 5, p. 817-824, 2010.

KUHN, R. J. Togaviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 629-650.

KINNEY, R. M. et al. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. **Virology**, Nova Iorque, v. 230, n. 2, p. 300-308, 1997.

KIRKPATRICK, B. D. et al. The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. **Sci. Transl. Med.**, Washington, v. 8, n. 330, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27089205>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

KOISHI, A. C. et al. Screening of Dengue virus antiviral activity of marine seaweeds by an in

situ enzyme-linked immunosorbent assay. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 12, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23227238>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

KONG, Y. Y. et al. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. **J. Virol. Methods**, Amsterdã, v. 138, n. 1-2, p. 123-130, 2006.

KRUTIKOV, M.; MANSON, J. Chikungunya Virus Infection: An Update on Joint Manifestations and Management. **Rambam Maimonides Med. J.**, Haifa, v. 7, n. 4, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5101007>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

KÜMMERER, B. M.; RICE, C. M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **J. Virol.**, Washington, v. 76, n. 10, p. 4773-4784, 2002.

KÜMMERER, B. M. et al. Construction of an infectious Chikungunya virus cDNA clone and stable insertion of mCherry reporter genes at two different sites. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 93, n. Pt 9, p. 1991-1995, 2012.

LABADIE, K. et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 120, n. 3, p. 894-906, 2010.

LAI, C. J. et al. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 88, n. 12, p. 5139-5143, 1991.

LAKSHMI, V. et al. Clinical features and molecular diagnosis of Chikungunya fever from South India. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 46, n. 9, p. 1436-1442, 2008.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 13, n. 5, p. 764-767, 2007.

LANCIOTTI R, R. J. Arboviruses. In: DETRICK B, S. J., HAMILTON R (Ed.). **Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology**. Washington: ASM Press, 2016. p.648-657.

LANI, R. et al. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. **Sci. Rep.**, Londres, v. 5, 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep11421>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

LE BRETON, M. et al. Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. **BMC Microbiol.**, Londres, v. 11, 2011. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-11-234>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

LEARDKAMOLKARN, V.; SIRIGULPANIT, W. Establishment of a stable cell line coexpressing dengue virus-2 and green fluorescent protein for screening of antiviral

compounds. **J. Biomol. Screen**, Thousand Oaks, v. 17, n. 3, p. 283-292, 2012.

LEBRUN, G. et al. Guillain-Barré syndrome after chikungunya infection. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 15, n. 3, p. 495-496, 2009.

LEE, E.; WEIR, R. C.; DALGARNO, L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. **Virology**, Nova Iorque, v. 232, n. 2, p. 281-290, 1997.

LEUNG, J. Y. et al. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **J. Virol.**, Washington; v. 82, n. 10, p. 4731-4741, 2008.

LEVITT, N. H. et al. Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. **Vaccine**, Amsterdã, v. 4, n. 3, p. 157-162, 1986.

LEYSEN, P. et al. The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. **J. Virol.**, Washington, v. 79, n. 3, p. 1943-1947, 2005.

LEYSEN, P.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. The anti-yellow fever virus activity of ribavirin is independent of error-prone replication. **Mol. Pharmacol.**, Bethesda, v. 69, n. 4, p. 1461-1467, 2006.

LI, Y. G. et al. Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. **Intervirol.**, Basileia; v. 56, n. 1, p. 6-12, 2013.

LIANG, G; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerg. Microbes Infect.**, Nova Iorque, v. 4, n. 3, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4395659>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

LIN, C. F. et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **J. Med. Virol.**, Nova Iorque, v. 69, n. 1, p. 82-90, 2003.

LINDENBACH, B. D. Flaviviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 712-746.

LIU, W. J. et al. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. **J. Virol.**, Washington, v. 78, n. 22, p. 12225-12235, 2004.

LLOYD, W.; THEILER, M.; RICCI, N. I. Modification of the virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues *in vitro*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 481-529, 1936.

LORENZ, I. C. et al. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. **J. Virol.**, Washington, v. 76, n. 11, p. 5480-

5491, 2002.

LOURENÇO, J.; RECKER, M. The 2012 Madeira dengue outbreak: epidemiological determinants and future epidemic potential. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 8, n. 8, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003083>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

LU, Y. E.; CASSESE, T.; KIELIAN, M. The cholesterol requirement for sindbis virus entry and exit and characterization of a spike protein region involved in cholesterol dependence. **J. Virol.**, Washington, v. 73, n. 5, p. 4272-4278, 1999.

LUM, F. M. et al. An essential role of antibodies in the control of Chikungunya virus infection. **J. Immunol.**, Bethesda, v. 190, n. 12, p. 6295-6302, 2013.

LUMSDEN, W. H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 33-57, 1955.

LUO, D. et al. Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. **EMBO J.**, Oxford, v. 27, n. 23, p. 3209-3219, 2008.

LYRA, P. P. et al. Congenital Chikungunya Virus Infection after an Outbreak in Salvador, Bahia, Brazil. **AJP Rep.**, Nova Iorque, v. 6, n. 3, p. e299-e300, 2016.

MACIEL, M. et al. A DNA vaccine against yellow fever virus: development and evaluation. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 9, n. 4, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25875109>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MAHESHWARI, R. K.; SRIKANTAN, V.; BHARTIYA, D. Chloroquine enhances replication of Semliki Forest virus and encephalomyocarditis virus in mice. **J. Virol.**, Washington, v. 65, n. 2, p. 992-995, 1991.

MAHY, B.; REGENMORTEL, M. V. **Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology**. Cambridge: Academic Press, 2009. p. 1-670.

MAROUN, S. L. et al. Case report: vertical dengue infection. **J. Pediatr. (Rio J.)**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 6, p. 556-559, 2008.

MARTINEZ, L. J. et al. Safety and Immunogenicity of a Dengue Virus Serotype-1 Purified-Inactivated Vaccine: Results of a Phase 1 Clinical Trial. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 93, n. 3, p. 454-460, 2015.

MARTINEZ-GUTIERREZ, M. et al. Lovastatin delays infection and increases survival rates in AG129 mice infected with dengue virus serotype 2. **PLoS One**, São Francisco, v. 9, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087412>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MARTINS, V. E. et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 7, 2012. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405123>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MARTÍNEZ-GUTIERREZ, M.; CASTELLANOS, J. E.; GALLEGÓ-GÓMEZ, J. C. Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. **Intervirology**, Basileia, v. 54, n. 4, p. 202-216, 2011.

MARTÍNEZ-PULGARÍN, D. F. et al. Ophthalmologic aspects of chikungunya infection. **Travel Med. Infect. Dis.**, Amsterdã, v. 14, n. 5, p. 451-457, 2016.

MASSÉ, N. et al. Dengue virus replicons: production of an interserotypic chimera and cell lines from different species, and establishment of a cell-based fluorescent assay to screen inhibitors, validated by the evaluation of ribavirin's activity. **Antiviral Res.**, Amsterdã, v. 86, n. 3, p. 296-305, 2010.

MASTRANGELO, E. et al. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. **J. Antimicrob. Chemother.**, Londres, v. 67, n. 8, p. 1884-1894, 2012.

MAVALE, M. et al. Venereal transmission of chikungunya virus by *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 83, n. 6, p. 1242-1244, 2010.

MAYHOUB, A. S. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of thiazoles targeting flavivirus envelope proteins. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 54, n. 6, p. 1704-1714, 2011.

MCALLISTER, A. et al. Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. **J. Virol.**, Washington, v. 74, n. 19, p. 9197-9205, 2000.

MCELROY, K. L. et al. Characterization of an infectious clone of the wild-type yellow fever virus Asibi strain that is able to infect and disseminate in mosquitoes. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 86, n. Pt 6, p. 1747-1751, 2005.

_____. Role of the yellow fever virus structural protein genes in viral dissemination from the *Aedes aegypti* mosquito midgut. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 87, n. Pt 10, p. 2993-3001, 2006.

MEERTENS, L. et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v. 12, n. 4, p. 544-557, 2012.

MEIER, K. C. et al. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. **PLoS Pathog**, São Francisco; v. 5, n. 10, 2009. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19816561>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MILLER, J. L. et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog.**, São Francisco, v. 4, n. 2, 2008. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2233670>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MILLER, S. et al. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 282, n. 12, p. 8873-8882, 2007.

MISHRA, P. et al. Inhibition of Chikungunya Virus Replication by 1-[(2-Methylbenzimidazol-1-yl) Methyl]-2-Oxo-Indolin-3-ylidene] Amino] Thiourea(MBZM-N-IBT). **Sci. Rep.**, Londres, v. 6, 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26843462>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MODHIRAN, N. et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Sci. Transl. Med.**, Washington, v. 7, n. 304, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26355031>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MOHAN, A. et al. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of Chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. **Indian J. Dermatol.**, Mumbai, v. 55, n. 1, p. 54-63, 2010.

MONATH, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 91, n. 7, p. 2395-400, 1994.

_____. Yellow fever: an update. **Lancet Infect. Dis.**, Nova Iorque, v. 1, n. 1, p. 11-20, 2001.

_____. Yellow fever vaccine. **Expert. Rev. Vaccines**, Londres, v. 4, n. 4, p. 553-574, 2005

_____. Treatment of yellow fever. **Antiviral Res.**, Amsterdã, v. 78, n. 1, p. 116-124, 2008.

MONATH, T. P. et al. An inactivated cell-culture vaccine against yellow fever. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 364, n. 14, p. 1326-1333, 2011.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. **J. Clin. Virol.**, Amsterdã, v. 64, p. 160-173, 2015.

MORRISON, A. C. et al. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. **PLoS Med.**, São Francisco, v. 5, n. 3, 2008. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0050068>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MORRISON, T. E. Reemergence of chikungunya virus. **J. Virol.**, Washington, v. 88, n. 20, p. 11644-11647, 2014.

MOUNCE, B. C. et al. Chikungunya virus overcomes polyamine depletion by mutation of nsp1 and the opal stop codon to confer enhanced replication and fitness. **J. Virol.**,

Washington, v. 91, n. 15, 2017. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28539441>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

MOURYA, D. T. et al. Horizontal and vertical transmission of dengue virus type 2 in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Acta Virol.**, Bratislava, v. 45, n. 2, p. 67-71, 2001.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat. Rev. Microbiol.**, Londres, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.

MUTHUMANI, K. et al. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. **Vaccine**, Amsterdã, v. 26, n. 40, p. 5128-5134, 2008.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L. et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **J. Virol.**, Washington, v. 79, n. 13, p. 8004-8013, 2005.

NAVARRO-SANCHEZ, E. et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO Rep.**, Oxford; v. 4, n. 7, p. 723-728, 2003.

NAYAK, T. K. et al. Regulation of Viral Replication, Apoptosis and Pro-Inflammatory Responses by 17-AAG during Chikungunya Virus Infection in Macrophages. **Viruses**, Basileia, v. 9, n. 1, 2017. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5294972/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

NEB. **BioLux® Gaussia Luciferase Assay Kit**, 2018. Disponível em:

<<https://www.neb.com/products/e3300-biolux-gaussia-luciferase-assay-kit#Product%20Information>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

NG, C. Y. et al. Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing. **Antiviral Res.**, Amsterdã, v. 76, n. 3, p. 222-231, 2007.

NINDS. **Guillain-Barré Syndrome Fact Sheet**, 2017. Disponível em:

<<https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/Guillain-Barr%C3%A9-Syndrome-Fact-Sheet>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

NIMMANNITYA, S. et al. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 18, n. 6, p. 954-971, 1969.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 269, 1991.

NUNES, M. R. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil.

BMC Med., Londres, v. 13, 2015. Disponível em:

<<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-015-0348-x>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

OEHLER, E. et al. Increase in cases of Guillain-Barré syndrome during a Chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014 to 2015. **Euro Surveill.**, Estocolmo, v. 20, n. 48, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26690898>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Chikungunya Fever, a re-emerging Disease in Asia**, 2018. Disponível em: <http://www.searo.who.int/entity/emerging_diseases/topics/Chikungunya/en/>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Guidelines on Clinical Management of Chikungunya Fever Guidelines on Clinical Management**, 2008. Disponível em: <http://www.wpro.who.int/mvp/topics/ntd/Clinical_Mgmt_Chikungunya_WHO_SEARO.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever, Revised and Expanded Edition**, 2011. Disponível em: <http://apps.searo.who.int/pds_docs/B4751.pdf?ua=1>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Rapid field entomological assessment during yellow fever outbreaks in Africa**, 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112785/WHO_HSE_PED_CED_2014.3_eng.pdf;jsessionid=335D256880B56CD55745F8799039885D?sequence=1>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations- Interim guidance for entomologists**, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/zika/insecticide-resistance/en/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Dengue and severe dengue**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Chikungunya**, 2018a. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/don/archive/disease/chikungunya/en/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Yellow fever**, 2018b. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/archive/disease/yellow_fever/en/>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Dengue fever**, 2018c. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/archive/disease/dengue_fever/en/>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Immunization coverage**, 2018d, Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/en/>> Acesso em: 10 fev. 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection**, 2018. Disponível em:
<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=43570&Itemid=270&lang=en>. Acesso em: 10 fev. 2018.

OSANAI, C. H. et al. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.

OSORIO, J. E. et al. Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. **Vaccine**, Amsterdã, v. 29, n. 42, p. 7251-7260, 2011.

STOBART, C. C.; MOORE, M. L. RNA virus reverse genetics and vaccine design. **Viruses**, Basileia, v. 6, n. 7, p. 2531-2350, 2014.

OZDEN, S. et al. Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 283, n. 32, p. 21899-21908, 2008.

PABBARAJU, K. et al. Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. **J. Clin. Virol.**, Amsterdã, v. 83, p. 66-71, 2016.

PALUMBO, E. Pegylated interferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. **Ther. Adv. Chronic Dis.**, Los Angeles, v. 2, n. 1, p. 39-45, 2011.

PARIDA, M. et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 6, p. 2895-2903, 2005.

PATKAR, C. G. et al. Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein. **J. Virol.**, Washington, v. 81, n. 12, p. 6471-6481, 06 2007.

_____. Identification of inhibitors of yellow fever virus replication using a replicon-based high-throughput assay. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 53, n. 10, p. 4103-4114, 2009.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **West J. Emerg. Med.**, Irvine, v. 17, n. 6, p. 671-679, 2016.

PEIRIS, J. S.; DITTUS, W. P.; RATNAYAKE, C. B. Seroepidemiology of dengue and other arboviruses in a natural population of toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. **J. Med. Primatol.**, Copenhagen, v. 22, n. 4, p. 240-245, 1993.

PERRI, S. et al. Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki forest virus that

establish persistent replication in host cells. **J. Virol.**, Washington, v. 74, n. 20, p. 9802-9807, 2000.

PEÑA, J.; HARRIS, E. Early dengue virus protein synthesis induces extensive rearrangement of the endoplasmic reticulum independent of the UPR and SREBP-2 pathway. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 6, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0038202>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

PIALOUX, G. et al. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. **Lancet Infect. Dis.**, Nova Iorque, v. 7, n. 5, p. 319-327, 2007.

PIERRO, D. J. et al. Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 87, n. Pt 8, p. 2263-2268, 2006.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. Filadélfia: LIPPINCOTT WILLIAMS e WILKINS, 2013. p. 747-794.

PINHEIRO, F.; NELSON, M. **Re-Emergence of Dengue and Emergence of Dengue Haemorrhagic Fever in the Americas**, 1997. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/148532/dbv21p16.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

PISTONE, T. et al. Cluster of chikungunya virus infection in travelers returning from Senegal, 2006. **J. Travel. Med.**, Hamilton, v. 16, n. 4, p. 286-288, 2009.

PLANTE, K. et al. Novel chikungunya vaccine candidate with an IRES-based attenuation and host range alteration mechanism. **PLoS Pathog.**, São Francisco, v. 7, n. 7, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002142>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

POHJALA, L. et al. Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. **PLoS One**, São Francisco, v. 6, n. 12, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0028923>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

POLO, S. et al. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. **J. Virol.**, Washington, v. 71, n. 7, p. 5366-5374, 1997.

PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 42, n. 5, p. 844-849, 2005.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 81, n. 2, p. 471-479, 2000.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 88, n. Pt 9, p. 2363-2377, 2007.

PU, S. Y. et al. Successful propagation of flavivirus infectious cDNAs by a novel method to reduce the cryptic bacterial promoter activity of virus genomes. **J. Virol.**, Washington, v. 85, n. 6, p. 2927-2941, 2011.

PUIG-BASAGOITI, F. et al. Triaryl pyrazoline compound inhibits flavivirus RNA replication. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 50, n. 4, p. 1320-1329, 2006.

QING, M. et al. A high-throughput assay using dengue-1 virus-like particles for drug discovery. **Antiviral Res.**, Amsterdã, v. 86, n. 2, p. 163-171, 2010.

QUAM, M. B. et al. Dissecting Japan's Dengue Outbreak in 2014. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 94, n. 2, p. 409-412, 2016.

RAJAPAKSE, S. et al. Corticosteroids in the treatment of dengue shock syndrome. **Infect. Drug Resist.**, Auckland, v. 7, p. 137-143, 2014.

RAMPAL; SHARDA, M.; MEENA, H. Neurological complications in Chikungunya fever. **J. Assoc. Physicians India**, Mumbai, v. 55, p. 765-769, 2007.

RAUSALU, K. et al. Chikungunya virus infectivity, RNA replication and non-structural polyprotein processing depend on the nsP2 protease's active site cysteine residue. **Sci. Rep.**, Londres, v. 6, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27845418>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

RAVIPRAKASH, K. et al. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 81, n. 7, p. 1659-1667, 2000.

REITER, P.; FONTENILLE, D.; PAUPY, C. Aedes albopictus as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? **Lancet Infect. Dis.**, Nova Iorque, v. 6, n. 8, p. 463-464, 2006.

RESNIK, D. B. Ethical issues in field trials of genetically modified disease-resistant mosquitoes. **Dev. World Bioeth.**, Abingdon, v. 14, n. 1, p. 37-46, 2014.

REY, J. R. Dengue in Florida (USA). **Insects**, Basileia, v. 5, n. 4, p. 991-1000, 2014.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, Londres, v. 370, n. 9602, p. 1840-1846, 2007.

RICE, C. M. et al. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. **New Biol.**, Filadélfia, v. 1, n. 3, p. 285-296, 1989.

RICHARDS, S. L.; ANDERSON, S. L.; SMARTT, C. T. Vector competence of Florida mosquitoes for chikungunya virus. **J. Vector Ecol.**, Hoboken, v. 35, n. 2, p. 439-443, 2010.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, Londres, v. 352, n. 9132, p. 971-977, 1998.

ROBERTS, G. C. et al. Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in Chikungunya virus research. **Sci. Rep.**, Londres, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-15269-w>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

ROBIN, S. et al. Severe bullous skin lesions associated with Chikungunya virus infection in small infants. **Eur. J. Pediatr.**, Berlim, v. 169, n. 1, p. 67-72, 2010.

ROBINSON, M. et al. Novel hepatitis C virus reporter replicon cell lines enable efficient antiviral screening against genotype 1a. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington; v. 54, n. 8, p. 3099-3106, 2010.

RODHAIN, F. The role of monkeys in the biology of dengue and yellow fever. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, Exeter, v. 14, n. 1, p. 9-19, 1991.

ROMANO, C. M. et al. Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. **PLoS One**, São Francisco, v. 5, n. 7, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0011811>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

ROSS, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **J. Hyg. (Lond.)**, Londres, v. 54, n. 2, p. 1777-1791, 1956.

ROTHWELL, C. et al. Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. **Virology**, Nova Iorque, v. 389, n. 1-2, p. 8-19, 2009.

ROY CHAUDHURI, S. et al. Serum Ferritin: A Backstage Weapon in Diagnosis of Dengue Fever. **Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.**, Cairo, v. 2017, 2017. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ipid/2017/7463489>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

RÜCKERT, C. et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nat. Commun.**, Londres, v. 8, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28524874>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

RUGGLI, N.; RICE, C. M. Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. **Adv. Virus Res.**, Nova Iorque, v. 53, p. 183-207, 1999.

RUSH, B. An account of the bilious remitting fever: As it appeared in Philadelphia, in the summer and autumn of the year 1780. **Am. J. Med.**, Nova Iorque, v. 11, n. 5, p. 546-550, 1951.

SAAD, L. D.; BARATA, R. B. Yellow fever outbreaks in São Paulo State, Brazil, 2000-2010. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 531-540, 2016.

SABCHAREON, A. et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **Lancet**, Londres, v. 380, n. 9853, p. 1559-1567, 2012.

SABINO, E. C. et al. Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 213, n. 5, p. 694-702, 2016.

SANTOS, J. J. et al. Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 8, p. 983-991, 2013.

SANTOS, J. J. et al. Full-length infectious clone of a low passage dengue virus serotype 2 from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 5, p. 677-683, 2015.

SAVARINO, A. et al. Anti-HIV effects of chloroquine: inhibition of viral particle glycosylation and synergism with protease inhibitors. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, Hagerstown, v. 35, n. 3, p. 223-232, 2004.

SBRANA, E. et al. Efficacy of post-exposure treatment of yellow fever with ribavirin in a hamster model of the disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 71, n. 3, p. 306-312, 2004.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 245-246, 1986.

SCHIEFFELIN, J. S. et al. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. **Virol. J.**, Londres, v. 7, 2010. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-7-28>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SCHILTE, C. et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 7, n. 3, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23556021>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SCHNEIDER, J.; DROLL, D. **A timeline for dengue in the americas to december 31, 2000 and noted first occurrences**, 2001. Disponível em: <http://www1.paho.org/english/hcp/hct/vbd/dengue_history.htm>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SCHOLTE, F. E. et al. Characterization of synthetic Chikungunya viruses based on the consensus sequence of recent E1-226V isolates. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 8, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3731263/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Med**, São Francisco, v. 3, n. 7, 2006. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0030263>>. Acesso

em: 10 fev. 2018.

SCHÄFER, B. et al. Pre-clinical efficacy and safety of experimental vaccines based on non-replicating vaccinia vectors against yellow fever. **PLoS One**, São Francisco, v. 6, n. 9, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0024505>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SERGON, K. et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 78, n. 2, p. 333-337, 2008.

_____. Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 76, n. 6, p. 1189-1193, 2007.

SHARMA, A.; GUPTA, P.; MAHESHWARI, R. K. Inactivation of Chikungunya virus by 1,5-iodonaphthyl azide. **Virol. J.**, Londres, v. 9, 2012. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-9-301>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SILVA Jr, J.V.J. **Desenvolvimento de sistemas de genética reversa para os vírus da doença de gumboro e influenza aviária através do uso de recombinação homóloga em levedura**. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

SILVA Jr, J. V. J. et al. Efficient assembly of full-length infectious clone of Brazilian IBDV isolate by homologous recombination in yeast. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 1555-1563, 2014.

_____. Current status, challenges and perspectives in the development of vaccines against yellow fever, dengue, Zika and chikungunya viruses. **Acta Trop.**, Amsterdã, v. 182, p. 257-263, 2018.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 127, n. 3, p. 737-749, 2017.

SILVA, L. A. et al. A single-amino-acid polymorphism in Chikungunya virus E2 glycoprotein influences glycosaminoglycan utilization. **J. Virol.**, Washington, v. 88, n. 5, p. 2385-2397, 2014.

SIMON, F. et al. Chikungunya virus infection. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, Filadélfia; v. 13, n. 3, p. 218-228, 2011.

_____. Chikungunya infection: an emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands. Report of 47 cases. **Medicine (Baltimore)**, Hagerstown, v. 86, n. 3, p. 123-137, 2007.

SINGH, S.K. Overview on Chikungunya Virus Pathogenesis. In: SINGH, S.K.

Human Emerging and Re-emerging Infections: Viral and Parasitic Infections. Salt Lake, Conscious Leadership, 2015.

SIRIVICHAYAKUL, C. et al. Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue Vaccine Candidate in Healthy Children and Adults in Dengue-Endemic Regions: A Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Study. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 213, n. 10, p. 1562-1572, 2016.

SISSOKO, D. et al. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 3, n. 3, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647734>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SIQUEIRA J.B. JR. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 11, n.1, p. 48-53, 2005.

SMALLEY, C. et al. Status of research and development of vaccines for chikungunya. **Vaccine**, Amsterdã, v. 34, n. 26, p. 2976-2981, 2016.

SMITH, S. A. et al. Dengue Virus prM-Specific Human Monoclonal Antibodies with Virus Replication-Enhancing Properties Recognize a Single Immunodominant Antigenic Site. **J. Virol.**, Washington, v. 90, n. 2, p. 780-789, 2015.

SOARES, C. N. et al. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: report of a case. **Int. J. Infect. Dis.**, Hamilton, v. 14, n. 2, p. e150-e152, 2010.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, Nova Iorque, v. 393, n. 2, p. 183-197, 2009.

SONG, Y.; PAUL, A. V.; WIMMER, E. Evolution of poliovirus defective interfering particles expressing Gaussia luciferase. **J. Virol.**, Washington, v. 86, n. 4, p. 1999-2010, 2012.

SRIBURI, R. et al. Construction of infectious dengue 2 virus cDNA clones using high copy number plasmid. **J. Virol. Methods**, Amsterdã, v. 92, n. 1, p. 71-82, 2001.

SRIKIATKHACHORN, A. et al. Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v. 26, n. 4, p. 283-290, 2007.

STADLER, K. et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **J. Virol.**, Washington, v. 71, n. 11, p. 8475-8481, 1997.

STAPLES, J. E.; BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 942-948, 2009.

STOKES, A.; BAUER, J. H.; HUDSON, N. P. The transmission of yellow fever to Macacus rhesus. 1928. **Rev. Med. Virol.**, Chichester, v. 11, n. 3, p. 141-148, 2001.

SUN, J. et al. Elaboration of tetravalent antibody responses against dengue viruses using a subunit vaccine comprised of a single consensus dengue envelope sequence. **Vaccine**, Amsterdã, v. 35, n. 46, p. 6308-6320, 2017.

TAKEDA. **Takeda's Dengue Vaccine Candidate Associated with Reduced Incidence of Dengue in Children and Adolescents; New 18-Month Interim Phase 2 Data Published in The Lancet Infectious Diseases**, 2017. Disponível em: <<https://www.takeda.com/newsroom/newsreleases/2017/takedas-dengue-vaccine/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

TAMM, K.; MERITS, A.; SARAND, I. Mutations in the nuclear localization signal of nsP2 influencing RNA synthesis, protein expression and cytotoxicity of Semliki Forest virus. **J. Gen. Virol.**, Londres, v. 89, n. Pt 3, p. 676-686, 2008.

TANNOUS, B. A. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo. **Nat. Protoc.**, Londres, v. 4, n. 4, p. 582-591, 2009.

TAYLOR, A. et al. Mutation of the N-Terminal Region of Chikungunya Virus Capsid Protein: Implications for Vaccine Design. **MBio**, Washington, v. 8, n. 1, 2017. Disponível em: <mbio.asm.org/content/8/1/e01970-16.short>. Acesso em: 10 fev. 2018.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. **Ciênc. e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.122-135, 1996.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad. Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 25, p. S7-S18, 2009.

TEMPORÃO, J. G. et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 17, n. 5, p. 938-940, 2011.

TEOH, B. T. et al. The Use of NS1 Rapid Diagnostic Test and qRT-PCR to Complement IgM ELISA for Improved Dengue Diagnosis from Single Specimen. **Sci. Rep.**, Londres, v. 6, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27278716>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

TERAMOTO, T. et al. Serotype-specific interactions among functional domains of dengue virus 2 nonstructural proteins (NS) 5 and NS3 are crucial for viral RNA replication. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 292, n. 23, p. 9465-9479, 2017.

THEILER, M.; SMITH, H. H. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. **J. Exp. Med.**, Nova Iorque, v. 65, n. 6, p. 767-786, 1937a.

_____. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. **J. Exp. Med.**, Nova Iorque, v. 65, n. 6, p. 787-800, 1937b

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Res.**, Amsterdã, v. 99, n. 3, p. 345-370, 2013.

THOMAS, R. E. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease: current perspectives. **Drug Des. Devel. Ther.**, Auckland, v. 10, p. 3345-3353, 2016.

TIWARI, M. et al. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. **Vaccine**, Amsterdã, v. 27, n. 18, p. 2513-2522, 2009.

TOMLINSON, W.; HODGSON, R. S. Centennial year of yellow fever eradication in New Orleans and the United States, 1905-2005. **J. La State Med. Soc.**, Nova Orleães, v. 157, n. 4, p. 216-217, 2005.

TRETYAKOVA, I. et al. DNA vaccine initiates replication of live attenuated chikungunya virus in vitro and elicits protective immune response in mice. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 209, n. 12, p. 1882-1890, 2014.

TRICOU, V. et al. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 4, n. 8, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20706626>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

TSETSARKIN, K. et al. Infectious clones of Chikungunya virus (La Réunion isolate) for vector competence studies. **Vector Borne Zoonotic Dis**, Nova Iorque, v. 6, n. 4, p. 325-337, 2006.

TSETSARKIN, K. A. et al. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. **Curr. Opin. Virol.**, Amsterdã, v. 1, n. 4, p. 310-317, 2011.

_____. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathog.**, São Francisco, v. 3, n. 12, 2007. Disponível em: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0030201>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

TU, W. C.; CHEN, C. C.; HOU, R. F. Ultrastructural studies on the reproductive system of male *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with dengue 2 virus. **J. Med. Entomol.**, Honolulu, v. 35, n. 1, p. 71-76, 1998.

TURNER, T. L. et al. Respiratory syncytial virus: current and emerging treatment options. **Clinicoecon Outcomes Res**, Auckland, v. 6, p. 217-225, 2014.

URAKAMI, A. et al. An Envelope-Modified Tetravalent Dengue Virus-Like-Particle Vaccine Has Implications for Flavivirus Vaccine Design. **J. Virol.**, Washington, v. 91, n. 23, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28956764>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

USME-CIRO, J. A. et al. Development of a novel DNA-launched dengue virus type 2 infectious clone assembled in a bacterial artificial chromosome. **Virus Res.**, Amsterdã, v. 180, p. 12-22, 2014.

UTT, A. et al. Mutations conferring a noncytotoxic phenotype on chikungunya virus replicons compromise enzymatic properties of nonstructural protein 2. **J. Virol.**, Washington; v. 89, n. 6, p. 3145-3162, 2015.

VAN DEN BERG, B. et al. Guillain-Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. **Nat. Rev. Neurol.**, Londres, v. 10, n. 8, p. 469-482, 2014.

VAN DEN DOEL, P. et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing glycoprotein E2 of Chikungunya virus protects AG129 mice against lethal challenge. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, São Francisco, v. 8, n. 9, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003101>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

VAN DUIJL-RICHTER, M. K. et al. Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. **Viruses**, Basileia, v. 7, n. 7, p. 3647-3674, 2015.

VANDERGAAST, R.; FREDERICKSEN, B. L. Generating West Nile Virus from an Infectious Clone. **Methods Mol. Biol.**, Totowa, v. 1435, p. 29-43, 2016.

VANDERGAAST, R. et al. Generation of West Nile virus infectious clones containing amino acid insertions between capsid and capsid anchor. **Viruses**, Basileia, v. 6, n. 4, p. 1637-1653, 2014.

VASCONCELOS, P. F.C. et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 253-255, 1995.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VASILAKIS, N. et al. Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. **PLoS Pathog.**, São Francisco, v. 5, n. 6, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19503824>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

VILELA, A. P. et al. Dengue virus 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 16, n. 6, p. 989-992, 2010.

VILLAR, L. et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 372, n. 2, p. 113-123, 2015.

VIRALZONE. **Flavivirus**, 2016. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/24>. Acesso em: 10 fev. 2018.

_____. **Togaviridae**, 2017. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/3>. Acesso em: 10 fev. 2018.

VOLK, S. M. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **J. Virol.**, Washington, v. 84, n. 13, p. 6497-6504, 2010.

WAGGONER, J. J. et al. Multiplex nucleic acid amplification test for diagnosis of dengue fever, malaria, and leptospirosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 52, n. 6, p. 2011-2018, 2014.

WANG, D. et al. A complex adenovirus vaccine against chikungunya virus provides complete protection against viraemia and arthritis. **Vaccine**, Amsterdã, v. 29, n. 15, p. 2803-2809, 2011.

WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J. Virol.**, Washington, v. 74, n. 7, p. 3227-3234, 2000.

_____. Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. **Vaccine**, Amsterdã, v. 26, n. 39, p. 5030-5039, 2008.

WANG, Y. et al. Inhibition of the infectivity and inflammatory response of influenza virus by Arbidol hydrochloride in vitro and in vivo (mice and ferret). **Biomed. Pharmacother.**, Paris, v. 91, p. 393-401, 2017.

WEINBREN, M.P.; HADDOW, A.J.; WILLIAMS, M.C. The occurrence of Chikungunya virus in Uganda. I. Isolation from mosquitoes. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 253-257, 1958.

WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. Chloroquine-resistant malaria. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 184, n. 6, p. 770-776, 2001.

WICHIT, S. et al. Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. **Sci. Rep.**, Londres, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-03316-5>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

WIKAN, N. et al. Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 1, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0031102>>.

WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D. J. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **Med. Clin. North. Am.**, Filadélfia, v. 92, n. 6, p. 1377-1390, 2008.

WILDER-SMITH, A. Yellow fever vaccination: estimating coverage. **Lancet**, Londres, v. 17, n. 11, p. 1109-1111, 2017.

WINTACHAI, P. et al. Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. **J. Med. Virol.**, Nova Iorque, v. 84, n. 11, p. 1757-1770, 2012.

_____. Assessment of flavaglines as potential chikungunya virus entry inhibitors. **Microbiol.**

Immunol., Richmond, v. 59, n. 3, p. 129-141, 2015.

WU, S. F. et al. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. **Vaccine**, Amsterdã, v. 21, n. 25-26, p. 3919-3929, 2003.

WU, X. et al. Inhibitory effect of small interfering RNA on dengue virus replication in mosquito cells. **Virol. J.**, Londres, v. 7, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965154>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

WURDINGER, T. et al. A secreted luciferase for ex vivo monitoring of in vivo processes. **Nat. Methods**, Nova Iorque, v. 5, n. 2, p. 171-173, 2008.

XIE, X. et al. Zika Virus Replicons for Drug Discovery. **EBioMedicine**, Amsterdã, v. 12, p. 156-160, 2016.

YANG, C. C. et al. Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington; v. 55, n. 1, p. 229-238, 2011.

_____. Characterization of an efficient dengue virus replicon for development of assays of discovery of small molecules against dengue virus. **Antiviral Res.**, Amsterdã, v. 98, n. 2, p. 228-241, 2013.

YAREN, O. et al. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. **BMC Infect. Dis.**, Londres, v. 17, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5399334>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

YEN, C. W. et al. Multicolored silver nanoparticles for multiplexed disease diagnostics: distinguishing dengue, yellow fever, and Ebola viruses. **Lab. Chip.**, Cambridge, v. 15, n. 7, p. 1638-1641, 2015.

YU, I. M. et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, Washington, v. 319, n. 5871, p. 1834-1837, 2008.

YUAN, L. et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, Washington, v. 358, n. 6365, p. 933-936, 2017.

ZANDI, K. et al. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. **Virol. J.**, Londres, v. 8, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201648>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

ZARA, A. L. et al. Aedes aegypti control strategies: a review. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZHANG, F. C. et al. Severe dengue outbreak in Yunnan, China, 2013. **Int. J. Infect. Dis.**,

Hamilton, v. 27, p. 4-6, 2014.

ZHANG, P. T. et al. Generation of a recombinant West Nile virus stably expressing the *Gussia luciferase* for neutralization assay. **Virus Res.**, Amsterdã, v. 211, p. 17-24, 2016.

ZHANG, S. et al. Vaccination with dengue virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in mice. **Virol. J.**, Londres, v. 8, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21714940>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

ZHENG, H. et al. A simple method for developing an infectious cDNA clone of Japanese encephalitis virus. **Virus Genes**, Boston, v. 53, n. 1, p. 4-14, 2017.

ZHU, W. et al. Attenuated dengue 2 viruses with deletions in capsid protein derived from an infectious full-length cDNA clone. **Virus Res.**, Amsterdã, v. 126, n. 1-2, p. 226-232, 2007.

APÊNDICE A**Reverse genetics for Caribbean strain of Chikungunya virus: generation of infectious clone and replicon by homologous recombination in yeast**

A ser submetido como *Short Communication* na revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*

José Valter Joaquim Silva Júnior¹, Giovani Rota Bertani², Laura Helena Vega Gonzales Gil^{1*}

¹Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brazil.

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

*Correspondence to: Laura Helena Vega Gonzales Gil. Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 50670-420 Recife, PE, Brazil. E-mail: laura@cpqam.fiocruz.br.

ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) is an (re-)emerging arbovirus important mainly for the public health of tropical and subtropical regions. Currently, no licensed vaccine or antivirals against CHIKV are available. In this context, the use of reverse genetics systems has become important instrument in the development of life-attenuated vaccines and high-throughput antivirals screening assays. However, CHIKV reverse genetics systems use standard cloning with several restriction sites and subcloning steps. Here, we described the development of a one-step yeast-based reverse genetics platform for cloning and generation of recombinant virus and CHIKV replicon, the last expressing *Gaussia* luciferase and neomycin phosphotransferase genes.

Key words: Chikungunya, reverse genetics, homologous recombination in yeast

Sponsorships:

This work received financial support from Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz (Papes VII), *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* - Facepe (APQ-0037-9.25/15) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* - Capes

Chikungunya virus (CHIKV), family *Togaviridae* and genus *Alphavirus*, is the etiological agent of chikungunya fever, an arthropod-borne disease transmitted mainly by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. The CHIKV is an enveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus, with a genome of approximately 12Kb, capped at its 5' end and polyadenylated at its 3' end. During replication, CHIKV originates two distinct RNAs, a genomic and a subgenomic, responsible for the translation of non-structural (nsP1-4) and structural and accessory proteins (C, E1, E2, E3, 6K and TF), respectively (Griffin, 2013).

The first report of a CHIKV outbreak dates from 1952 in present-day Tanzania (Lumsden et al., 1955; Robinson, 1955). Since then, small outbreaks by CHIKV were also reported in Asia, mainly between the 1950s and 1970s (Ross, 1953; Shah et al., 1964; Nimmannitya et al., 1969; Padbidri, Gnaneswar, 1979). However, after a relative epidemiological silencing of approximately three decades, a major CHIKV outbreak was described in Kenya, 2004 (Sergon et al., 2008). In 2005-2006, numerous cases of CHIKV infection were also recorded in Reunion Island (Josseran et al., 2006), and in 2007, the first CHIKV outbreak in Europe was reported in Italy (Rezza et al., 2007). In 2013, the first autochthonous cases of infection were described in the Caribbean (Cassadou et al., 2014) and in 2014 in Brazil (Rodrigues Faria et al., 2016). The last CHIKV outbreak was recently reported in Italy (WHO, 2017). Currently, CHIKV transmission has been recorded on all continents (CDC, 2016).

Clinically, most of these infections are symptomatic and usually accompanied by high fever, severe polyarthralgia, myalgia, arthritis and rash. However, in the last outbreaks, less common clinical alterations have also been reported, such as neurological diseases, Guillain-Barré syndrome, uveitis, retinitis, cardiac and gastrointestinal involvement, and bullous skin lesions (CDC, 2015; Ludlow et al., 2015).

Despite the various proposed strategies, currently no licensed vaccine or antivirals against CHIKV are available. In this context, reverse genetics systems are an important tool for the development of recombinant viruses and subgenomic replicons, which can be used in several biotechnological applications, such as vaccine formulation and antiviral compound screening assay (Plante et al., 2011; Lani et al., 2015). Beside, CHIKV genomes have also been manipulated for studies on virus biology, anti-viral resistance mechanism, viral evolution and virus-host interaction (Tsetsarkin et al., 2006; Fros et al., 2013; Scholte et al.,

2013; Delang et al., 2014). However, all of these strategies use standard cloning techniques with multiple rounds of amplification, dependence on restriction sites and need of *in vitro* ligation.

On the other hand, homologous recombination in yeast has been proposed as an alternative for cloning of several viruses, especially RNA viruses that present genomic instability when inserted in conventional *Escherichia coli* systems. Among the additional advantages of yeast-based homologous recombination, the technique also offers efficiency, robustness and simplicity, allowing the manipulation of full viral genomes in only one cloning step and independent of multiple restriction sites (Arenhart et al., 2014; 2016; Santos et al., 2013; 2014; 2015; Silva Jr et al., 2014).

Therefore, by recognizing the several applications of infectious clones and replicons and the advantages of homologous recombination in yeast, we developed a yeast-based reverse genetics system for construction of Caribbean CHIKV infectious clone. In addition, we demonstrated the feasibility of this approach by the development of a CHIKV reporter replicon cell line that stably expresses the *Gaussia* luciferase reporter (GLuc) and the neomycin phosphotransferase genes.

Initially, the genome sequence of CHIKV strain 99659 (CHIKV-99659) (GenBank KJ451624), isolated from a 33 years old male in British Virgin Islands in 2014, was chemically synthesized (GenScript) in two fragments: fragment 1 (7,489 bp) and 2 (4,522 bp), encoding non-structural and structural proteins, respectively.

Fragments 1 and 2 were then amplified with homologous recombination oligonucleotides, using Phusion DNA Polymerase (New England Biolabs), according to manufacturer's instructions, and cloned into shuttle vector pBSC-HDR (Gil et al., unpublished data), previously digested with Bam-HI (New England Biolabs). Cloning occurred in only one-step of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* (RFY-206 strain) transformed by lithium acetate (Silva Jr. et al., 2014) (Figure 1A).

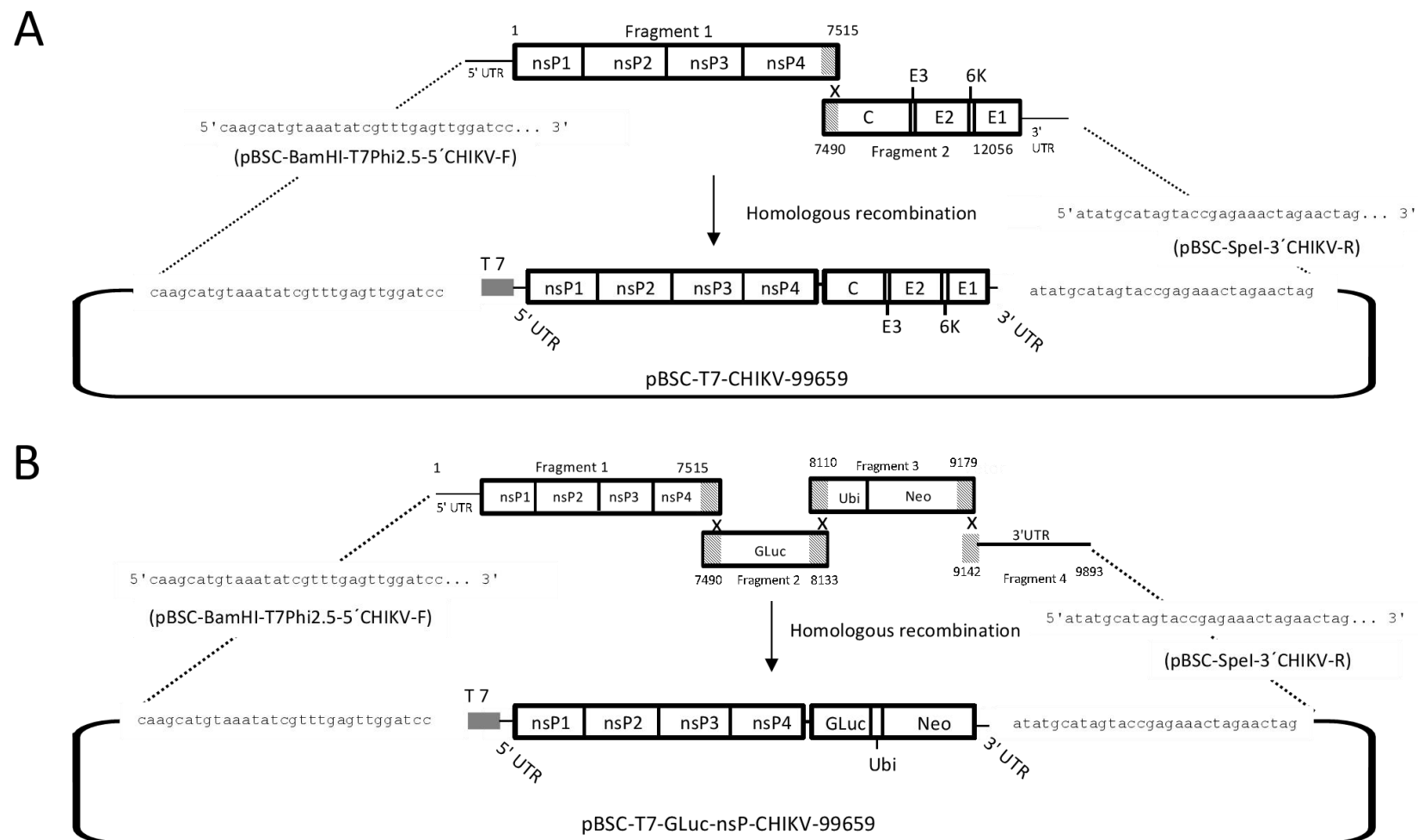
Figure 1: Reverse genetics system for Chikungunya virus

Figure 1: (A) pBSC-T7-CHIKV-99659 clone. Fragments 1 and 2 from Chikungunya virus (99659 strain) encoding non-structural and structural proteins, respectively, was amplified with the pBSC-BamHI-T7Phi2.5'-CHIKV-F/CHIKV-7515R and CHIKV-7490F/pBSC-SpeI-3'CHIKV-R oligonucleotides (Table I), and cloned in a single step into pBSC-HDR vector by homologous recombination in yeast. The areas with the same texture represent the homology regions between fragments and vector. (B) Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 replicon. Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 was cloned into pBSC-HDR vector in a single step by homologous recombination between four fragments. Fragment 1: non-structural proteins, was amplified from pBSC-T7-CHIKV-99659 with the pBSC-BamHI-T7Phi2.5'-CHIKV-F/CHIKV-7515R oligonucleotides; Fragment 2, GLuc, amplified from the pGLuc-NS construct (WF10) with the CHIKV1-GLuc-F/GLuc-Ubiq-R oligonucleotides; Fragment 3, ubiquitination signal and neomycin phosphotransferase cassette, amplified with the Ubiq-F/CHIKV1-Neo-R from YFVLucNeoIRES oligonucleotides; and Fragment 4, pBSC-T7-CHIKV-99659 3'UTR, amplified from the pBSC-T7-CHIKV-99659 with the CHIKV-3UTR-F/pBSC-SpeI-3'CHIKV- oligonucleotides. Homologous recombination oligonucleotides are listed in Table I. The areas with the same texture represent the homology regions.

The plasmid DNA from the colonies was extracted with QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions, and cloning was confirmed by intersection region amplification between the two fragments with the CHIKV-7300-F (GCTGGCTGATGAAGTAATCAG) and CHIKV-7796-R (GTATTGTTTCGTGGCGCCTGC) oligonucleotides (data not shown) (Table I). The constructed was named pBSC-T7-CHIKV-99659. In order to amplify the DNA after homologous recombination, the yeast DNA was used to transform competent *E. coli* (DH10B strain) (Invitrogen) (Silva Jr et al., 2014). Plasmid DNA was purified with Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions, and used as template for amplification of the full-length CHIKV-99659 cloned genome with AccuTaq LA enzyme Polymerase DNA and the pBSC-BamHI-T7Phi2.5-5'CHIKV-F/CHIKV-3'UTR-R oligonucleotides (Table I).

Table I: Oligonucleotides used for the construction and recovery of the recombinant virus and replicon from CHIKV 99659 strain

Oligonucleotide	Sequence (5' - 3')
pBSC-BamHI-T7Phi2.5-5'CHIKV-F ^a	^{C,D} CAAGCATGTAAATATCGTTTTGAGTTGGATCC CAGTAATACGA CTCACTATTATGGCTGCGTGAGACACACGTAG
pBSC-SpeI-3'CHIKV-R ^b	ATATGCATAGTACCGAGAACTAGAACTAGTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATATATAAAAACAAAA TAACATCTCC
CHIKV-7490F	GTACGCACTACAGCTACCTATTTTTGC
CHIKV-7515R	GCAAAATAGGTAGCTGTAGTGCGTACCTATTTAGGACCGCCGTA CAAG
CHIKV1-GLuc-F	GTACGCACTACAGCTACCTATTTTTGCAAAAGCCGACAGCAGGTA CCTAAATACCAATCAGCCATAATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTGC CCTG
GLuc-Ubiq-R	CACGAAGATCTGCATGTTTAAACCGTCACCACCGGCCCCCTTGA TC
Ubiq-F	GGTTTAAACATGCAGATCTTCGTGAAG
CHIKV1-Neo-R	CTTTAGGGACGCGTATGCCTTCATACCTAGTTGTCAAGTCAGAA GAACTCGTCAAGAAGGCGATAG
CHIKV-3UTR-F	CTTGACAACCTAGGTATGAAGGCATAC
CHIKV-3UTR-R	TTTGA ATATATAAAAACAAAATAACATCTCCTACGTCCCTATGGGTAC

^aF: Forward oligonucleotide;

^bR: Reverse oligonucleotide;

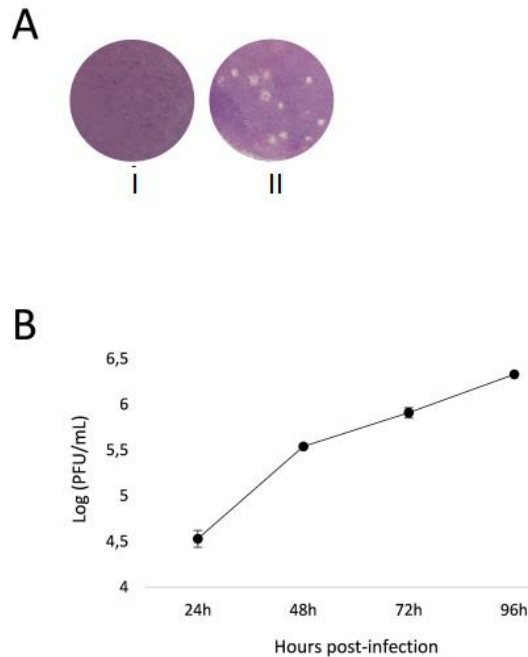
^cUnderlined sequences corresponding to the region used for homologous recombination

^dT7 RNA polymerase promoter sequence was marked in italic

The amplicon was purified with phenol-chloroform, ethanol precipitated and *in vitro* transcribed with the RiboMAX Express Large Scale RNA Production System T7 kit (Promega), according to manufacturer's instructions. Transcribed RNA was transfected by electroporation into BHK-21 cell (Santos et al., 2015), maintained at 37°C/5% CO₂ in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin (stock at 10.000UI/mL) and Streptomycin (stock at 10.00 µg/mL) (LGC Biotecnologia).

Four days after transfection, the cell supernatant was inoculated in Vero cell and the recovered virus, IC-CHIKV-99659, was amplified by three more passages in Vero cells. In passage 4 (p4), the virus was characterized by formation of plaques (approximately 1mm in diameter) (Figure 2A) and virus replication kinetics (Figure 2B).

Figure 2: *In vitro* characterization of recombinant chikungunya virus, IC-CHIKV-99659



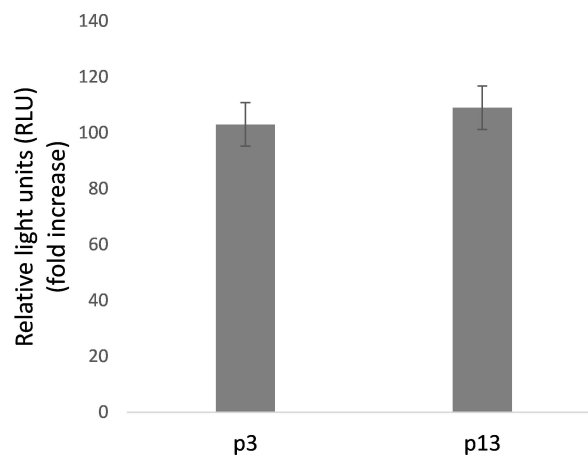
(A) Plaque assay. Vero cells were seeded in 12-well plates (1×10^5 cells /well) overnight and then infected with serial dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) of IC-CHIKV-99659. After two hours of adsorption at 37 °C, the inoculum was removed and the cells were covered with minimal essential medium (MEM), containing 0.3% agarose, 1% penicillin and streptomycin, 5% fetal bovine serum (FBS) and incubated at 37 °C. After seven days, the cells were fixed in formalin (10%) and stained with crystal violet (0.05%) (I); Negative control (II). (B) Replication kinetics. Vero cells were infected at a multiplicity of infection of 3 of IC-CHIKV-99659. After two hours of incubation at 37 °C, the inoculum was removed and the cells were washed three times and maintained at 37 °C in MEM containing 5% FBS and 1% penicillin and streptomycin. The supernatant was collected at 24, 48, 72 and 96 hours post-infection and the infectious particles was titrated using plaque assay. The result was obtained as mean of the two independent experiments.

Further, the pBSC-T7-CHIKV-99659 clone was used for the construction of Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 replicon in a single step cloning by homologous recombination in RFY-206 between four fragments (Figure 1B). After extraction of yeast plasmidial DNA, the cloning was confirmed by PCR with the CHIKV-3'UTR-F/pBSC-SpeI-3'CHIKV-R oligonucleotides (data not shown) and the Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 replicon was obtained.

As described for IC-CHIKV-99659: *E. coli* (DH10B) was transformed with Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659; plasmid DNA was used to amplify the full-length Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659; the amplicon was *in vitro* transcribed and BHK-21 cells were transfected with Rep-T7-GLuc-nsP-CHIKV-99659 RNA.

Three days after transfection, the cells were subjected to drug selection by the addition of geneticin (700 µg /mL) to the medium. After ten days of selection, the resulting replicon cell line BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 was amplified to passage three (p3) and luciferase activity was measured by the BioLux Gaussia Luciferase Assay kit (New England BioLabs) in Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold), according to manufacturer's instructions. To evaluate the BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 stability, GLuc activity was also evaluated after 13 passages (Figure 3). In both passages, GLuc activity was not statistically different for the Student's t-test ($p < 0.05$).

Figure 3: Evaluation of BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 cell line stability



BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 cells in passage 3 and 13 (p3 and p13) were seeded in 96-well plate (10^5 cells/well), incubated at 37 °C and maintained in minimal essential medium, containing 10% fetal bovine serum, 1% penicillin and streptomycin, and geneticin (700 µg /mL). Eighteen hours after seed, *Gaussia* luciferase activity was measured. The results were expressed as the fold increase over the negative control (wild BHK-21 cells), using the relative light units (RLU). Each value represents the mean of two independent experiments

Many kinds of alphavirus infectious cDNA clones and replicons have been developed and efficiently used for several research over the past few years. However, although efficient, all these reverse genetics systems use multiple restriction sites and several subcloning steps for recombinant viruses construction and mutations insertion (Plante et al., 2011; Fros et al., 2013; Delang et al., 2014). To expedite the process, we used yeast homologous recombination method to construct an infectious cDNA clone and reporter replicon of CHIKV in a single cloning step.

Furthermore, we also confirmed the cloning functionality verified with the formation of infectious and replicative particles of IC-CHIKV-99659, as indicated by plaque assay and increasing pattern of virus replication kinetics. In addition, through the manipulation of the IC-CHIKV-99659 genome, we have also developed the BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 cell line, which contains the GLuc gene associated with the IC-CHIKV-99659 subgenome. The BHK-21-GLUC-nsP-CHIKV-99659 cell line expressed efficiently the GLuc reporter gene and showed stability along the passages, maintaining the same fold increase of relative light unit (RLU) in p3 and p13.

Despite the development of stable CHIKV replicon cell lines expressing other reporter genes, such as Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) and Renilla luciferase (RLuc) (Lani et al., 2015), this is the first report of a CHIKV replicon cell line stably expressing GLuc. In contrast to the luciferase RLuc and Firefly (FLuc), GLuc has the advantage of being secreted into the supernatant and does not require cell lysis for its measurement. Moreover, GLuc also has greater sensitivity and stability, making of the BHK-21-GLuc-nsP-CHIKV-99659 a possible platform for future high-throughput assays.

In addition, aiming at basic and applied research, we constructed the infectious clone and its replicon from the CHIKV-99659 sequence, which has already been used for vaccine strategies (Erasmus et al., 2017), evaluation of the virus-arthropod interaction (Rückert et al., 2017) and of therapeutic measures (Smith et al., 2015). Finally, we also believe yeast-based reverse genetics system may be used for recovery of recombinant viruses from other emerging alphaviruses, such as the Mayaro and Eastern equine encephalitis and Western equine encephalitis viruses.

REFERENCES

- Arenhart S, et al. Insertion and stable expression of Gaussia luciferase gene by the genome of bovine viral diarrhoea virus. *Res Vet Sci.* 2014;97(2):439-48.
- Arenhart S, et al. Use of homologous recombination in yeast to create chimeric bovine viral diarrhoea virus cDNA clones. *Braz J Microbiol.* 2016;47(4):993-9.
- Cassadou S, Boucau S, Petit-Sinturel M, Huc P, Leparç-Goffart I, Ledrans M. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. *Euro Surveill.* 2014;19(13).
- CDC. Chikungunya Virus. Clinical Evaluation e Disease. <https://www.cdc.gov/chikungunya/hc/clinicalevaluation.html>, 2015 (accessed 24 December 2017).
- CDC. Chikungunya Virus. Geographic Distribution. <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>, 2016 (accessed 24 December 2017).
- Delang L, et al. Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(10):2770-84.
- Erasmus JH, et al. A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. *Nat Med.* 2017;23(2):192-9.
- Fros JJ, et al. The C-terminal domain of chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, cytopathicity, and inhibition of interferon signaling. *J Virol.* 2013;87(18):10394-400.
- Gläscher S, et al. Virus replicon particle based Chikungunya virus neutralization assay using Gaussia luciferase as readout. *Virol J.* 2013;10:235
- Griffin, R. A. Alphaviruses. In Eds . M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello e B. Roizman. *Fields Virology*, 6th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams e Wilkins, 2013, p. 2080-2128.
- Josseran L, et al. Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(12):1994-5.
- Lani R, Hassandarvish P, Chiam CW, Moghaddam E, Chu JJ, Rausalu K, et al. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Sci Rep.* 2015;5:11421.
- Ludlow M, et al. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol.* 2016;131(2):159-84.
- Lumsden WH. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1955;49(1):33-57.

Nimmannitya S, et al. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18(6):954-71.

Padbidri VS, Gnaneswar TT. Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1979;23(4):445-51.

Plante K, et al. Novel chikungunya vaccine candidate with an IRES-based attenuation and host range alteration mechanism. *PLoS Pathog.* 2011;7(7):e1002142.

Rezza G, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet.* 2007;370(9602):1840-6.

Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1955;49(1):28-32.

Rodrigues Faria N, et al. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. *PLoS Curr.* 2016;8.

Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond).* 1956;54(2):177-91.

Rückert C, et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nat Commun.* 2017;8:15412.

Santos JJ, et al. Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(8):983-91.

Santos JJ, et al. A two-plasmid strategy for engineering a dengue virus type 3 infectious clone from primary Brazilian isolate. *An Acad Bras Cienc.* 2014;86(4):1749-59.

Santos JJ, et al. Full-length infectious clone of a low passage dengue virus serotype 2 from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(5):677-83.

Scholte FE, et al. Characterization of synthetic Chikungunya viruses based on the consensus sequence of recent E1-226V isolates. *PLoS One.* 2013;8(8):e71047.

Sergon K, et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(2):333-7.

Shah KV, et al. Virological investigation of the epidemic of haemorrhagic fever in Calcutta: isolation of three strains of chikungunya virus. *Indian J Med Res.* 1964;52:676-83.

Silva Jr JVJ, et al. Efficient assembly of full-length infectious clone of Brazilian IBDV isolate by homologous recombination in yeast. *Braz J Microbiol.* 2014;45(4):1555-63.

Smith SA, et al. Isolation and Characterization of Broad and Ultrapotent Human Monoclonal

Antibodies with Therapeutic Activity against Chikungunya Virus. *Cell Host Microbe*. 2015;18(1):86-95.

Tsetsarkin K, Higgs S, McGee CE, De Lamballerie X, Charrel RN, Vanlandingham DL. Infectious clones of Chikungunya virus (La Réunion isolate) for vector competence studies. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2006;6(4):325-37.

WHO. Chikungunya. <http://www.who.int/csr/don/archive/disease/chikungunya/en/>, 2017 (accessed 24 December 2017).

APÊNDICE B

Construction and characterization of a recombinant yellow fever virus stably expressing *Gaussia* luciferase

Anais da Academia Brasileira de Ciências (2017)

TELISSA C. KASSAR^{1,*}, TEREZA MAGALHÃES¹, JOSÉ V.J.S. JÚNIOR¹, AMANDA G.O. CARVALHO¹, ANDRÉA N.M.R. DA SILVA^{1,**}, SABRINA R.A. QUEIROZ^{1,***}, GIOVANI R. BERTANI² and LAURA H.V.G. GIL¹¹Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50740-465 Recife, PE, Brazil²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil*Manuscript received on April 15, 2016; accepted for publication on June 20, 2016.*

ABSTRACT

Yellow fever is an arthropod-borne viral disease that still poses high public health concerns, despite the availability of an effective vaccine. The development of recombinant viruses is of utmost importance for several types of studies, such as those aimed to dissect virus-host interactions and to search for novel antiviral strategies. Moreover, recombinant viruses expressing reporter genes may greatly facilitate these studies. Here, we report the construction of a recombinant yellow fever virus (YFV) expressing *Gaussia* luciferase (GLuc) (YFV-GLuc). We show, through RT-PCR, sequencing and measurement of GLuc activity, that stability of the heterologous gene was maintained after six passages. Furthermore, a direct association between GLuc expression and viral replication was observed ($r^2=0.9967$), indicating that measurement of GLuc activity may be used to assess viral replication in different applications. In addition, we evaluated the use of the recombinant virus in an antiviral assay with recombinant human alfa-2b interferon. A 60% inhibition of GLuc expression was observed in cells infected with YFV-GLuc and incubated with IFN alfa-2b. Previously tested on YFV inhibition by plaque assays indicated a similar fold-decrease in viral replication. These results are valuable as they show the stability of YFV-GLuc and one of several possible applications of this construct.

Key words: *Gaussia* luciferase, homologous recombination in yeast, reporter gene, yellow fever virus.

Correspondence to: Laura Helena Vega Gonzales Gil
E-mail: laura@cpqam.fiocruz.br

Present address: *Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

**Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá, 66075-110 Belém, PA, Brazil

***Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Avenida Duque Caxias Norte, 225, Jardim Elite, 13635-000 Pirassununga, SP, Brazil

INTRODUCTION

Yellow fever is an infectious disease caused by the yellow fever virus (YFV), a flavivirus (Family *Flaviviridae*), transmitted to humans by biting infected female mosquitoes of the genera *Aedes*, *Sabethes* and *Haemagogus* (Hanley et al. 2013). YFV is endemic in countries of Africa and South America and is maintained mainly through sylvatic

transmission cycles among nonhuman primates and sylvatic mosquitoes. However, several, often disastrous, urban transmission cycles involving the mosquito *Aedes aegypti* as the main vector have occurred and the risk of urban outbreaks remains a threat, especially in regions where viruses and vectors are found (Hanley et al. 2013).

Yellow fever in humans can be divided into three clinical stages: infection, remission and intoxication (Ishikawa et al. 2014). After an incubation period of 3-6 days symptoms like headache, fever and myalgia may be observed, which corresponds to the viremic period. After the infection period, some patients may develop the remission period, presenting liver and renal failure. An intoxication period may follow, characterized by hemorrhagic fever and organ failure. Approximately 15% of cases develop moderate/severe manifestations. The World Health Organization estimates that 200,000 cases and 30,000 deaths occur annually, mostly in Africa (Ishikawa et al. 2014).

Despite the availability of a human vaccine against YFV, the virus continues to pose a threat to human populations, reaching mortality rates of 20-50% in urban cycles. The currently available vaccine is based on the live-attenuated strain 17D or the substrains 17DD and 17D-204, and although it reaches high protection levels in vaccinees, it may cause rare, severe side effects leading to viscerotropic disease, especially in risk groups (Monath et al. 2015). The other control methods for arthropod-borne viral diseases such as yellow fever are: 1) anti-vector strategies, which have been proven highly difficult in the case of extremely adapted species such as *Ae. aegypti*; and 2) antiviral drugs. For the latter, the antiviral medications available are ineffective against YFV (Monath et al. 2015) and the search for novel effective medications is an active field of research. The YFV is an enveloped, single-stranded, positive-sense RNA virus, with a genome of approximately 11Kb, capped at its 5' end and non-

polyadenylated at its 3' end. It encodes, within one open-reading frame, three structural proteins at the N-terminal portion (capsid-C, pre-membrane-prM, envelope-E) and seven non-structural proteins at the C-terminal portion (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, and NS5) of the polyprotein. Additionally, the YFV genome has functional non-coding terminal ends (5' and 3' untranslated regions-UTRs) that are involved in several viral features such as genome replication and protein translation (Lindenbach et al. 2013).

In the 1950s, it was discovered that the nucleic acid of some animal viruses was infectious. Later on, experiments showed that transfection of live, susceptible cells or hosts with the genome of several positive RNA viruses led to the production of infective viruses (Aubry et al. 2015). These discoveries have allowed the development of powerful viral molecular tools for the past decades. Full-length infectious clones are a good example of these tools as they allow the genetic manipulation (e.g. mutations, deletions, insertions) of viral genomes and further studies of the phenotypic effects of such modifications (Aubry et al. 2015).

Since the construction of the first flavivirus full-length clone (Rice et al. 1989), some technical difficulties have been reported, such as the instability of the viral genome in cloning bacterial hosts. To overcome part of the obstacles, several novel molecular techniques have been developed, including low-copy-number plasmids, bacterial artificial chromosomes and yeast-based homologous recombination. In addition, infectious clones or replicon systems expressing reporter genes (e.g. firefly and *Renilla* luciferases, green and yellow fluorescent proteins) have been developed and used mainly on molecular virology studies, to construct viral vectors and on sophisticated antiviral assays (De Baets et al. 2015, Patkar et al. 2009, Roth et al. 2009, Schoggins et al. 2012, van den Worm et al. 2012, Dag et al. 2013, Kato et al. 2014, Ding et al. 2015, Zhang et al. 2015). Among the

reporter genes, *Gussia* luciferase (GLuc) started to be used in *in vivo* and *in vitro* assays due to some advantages such as high stability and sensitivity, and the fact that it is secreted, facilitating its detection in several experiments (Tannous et al. 2005, Venisnik et al. 2007).

Considering the aforementioned, here we report the construction and characterization of a stable recombinant YFV (made by homologous recombination in yeast using YFV-17D) expressing the GLuc gene. We also show the use of YFV-GLuc in an antiviral assay as one of its several possible applications.

MATERIALS AND METHODS

CELL AND VIRUS CULTURE

Baby hamster kidney (BHK-21) cells were maintained at 37°C/5% CO₂ in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% Penicillin (stock at 10.000UI/mL) and Streptomycin (stock at 10.000µg/mL) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil) and 0.1% Fungizone (Gibco, Langley, OK, EUA). The YFV-17D virus, previously generated by Gil L.H.V.G. et al. (unpublished data) by pBSC-YFV17D transfection in BHK-21 cells, was amplified in BHK-21 cells, titrated by plaque assay and used as a positive control in experiments. The YFV-17D cloned genome was kindly provided by Galler, Fiocruz/RJ, Brazil.

CONSTRUCTION OF THE pBSC-YFV-GLuc PLASMID

pBSC-YFV-GLuc plasmid was constructed by homologous recombination in yeast on pBSC-YFV-YFP-DENV1linker, a recombinant virus with the YFP gene inserted in the YFV-17D genome (Fig. 1), previously made by Gil L.H.V.G. and Almeida-Queiroz S.R.A (unpublished data) according to the strategy reported by Bonaldo et al. (2007). For this, pBSC-YFV-YFP-DENV1linker was digested with *NarI* and the GLuc PCR product, containing

terminal sequences homologous to E and NS1 regions of the *NarI*-linearized pBSC-YFV-YFP-DENV1linker, was directly cloned to produce the pBSC-YFV-GLuc recombinant plasmid. Digestion of pBSC-YFV-YFP-DENV1linker and the cloning strategy are shown in Fig. 1.

The GLuc reporter gene was amplified from the plasmid pGLuc-NS (WF10) (kindly provided by Perez, University of Maryland) through PCR with Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). PCR conditions were as follows: initial denaturation at 94°C for 30 s; and 32 cycles of denaturation at 94°C for 15 s, annealing at 52°C for 30 s, and extension at 68°C for 1 min. The recombination oligonucleotides (YFV-GLuc-F and YFV-GLuc-R) used to amplify the GLuc sequence are listed in Table I.

Briefly, pBSC-YFV-GLuc plasmid was generated by homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* strain RFY206 and transformed by a procedure using lithium acetate (Sambrook and Russel 2001). The pBSC-YFV-GLuc plasmid has a coding sequence for tryptophan (trp) as a marker for transformed cells selection on medium without trp. Then, selection of positive colonies was performed using Yeast Nitrogen Base without trp and plasmid DNA extraction was performed using QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The DNA of the colonies was sequentially screened by two PCR reactions using Taq Platinum (Invitrogen) and the same PCR conditions mentioned above; oligonucleotide pairs were YFV-GLuc-F and YFV-NS1-2502-R, and YFV-2375-F and YFV-GLuc-R (Table I).

In vitro TRANSCRIPTION AND TRANSFECTION

For *in vitro* transcription, the full-length cDNA recombinant virus genome was amplified by PCR, using the KlenTaq-LA polymerase enzyme (Clontech, Mountain View, CA), and pBSC-RsrII-T7-5'-YFV-F and YFV-3'UTR-R oligonucleotides

TABLE I
Oligonucleotides used for pBSC-YFV-GLuc construction and *in vitro* transcription.

Oligonucleotide	Sequence
YFV-Gluc-F ^a	<u>°GACCAGGGCTGTGCAATTAATTCGGGGCGCCATGGGAGTCAAAGTTCTGTTT</u> G
YFV-Gluc-R ^b	°CTCGGGCGGTTGCTTCGAACATTTTGGCGCCGTCACCACCGGCCCCCTTG
PBSC-RSRII-T7-5'-YFV-F	^d CAAGCATGTAAATATCGTTT GAGTTCCGGTCCGTAATACGACTCACTATAGAGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGG
YFV-3'UTR-R	AGTGGTTTTGTGTTTGCATCC
YFV-NS1-2502-R	TCTCCGCACTTGAGCTCTC
YFV - 2375 - F	ACAAGAAACATGACAATGTCC

^aForward oligonucleotide. ^bReverse oligonucleotide. ^cUnderlined nucleotide sequence corresponds to the region used for homologous recombination in yeast. ^dBold nucleotide sequence corresponds to the T7 promoter for *in vitro* transcription.

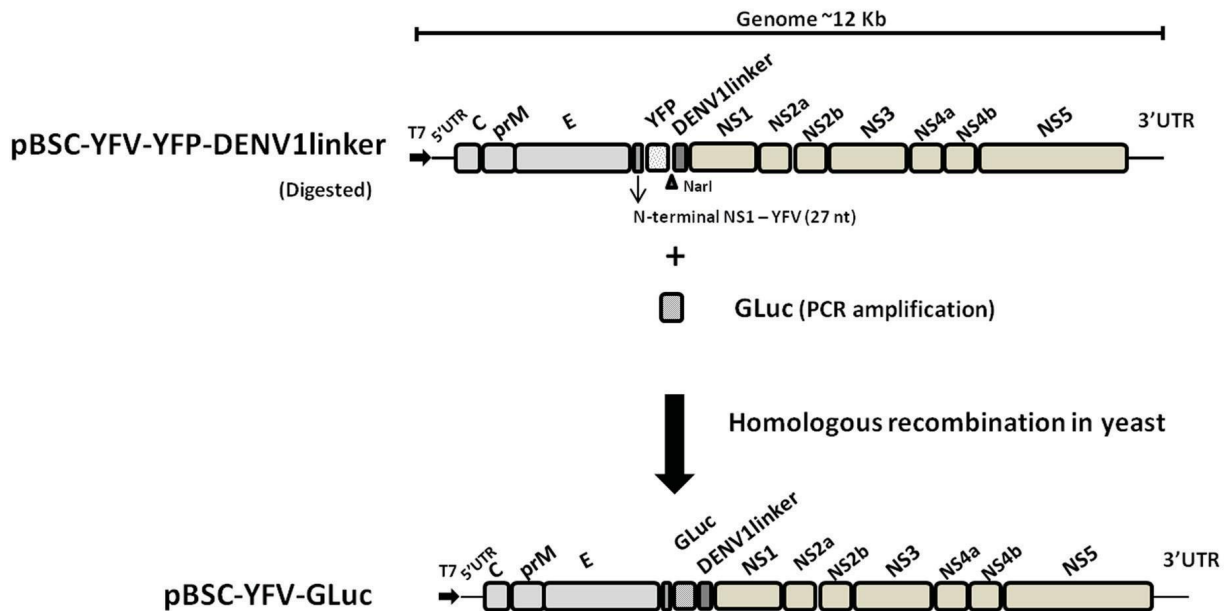


Figure 1 - Schematic representation of YFV-GLuc virus construction. pBSC-YFV-YFP-DENV1linker was digested with *NarI* restriction enzyme and the *Gaussia* luciferase (GLuc) reporter gene was amplified with recombination oligonucleotides (YFV-GLuc-F and YFV-GLuc-R) (Table I). The GLuc PCR product with homologous terminal sequences to *NarI*-linearized pBSC-YFV-YFP-DENV1linker (E and NS1 region) was cloned to produce the pBSC-YFV-GLuc plasmid. DENV1linker: Stem-anchor E DENV1; UTR: untranslated region; NS: nonstructural; nt: nucleotide.

(Table I). The full-length PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min; 32 cycles of denaturation at 93°C for 1 min, annealing at 56°C for 1 min, and extension at 72°C for 13 min, with an increase of 10 s in extension per cycle;

and a final extension at 72°C for 20 min. The full-length PCR product, which has the bacteriophage T7 promoter in the 5' terminal sequence, was purified by phenol-chloroform extraction followed by ethanol precipitation, and transcribed using

the MEGAscript T7 kit (Ambion, Foster City, CA, USA) with the addition of the 7-methyl-guanosine cap analog for *in vitro* transcription (Ambion, Foster City, CA, USA). Full-length RNA transcripts were introduced into BHK-21 cells by electroporation as described previously (Santos et al. 2013). Transfected cells were plated in 6-well plates containing coverslips and virus generation was confirmed by immunofluorescence assay (IFA) and expression of the GLuc reporter gene, as described below. For these assays, coverslips or cell supernatants were collected at selected time points for further analyzes.

INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE AND *Gaussia* LUCIFERASE ACTIVITY ASSAY

Five days post-transfection, coverslips containing BHK-21 cells were collected and rinsed with phosphate buffered saline (PBS), fixed with cold acetone at 4°C for 5 min and air-dried. Cells were then incubated at 37°C for 1 h with a polyclonal hyperimmune mouse ascitic fluid raised against group B flaviviruses (kindly provided by Vasconcelos, Instituto Evandro Chagas) diluted 1:100 in PBS. After a washing step with PBS, cells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) diluted 1:100 in PBS at 37°C for 1 h. Following a final washing step in PBS, cells were air-dried and the material was mounted on glass slides to allow visualization in a DMI 4000B fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany). At the same time point, the GLuc activity was measured in 10 µL of cell supernatant using the Bioluminescence Assay Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold, Bad Wildbad, Germany).

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION

YFV-GLuc (passage 4, p4) was used for phenotypic characterization. The recombinant virus was passaged four times in BHK-21 cells at a multiplicity of infection (MOI) of 1 (titrated by plaque assay) and incubated until 70-80% cytopathic effect was observed (CPE) (7-8 days).

PLAQUE-FORMING ASSAY

Plaque assay was performed to evaluate plaques formed by the parental virus (YFV-17D) and recombinant viruses. For this, monolayers of BHK-21 cells were plated in a 6-well tissue culture plate (4×10^5 cells/well) and 24h later inoculated with serial 10-fold dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) of YFV-17D or YFV-GLuc (p4). Following 1 h of adsorption at 37°C in 5% CO₂, the inoculum was removed. Cells were washed twice, overlaid with 1 mL of MEM containing 1% agarose and 10% FBS and incubated at 37°C. After 7 days, plates were stained with Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) in PBS and plaque morphology and size were analyzed. The staining procedure consisted of adding approximately 100 µL of 5mg/mL MTT in the wells and incubating plates for 2 h at 37°C.

REPLICATION KINETICS OF YFV-GLuc VS. YFV-17D AND CURVE OF *Gaussia* LUCIFERASE EXPRESSION

The replication kinetics of YFV-GLuc and YFV-17D were analyzed in BHK-21 cells cultured in 24-well plates (8×10^4 cells/well). Cells were infected with YFV-GLuc (p4) or YFV-17D virus at a MOI of 0.1. The supernatant was collected for 4 days at every 24h and frozen at -80°C. Viral RNA (vRNA) was extracted from 140 µL of BHK-21 cell culture supernatant infected with YFV-GLuc or YFV-17D with the Viral RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). vRNA quantification was performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) with the QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), using a standard

curve of the PCR-targeted gene as described for dengue virus by Carvalho-Leandro et al. (2012). Primers used for YFV qRT-PCR were those used by Dash et al. (2012), targeting the 5' UTR and capsid gene junction of YFV. The positive control was RNA extracted from a known YFV-17D-infected culture. Reactions were performed in duplicate using the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System. The supernatants collected during the growth curve of YFV-GLuc were also used to perform the curve of GLuc expression. Finally, the relationship between GLuc activity and YFV-GLuc replication was evaluated by linear correlation and confirmed by r^2 value. Both qRT-PCR and GLuc expression were performed twice (two separate biological assays).

GENETIC STABILITY OF THE YFV-GLuc RECOVERED VIRUS

To assess the genetic stability of the YFV-GLuc construct, the recombinant virus was successively passed in BHK-21 cells six times at MOI of 1 and incubated until 70-80% CPE was observed (7-8 days). In passage 6 (p6), GLuc expression was evaluated three days post-infection. Moreover, vRNA was extracted from 140 μ L of supernatant from a BHK-21 cell culture infected with YFV-GLuc using the Viral RNA Isolation Kit and the presence of GLuc gene was confirmed through RT-PCR using the One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), and YFV-2375-F and YFV-NS1-2502-R oligonucleotides (Table I). The RT-PCR conditions were: reverse transcription at 50°C for 30 min; an initial PCR step (Taq activation) at 95°C for 15 min; and 32 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 52°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. The integrity and identity of the RT-PCR products were evaluated by Sanger sequencing. Nucleotide analysis was performed with Ape-A plasmid Editor v1.10.4.

ANTIVIRAL ASSAY

In this assay, BHK-21 cells were cultured in 96-well plates (10^4 cells/well) and 24 h later infected with YFV-GLuc (p4) and YFV-17D at a MOI of 0.1. Immediately after adsorption, BHK-21 cells were treated with recombinant human alfa-2b interferon (IFN alfa-2b) (Heber Biotec, Havana, Cuba), a known antiviral molecule (Akira et al. 2001), at 1000 UI/mL by 48 h. The negative controls were cells infected and not treated with IFN alfa-2b. After this step, GLuc activity was assessed according to the protocol described above and viral titer of YFV-17D was evaluated by plaque assay. This experiment was performed in duplicate.

STATISTICAL ANALYSIS

To compare the replication kinetics between the YFV-17D and YFV-GLuc viruses, Student's t-test (paired) was performed with the mean value of RNAv molecules/ μ L (Log10) at each timepoint (24, 48 and 72h) obtained in each experiment. A significance level of 5% was considered.

The correlation between GLuc activity and YFV-GLuc replication was evaluated by calculating the coefficient of determination (r^2) after plotting in one graph data from both experiments.

RESULTS

CONSTRUCTION OF pBSC-YFV-GLuc PLASMID

The successful construction of pBSC-YFV-GLuc was confirmed by two PCR reactions using YFV-GLuc-F and YFV-NS1-2502-R, and YFV-2375-F and YFV-GLuc-R oligonucleotides (data not shown). The full-length cDNA recombinant virus genome was then amplified and *in vitro* transcribed, and the RNA was introduced into BHK-21 cells. The positive immunofluorescence and GLuc activity assay post-transfection (31-fold increase) showed that the viral protein and GLuc heterologous protein were correctly translated (Fig. 2).

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF YFV-GLuc IN CELL CULTURE

The plaque assay confirmed the efficient replication of the YFV-GLuc rescued virus in cell culture. However, at the 10^{-5} dilution YFV-GLuc plaques (p4) were smaller (5 mm mean diameter; eleven plaques were counted) than those formed by the YFV-17D parental virus (10^{-4}) (9 mm mean diameter; seven were counted) (Fig. 3). The

replication kinetics of the YFV-GLuc (p4) vs. YFV-17D showed no statistical significance between the two viruses ($p < 0.05$) (Fig. 4a). The curve of GLuc activity on the supernatant of cells infected with YFV-GLuc (p4) showed a crescent GLuc expression over time (Fig. 4b). Moreover, a direct relationship between GLuc activity and YFV-GLuc replication was confirmed by regression analysis, with an r^2 value of 0.9967 (Fig. 4c).

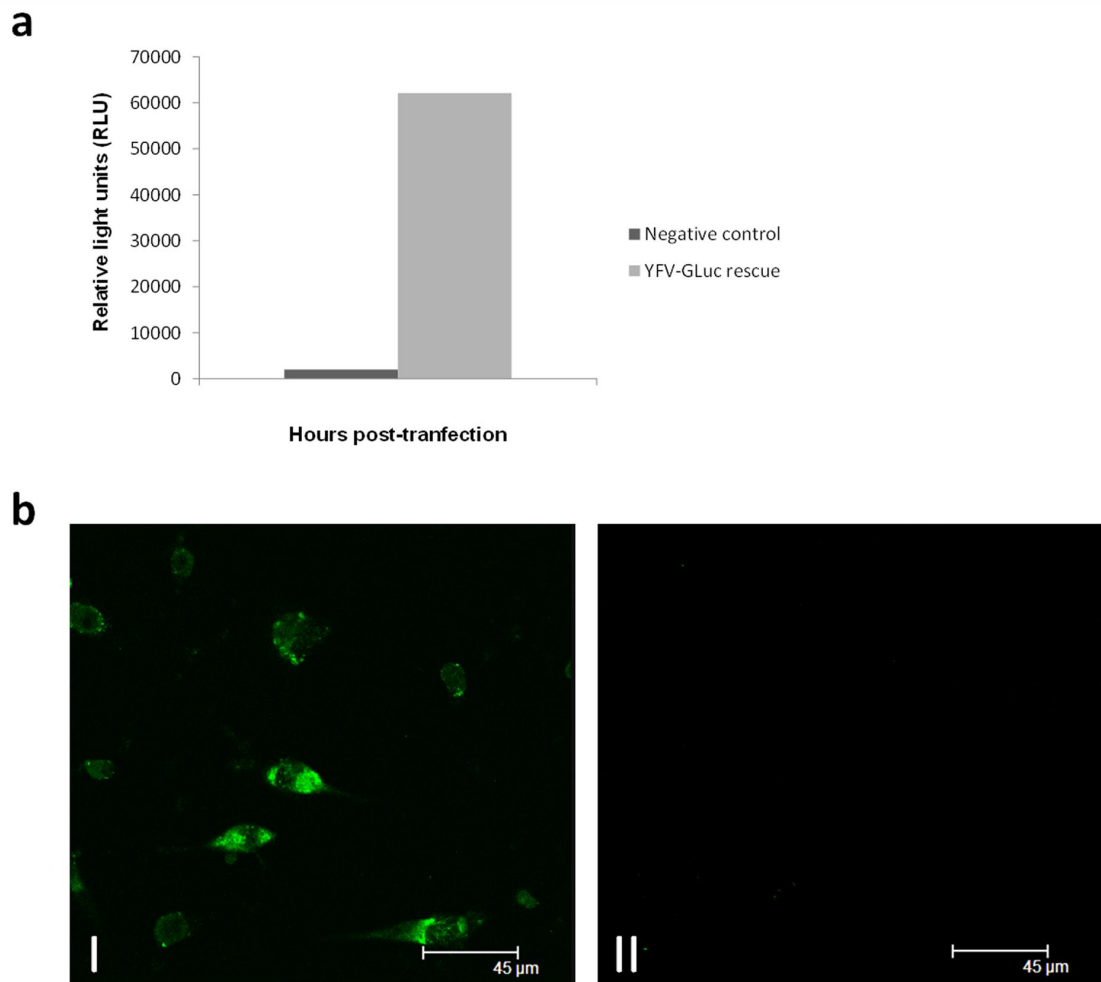


Figure 2 - a) *Gussia* luciferase activity on the supernatant of BHK-21 cells 120 hours post-transfection with YFV-GLuc RNA. GLuc activity is expressed as relative light units (RLU). Negative control: supernatant of electroporated cells without YFV-GLuc RNA. **b)** IFA (63x magnification) performed with polyclonal hyperimmune mouse ascitic fluid raised against group B flaviviruses (primary antibody) and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (secondary antibody). I) BHK-21 cells transfected with YFV-GLuc RNA at 120 h post-transfection; II) Negative control, mock-electroporated cells at 120 hours post-electroporation.

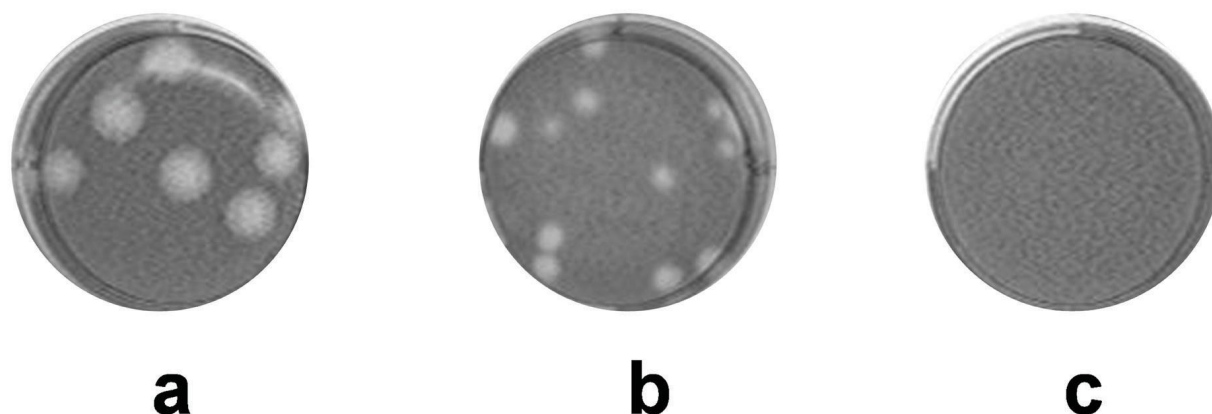


Figure 3 - Plaque assay of YFV-17D and YFV-GLuc. BHK-21 cells were inoculated with serial dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) of YFV-GLuc or YFV-17D, and plaques were revealed 7 days post-infection. **a**) Plaques formed by YFV-17D at 10^{-5} dilution, measuring approximately 9 mm in diameter; **b**) Plaques formed by YFV-GLuc at 10^{-4} dilution, measuring approximately 5 mm in diameter; **c**) Negative control (non-infected cells).

GENETIC STABILITY OF THE YFV-GLuc RECOVERED VIRUS

The presence and integrity of the GLuc gene was confirmed after six passages in BHK-21 cells through RT-PCR (Fig. 5) and nucleotide sequencing (data not shown). Moreover, in p6, GLuc activity (130-fold increase) in relation to mock-infected cells confirmed the stability of GLuc expression.

ANTIVIRAL ASSAY

Conventional antiviral assays are performed through plaque assays (Green 2008) and are time-consuming and require several steps. Thus, the YFV-GLuc recombinant virus was evaluated about its ability to be used as a novel antiviral assay platform: in this case, GLuc activity is inversely proportional to the antiviral activity of the evaluated substrate.

The antiviral assay was performed with IFN alfa-2b at 1000 UI/mL. The result was expressed as the percentage of GLuc inhibition in BHK-21 cells infected by YFV-GLuc. Inhibition of GLuc expression in cells treated with IFN alfa-2b was 60% (similar inhibition results were observed with YFV-17D evaluated by plaque assay). The negative

control consisted of cells infected and not treated with IFN alfa-2b.

DISCUSSION

Despite the success of the yellow fever vaccine with attenuated YFV (YFV-17D strain and its substrains YFV-17DD and YFV17D-204), yellow fever still poses a threat to several countries throughout the world. Although several drugs targeting the virus or blocking host responses are being developed, no anti-YFV drug is currently licensed (Julander 2013). Moreover, conventional assays to screen for antiviral compounds are usually performed through plaque assays and thus are laborious and time-consuming (Green et al. 2008). Replicon-based high-throughput screening methods using reporter genes represent important tools to evaluate antiviral compounds against several viruses *in vitro* and/or *in vivo* experiments (Patkar et al. 2009, Kato et al. 2014, Ding et al. 2015). However, replicon systems consist of a viral subgenome containing only nonstructural genes, and antiviral drugs or antibody targeting structural viral proteins cannot be evaluated through this technology (Mayhoub et al. 2011, Umamaheswari et al. 2011). To overcome

Figure 4

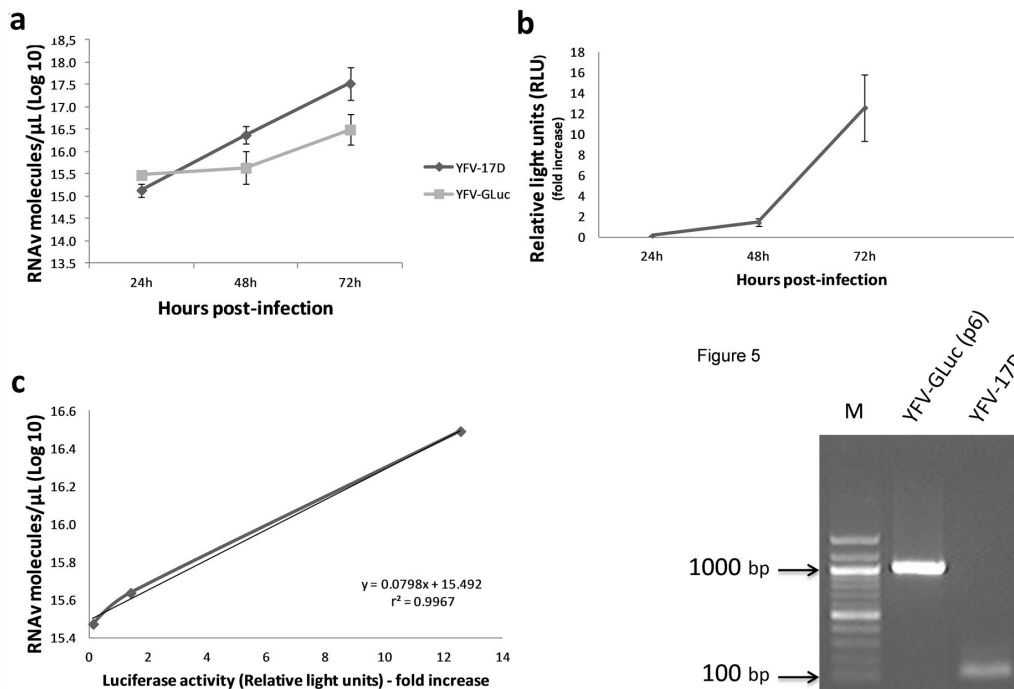


Figure 4 - a) Comparison of YFV-GLuc and YFV-17D replication kinetics. BHK-21 cells were inoculated with either virus at MOI of 0.1. At indicated times, the supernatant was collected and viral quantitation was assessed through SYBR Green-based quantitative real-time PCR. Each value represents the mean of two independent experiments; **b)** Curve of GLuc activity on the supernatant of cells infected with YFV-GLuc (MOI of 0.1). At different time points, the supernatant was collected and GLuc activity was measured and expressed as the fold-increase in relation to time zero using the relative light units. Each value represents the mean of two independent experiments; **c)** Linear correlation between GLuc activity (relative light units) and viral replication (RNAv molecules/μL). The replication kinetics of the YFV-GLuc and curve of *Gaussia* luciferase expression were overlapping and the direct relationship between them was evaluated by linear regression.

this limitation of replicon systems, strategies that use recombinant viruses containing reporter genes may be used.

Recombinant viruses expressing reporter genes (e.g. YFV, GFP, and firefly and *Renilla* luciferases)

Figure 5

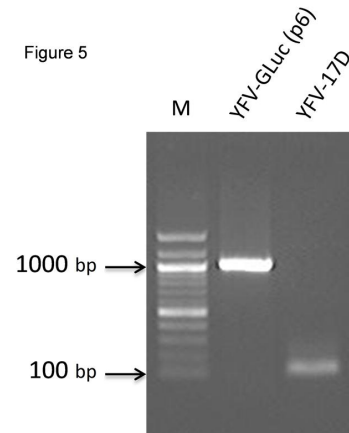


Figure 5 - RT-PCR of the YFV-GLuc (passage 6, p6). vRNA was extracted from BHK-21 cell culture supernatant infected with YFV-GLuc and YFV-17D parental virus and RT-PCR was performed to confirm the presence of the GLuc gene. The oligonucleotides set used in the amplification are listed in Table I (YFV-2375- F and YFV-NS1-2502-R). The difference between the size of YFV-GLuc (approximately 1000bp) and YFV-17D (approximately 130bp) amplicons is due to GLuc gene and accessory regions (Stem-anchor E DENV1 and NS1 N-terminal-YFV). M: 100bp DNA Ladder.

have been reported for distinct viruses and used for various purposes, e.g. on the evaluation of virus-host interactions, viral tropism, and antiviral and neutralization assays (Roth et al. 2009, Schoggins et al. 2012, van den Worm et al. 2012, Dag et al. 2013, De Baets et al. 2015, Zhang et al. 2015). These studies include the development of recombinant flavivirus expressing reporter genes, such as Dengue virus expressing GFP and firefly

and *Renilla* luciferases (Zou et al. 2011, Schoggins et al. 2012). However, the instability or decreased fitness of the recombinant viruses compared to the parental virus limit their application in some experimental designs, as noted by Aubry et al. (2015). This instability in engineered virus expressing reporter genes was also reported in other flavivirus and DNA virus platforms (Song et al. 2012, Vandergaast et al. 2014, Zhang et al. 2015).

More recently, the constructions of viruses expressing GLuc as reporter gene and their use in several biotechnological applications have been reported. A desired feature of such clones is the stability of GLuc expression to allow their use in long-term studies, but unfortunately such condition has not always been achieved. Zhang et al. (2015) reported the construction of a West Nile Virus (WNV) expressing GLuc and its use in neutralization assays, but the recombinant virus gradually lost stability along the passages, where GLuc activity was no longer detected in passage 3. Vandergaast et al. (2014) also found similar instability in a GLuc-expressing WNV. The lower stability of these recombinant viruses in relation to YFV-GLuc probably is due to the insertion position GLuc gene (within C gene) and/or to the pathogenic strain used as backbone of WNV-GLuc, especially in Vandergaast et al. (2014). Conversely, in our experiments, GLuc gene was inserted into E-NS1 junction of an attenuated virus (YFV-17D). A recombinant poliovirus expressing GLuc retained the complete reporter gene for three passages and after that also gradually lost it (Song et al. 2012).

Our group has recently reported a recombinant bovine viral diarrhea virus stably expressing GLuc (Arenhart et al. 2014) and now reports a recombinant YFV-17D stably expressing this same reporter gene (YFV-GLuc). The choice of GLuc as a reporter gene is mainly due to the following advantages: 1) high stability and sensitivity of GLuc (Tannous et al. 2005); 2) GLuc upon expression is secreted

into the cell culture media or organics fluids/secretions, thus cell lysis to assess GLuc activity is not necessary, making GLuc an ideal reporter gene for time-course studies (Venisnik et al. 2007); and 3) GLuc gene is smaller than other reporter genes, facilitating its manipulation in recombinant technologies.

In the present study, YFV-GLuc was stable after six passages in BHK-21 cells as indicated by RT-PCR (Fig. 5), sequencing integrity (data not shown) and GLuc activity (130-fold increase in comparison to mock-infected cells). The stability of GLuc activity also was evidenced by its increasing expression over time (Fig. 4b). The comparison of plaques formed by the parental and recombinant viruses in BHK-21 cells showed smaller-sized plaques in the latter (Fig. 3). Nevertheless, the replication kinetics of YFV-GLuc vs. YFV-17D showed no statistical significance between the two viruses ($p < 0.05$), although there was a tendency for YFV-GLuc to grow more slowly (Fig. 4a). The similarity between the YFV-17D parental virus and recombinant virus replication has already been reported in YFV platforms expressing heterologous proteins or small heterologous sequences from virus or protozoan at the E-NS1 expression site (Rumyantsev et al. 2010, Franco et al. 2010, Nogueira et al. 2013).

After construction, characterization and stability confirmation, YFV-GLuc was evaluated in an antiviral assay with IFN alfa-2b. Importantly, a direct relationship between GLuc activity and YFV-GLuc replication was confirmed through regression analysis, indicating that GLuc expression may be used to represent viral replication (Fig. 4c). Thus, a decrease in GLuc activity after incubation with IFN alfa-2b reflects, indirectly, a decrease in viral genome replication. For instance, an inhibition of approximately 60% in GLuc activity after incubation with IFN alfa-2b reflects a decrease within the same range in viral replication. The result of the IFN- alfa 2b assay shows the usefulness

of GLuc-YFV construct to be used in further high-throughput antiviral screening assays.

In summary, the genetic manipulation of YFV-17D has proven to be stable in several biotechnological applications, as reviewed by Bonaldo et al. (2014). The present work reports the construction, characterization and additionally the use of a stable recombinant YFV-17D expressing GLuc to antiviral activity, combining in a single strategy the stability of the YFV-17D backbone and the advantages of GLuc as a reporter gene.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-470453/2012-5).

REFERENCES

- AKIRA S, TAKEDA K AND KAISHO T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675-680.
- ARENHART S, FLORES EF, WEIBLEN R AND GIL LH. 2014. Insertion and stable expression of *Gaussia* luciferase gene by the genome of bovine viral diarrhea virus. *Res Vet Sci* 97: 439-448.
- AUBRY F, NOUGAIREDE A, GOULD EA AND DE LAMBALLERIE X. 2015. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: a historical perspective. *Antiviral Res* 114: 67-85.
- BONALDO MC, MELLO SM, TRINDADE GF, RANGEL AA, DUARTE AS, OLIVEIRA PJ, FREIRE MS, KUBELKA CF AND GALLER R. 2007. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virology* 4: 115.
- BONALDO MC, SEQUEIRA PC AND GALLER R. 2014. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Hum Vacc Immunother* 10: 1256-1265.
- CARVALHO-LEANDRO D ET AL. 2012. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. *Acta Trop* 124: 113-119.
- DAG F, WEINGARTNER A, BUTUEVA M, CONTE I, HOLZKI J, MAY T, ADLER B, WIRTH D AND CICINSAIN L. 2013. A new reporter mouse cytomegalovirus reveals maintained immediate-early gene expression but poor virus replication in cycling liver sinusoidal endothelial cells. *Virology* 10: 197.
- DASH PK, BOUTONNIER A, PRINA E, SHARMA S AND REITER P. 2012. Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of YFV infection in *Aedes aegypti*. *Virology* 9: 27.
- DE BAETS S, VERHELST J, VANDEN HOECKE S, SMET A, SCHOTSAERT M, JOB ER, ROOSE K, SCHEPENS B, FIERS W AND SAELENS X. 2015. A GFP expressing influenza A virus to report *in vivo* tropism and protection by a matrix protein 2 ectodomain-specific monoclonal antibody. *PLoS ONE* 10: e01211491.
- DING CB, ZHAO Y, ZHANG JP, PENG ZG, SONG DQ AND JIANG JD. 2015. A zebrafish model for subgenomic hepatitis C virus replication. *Int J Mol Med* 35: 791-797.
- FRANCO D, LI W, QING F, STOYANOV CT, MORAN T, RICE CM AND HO DD. 2010. Evaluation of yellow fever virus 17D strain as a new vector for HIV-1 vaccine development. *Vaccine* 28: 5676-5685.
- GREEN N, OTT RD, ISAACS RJ AND FANG H. 2008. Cell-based Assays to Identify Inhibitors of Viral Disease. *Expert Opin Drug Discov* 3: 671-676.
- HANLEY KA, MONATH TP, WEAVER SC, ROSSI SL, RICHMAN RL AND VASILAKIS N. 2013. Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infect Genet Evol* 19: 292-311.
- ISHIKAWA T, YAMANAKA A AND KONISHI E. 2014. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine* 32: 1326-1337.
- JULANDER JG. 2013. Experimental therapies for yellow fever. *Antiviral Res* 97: 169-179.
- KATOF, KOBAYASHI T, TAJIMA S, TAKASAKI T, MIURA T, IGARASHI T AND HISHIKI T. 2014. Development of a novel Dengue-1 virus replicon system expressing secretory *Gaussia* luciferase for analysis of viral replication and discovery of antiviral drugs. *Jpn J Infect Dis* 67: 209-212.
- LINDENBACH BD, MURRAY CL, THIEL H-J AND RICE CM. 2013. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM and Howley PM (Eds), *Fields Virology*, New York: Lippincott Williams e Wilkins 6: 712-746.
- MAYHOUB AS, KHALIQU M, KUHN RJ AND CUSHMAN M. 2011. Design, synthesis, and biological evaluation of thiazoles targeting flavivirus envelope proteins. *J Med Chem* 54: 1704-1714.
- MONATH TP, SELIGMAN SJ, ROBERTSON JS, GUY B, HAYES EB, CONDIT RC, EXCLER JL, MAC LM, CARBERY B AND CHEN RT. 2015. Live virus vaccines based on a yellow fever vaccine backbone: standardized

- template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine* 33: 62-72.
- NOGUEIRA RT, NOGUEIRA AR, PEREIRA MC, RODRIGUES MM, NEVES PC, GALLER R AND BONALDO MC. 2013. Recombinant yellow fever viruses elicit CD8+ T cell responses and protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* 8: e59347.
- PATKAR CG, LARSEN M, OWSTON M, SMITH JL AND KUHN RJ. 2009. Identification of inhibitors of yellow fever virus replication using a replicon-based high-throughput assay. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 4103-4114.
- RICE CM, GRAKOU I A, GALLER R AND CHAMBERS TJ. 1989. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation. *New Biol* 1: 285-296.
- ROTH JP, LI JK, SMEE DF, MORREY JD AND BARNARD DL. 2009. A recombinant, infectious human parainfluenza virus type 3 expressing the enhanced green fluorescent protein for use in high-throughput antiviral assays. *Antiviral Res* 82: 12-21.
- RUMYANTSEV AA, ZHANG ZX, GAO QS, MORETTI N, BROWN N, KLEANTHOS H, DELAGRAVE S, GUIRAKHOO F, COLLETT MS AND PUGACHEV KV. 2010. Direct random insertion of an influenza virus immunologic determinant into the NS1 glycoprotein of a vaccine flavivirus. *Virology* 396: 329-338.
- SAMBROOK J AND RUSSEL DW 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. n. 2, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANTOS JJ, CORDEIRO MT, BERTANI GR, MARQUES ET AND GIL LH. 2013. Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 983-991.
- SCHOGGINS JW, DORNER M, FEULNER M, IMANAKA N, MURPHY MY, PLOSS A AND RICE CM. 2012. Dengue reporter viruses reveal viral dynamics in interferon receptor-deficient mice and sensitivity to interferon effectors *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 14610-14615.
- SONG BH, YUN GN, KIM JK, YUN SI AND LEE YM. 2012. Biological and genetic properties of SA(1)(4)-14-2, a live-attenuated Japanese encephalitis vaccine that is currently available for humans. *J Microbiol* 50: 698-706.
- TANNOUS BA, KIM DE, FERNANDEZ JL, WEISSLEDER R AND BREAKFIELD XO. 2005. Codon-optimized *Gaussia* luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and *in vivo*. *Mol Ther* 11: 435-443.
- UMAMAHESWARI A, KUMAR MM, PRADHAN D AND MARISSETTY H. 2011. Docking studies towards exploring antiviral compounds against envelope protein of yellow fever virus. *Interdiscip Sci* 3: 64-77.
- VAN DEN WORM SH ET AL. 2012. Reverse genetics of SARS-related coronavirus using vaccinia virus-based recombination. *PLoS ONE* 7: e32857.
- VANDERGAAST R, HOOVER LI, ZHENG K AND FREDERICKSEN BL. 2014. Generation of West Nile virus infectious clones containing amino acid insertions between capsid and capsid anchor. *Viruses* 6: 1637-1653.
- VENISNIK KM, OLAFSEN T, GAMBHIR SS AND WU AM. 2007. Fusion of *Gaussia* luciferase to an engineered anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody for *in vivo* optical imaging. *Mol Imaging Biol* 9: 267-277.
- ZHANG PT ET AL. 2015. Generation of a recombinant West Nile virus stably expressing the *Gaussia* luciferase for neutralization assay. *Virus Res* 211: 17-24.
- ZOU G, XU HY, QING M, WANG QY AND SHI PY. 2011. Development and characterization of a stable luciferase dengue virus for high-throughput screening. *Antiviral Res* 91: 11-19.

APÊNDICE C

Full-length infectious clone of a low passage dengue virus serotype 2 from Brazil

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz (2015)

**Jefferson José da Silva Santos¹, Tereza Magalhães¹, José Valter Joaquim Silva Junior¹,
Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva¹, Marli Tenório Cordeiro^{1,2}, Laura Helena Vega Gonzales
Gil^{1*}**

¹Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Saúde do Estado de Pernambuco, Laboratório Central de Saúde Pública, Recife, PE, Brasil

Full-length dengue virus (DENV) cDNA clones are an invaluable tool for many studies, including those on the development of attenuated or chimeric vaccines and on host-virus interactions. Furthermore, the importance of low passage DENV infectious clones should be highlighted, as these may harbour critical and unique strain-specific viral components from field-circulating isolates. The successful construction of a functional Brazilian low passage DENV serotype 2 full-length clone through homologous recombination reported here supports the use of a strategy that has been shown to be highly useful by our group for the development of flavivirus infectious clones and replicons.

Key words: infectious clone - yeast homologous recombination - flavivirus

Dengue is an arthropod-borne disease found in tropical and subtropical regions throughout the world. The incidence of dengue has increased significantly in the past years and a recent study estimates that 390 million people are infected with dengue viruses (DENV) annually (2013). In the Americas, Brazil and Mexico account for most cases (Bhatt et al. 2013). The burden of dengue is due to the mortality rate (which can reach approximately 5% of the severe cases) and to the morbidity rate among symptomatic patients, which involves a broad spectrum of symptoms and may last for several days. In fact, the classification of dengue clinical cases remains a complex and changing subject (Horstick et al. 2015). Although there are currently a few vaccine formulations in clinical trials, there are no licensed vaccines available against DENV (Ishikawa et al. 2014). The complex interactions among hosts (humans and mosquitoes) and different virus strains most likely represent part of the obstacle to the development of an effective vaccine.

DENV (genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*) are transmitted to humans by female adult mosquitoes, with *Aedes aegypti* being the most important vector (Nene et al. 2007). There are four recognised DENV serotypes (DENV1-DENV4), with multiple genotypes/lineages identified within each serotype (Chen e Vasilakis 2011). The importance of viral genotype/lineage identification is due to strain-associated features involved in viral replication and pathogenesis (Rico-Hesse 2007). The genome of DENV consists of positive single-stranded

RNA and is approximately 10.7 Kb with a 5' cap structure and a 3' untranslated region that lacks a poly (A) tail. A polyprotein is encoded by a single open reading frame within the genome and it is further cleaved into three structural and seven nonstructural (NS) proteins (NH₂-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COOH) by viral and host proteases (Chambers et al. 1990).

A full-length complementary DNA (cDNA) clone or infectious clone of a virus is a powerful tool that allows for the manipulation of the viral genome for various purposes, providing a homogeneous viral population for research (Ruggli e Rice 1999). Although not all infectious clones rely on in vitro transcription or cloning vectors, to simplify, here we will consider full-length clones that consist of the whole viral genome inserted in a cloning vector downstream of the sequence of an RNA polymerase phage promoter. The construct is then propagated in a bacteria or yeast host, linearised and in vitro transcribed to generate transcripts that resemble the parental virus genome. The transcripts are further used to transfect cells, allowing for the production of mature virions. Full-length flavivirus infectious clones have been reported since 1991 (Lai et al. 1991). However, the major obstacle for these studies is the instability of the viral genome in host systems, especially in *Escherichia coli* (Ruggli e Rice 1999). Different methodologies have been applied to overcome viral genome instability, including the use of low copy bacterial plasmids and bacterial artificial chromosome (BAC) vectors.

Homologous recombination in yeast with linear DNA fragments containing homologous regions in their ends can overcome laborious cloning strategies in bacteria (Gibson 2009). Importantly, with regard to the construction of flavivirus infectious clones, this technique yields more stable plasmid amplification than in bacteria, as it has been shown that the genome of some flaviviruses, such as DENV, may contain cryptic bacterial promoters. These promoters lead to the unwanted production of vi-

doi: 10.1590/0074-02760150053

Financial support: FIOCRUZ (PAPES V), CNPq (CNPq-470892/2007-2)

JJSS currently address: University of Maryland, Department of Veterinary Medicine, College Park, MD, USA

* Corresponding author: laura@cpqam.fiocruz.br

Received 9 February 2015

Accepted 11 June 2015

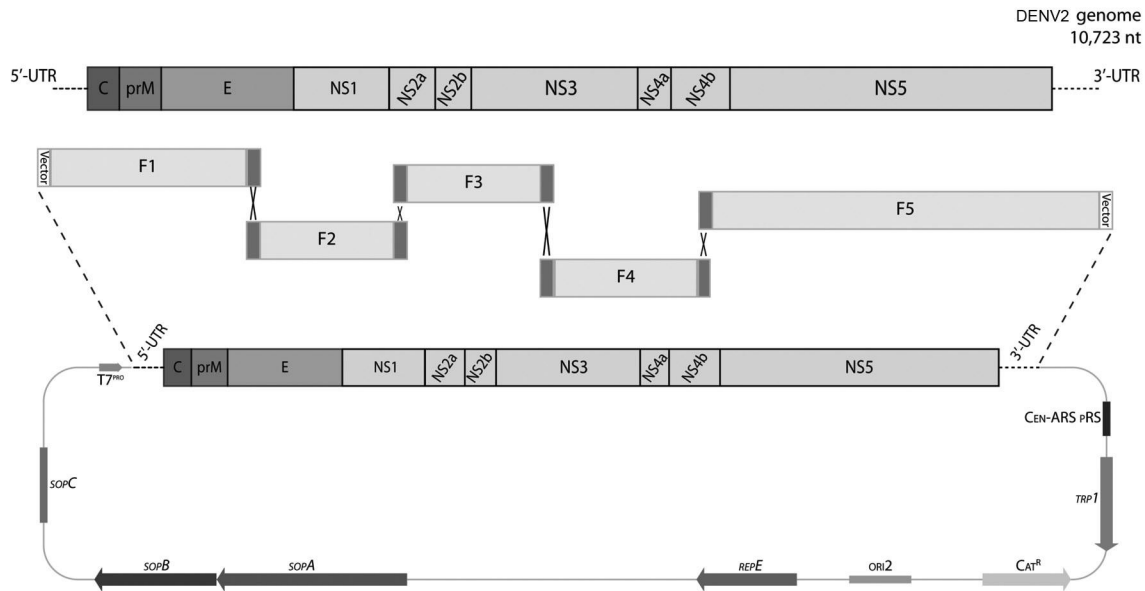


Fig. 1: construction of a low passage full-length dengue virus serotype 2 (DENV2) infectious clone named pSVJS01-DENV2. Five fragments within the DENV2 genome were amplified and inserted into the shuttle vector pSVJS01 through homologous recombination in yeast. E: envelope; F: fragment; NS: nonstructural; UTR: untranslated region.

ral proteins/regions that are toxic to the bacteria (Pu et al. 2011), which results in viral genome modifications (e.g., deletions, insertions) during the amplification process.

In the present paper, we report the construction of a full-length DENV2 infectious clone based on a low passage clinical isolate, through homologous recombination in yeast. The virus DENV2 BR-3808 was isolated from a biological sample collected from a patient presenting with dengue fever during a dengue outbreak in Recife, state of Pernambuco, Brazil, in 1995. An aliquot of the biological sample was inoculated into C6/36 mosquito cells and, after a few days, the flask content was harvested for virus identification through reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using primers specific for DENV2 (Lanciotti et al. 1992) and indirect immunofluorescence (IFA). The virus was then cultured in C6/36 until passage 3. C6/36 were maintained at 28°C in Leibovitz's medium (L15) containing 5% foetal bovine serum (FBS), 1% antibiotics solution (stock solution at 10,000 units/mL of penicillin and 10,000 µg/mL of streptomycin) and 0.1% Fungizone (stock solution at 250 µg/mL). Next, DENV2 BR-3808 was plaque purified and amplified once in baby hamster kidney (BHK)-21 cells. BHK-21 was maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% FBS, 1% antibiotics solution and 0.1% Fungizone.

Construction of the DENV2 infectious clone was performed using the same strategy described previously by our group for the construction of a DENV3 full-length clone (Santos et al. 2013). Electrocompetent *E. coli* DH10B and *Saccharomyces cerevisiae* YPH252 were used for plasmid amplification. *S. cerevisiae* RFY206 was used for homologous recombination to insert the DENV2 genome into a shuttle vector previously

constructed, pSVJS01 (Santos et al. 2013). This plasmid is a modified version of the BAC vector pBeloBAC11, into which a 2 kb fragment of the plasmid pRS414 (that allows replication and selection in yeast), a T7 promoter recognition site and a multiple cloning site was inserted. This construct ensures amplification at low copy number in yeast, a strategy known to minimise infectious clone instability (Bredenbeek et al. 2003, Suzuki et al. 2007). The DENV2 infectious clone was constructed as shown in Fig. 1. Firstly, the viral genome was amplified in five overlapping fragments. Primers sequences and fragment size are depicted in Table I. Primer PSVJS01-F contained an RsrII restriction site, a T7 promoter recognition site and an additional G immediately before the first base of the DENV2 genome. Amplified fragments (F1-F5) were assembled into the NotI-linearised pSVJS01 vector by homologous recombination in the YPH252 yeast strain. The DENV2 full-length infectious clone, named pSVJS01-DENV2, was successfully assembled by this strategy. The full-length PCR amplicon from two pSVJS01-DENV2 clones (3 and 10) was confirmed by gel electrophoresis. Functional clones were maintained in yeast to prevent infectious clone instability that may occur upon amplification in bacteria (Polo et al. 1997, Ruggli e Rice 1999). PCR amplicons derived from pSVJS01-DENV2 were purified using phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation and the purified amplicons were used as a template for full-length in vitro RNA transcription. For transcription, the MEGAScript T7 kit (Ambion) was used with the addition of a 7-methyl-guanosine cap analogue (Ambion), following the manufacturer's instructions. Transcript analysis through formaldehyde-agarose gel electrophoresis showed high-quality products (data now shown). RNA transcripts

TABLE I
Primers used to amplify fragments of the dengue virus serotype 2 (DENV2) (strain BR-3808) genome used to assemble the full-length infectious clone through homologous recombination in yeast

Fragment	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Primer annealing	
				Position (nt) ^a	Gene region
F1	PSVJS01-F	<i>egggtccgtaatacgaactcactata</i> <u>GAGTTGTTARTCTACGTGGACCGA</u>	2,045	1-23	5'-UTR
	DENV2-2045-R	TCTGCTTCTATGTTGACTGGG		2,025-2,045	E
F2	DENV2-1810-F	CTACAGCTCAAAGGAATGTCAT	1,760	1,810-1,831	E
	DENV2-3570-R	CATGTTTCGTTCTACTCGGGTCC		3,548-3,571	NS2A
F3	DENV2-3501-F	TCACTAGGAGTCTTGGGAATGGC	2,058	3,502-3,524	NS2A
	DENV2-5559-R	TCCGTGACCCATTCATGTCC		5,560-5,579	NS3
F4	DENV2-5491-F	CATTTCCTCAGAGCAATGCACCAATC	1,878	5,492-5,517	NS3
	DENV2-7369-R	AATACTTGAGTCACGCAGAGG		7,350-7,370	NS4a
F5	DENV2-7190-F	GCCAGGACTTCAAGCAAAAGC	3,533	7,191-7,211	NS4a
	PSVJS01-R	<i>ttaacatttcgtctcgcgcggccgc</i> AGAACCRGTTGATTCAACAGCACCATT		10,697-10,723	3'-UTR

a: nucleotide numbering refers to DENV2 full-length genome (GeneBank accession JX669481). RsrI restriction site was marked in bold type. T7 RNA polymerase promoter sequence was marked in italic and a single G for initiation of transcription is underlined. Regions of homology to pSVJS01 vector shown in capitals. E: envelope; F: fragment; NS: nonstructural; UTR: untranslated region.

were then introduced into BHK-21 cells by electroporation using the ECM 830 electro cell manipulator (BTX; Harvard Apparatus). For electroporation, 2×10^6 BHK-21 cells were trypsinised, washed twice with serum-free medium, resuspended in 100 μ L cytomix solution (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.6, 25 mM HEPES, pH 7.6, 2.0 mM EGTA, 5.0 mM MgCl₂) plus 2.0 mM of ATP and 5.0 mM of glutathione and mixed with 5 μ g of the transcript. Cuvettes of 0.2 cm gap were used and electroporation settings were as follows: two pulses of 100 μ s at 1,200 V and 1 s interval. As a negative control, BHK-21 cells were transfected under the same conditions with no RNA. After electroporation, cells were allowed to recover for 10 min at room temperature, resuspended in complete growth medium and plated into 25 cm² flasks.

To detect DENV2 production in BHK-21, transfected cells were analysed by IFA. Specifically, three days after electroporation cells were trypsinised from the flask and seeded on glass coverslips. Coverslips were then collected four days later (i.e., 7 days post-infection), rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 50% cold acetone (v/v) in PBS for 5 min at 4°C and air-dried. Next, fixed cells were incubated with a 1:100 dilution of a polyclonal hyperimmune mouse ascitic fluid (HMAF) as the primary antibody for 1 h at 37°C. The HMAF reacts against group B flaviviruses, including the four DENV serotypes and yellow fever virus. After incubation, the cells were rinsed twice with PBS and incubated for 1 h at 37°C with a 1:100 dilution of fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Sigma-Aldrich) as the secondary antibody. Cells were then rinsed twice with PBS, air-dried and mounted. A DMI4000 B inverted microscope (Leica) was used for

analysis. Positive immunofluorescence was observed in infected cells (Fig. 2A) showing DENV2 production in BHK-21 cells transfected with RNA transcripts derived from pSVJS01-DENV2. Transfected, noninfected cells did not show any fluorescence (data not shown).

Virus characterisation was performed by *focus*-forming assay in BKH-21 cells and growth curve analysis between both viruses. For the *focus*-forming assay, 4×10^5 cells/per well were plated in six-well plates and 24 h later cell monolayers were incubated for 1 h at 37°C with 0.8 mL of serial dilutions of parental DENV2 BR-3808 (parental-DENV2) and virus derived from pSVJS01-DENV2. After removing the *inoculum*, cells were covered with 3 mL of MEM overlay medium (containing 2% carboxymethyl cellulose, 5% FBS and 1% antibiotic solution) and incubated at 37°C with 5% CO₂ for five days. Next, overlay medium was removed and the cells were fixed with 30% cold acetone (v/v) in PBS for 13 min at 4°C and washed once with PBS. Fixed cells were incubated for 1 h at 37°C with primary anti-DENV2 monoclonal antibody D1-4G2-4-15 (HB112 - ATCC) diluted 1:2 in ligation buffer (0.5 M NaCl and 0.01% Tween-20 in PBS). Cells were rinsed with wash buffer (0.05% Tween-20 in PBS) and incubated for 1 h at 37°C with horseradish peroxidase-conjugated recombinant protein G (Invitrogen) diluted 1:500 in ligation buffer. Three additional washing steps were performed and *foci* were developed by adding 3-amino-9-ethylcarbazole substrate buffer. In these assays, *foci* were visible at up to the 10⁻⁵ dilution for DENV2 derived from pSVJS01-DENV2. Moreover, *foci* of pSVJS01-derived DENV2 virus did not differ in formation or size from parental-DENV2 (Fig. 2B). These results show the production of functional and infectious DENV2 from the infectious clones.

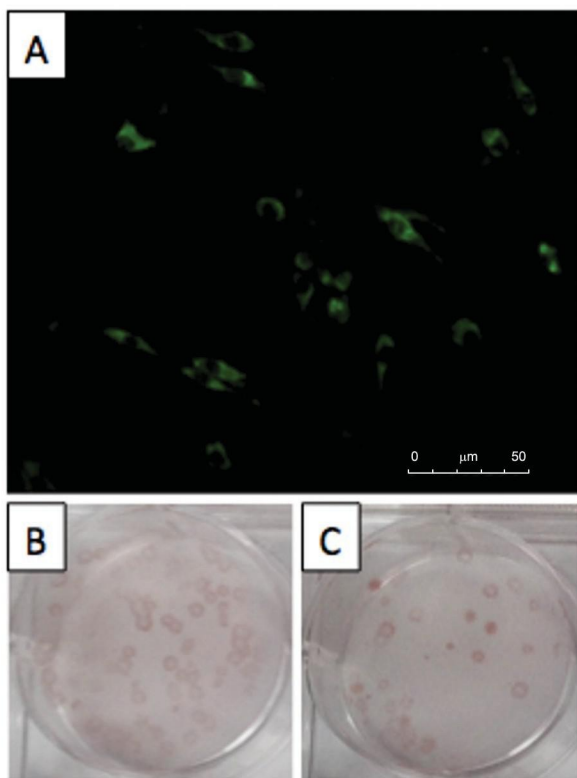


Fig. 2: in vitro characterisation of pSVJS01-DENV2 virus. A: detection of dengue virus serotype 2 (DENV2) in baby hamster kidney (BHK)-21 cells transfected with RNA derived from pSVJS01-DENV2 clone 10 by indirect immunofluorescence assay. Cells were collected at five days post-transfection and labelled with anti-flavivirus group B as the primary antibody and anti-mouse IgG-fluorescein isothiocyanate as the secondary antibody; B, C: plaque phenotypes of the wild type DENV2 (BR-3808) and the virus derived from pSVJS01-DENV2. BHK-21 cells were infected with the different viruses for five days at 37°C. Plaque formation was revealed by immunoperoxidase assay; B: DENV2 BR-3808; C: pSVJS01-DENV2 clone 10.

For the growth curve analysis, BHK-21 cells were seeded in 24-well plates at 6×10^4 cells/well and were infected 24 h later with both viruses at a multiplicity of infection of 0.1. The supernatant was collected from the wells at the following time-points: 0 h, 24 h, 48 h and 72 h. Viral RNA was extracted from the material with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). To quantify the viral genome in this material, quantitative real-time PCR was performed with the QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen), as described by Carvalho-Leandro et al. (2012). Briefly, primers that amplify a 104 bp region of the DENV NS5 according to Kong et al. (2006) were used. PCR reactions were performed with a fixed amount of RNA and 0.4 μ M of each primer. Reaction conditions were as follows: 50°C for 30 min, to allow reverse transcription, 95°C for 15 min, to activate Taq, and 35 cycles of 94°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The amount of viral RNA in each sample was calculated by cycle threshold values from the standard curve in-

cluded in each PCR plate. This curve consisted of known concentrations of purified NS5 transcript, as described in Kong et al. (2006). The negative controls consisted of one reaction with no RNA template and one reaction with RNA extracted from noninfected cells. The positive control was RNA extracted from a known DENV2 infected-culture. Reactions were performed in duplicate using the Applied Biosystems 7500 fast and Real-Time PCR System. Similar results were observed between samples of cultures infected with either DENV2 BR-3808 or the infectious clone-derived DENV2 at the different time-points assayed. The amounts of viral RNA at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h were 15.6, 16.8, 17.5 and 18.0, respectively, for the BR-3808, and 15.6, 17.1, 17.1 and 17.7 RNA molecules/ μ L (\log_{10}) for the pSVJS01-derived DENV2 (Fig. 3). These results also show the similar phenotype between the viruses.

Finally, the gene coding for the envelope protein, which is approximately 1,500 bp, was sequenced from both viruses using the Sanger method. The results showed that the sequences were 100% identical (data not shown), demonstrating that at least in this part of the genome no mutations arose from the strategy described here. In addition, any mutation in other genome regions that may have occurred was not enough to cause significant phenotypic differences among the parental and infectious clone-derived viruses.

The availability of DENV full-length cDNA clones that correspond to the original DENV genome is an invaluable tool for several types of study, including those on the development of attenuated or chimeric vaccines and on host-virus interactions. Furthermore, the importance of low passage DENV infectious clones should be highlighted, as these may harbour critical and unique strain-specific viral components from field-circulating isolates; hence, the importance of reporting the construction and availability of such clones.

Full-length clones have been reported for all four DENV serotypes. However, only a remarkably small amount of these are based on low passage isolates (Table II). Although there is a higher number of available

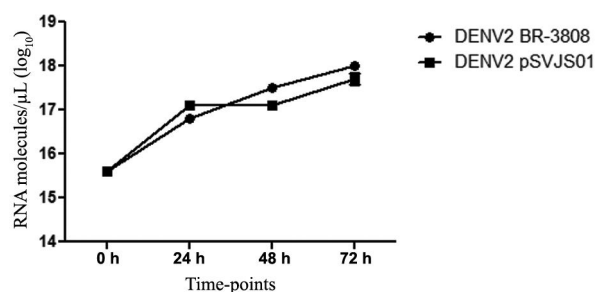


Fig. 3: growth curve analysis of parental (BR-3808) and infectious clone-derived dengue virus serotype 2 (DENV2) (pSVJS01) assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction. Viral RNA was quantified in baby hamster kidney-21 cells infected with either viruses at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h post-infection.

TABLE II

Full-length infectious clones of dengue virus (DENV) serotypes 1-4 and their passage history^a

Serotype	Strain	Passage history	Plasmid (type)	Reference
DENV4	814669 (Dominica, 1981)	Not available ^b	pBR322 (<i>Escherichia coli</i>)	Lai et al. (1991)
DENV2	16681 (Thailand, 1964)	BS-C-1 cells (several times); LLC-MK2 cells (6 times); rhesus macaque monkey (once); <i>Toxorhynchites amboinensis</i> mosquitoes (twice); primary green monkey kidney cells (once); LLC-MK2 cells (twice); C6/36 (4 times)	pBRUC-139S (derived from pBR322 and pUC19) (<i>E. coli</i>)	Kinney et al. (1997) ^c
DENV2	New Guinea C (New Guinea, 1944)	suckling mouse brain (38 times); C6/36 cells (several times)	pRML2 (yeast artificial chromosome) and pRS424 (yeast- <i>E. coli</i> shuttle vector)	Polo et al. (1997)
DENV2	New Guinea C	suckling mice (24 times); EK cells (5 times); C6/36 (twice) ^d	pWSK29 (<i>E. coli</i>)	Gualano et al. (1998)
DENV1	Western Pacific'74 (Nauru Island, 1974)	Not available	pRS424	Puri et al. (2000)
DENV2	16681	C6/36 (several times; virus obtained from another lab, previous history not informed)	pBluescript II KS (<i>E. coli</i>)	Sriburi et al. (2001)
DENV3	Sleman/78 (Indonesia, 1978)	Vero cells (passage number not informed; virus obtained from another lab, previous history not informed)	pBR322	Blaney et al. (2004a)
DENV2	Tonga/74 (Tonga, 1974)	<i>Aedes albopictus</i> mosquitoes (once); C6/36 cells (passage number not informed)	pBR322	Blaney et al. (2004b)
DENV1	NIID02-20 (Japan, 2002)	Vero cells (passage number not informed)	pMW119 (<i>E. coli</i>)	Tajima et al. (2006)
DENV2	1409 (Jamaica, 1983)	LLC-MK2 cells (once); C6/36 (several times)	pBeloBac11 (BAC)	Pierro et al. (2006)
DENV1	BR/90 (Brazil, 1990)	C6/36 (4 times; virus obtained from another lab, previous history not informed)	pBACDV1poly (derived from pBeloBAC11)	Suzuki et al. (2007)
DENV2	43 (China, 1987)	Not informed	pWSK29	Zhu et al. (2007)
DENV4	341750 (Colombia, 1982)	Mosquito (once; species not informed); primary green monkey cells (5 times); FRhL cells (4 times); PDK cells (20 times); FRhL cells (4 times)	pRS424	Kelly et al. (2010)
DENV2	PL046 (Taiwan, 2008)	C6/36 (passage number not informed)	pRS313 (yeast- <i>E. coli</i> shuttle vector)	Pu et al. (2011)
DENV2	TSV01 (Australia, 1993)	C6/36 cells (5 times)	pACYC177 (<i>E. coli</i>)	Zou et al. (2011)



Strain	Passage history	Plasmid (type)	Reference
SI6803 (Thailand, 1974)	Mosquito (once; species not informed) primary green monkey cells (4 times) PDK cells (50 times); FRhL cells (3 times)	pRS424	Kelly et al. (2011)
95016/BR-PE/02 (Brazil, 2002) New Guinea C	C6/36 cells (3 times)	pSVJS01 (shuttle vector derived from pRS414 and pBeloBAC11) pBeloBAC11	Santos et al. (2013) Usme-Ciro et al. (2014)
BR-3808 (Brazil, 1995)	(passage number not informed) C6/36 cells (3 times); BHK-21 cells (twice)	pSVJS01	Santos et al. (present paper)

a: only articles in English were analysed in PubMed [search terms were: (i) infectious clone, dengue, (ii) cDNA clone, dengue, (iii) full-length clone, dengue]; *b*: full-length clone was obtained from a cDNA library of DENV4 814669; *c*: full-length clones of DENV2 16681 with a different passage history were also constructed. However, only the infectious clone based on the parental virus is cited here; *d*: this is the original passage history cited by Gruenberg et al. (1988), from whom the virus stock was obtained additional passages in C6/36 (derived from larval tissue of *Ae. albopictus* mosquitoes) were performed by Gualano et al. (1998), however the passage number was not informed; BAC: bacterial artificial chromosome; BHK: baby hamster kidney; BS-C-1: grivet monkey kidney; EK: equine kidney; FRhL: foetal rhesus lung; LLC-MK2: rhesus monkey kidney; PDK: primary dog kidney; Vero: African green monkey kidney.

full-length DENV2 clones compared to the other three serotypes, out of the 12 full-length clones found in the literature search performed here, only a few provide the passage history of the virus and only one is reported to have been passaged under five times (Table II). The importance of full-length infectious clones based on low passage viruses is a result of mutations that arise upon sequential passages in biological systems (Lee et al. 1997, Vasilakis et al. 2009), where only low passage viruses most closely resemble the original genotypic and phenotypic features of the parental virus population.

The successful construction of a Brazilian low passage DENV2 full-length clone through homologous recombination reported here supports the use of a strategy that has been shown to be highly useful by our group for the development of flavivirus infectious clones and replicons (Queiroz et al. 2013, Santos et al. 2013).

REFERENCES

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504-507.
- Blaney Jr JE, Hanson CT, Firestone CY, Hanley KA, Murphy BR, Whitehead SS 2004a. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg* 71: 811-821.
- Blaney Jr JE, Hanson CT, Hanley KA, Murphy BR, Whitehead SS 2004b. Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. *BMC Infect Dis* 4: 39.
- Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijckman N, Rice CM, Spaan WJ 2003. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J Gen Virol* 84: 1261-1268.
- Carvalho-Leandro D, Ayres CF, Guedes DR, Suesdek L, Melo-Santos MA, Oliveira CF, Cordeiro MT, Regis LN, Marques ET, Gil LH, Magalhaes T 2012. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. *Acta Trop* 124: 113-119.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM 1990. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649-688.
- Chen R, Vasilakis N 2011. Dengue - quo tu et quo vadis? *Viruses* 3: 1562-1608.
- Gibson DG 2009. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 37: 6984-6990.
- Gruenberg A, Woo WS, Biedrzycka A, Wright PJ 1988. Partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of dengue virus type 2, New Guinea C and PUO-218 strains. *J Gen Virol* 69 6: 1391-1398.
- Gualano RC, Pryor MJ, Cauchi MR, Wright PJ, Davidson AD 1998. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. *J Gen Virol* 79 3: 437-446.
- Horstick O, Martinez E, Guzman MG, Martin JL, Ranzinger SR 2015. WHO dengue case classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. *Pathog Glob Health* 109: 19-25.

- Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E 2014. A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine* 32: 1326-1337.
- Kelly EP, Polo S, Sun W, Falgout B 2011. Evolution of attenuating mutations in dengue-2 strain S16803 PDK50 vaccine and comparison of growth kinetics with parent virus. *Virus Genes* 43: 18-26.
- Kelly EP, Puri B, Sun W, Falgout B 2010. Identification of mutations in a candidate dengue 4 vaccine strain 341750 PDK20 and construction of a full-length cDNA clone of the PDK20 vaccine candidate. *Vaccine* 28: 3030-3037.
- Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapravati N, Gubler DJ 1997. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 230: 300-308.
- Kong YY, Thay CH, Tin TC, Devi S 2006. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods* 138: 123-130.
- Lai CJ, Zhao BT, Hori H, Bray M 1991. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5139-5143.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 545-551.
- Lee E, Weir RC, Dalgarno L 1997. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. *Virology* 232: 281-290.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q, Zdobnov EM, Lobo NF, Campbell KS, Brown SE, Bonaldo MF, Zhu J, Sinkins SP, Hongkham DG, Amedeo P, Arensburger P, Atkinson PW, Bidwell S, Biedler J, Birney E, Bruggner RV, Costas J, Coy MR, Crabtree J, Crawford M, Debruyn B, Decaprio D, Eiglmeier K, Eisenstadt E, El-Dorri H, Gelbart WM, Gomes SL, Hammond M, Hannick LI, Hogan JR, Holmes MH, Jaffe D, Johnston JS, Kennedy RC, Koo H, Kravitz S, Kriventseva EV, Kulp D, Labutti K, Lee E, Li S, Lovin DD, Mao C, Mauceli E, Menck CF, Miller JR, Montgomery P, Mori A, Nascimento AL, Naveira HF, Nusbaum C, O'Leary S, Orvis J, Pertea M, Quesneville H, Reidenbach KR, Rogers YH, Roth CW, Schneider JR, Schatz M, Shumway M, Stanke M, Stinson EO, Tubio JM, Vanzeer JP, Verjovski-Almeida S, Werner D, White O, Wyder S, Zeng Q, Zhao Q, Zhao Y, Hill CA, Raikhel AS, Soares MB, Knudson DL, Lee NH, Galagan J, Salzberg SL, Paulsen IT, Dimopoulos G, Collins FH, Birren B, Fraser-Liggett CM, Severson DW 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316: 1718-1723.
- Pierro DJ, Salazar MI, Beaty BJ, Olson KE 2006. Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. *J Gen Virol* 87: 2263-2268.
- Polo S, Ketner G, Levis R, Falgout B 1997. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J Virol* 71: 5366-5374.
- Pu SY, Wu RH, Yang CC, Jao TM, Tsai MH, Wang JC, Lin HM, Chao YS, Yueh A 2011. Successful propagation of flavivirus infectious cDNAs by a novel method to reduce the cryptic bacterial promoter activity of virus genomes. *J Virol* 85: 2927-2941.
- Puri B, Polo S, Hayes CG, Falgout B 2000. Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific, 74 strain. *Virus Genes* 20: 57-63.
- Queiroz SR, Silva AN, Santos JJ, Marques Jr ET, Bertani GR, Gil LH 2013. Construction of yellow fever virus subgenomic replicons by yeast-based homologous recombination cloning technique. *An Acad Bras Cienc* 85: 159-168.
- Rico-Hesse R 2007. Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis* 44: 1462-1466.
- Ruggli N, Rice CM 1999. Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. *Adv Virus Res* 53: 183-207.
- Santos JJS, Cordeiro MT, Bertani GR, Marques ETA, Gil LHV 2013. Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 983-991.
- Sriburi R, Keelapang P, Duangchinda T, Pruksakorn S, Maneekarn N, Malasit P, Sittisombut N 2001. Construction of infectious dengue 2 virus cDNA clones using high copy number plasmid. *J Virol Methods* 92: 71-82.
- Suzuki R, de Borja L, Duarte dos Santos CN, Mason PW 2007. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. *Virology* 362: 374-383.
- Tajima S, Nukui Y, Ito M, Takasaki T, Kurane I 2006. Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro. *Virus Res* 116: 38-44.
- Usme-Ciro JA, Lopera JA, Enjuanes L, Almazan F, Gallego-Gomez JC 2014. Development of a novel DNA-launched dengue virus type 2 infectious clone assembled in a bacterial artificial chromosome. *Virus Res* 180: 12-22.
- Vasilakis N, Deardorff ER, Kenney JL, Rossi SL, Hanley KA, Weaver SC 2009. Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. *PLoS Pathog* 5: e1000467.
- Zhu W, Qin C, Chen S, Jiang T, Yu M, Yu X, Qin E 2007. Attenuated dengue 2 viruses with deletions in capsid protein derived from an infectious full-length cDNA clone. *Virus Res* 126: 226-232.
- Zou G, Chen YL, Dong H, Lim CC, Yap LJ, Yau YH, Shochat SG, Lescar J, Shi PY 2011. Functional analysis of two cavities in flavivirus NS5 polymerase. *J Biol Chem* 286: 14362-14372.