

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Dina Pinheiro Machado Bittencourt

**Caracterização da via dos interferons durante a infecção por *Pirahy virus***

Florianópolis  
2022

Dina Pinheiro Machado Bittencourt

**Caracterização da via dos interferons durante a infecção por *Pirahy virus*.**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Daniel Santos Mansur, PhD.

Coorientador: Daniel de Oliveira Patrício, PhD.

Florianópolis,

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bittencourt, Dina Pinheiro Machado  
Caracterização da via dos interferons durante a infecção  
por Pirahy virus / Dina Pinheiro Machado Bittencourt ;  
orientador, Daniel Santos Mansur, coorientador, Daniel de  
Oliveira Patrício, 2022.  
35 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,  
2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Alphavirus. 3. Interferon. 4.  
Imunologia. I. Santos Mansur, Daniel . II. de Oliveira  
Patrício, Daniel. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Dina Pinheiro Machado Bittencourt

**Caracterização da via dos interferons durante a infecção por *Pirahy virus*.**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 13 de julho de 2022.

---

Prof.<sup>a</sup>. Daniela Cristina de Toni, Dra.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Daniel Santos Mansur, PhD.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. José Henrique Maia Campos de Oliveira, Dr.  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Carolina Eto, Me.  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de começar agradecendo minha família, que sempre me deu um apoio imensurável, e sem eles eu não estaria aqui e seria quem sou. Minha mãe e meu pai, Zelina e Carlos, muito obrigada por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim. À minha irmã Cássia, que fez questão de deixar recados motivacionais em todos meus cadernos da graduação. Ao meu namorado e companheiro Henrique, que segurou minha mão nesse finzinho de caminhada, e sempre esteve ao meu lado quando eu mais precisei.

Um agradecimento especial a todos e todas colegas de LIDI, que fizeram parte da minha caminhada nesses quatro anos de laboratório. Impossível citar todos, mas cada um de vocês tem um pedaço importante na minha jornada. Agradeço especialmente à Taíssa, Lucilene e Greicy, que sempre estiveram dispostas a me ensinar e ajudar. Vocês são os maiores exemplos de que a ciência é feita por e para mulheres! Ao meu orientador, Daniel Mansur, e meu coorientador, Daniel Patrício, muito obrigada por todo o auxílio durante esses anos, e principalmente nos últimos meses. Agradeço aos professores André Báfica e José Henrique Oliveira a disponibilidade de tempo prestada durante os seminários, e a todas as sugestões dadas.

Durante esse tempo no curso de Ciências Biológicas pude conhecer e me aproximar de pessoas incríveis, e agradeço muito pelas amizades que adquiri durante esses anos. Andressa, Barbara, Beatriz, Gabriela, Gustavo, Laís, Matheus e Sara, como fico feliz dos nossos caminhos terem se cruzado! Às minhas outras amigas mais do que especiais, Manoela e Renata, que mesmo sem o contato diário, sempre estão do meu lado, e me apoiaram sempre que precisei.

Aos meus professores da graduação, muito obrigada pelos ensinamentos sobre biologia, mas também por tornarem essa jornada mais leve.

## RESUMO

A emergência e re-emergência de vírus tem cada vez mais causado preocupação na saúde pública devido à chance desses patógenos serem causadores de epidemias, como aconteceu nos últimos anos com o vírus Zika e o vírus Chikungunya. Por isso, estudos que detectam arbovírus na natureza são importantes para monitorar possíveis ameaças. No Paraná, foi isolado um novo *Alphavirus* de duas espécies diferentes de mosquitos, denominado *Pirahy virus* (PIRAV). Através de estudos *in vitro*, foi constatado que o PIRAV consegue se replicar com sucesso em células humanas e de outros mamíferos. Nosso objetivo com esse estudo é caracterizar a resposta imune inata, associada à via dos interferons (IFN) do tipo I e III, em células humanas infectadas por PIRAV. Para isso, utilizamos células epiteliais humanas da linhagem A549 selvagens (WT) e *knockout* (KO) para o gene *RIGI*, um sensor citoplasmático de RNA, que ativa a via dos interferons. Nossos resultados demonstram que, apesar de suscetíveis, as células humanas possuem a capacidade de combater a infecção, mesmo em grandes concentrações do vírus. Além disso, PIRAV induz a transcrição de *IFNB*, *IFNL1* e *IFIT2* em células A549 WT, mas não em células A549 RIG-I KO, o que sugere que RIG-I é o principal sensor de RNA durante a infecção por PIRAV.

**Palavras chave:** *Pirahy virus*, interferon, sensor de RNA, RIG-I.

## ABSTRACT

The emergence and re-emergence of viruses has caused more concern for public health due to the chance that these pathogens can cause epidemics, as happened in the last few years with *Zika virus* e *Chikungunya virus*. Therefore, studies that detect arboviruses in nature are important to monitoring possible threats. Recently, a new Alphavirus has been isolated from two different species of mosquitoes, and it was called *Pirahy virus* (PIRAV) in Paraná, Brasil. Through in vitro studies, it was found that PIRAV can successfully replicate in human and other mammalian cells. Our goal with this study is to characterize the innate immune response associated with the interferon type I and III pathway, in human cells infected by PIRAV. To achieve that, we used a human epithelial A549 wild-type (WT) and knockout (KO) cells for the *RIGI* gene, a cytoplasmic RNA sensor, responsible for activation of the interferon pathway. Our results showed that human cells have the capacity to inhibit viral replication and fight infection, even with high viral input. Furthermore, PIRAV induces the transcription of *IFNB*, *IFNL1*, and *IFIT2* in A549 WT, but not in A549 RIG-I KO cells, suggesting that RIG-I is the main RNA sensor during PIRAV infection.

**Keywords:** *Pirahy virus*, interferon, RNA sensor, RIG-I.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática da ativação das vias de IFN-I e IFN-III após a entrada do vírus de RNA. .... 18
- Figura 2 - Teste de viabilidade celular em células A549-WT infectadas com PIRAV. Células A549-WT foram infectadas com PIRAV nas MOIs de 0,01; 0,1; 1 e 10 durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A viabilidade celular foi analisada por ensaios de MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata. Mock: não infectado..... 24
- Figura 3 - Teste de viabilidade celular em células A549-WT e A549 RIG-I-KO infectadas com PIRAV. Células A549-WT e A549 RIG-I-KO foram infectadas com PIRAV na MOI 10 durante 24, 72 e 120 horas. A viabilidade celular foi analisada pelos ensaios de MTT (a) e citometria de fluxo pela marcação com iodeto de propídio (PI) (b). Os experimentos foram realizados em triplicata. Mock: não infectado..... 25
- Figura 4 - Curva de infecção de PIRAV em células A549-WT. Células A549-WT foram infectadas com PIRAV nas MOIs 0,01; 0,1; 1 e 10, durante 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O sobrenadante do experimento foi coletado e utilizado para infectar células Vero E6. O título viral foi medido através da contagem de PFU. Os experimentos foram realizados em triplicata. .... 27
- Figura 5 - Curvas de expressão gênica de A549-WT infectadas com PIRAV. Células A549-WT foram infectadas com PIRAV na MOI 10, durante 12, 24, 72 e 120 horas. O RNA das células foi extraído e quantificado através de qPCR. Os experimentos foram realizados em triplicata. .... 28
- Figura 6 - Curvas de expressão gênica de A549-WT e A549 RIG-I-KO infectadas com PIRAV. Células A549-WT e A549 RIG-I-KO foram infectadas com PIRAV na MOI 10, durante 24 e 72 horas. O RNA das células foi extraído e quantificado através de qPCR. Os experimentos foram realizados em triplicata. .... 29



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados na reação de qPCR.....	22
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'pppRNA - RNA trifosforilado

BSA - Albumina de soro bovino cDNA - DNA complementar

CHIKV - *Chikungunya virus*

CMC - Carboximetilcelulose

Ct - Cycle threshold

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAse - Desoxirribonuclease

dsRNA - RNA dupla fita

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EEEV - *Eastern equine encephalitis virus*

FACS - *Fluorescence activated cell sorter*

g - Força G

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

IFIT2 - *interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 2*

IFN - Interferon

IFN- $\beta$  - Interferon Beta

IFNAR - Receptor de interferon- $\alpha/\beta$

IFN- $\lambda$  - Interferon Lambda

IFNLR1/IL-28Ra - Receptor de IFN- $\lambda$ /Receptor de Interleucina 28, subunidade alfa

IL-10R2 - Receptor de Interleucina 10, subunidade beta

IMD - *Immune deficiency*

IRF - *Interferon Regulatory Factor*

IRG - *Interferon Regulated Genes*

ISG - *Interferon Stimulated Genes*

ISGF3 - *Interferon Stimulated Gene Factor 3*

JAK1 - *Janus Kinase 1*

JEV - *Japanese encephalitis virus*

**KO - *Knockout***  
**L-15 - Leibovitz L-15 Medium**  
**MAVS - *mitochondrial antiviral-signaling protein***  
**MAYV - *Mayaro virus***  
**MDA5 - *Melanoma differentiation factor 5***  
**mL - mililitros**  
**MOI - Multiplicidade de infecção**  
**MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina**  
**NB-2+ - Nível de biossegurança 2+**  
**NF-κB - Fator nuclear kappa B**  
**ng - nanograma**  
**nm - nanômetros**  
**ONNG - *O'nyong'nyong virus***  
**ORF - *Open reading frames***  
**PAMP - Padrão molecular associado a patógeno**  
**PBS - Tampão fosfato salino**  
**PCR - Reação em cadeia da polimerase**  
**PI - Iodeto de propídio**  
**PIRAV - *Pirahy virus***  
**PFA - Paraformaldeído**  
**PFU - Unidades formadoras de placa**  
**qPCR - PCR quantitativa**  
**RIG-I - *Retinoic acid-inducible gene 1***  
**RLR - *Rig-I like receptors***  
**RNA - Ácido ribonucleico**  
**RNAi - RNA de interferência**  
**RRV - *Ross river virus***  
**SFB - Soro fetal bovino**  
**SINV - *Sindbis virus***  
**SOCS - *Suppressor Of Cytokine Signaling 1***  
**STAT - *Signal Transducer And Activator Of Transcription 1***  
**TRAF - *tumor necrosis factor receptor-associated factor***

**TLR - *Toll-like receptor***

**TYK1 - *Tyrosine kinase 1***

**μL - *microlitro***

**VEEV - *Venezuelan equine encephalitis virus***

**WEEV - *Western equine encephalitis virus***

**WT - *Wild type***

**ZIKV - *Zika virus***

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 JUSTIFICATIVA .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1. OBJETIVO GERAL .....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
3.1 VÍRUS .....	19
3.2 CÉLULAS .....	19
3.3 VIABILIDADE CELULAR .....	20
<b>3.3.1 MTT</b> .....	20
<b>3.3.2 Citometria de Fluxo</b> .....	20
3.4 ENSAIOS DE INFECÇÃO .....	21
<b>3.4.1 qPCR</b> .....	21
<b>3.4.2 Ensaio de Placa</b> .....	23
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
4.1 INFECÇÃO COM PIRAV DIMINUI PARCIALMENTE A VIABILIDADE DE CÉLULAS A549 .....	24
4.2 PIRAV POSSUI A CAPACIDADE DE REPLICAÇÃO EM CÉLULAS A549-WT, MAS AS CÉLULAS SÃO CAPAZES DE COMBATER A INFECÇÃO .....	26
4.3 PIRAV ATIVA A TRANSCRIÇÃO DE GENES LIGADOS À VIA DOS IFNS DEPENDENTES DE RIG-I .....	27
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	31
<b>6 PERSPECTIVAS</b> .....	32

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um aumento na emergência e re-emergência de vírus zoonóticos, com potencial de infectar animais, inclusive humanos (JOHNSON et al., 2015). Os arbovírus, vírus transmitidos por artrópodes, são uma grande ameaça à saúde pública, especialmente em regiões onde se concentram as maiores densidades populacionais, nas quais as pressões ambientais são maiores (GÚZMAN et al., 2020). Diversos arbovírus infectam humanos, como *Dengue virus* e *Zika virus* (gênero *Flavivirus*), *Chikungunya virus* e *Mayaro virus* (gênero *Alphavirus*), *Oropouche virus* (gênero *Orthobunyavirus*), entre outros (GÚZMAN et al., 2020). Além da diversidade taxonômica dos vetores, esses vírus são capazes de infectar três vezes mais grupos taxonômicos de hospedeiros do que os vírus que não transmitidos por vetores (JOHNSON et al., 2015).

O gênero *Alphavirus* pertence à família *Togaviridae*, são vírus envelopados de RNA de fita simples de senso positivo. Seu genoma contém duas fases abertas de leitura (*open reading frames* - ORFs), que codificam proteínas estruturais e não estruturais (HEMANN; GALE; SAVAN, 2017). Os vírus desse gênero são divididos entre vírus do velho mundo e vírus do novo mundo, devido a localização de onde eles foram originalmente isolados e aos sintomas que causam. Os vírus do Velho Mundo, incluindo *Ross River virus* (RRV), *Mayaro virus* (MAYV), *O'nyong-nyong virus* (ONNV), *Chikungunya virus* (CHIKV), and *Sindbis virus* (SINV), são conhecidos por causar dores nas articulações, enquanto os do Novo Mundo, como *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), e *Western equine encephalitis virus* (WEEV) são conhecidos por causar encefalite. Os *alphavirus* são transmitidos principalmente por artrópodes, e podem ser encontrados na natureza em reservatórios, como mamíferos e aves (CALUWÉ; ARIËN; BARTHOLOMEEUSEN, 2021; GÚZMAN et al., 2020; HOLMES et al., 2020).

Mesmo que alguns vírus zoonóticos ainda não tenham a capacidade de infectar seres humanos, o fato deles estarem presentes nos reservatórios em ciclos silvestres nos alerta de que eles possuem essa capacidade, visto que muitos dos vírus que circulam hoje possuem origem silvestre (WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUERIA, 2005). A presença de vetores atua como uma ponte entre os animais selvagens e os humanos, fazendo com que o alcance dos vírus seja maior (JOHNSON et al., 2015).

Existem três mecanismos pelos quais os humanos são infectados por vírus zoonóticos transmitidos por vetores. O primeiro é através do transbordamento, na qual ocorre a transmissão do vírus do animal silvestre para o ser humano via vetor, como o *West Nile virus* (gênero *Flavivirus*). O segundo mecanismo é a passagem do vírus de um animal silvestre para um animal doméstico, o que faz com que ocorra a amplificação viral, e posterior transmissão para humanos. É o caso do *japanese encephalitis virus* (JEV) e VEEV, dos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus*, respectivamente. O terceiro mecanismo é o que causa maior preocupação, pois o vírus sai do ciclo silvestre para o ciclo urbano, onde ocorre a transmissão entre humanos ou de vetores para humanos, como no caso do *Dengue virus* (DENV) e *Zika virus* (ZIKV) (WEAVER et al., 2018). Se em um mesmo tempo e local, existir disponibilidade de hospedeiros e competência vetorial, as condições são favoráveis para que o último mecanismo ocorra, podendo levar ao surgimento de novas epidemias.

Epidemias recentes são exemplos de como os vírus podem emergir ou reemergir causando surtos. O vírus ZIKV, isolado de macacos do gênero *Rhesus*, bem como de mosquitos *Aedes africanus* da floresta de Zika, localizada na Uganda, em 1947 e emergiu na Ásia, possuindo duas principais linhagens, a Asiática e a Africana (REF). Apesar de já circular no ciclo silvestre (entre mosquitos e animais não humanos), o ZIKV causou surtos no sul da Ásia apenas em 2007 e em 2013 na Polinésia Francesa (REF) (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019; PIELNAA et al., 2020; VALENTINE; MURDOCK; KELLY, 2019). Após mutações ocorridas no vírus em 2013, surge uma nova linhagem denominada Americana, que causou surtos de proporções epidêmicas na América do Sul, principalmente no nordeste brasileiro em 2016 (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019). O alfavírus CHIKV, possui uma história semelhante, o qual teve o primeiro caso documentado em 1952, e em 1953 foi isolado pela primeira vez na Tanzânia (GONZALEZ-SANCHEZ; RAMIREZ-ARROYO, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2020), desde 2004 o CHIKV foi identificado em mais de 60 países entre África, Ásia, Europa e Américas. O CHIKV se mantém no ciclo silvático em locais onde é endêmico (como na África e Ásia), utilizando diferentes animais como reservatórios, principalmente primatas não humanos. O vírus atinge o ciclo urbano quando infecta humanos que vivem nas zonas rurais, e é facilmente dispersado pelos continentes através de viajantes infectados

(MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; GONZALEZ-SANCHEZ; RAMIREZ-ARROYO, 2018). O principal vetor do CHIKV conhecido é o *Aedes aegypti*, mas acredita-se que o aumento da população do vetor *Aedes albopictus*, juntamente com mutações adaptativas do vírus, aumentaram drasticamente a frequência de transmissão no ciclo urbano (WEAVER et al., 2012).

Diversos fatores podem fazer com que os arbovírus atinjam níveis epidêmicos, como mudanças no genoma viral, na composição ou dinâmica da população de vetores e hospedeiros, além de alterações ambientais de origem antropogênica (WEAVER; REISEN, 2010). Alguns vírus possuem maiores taxas mutacionais, conferindo-lhes uma maior capacidade de adaptação às diferentes condições, e conseqüentemente a capacidade de infectar um maior número de hospedeiros. Entre esses vírus, podemos destacar os vírus com genoma de RNA, que representam cerca de 94% de todos os vírus zoonóticos (JOHNSON et al., 2015). Segundo Carrasco-Hernandez et al. (2017), os vírus de RNA possuem maior probabilidade de infectar novos hospedeiros devido à sua rápida replicação e a suas altas taxas evolutivas provenientes de erros transcricionais durante a replicação.

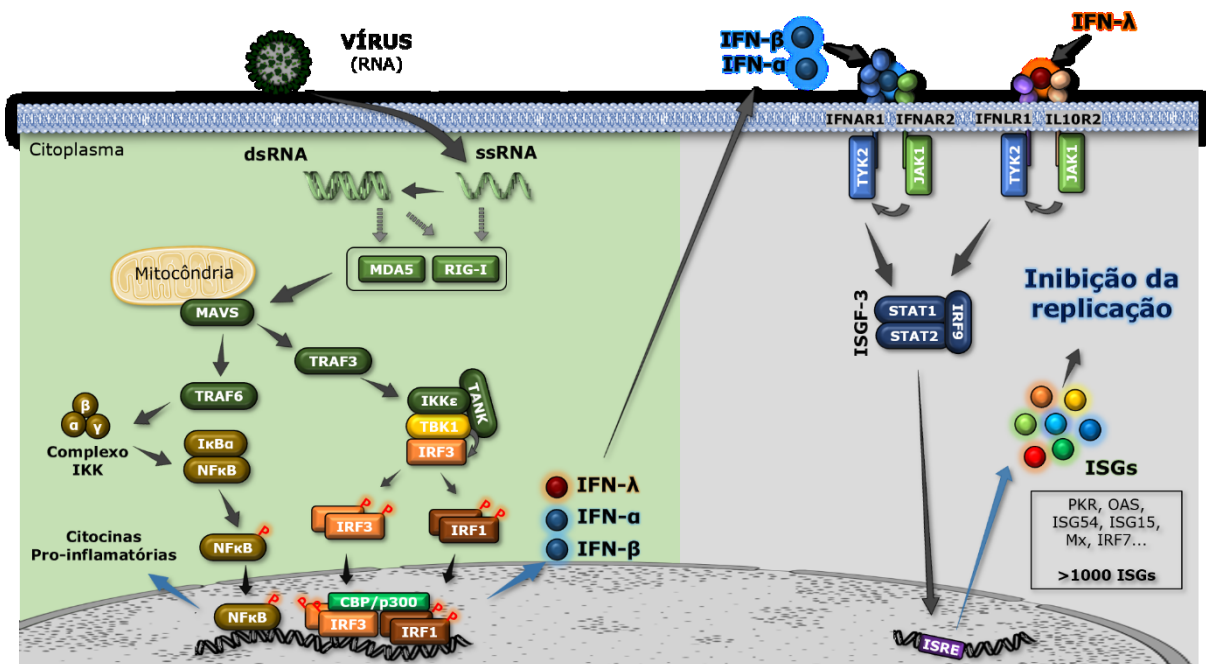
As variações presentes no genoma viral acontecem naturalmente, mas podem ser selecionadas pelo sistema imune, o que ocorre tanto no vetor como nos hospedeiros (COFFEY et al., 2008; WOO; REIFMAN, 2012). Assim, o sistema imune também impulsiona a evolução dos vírus, através da pressão de seleção (WOO; REIFMAN, 2012). A pressão evolutiva, nesse caso, é resultado da ativação de diversas vias do sistema imune. As principais vias ativadas nos vetores após a entrada do vírus são: RNA de interferência (RNAi), Imd, Toll e via Jak-STAT (SPARKS; BARTHOLOMAY; BONNING, 2008). Já a resposta imune do hospedeiro vertebrado inclui outras vias. Em humanos, por exemplo, a ativação da via dos interferons do tipo I (IFN-I), responsável pela produção dos interferons alfa (IFN- $\alpha$ ) e beta (IFN- $\beta$ ), são fundamentais para a resposta antiviral (KOYAMA et al., 2008). Além dos IFN-I, também são produzidos os interferons do tipo III (IFN-III), caracterizados por interferon lambda (IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3 e IFN- $\lambda$ 4), descobertos posteriormente (HEMANN; GALE; SAVAN, 2017). Os interferons são produzidos durante infecções virais após a detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o RNA de fita dupla (dsRNA) (FENSTERL; SEN, 2009). Esse tipo de RNA não ocorre



naturalmente nas células humanas, apenas durante a replicação viral. O reconhecimento de RNA exógeno ocorre através de sensores endossomais, como os receptores *Toll-like* (TLR), entre eles o TLR3, além dos sensores citoplasmáticos como os receptores *RIG-I-like* (RLR), entre eles RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*) e MDA5 (*melanoma differentiation factor 5*). Após o reconhecimento pelos RLR, ocorre uma mudança de conformação que leva à interação com a proteína MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*), presente na membrana externa de mitocôndrias, as quais recrutam as moléculas de sinalização TRAF3 e TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*). Esse processo resulta na ativação de fatores de transcrição como IRF1, IRF3, IRF7 e NF- $\kappa$ B, os quais levam à produção de IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\lambda$ . Essas citocinas são então secretadas para o meio extracelular. Apesar dos mesmos fatores transcricionais induzirem a expressão dos IFN-I e IFN-III, a via do NF- $\kappa$ B é o mais importante regulador de IFN- $\lambda$ , enquanto os IRFs dominam a expressão de IFN-I (FENSTERL; SEN, 2009; LEE *et al.*, 2018; OLAGNIER *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2018).

O reconhecimento dos IFN-I ocorre após o contato com seu receptor, o complexo IFNAR, composto por IFNAR1 e IFNAR2, localizado na membrana celular. Já o receptor dos IFN-III é um complexo entre as proteínas IL-28Ra (IFNLR) e IL-10R2. Após o reconhecimento dos IFNs, ocorre a ativação das proteínas acopladas aos receptores JAK1 (*Janus quinase*) e TYK1, responsáveis por fosforilar as proteínas STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), realizando a dimerização de STAT1 e STAT2. A dimerização das proteínas STATs, leva ao recrutamento de IRF9, formando o complexo ISGF3, que atua como fator de transcrição dos genes estimulados por interferons (ISGs) os quais constituem uma importante linha de defesa contra infecções virais (Figura 1) (GOKHALE *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2017). Todas as células nucleadas são produtoras e responsivas ao IFN-I, o que não ocorre com IFN-III. O receptor IFNLR1 só é expresso em um número limitado de células, especialmente células dendríticas, macrófagos e células epiteliais (GOEL; KOTENKO; KAPLAN, 2021). A ação dos IFNs no organismo pode ser autócrina, atuando na própria célula produtora, ou parácrina, induzindo um estado antiviral nas células adjacentes (DURBIN; KOTENKO; DURBIN, 2013; HEMANN; GALE; SAVAN, 2017; KOYAMA *et al.*, 2008; STANIFER; PERVOLARAKI; BOULANT; 2019).

Figura 1 - Representação esquemática da ativação das vias de IFN-I e IFN-III após a entrada do vírus de RNA.



Fonte: Daniel de Oliveira Patrício (2021).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Estudos que identificam vírus na natureza são essenciais para detecção e prevenção de epidemias. A partir de um estudo de vigilância realizado pelo Instituto Carlos Chagas/Fiocruz no ano de 2017 em parceria com nosso laboratório, foi identificado um novo *Alphavirus*, denominado *Pirahy virus* (PIRAV). Esse vírus foi identificado na localidade de Pirai do Sul, no Paraná, em mosquitos do gênero *Trichoprosopon*, e também do gênero *Wyeomia* (TSCHÁ *et al.*, 2021). O vírus foi isolado em cultura celular e possui a capacidade de infectar linhagens celulares de vertebrados, logo, constitui um alerta para o surgimento de novas arboviroses (Artigo submetido). Diante dos dados apresentados, hipotetizamos que a via dos IFN é uma barreira importante contra a infecção por PIRAV em células humanas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a resposta imune inata via IFNs em células humanas infectadas por PIRAV.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a viabilidade de células epiteliais humanas (A549), WT e deficientes para RIG-I, infectadas pelo PIRAV.
- Realizar curvas de infecção de ciclo múltiplo e ciclo único em células A549.
- Determinar a dependência de RIG-I para expressão de genes envolvidos nas vias dos IFN-I e IFN-III.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 VÍRUS

O vírus PIRAV utilizado foi cedido pelo ICC/Fiocruz, sendo posteriormente expandido em células de larvas de *A. albopictus* C6/36 (ATCC® CRL-1660™). Esse procedimento foi realizado em um laboratório NB-2+. O vírus foi aliquotado e armazenado em freezer -80°C.

### 3.2 CÉLULAS

As células utilizadas foram células epiteliais de pulmão humano - A549 (ATCC® CCL-185™) selvagem (WT, do inglês *wild type*). Além disso, também foram utilizadas células A549 deficientes (KO, do inglês *knockout*) para o sensor citoplasmático de RNA RIG-I, geradas no próprio laboratório. Para os experimentos de titulação viral, foram utilizadas células de rim de macaco verde africano - Vero E6 (ATCC® CRL-1586™). As células A549-WT, A549 RIG-I-KO e Vero E6 foram cultivadas em meio

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina), em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células C6/36 foram crescidas em meio Leibovitz (L-15), suplementadas com 5% de SFB, 0,5% de antibiótico (Gentamicina) e 0,26% de triptose 13M.

### 3.3 VIABILIDADE CELULAR

#### 3.3.1 MTT

Para analisar a viabilidade celular foram realizados ensaios de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), o qual mensura a atividade metabólica de mitocôndrias. Para tal, foram plaqueadas células A549-WT e RIG-I-KO, em placas de 96 poços, na concentração de  $2 \times 10^4$  células/poço em meio DMEM, as quais ficaram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células foram infectadas por PIRAV nas concentrações e tempos determinados, em triplicatas. O meio de cultura contendo o vírus foi adicionado nas suas respectivas diluições, e então foi retirado após 90 minutos, substituído por meio DMEM. Após o tempo de infecção foi adicionada uma solução de MTT 5mg/mL em cada amostra, seguido de incubação por 3 horas à 37°C, no escuro. Depois, foi retirado o sobrenadante e foram adicionados 100µl de DMSO por poço para solubilização dos cristais de formazan gerados na reação. A placa foi então colocada no shaker por 15 minutos, protegida da luz, para então ser realizada a leitura no leitor de placas, à 540nm.

#### 3.3.2 Citometria de Fluxo

Para analisar a viabilidade celular através de citometria de fluxo, utilizamos o reagente iodeto de propídio (PI). O PI atravessa membranas não intactas de células mortas, e intercala no DNA, gerando fluorescência. As células A549-WT e RIG-I-KO foram plaqueadas em placas de 12 poços em triplicatas, incubadas overnight, e infectadas. Após o tempo de infecção, as células foram retiradas dos poços, armazenadas em microtubos, centrifugadas e suspendidas em FACS Buffer (Solução salina e 1% de SFB). As amostras foram então marcadas com PI, e as células foram então adquiridas no citômetro de fluxo FACSVerse (BD). Os resultados foram

analisados no software FlowJo (TreeStar) e os gráficos foram construídos no software GraphPad Prism.

### 3.4 ENSAIOS DE INFECÇÃO

A determinação da replicação do vírus e o perfil de resposta imune das células perante a infecção por PIRAV foi realizada através de ensaios de infecção, onde as células foram plaqueadas em placas de 12 poços, em triplicata, e infectadas com o vírus em diferentes tempos, e com diferentes multiplicidades de infecção (MOI). Após esse tempo, as células foram recolhidas e o seu RNA foi extraído com o reagente trizol (GE), para experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), enquanto o sobrenadante foi utilizado para ensaios de placa. Ambos foram armazenados em freezer -80°C até a realização dos experimentos, descritos a seguir.

#### 3.4.1 qPCR

Para analisar o perfil de expressão de genes relacionados à via dos IFN, utilizamos o método de qPCR. O sobrenadante das células dos ensaios de infecção foi retirado e posteriormente foi adicionado 340 µL de trizol (GE) por poço contendo as células. Em seguida, a solução de trizol contendo as células lisadas foram transferidas para microtubos e armazenadas em freezer a -80 °C. Para extração do RNA das células, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente por 15 minutos. Depois, foram adicionados 70 µL de clorofórmio por tubo, misturados por inversão e incubados à temperatura ambiente por dois minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos na velocidade de 12000 g à 4 °C. Durante essa etapa, ocorre a separação da amostra por fases, onde a fase de interesse é a superior (aquosa). Essa fase aquosa é então transferida para um novo microtubo, onde são adicionados 200 µL de isopropanol e misturados por inversão, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12000 g por 10 minutos à 4 °C. Depois, o sobrenadante é descartado, são adicionados 340 µL de etanol 70 % por amostra e essas são centrifugadas em 7500 g por 5 minutos à 4 °C. O sobrenadante é então descartado, e o pellet de RNA é suspenso em 20 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura, dosado no espectrofotômetro Nanodrop Lite (Thermo), e armazenado à -80 °C. Após

extrair o RNA, precisamos fazer o DNA complementar(cDNA) pela técnica de RT-PCR. Para isso, diluímos o RNA para 500 ng/μL, a fim de deixar todas as amostras na mesma concentração, e então fizemos o tratamento com DNase I (Thermo), para eliminar resquícios de DNA endógeno na amostra. As amostras foram incubadas com DNase I à temperatura ambiente por 15 minutos e utilizamos EDTA para intercalar ao RNA e inibir sua degradação durante o processo de inativação da DNase I pela incubação à 65 °C por 10 min. Em seguida, foi preparado o mix contendo os reagentes para o RT-PCR, seguindo a reação em termociclador (Applied Biosystems), transformando o RNA inicial em cDNA. Esse cDNA foi então diluído em H<sub>2</sub>O ultrapura na proporção 1:20. Com o cDNA diluído, realizamos então o qPCR para analisar a transcrição dos genes *IFNB*, *IFNL1* e *IFIT2*. Foram adicionados 2 μL de amostra para cada poço da placa contendo o GoTaq qPCR Master Mix (Promega), para cada um dos genes utilizados. O ensaio foi realizado no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems). A análise foi realizada por  $\Delta\Delta C_t$ , normalizado com o gene endógeno *GAPDH* (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers utilizados na reação de qPCR.

Primer	Sequência
<i>GAPDH</i> Forward	GGACCTGACCTGCCGTCTAG
<i>GAPDH</i> Reverse	TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC
<i>IFNB1</i> Forward	CACCGGAGAAAGATTAAGGAGGAAGG
<i>IFNB1</i> Reverse	AAACCCTTCCTCCTTAATCTTTCTC
<i>IFNL1</i> Forward	CTTCCAAGCCCACCCCAACT
<i>IFNL1</i> Reverse	GGCCTCCAGGACCTTCAGC
<i>IFIT2</i> Forward	GACACGGTTAAAGTGTGGAGG
<i>IFIT2</i> Reverse	TCCAGACGGTAGCTTGCTATT

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 3.4.2 Ensaio de Placa

Foram realizados ensaios de placa para análise dos títulos (ou concentração) de partículas virais, quantificada por unidades formadoras de placas (PFU, do inglês *Plaque-Forming Units*) nas diferentes células infectadas. O ensaio foi realizado em células Vero E6, com o sobrenadante dos ensaios de infecção com PIRAV. Células Vero E6 foram plaqueadas na confluência de  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços, e infectadas com o sobrenadante diluído em diluição seriada de ordem 10. As células foram incubadas por 7 dias em estufa à 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, depois fixadas com paraformaldeído (PFA) 3% e coradas com solução de cristal violeta. As placas foram contadas e os dados foram inseridos na fórmula a seguir:

$$\text{Número de placas} \div (\text{volume da infecção} \times \text{diluição da amostra})$$

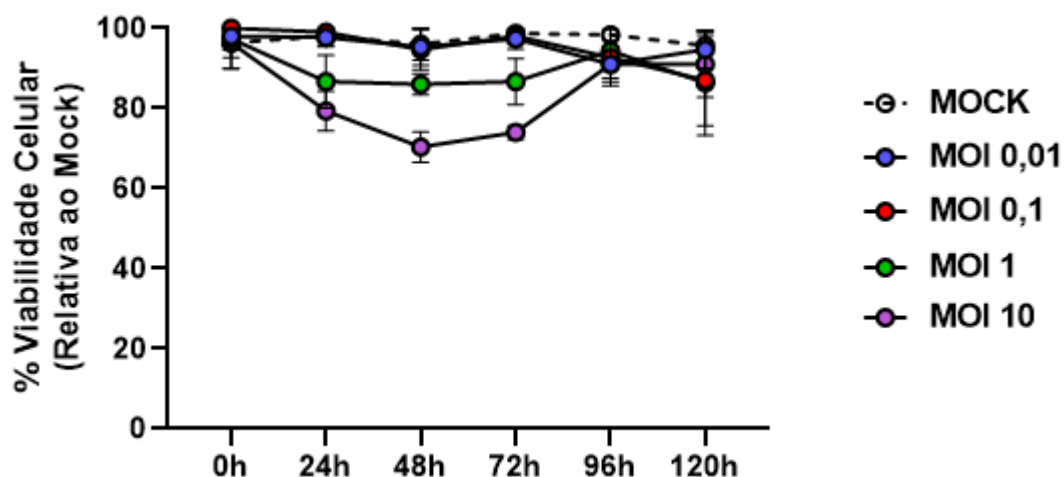
O experimento foi realizado em triplicatas, e os gráficos foram plotados com o software GraphPad Prism.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 INFECÇÃO COM PIRAV DIMINUI PARCIALMENTE A VIABILIDADE DE CÉLULAS A549

Para analisar a capacidade citolítica do PIRAV em células humanas, utilizamos células epiteliais da linhagem A549 infectadas com PIRAV nas MOI 0,01, 0,1, 1 e 10. Comparamos o grupo infectado com o grupo não infectado (mock) (Figura 2). Nas MOIs de 0,01 e 0,1, não houve alteração significativa na viabilidade celular. Já nas MOIs de 1 e 10, observa-se morte celular a partir de 24 horas após a infecção. No MOI 10, as células continuam perdendo viabilidade até 48 horas após a infecção. No entanto, após 48 horas de infecção observa-se uma recuperação da viabilidade celular em todas MOIs onde haviam ocorrido morte celular anteriormente, sugerindo um controle da infecção.

Figura 2 - Teste de viabilidade celular em células A549-WT infectadas com PIRAV. Células A549-WT foram infectadas com PIRAV nas MOIs de 0,01; 0,1; 1 e 10 durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A viabilidade celular foi analisada por ensaios de MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata. Mock: não infectado.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Esses resultados sugerem que a infecção com MOI elevado de PIRAV afeta a viabilidade das células em momentos iniciais da infecção, porém, após 48 horas a viabilidade celular volta a aumentar. Resultados semelhantes foram encontrados em



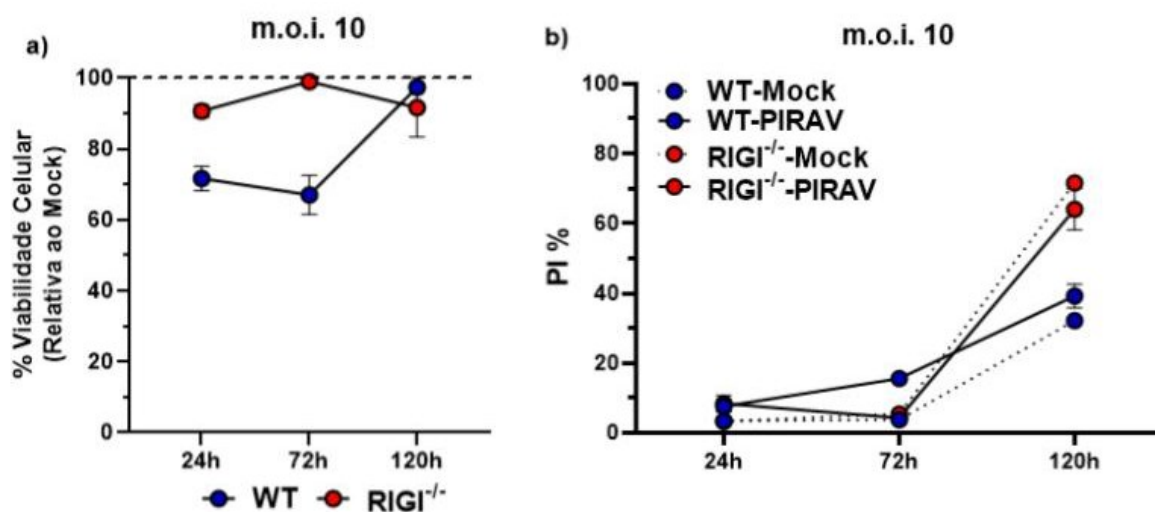
células SH-SY5Y (célula de neuroblastoma humano) infectadas com PIRAV, onde a viabilidade celular diminui entre 24 e 48 horas pós infecção, mas depois parece estabilizar (TSCHÁ *et al.*, 2021). Entretanto, o mesmo não ocorre quando as células A549 são infectadas com CHIKV, onde altas concentrações do vírus causam morte celular em momentos mais tardios da infecção (HUCKE *et al.*, 2022).

Com base nos nossos resultados, decidimos utilizar para o restante dos experimentos as MOI de 0,01 e/ou 10, como estratégia para analisar ciclo múltiplo e ciclo único do vírus, respectivamente, além dos tempos de 24, 72 e 120 horas após a infecção, as quais representam os tempos de pico e resolução da infecção.

O sensor citoplasmático de RNA RIG-I é um dos principais receptores responsáveis pelo reconhecimento do RNA viral, o que desencadeia a ativação da via dos IFNs. Como o PIRAV é um vírus de RNA, sugere-se que o RIG-I possui um papel importante na ativação das vias de defesa do hospedeiro, através do reconhecimento do vírus. Para analisar o papel do RIG-I na infecção com PIRAV, foram utilizadas células A549 deficientes para esse receptor, denominadas A549 RIG-I KO. A avaliação da viabilidade celular nas células A549 RIG-I KO foi realizada através de ensaios de MTT e citometria de fluxo em células infectadas com PIRAV em MOI 10 e nos tempos de 24, 72 e 120 horas (Figura 3). Nossos resultados de viabilidade celular por análise de MTT demonstram que as células A549-WT são mais impactadas durante a infecção por PIRAV em comparação com as células A549 RIG-I-KO nas condições analisadas (Figura 3a). Além disso, a viabilidade analisada pela marcação com PI corrobora com o resultado anterior, onde observa-se maior porcentagem de células mortas nas A549-WT em 72 horas de infecção comparado com as A549 RIG-I-KO (Figura 3b). No entanto, observa-se que as células A549 RIG-I-KO sofrem mais morte celular em 120 horas quando comparadas às células WT, independente da infecção com PIRAV. Esse conjunto de resultados sugere que a infecção com PIRAV diminui parcialmente a viabilidade em células A549-WT, mas não em células A549 RIG-I-KO. Apesar desse dano parcial, tanto as células A549-WT quanto as A549 RIG-I-KO apresentam total recuperação da sua viabilidade celular em 120 horas ao comparar o grupo infectado com o não infectado.

Figura 3 - Teste de viabilidade celular em células A549-WT e A549 RIG-I-KO infectadas com PIRAV. Células A549-WT e A549 RIG-I-KO foram infectadas com

PIRAV na MOI 10 durante 24, 72 e 120 horas. A viabilidade celular foi analisada pelos ensaios de MTT (a) e citometria de fluxo pela marcação com iodeto de propídio (PI) (b). Os experimentos foram realizados em triplicata. Mock: não infectado.

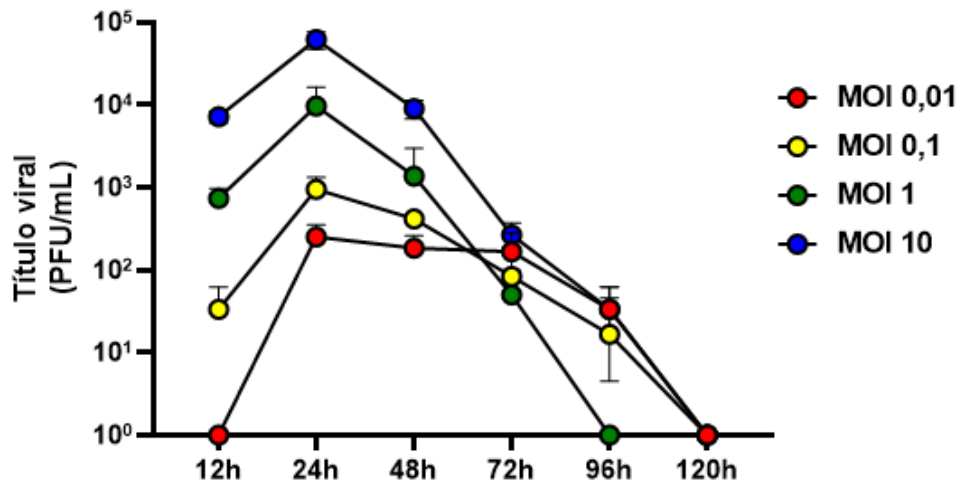


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 4.2 PIRAV POSSUI A CAPACIDADE DE REPLICAÇÃO EM CÉLULAS A549-WT, MAS AS CÉLULAS SÃO CAPAZES DE COMBATER A INFECÇÃO

Após determinar a viabilidade de células humanas infectadas por PIRAV, decidimos observar a infecção do vírus na célula, através de um ensaio de placa. Para isso, infectamos as células A549 com diferentes concentrações do vírus, medindo a sua liberação no meio extracelular nos tempos determinados através da quantificação de unidades formadoras de placa (PFU) (Figura 4). Observa-se que entre 12 e 24 horas ocorre um aumento nos títulos virais em todas as concentrações analisadas, culminando no pico da infecção em 24 horas. Após 24 horas, observa-se uma diminuição dos títulos virais de todas as MOIs analisadas, chegando à não detecção de PFU no tempo de 120 horas.

Figura 4 - Curva de infecção de PIRAV em células A549-WT. Células A549-WT foram infectadas com PIRAV nas MOIs 0,01; 0,1; 1 e 10, durante 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O sobrenadante do experimento foi coletado e utilizado para infectar células Vero E6. O título viral foi medido através da contagem de PFU. Os experimentos foram realizados em triplicata.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

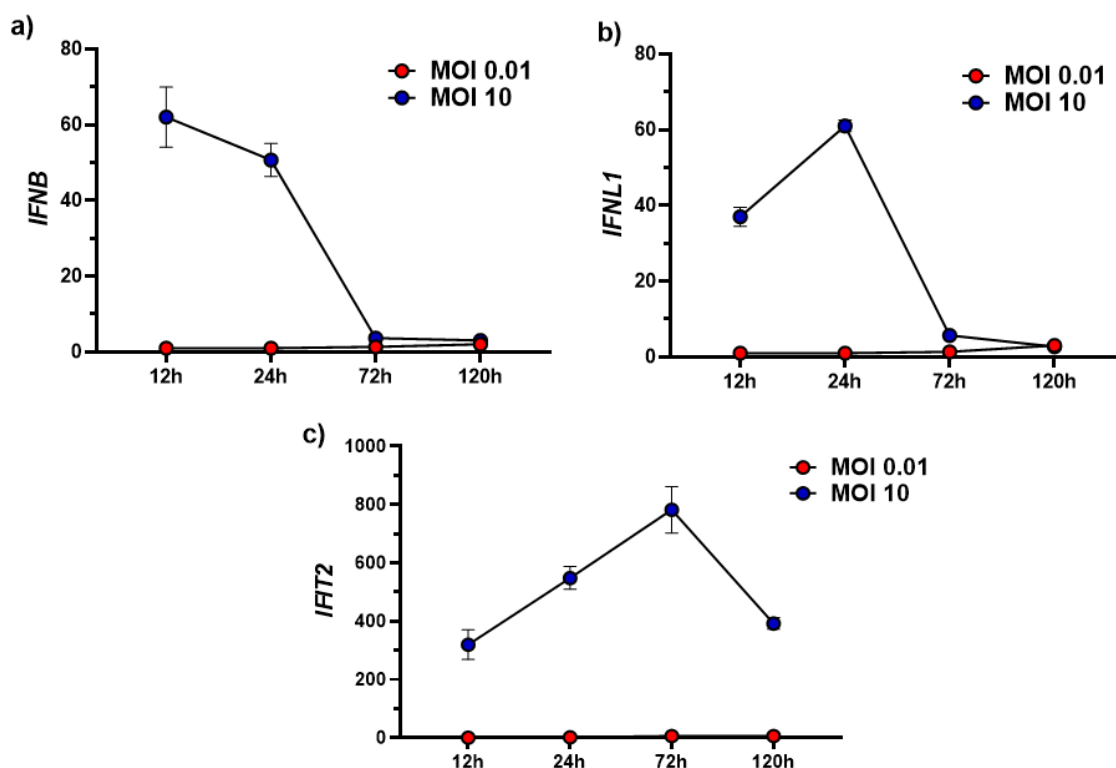
O resultado sugere que o vírus PIRAV se replica com sucesso em células A549, tendo em 24 horas o seu pico de infecção, no entanto, as células conseguem controlar a infecção nos tempos posteriores. Em células SH-SY5Y, o pico da infecção ocorre às 48 horas após a infecção (TSCHÁ *et al.*, 2021). O fato de que o título viral estar zerado em 120 horas sugere que existe um mecanismo de defesa nas células humanas capaz de combater a infecção por PIRAV.

#### 4.3 PIRAV ATIVA A TRANSCRIÇÃO DE GENES LIGADOS À VIA DOS IFNS DEPENDENTES DE RIG-I

Após a determinação do perfil de infecção por PIRAV nas células A549 através de ensaios de viabilidade celular e curvas de infecção, decidimos avaliar a resposta imune da célula frente à infecção. Devido à importância da via dos IFNs como a primeira linha de defesa durante infecções virais em vertebrados, utilizamos essa via como alvo da nossa análise, quantificando a expressão de genes relacionados à via

dos IFN-I em células A549-WT infectadas com PIRAV em MOIs de 0,01 e 10 (Figura 5a-c). Observa-se que o PIRAV com MOI 0,01 foi insuficiente para aumentar a transcrição dos genes *IFNB*, *IFNL1* e *IFIT2*. Ao analisar a MOI de 10, observa-se que o vírus induziu a transcrição de *IFNB*, com pico em 12 horas, voltando ao seu basal em 72 horas (Figura 5a). Ao analisar a transcrição de *IFNL1* no MOI 10, observa-se um aumento em 12 horas, atingindo seu ápice em 24 horas, e em 72 horas não havendo mais aumento significativa do gene em comparação com as células não infectadas (Figura 5b). O aumento da transcrição de *IFIT2* ocorre em 12 horas após a infecção e segue aumentando até 72 horas, onde observa-se uma diminuição na transcrição no tempo de 120 horas.

Figura 5 - Curvas de expressão gênica de A549-WT infectadas com PIRAV. Células A549-WT foram infectadas com PIRAV na MOI 10, durante 12, 24, 72 e 120 horas. O RNA das células foi extraído e quantificado através de qPCR. Os experimentos foram realizados em triplicata.

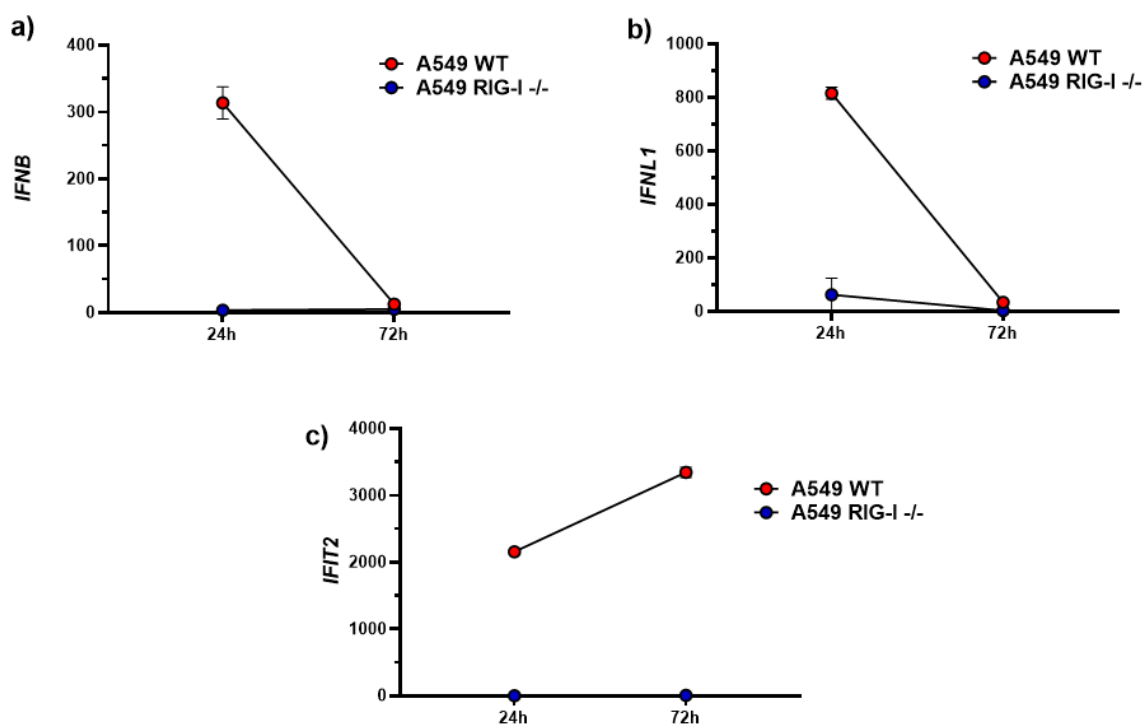


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Esses resultados sugerem que altas concentrações do vírus PIRAV são capazes de ativar a transcrição dos genes *IFNB*, *IFNL1* e *IFIT2*, indicando que a célula está utilizando os IFN como mecanismo de defesa contra o vírus.

Analisamos então a expressão dos genes *IFNB*, *IFNL1* e *IFIT2* em células A549 RIG-I KO durante a infecção por PIRAV, utilizando a MOI 10 e nos tempos de 24 e 72 horas (Figura 6), na hipótese de que a transcrição desses genes seja impactada negativamente pela falta de um importante sensor de vírus de RNA. Os resultados demonstram que PIRAV não induziu a transcrição de *IFNB* em células A549 RIG-I-KO, mesmo em altas concentrações do vírus (Figura 6a). Quando analisamos a expressão de *IFNL1* nas células deficientes para RIG-I, notamos que existe uma expressão basal no tempo de 24 horas (Figura 6b), o que sugere que o vírus pode ser reconhecido por algum outro receptor. Entretanto, essa expressão não é forte o suficiente para que ocorra o aumento na produção de ISGs, como *IFIT2* (Figura 6c).

Figura 6 - Curvas de expressão gênica de A549-WT e A549 RIG-I-KO infectadas com PIRAV. Células A549-WT e A549 RIG-I-KO foram infectadas com PIRAV na MOI 10, durante 24 e 72 horas. O RNA das células foi extraído e quantificado através de qPCR. Os experimentos foram realizados em triplicata.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Os resultados sugerem que o RIG-I é o principal receptor responsável pela detecção de PIRAV na célula, mas que existem outros receptores envolvidos, observados pela expressão basal de *IFNL1*. Olagnier et. al., (2014), demonstraram que com o silenciamento de RIG-I em células A549 bloqueia a expressão de *IFNL1*, após o tratamento com um RNA sintético trifosforilado (5'pppRNA), o qual é suficiente para ativar as vias de IFN-I e IFN-III. Além disso, dados preliminares do nosso laboratório demonstram que a deficiência de RIG-I em células A549 inibe completamente a transcrição de *IFNB*, *IFNL1* e *IFIT2* induzidas pela infecção com ZIKV (Dados não publicados), o que corrobora com nossos resultados. O reconhecimento do vírus responsável pela ativação basal de *IFNL1* pode ocorrer através de receptores citoplasmáticos como o MDA5 ou através de receptores de RNA endossomais como TLR3, TLR7 e TLR8 (ZHOU et al., 2018). Futuros estudos são necessários para essa caracterização.

Ao comparar IFN- $\alpha$  e IFN- $\lambda$ 1 durante infecção por *hepatitis C virus* (HCV), Marcello et. al. (2006) demonstraram que IFN- $\lambda$ 1 induz aumentos constantes nos níveis de ISGs, enquanto ISGs ligadas ao IFN- $\alpha$  aumentam rapidamente e diminuem em seguida. O perfil de expressão da ISG *IFIT2* nos nossos resultados sugere que a produção de ISGs segue ocorrendo após 72 horas, mesmo com a diminuição da carga viral na célula, indicando uma ativação prolongada de algum receptor.

## 5 CONCLUSÕES

O vírus recém descrito *Pirahy virus* (PIRAV) é um dos muitos exemplos de arbovírus que circulam próximos a centros urbanos, podendo causar danos à saúde humana. Para avaliar a capacidade do vírus de se multiplicar e causar danos celulares, realizamos ensaios de viabilidade celular e ensaios de placa. Além disso, analisamos a resposta imune do hospedeiro humano frente à infecção por PIRAV, através da quantificação da expressão de genes relacionados à via dos interferons. Nossos resultados demonstraram que:

- PIRAV induz morte celular em células A549-WT em tempos iniciais de infecção. Entretanto, a viabilidade das células é restaurada nos tempos tardios.
- As células A549 RIG-I-KO não apresentam perda de viabilidade, mesmo sob altas concentrações do vírus PIRAV;
- O vírus PIRAV se replica com sucesso em células A549. PIRAV induz a expressão dos genes *IFNB*, *IFNL1* e *IFIT2*, em células A549-WT em ciclo único de infecção (MOI 10), mas não em ciclos múltiplos (MOI 0,01);
- Conclui-se também que a infecção com PIRAV induz a expressão dos genes *IFNB* e *IFIT2* de maneira dependente de RIG-I. Entretanto, outros receptores, além de RIG-I, induzem a transcrição de *IFNL1* durante a infecção com PIRAV.

## 6 PERSPECTIVAS

Para uma melhor caracterização da via dos IFNs, alguns experimentos ainda serão executados futuramente, explorando outros tempos de infecção. Os tempos de 24 e 72 horas se mostraram insuficientes para avaliar a curva de expressão de *IFIT2* e *IFNB* em células A549 RIG-KO, uma vez que a expressão dessa ISG já ocorre em tempos anteriores, não analisados nos experimentos realizados. Esses tempos de infecção foram escolhidos a partir da observação da curva de infecção. No entanto, após analisarmos a curva de expressão dos genes, decidimos que outros tempos devem ser explorados. Além disso, pretendemos avaliar também o tempo de 48 horas, para observar como a expressão se comporta nesse momento da infecção.

O título viral de células A549 RIG-I-KO também deve-se ser avaliado em experimentos futuros. O ensaio de placa será repetido, uma vez que esse resultado é importante para avaliar o papel do receptor RIG-I na replicação dos PIRAV. Um experimento alternativo ao ensaio de placa é a realização de um ensaio de imunofluorescência, para que possamos avaliar o fenótipo, o número de placas formadas e a velocidade de espalhamento viral, analisados através da marcação com anticorpos anti-PIRAV.



## REFERÊNCIAS

- CARRASCO-HERNANDEZ, R *et al.* Are RNA Viruses Candidate Agents for the Next Global Pandemic? A Review. **Iilar Journal**, v. 58, n. 3, p. 343-358, 2017. Oxford University Press (OUP).
- CALUWÉ, Lien de; ARIËN, Kevin K.; BARTHOLOMEEUSEN, Koen. Host Factors and Pathways Involved in the Entry of Mosquito-Borne Alphaviruses. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 29, n. 7, p. 634-647, jul. 2021. Elsevier BV.
- COFFEY, L. L. *et al.* Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 19, p. 6970-6975, 5 maio 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- DURBIN, Russell K.; KOTENKO, Sergei V.; DURBIN, Joan E.. Interferon induction and function at the mucosal surface. **Immunological Reviews**, [S.L.], v. 255, n. 1, p. 25-39, 15 ago. 2013. Wiley.
- FENSTERL, Volker; SEN, Ganes C.. Interferons and viral infections. **Biofactors**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 14-20, jan. 2009. Wiley.
- GOEL, Rishi R.; KOTENKO, Sergei V.; KAPLAN, Mariana J.. Interferon lambda in inflammation and autoimmune rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 349-362, 27 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC.
- GOKHALE, Nandan S. *et al.* RNA regulatory mechanisms that control antiviral innate immunity. **Immunological Reviews**, [S.L.], v. 304, n. 1, p. 77-96, 17 ago. 2021. Wiley.
- GONZALEZ-SANCHEZ, Juan A.; RAMIREZ-ARROYO, Giovanni F.. "Chikungunya Virus: History, Geographic Distribution, Clinical Picture, and Treatment." **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 37, n. 4, 2018, p. 187+.
- GUTIÉRREZ-BUGALLO, Gladys *et al.* Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 4, p. 561-569, 18 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC.
- GUZMÁN, Camilo *et al.* Ecoepidemiology of Alphaviruses and Flaviviruses. **Emerging And Reemerging Viral Pathogens**, p. 101-125, 2020. Elsevier.
- HEMANN, Emily A.; GALE, Michael; SAVAN, Ram. Interferon Lambda Genetics and Biology in Regulation of Viral Control. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 8, n. 1707, 6 dez. 2017. Frontiers Media SA.
- HOLMES, Autumn C. *et al.* A molecular understanding of alphavirus entry. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 16, n. 10, 22 out. 2020. Public Library of Science (PLoS).
- HUCKE, Friederike I. L. *et al.* CHIKV strains Brazil (wt) and Ross (lab-adapted) differ with regard to cell host range and antiviral sensitivity and show CPE in human glioblastoma cell lines U138 and U251. **Virus Genes**, [S.L.], v. 58, n. 3, p. 188-202,

26 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

JOHNSON, Christine Kreuder *et al.* Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 7 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

KOYAMA, Shohei *et al.* Innate immune response to viral infection. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 336-341, set. 2008. Elsevier BV.

LEE, Na-Rae *et al.* Activation of RIG-I-Mediated Antiviral Signaling Triggers Autophagy Through the MAVS-TRAF6-Beclin-1 Signaling Axis. **Frontiers In Immunology**, [S.I.], v. 9, n. 2096, 12 set. 2018.

MAYER, Sandra V.; TESH, Robert B.; VASILAKIS, Nikos. The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155-163, fev. 2017. Elsevier BV.

MARCELLO, Tobias *et al.* Interferons  $\alpha$  and  $\lambda$  Inhibit Hepatitis C Virus Replication With Distinct Signal Transduction and Gene Regulation Kinetics. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 131, n. 6, p. 1887-1898, dez. 2006. Elsevier BV.

OLAGNIER, David *et al.* Inhibition of Dengue and Chikungunya Virus Infections by RIG-I-Mediated Type I Interferon-Independent Stimulation of the Innate Antiviral Response. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 88, n. 8, p. 4180-4194, 15 abr. 2014. American Society for Microbiology.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Chikungunya**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya#:~:text=Chikungunya%20virus%20was%20first%20identified,Africa%2C%20Europe%20and%20the%20Americas>

PIELNAA, Paul *et al.* Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, p. 34-42, abr. 2020. Elsevier BV.

SPARKS, Wendy O.; BARTHOLOMAY, Lyric C.; BONNING, Bryony C.. Insect Immunity to Viruses. In: BECKAGE, Nancy E.. **Insect Immunology**. Academic Press, 2008. Cap. 9. p. 209-242.

STANIFER, Megan L.; PERVOLARAKI, Kalliopi; BOULANT, Steeve. Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1445-1467, 21 mar. 2019. MDPI AG.

TSCHÁ, Marcel Kruchelski *et al.* Pirahy virus: identification of a new and potential emerging arbovirus in south brazil. **Virus Evolution**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 1-10, 1 set. 2021. Oxford University Press (OUP)

VALENTINE, Matthew John; MURDOCK, Courtney Cuin; KELLY, Patrick John. Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-18, 2 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

WANG, Wenshi *et al.* Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated

Genes. **Trends In Microbiology**, v. 25, n. 7, p. 573-584, jul. 2017. Elsevier BV.

WEAVER, Scott C. *et al.* Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. **Antiviral Research**, v. 94, n. 3, p. 242-257, jun. 2012. Elsevier BV.

WEAVER, Scott C. *et al.* Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual Review Of Medicine**, v. 69, n. 1, p. 395-408, 29 jan. 2018. Annual Reviews.

WEAVER, Scott C.; REISEN, William K.. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, fev. 2010. Elsevier BV.

WOO, H.-J.; REIFMAN, J.. A quantitative quasispecies theory-based model of virus escape mutation under immune selection. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 109, n. 32, p. 12980-12985, 23 jul. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences.

WOOLHOUSE, Mark E.J.; GOWTAGE-SEQUERIA, Sonya. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1842-1847, dez. 2005. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

ZHOU, Jian-Hua *et al.* Type III Interferons in Viral Infection and Antiviral Immunity. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 173-185, nov. 2018. S. Karger AG.