

Virginia Lima dos Santos

O papel do capsídeo dos *Flavivírus* na interação com hospedeiros
vertebrados e invertebrados: a influência das condições biofísicas
nessas interações



**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
Dezembro / 2023

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Leticia de Albuquerque Maranhão Carneiro

Ficha Catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

S237p

Santos, Virginia Lima dos
O papel do capsídeo dos Flavivirus na interação com
hospedeiros vertebrados e invertebrados: a
influência das condições biofísicas nessas interações
/ Virginia Lima dos Santos. -- Rio de Janeiro, 2023.
44 f.

Orientador: Letícia 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, 2023.

1. Dengue. 2. Febre Amarela. 3. Proteína do
Capsídeo. 4. Hospedeiros vertebrados e
invertebrados. 5. Núcleo. I. Carneiro, Letícia de
Albuquerque Maranhão, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

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(A): **Virginia Lima dos Santos**

DRE: **120022154**

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Luciana Barros de Arruda Hinds (Presidente)
 Profa. Tatiana Domitrovic
 Msc. Rômulo Neris
 Profa. Juliana Echevarria (Suplente)

Título da Monografia: **“O papel do capsídeo dos *Flavivirus* na interação com hospedeiros vertebrados e invertebrados: a influência das condições biofísicas nessas interações”**

Local: **Anfiteatro do IMPG / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **14 de dezembro de 2023 às 09:00h**

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 9,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2023.

NOTA:

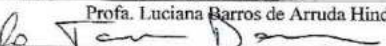
Banca Examinadora:

9,0



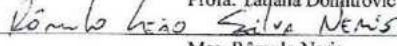
Profa. Luciana Barros de Arruda Hinds (Presidente)

9,0



Profa. Tatiana Domitrovic

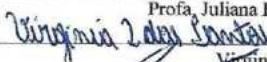
9,0



Msc. Rômulo Neris

Profa. Juliana Echevarria (Suplente)

Aluno(a):



Virginia Lima dos Santos

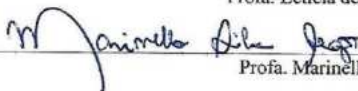
Orientador(a)



Profa. Letícia de A.M Carneiro

(e coorientador):

Coordenadora de



Profa. Marinella Silva Laport

TCC:

Dedicatória

Dedico o presente trabalho aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram em todas as minhas escolhas, e ao meu avô do coração, Moraes, que de onde estiver deve estar radiante.

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais, Vanessa e Humberto, que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as escolhas que fiz em minha vida. Obrigada por terem feito o possível para que eu tivesse a melhor educação possível e por sempre me mostrarem que o caminho para o sucesso era através dos estudos.

Aos meus avós, que cuidaram de mim e me incentivaram a ser a primeira da família a ingressar em uma Universidade pública.

À minha madrinha Adevane, que sempre se fez presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus primos queridos e minha sobrinha Maria Liz, que me motivam todos os dias a ser alguém melhor para ajudá-los e inspirá-los.

À minha orientadora Letícia, que acreditou e confiou em mim e no meu potencial, mesmo quando eu duvidava que conseguiria. Obrigada por todo o cuidado, pela atenção, pelos docinhos e pelas palavras carinhosas e de incentivo.

Aos meus amigos Gyovanna, Iza, Luane, Fernanda, Brenda, Manoella e Victor Hugo, que sempre se preocuparam e acreditaram no meu potencial.

Aos meus melhores amigos do mundo, Camille e Breno, por estarem sempre ao meu lado, nos sorrisos e nos choros.

Aos meus amigos da faculdade, Jéssica, Stella, Luiza, Mariana, Gabriela, Fabiane, Livia e Matheus V., que dividiram esses 4 anos de graduação comigo, rindo e entrando em desespero várias vezes. Sem vocês, definitivamente, nada disso seria possível.

Aos meus professores de ensino médio, Deborah, Gabriel, Xunei, Felipe, Mauro, Sérgio e Ramon, que me inspiram até hoje a buscar conhecimento e sempre acreditaram no meu potencial.

Ao Laboratório de Inflamação e Imunidade, que me acolheu, me ajudou e colaborou muito com o meu desenvolvimento acadêmico-científico.

Ao LaRIV, que sempre se dispôs a me auxiliar em novas técnicas e experimentos.

Ao LabPat, que cedeu, gentilmente, os vírus para a realização do presente trabalho, e auxiliou com protocolos.

Aos meus professores da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que me inspiraram e apresentaram o maravilhoso mundo da Microbiologia e Imunologia.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, por proporcionar quatro anos de sorrisos, choros e muito conhecimento.

À CAPES e à FAPERJ, por acreditarem na ciência brasileira e investirem em nós, jovens pesquisadores.

À mim, por não desistir do meu sonho mesmo nos momentos mais difíceis.

Epígrafe

Maravilhar-se é o primeiro passo para um descobrimento.

- Louis Pasteur

Resumo

Virginia Lima dos Santos

O papel do capsídeo dos *Flavivirus* na interação com hospedeiros vertebrados e invertebrados: a influência das condições biofísicas nessas interações

Orientador: Letícia de A.M Carneiro

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

As arboviroses são doenças infecciosas não contagiosas causadas por vírus e transmitida para os primatas por artrópodes, como os mosquitos, comum em países tropicais e subtropicais. Dentre os exemplos de arboviroses estão a Dengue, a Febre Amarela e a Zika. Esses arbovírus apresentam dois hospedeiros principais distintos: o homem e o mosquito. Dentre os gêneros de mosquitos que transmitem esses vírus estão *Aedes*, *Sabethes* e *Haemagogus*. Visto que esses microrganismos apresentam como genoma uma fita simples de RNA de polaridade positiva, sua replicação ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira. Porém, já é bem caracterizada a presença da proteína do capsídeo do vírus da Dengue (DENV-C) no núcleo de células de primatas, e dados não publicados obtidos previamente pelo nosso grupo demonstram que é possível encontrar a proteína do capsídeo viral da Febre Amarela (YFV-C) também, mas essa presença não é vista com nenhum dos dois vírus em células de mosquito. Assim, o objetivo desse projeto é compreender os mecanismos que permitem o acúmulo de DENV-C e YFV-C no núcleo de células de primatas mas não no de células de mosquito, a fim de elucidar posteriormente se esse acúmulo é responsável pela diferença de padrão de infecção, visto que os primatas apresentam um padrão de infecção agudo sintomático, enquanto os mosquitos apresentam um padrão de infecção crônico assintomático. Além disso, os mosquitos e os primatas diferem em suas condições fisiológicas, ou seja, o homem apresenta a temperatura corporal perto de 37°C, enquanto o mosquito apresenta 28°C, entre outras diferenças. Assim, talvez a presença das proteínas do vírus no núcleo das células humanas seja por conta dessas diferenças fisiológicas. A fim de responder as perguntas, foram feitos experimentos nos quais submetemos às células humanas e as células de mosquitos às mesmas condições biofísicas, como diferentes temperaturas e diferentes pHs, a fim de analisarmos se é isso que promove a ida ou não de DENV-C e YFV-C para o núcleo. Embora a temperatura e o pH não pareçam estar relacionados com a co-localização da proteína C de *Flavivirus* no nucléolo, visto que não houveram diferenças entre as condições, novos experimentos devem ser realizados, a fim de confirmar os resultados prévios.

Palavras-chave: Dengue; Febre Amarela; proteína do capsídeo; hospedeiros vertebrados e invertebrados; núcleo

Abstract
Virginia Lima dos Santos

The role of the *Flavivirus* capsid in the interaction with vertebrate and invertebrate hosts: the influence of biophysical conditions on these interactions

Orientador: Letícia de A.M Carneiro

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Arboviruses are non-contagious infectious diseases caused by viruses and transmitted to primates by arthropods, such as mosquitoes, common in tropical and subtropical countries. Examples of arboviruses include Dengue, Yellow Fever and Zika. These arboviruses have two distinct main hosts: humans and mosquitoes. Among the genera of mosquitoes that transmit these viruses are *Aedes*, *Sabethes* and *Haemagogus*. Since these microorganisms have a single strand of RNA with positive polarity as their genome, their replication inherently occurs in the cytoplasm of the host cell. However, the Dengue virus capsid protein (DENV-C) in the nucleus of primate cells has already been well described, and unpublished data previously published by our group demonstrate that it is possible to find the Yellow Fever viral capsid protein (YFV-C) as well, but this presence is not seen with either virus in mosquito cells. Thus, the objective of this project is to understand the mechanisms that allow the accumulation of DENV-C and YFV-C in the nucleus of primate cells, but not in the nucleus of mosquito cells, in order to further elucidate whether this accumulation is responsible for the difference in pattern of infection, given that primates have an acute symptomatic pattern of infection, while mosquitoes have an especially asymptomatic pattern of infection. Furthermore, mosquitoes and primates suffer in their physiological conditions, that is, humans have a body temperature close to 37°C, while mosquitoes have 28°C, among other differences. Thus, perhaps the presence of virus proteins in the nucleus of human cells is due to physiological differences. To answer the questions, experiments were carried out in which we subjected human cells and mosquito cells to the same biophysical conditions, such as different temperatures and different pHs, in order to analyze whether this is what promotes the release or not of DENV-C and YFV -C for core. Although temperature and pH do not seem to be related to the co-localization of the Flavivirus C protein in the nucleolus, since there were no differences between the conditions, new experiments should be carried out in order to confirm the previous results.

Keywords: Dengue; Yellow fever; capsid protein; vertebrate and invertebrate hosts; nucleolus.

Resumo para leigos
Virginia Lima dos Santos

Como os vírus da Febre Amarela e da Dengue se comportam nas células humanas e nas células do mosquito?

Orientador: Letícia de A.M Carneiro

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A Febre Amarela e a Dengue são viroses comuns em países tropicais e subtropicais, como o Brasil. Elas são transmitidas para os macacos, chimpanzés e o homem pela picada do mosquito infectado com o vírus. Dessa forma, podemos ver que esses vírus apresentam 3 hospedeiros diferentes: o homem, o mosquito e outros primatas, como os macacos. Por serem vírus, eles se replicam dentro das células do hospedeiro, pois eles precisam das nossas ferramentas celulares para isso, já que eles não as possuem. Dentro das células, esses vírus se replicam numa região chamada citoplasma. Porém, é possível encontrar componentes virais em outra região celular, o núcleo. Todavia, o acesso a essa região é altamente controlado, o que nos fez perguntar como e por que essas proteínas estão nessa região. É mais estranho ainda é que só é possível encontrar essas proteínas nas células humanas e dos primatas não humanos, enquanto nas células do mosquito não. E outra diferença entre os hospedeiros é que os primatas apresentam um quadro agudo da doença, ou seja, eles são infectados, produzem vírus, podem apresentar sinais e sintomas da doença e depois param de produzir vírus, o que possibilita a cura, enquanto os insetos produzem vírus por toda a sua vida mas sem sinais e sintomas de doença, caracterizando um quadro de infecção crônico. Além disso, os mosquitos e os primatas diferem em suas condições fisiológicas, ou seja, o homem apresenta a temperatura corporal perto de 37°C, enquanto o mosquito apresenta 28°C, entre outras diferenças. Assim, talvez a presença das proteínas do vírus no núcleo das células humanas seja por conta dessas diferenças fisiológicas. A fim de confirmar a hipótese, o presente trabalho colocou as células humanas e de mosquitos infectadas com os vírus da Dengue e da Febre Amarela em diferentes condições de temperatura e pH e analisou os percursos feitos pelas proteínas virais dentro das células. Aparentemente, essas condições não parecem estar relacionadas com a presença ou ausência das proteínas virais nos núcleos.

Lista de abreviaturas e siglas

Aag2- Células de Mosquito *Aedes aegypti*
 B23- Nucleofosmina
 BRD4- Proteína *Bromodomain containing 4*
 CLR- Receptor de Lectina tipo C
 CMC- Carboximetilcelulose
 CO₂- Gás Carbônico
 DAPI- 4',6'-diamino-2-fenil-indol
 DC- Células Dendríticas
 DFC- Componentes Fibrilares Densos
 DENV-1- Vírus da Dengue sorotipo 1
 DENV-2- Vírus da Dengue sorotipo 2
 DENV-3- Vírus da Dengue sorotipo 3
 DENV-4- Vírus da Dengue sorotipo 4
 DENV- Vírus da Dengue
 DENV-C- Proteína do Capsídeo do Vírus da Dengue
 DMEM- Meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
 DNAr- DNA ribossômico
 dsRNA- RNA dupla-fita
 FC- Centros Fibrilares
 GC- Componentes Granulares
 GFP- Proteína Fluorescente Verde
 H2A- Histona 2A
 H2B- Histona 2B
 H3- Histona 3
 H4- Histona 4
 HELA- Células Epiteliais de Adenocarcinoma Cervical
 HSP70- Proteína de Choque Térmico 70
 HSP90- Proteína de Choque Térmico 90
 HUH7- Linhagem de Células de Hepatocarcinoma Humano
 IDP- Proteína Intrinsicamente Desordenada
 IDR- Proteína com Regiões Intrinsicamente Desordenada
 IFN- Interferon
 JEV- Vírus da Encefalite Japonesa
 LAMRI- Receptor de Laminina
 LDH- Lactato Desidrogenase
 LLPS- Separação de Fase Líquido-Líquido
 MLOs- Organelas Não Membranosas
 MOI- Multiplicidade de Infecção
 NOR- Região de Organização Nucleolar
 NS1- Proteína Não-Estrutural 1
 NS2A- Proteína Não-Estrutural 2A
 NS2B- Proteína Não-Estrutural 2B
 NS3- Proteína Não-Estrutural 3
 NS4A- Proteína Não-Estrutural 4A
 NS4B- Proteína Não-Estrutural 4B
 NS5- Proteína Não-Estrutural 5
 p53- Proteína Tumoral

p68- Proteína quinase ativada por RNA
PAMP- Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS- Tampão Fosfato-Salino
PBS-BSA- Tampão Fosfato-Salino com Albumina Sérica Bovina
PBS-PFA- Tampão Fosfato-Salino com Paraformaldeído 4%
pHNTR- região de direcionamento nucleolar sensível ao pH
prM- Precursor da Proteína M
PRR-Receptores de Padrões de Reconhecimento
RTPase- RNA trifosfatase
NTPase- Nucleosídeo-trifosfatase
RNA- Ácido Ribonucléico
RNAm- RNA mensageiro
RNAi- RNA de Interferência
RT-PCR - Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
SFB- Soro Fetal Bovino
ssRNA- RNA de fita simples
TAM- Receptor Tirosina Quinase
TIM- Receptor de Fosfatidilserina
U4.4- Células de Mosquito *Aedes albopictus*
UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro
VERO- Células Epiteliais de Rim de Macaco Verde
WNV- Vírus do Oeste no Nilo
YFP- Proteína Fluorescente Amarela
YFV- Vírus da Febre Amarela
YFV-C - Proteína do Capsídeo do Vírus da Febre Amarela
YFV-E- Proteína do Envelope do Vírus da Febre Amarela
ZIKV- Vírus da Zika

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
RESUMO PARA LEIGOS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Características gerais dos <i>Flavivírus</i>	1
1.2 A Febre Amarela.....	1
1.3 A Dengue.....	2
1.4 Estrutura e Proteínas dos <i>Flavivirus</i>	2
1.5 Ciclo de replicação dos <i>Flavivirus</i>	5
1.6 O núcleo e nucléolo.....	7
1.7 Proteínas virais encontradas no nucléolo.....	8
2 JUSTIFICATIVA	11
3 OBJETIVOS	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Cultura de células.....	14
4.2 Infecção em diferentes temperaturas.....	15
4.3 Infecção em diferentes pHs	15
4.4 LDH.....	16
4.5 Titulação.....	16
4.6 Imunofluorescência.....	17
5 RESULTADOS.....	17
5.1 A temperatura de cultivo não afeta o tráfego de YFV-C para o nucléolo.....	17
5.2 O pH extracelular não afeta o tráfego de YFV-C e DENV-C para o nucléolo.....	18
5.3 LDH.....	22
5.4 Titulação.....	23
6 DISCUSSÃO.....	23
7 CONCLUSÃO.....	26
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. Introdução

1.1. Características gerais dos *Flavivírus*

As arboviroses são doenças virais transmitidas pela picada de artrópodes, inclusive por fêmeas dos mosquitos durante o repasto sanguíneo (Zhu *et al.*, 2021). Dentre os arbovírus mais prevalentes e capazes de causar quadros graves, estão os da família Flaviviridae, do gênero *Flavivirus*, como o vírus da Dengue (DENV), vírus da Febre Amarela (YFV) e vírus da Zika (ZIKV) (Byk e Gamarnik., 2016). Esse grupo de doenças é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Beasley *et al.*, 2015; WHO, 2023). A manutenção desses vírus no ambiente deve-se aos ciclos urbano e silvestre, em que se alternam hospedeiros invertebrados, que se alimentam de sangue de hospedeiros vertebrados infectados, como o homem e primatas não humanos, respectivamente, num ciclo de transmissão que se retroalimenta. Os vetores são comumente encontrados em áreas silvestres, como em matas e florestas, e mantém o ciclo silvestre transmitindo os vírus para primatas não humanos. Quando os seres humanos adentram essas áreas, podem servir como hospedeiros acidentais. Quando os vetores migram para os centros urbanos, devido ao desmatamento e ampliação das áreas urbanas, o ciclo é caracterizado como urbano (Monath e Vasconcelos, 2015).

Dentre os gêneros de mosquitos hematófagos cujas fêmeas podem transmitir os vírus para os primatas estão *Haemagogus*, *Sabethes* e *Aedes* (Monath e Vasconcelos, 2015; Delrieu, 2023). Uma vez infectados, os mosquitos apresentam uma infecção crônica, isto é, mantêm uma produção persistente de novas partículas virais por todo o seu tempo de vida. Apesar disso, essa infecção não resulta em alterações substanciais em parâmetros de *fitness* dos mosquitos, como alteração no tempo de voo ou na postura dos ovos (Blahove *et al.*, 2021). Assim, quando as fêmeas grávidas dos gêneros de mosquito transmissores estão infectadas e realizam o repasto sanguíneo, elas inoculam partículas virais no hospedeiro vertebrado (FIOCRUZ, acessado em 2023). Esses, por outro lado, apresentam um padrão de infecção agudo, ou seja, após o pico de produção de partículas virais ser atingido, há uma progressiva redução até a resolução completa da infecção, com eliminação do patógeno pelo sistema imune do hospedeiro (Romanos *et al.*, 2015).

1.2. A Febre Amarela

A Febre Amarela tem um período de incubação entre 3 e 6 dias e os quadros clínicos são bem variados, desde infecção assintomática até sintomas leves e graves, os mais comuns sendo febre, icterícia, calafrios, mialgia, cefaléia (Lopes *et al.*, 2019), e é capaz de causar

vazamento vascular e hemorragias (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009), o que leva ao quadro de febre hemorrágica e pode levar o indivíduo à óbito.

Sobre a evolução da doença, a maioria dos casos se mantêm benignos, mas entre 25 e 50% dos casos podem evoluir para casos graves (Beasley *et al.*, 2015). Desses, 20 a 60% evoluem para o óbito do paciente, o que representa uma alta taxa de mortalidade (Pestana *et al.*, 2018). Como profilaxia, há uma vacina disponível, feita com vírus atenuado, chamada vacina 17DD (Lopes *et al.*, 2019). Essa vacina foi desenvolvida na Fundação Rockefeller, em 1936, por Theiler e colaboradores (Theiler *et al.*, 1937), e é baseada em atenuar o vírus através do cultivo em ovos embrionados de galinhas. Além desse método profilático, há ainda o combate ao vetor, através do uso de repelentes e telas (Vasconcelos, 2003). Porém, não existe um fármaco antiviral específico para o YFV, tornando-se necessário conhecer mais sobre esse vírus, sua replicação e sobre as células que ele infecta e manipula a seu favor.

1.3. A Dengue

A Dengue tem um período de incubação entre 4 e 10 dias e os sintomas mais comuns são febre, *rash*, dores nas articulações e de cabeça. A febre hemorrágica é uma das manifestações clínicas da doença e é causada por um aumento na permeabilidade vascular, o que pode levar ao choque hipovolêmico conhecido como síndrome do choque da dengue (WHO, 2009). Devido aos diferentes sorotipos do vírus da Dengue que podem infectar um indivíduo, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, diferentes níveis de severidade da doença podem ser vistos (Byk e Gamarnik., 2016). Sobre a epidemiologia da doença, estima-se que ocorram de 100 a 400 milhões de casos de Dengue por ano no mundo (WHO, 2023). Como métodos profiláticos, há o combate ao vetor, através do uso de repelentes e telas (Vasconcelos, 2003), e as vacinas feitas com vírus atenuado Dengvaxia® e QDenga® (WHO, 2018; López-Medina *et al.*, 2020), mas estas ainda não são amplamente distribuídas, devido a ausência dessas no Programa Nacional de Imunização (PNI) e riscos associados a Dengvaxia® em pacientes soronegativos para Dengue. Assim como para o vírus da Febre Amarela, não existem antivirais capazes de atuar contra a replicação viral, apenas os sintomas podem ser tratados (WHO, 2023).

1.4. Estrutura e proteínas dos *Flavivirus*

Os flavivírus são partículas de, aproximadamente, 40 a 60 nm, possuem simetria icosaédrica e são envoltas por uma bicamada lipídica, proveniente da membrana da célula hospedeira (Romanos *et al.*, 2015) (Figura 1).

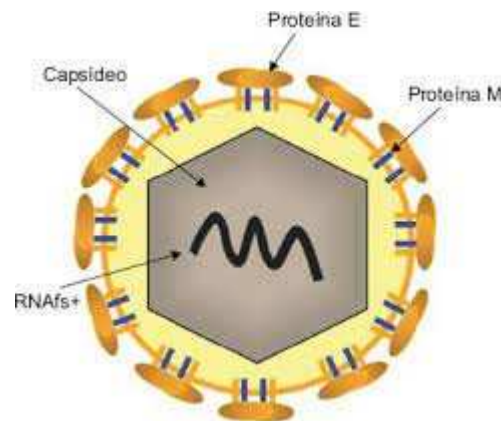


Figura 1- Estrutura dos *Flavivirus* mostrando o genoma, o capsídeo e as proteínas de envelope (E) e de membrana (M) virais. Romanos; Cavalcanti (2015)

Esses vírus apresentam um genoma de RNA de fita simples e com polaridade positiva (ssRNA+), de aproximadamente 11kb e que codifica uma poliproteína de 3.400 aminoácidos que é processada gerando 3 proteínas estruturais (C, M e E) e 7 não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009) (Figura 2).

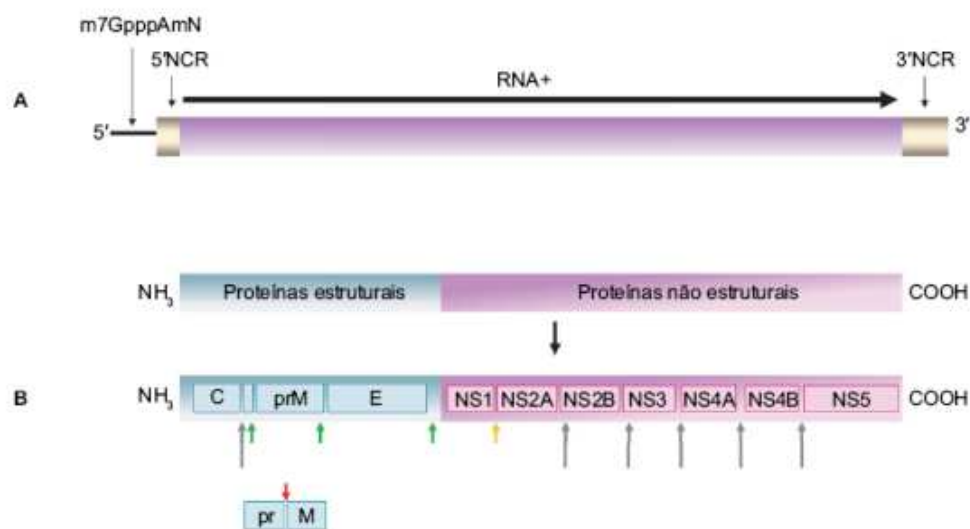


Figura 2- (A) Genoma e (B) Proteínas dos *Flavivirus*. Romanos; Cavalcanti (2015)

Por conta do genoma pequeno, que codifica apenas 10 proteínas, cada uma delas desempenha múltiplas funções, tanto no processo de replicação e formação de novas partículas virais como também na manipulação da célula hospedeira. A proteína estrutural C,

que forma o capsídeo viral, é rica em aminoácidos básicos o que condiz com sua função de interagir com o ácido nucleico viral, o RNA, encapsulando-o. Além disso, essa proteína apresenta outras funções, como a interação com a membrana celular do hospedeiro, possibilitando a liberação das partículas virais recém sintetizadas (Byk e Gamarnik., 2016). Essa proteína também exerce outras funções na interação com o hospedeiro, manipulando respostas celulares para favorecer sua replicação. Em mosquitos, por exemplo, as proteínas C de YFV inibem a resposta de RNAi (RNA de interferência) ao interferir com a função da enzima Dicer, responsável por clivar fitas duplas de RNA (Samuel *et al.*, 2016). Outra proteína estrutural, a proteína M, é formada após a maturação das partículas virais, a partir da clivagem do precursor da proteína M (prM) por proteases celulares (Beasley *et al.*, 2015). Essa proteína tem como função impedir o rearranjo da terceira proteína estrutural, a glicoproteína E, evitando a sua fusão prematura com a membrana do endossomo durante a via secretória, que apresenta um baixo pH capaz de alterar a conformação proteica. A glicoproteína E é um alvo antigênico que está na superfície viral e é a responsável pela fusão da partícula viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira (Ishida *et al.*, 2023).

Entre as proteínas não estruturais, a proteína NS1, ao interagir com NS4B, regula a replicação de RNA ao co-localizar-se com a dupla fita intermediária de replicação (Kok *et al.*, 2023). Além disso, ela modula a permeabilidade endotelial e é capaz de aumentar a ativação do sistema complemento, o que leva aos quadros graves de doença (Fisher *et al.*, 2023). A proteína NS2 é dividida em dois polipeptídios, NS2A e NS2B, e suas funções estão relacionadas à replicação e montagem viral, visto que ela atua no complexo de replicação auxiliando na síntese de novas fitas de RNA (Leung *et al.*, 2008). A proteína NS3 atua como RNA-helicase, RTPase, NTPase, e junto com a NS2B, como protease, clivando a poliproteína em proteínas individuais (Wahaab *et al.*, 2022). A proteína NS4 também é dividida em dois polipeptídeos, a NS4A e a NS4B. A proteína NS4A está relacionada com o antagonismo à resposta de interferon (IFN) do hospedeiro (Gopala Reddy *et al.*, 2018) e compor o complexo replicativo (Klaitong e Smith, 2021). A proteína NS4B está envolvida com a imunomodulação do hospedeiros (Wang *et al.*, 2022) e na replicação viral, visto que, juntamente com a NS2A, é responsável por ancorar o complexo replicativo viral na membrana celular (Klaitong e Smith, 2021). A proteína NS5 atua como RNA polimerase dependente de RNA, sendo a responsável pela replicação do material genético viral a partir da fita simples de polaridade positiva que entra na célula hospedeira (Tan *et al.*, 2023).

Por apresentarem um genoma de RNA, todas as etapas de replicação dos flavivírus, incluindo replicação do material genético, síntese de proteínas virais e montagem, das

partículas ocorre no citoplasma da célula hospedeira, sem a necessidade de etapas no núcleo (Mourão *et al.*, 2020). Entretanto, algumas proteínas virais são encontradas nessa região de células infectadas. Embora os mecanismos e consequências dessa localização sub-celular não sejam totalmente esclarecidos, está claro que estão envolvidos na manipulação de funções celulares para favorecer a replicação viral. Corroborando essa ideia, é sabido que a ausência dessas proteínas no núcleo impacta negativamente a replicação viral, como discutiremos mais abaixo (Salveti e Greco, 2014).

1.5. Ciclo de replicação dos *Flavivirus*

Após a picada do mosquito infectado, os vírus infectam as células dendríticas (DCs) presentes no tecido subcutâneo do hospedeiro vertebrado (Pereira *et al.*, 2019). Acredita-se que os receptores que permitem a adsorção viral nessas células sejam as moléculas de heparan sulfato de glicosaminoglicano, visto que a interação entre a glicoproteína E viral e esta molécula facilita a ligação e internalização do vírus (Germi *et al.*, 2002). Além desse, outros receptores que parecem permitir a adsorção de *Flavivirus* são os da família tirosina quinase (TAM), os de fosfatidilserina (TIM), os de lectina tipo C (CLR), as integrinas, as proteínas de choque térmico 70/90 (Hsp70 e Hsp90) e o receptor de laminina (LAMRI) (Thongtan *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2013; Richard *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2019; Pujhari *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). As DCs migram para os nódulos linfáticos, onde se inicia a replicação viral e, conseqüentemente, a resposta imune adaptativa do hospedeiro (Monath, 2008).

A internalização da partícula ocorre pela via de endocitose mediada por vesículas revestidas de clatrina, que são direcionadas ao endossomo. Esse compartimento celular sofre acidificação e esta provoca mudanças conformacionais na glicoproteína E viral, que permite a sua fusão com a membrana citoplasmática celular e, conseqüentemente, a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (Acosta *et al.*, 2008).

A maquinaria de replicação da célula hospedeira inicia, então, a tradução das proteínas a partir do genoma viral que foi liberado no citoplasma. Isso ocorre pois o RNA dos *Flavivirus* é uma fita simples de polaridade positiva, que atua como um RNA mensageiro (RNAm), logo, após o desnudamento, ele pode ser traduzido (Fishburn *et al.*, 2022). Nesta etapa, é sintetizada uma poliproteína que é processada ainda durante o processo de tradução, no retículo endoplasmático, tanto por proteases virais, como NS2B e NS3, quanto celulares dando origem às proteínas estruturais e não estruturais (Wahaab *et al.*, 2022). As proteínas recém-sintetizadas são direcionadas para a membrana do retículo endoplasmático, onde se ancoram e onde é então montada a nova partícula viral (Neufeldt *et al.*, 2019).

Posteriormente, inicia-se a síntese de uma fita de RNA polaridade negativa complementar à fita original, para que esta sirva de modelo para a síntese das novas fitas de polaridade positiva que darão origem aos novos vírus (Fishburn *et al.*, 2022). O ambiente onde ocorre essa replicação é chamado de Complexo de Replicação, uma estrutura membranosa formada por invaginações do retículo endoplasmático que permite a replicação do genoma viral (Byk e Gamarnik, 2016).

A proteína C recém sintetizada apresenta afinidade pelas fitas de RNA recém sintetizadas, ocorrendo, pela associação dessas duas moléculas, a formação de novos nucleocapsídeos virais. Após a maturação dessas partículas, o vírus maduro é, então, liberado na superfície celular e ganha a corrente sanguínea (Figura 3).

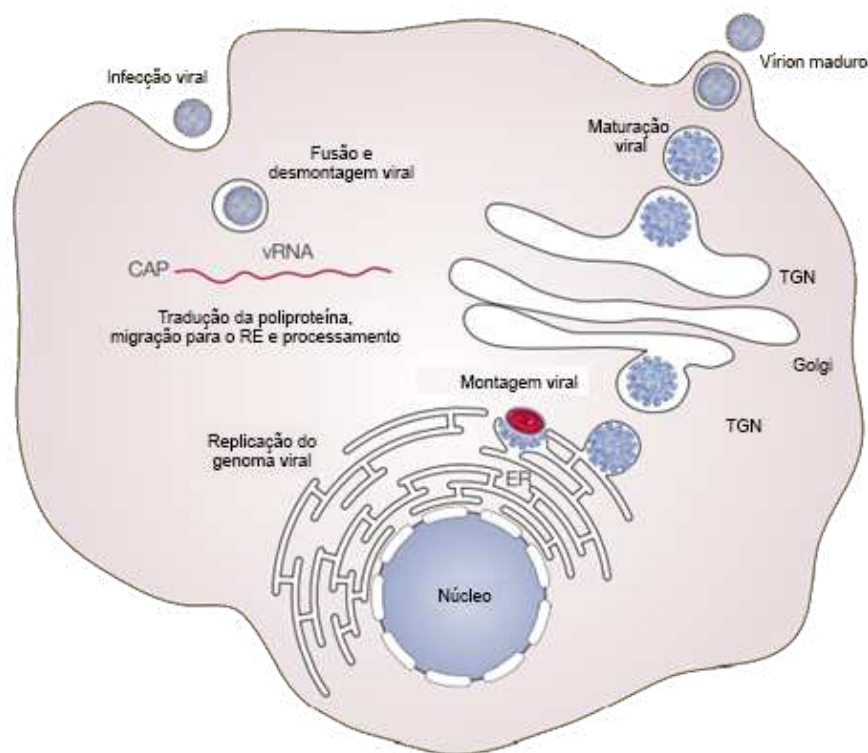


Figura 3- Representação esquemática do ciclo de replicação do DENV. Adaptado de Mukhopadhyay, Kuhn e Rossmann, 2005.

1.6. O núcleo e o nucléolo

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, necessitam da maquinaria celular do hospedeiro para se replicarem. Ao longo da evolução, foi necessário o desenvolvimento de mecanismos não só para possibilitar a tradução de suas próprias proteínas e replicação do seu material genético, ambos processo que envolvem componentes celulares,

como também formas de manipular a resposta imunológica do hospedeiro e a expressão gênica das células infectadas (Salveti e Greco, 2014). Assim, o núcleo das células infectadas é um alvo comum de muitos vírus, inclusive dos *Flavivírus*. Como mencionado anteriormente, todas as etapas de montagem das partículas dos *Flavivírus* ocorrem no citoplasma. Ainda assim, é bem estabelecido que algumas proteínas virais se acumulam nos núcleos das células infectadas onde interagem com a cromatina e com histonas alterando a expressão gênica. Por exemplo, a natureza básica da proteína C de DENV (DENV-C), que é encontrada nos núcleos de células infectadas, permite que esta interaja com histonas e interfira com a formação de nucleosomos. Histonas têm um papel fundamental na regulação gênica e acessibilidade da cromatina. Muitas proteínas virais têm como alvos as histonas para interferir com a expressão gênica do hospedeiro. DENV-C atua como um mímico de histonas e se associa às histonas H2A, H2B, H3 e H4 levando à destruição dos nucleosomos e podendo levar a alterações na transcrição (Colpitts *et al.*, 2011). Recentemente, Mourão-Sa *et al* demonstraram que YFV-C se acumula nos núcleos e nucléolos de células infectadas com YFV. YFV-C é capaz de interagir diretamente com a cromatina e também de afetar a acessibilidade à cromatina e expressão gênica da célula hospedeira. Além disso, YFV-C possui um domínio na sua porção N-terminal que apresenta 75% de similaridade com segmentos não estruturados da cauda da histona H4, incluindo as lisinas (K) nas posições 4 e 8, cuja acetilação é fundamental para o papel de H4 na regulação da expressão gênica. Isso permite que YFV-C interaja com o principal regulador epigenético de H4, a proteína BRD4 (*Bromodomain containing protein 4*) e caracteriza YFV-C como um mímico da histona H4. Finalmente, o estudo demonstra que, por sua capacidade de mimetizar a histona H4, YFV-C interfere com a distribuição de BRD4 na cromatina, regulando negativamente a expressão de genes chave na resposta celular resultando em menor replicação e infectividade viral.

Os núcleos de células de mamíferos são altamente compartimentalizados e, ainda assim, extremamente dinâmicos. Muitos fatores nucleares estão localizados em organelas sem membranas (MLOs, do inglês *membraneless organelles*) que se formam como resultado de separação de fase líquido-líquido (LLPS, do inglês *liquid-liquid phase separation*), como *speckles*, *paraspeckles*, nucléolos, corpúsculos de Cajal, *polycomb bodies* e *promyelocytic leukemia bodies* (Latonen, 2019; Stanek e Fox, 2017). Essas estruturas são visualizadas como pontos de tamanhos variados em ensaios de microscopia de fluorescência e por isso também chamadas de grânulos nucleares.

Os nucléolos são os maiores sub-compartimentos nucleares e são estruturas altamente dinâmicas e multifuncionais envolvidas em funções celulares como ciclo celular, resposta ao

estresse, apoptose, além da sua função canônica na biogênese de ribossomos. O nucléolo se forma a partir da LLPS no núcleo, ao redor de repetições genéticas de DNAr (DNA ribossômico) (Latonen, 2019) e é dividido em três subcompartimentos: os centros fibrilares (FCs), os componentes fibrilares densos (DFCs) e os componentes granulares (GCs).

A LLPS é um processo físico no qual uma solução supersaturada de uma molécula polimérica se separa espontaneamente em duas ou mais fases com propriedades físico-químicas distintas. Normalmente, esse processo origina duas fases, que coexistem de maneira estável, sendo uma densa e outra dispersa. A fase densa é também chamada de fase condensada e acontece naturalmente para soluções de algumas proteínas ou outras biomoléculas, como RNA, que possuem determinadas características semelhantes (Brangwyne *et al.*, 2011). O conceito de que a LLPS é o princípio formador das MLOs surgiu apenas recentemente, em 2012, quando foi mostrado que condensados líquidos, formados de proteína e RNA, reconstituídos *in vitro* a partir de seus componentes purificados são capazes de induzir a nucleação de actina, evidenciando o papel essencial da LLPS na formação das MLOs (Li *et al.*, 2012). Diversas evidências experimentais sugerem a capacidade de proteínas ou outras macromoléculas biológicas, como RNA, de formar condensados espacialmente organizados, exibindo diferentes propriedades materiais, como líquido, gel ou agregado sólido (Kim *et al.*, 2013; Molliex *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2015).

O processo de separação de fase é extremamente sensível a mudanças nas condições físico-químicas. Variações mínimas na temperatura, quantidade de proteína, ácido nucléico ou concentração de sal, podem levar a diferentes resultados (Alberti *et al.*, 2019). Portanto, a capacidade de uma proteína de separar de fase depende tanto da sua identidade quanto da solução em que a macromolécula se encontra inserida. Esse processo pode ser classificado como estímulo-responsivo, dependendo de fatores como temperatura, tipo de sal, concentração de co-solutos, pH e até mesmo o volume de outras macromoléculas presentes (Franzmann *et al.*, 2018).

1.7. Proteínas virais encontradas no nucléolo

A capacidade de diferentes vírus manipularem o nucléolo das células hospedeiras é algo bem descrito na literatura, independente das diferentes estratégias de replicação destes. Vírus das famílias Coronaviridae, Flaviviridae e Togaviridae são exemplos de microrganismos capazes de manipular o nucléolo da célula hospedeira em seu benefício (Salveti e Greco, 2014).

A proteína NS5 de DENV, essencial na replicação viral que ocorre no citoplasma, também já foi encontrada no nucléolo de células infectadas. De forma interessante, o tráfego dessa proteína entre o núcleo e o nucléolo responde de forma rápida e reversível a variações do pH extracelular. Os autores mapearam uma região que denominaram de pHNTR (do inglês *pH-sensitive nucleolar targeting region*) numa região rica em aminoácidos hidrofóbicos nos primeiros 244 resíduos da proteína (Fraser *et al.*, 2016). Além disso, vários estudos mostram que as proteínas C de vários flavivírus, como a do DENV, o vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus do oeste no Nilo (WNV) interagem com proteínas nucleolares a fim de favorecer sua replicação e disseminação através da indução de apoptose na célula hospedeira (Colpitts *et al.*, 2011). Um estudo japonês observou que o capsídeo do JEV foi encontrado associado à B23 (nucleofosmina) tanto no citoplasma quanto nos nucléolos de células de mamíferos e mosquitos infectadas. B23 é uma proteína que trafega entre citoplasma-núcleo-nucléolo e não está claro se essa proteína pode servir como carreadora para a proteína C de JEV. Mutações na proteína C de JEV que impedem essa interação resultam em uma menor replicação viral, o que sugere que essa co-localização é essencial para o curso da infecção (Tsuda *et al.*, 2006). Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que as proteínas C dos flavivírus YFV, DENV e ZIKV se acumulam nos nucléolos de células de linhagem humanas, como já era conhecido, mas não se acumulam nos nucléolos de células de linhagens de provenientes de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* ou *Drosophila melanogaster*.

As proteínas C dos *Flavivírus* apresentam os Sinais de Localização Nuclear (NLS), que são sequências de aminoácidos na superfície das proteínas que as direciona para importação nuclear e os Sinais de Localização Nucleolar (Nols) putativos, que as direciona especificamente para o nucléolo (Salveti e Greco, 2014).

As hipóteses de porquê essa proteína vai para o núcleo e nucléolo celular são muitas, desde o fato dela ser a proteína viral mais abundante e, por isso, acaba passando para essas regiões, até o fato dela ser capaz de alterar a maquinaria celular ao seu favor. Além disso, esse compartimento celular é rico em RNA e a proteína C apresenta alta afinidade por essa molécula, o que poderia causar um polo de atração. Outrossim, existem hipóteses de que essa retenção da proteína C no núcleo é uma resposta imune inata do hospedeiro, visando impedir que essas proteínas permaneçam no citoplasma celular e gerem novas partículas virais. Porém, já é sabido que essa retenção não é permanente, o que vai de encontro a esta hipótese. Ademais, essa co-localização pode ser uma forma da célula modificar, de maneira pós-traducional, a proteína viral, a fim de alterar sua função e prejudicar o curso da infecção. Essa hipótese também não parece promissora, visto que, conforme há a interação da proteína

C com o nucléolo, a replicação viral ocorre da mesma maneira. Outra hipótese é de que o vírus, ao interagir com o nucléolo celular, leva consigo fatores nucleolares necessários para a replicação para o citoplasma (Salvetti e Greco, 2014).

As proteínas C dos *Flavivirus* são proteínas pequenas (~12kb) e básicas com os domínios N- e C-terminais carregados separados por uma região hidrofóbica (Sotcheff e Routh, 2019). A distribuição não uniforme dos resíduos carregados positivamente gera uma rede de cargas positivas incomumente grande que faz a oligomerização apenas com proteínas ser improvável. De fato, as proteínas C dos flavivírus parecem ser bastante promíscuas em suas interações com proteínas do hospedeiro, membranas e ácidos nucleicos. Isso pode ser atribuído, em parte, ao seu domínio N-terminal que apresenta uma natureza intrinsecamente desordenada. Proteínas intrinsecamente desordenadas (IDPs, do inglês *intrinsic disordered proteins*), ou que contenham regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs, do inglês *intrinsic disordered regions*), não se dobram espontaneamente em estruturas globulares tridimensionais e se alternam entre diferentes conformações. Essa característica permite que IDPs/IDRs formem complexos heterogêneos e dinâmicos com diversos parceiros. A natureza dinâmica das IDPs/IDRs também permite um número maior de sítios de ligação, o que pode ser ainda mais aumentado pela propensão que essas proteínas têm de sofrer modificações pós-transducionais. Essas características contribuem para que tenham um papel proeminente em redes de sinalização. As IDPs/IDRs participam da formação de diversos complexos de sinalização através de interações proteína- proteína reversíveis (Martins e Santos, 2020). Assim, não é surpreendente que as proteínas C dos flavivírus sejam encontradas em estruturas que se formam como resultado de LLPS, em particular em MLOs, como nucléolos (Colpitts *et al.*, 2011).

Dentre alguns parâmetros biofísicos capazes de afetar a LLPS estão a temperatura e o pH (Uversky, 2017). É possível que as diferenças que observamos em relação ao acúmulo de YFV-C nos nucléolos de células de linhagem humanas e de mosquitos estejam relacionadas a isso. Por exemplo, os mosquitos apresentam uma temperatura corporal de aproximadamente 28°C (Beserra *et al.*, 2009), diferentemente da temperatura corporal humana, que é próxima de 37°C (Laganá *et al.*, 1992). Além disso, o pH sanguíneo do homem é em torno de 7,35 (Hopkins *et al.*, 2022), enquanto no intestino de fêmeas sem repasto sanguíneo o pH está entre 5,5 e 6 (Barguil, 2015). É possível especular ainda que, em última instância, essas diferenças estejam relacionadas às diferentes interações estabelecidas com os diferentes.

2. Justificativa

As arboviroses, em particular as causadas pelos flavivírus, são de grande importância médica, visto que apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade. Além da perda de vidas humanas, há um grande impacto nos sistemas de saúde pública e na economia dos países afetados, inclusive o Brasil. As vacinas existentes contra a Dengue e Febre Amarela, por exemplo, não são amplamente recomendadas devido aos riscos de agravamento da doença em indivíduos vacinados que eram soronegativos e de alergia a componentes da vacina, respectivamente. O DENV continua causando epidemias sazonais no Brasil e no Rio de Janeiro, onde, em 2023, foram registrados 37.256 casos (Ministério da Saúde, 2023). Ademais, devido à expansão das áreas urbanas e a consequente entrada do homem em áreas silvestres, onde há a maior concentração dos agentes transmissores e a presença de primatas amplificadores, os surtos de Febre Amarela, como aconteceram em 2016, tendem a se tornarem frequentes nessas regiões, o que é um risco para a vida das pessoas e para a saúde pública. Assim, torna-se necessário conhecer amplamente os mecanismos dessas infecções virais e a fisiopatologia dessas doenças. Décadas de esforços nos permitiram conhecer muitos aspectos das interações dos flavivírus com seus hospedeiros, mas algumas questões permanecem sem resposta. Uma questão intrigante e ainda não resolvida é o que determina interações tão diferentes entre os flavivírus e seus hospedeiros vertebrados e invertebrados: ao se infectarem, os mosquitos permanecem cronicamente infectados para o resto da vida e não apresentam alterações patológicas. Tampouco apresentam sinais que indiquem redução de 'fitness' como redução da capacidade reprodutiva, tempo de voo ou longevidade. Por outro lado, humanos apresentam uma infecção aguda e autolimitada. A infecção pode ser assintomática ou apresentar sintomas como febre alta, náusea, dores e sangramentos podendo, em certos casos, evoluir para febres hemorrágicas e encefalite, podendo ser fatais. O entendimento do que acarreta quadros tão diferentes pode nos ajudar a desenvolver estratégias terapêuticas mais eficientes.

Nosso grupo vem estudando os mecanismos moleculares das interações entre esses vírus e as células hospedeiras, tanto dos vertebrados quanto dos invertebrados. Em particular, temos buscado elucidar o papel das proteínas do capsídeo dos flavivírus na manipulação da célula hospedeira. Nesse sentido, convém ressaltar que a presença das proteínas de capsídeo de flavivirus no núcleo e nucléolos de células humanas já é bem caracterizada, entretanto os mecanismos que determinam o tráfego e o acúmulo dessas proteínas nesses compartimentos celulares, assim como sua função na interação entre vírus e célula hospedeira ainda permanece largamente não caracterizada. Considerando a similaridade entre as proteínas C

desses flavivírus e os achados semelhantes em relação à sua localização subcelular, é possível que seja uma estratégia comum desse gênero.

Outro dado prévio do nosso grupo (não publicado) relevante nesse contexto, além da confirmação de que a proteína C de YFV se acumula nos nucléolos, é o de que também afeta seu volume e transcrição do DNA ribossomal (Figura 4 e dados não mostrados). Por outro lado, nossos dados mostram que YFV-C não é encontrado nos nucléolos de células de mosquitos infectadas mesmo após vários dias de infecção (Figura 5). Considerando que (i) YFV-C apresenta várias características de proteínas que fazem LLPS; (ii) esse é o mecanismo de formação dos nucléolos; (iii) LLPS é altamente sensível a variações físicas, como temperatura e pH; e que (iv) células de humanos e de mosquitos são submetidas a diferentes condições, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, **nossa hipótese é de que as diferenças de temperatura e pH podem afetar o tráfego de YFV-C para os nucléolos de células humanas e de mosquito.** De fato, os mosquitos apresentam uma temperatura corporal de aproximadamente 28°C (Beserra *et al.*, 2009), diferentemente da temperatura corporal humana, que é próxima de 37°C (Lagan *et al.*, 1992). Além disso, o pH sanguíneo do homem é em torno de 7,35 (Hopkins *et al.*, 2022), enquanto no intestino de fêmeas sem repasto sanguíneo o pH está entre 5,5 e 6 (Barguil, 2015).

Finalmente, a crescente noção de que os nucléolos atuam como *hubs* de várias vias de sinalização, especialmente aquelas relacionadas a respostas ao stress, e que isso tem profundo impacto na homeostase celular, traz à luz a possibilidade de interações de YFV-C nos nucléolos, ou a ausência delas, podem determinar as relações tão diferentes estabelecidas pelo vírus e as células dos seus diferentes hospedeiros. Dessa forma, esse projeto busca, inicialmente, entender se e quais parâmetros biofísicos podem determinar a ida ou não da proteína C do vírus da Febre Amarela para o núcleo de células de hospedeiros vertebrados e invertebrados.

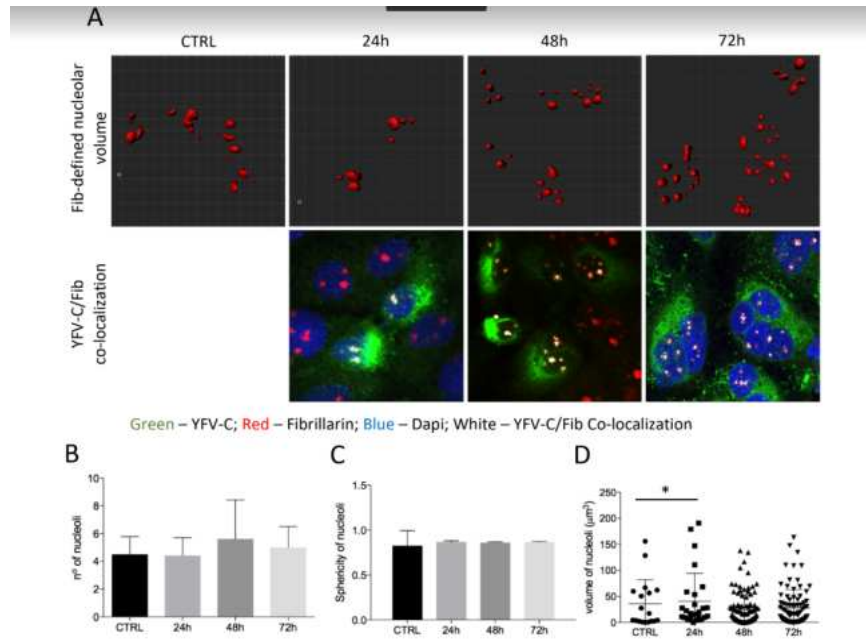


Figura 4- A proteína C do YFV se acumula no nucléolo de células humanas. (A) Imunofluorescência de hepatócitos humanos da linhagem Huh7 infectados com YFV e marcados para YFV-C (verde), para a proteína nucleolar fibrilarina (vermelho) e com Dapi (azul); (B) (C) e (D) quantificação do número, esfericidade e volume dos nucléolos de hepatócitos humanos da linhagem Huh7 infectados com YFV. * $p < 0.05$.

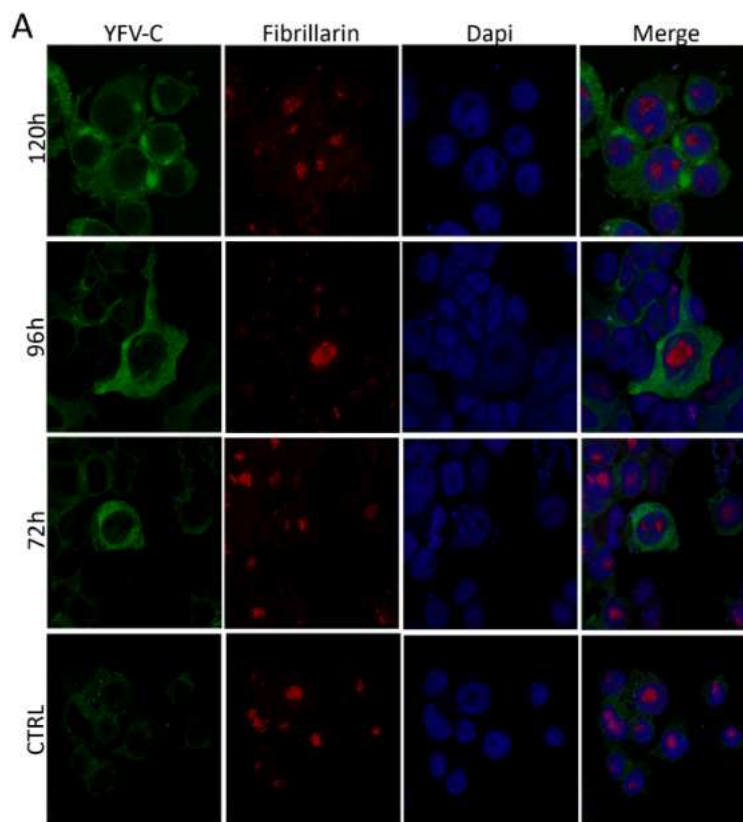


Figura 5- A proteína C do YFV não se acumula no nucléolo de células de mosquitos. (A) Imunofluorescência de células de *Aedes albopictus* infectadas com YFV por 72h, 96h e 120h e marcados para YFV-C (verde), para a proteína nucleolar fibrilarina (vermelho) e com Dapi (azul)

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar se parâmetros biofísicos, especificamente temperatura e pH, interferem no o acúmulo de YFV-C e DENV-C nos nucléolos de células de linhagem humanas e de mosquitos.

3.2. Objetivos específicos

Investigar se o pH (6.2, 7.4 e 8.5) afeta o tráfego de YFV-C e DENV-C para os nucléolos durante a infecção por YFV e DENV, respectivamente em células de linhagem humana;

Investigar se o pH (6.2, 7.4 e 8.5) afeta o tráfego de YFV-C e DENV-C para os nucléolos durante a infecção por YFV e DENV, respectivamente em células de linhagem de mosquitos;

Investigar se a temperatura (28°C e 37°C) afeta o tráfego de YFV-C e DENV-C para os nucléolos durante a infecção por YFV e DENV, respectivamente em células de linhagem humanas;

4. Material e Métodos

4.1. Cultura de células

As linhagens celulares utilizadas para o experimento foram: HUH7 (células de carcinoma derivadas de fígado humana) gentilmente cedidas pela Prof. Andrea da Poian (IBqM, UFRJ), Hela (células epiteliais de adenocarcinoma cervical), gentilmente cedidas pela Dr. Ulrike Kutay (ETH Zurich, Suíça) e C6/36 (células de extrato de larvas de mosquito da espécie *Aedes albopictus*), gentilmente cedidas pela Dra. Mariah Saleh (Instituto Pasteur, Paris, França).

As células humanas foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific*) com alta concentração de glicose (4.5 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, *Thermo Fisher Scientific*) (v/v), 10.000 U/ml penicilina e 10.000 µg/ml estreptomicina (1% v/v solução penicilina/estreptomicina, Lonza) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C e suplementada com CO₂ (gás carbônico) a 5%.

As células de mosquito foram cultivadas em meio L-15 (Leibovitz, Sigma), 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) e incubadas em estufa bacteriológica a 28°C.

4.2. Infecção em diferentes temperaturas

As células foram plaqueadas em 5×10^5 células/poço e incubadas, overnight, em suas respectivas condições de crescimento. Em placas de 24 poços com lamínulas estéreis no fundo, foram cultivadas 2 diferentes linhagens de células, HUH7 e Hela, e incubadas em estufa a 37°C e suplementada com CO_2 a 5%. Em outras placas foram cultivadas células C636 e incubadas em estufa bacteriológica a 28°C . No dia seguinte, foi realizada a infecção com o vírus da Dengue sorotipo 2 (DENV-2) gentilmente cedido pela Prof. Andrea da Poian, IBqM, UFRJ e com o vírus da Febre Amarela cepa 17DD (YFV), gentilmente cedido pelo Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ Rio de Janeiro. Primeiramente, as células de um poço de cada tipo celular foram contadas para o cálculo de partículas infecciosas que seriam inoculadas. A multiplicidade de infecção (MOI) foi de 1. Nos poços controle não houve inoculação, enquanto nos poços teste foram adicionados 200uL de meio DMEM ou L-15 com YFV ou DENV-2. Após a inoculação, as placas foram incubadas, por 1 hora, em estufa com suas respectivas condições de crescimento. Após o tempo de adsorção viral, o inóculo foi retirado e foi adicionado meio DMEM suplementado nas células humanas e meio L-15 nas células de mosquito. Após isso, as placas foram incubadas, por 24h, em estufas com diferentes temperaturas, sendo uma de células humanas e uma de células de mosquito a 37°C com 5% de CO_2 e a outras a 28°C com 5% de CO_2 . Após as 24h, 250uL de sobrenadante foram coletados de cada poço em dois eppendorfs, totalizando 500uL, e congelados em freezer -20°C . As células foram então lavadas três vezes com PBS 1x, fixadas com PBS-PFA 4% (Tampão Fosfato-Salino com Paraformaldeído 4%) por 15 minutos, lavadas novamente três vezes com PBS 1x e colocadas na geladeira com PBS 1x.

4.3. Infecção em diferentes pHs

Em três placas de 24 poços com lamínulas estéreis no fundo, foram cultivadas as linhagens celulares HUH7 e Hela e incubadas em estufa a 37°C e suplementada com CO_2 a 5%. Em outras três placas foram cultivadas células C636 e incubadas em estufa bacteriológica a 28°C . As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células/poço e incubadas, overnight, em suas respectivas condições de crescimento. No dia seguinte, foi realizada a infecção com DENV-2 e com YFV 17DD. Primeiramente, as células de um poço de cada tipo celular foram contadas para o cálculo de partículas infecciosas que seriam inoculadas. A multiplicidade de infecção (MOI) foi de 1. Nos poços controle negativo não houve inoculação, enquanto nos poços teste foram adicionados 200uL de meio com YFV ou DENV-2. Após a inoculação, as placas foram incubadas, por 1 hora, em estufa com suas

respectivas condições de crescimento. Após o tempo de adsorção viral, o inóculo foi retirado e foi adicionado meio DMEM suplementado nas células humanas e meio L-15 nas células de mosquito. Porém, esses meios tiveram seus pHs alterados pelo uso de ácido clorídrico e bicarbonato de sódio. Assim, foram feitos meios L-15 e DMEM com pH de 6,2, 7,4 e 8,5. Dessa forma, uma placa de células humanas e uma de mosquito estavam com meio ácido, outras duas com meio neutro e outras duas com meio básico. Após isso, as placas foram incubadas, por 24h, em estufas com diferentes temperaturas, sendo as de células humanas a 37°C com 5% de CO₂ e as de mosquito a 28°C. Após as 24h, 250uL de sobrenadante foram coletados de cada poço em dois eppendorfs, totalizando 500uL, e congelados em freezer -20°C. As células foram então lavadas três vezes com PBS 1x, fixadas com PBS-PFA 4% por 15 minutos, lavadas novamente três vezes com PBS 1x e colocadas na geladeira com PBS 1x.

4.4. LDH

Em uma placa de 96 poços, adicionamos 50 uL da Mistura de Reação do kit *CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)* por poço. Posteriormente, adicionamos 50 uL dos sobrenadantes coletados das placas de infecção e dos controles e incubamos a placa por 30 minutos, em temperatura ambiente e protegida da luz. As amostras estavam congeladas em freezer -20°C e foram descongeladas. Nos controles positivos, foi adicionado PBS-Triton X-100 para lisar as células, por 5 minutos. Finalmente, adicionamos 50 uL da Solução de Parada e analisamos os comprimentos de onda no aparelho *SpectraMax®* em 490 nm e 680 nm, organizamos os dados no programa *Microsoft Excel* e montamos os gráficos no programa *GraphPad Prism 10*.

4.5. Titulação

Em placas de 24 poços, foram cultivadas, overnight e em estufa a 37°C, 1×10^5 células VERO (células epiteliais de rim de macaco verde) por poço em meio DMEM com 10% SFB. No dia seguinte, foram feitas as diluições seriadas, em meio DMEM sem SFB, das amostras a serem testadas, de C636 e HUH7, de 10^1 a 10^7 . Após isso, o meio das placas de cultura já contendo células VERO aderidas foi retirado e, em duplicata, foram adicionados 100 µL de cada diluição seriada. Após isso, a placa foi incubada em estufa a 37°C, por uma hora, a fim de permitir a adsorção viral. Passado esse tempo, o inóculo foi retirado e foi adicionado 1 mL de CMC completo (carboximetilcelulose) por poço e a placa foi incubada em estufa novamente, por 7 dias. Após esse tempo, foi feita a revelação. Para isso, após a retirada do CMC, adicionou-se 1mL de Paraformaldeído 4% com Cristal Violeta 0,04% em

cada poço, a fim de fixar e corar as células. A placa foi, então, incubada em temperatura ambiente, overnight. Finalmente, realizou-se a contagem do número de plaques nas duplicatas de cada diluição e fez-se a média entre os dois poços e esse número foi multiplicado pelo fator de diluição correspondente, dando assim o título viral em PFU/mL.

4.6. Imunofluorescência

As placas foram retiradas da geladeira, o PBS foi retirado e foi feita, então a permeabilização, com 500uL de PBS-Triton X-100 por 10 minutos. Posteriormente, foi realizado o bloqueio, com PBS-BSA 5% PBS-BSA (Tampão Fosfato-Salino com Albumina Sérica Bovina 5%), por 20 minutos. Enquanto as células estavam, com o bloqueio, diluímos o anticorpo primário em PBS-BSA 5%, de 1:1000. O anticorpo anti-YFV-C foi feito sob encomenda e gentilmente cedido pelo Dr. Alexander Tarakhovsky, da Rockefeller University (NY, EUA) e o anticorpo anti-DENV-C foi obtido da GeneTex. Adicionou-se 50 uL do anticorpo primário diluído e incubamos por 1h, em ambiente úmido. Após esse tempo, lavamos 3 vezes com PBS e duas vezes com PBS-BSA 5%. Diluímos o anticorpo secundário (anti-coelho Alexa Fluor 488, Invitrogen) em PBS-BSA 5%, de 1:1000. Adicionamos 50 uL do anticorpo secundário diluído e incubamos por 1h, em ambiente úmido e protegido da luz. Após esse tempo, lavamos 3 vezes com PBS. Finalmente, montamos as lâminas com o Prolong Gold, que já contém o DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) e analisamos em microscópio de fluorescência.

5. Resultados

5.1. A temperatura de cultivo não afeta o tráfego de YFV-C para o nucléolo

Considerando que células de mosquito são mantidas na temperatura de 28°C, de acordo com a temperatura corporal deles, em contraste com as células de linhagem humana, que são mantidas a 37°C, e que a temperatura é outro parâmetro biofísico que pode afetar as propriedades de LLPS de proteínas, nós investigamos se a localização subcelular de YFV-C seria afetada pela manutenção das células infectadas em diferentes temperaturas. Como podemos observar na figura 6, a infecção de células HUH7 com YFV em 28°C ou 37°C não afeta a localização subcelular de YFV-C.

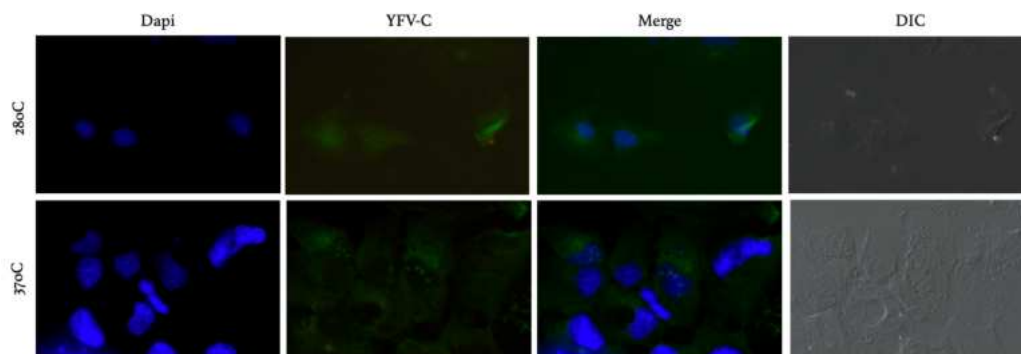


Figura 6 – Localização subcelular de YFV-C em células HUH7 mantidas em meios com diferentes temperaturas. Células HUH7 foram infectadas com YFV 17DD, com MOI de 1, por 24 horas e mantidas em estufa a 28°C ou 37°C (n =1). Marcados para YFV-C (verde) e com Dapi (azul).

5.2. O pH extracelular não afeta o tráfego de YFV-C e DENV-C para o nucléolo

Como mencionado na introdução, o pH extracelular afeta o tráfego da proteína NS5 de DENV para os nucléolos. Adicionalmente, considerando a nossa hipótese de trabalho de que o acúmulo de YFV-C e DENV-C nos nucléolos é dependente de sua capacidade de fazer LLPS, que por sua vez é afetada pelo pH do meio, iniciamos nossos experimentos testando se alterações no pH extracelular afetaria a localização das proteínas do capsídeo durante a infecção com YFV ou DENV em linhagens de células humanas. Como podemos observar na figura 7, YFV-C se acumula de forma semelhante em hepatócitos da linhagem HUH7 infectados com YFV e mantidos em meio extracelular com pH 6.2, 7.4 ou 8.5. De forma similar, o acúmulo de DENV-C nos nucléolos de células HUH7 infectadas não foi diferente em células mantidas em meio com pHs 6.2, 7.4 ou 8.5 (Figura 8).

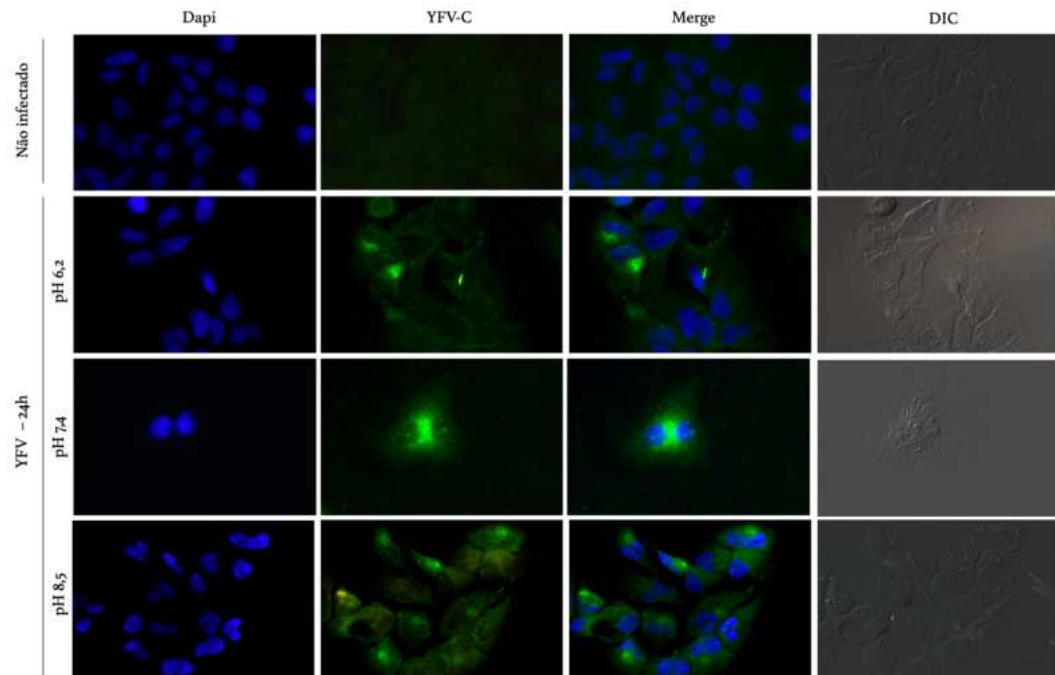


Figura 7 – Localização subcelular de YFV-C em células HUH7 mantidas em meios com diferentes pHs. Células HUH7 foram infectadas com YFV 17DD, com MOI de 1, por 24 horas e mantidas em meio com pHs 6.2, 7.4 ou 8.5 (n=1). Marcados para YFV-C (verde) e com Dapi (azul).

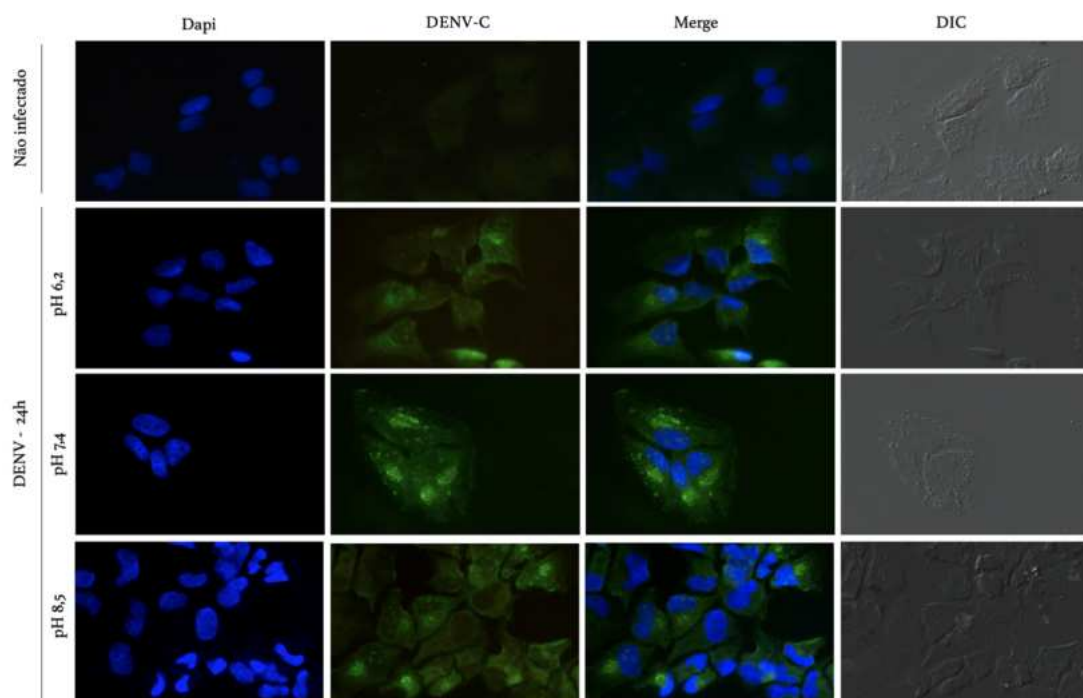


Figura 8 – Localização subcelular de DENV-C em células HUH7 mantidas em meios com diferentes pHs. Células HUH7 foram infectadas com DENV-2, com MOI de 1, por 24 horas e mantidas em meio com pHs 6.2, 7.4 ou 8.5 (n=1). Marcados para DENV-C (verde) e com Dapi (azul).

Testamos também o acúmulo de YFV-C nos nucléolos de outra linhagem de células humanas. Em células HeLa, uma linhagem de células epiteliais, também observamos o acúmulo de YFV-C nos nucléolos, independentemente do pH do meio extracelular.

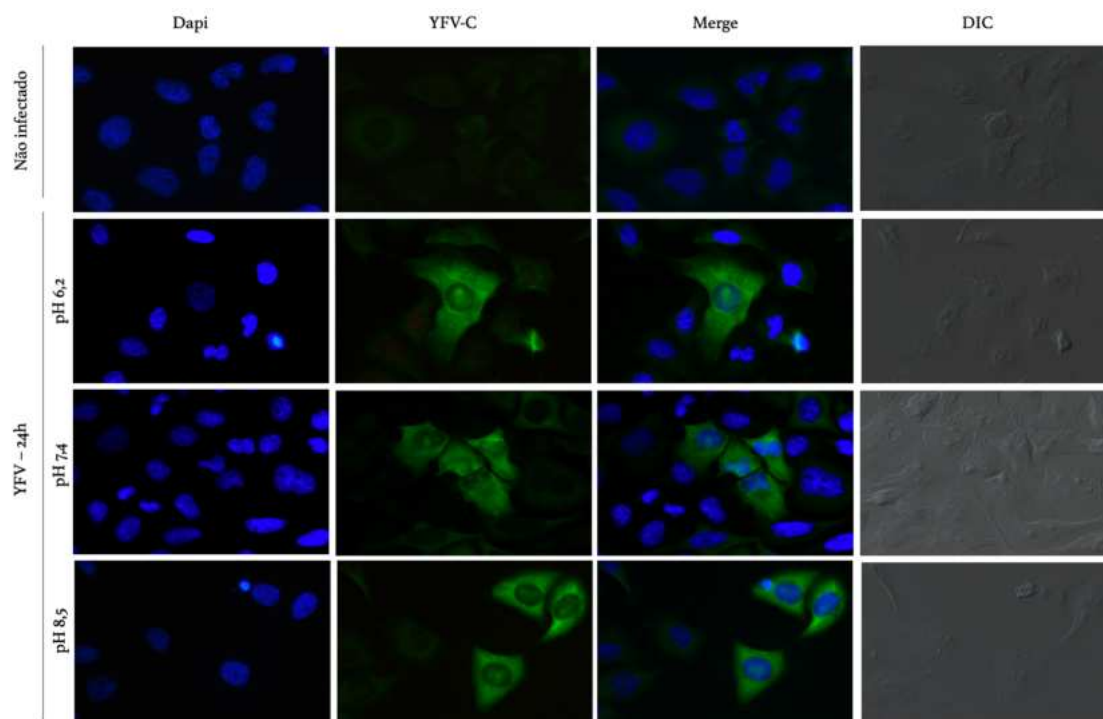


Figura 9 – Localização subcelular de YFV-C em células HeLa mantidas em meios com diferentes pHs. Células HeLa foram infectadas com YFV 17DD, com MOI de 1, por 24 horas e mantidas em meio com pHs 6.2, 7.4 ou 8.5 (n=1). Marcados para YFV-C (verde) e com Dapi (azul).

Em seguida, fizemos o mesmo tipo de análise em linhagens de células do mosquito transmissor da febre amarela, *Aedes albopictus*. Como já mencionado anteriormente, dados não publicados do nosso grupo demonstraram que YFV-C e DENV-C não se acumulam nos nucléolos de células de *A. albopictus* (tanto na linhagem U4.4 quanto na linhagem C6/36) e nem de *Aedes aegypti* (linhagem Aag2). Nosso objetivo agora era verificar se alterações no pH extracelular poderiam resultar no tráfego de dessas proteínas para os nucléolos de células de mosquito. Como podemos observar nas figuras 10 e 11, diferenças no pH extracelular não alteraram o padrão de localização subcelular de YFV-C ou DENV-C.

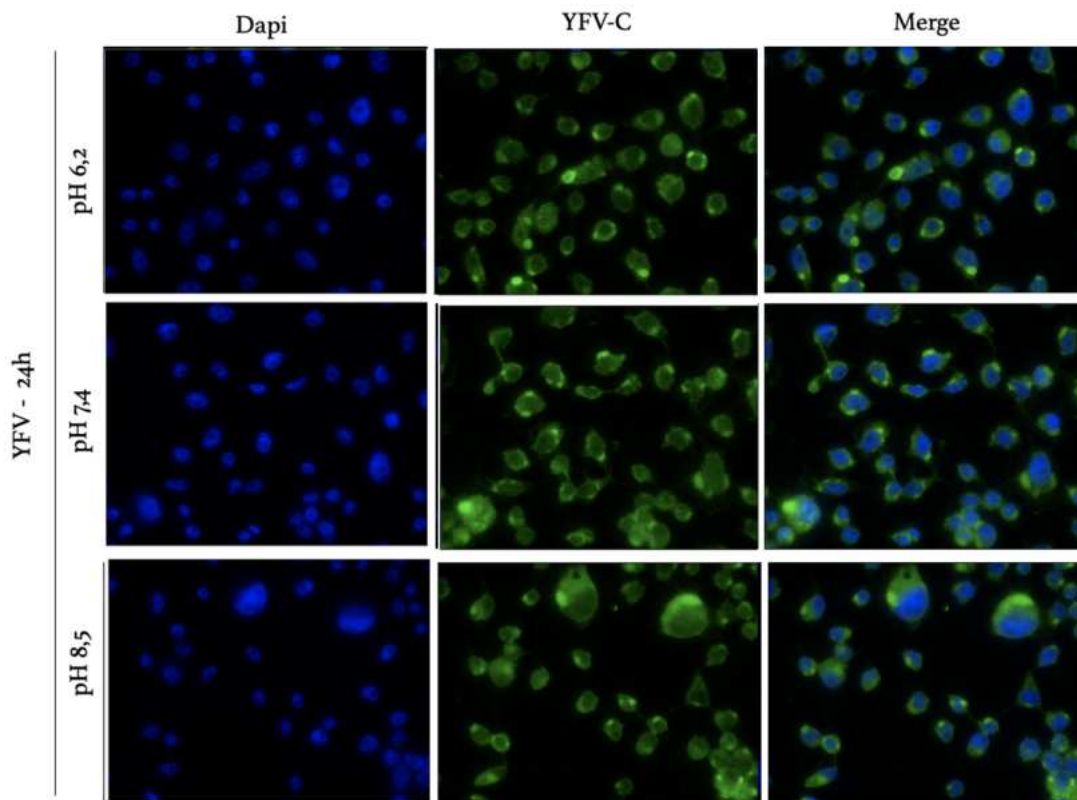


Figura 10 – Localização subcelular de YFV-C em células C6/36 mantidas em meios com diferentes pHs. Células C6/36 foram infectadas com YFV 17DD, com MOI de 1, por 24 horas e mantidas em meio com pHs 6.2, 7.4 ou 8.5 (n=1). Marcados para YFV-C (verde) e com Dapi (azul).

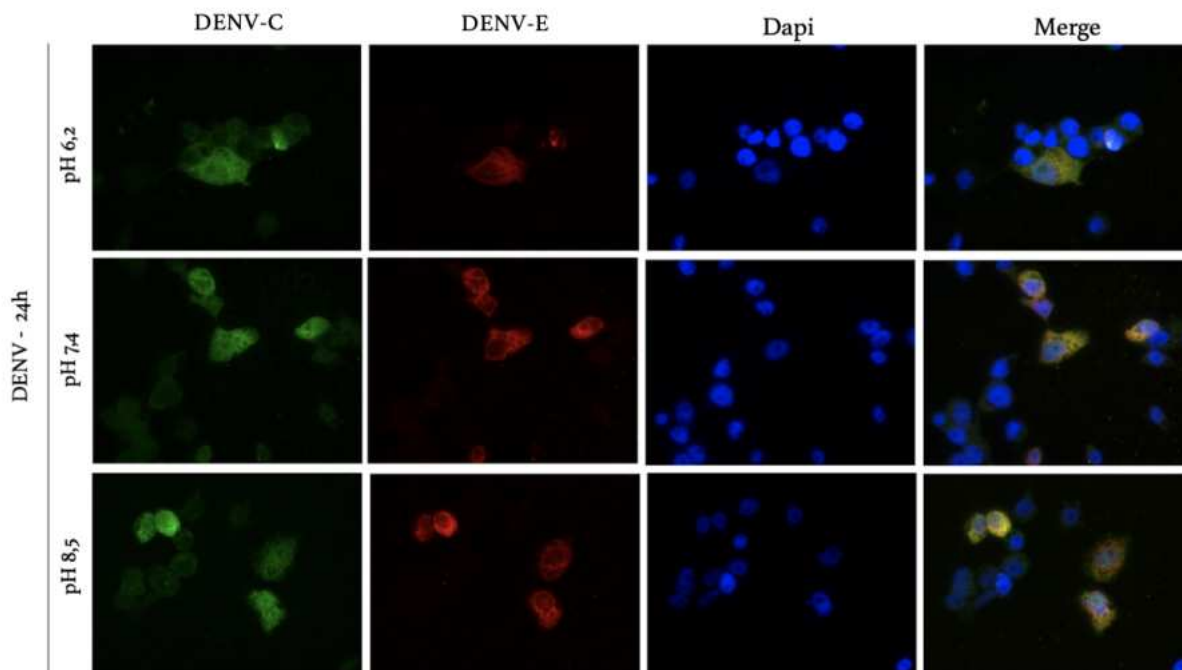


Figura 11 – Localização subcelular de DENV-C em células C6/36 mantidas em meios com diferentes pHs. Células C6/36 foram infectadas com DENV-2, com MOI de 1, por 24 horas e mantidas em meio com pHs 6.2, 7.4 ou 8.5 (n=1). Marcados para DENV-C (verde), para DENV-E (vermelho) e com Dapi (azul)

5.3. LDH

A fim de visualizar a morte celular nas diferentes condições, realizamos ensaios de citotoxicidade de liberação de lactato desidrogenase (LDH). Como podemos observar na figura 12,13 e 14 nas quais quantificamos a morte celular em células C636, Huh7 e Hela, respectivamente, as diferentes condições não parecem induzir mortes diferentes.

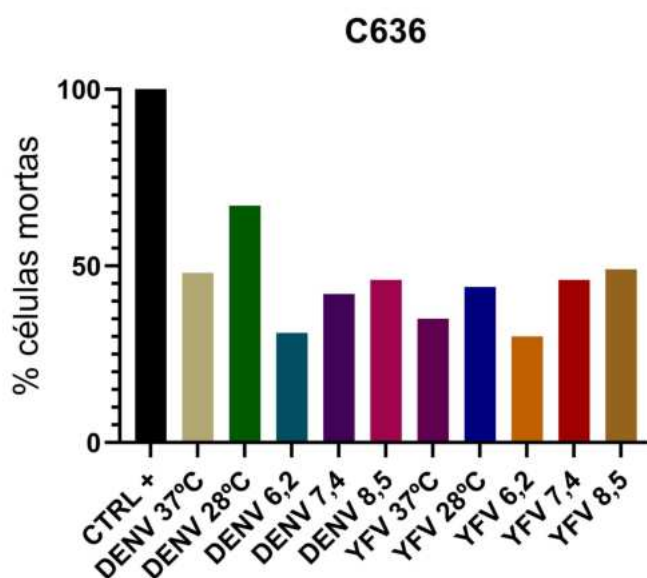


Figura 12 –Quantificação de morte celular das células C636. Células C6/36 foram infectadas com DENV-2 e YFV, com MOI de 1, por 24 horas e mantidas em meio com pHs 6.2, 7.4 ou 8.5 (n=1) ou em estufas a 37°C ou 28°C (n=1).

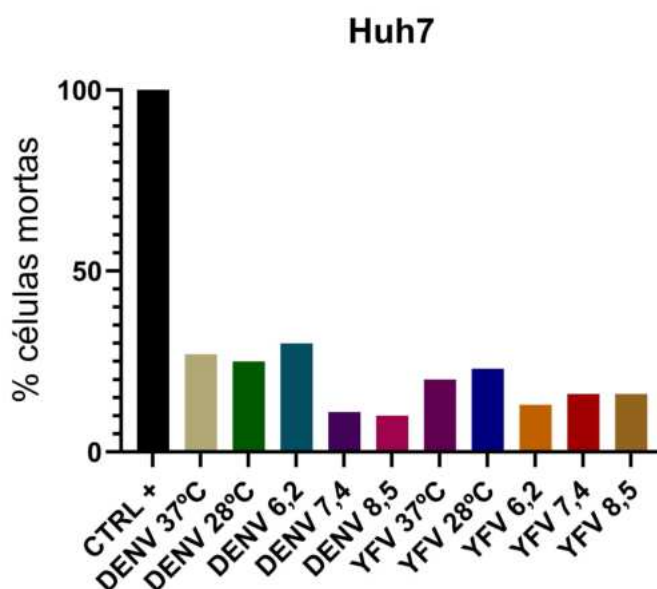


Figura 13 –Quantificação de morte celular das células Huh7. Células Huh7 foram infectadas com DENV-2 e YFV, com MOI de 1, por 24 horas e mantidas em meio com pHs 6.2, 7.4 ou 8.5 (n=1) ou em estufas a 37°C ou 28°C (n=1).

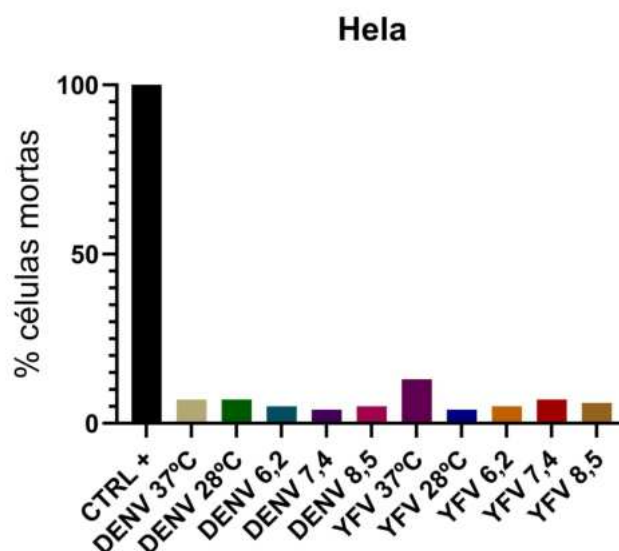


Figura 13 –Quantificação de morte celular das células Hela. Células Hela foram infectadas com DENV-2 e YFV, com MOI de 1, por 24 horas e mantidas em meio com pHs 6.2, 7.4 ou 8.5 (n=1) ou em estufas a 37°C ou 28°C (n=1).

5.4. Titulação

Os ensaios de titulação apresentaram problemas técnicos impossibilitando a visualização de plaques e quantificação das partículas virais infecciosas. Estamos no processo de repetir esses experimentos.

6. Discussão

Esse projeto está inserido dentro de uma linha de pesquisa que trata de um tema de extrema relevância para saúde pública no Brasil e no mundo. As arboviroses representam um enorme problema não só de saúde pública, mas também têm um custo social e econômico importante (Girard *et al.*, 2020). Nosso grupo vem, ao longo dos últimos anos, dedicando esforços ao entendimento de mecanismos de manipulação viral que interferem com processos muito fundamentais e conservados na biologia celular (como a transcrição gênica, a função dos nucléolos, os mecanismos ancestrais de resposta ao stress), e que são resultado de um longo processo de co-evolução do vírus com seus hospedeiros (Kájan *et al.*, 2020; LaTourrette e Garcia-Ruiz, 2022). A compreensão de como um agente infeccioso, no caso os flavivirus, com um conjunto tão reduzido de proteínas consegue manipular de forma tão distinta seus diferentes hospedeiros pode ser muito útil para o entendimento da biologia e a patogênese desses vírus.

Dados não publicados do nosso grupo (Figura 4) mostraram que a proteína C de YFV se acumula nos nucléolos de células humanas afetando a transcrição dependente da RNA

polimerase I, a enzima responsável pela transcrição do RNA ribossomal. Com isso, hipotetizamos que, nessas células, a localização de YFV-C nos nucléolos tenha um impacto no desenvolvimento da infecção. Recentemente, proteômica quantitativa e biologia de sistemas foram instrumentais para elucidar a biologia dos nucléolos e sugeriram uma relação mais profunda do que se poderia supor entre vírus e o nucléolo. Essas técnicas nos deram uma nova visão da dinâmica e natureza complexa dos nucléolos com a identificação de mais de 6000 proteínas que se localizam nos nucléolos. Entre elas algumas são residentes como, por exemplo, nucleolina, B23 e fibrilarina; e outras transitórias, como p53, p68 e von-Hippel Lindau. Apenas 30% das proteínas do proteoma nucleolar são sabidamente envolvidas na biogênese de ribossomos e uma grande parte atua em processos como regulação do ciclo celular, processamento de mRNA, replicação ou reparo de DNA ou ainda não tem função identificada (Rawlinson e Moseley, 2015). É sabido que o estresse nucleolar é uma resposta comum a vários tipos de estresse, inclusive infecções, que pode levar à apoptose induzida por p53. Frequentemente, em infecções virais, a apoptose pode ser considerada um mecanismo antiviral já que eliminar as células infectadas restringe a possibilidade de replicação viral e, portanto, propagação viral (Okamoto *et al.*, 2017). Entretanto, em relação ao papel das proteínas do capsídeo nos nucléolos de células humanas, ainda existem muito mais perguntas do que respostas: Seria esse um mecanismo de defesa em células humanas ausente em células de mosquitos? Nossos dados não publicados também indicam que YFV-C interage com várias proteínas nucleolares. É possível que haja algum reconhecimento específico para ativar respostas específicas nos nucléolos? Ou essas respostas dependerão simplesmente do acúmulo de YFV-C nos nucléolos resultando em sua ruptura? Por outro lado, poderiam os vírus tirar alguma vantagem da presença de YFV-C nos nucléolos ao modular o ciclo celular ou a biogênese de ribossomos, por exemplo? Nosso primeiro objetivo inclui também compreender o papel biológico de YFV-C nos nucléolos.

Ainda há muito que não sabemos a respeito do tráfego de proteínas para os nucléolos. Apesar de os nucléolos não serem delimitados por membranas, o recrutamento de proteínas é altamente específico e envolve a interação com componentes nucleolares, DNA ribossomal, RNA ribossomal (rRNA) e proteínas residentes (Latonen, 2019). Em humanos, nucléolos maduros estão associados à cromatina perinucleolar, sequências de DNA localizadas próximas das regiões organizadoras dos nucléolos (NOR, do inglês *nucleolar organizing regions*) que são compostas de repetições de DNA ribossomal (Mangan, Gailín e McStay, 2017). Hoje em dia, acredita-se que a formação dos nucléolos se dá pela combinação do recrutamento ativo de proteínas que formam um arcabouço nessas regiões, e que são proteínas

resistentes, e de LLPS, que permite a entrada e saída de proteínas, tornando os nucléolos extremamente dinâmicos (Guillen-Chable *et al.*, 2021). Como mencionado acima, mais de 6000 proteínas já foram encontradas nos nucléolos mas apenas uma fração dessas é de proteínas residentes. A entrada e saída da maioria dessas proteínas nos nucléolos depende de estímulos específicos e do contexto celular e são, em grande parte, mediadas por LLPS. As proteínas do capsídeo dos flavivírus apresentam várias características típicas de proteínas que fazem LLPS, como possuir uma região intrinsecamente desordenada, uma proporção maior do que o normal de aminoácidos apolares e alifáticos, e um domínio que se liga a RNA (Lopes *et al.*, 2019; Martins e Santos, 2020).

Considerando que LLPS é extremamente sensível a variações de temperatura, quantidade de proteína, ácido nucléico ou concentração de sal (Alberti *et al.*, 2019), hipotetizamos que manipular essas condições poderiam afetar a capacidade de YFV-C e DENV-C se acumular nos nucléolos durante a infecção *in vitro*. Nossos resultados preliminares apontam que o pH extracelular (6.2, 7.4 ou 8.5) ou a variação de temperatura (28°C e 37°C) não impactam no tráfego de YFV-C e DENV-C para os nucléolos. Entretanto, esses resultados precisam não só ser repetidos como ampliados. Além da quantificação do número de células apresentando YFV-C ou DENV-C nos nucléolos entre aquelas sabidamente infectadas pela marcação da proteína, pretendemos refinar nossa análise através de microscopia confocal, onde poderemos avaliar parâmetros como volume, esfericidade, compactação e co-localização com outras proteínas. Considerando os nossos dados preliminares, temos que levar em conta que as células eucarióticas dispõem de uma variedade de mecanismos para manter sua homeostase, o que inclui a manutenção do seu pH e temperaturas intracelulares mesmo em ambientes em que esses parâmetros variam (Pakos-Zebrucka, 2016). Assim, é possível que as variações extracelulares que impusemos durante o experimento não tenham afetado o ambiente intracelular. Por outro lado, devemos considerar também que parâmetros, como pH, por exemplo, não são iguais em todos os compartimentos subcelulares e que microambientes dentro da célula podem sofrer grandes variações para permitir que reações específicas aconteçam (Asokan, 2002). Assim, ainda é possível e até provável que condições físico-químicas afetem a capacidade de YFV-C e DENV-C de fazer LLPS e que isso impacte no seu recrutamento no microambiente nuclear/nucleolar. Um estudo complementar que vem sendo realizado no nosso laboratório está investigando as propriedades de LLPS da proteína YFV-C *in vitro*, num sistema *cell-free*.

Por outro lado, dados não publicados do nosso laboratório (Figura 5), mostram que durante a infecção por YFV ou DENV, as respectivas proteínas C não se acumulam em

linhagens de células de mosquitos, o hospedeiro invertebrado. Assim como ainda não sabemos os mecanismos envolvidos no tráfego das proteínas C de flavivírus para os nucléolos de células humanas, também ainda não sabemos quais são as diferenças que fazem com o que o mesmo não aconteça nas células de mosquito. Isso pode envolver diferenças físico-químicas, interações específicas com proteínas ou RNA ou ainda a presença/ausência de modificações pós-translacionais que ocorrem de forma diferente nas células dos dois hospedeiros.

Considerando a diferença tão dramática que observamos em relação ao acúmulo de YFV-C e DENV-C nos nucléolos de células humanas e de mosquitos e que é igualmente dramática as consequências da infecção em termos de sobrevivência/morte celular entre as células dos dois hospedeiros, é tentador especular que presença dessas proteínas virais nos nucléolos exerça um papel importante durante a infecção. Essa especulação ganha força com a recente literatura que mostra que os nucléolos atuam como importantes plataformas de sinalização por onde passam vias que determinam o destino da célula.

Em suma, com os experimentos realizados até agora, ainda não podemos descartar que parâmetros biofísicos possam influenciar o tráfego/acúmulo das proteínas C de flavivírus para os nucléolos. Estudos adicionais serão necessários para elucidar essa questão.

7. Conclusão

Os resultados da imunofluorescência não demonstraram diferenças no tráfego de YFV-C e DENV-C para os nucléolos de células de linhagem humana durante a infecção por YFV e DENV nem em diferentes temperaturas nem em diferentes pHs. Além disso, o pH também não alterou o tráfego dessas proteínas em células de linhagem de mosquitos.

Os resultados de LDH mostraram que as diferentes condições, em uma mesma linhagem celular infectada, não induzem porcentagens diferentes de morte celular.

Assim, novos experimentos devem ser realizados, a fim de confirmar que esses parâmetros biofísicos não estão relacionados com a co-localização da proteína C de *Flavivirus* no nucléolo das células hospedeiras.

8. Referências bibliográficas

Acosta, E. G., Castilla, V., and Damonte, E. B. (2008). Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 89, 474–484.

Alberti, S., Gladfelter, A., & Mittag, T. (2019). Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell*, 176(3), 419–434.

Asokan, A., & Cho, M. J. (2002). *Exploitation of Intracellular pH Gradients in the Cellular Delivery of Macromolecules*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(4), 903–913. doi:10.1002/jps.10095

Barguil, D. (2015). Controle do pH no tubo digestivo de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em diferentes condições fisiológicas. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 56f.

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.

Beserra, E. B., Fernandes, C. R. M., Silva, S. A. de O., Silva, L. A. da ., & Santos, J. W. dos .. (2009). Efeitos da temperatura no ciclo de vida, exigências térmicas e estimativas do número de gerações anuais de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Iheringia. Série Zoologia*, 99(2), 142–148.

Blahove, M.R.; Carter, J.R. Flavivirus Persistence in Wildlife Populations (2021). *Viruses*, 13, 2099.

Brangwynne, C. P., Mitchison, T. J., & Hyman, A. A. (2011). Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(11), 4334–4339.

Byk LA & Gamarnik AV. (2016). Properties and functions of the Dengue virus capsid protein. *Annual Review of Virology*, 3:263.

Colpitts, T. M., Barthel, S., Wang, P., & Fikrig, E. (2011). Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells. *PloS one*, 6(9), e24365.

Da Saúde, M. Monitoramento das arboviroses urbanas: semanas epidemiológicas 1 a 35 de 2023. [s.l: s.n.].

Delrieu, M., Martinet, J. P., O'Connor, O., Viennet, E., Menkes, C., Burtet-Sarramegna, V., Frentiu, F. D., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2023). Temperature and transmission of chikungunya, dengue, and Zika viruses: A systematic review of experimental studies on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Current research in parasitology & vector-borne diseases*, v. 4, n. 100139, p. 100139, 2023.

Fernandez-Garcia, M. D., Mazzon, M., Jacobs, M., & Amara, A. 2009. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell host & microbe*, 5(4), 318–328.

Fiocruz. Dengue. Disponível em: <<https://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/aedesvetoredoenca.html>>. Acesso em: 1 dez. 2023.

Fishburn AT, Pham OH, Kenaston MW, Beesabathuni NS and Shah PS (2022) Let's Get Physical: Flavivirus-Host Protein-Protein Interactions in Replication and Pathogenesis. *Front. Microbiol.* 13:847588.

Fisher, R.; Lustig, Y.; Sklan, E.H.; Schwartz, E. (2023) The Role of NS1 Protein in the Diagnosis of Flavivirus Infections. *Viruses*, 15, 572.

Franzmann, T. M., Jahnel, M., Pozniakovsky, A., Mahamid, J., Holehouse, A. S., Nüske, E., Richter, D., Baumeister, W., Grill, S. W., Pappu, R. V., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2018). Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6371), eaa05654.

Fraser, J. E., Rawlinson, S. M., Heaton, S. M., & Jans, D. A. (2016). Dynamic Nucleolar Targeting of Dengue Virus Polymerase NS5 in Response to Extracellular pH. *Journal of virology*, 90(12), 5797–5807.

Frottin, F., Schueder, F., Tiwary, S., Gupta, R., Körner, R., Schlichthaerle, T., Cox, J., Jungmann, R., Hartl, F. U., & Hipp, M. S. (2019) The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6451), 342–347.

- 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*, 38(24), 162–168.
- Girard, M., Nelson, C. B., Picot, V., & Gubler, D. J. (2020). Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine*, 38(24), 3989–3994.
- Greco A. (2009). Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Reviews in medical virology*, 19(4), 201–214.
- Guillen-Chable, F., Bayona, A., Rodríguez-Zapata, L. C., & Castano, E. (2021). Phase Separation of Intrinsically Disordered Nucleolar Proteins Relate to Localization and Function. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 13095.
- Ishida, K., Yagi, H., Kato, Y., & Morita, E. (2023). N-linked glycosylation of flavivirus E protein contributes to viral particle formation. *PLoS pathogens*, 19(10), e1011681.
- Kaján, G. L., Doszpoly, A., Tarján, Z. L., Vidovszky, M. Z., & Papp, T. (2020). Virus-Host Coevolution with a Focus on Animal and Human DNA Viruses. *Journal of molecular evolution*, 88(1), 41–56.
- Kim, H. J.; Kim, N. C.; Wang, Y. D.; Scarborough, E. A. et al.(2013) Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*, 495, n. 7442, p. 467-473
- Klaitong, P.; Smith, D.R. (2021) Roles of Non-Structural Protein 4A in Flavivirus Infection. *Viruses*, 13, 2077.
- Kok, B. H., Lim, H. T., Lim, C. P., Lai, N. S., Leow, C. Y., & Leow, C. H. (2023). Dengue virus infection - a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. *Virus research*, 324, 199018.
- Laganá, M.T.C.; Faro, A.C.M. e; Araújo, T.L. (1992). A problemática da temperatura corporal, enquanto um procedimento de enfermagem: conceitos e mecanismos reguladores. *Rev. Esc. Enf. USP*, v. 26, n. 2, p. 173-86.
- Latonen L. 2019. Phase-to-Phase With Nucleoli - Stress Responses, Protein Aggregation and Novel Roles of RNA. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 151.
- LaTourrette, K., & Garcia-Ruiz, H. (2022). Determinants of Virus Variation, Evolution, and Host Adaptation. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1039.
- Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, e Khromykh AA (2008). Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *Journal of virology* 82, 4731–4741.
- Li P, et al (2012) Phase transitions in the assembly of multivalent signaling proteins. *Nature*, 483 (7389), 336-340
- Lopes, R. L. Pinto, J. R., Junior, G. B. S. Santos, A. K. T., Souza, M. T. O. Daher, E. F. (2019) Kidney involvement in yellow fever: a review. *Journal of the sao paulo institute of tropical medicine*, 61, e35.
- López-Medina, E., Biswal, S., Saez-Llorens, X., Borja-Tabora, C., Bravo, L., Sirivichayakul, C., Vargas, L. M., Alera, M. T., Velásquez, H., Reynales, H., Rivera, L., Watanaveeradej, V., Rodriguez-Arenales, E. J., Yu, D., Espinoza, F., Dietze, R., Fernando, L. K., K. Wickramasinghe, P., Duarte Moreira, E., Fernando, A. D., ... Borkowski, A. (2022). Efficacy of a Dengue Vaccine Candidate (TAK-003) in Healthy Children and Adolescents 2 Years after Vaccination. *The Journal of infectious diseases*, 225(9), 1521–1532.
- Mangan, H., Gailín, M. Ó., & McStay, B. (2017). Integrating the genomic architecture of human nucleolar organizer regions with the biophysical properties of nucleoli. *The FEBS journal*, 284(23), 3977–3985.
- Martins, I. C., & Santos, N. C. (2020). Intrinsically disordered protein domains in flavivirus infection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 108298. doi:10.1016/j.abb.2020.108298

Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A. P., Kim, H. J., Mittag, T., & Taylor, J. P. (2015). Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell*, *163*(1), 123–133.

Monath, T. P. (2008). Treatment of yellow fever. *Antiviral Research*, *78*, 116–124.

Monath, T. P., & Vasconcelos, P. F. (2015). Yellow fever. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, *64*, 160–173.

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 yellow 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

Neufeldt, C. J., Cortese, M., Scaturro, P., Cerikan, B., Wideman, J. G., Tabata, K., et al. (2019). ER-shaping atlastin proteins act as central hubs to promote flavivirus replication and virion assembly. *Nat. Microbiol.* *4*, 2416–2429.

Okamoto, T., Suzuki, T., Kusakabe, S., Tokunaga, M., Hirano, J., Miyata, Y., & Matsuura, Y. (2017). Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses*, *9*(9), 243.

Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016). The integrated stress response. *EMBO reports*, *17*(10), 1374–1395.

Patel, A., Lee, H. O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M. Y., Stoynev, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T. M., Pozniakovski, A., Poser, I., Maghelli, N., Royer, L. A., Weigert, M., Myers, E. W., Grill, S., Drechsel, D., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell*, *162*(5), 1066–1077.

Pereira, L. H. S., de Souza, T. P. P., Camargos, V. N., de Oliveira Barbosa, L. A., Taranto, A. G., Junior, M. C., de Lima Santos, H., de Oliveira Lopes, D., Ferreira, J. M. S., & Dos Santos, L. L. (2019). Assays with recombinant soluble isoforms of DC-SIGN, a dengue virus ligand, show variation in their ability to bind to mannose residues. *Archives of virology*, *164*(11), 2793–2797.

Pestana, C. P., Lawson-Ferreira, R., Lessa-Aquino, C., Leal, M. D. L. F., Freire, M. D. S., Homma, A., & Medeiros, M. A. (2018). Sanger-based sequencing technology for yellow fever vaccine genetic quality control. *Journal of virological methods*, *260*, 82–87.

Pujhari, S., Brustolin, M., Macias, V. M., Nissly, R. H., Nomura, M., Kuchipudi, S. V., & Rasgon, J. L. (2019). Heat shock protein 70 (Hsp70) mediates Zika virus entry, replication, and egress from host cells. *Emerging microbes & infections*, *8*(1), 8–16.

Rawlinson, S.M. and Moseley, G.W. (2015), Nucleolar targeting of RNA viruses. *Cell Microbiol*, *17*: 1108-1120.

Richard, A. S., Shim, B. S., Kwon, Y. C., Zhang, R., Otsuka, Y., Schmitt, K., Berri, F., Diamond, M. S., & Choe, H. (2017). AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(8), 2024–2029.

Romanos, M. T. V.; Cavalcanti, J. F. Febre Amarela e Dengue. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. V.; WIGG, M. D. *Virologia Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 399-409

Schmidt K, Keller M, Bader BL, Korytář T, Finke S, Ziegler U, Groschup MH. (2013) Integrins modulate the infection efficiency of West Nile virus into cells. *J Gen Virol.* 94(Pt 8):1723-1733.

Salvetti, A., & Greco, A. (2014) Viruses and the nucleolus: the fatal attraction. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(6), 840–847.

Samuel, G. H., Wiley, M. R., Badawi, A., Adelman, Z. N., & Myles, K. M. (2016). Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(48), 13863–13868.

Stanek, D. e Fox, A. H. (2017). Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 46, 94–101.

Tan Z, Wu J, Huang L, Wang T, Zheng Z, Zhang J, et al. (2023) LGP2 directly interacts with flavivirus NS5 RNA-dependent RNA polymerase and downregulates its pre-elongation activities. *PLoS Pathog* 19(9): e1011620.

Theiler, M., & Smith, H. H. (1937). The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *The Journal of experimental medicine*, 65(6), 787–800.

Thongtan, T., Wikan, N., Wintachai, P., Rattananungsan, C., Srisomsap, C., Cheepsunthorn, P. and Smith, D.R. (2012), Characterization of putative Japanese encephalitis virus receptor molecules on microglial cells. *J. Med. Virol.*, 84: 615-623.

Vasconcelos, Pedro Fernando da Costa. 2003. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [online]. v. 36, n. 2 , pp. 275-293.

Wahaab, A.; Mustafa, B.E.; Hameed, M.; Stevenson, N.J.; Anwar, M.N.; Liu, K.; Wei, J.; Qiu, Y.; Ma, Z. (2022) Potential Role of Flavivirus NS2B-NS3 Proteases in Viral Pathogenesis and Anti-flavivirus Drug Discovery Employing Animal Cells and Models: A Review. *Viruses*, 14, 44.

Wang, Y., Xie, X., & Shi, P. Y. (2022). Flavivirus NS4B protein: Structure, function, and antiviral discovery. *Antiviral research*, 207, 105423.

Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller. S. D., Antony. C., Krijnse-Locker. J. e Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe*, 5, 365–375.

WHO. (2009). *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition.*

WHO. Dengue vaccine: WHO position paper—September 2018. *Wkly Epidemiol Rec* 2018; 93:457–76.

WHO. (2023). *Dengue and severe dengue.*

Zhang, X., Liang, C., Wang, H., Guo, Z., Rong, H., Pan, J., Li, W., Pei, R., Chen, X., Zhang, Z., Zhang, X. E., & Cui, Z. (2022). T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain 1 (TIM-1) Is a Functional Entry Factor for Tick-Borne Encephalitis Virus. *mBio*, 13(1), e0286021.

Zhu, Y., Zhang, C., Zhang, L., Yang, Y., Yu, X., Wang, J., Liu, Q., Wang, P., & Cheng, G. (2021). A human-blood-derived microRNA facilitates flavivirus infection in fed mosquitoes. *Cell reports*, 37(11), 110091.