

JULIA CRISTINA PAIVA BRUNO

AS INTERAÇÕES DO CAPSÍDEO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA COM OS
NUCLÉOLOS DE SEUS HOSPEDEIROS VERTEBRADOS.



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
FEVEREIRO/2022

Trabalho realizado no Departamento de imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Leticia A. M. Carneiro.

FICHA CATALOGRÁFICA

B898i Bruno, Julia Cristina Paiva
As interações do capsídeo do vírus da febre amarela
com o nucléolo de seus hospedeiros vertebrados /
Julia Cristina Paiva Bruno. -- Rio de Janeiro,
2022.
30 f.

Orientador: Leticia de Albuquerque Maranhão
Carneiro.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Imunologia celular. 2. Virologia. 3. Vírus da
febre amarela. 4. Nucléolos. 5. Capsídeo. I.
Carneiro, Leticia de Albuquerque Maranhão, orient.
II. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Julia Cristina Paiva Bruno**
DRE: 118087300

BANCA EXAMINADORA: Profa. Iranaia Assunção Miranda (Presidente)
Dra. Elisa Beatriz Prestes
Prof. Renato Sampaio Carvalho
Prof. Frederico Alisson da Silva (Suplente)

Título da Monografia: **“As interações do capsídeo do vírus da febre amarela
com nucléolos de seus hospedeiros vertebrados”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/urh-rhuk-cya>

Data e hora de início: **25 de fevereiro de 2022 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

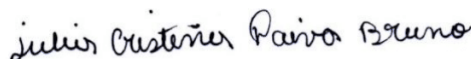
Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
10	Profa. Iranaia Assunção Miranda
10	Dra. Elisa Beatriz Prestes
10 _____	Prof. Renato Sampaio Carvalho
_____	Prof. Frederico Alisson da Silva



Presidente da banca _____

Profa. Iranaia Assunção Miranda



Aluno: _____

Julia Cristina Paiva Bruno



Orientador: _____

Profa. Leticia de Albuquerque Maranhão Carneiro



Coordenador
de TCC _____

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

A todas as mulheres que fazem parte da minha vida. Minha mãe, Cristina Paiva e avó, Maria Paiva, que sempre me deram apoio emocional e incentivo.

À minha orientadora, Letícia Carneiro, que me motiva a cada dia a ser uma pesquisadora melhor e que acredita no meu potencial. Pela paciência e incentivo. Por ter confiado em mim e ter me aceitado em seu laboratório.

À professora Luciana Costa e seu aluno, Gustavo, que sempre me receberam muito bem e sempre estiveram disponíveis a me ajudar quando minha orientadora esteve de licença maternidade.

À minha melhor amiga, Dona Maria, que sempre torceu pelo meu sucesso.

À minha terapeuta, Renata Christian, pelas conversas reconfortantes.

Aos meus queridos irmãos, Luiz Felipe e Fabiano, por terem sido meu combustível nos momentos em que pensei em desistir. Sem vocês, chegar até aqui, não seria possível.

Ao Seu Fernando e dona Rita por me acolherem como filha.

Aos integrantes do grupo de pesquisa da professora Leticia carneiro, que sempre estenderam a mão para me ajudar em todos os momentos em que precisei.

Aos integrantes do laboratório de imunidade e inflamação inata, por sempre se demonstrarem prestativos em me ajudar.

RESUMO

O vírus da febre amarela (YFV) é um arbovírus causador da doença febre amarela que apresenta grande importância para saúde pública por causar epidemias no Brasil e em algumas regiões do mundo. Uma vez dentro das células de seus hospedeiros, a replicação e montagem das partículas virais acontece inteiramente no citoplasma, sem necessitar de intermediários nucleares. No entanto, em estudos anteriores, foi observado que a proteína do capsídeo de YFV (YFV-C) acumula-se de forma significativa nos nucléolos de células humanas infectadas. Posto que a replicação viral ocorre no citoplasma, não há motivos conhecidos para que esse fenômeno aconteça, embora acredite-se que isso esteja envolvido na manipulação de funções celulares na qual favorece a replicação viral. Essas observações levaram a algumas hipóteses para a migração de YFV-C para o nucléolo de células infectadas: (i) A migração ocorre através de interações da proteína viral com proteínas nucleolares localizadas no citoplasma; (ii) devido a presença de motivos proteicos presentes na sequência polipeptídica que permitam o direcionamento do capsídeo para os nucléolos; (iii) a permanência de YFV-C nos nucléolos seja favorecida pela natureza intrinsecamente desordenada (IDR) dessa proteína. Portanto, a partir desses achados, temos como objetivo investigar possíveis motivos proteicos responsáveis pelo acúmulo de YFV-C nos nucléolos de células humanas através de análises de bioinformática. Comparamos as sequências polipeptídicas de quatro flavivírus (Zika vírus, vírus da Dengue sorotipo I, vírus da encefalite japonesa e YFV) e buscamos identificar diferentes motivos proteicos importantes para o direcionamento nucleolar. Após realizadas análises, não identificamos a presença da sequência de direcionamento nucleolar (NoLS), indicando que outro mecanismo seja o responsável pela migração desse capsídeo para o nucléolo das células infectadas.

Palavras-chave: YFV, YFV-C, nucléolo, NoLS e NLS.

ABSTRACT

Yellow fever virus (YFV) is an arbovirus that causes yellow fever disease and is very important to public health because it causes endemic diseases in Brazil and in some regions of the world. When the YFV is inside the cells of their hosts, replication and assembly of viral particles take place in the cytoplasm, there is no need for nuclear intermediates. However, in previous studies, YFV capsid protein (YFV-C) was observed to accumulate in the nucleoli of infected human cells. Since viral replication occurs in the cytoplasm, there are no known reasons for this phenomenon to occur, although it is believed that this is involved in the manipulation of cellular functions which favor viral replication. These observations led to some hypotheses for the migration of YFV-C to the nucleolus of infected cells: (i) Migration occurs through interactions of the viral protein with nucleolar proteins located in the cytoplasm; (ii) due to the presence of protein motifs in the polypeptide sequence that allows the capsid to be directed to the nucleoli; (iii) the permanence of YFV-C in nucleoli is favored by the intrinsically disordered physiology of this protein. Therefore, from these findings, we aim to investigate possible protein motives responsible for the accumulation of YFV-C in the nucleoli of human cells through bioinformatics analyses. We compared the polypeptide sequences of four flaviviruses (Zika virus, dengue virus serotype I, Japanese encephalitis virus, and YFV) and sought to identify different protein motifs important for nucleolar targeting. After analysis, we did not identify the presence of the NoLS sequence, indicating that another mechanism is responsible for the capsid migration to the infected cells nucleolus.

Keywords: YFV, YFV-C, nucleolus, NoLS and NLS.

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

A doença febre afeta diversas pessoas anualmente e é causada pelo agente etiológico vírus da febre amarela que é transmitido por mosquitos durante o repasto sanguíneo. Os vírus são conhecidos como patógenos intracelulares obrigatórios, ou seja, para que eles possam se replicar, necessitam estar dentro de uma célula hospedeira. A célula eucariótica possui duas divisões principais, o citoplasma e o núcleo. O vírus da febre amarela é conhecido por se replicar no citoplasma. Porém, ao realizar a análise das células infectadas, percebemos que uma proteína que faz parte da estrutura do vírus (proteína do capsídeo) foi encontrada dentro da região nuclear, num local denominado nucléolo, que é a uma estrutura importante na produção de ribossomos. Com base nessas informações, o objetivo do nosso trabalho é investigar por que essa proteína está localizada no nucléolo, visto que o seu local de atuação é o citoplasma. Para isso, usamos as ferramentas de bioinformática para identificar regiões importantes que permitem o possível direcionamento da proteína viral para a região nucleolar. Os resultados obtidos indicam que o capsídeo não apresenta sequencias importantes para o direcionamento nucleolar, no entanto foram localizados aminoácidos conservados e motivos proteicos nas sequencias polipeptídicas dos vírus, que são importantes para que sejam transportados para a região nuclear. Portanto, sugere-se que a proteína do capsídeo da febre amarela é importada para o nucléolo por outros mecanismos.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Características gerais do vírus da Febre Amarela.....	1
1.2 Ciclo de transmissão do YFV	1
1.3 Manifestações Clínicas	3
1.4 Estrutura do YFV.....	4
1.5 Proteínas do YFV	4
1.6 Ciclo de replicação do YFV	6
1.7 O nucléolo.....	8
1.7.1 Proteínas virais encontradas no nucléolo	12
2 JUSTIFICATIVA.....	14
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Cultura de células	17
4.2 Infecções virais	17
4.3 Quantificação da replicação viral por ensaio de placa de lise	17
4.3.1 Análise da sequência da sequência proteica de YFV-C.....	18
5. RESULTADOS	20
5.1 Quantificação da replicação viral por ensaio de placa de lise	20
5.2 Análise da sequência proteica de YFV-C.....	21
6. DISCUSSÃO.....	23
7. CONCLUSÕES.....	25
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do vírus da Febre Amarela

O vírus da febre amarela (YFV) é um arbovírus, isto é, vírus transmitido por artrópodes. O YFV pertence ao grupo dos Flavivirus, família Flaviviridae. É o agente etiológico da febre amarela, uma doença aguda, de grande importância para a saúde pública por causar endemias, e eventualmente epidemias, em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais dos continentes africano e sul-americano (Beasley, McAuley e Bente, 2015).

A transmissão do vírus para humanos e primatas não humanos (hospedeiros vertebrados) ocorre através da picada de mosquitos fêmeas hematófagos, dos gêneros *Haemagogus*, *Sabethes* e *Aedes*, sendo esses seus hospedeiros invertebrados (Gardner e Ryman, 2010; Monath e Vasconcelos, 2014). Uma vez dentro de células suscetíveis de seus hospedeiros, o YFV e outros flavivírus, cujo genoma é de RNA fita simples de polaridade positiva (+)ssRNA, realizam a replicação do seu material genético e tradução das suas proteínas inteiramente no citoplasma, sem necessitar de intermediários nucleares (Best, 2016). No entanto, relatos na literatura mostraram que proteínas virais que são essenciais no processo de montagem e replicação do genoma, foram localizadas na região nuclear e nucleolar, sugerindo que a migração dessas proteínas seja importante para replicação dos vírus em seus hospedeiros (Mori *et al.*, 2005; Mourão *et al.*, 2020).

1.2 Ciclo de transmissão do YFV

Acredita-se que a primeira notificação de YFV foi reportada no século XV, em San Diego, Estados Unidos da América, baseado nos sintomas clínicos da doença relatados que foram os mesmos que conhecemos na contemporaneidade (Scott, 1939 apud Barret e Monath, 2003). Dados filogenéticos indicam que o vírus surgiu no continente africano, tendo o seu espalhamento para as Américas durante o período de deslocamento de navios negreiros que transportavam pessoas escravizadas e o vetor, o *Aedes aegypti* (Barret e Monath, 2003; Litvoc, Novaes e Lopes, 2018). Assim, YFV é predominantemente encontrado em regiões endêmicas da África e América do Sul, posto que o clima desses ambientes tende a favorecer a reprodução e circulação do vetor (Monath, 2001; Monath e Vasconcelos, 2015; Hamrick *et al.*, 2017).

Embora, atualmente, exista uma vacina eficaz contra o vírus da febre amarela, obtida a partir de uma cepa atenuada (17D), e desenvolvida por Theiler e colaboradores, na fundação Rockefeller, em 1936. (Theiler *et al.*, 1937; Monath, 2005), ainda se

testemunha eclosões da atividade de YFV em regiões endêmicas. Trata-se de uma doença epizootica, com múltiplos animais de uma mesma região geográfica sendo afetados, o que torna difícil a erradicação do vírus em todo o mundo (Goldani, 2017; Bifani, Ong e Alwis, 2020).

A transmissão do YFV se mantém entre hospedeiros primatas não-humanos selvagens e mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* na América, e *Aedes*, na África. Esses vetores são comumente encontrados em regiões de mata, sendo esta forma de transmissão classificada como ciclo silvestre (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003; Gardner e Ryman, 2010). No entanto, humanos acabam participando desse ciclo de transmissão ao adentrarem em regiões com foco de mosquitos contaminados e, conseqüentemente, sendo infectados de forma acidental (Klitting, Paupy e Lamballerie, 2018).

No ciclo silvestre, os primatas não humanos servem de reservatório para o vírus realizar sua replicação e ser mantido na natureza. (Tomori, 1999; Barrett e Monath, 2003).

Além disso, o homem pode ser infectado quando há migração desses artrópodes para os centros urbanos em decorrência do desmatamento, caracterizando o ciclo urbano (Tomori, 1999; Barrett e Monath, 2003; Barrett e Higgs, 2007). No ciclo urbano a transmissão ocorre entre hospedeiros humanos, no qual o mosquito infecta-se após a picada, e subseqüentemente transmite para outro humano durante o repasto sanguíneo. Diferentemente do ciclo silvestre, o vetor responsável pela transmissão do YFV, no ciclo urbano, é o mosquito da espécie *A. aegypti* (Gardner e Ryman, 2010). Dessa forma, a transmissão para humanos, nas Américas, ocorre de duas maneiras: através do ciclo silvestre e urbano (Gardner e Ryman, 2010).

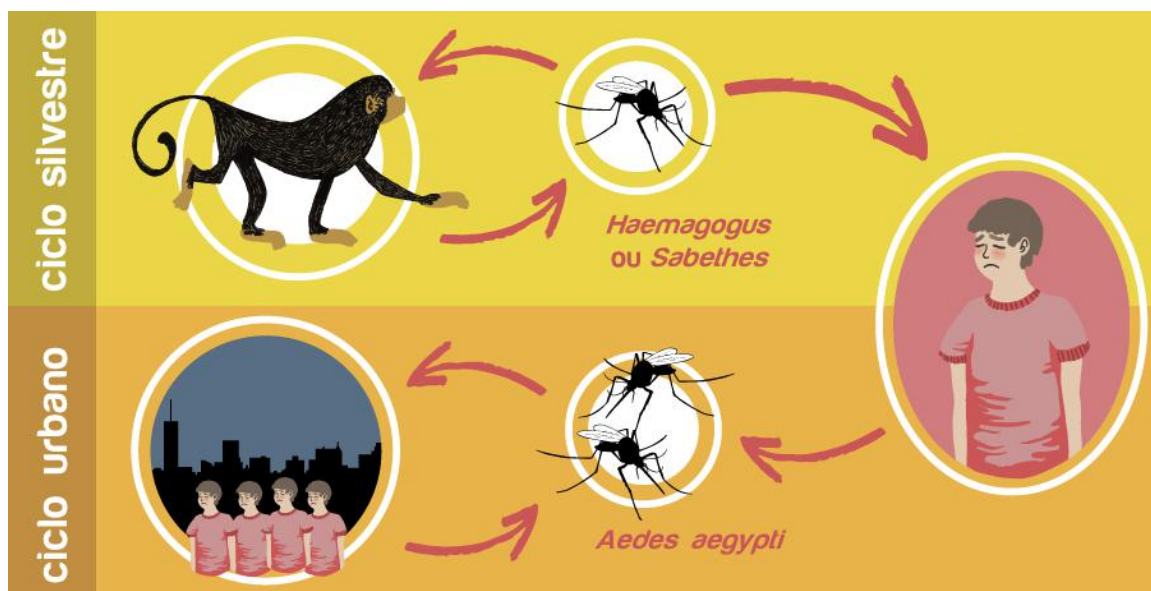


Figura 1 - Ciclo de transmissão do vírus da febre amarela. (i) Ciclo Silvestre: a transmissão é realizada por mosquitos que habitam regiões de matas e florestas (*Haemagogus* ou *Sabethes*) sendo o hospedeiro vertebrado deste ciclo primata não-humanos. (ii) Ciclo urbano. Mosquitos *Aedes aegypti*, durante o repasto sanguíneo transmite o vírus para primatas humanos, nos centros urbanos. Retirado de: <https://www.comciencia.br/tira-duvidas-febre-amarela/>

1.3 Manifestações Clínicas

A febre amarela apresenta aspectos clínicos variados que podem ser desde uma infecção assintomática, sintomas leves ou, nos casos mais graves, febre hemorrágica que pode levar o indivíduo ao óbito (Monath, 2001).

Indivíduos infectados que desenvolvem sintomatologia, geralmente, apresentam um período de incubação entre 3-6 dias (Monath, 2001; CDC, 2019). No começo da infecção (1º estágio) nota-se uma evolução relativamente rápida, com quadros clínicos caracterizados por febre, calafrios, mal-estar, dor de cabeça, dor lombar, mialgia, náusea e tontura (Monath, 2001). Nos que desenvolvem a febre amarela leve e abortiva, os sintomas da infecção são particularmente inespecíficos podendo ser confundidos com um típico resfriado e, normalmente, os pacientes manifestam febre e dor de cabeça. A recuperação acontece em poucos dias sem deixar sequelas (Gardner e Ryman, 2010). Após um tempo, o paciente progride para o período de remissão (2º estágio) sendo esta uma fase de recuperação para grande maioria dos indivíduos infectados. Contudo, alguns ainda podem evoluir para a forma grave da doença (3º estágio), onde as manifestações clínicas se apresentam como icterícia, hemorragias e, em alguns casos,

falência de múltiplos órgãos. Por esta razão, esta fase é nomeada fase de intoxicação (Gardner e Ryman, 2010; Lopes *et al.*, 2019).

1.4 Estrutura do YFV

Partículas de YFV têm um tamanho relativamente pequeno (40nm), possuem simetria icosaédrica, sendo esta estrutura composta por proteínas do capsídeo, envoltas por uma bicamada lipídica, oriunda da membrana das células hospedeiras (Gardner e Ryman, 2010). Essas proteínas formam o complexo de nucleocapsídeo, que é fundamental para o empacotamento do genoma em partículas virais maduras (Arakawa e Morita, 2019). Além disso, outras proteínas também fazem parte da estrutura do vírus, como os dímeros de glicoproteínas do envelope (E) que estão presentes na superfície do vírion juntamente da proteína de membrana (M) (Gardner e Ryman, 2010; Douam e Ploss, 2018).

O YFV apresenta material genético de RNA fita simples, polaridade positiva, com um tamanho aproximado de 11.000 pares de bases. Na extremidade 5' de seu genoma, encontra-se o cap tipo I (m7GpppAmp), seguido por um nucleotídeo AG conservado. No terminal 3' notase a ausência de cauda poli-A (Gardner e Ryman, 2010; Beasley, McAuley e Bente, 2015). O genoma deste vírus apresenta apenas um quadro de leitura aberto que é responsável por codificar uma grande cadeia de poliproteína de 3.400 aminoácidos, que são divididas em proteínas estruturais (C, proteína precursora de M (prM) e a E), que estão envolvidas na formação das novas partículas virais, e proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Best *et al.*, 2015; Douam e Ploss, 2018).

1.5 Proteínas do YFV

Após a tradução, a poliproteína viral é clivada em três proteínas estruturais: (C, proteína precursora de M (prM) e a E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Gardner e Ryman, 2010) (Figura1).

A proteína C, na região do N-terminal, apresenta uma grande quantidade de aminoácidos básicos e tende a fazer interações com ácidos nucleicos. Na região C-terminal, atua como um peptídeo-sinal para a translocação de prM no retículo endoplasmático (Patkar *et al.*, 2007; Lindenbach *et al.*, 2013). Além disso, quando associada a membrana do retículo endoplasmático, realiza o empacotamento do

material genético viral, formando uma estrutura conhecida como nucleocapsídeo (Beasley, McAuley e Bente 2015).

As partículas virais, enquanto imaturas, possuem o precursor da proteína M (prM) que será clivado por atividade proteolítica durante a maturação das partículas virais, a fim de produzir a proteína M (Gardner e Ryman, 2010; Beasley, McAuley e Bente 2015). A prM tem a função de impedir o rearranjo da proteína E, evitando que essa sofra fusão através de catálise durante a transição dos vírions pela via secretora (Lindenbach *et al.*, 2013).

A glicoproteína E se localiza na superfície dos vírions. Sua principal função é promover a fusão da partícula viral com a membrana citoplasmática, para que seja internalizada e exportada durante a biossíntese viral (Modis *et al.*, 2004; Roby *et al.*, 2015), é alvo antigênico para o desenvolvimento da imunidade humoral neutralizante, bem como na produção de vacinas (Lei *et al.*, 2015).

A proteína não estrutural NS1 está associada com a patogênese e virulência viral, um exemplo seria a sua capacidade de inibir a atividade da cascata do complemento (Conde *et al.*, 2017). Acredita-se que os polipeptídeos, NS2A e NS2B, auxiliam na montagem do complexo de replicação viral (Lindenbach *et al.*, 2013). A proteína não estrutural NS3 atua como RNA helicase, como nucleotídeo-trifosfatase (NTPase), e, juntamente da NS2B, também atua como protease clivando a poliproteína viral em proteínas individuais (Werrener, Tamura e Collett, 1993; Xing *et al.*, 2019; Voss e Nitsche, 2020).

As proteínas, NS4A e NS4B, apresentam carácter hidrofóbico que, possivelmente, tem envolvimento com a replicação do genoma viral (Lindenbach *et al.*, 2013). A proteína não estrutural NS5 atua como RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), promovendo a replicação do material genético viral (Guyatt, Westaway e Khromykh, 2001).

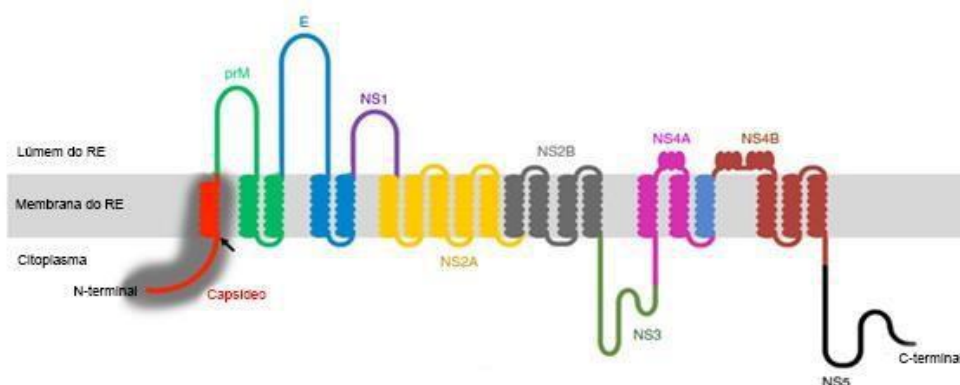


Figura 2 - Representação esquemática da poliproteína de flavivírus associada à membrana do retículo endoplasmático. Adaptado de Tan *et al.*, 2020

1.6 Ciclo de replicação do YFV

Após hospedeiros vertebrados serem contaminados com o vírus, através da picada do mosquito infectado, o YFV infecta inicialmente células dendríticas (DCs) no tecido subcutâneo e, em seguida, migra para os nódulos linfáticos, que serão o locais de replicação do vírus e onde a resposta imune celular é iniciada (Monath, 2008). Após este processo, partículas virais são inoculadas na corrente sanguínea pelos canais linfáticos tendo seu espalhamento para os linfonodos regionais (Lopes *et al.*, 2019). Posteriormente, ao deixar os gânglios linfáticos o vírus infecta e realiza sua replicação em órgãos alvo como fígado, baço, coração e rins (Monath, 2001; Lopes *et al.*, 2019).

Os receptores envolvidos na adsorção do vírus às diferentes células ainda não estão completamente elucidados. No entanto, acredita-se que a molécula heparan sulfato de glicosaminoglicano, presente na superfície de células como hepatócitos e DCs, tem grande importância para o percurso da infecção uma vez que a interação entre a proteína glicoproteína viral e esta proteína de superfície facilita a ligação do vírus com receptores específicos da célula hospedeira, permitindo a sua internalização (Germi *et al.*, 2002; Douam e Ploss, 2018). A ligação da proteína E a esses receptores promove o início do processo de internalização da partícula viral, realizada pela via de endocitose mediadas por vesículas revestidas de clatrina, que são direcionadas ao endossomo (Laureti *et al.*, 2018).

A acidificação no interior do endossomo resultará em mudanças conformacionais na glicoproteína E que, conseqüentemente, levará à fusão do envelope lipídico viral com a membrana endossomal, seguida pela liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (Douam e Ploss, 2018; Laureti *et al.*, 2018).

O genoma viral liberado no citoplasma da célula tem a sua tradução iniciada, sendo esse processo realizado pela maquinaria celular. Nesta etapa é gerada uma poliproteína que, posteriormente, com auxílio de peptidases celulares, juntamente com proteases virais, como NS2B e NS3, será processada na membrana do retículo endoplasmático, dando origem às proteínas estruturais e não estruturais (Chambers, Nestorowicz e Rice, 1995; Arakawa e Morita, 2019). Enquanto a tradução e processamento da poliproteína está sendo realizado, as proteínas estruturais recém-sintetizadas se ancoram à membrana do retículo endoplasmático, que será o local de montagem da partícula viral (Welsch *et al.*, 2009; Mukhopadhyay, Kuhn e Rossmann, 2005).

O mesmo RNA que foi previamente traduzido em proteínas é utilizado como molde para a síntese das novas fitas do genoma viral. Este processo ocorre em associação com estruturas de membrana intracelular induzida pelo próprio vírus, denominadas complexo de replicação (CR), apontados como estruturas que inibem a detecção do intermediário da replicação viral (fita de RNA negativa) contra os sensores celulares. (Welsch *et al.*, 2009; Wolff *et al.*, 2020). A formação desse microambiente permite que o intermediário da replicação, isto é, a fita dupla de RNA (dsRNA) não seja facilmente detectado pelo sistema imune do hospedeiro, permitindo, portanto, uma replicação viral eficiente (Welsch *et al.*, 2009).

As novas fitas do genoma recém-sintetizado apresentam uma grande afinidade pela proteína C, devido ao caráter básico dessa proteína, e com isso haverá uma associação destas duas moléculas, formando o nucleocapsídeo. Realizada a montagem dos novos vírions, estes serão direcionados para a secretora do hospedeiro, tendo a sua liberação na superfície das células (Figura 2) (Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach *et al.*, 2013).

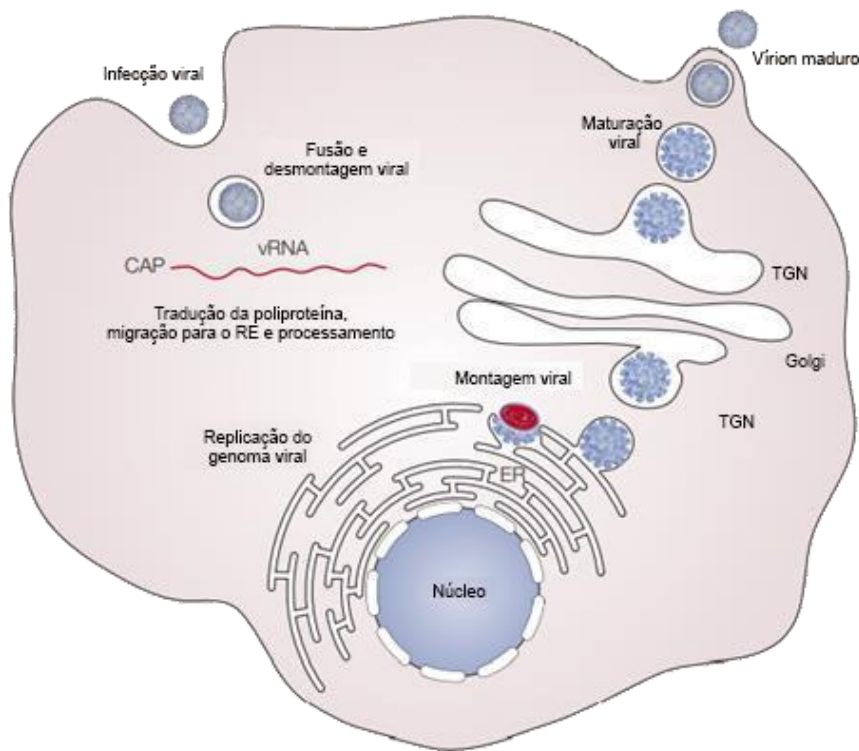


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de replicação dos flavivírus. Adaptado de Mukhopadhyay, Kuhn e Rossmann, 2005.

1.7 O nucléolo

Células eucarióticas apresentam mecanismos diversos que são primordiais para reestabelecer a homeostase quando ocorre um desequilíbrio celular. Nesse contexto, os corpos nucleares (NBs), que são estruturas não envoltas por membranas presentes nos núcleos destas células, estão relacionados com diversas funções, desde resposta ao estresse celular até o metabolismo nuclear (Stanek e Fox, 2017).

O nucléolo, um corpo nuclear, cuja função canônica é a biogênese dos ribossomos, forma-se através da separação de fases no núcleo (Iarovaia *et al.*, 2019). Heitz em 1931, após observar a semelhança entre o tamanho e a quantidade de constrições secundárias presentes nos cromossomos acrocêntricos, com o tamanho e quantidade de nucléolos, descreveu a localização desta organela (Stanek e Fox, 2017). Por ser esta região o local de formação desse corpo nuclear, passou a ser conhecida como região organizadora de nucléolo (NOR) (Figura 3) (Heitz, 1931 apud Shaw e Jordan, 1995).

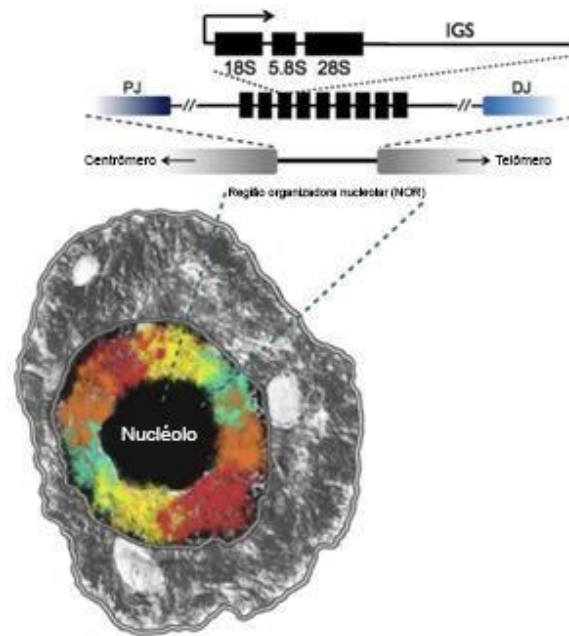


Figura 3: Localização da Região Organizadora do Nucléolo (NOR) e do rDNA. O nucléolo forma-se na região em que está localizada a fita de rDNA, que se encontra entre os telômeros e centrômeros dos cromossomos acrocêntricos. Na parte superior da figura encontram-se as junções proximais (PJ) e distal (DJ) simbolizando a ligação da matriz de rDNA à região genômica vizinha. Na parte inferior da figura encontra-se o nucléolo próximo à matriz de rDNA. Adaptado de Cirqueira e Lemos, 2020.

Por ser o sítio de produção e montagem das partículas ribossomais, nota-se nesta região, a presença dos genes de DNA ribossomal agrupados em repetições in tandem. A transcrição destes genes é realizada pela RNA polimerase I (RNA pol I) gerando o precursor RNA 47S. Este, posteriormente, será clivado em rRNAs 28S, 18S e 5.8S maduros que serão modificados por ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs) e fatores de processamento de proteínas adicionais. E, por fim, tem-se as subunidades ribossomais que serão exportadas para o citoplasma (Boisvert *et al.*, 2007).

No entanto, esta organela não participa somente da produção das partículas ribossomais, mas também de outros processos celulares. Por exemplo, atua na exportação ou degradação de mRNA, biossíntese da partícula de reconhecimento de sinal (SRP), biossíntese de alguns snRNAs e tRNAs e sequestro de proteínas regulatórias (Olson, Hingorani e Szebeni, 2002; Gerbi, Borovjagin e Lange, 2003; Olson e Dunder, 2005; Mekhail *et al.*, 2020). Durante a divisão celular existem mecanismos que modulam a célula, sobretudo o núcleo, para que as informações genéticas sejam passadas para as células-filha. Por conseguinte, o material genético sofre uma

remodelação, adotando uma conformação extremamente condensada. Nesta etapa do ciclo celular, o nucléolo também é submetido a diversas alterações, logo, dependendo da fase do ciclo celular em que a célula se encontra, proteínas nucleolares poderão ser encontradas em outros locais da célula, como citoplasma (Boisvert *et al.*, 2007). O nucléolo é uma organela dinâmica, devido à sua composição e ausência de uma membrana, o que viabiliza que o proteoma e o tamanho do nucléolo sejam facilmente modulados frente à uma resposta celular (Stenstrom *et al.*, 2020).

Devido à tensão superficial criada a partir do aglomerado de macromoléculas gera-se diferentes fases líquidas, fazendo com que o nucléolo, em humanos, seja subdividido em três regiões denominadas como: centros fibrilares (FCs), componentes fibrilares densos (DFCs) e componentes granulares (GCs), sendo cada uma destas importante para as etapas de produção das partículas ribossômicas. (Thiry e Lafontaine, 2005; Boisvert *et al.*, 2007; Lafontaine *et al.*, 2020).

Em cada sub-região nucleolar encontram-se moléculas específicas que, conseqüentemente, ditam a sequência de eventos realizados para a formação das subunidades ribossomais, logo, a composição bioquímica também difere; por exemplo: as etapas iniciais de formação de ribossomos, isto é, a transcrição do rDNA, ocorrem na periferia, entre o centro fibrilar e o componente fibrilar denso, e por isso, neste local observa-se a presença de fatores de transcrição, como o fator de ligação a montante (UBF), a RNA Pol I e o DNA topoisomerase I (Huang, 2002; Thiry e Lafontaine, 2005).

Quando o rDNA começa a ser transcrito pela RNA pol I, surgem os pré-RNA 47S. Ao mesmo tempo, os recém-transcritos, na região do componente fibrilar denso, são subsequentemente processados e modificados pela ação de snoRNAs e proteínas não ribossomais, com a finalidade de formar os rRNAs 28S, 18S e 5.8S maduros (Boisvert *et al.*, 2007; Lafontaine, 2019). Assim, uma vez que estes RNAs maduros passam para a região do componente granular, são realizadas as etapas de montagem das subunidades ribossomais, seguido de sua exportação para o citoplasma (Figura 4) (Tschochner e Hurt, 2003; Lafontaine *et al.*, 2020).

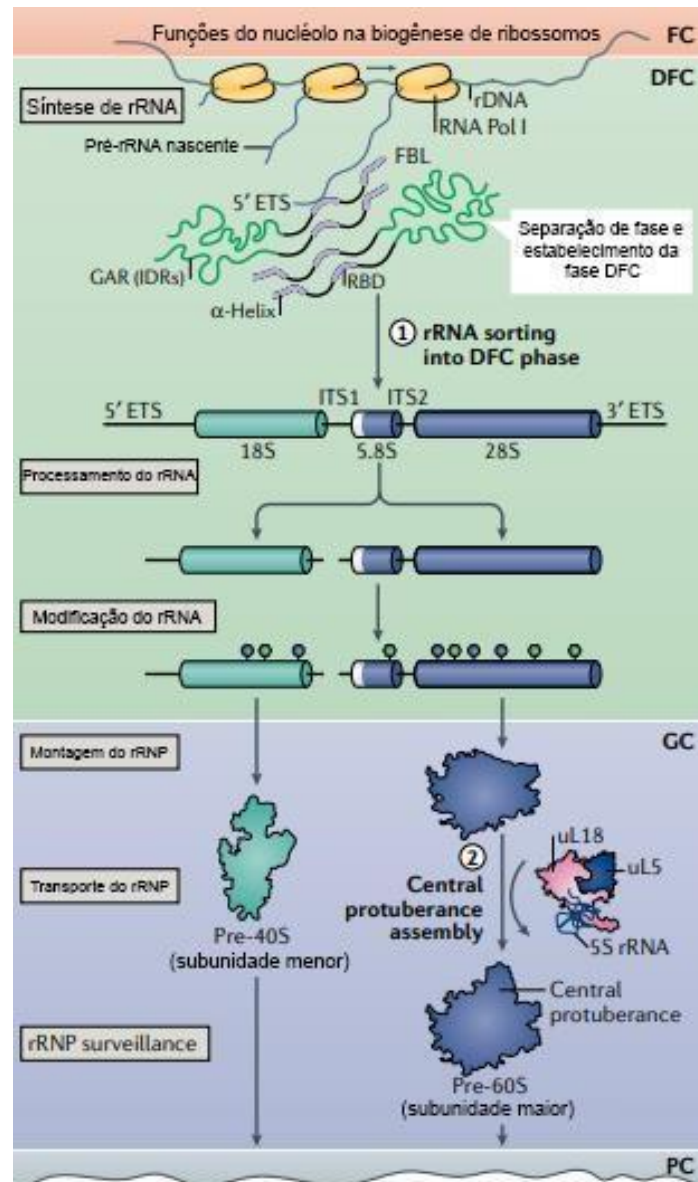


Figura 4 - Envolvimento do nucléolo e suas respectivas sub-regiões na biogênese dos ribossomos. A primeira parte mostra o centro fibrilar (FC) local em que ocorre a síntese de rRNA. Em verde indica a dos componentes fibrilares densos (DFC) local que em que ocorre o processamento do rRNA e modificação do mesmo. Por último, em azul, tem o componente granular que é onde será montado as subunidades ribossômicas. Adaptado de Lafontaine *et al.*, 2020.

Em virtude da plurifuncionalidade do nucléolo, não é surpreendente que alguns microrganismos, sobretudo vírus, tenham adquirido mecanismos para manipulação deste compartimento subnuclear, a fim de facilitar a infecção (Hiscox *et al.*, 2001; Timani *et al.*, 2005; Hiscox, 2007; Jans e Martin, 2018).

1.7.1 Proteínas virais encontradas no nucléolo

Patógenos, ao longo da evolução, desenvolveram estratégias que os permitem evadir as defesas imunitárias de seus hospedeiros, conseqüentemente, impactando na sua replicação e sobrevivência, de forma a beneficiá-los (Goldmann e Medina, 2018; Patro, 2019) Estratégias como intervenção na regulação gênica em nível da cromatina e modificação de proteínas do hospedeiro a partir dos produtos gênicos gerados por estes microrganismos, são duas das diversas formas que patógenos manipulam as vias de detecção e sinalização celular. Assim, a modulação da expressão de ativadores e repressores da imunidade inata facilita o estabelecimento da infecção (Salvetti e Greco, 2013; Zhang e Cao, 2019; Mourão *et al.*, 2020).

Relatos na literatura demonstraram que diferentes vírus, com diferentes estratégias de replicação, possuem propriedades de manipulação do nucléolo (Rowland *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2016). Vírus de RNA, como os do gênero Flavivírus, tem a síntese de proteínas e montagem das partículas realizada no citoplasma da célula infectada e, dessa forma, não existe nenhuma razão evidente para que suas proteínas se desloquem para a região nuclear e/ou nucleolar. No entanto, acredita-se esse mecanismo esteja correlacionado com funções ações que interfiram com o funcionamento da célula hospedeira (Yoo *et al.*, 2003; Belin *et al.*, 2010).

Fraser e colaboradores (2016), demonstraram que, embora a NS5 de DENV, um flavivírus, seja crucial para a replicação do vírus no citoplasma da célula hospedeira, durante a replicação viral, em resposta a variação de pH, foi encontrada co-localizando com o nucléolo das células infectadas sendo, provavelmente, um mecanismo importante para manipulação das respostas antivirais (Fraser *et al.*, 2016).

Em um estudo japonês, observou-se que o capsídeo do vírus da encefalite japonesa (JEV) foi encontrado tanto no citoplasma quanto nos nucléolos de células de mamíferos e mosquitos infectadas, indicando que a translocação dessa proteína seja importante na manutenção da replicação do vírus em seus hospedeiros (Mori *et al.*, 2005).

O trabalho de Timani e colaboradores revelou que o a proteína do nucleocapsídeo do coronavírus, causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS), possui um motivo proteico na região do C-terminal importante para permitir a migração e acúmulo da proteína viral nos nucléolos de células infectadas. Além disso, acredita-se que esse mecanismo de importação da proteína viral para região nucleolar possa ter envolvimento com a regulação do ciclo celular supostamente retardando esse evento para promover condições de replicação favorável para o vírus, no sequestro de

ribossomos para tradução de proteínas virais bem como na modulação das funções nucleolares (Timani *et al.*, 2005).

No trabalho de Miyamoto e colaboradores (2022), realizado no Japão, foi retratado que a ribonucleoproteína (NP) do vírus Influenza A, no início da infecção, localiza-se no nucléolo das células infectadas. Uma vez que o direcionamento da proteína para o nucléolo é bloqueado, bem como a desmontagem do nucléolo induzido, a formação do complexo ribonucleoproteína é prejudicada. Além disso, a transcrição e replicação do genoma viral são notavelmente reduzidas. No entanto, como esse vírus realiza replicação na região nuclear da célula infectada, localizar a proteína viral nesse compartimento faz mais sentido do que os vírus que têm como sítio primário de replicação o citoplasma (Miyamoto *et al.*, 2022). Apesar disso, o nucléolo, mais uma vez, mostra-se extremamente relevante importante para a replicação viral (Miyamoto *et al.*, 2022).

2 JUSTIFICATIVA

YFV é de grande importância para a saúde pública por causar epidemias no Brasil e no mundo. Estudos conduzidos pelo nosso grupo (dados ainda não publicados), mostraram o acúmulo de YFV-C nos nucléolos de células humanas (Figura 7). No entanto, vírus (+)ssRNA, como YFV, realizam a replicação e montagem de proteínas na região do citoplasma de células infectadas (Arakawa e Morita, 2019). Deste modo, não haveria motivos para que as proteínas virais sejam encontradas nos nucléolos e núcleos de seus hospedeiros, uma vez que a presença da proteína C no citoplasma da célula é importante para que haja a formação das progênies virais.

O nucléolo, assim como outros grânulos celulares sem membrana, são estruturas altamente dinâmicas formadas a partir da separação de fases líquido-líquido, devido a grande quantidade de proteínas intrinsecamente desordenadas (IDPs) presentes que, quando em solução, promovem a separação de fases (Uversky, 2017).

Há três hipóteses que possam explicar o direcionamento de YFV-C para os nucléolos: (i) a migração ocorre através de interações da proteína viral com proteínas nucleolares localizadas no citoplasma, como nucleolina; (ii) devido a presença de motivos proteicos presentes na sequência polipeptídica que permitam o direcionamento do capsídeo para os nucléolos; (iii) a permanência de YFV-C nos nucléolos seja favorecida pela natureza intrinsecamente desordenada (IDR) dessa proteína (Martins e Santos, 2020). Com isso, esse mecanismo pode estar associado com a modulação de funções cruciais da célula infectada, como a biossíntese, a fim de favorecer a replicação do vírus.

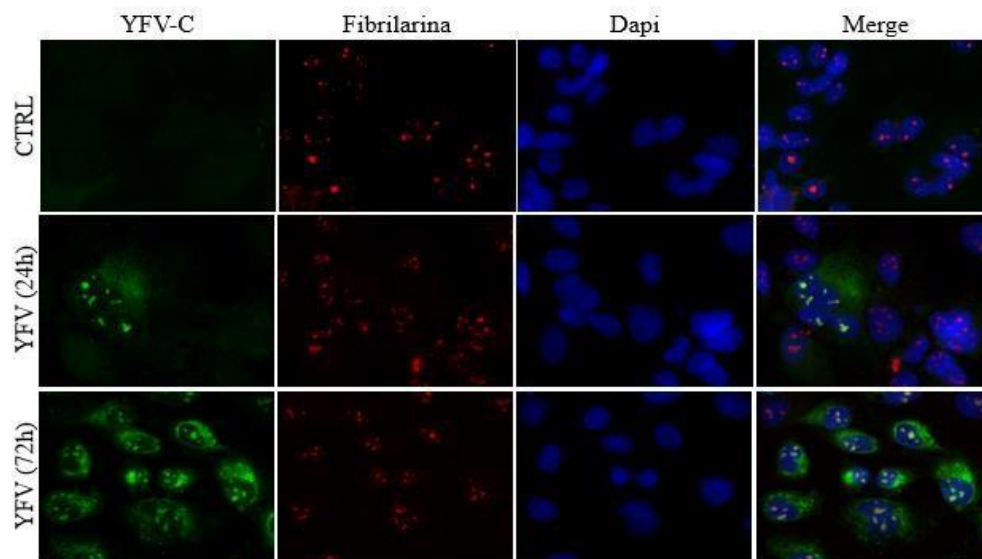


Figura 5: Microscopia de imunofluorescência para proteína do Capsídeo do YFV e para proteína fibrilarina. Células Huh-7 foram infectadas com uma MOI de 1, as células foram fixadas e devidamente permeabilizadas para subsequente incubação com anticorpos primários anti-ptn C (verde), anti a proteína nucleolar fibrilarina (vermelho) e Ácido nucleico (azul) foi marcado com Dapi.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Nesse primeiro momento, buscamos analisar as sequências proteicas dos capsídeos de diferentes flavivírus, sobretudo de YFV que, futuramente servirão como base para um projeto que busca elucidar os requerimentos moleculares necessários para a migração de YFV-C para os nucléolos de seus hospedeiros vertebrados.

3.2 Objetivos específicos

Identificar motivos de importação nucleolar na sequência proteica

Correlacionar a estrutura da proteína C com possíveis requerimentos moleculares para a importação nucleolar

Avaliar o título de replicação de YVF em células Huh-7

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

Foram cultivadas células de hepatocarcinoma humano (Huh-7) que são suscetíveis para YFV, em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (v/v), 10.000 U/ml penicilina e 10.000 µg/ml estreptomicina (1% v/v solução penicilina/estreptomicina). As células foram armazenadas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂.

4.2 Infecções virais

As células foram cultivadas na placa de 24 poços (Nest) em uma concentração de 4x10⁴ células/poço, em meio DMEM com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (v/v), 10.000 U/ml penicilina e 10.000 µg/ml estreptomicina (1% v/v solução penicilina/estreptomicina). Em seguida, armazenadas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂.

Posteriormente, as células foram infectadas com YFV (17D) com MOI de 1, em meio DMEM com um volume de 200µl por poço, e armazenada a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂, durante 1h30min. Ao término da infecção, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80, nos outros poços, o sobrenadante de 0 horas pós infecção (hpi) foi coletado, e os outros poços tiveram o meio desprezado e substituído por meio DMEM suplementado. A infecção foi acompanhada por um período de 72h p.i.

4.3 Quantificação da replicação viral por ensaio de placa de lise

A quantificação das partículas infecciosas presentes nas amostras foi realizada por ensaio de placa de lise em células PS (*porcine stable cells*). Foram plaqueados 1x10⁶ células na placa de 24 poços, contendo meio DMEM com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (v/v), 10.000 U/ml penicilina e 10.000 µg/ml estreptomicina (1% v/v solução penicilina/estreptomicina). Em seguida, armazenadas a 37°C em estufa suplementada 5% de CO₂, até que a placa atingisse uma monocamada de 80-90% de confluência. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas do meio de cultura condicionado das células infectadas. Depois, as células foram armazenadas estufa incubadora com 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura foi trocado por um meio semi-sólido (carboximetil celulose 1%, p/v) suplementado com

SFB 10% (v/v) e as células foram mantidas em estufa a 37°C e suplementada com 5% de CO₂, durante 4 dias. Após este período, as células foram fixadas com uma solução de formaldeído 10% (v/v), em temperatura ambiente, por pelo menos 1 hora. Após lavagens das placas com água corrente, os plaques formados foram visualizados por coloração com uma solução cristal violeta 1% e etanol 20%. O cristal violeta foi removido e, a placa foi novamente lavada em água corrente. Em seguida, foram contados o número de plaque das duas últimas diluições e, depois, calculado o número de unidades formadoras de placas de lise (PFU) por ml. Após serem calculados, os resultados foram organizados através dos softwares GraphPad Prism.

Para quantificação de partículas virais intracelulares, utilizamos o programa CellQuest do BD FACSCalibur™ onde foram feitas as análises citofluoriméticas através do *software* FlowJo. Nós utilizamos os anticorpos primários anti-Dengue Complex (D3-2H2-9-21 MSDS) para marcar proteína E de YFV devido as semelhanças apresentadas entre as proteínas desses vírus, diluído a 1:1000.

4.3.1 Análise da sequência da sequência proteica de YFV-C

Foi feito o *download* da sequência polipeptídica do capsídeo de quatro flavivírus diferentes (Dengue sorotipo I, Zika vírus, YFV e vírus da encefalite japonesa) no banco de dados Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Após as sequências serem baixadas, foram agrupadas em um arquivo FASTA. O alinhamento foi realizado utilizando o *software* MegaX versão 11 e a ferramenta ClustalW. Nós separamos 4 artigos que se mostraram relevantes para o nosso objetivo (Rowland *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2010; Fraser *et al.*, 2016 e Mori *et al.*, 2005). O trabalho de Rowland e colaboradores evidencia as 3 sequências envolvidas na importação de proteínas para o núcleo (NLS). A primeira sequência é denominada como “pat4” em que corresponde a um motivo que consiste 3 a 4 aminoácidos básicos (Lisina e/ou Arginina) ou 3 aminoácidos básicos associados de uma prolina ou histidina. A segunda, “pat 7” refere-se a uma sequência que inicia com uma prolina, seguido de 3 aminoácidos básicos dentro de 4 aminoácidos da sequência. A última é conhecida como “motivo bipartido” e corresponde a 2 aminoácidos básicos, um espaço de 10 aminoácidos e um seguimento de 5 aminoácidos contendo pelo menos 3 aminoácidos básicos (Rowland *et al.*, 1999). Enquanto, no trabalho de Scott e colaboradores, foram reunidos 46 sequencias de importação nucleolar (NoLS) descritas na literatura (Scott *et al.*, 2010). O trabalho de Fraser e colaboradores mostrou que a proteína NS5 de DENV, possui uma sequência

conhecida como *The minimal pHsensitive nucleolar targeting region* (pHNTR), que em resposta a acidificação do meio extracelular, favorece o acúmulo da proteína viral no nucléolo de seus hospedeiros vertebrados. Para que uma proteína possa ser considerada com as mesmas funções, ela necessita apresentar uma região com o aminoácido Leucina, seguida de qualquer resíduo hidrofóbico (Φ), seguido de uma asparagina e prolina [L(Φ /N)(V/L)]. Ou então é necessário que ela apresente duas argininas críticas, seguida de uma isoleucina, 3 qualquer aminoácido e uma arginina menos crítica [RR(I/L)X3r] (Fraser *et al.*, 2016). O trabalho de Mori e colaboradores revelou a importância dos aminoácidos glicina e prolina nas respectivas posições, 42 e 43, para a migração da proteína do capsídeo do vírus da encefalite japonesa (JEV) e sua infecciosidade. Portanto, comparamos as sequências do nosso trabalho com as descritas nos trabalhos dos autores supracitados.

5. RESULTADOS

5.1 Quantificação da replicação viral por ensaio de placa de lise

A fim de determinar a curva de infecção do YFV na linhagem Huh7 em nosso laboratório, iniciamos realizando um ensaio de replicação viral de YFV e quantificação por ensaio de plaque.

Após 24h p.i foi observada um título viral de 10^5 UFP nas células Huh-7. Após o período de 72h p.i foi observado o título viral de aproximadamente 10^6 UFP (Figura 6). Esse resultado mostra que há replicação de YFV-C nas células de carcinoma de hepatócitos humanos.

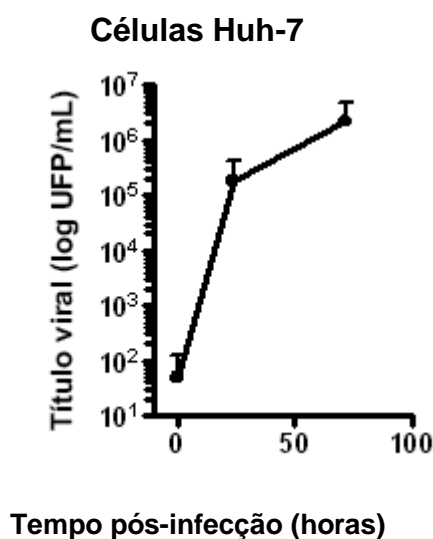


Figura 6: Curva da infecção por YFV nas células Huh-7. Células Huh-7 foram infectadas com YFV com uma MOI de 1. O sobrenadante foi coletado nos tempos 0, 24 e 72h p.i e o título viral quantificado por ensaio de placa de lise em células PS.

O resultado obtido no *Dotplot* mostra que as células infectadas apresentaram tamanho (eixo X) e granulosidade (eixo Y) normal. No controle negativo de anticorpos (IgG) o percentual de células infectadas foi de 2,84%. No tempo de 24h p.i, o percentual de células infectadas foi de 22,1% (Figura 7).

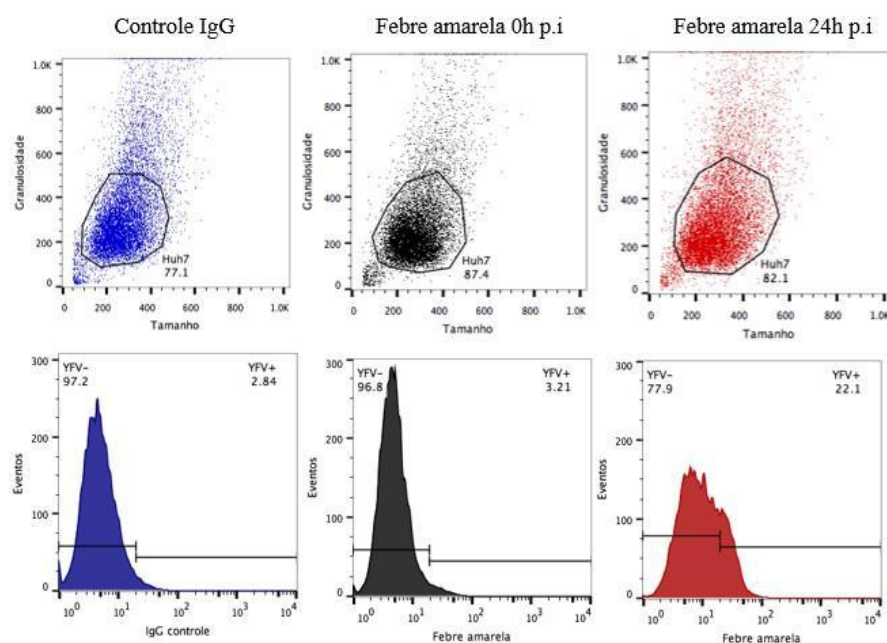


Figura 7: Análise citofotométrica das células Huh-7 infectadas com YFV de uma MOI de 1. O sobrenadante foi coletado no tempo de 0 e 24h.p.i. *Dotplot* mostra o tamanho (eixo X) e granularidade (eixo Y). Histograma de marcação de YFV-E. Eixo X – intensidade de fluorescência em log. Eixo Y – Número de anti-YFV-E⁺.

5.2 Análise da sequência proteica de YFV-C

Foram pesquisados motivos de importância para importação nuclear (NLS) e nucleolar (NoLS) previamente descritos na literatura nas proteínas C de quatro flavivirus. Observou-se, na região C-terminal de YFV-C, um trecho contínuo de quatro aminoácidos básicos (RKRR), denominado “pat4” (Tabela 1).

Tabela 1: Potenciais motivos de NLS e NoLS analisados

Motivo	Sequência polipeptídica	Referência
pat4	[K R] ₄ ou [K R] ₃ [H P]	Rowland <i>et al.</i> , 1999
NoLS	Variada	Scott <i>et al.</i> , 2010
pHNTR	[L(Φ/N)(V/L)] e [RR(I/L)X3r]	Fraser <i>et al.</i> , 2016
Aminoácidos conservados	Gly ⁴² e Pro ⁴³	Mori <i>et al.</i> , 2005

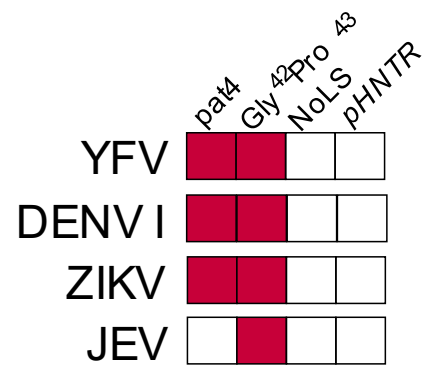


Figura 8: Análise da presença de motivos proteicos importantes para o direcionamento nucleolar.
Quadrados coloridos indicam presença; quadrados brancos indicam ausência.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho corresponde ao início de um projeto que busca entender os requerimentos moleculares para acúmulo de YFV-C nos nucléolos de células de seus hospedeiros vertebrados.

No presente estudo, foi feito o *download* da sequência polipeptídica do capsídeo de quatro flavivírus (DENV I, ZIKV, JEV, YFV). O estudo de Mori e colaboradores (2005) mostrou que a proteína nucleocapsídica de JEV foi encontrada colocalizando com núcleo e nucléolo de seus hospedeiros vertebrados e invertebrados, devido a presença dos aminoácidos Glicina⁴² e Prolina⁴³ (Mori *et al.*, 2005). Quando comparamos com nossos dados, Glicina e Prolina estavam presentes, entretanto, nas posições 43 e 44, respectivamente. Uma hipótese para essa diferença seja o *software* ou o parâmetro utilizado para a realização do alinhamento. Além disso, a presença desses aminoácidos nessas respectivas posições parece ser importante para o espalhamento do JEV, pois quando foram substituídos por alanina, houve uma diminuição da propagação viral (Mori *et al.*, 2005). Curiosamente, encontramos, além dos aminoácidos glicina e prolina, 12 aminoácidos conservados no capsídeo de todos os vírus analisados. Os quatro últimos aminoácidos localizados no C-terminal de YFV-C sofreram uma deleção. O primeiro aminoácido da região do N-terminal de YFV-C também sofreu deleção, bem como os aminoácidos da posição 21-23.

Em um trabalho realizado por Fraser e colaboradores (2016), foi visto que a proteína NS5 de DENV, em condições fisiológicas normais (pH 7,4), acumula-se nos nucléolos de células Vero infectadas. Além disso, ao serem submetidas a um meio com pH ácido (pH 6), a quantidade de proteínas no nucléolo aumentou e, contrariamente, em pH básico (pH 8), diminuiu. Esse evento acontece devido uma sequência descrita como “*pH-dependent nucleolar targeting region (pHNTR)*” estar presente na proteína viral que, após a acidificação do meio extracelular, é responsável pelo direcionamento de NS5 para a região nucleolar. Após nossas análises, essa sequência dependente de pH não foi encontrada nos capsídeos dos vírus selecionados (Figura 8). Foram formuladas duas hipóteses para esse resultado: (i) NS5 é uma proteína com funções diferentes da proteína do capsídeo, por essa razão a sequência seja exclusiva de NS5. (ii) a acidificação do meio extracelular não seja importante para o direcionamento de YFV-C para os nucléolos.

Relatos na literatura descrevem que sequências de direcionamento nucleolar (NoLS) são importantes para migração de proteínas citoplasmáticas e nucleares para o

nucléolo (Timani *et al.*, 2005). Com base nesses achados, foi pesquisado nos capsídeos dos flavivírus selecionados domínios correspondentes as NoLS (Scott *et al.*, 2010). No nosso estudo observamos que nenhuma das 46 sequencias de NoLS pesquisadas, foi localizada (Figura 8). Formulamos uma hipótese de que a migração da proteína possa ocorrer exclusivamente através de interações entre proteína-proteína, e não pela presença de NoLS.

Sabe-se que proteínas virais, eventualmente, apresentam sequencias ricas em aminoácidos básicos, uma característica principal de sinal de localização nuclear (NLS). Diversos estudos já mostraram que de YFV-C migra e se acumula no núcleo de seus hospedeiros (Hiscox, 2002; Yoo *et al.*, 2003; Mourão *et al.*, 2020). Além disso, observamos nos resultados obtidos um trecho contínuo de quatro aminoácidos básicos (RKRR) na sequência peptídica de YFV-C localizados na posição 102-105, uma característica de NLS (Rowland *et al.*, 1999). Portanto, uma hipótese que possa explicar esse fenômeno seja que durante a replicação viral, o sítio de NLS ao estar exposto permite que proteínas associadas a importação nuclear, como nucleolina, interaja com a proteína viral, atuando como proteínas de transporte ao direcionar as proteínas virais para a região nucleolar. Além disso, por ser uma proteína intrinsecamente desordenada, isto é, adota diversas conformações, a proteína viral consegue interagir com proteínas presentes na região nucleolar, perturbando o funcionamento da biossíntese celular.

Além disso, no presente estudo também realizamos um experimento para verificar a taxa de replicação de YFV nas células Huh-7 infectadas. Os resultados obtidos do histograma mostraram que no controle negativo do anticorpo o percentual de células infectadas foi de 2,84 % (Figura 7). Enquanto no tempo de 0h p.i, o percentual de células infectadas foi de 3,21%. No tempo de 24h p.i, o percentual de células infectadas foi de 22,1%, mostrando que o vírus replica nas células Huh-7 (Figura 7).

Na análise do flowjo foi visto que todas as células apresentaram tamanho e granulosidade normal (Figura 7).

Os resultados do ensaio de plaque constataram que houve um aumento na replicação viral em 72h p.i quando comparamos com o tempo de 0h p.i (Figura 6).

Esses resultados servirão como base para darmos continuidade ao trabalho que visa elucidar os requerimentos necessários para o direcionamento de YFV-C aos nucléolos de seus hospedeiros vertebrados.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do ensaio de plaque e citometria de fluxo demonstraram que houve replicação de YFV nas células Huh-7. Além disso, dentre as 46 NoLS pesquisadas, nenhuma foi encontrada na sequência peptídica de YFV e outros flavivírus analisados. Já o motivo pat4 e os aminoácidos Gly⁴²Pro⁴³ foram encontrados em YFV-C. Por fim, estudos futuros serão necessários para investigar outros mecanismos do acúmulo de YFV-C nos nucléolos de células de seus hospedeiros vertebrados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akira, S., Uematsu, S. e Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124, 783–801.
- Arakawa, M. e Morita, E. (2019). Flavivirus Replication Organelle Biogenesis in the Endoplasmic Reticulum: Comparison with Other Single-Stranded Positive-Sense RNA Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2336.
- Barrett, A. D. T., & Higgs, S. (2007). Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *Annual Review of Entomology*, 52, 209–229.
- Barrett, A. D. e Monath, T. P. (2003). Epidemiology and ecology of yellow fever virus. *Advances in Virus Research*, 61, 291–315.
- Bartholomeusz, A. e Thompson, P. (1999). Flaviviridae polymerase and RNA replication. *Journal of Viral Hepatitis*, 6, 261–270.
- Barton, G. M. e Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature Reviews Immunology*, 9, 535–542.
- Beasley, D. W. C., McAuley, A. J. e Bente, D. A. (2015). Yellow fever virus: Genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral Research*, 115, 48–70.
- Belin, S., Kindbeiter, K., Hacot, S., Albaret, M. A., Roca-Martinez, J. X., Thérizols, G., Grosso, O., Diaz, J.J. (2010). Uncoupling ribosome biogenesis regulation from RNA polymerase I activity during herpes simplex virus type 1 infection. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 16, 131–140.
- Best, S. M. (2016). Flaviviruses. *Current Biology*, 26(24), R1258–R1260
- Bifani, A. M., Ong, E. Z., & de Alwis, R. (2020). Vaccination and Therapeutics: Responding to the Changing Epidemiology of Yellow Fever. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*.
- Blair, C. D., & Olson, K. E. (2014). Mosquito immune responses to arbovirus infections. *Current Opinion in Insect Science*, 3, 22–29.
- Blasius, A. L., & Beutler, B. (2010). Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity*, 32, 305–315.
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J. e Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 574–585.
- Cerqueira, A. V. e Lemos, B. (2019). Ribosomal DNA and the Nucleolus as Keystones of Nuclear Architecture, Organization, and Function. *Trends in Genetics*.
- Chambers, T. J., Nestorowicz, A., e Rice, C. M. (1995). Mutagenesis of the Yellow Fever Virus NS2B/3 Cleavage Site: Determinants of Cleavage Site Specificity and Effects on Polyprotein Processing and Viral Replication. *Journal of Virology*, 69, 1600–1605.
- Cheng, G., Liu, Y., Wang, P., & Xiao, X. (2016). Mosquito Defense Strategies against Viral Infection. *Trends in Parasitology*, 32, 177–186.
- Douam, F. e Ploss, A. (2018). Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends in Microbiology*, 26, 913–928.
- Fraser, J. E., Rawlinson, S. M., Heaton, S. M. e Jans, D. A. (2016). Dynamic Nucleolar Targeting of Dengue Virus Polymerase NS5 in Response to Extracellular pH. *Journal of Virology*, 90, 5797–5807
- Gardner, C. L. e Ryman, K. D. (2010). Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30, 237–260.
- Gerbi, S., Borovjagin, A. V. e Lange, T. S. (2003). The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15, 318–325.
- Germi, R., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., Zrsky, J.-P. e Drouet, E.

- (2002). Heparan Sulfate-Mediated Binding of Infectious Dengue Virus Type 2 and Yellow Fever Virus. *Virology*, 292, 162–168.
- Goldani, L. Z. (2017). Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21, 123–124.
- Goldmann, O. e Medina, E. (2018). Staphylococcus aureus strategies to evade the host acquired immune response. *International Journal of Medical Microbiology*, 308, 625–630.
- Guyatt, K. J., Westaway, E. G., & Khromykh, A. A. (2001). Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5) of the flavivirus Kunjin. *Journal of Virological Methods*, 92, 37–44.
- Hamrick, P. N., Aldighieri, S., Machado, G., Leonel, D. G., Vilca, L. M., Uriona, S. e Schneider, M. C. (2017). Geographic patterns and environmental factors associated with human yellow fever presence in the Americas. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11, e0005897.
- Hill, C. L., Sharma, A., Shouche, Y. e Severson, D. W. (2014). Dynamics of midgut microflora and dengue virus impact on life history traits in *Aedes aegypti*. *Acta Tropica*, 140, 151–157.
- Hiscox, J. A. (2002). The nucleolus – a gateway to viral infection?. *Archives of virology*, 147, 1077–1089.
- Hiscox, J. A., Wurm, T., Wilson, L., Britton, P., Cavanagh, D. e Brooks, G. (2001). The Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Nucleoprotein Localizes to the Nucleolus. *Journal of Virology*, 75, 506–512.
- Hiscox, J. A. (2007). RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 119–127.
- Huang, S. (2002). Building an efficient factory: Figure 1. *The Journal of Cell Biology*, 157, 739–741.
- Iarovaia, O. V., Minina, E. P., Sheval, E. V., Onichtchouk, D., Dokudovskaya, S., Razin, S. V. e Vassetzky, Y. S. (2019). Nucleolus: A Central Hub for Nuclear Functions. *Trends in Cell Biology*, 29, 647–659.
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14, 36–49.
- Iwasaki, A. e Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16, 343–353.
- Jans, D. A., & Martin, A. J. (2018). Nucleocytoplasmic Trafficking of Dengue Non-structural Protein 5 as a Target for Antivirals. *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*, 199–213.
- Klitting, R., Gould, E., Paupy, C., & de Lamballerie, X. (2018). What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (I). *Genes*, 9, 291.
- Lafontaine, D. L. J. (2019). Birth of Nucleolar Compartments: Phase Separation-Driven Ribosomal RNA Sorting and Processing. *Molecular Cell*, 76, 694-696.
- Lafontaine, D. L. J., Riback, J. A., Bascetin, R. e Brangwynne, C. P. (2020). The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22, 165–182.
- Laureti, M., Narayanan, D., Rodriguez-Andres, J., Fazakerley, J. K., & Kedzierski, L. (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Lee, W.-S., Webster, J. A., Madzokere, E. T., Stephenson, E. B., & Herrero, L. J. (2019). Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasites & Vectors*, 12.
- Lei, Y., Yu, H., Dong, Y., Yang, J., Ye, W., Wang, Y., Chen, W., Jia, Z., Xu, Z., Li, Z. e Zhang, F. (2015). Characterization of N-Glycan Structures on the Surface of Mature Dengue 2 Virus Derived from Insect Cells. *Plos one*, 10, e0132122.

- Litvoc, M. N., Novaes, C. T. G., & Lopes, M. I. B. F. (2018). Yellow fever. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 64, 106–113.
- Lopes, R. L., Pinto, J. R., Junior, G. B. S., Santos, A. K. T., Souza, M. T. O. e Daher, E. F. (2019) Kidney involvement in yellow fever: a review. *Journal of the sao paulo institute of tropical medicine*, 61, e35.
- Mares-Guia, M. A. M. de M., Horta, M. A., Romano, A., Rodrigues, C. D. S., Mendonça, M. C. L., dos Santos, C. C., ... de Filippis, A. M. B. (2020). Yellow fever epizootics in non-human primates, Southeast and Northeast Brazil (2017 and 2018). *Parasites & Vectors*, 13.
- Martins, I. C. e Santos, N. C. (2020). Intrinsically disordered protein domains in flavivirus infection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 683, 108298.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A. e O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 15, 87–103.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1, 135–145.
- Mekhail, K., Khacho, M., Carrigan, A., Hache, R. R. J., Gunaratnam, L. e Lee, S. (2005). Regulation of ubiquitin ligase dynamics by the nucleolus. *The Journal of Cell Biology*, 170, 733–744.
- Michienzi, A., De Angelis, F. G., Bozzoni, I., & Rossi, J. J. (2006). A nucleolar localizing Rev binding element inhibits HIV replication. *AIDS Research and Therapy*, 3, 13.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427, 313–319
- Monath, T. P. (2001). Yellow fever: an update. *The Lancet Infectious Diseases*, 1, 11–20.
- Monath, T. P. (2005). Yellow fever vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 4, 553–574.
- Monath, T. P. (2008). Treatment of yellow fever. *Antiviral Research*, 78, 116–124.
- Monath, T. P. e Vasconcelos, P. F. C. (2015). Yellow fever. *Journal of Clinical Virology*, 64, 160–173.
- Mori, Y., Okabayashi, T., Yamashita, T., Zhao, Z., Wakita, T., Yasui, K., ... Matsuura, Y. (2005). Nuclear Localization of Japanese Encephalitis Virus Core Protein Enhances Viral Replication. *Journal of Virology*, 79, 3448–3458.
- Mourão, D., Chen, S., Scheafer, U, Bozzacco, L., Carneiro, L. A., Gerber, A., Adura, C., Dill, B. D., Molina, H.,
- Carroll, T., Paul, M., Bhanu, N. V, Garcia, B. A., Joberty, G., Rioja, I., Prijha, R. K., Roeder, R. G., Rice, C. M., MacDonald, M. R., Patel, D e Tarakhovsky, A. (2020) A histone-like motif in yellon fever virus contributes to viral replication.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J. e Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 13–22.
- Nasirudeen, A. M. A., Wong, H. H., Thien, P., Xu, S., Lam, K.-P. e Liu, D. X. (2011). RIG-I, MDA5 and TLR3 Synergistically Play an Important Role in Restriction of Dengue Virus Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e926.
- Oliveira, J. H., Bahia, A. C., & Vale, P. F. (2019). How are arbovirus vectors able to tolerate infection? *Developmental & Comparative Immunology*, 103514.
- Olson, M. O. J., Hingorani, K. e Szebeni, A. (2002). Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *International Review of Cytology*, 219,199–266.
- Olson, M. O. J. e Dunder, M. (2005). The moving parts of the nucleolus. *Histochemistry and Cell Biology*, 123, 203–216.
- Patro, A. R. K. (2019). Subversion of Immune Response by Human Cytomegalovirus. *Frontiers in Immunology*,

10.

- Quaresma, J. A. S., Pagliari, C., Medeiros, D. B. A., Duarte, M. I. S. e Vasconcelos, P. F. C. (2013). Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Reviews in Medical Virology*, 23, 305–318
- Roby, J. A. Hall, R. A. Setoh, Y. X. e Khromykh, A. A. (2015). Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *Journal of General Virology*, 96, 1551–1569.
- Rowland, R. Kervin, R. Kuckleburg, C. Sperlich, A. e Benfield, D. A. (1999). The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Research*, 64, 1–12.
- Salvetii, A. Greco, A. (2013) Viruses and the nucleolus: The fatal attraction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842, 840–847.
- Sattler, S. (2017). The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*, 3–14.
- Scott, M. S., Boisvert, F. M., McDowall, M. D., Lamond, A. I e Barton, G. J. (2010) Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Research*, 38, 7388-7399.
- Shaw, P. J. e Jordan, E. G. (1995). The Nucleolus. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11, 93– 121.
- Sim, S., Jupatanakul, N. e Dimopoulos, G. (2014). Mosquito Immunity against Arboviruses. *Viruses*, 6, 4479– 4504.
- Stanek, D. e Fox, A. H. (2017). Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 46, 94–101.
- Stenstrom, L., Mahdessian, D., Gnann, C., Cesnik, A. J., Ouyang, W., Leonetti, A. D., Uhlén, M., CuylenHaering, S. e Thul, P. J. e Lundberg, E. (2020). Mapping the nucleolar proteome reveals a spatiotemporal organization related to intrinsic protein disorder. *Molecular Systems Biology*, 16: e9469.
- Tan, T. Y., Fibriansah, G., Kostyuchenko, V. A., Ng, T.-S., Lim, X.-X., Zhang, S., Lin, X. N., Wang, J., Shi, J., Morais, M. C. Corti, D e Lok, S. M. Lok, S.-M. (2020). Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nature Communications*, 11.
- Timani, K. A., Liao, Q., Ye, L., Zeng, Y., Liu, J., Zheng, Y., Ye. L., Yang. X., Lingbao. K., Gao. J. e Zhu, Y. (2005). Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus. *Virus Research*, 114, 23–34.
- Theiler. M., M.R.C.S., L.R.C.P., Hugh. H., Smith. M.D. (1937). The use of yellow fever vírus modified by in vitro cultivation for human immunization. *Journal of Experimental Medicine*, 65, 787-800.
- Thiry, M. e Lafontaine, D. L. J. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends in Cell Biology*, 15, 194–199.
- Tomori, O. (1999). Impact of Yellow Fever on The Developing World. *Advances in Virus Research* Volume 53, 5–34.
- Tschochner, H. e Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends in Cell Biology*, 13, 255–263.
- Uno, N. e Ross, T. M. (2018). Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging Microbes & Infections*, 7.
- Uversky, V. N. (2017). Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder. *Current Opinion in Structural Biology*, 44, 18–30.
- Vasconcelos, P. F. da C. (2003). Febre amarela. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 275– 293.

- Voss, S. e Nitsche, C. (2020). Inhibitors of the Zika virus protease NS2B-NS3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 126965.
- Xi, Z., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. *PLoS Pathogens*, 4, e1000098.
- Xiao, X., Zhang, R., Pang, X., Liang, G., Wang, P. e Cheng, G. (2015). A Neuron-Specific Antiviral Mechanism Prevents Lethal Flaviviral Infection of Mosquitoes. *PLOS Pathogens*, 11, e100484
- Xing, H., Xu, S., Jia, F., Yang, Y., Xu, C., Qin, C. e Shi, L. (2019). Zika NS2B is a crucial factor recruiting NS3 to the ER and activating its protease activity. *Virus Research*, 197793.
- Wang, J. P., Liu, P., Latz, E., Golenbock, D. T., Finberg, R. W. e Libraty, D. H. (2006). Flavivirus Activation of Plasmacytoid Dendritic Cells Delineates Key Elements of TLR7 Signaling beyond Endosomal Recognition. *The Journal of Immunology*, 177, 7114–7121.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., KrijnseLocker, J. e Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe*, 5, 365–375.
- Wolff, G., Melia, C. E., Snijder, E. J., Barcena, M. (2020). Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. *Trends in Microbiology*, 12.
- Woon, A. P. e Purcell, A. W. (2018). The use of proteomics to understand antiviral immunity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- Yoo, D., Wootton, S. K., Li, G., Song, C e Rowland, R. R. (2003). Colocalization and Interaction of the Porcine Arterivirus Nucleocapsid Protein with the Small Nucleolar RNA-Associated Protein Fibrillarin. *Journal of virology*, 77, 12173–12183.
- Zhang, Q., e Cao, X. (2019). Epigenetic regulation of the innate immune response to infection. *Nature Reviews Immunology*.