



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde

Ceyla Maria Oeiras de Castro

Análise Metabolômica de Alterações
Induzidas pelo Vírus Mayaro em Células Vero

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

São José do Rio Preto
2015

Ceyla Maria Oeiras de Castro

Análise Metabolômica de Alterações Induzidas
pelo Vírus Mayaro em Células Vero

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Doutor no
Curso de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Eixo Temático:
Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio L. Nogueira

São José do Rio Preto

2015

Castro, Ceyla Maria Oeiras de

Análise Metabolômica de Alterações Induzidas pelo Vírus Mayaro em Células Vero/ Ceyla Maria Oeiras de Castro. São José do Rio Preto, 2015.

112p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira

1. Alphavirus. 2. Celulas Vero. 3. Metabolismo.

CEYLA MARIA OEIRAS DE CASTRO

Análise Metabolômica de Alterações Induzidas
pelo Vírus Mayaro em Células Vero

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: _____

2º Examinador: _____

3º Examinador: _____

4º Examinador: _____

5º Examinador: _____

Suplentes: _____

São José do Rio Preto, ____/____/____.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Generalidades.....	2
1.2 Vírus Mayaro.....	5
1.2.1 Agente infeccioso.....	8
1.2.2 Mecanismos de replicação.....	10
1.2.3 Propagação e ensaio em cultura de tecidos.....	14
1.3 Características biológicas.....	15
1.3.1 Hemaglutinação.....	15
1.3.2 Receptores celulares.....	15
1.3.3 Efeitos sobre células de vertebrados.....	18
1.3.4 Efeitos sobre células de invertebrados.....	18
1.3.5 Composição antigênica.....	18
1.4 Evolução e filogenia.....	20
1.5 Patogenicidade em vertebrados.....	22
1.5.1 Entrada do vírus.....	22
1.5.2 Locais primários de replicação.....	23
1.5.3 Propagação.....	23

1.5.4 Tropismo celular e tecidual.....	24
1.6 Resposta imune.....	25
1.6.1 Resposta inata.....	25
1.6.2 Resposta adaptativa para vírus específico.....	26
1.6.3 Imunidade humoral.....	26
1.6.4 Imunidade celular.....	27
1.7 Virulência.....	27
1.7.1 Persistência.....	28
1.8 Infecção congênita.....	29
1.9 Patologia em mosquitos.....	29
1.10 Abordagem metabólica.....	30
1.11 Relevância do estudo.....	37
1.12 Objetivos.....	40
1.12.1 Objetivo geral.....	40
1.12.2 Objetivos específicos.....	40
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1 Materiais.....	43
2.1.1 Linhagem celular.....	43
2.1.2 Vírus.....	43
2.2 Métodos.....	44
2.2.1 Preparação do meio de cultura.....	44
2.2.2 Repique celular.....	45
2.2.3 Infecção da célula C6/36.....	46
2.2.4 Teste de plaqueamento em meio semi-sólido.....	47
2.2.5 Infecção da célula Vero.....	48
2.2.6 Pré-lavagem do Vivaspin	49

2.2.7 Preparação das amostras para RMN	50
2.2.8 Espectroscopia de RMN	50
2.2.9 Análises estatística e quimiométrica	50
3 RESULTADOS.....	54
3.1 Teste de plaqueamento em meio semi-sólido.....	54
3.2 Alterações metabólicas em sobrenadantes infectados e não infectados.....	54
3.3 Resultados das alterações metabólicas pela espectroscopia de RMN.....	54
3.4 PCA, PLS-DA e OPLS-DA.....	57
4 DISCUSSÃO.....	62
4.1 Sobrenadantes de células Vero infectados no período de 2 h...	62
4.2 Sobrenadantes de células Vero infectados no período de 6 h...	65
4.3 Sobrenadantes de células Vero infectados no período de 12 h.	68
4.4 Metabólitos detectados e identificados nos três períodos p.i.....	69
5 CONCLUSÃO.....	74
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

Dedico esta dissertação ao Said Senado e a minha amada Filha, pela dedicação, pela enorme compreensão da distância, pelo amor e carinho que recebo. E a minha Mãe do coração pelo imenso apoio, bondade e generosidade.

Agradecimentos

1. Agradeço ao meu orientador *Prof. Dr. Mauricio Nogueira* pela oportunidade deste doutorado e de aprender metabolômica. Foi uma experiência muito preciosa.
2. Agradeço ao meu amigo *Joaquim Ivanir* pelo imenso apoio e sincera amizade.
3. Agradeço ao *Fábio (UNESP)* por sua ajuda nas análises metabolômica.
4. Agradeço ao *Mânlio* por suas considerações e sugestões no texto da tese.
5. Agradeço *Alessandra Vidotto* pelo apoio técnico na etapa inicial dos experimentos.
6. Agradeço aos colegas do laboratório pelo apoio técnico e amizade, em especial a *Tauyne, Milene, Tati, Lucas, Gislaine, Evelin, Aninha, Ari e Danila*.
7. Agradeço aos colegas da pós-graduação, *Luís, Zé e a Fabiana*.
8. Agradeço ao *CNPq-Capes*, pelo incentivo a pesquisa e apoio com a bolsa de estudo.
9. Agradeço a *FAPESP* pelo apoio financeiro, referente ao processo nº 2009/53989-4 (CMIB).

O livre arbítrio é dado nesta existência terrena, mas é preciso ter coragem, paciência, tolerância, fé e amor no coração, para entender o verdadeiro sentido da Vida.

(Allan Kardec)

-
- Figura 1.** (A) Figura ilustrativa do ciclo de replicação do *Alphavirus*. (B) Figura ilustrativa do esquema estrutural da poliproteína..... 9
- Figura 2.** Gráficos de agrupamento obtidos de sobrenadantes de células Vero não infectados (○= azul) e infectados com MAYV (△= vermelho) em 2, 6, e 12 h p.i. Baseados em dados de RMN..... 58
- Figura 3.** Representação gráfica de metabólitos identificados com altos níveis em sobrenadantes de células Vero infectados com MAYV (I) e baixos níveis em sobrenadantes não infectados (C). Os gráficos são baseados em dados de RMN..... 59
- Figura 4.** Representação gráfica da variação dos níveis de metabólitos identificados em sobrenadantes de células Vero não infectados (C) e infectados com MAYV (I). Os gráficos são baseados em dados de RMN..... 60

Lista de Tabelas

Tabela 1.	<i>Alphavirus</i> , abreviações, características biológicas, e associação com doenças.....	4
Tabela 2.	Metabólitos identificados em sobrenadantes de células Vero não infectados (C) e infectados com MAYV (I) com níveis diferenciados para cada período p.i.....	56
Tabela 3.	Metabólitos identificados em sobrenadantes de células Vero não infectados (C) e infectados com MAYV (I).....	57

Lista de Abreviaturas

ATP	- trifosfato de adenosina.
CHIKV	- vírus chikungunya.
Da	- daltons.
EA.hy926	- célula somática híbrida endotelial.
ECP	- efeito citopático.
HI	- inibição de hemaglutinação.
HS	- sulfato de heparina.
K	- kelvin (temperatura).
Kb	- Kilobases.
KDa	- Kilodaltons.
MAYV	- vírus Mayaro.
MEM	- meio mínimo essencial de Eagle.
MHz	- mega-hertz.
MO	- microscópio óptico.

<i>nsP</i>	- proteína não estrutural.
<i>OPLS-DA.</i>	- <i>Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis.</i>
<i>PCA</i>	- <i>Principal component analysis.</i>
<i>p.i</i>	- pós-infecção.
<i>PLS</i>	- <i>Partial Least Square Discriminant Analysis.</i>
<i>RE</i>	- retículo endoplasmático.
<i>RMN</i>	- ressonância magnética nuclear.
<i>SFB</i>	- soro fetal bovino.
<i>SNC</i>	- Sistema nervosa central.
<i>TCA</i>	- ciclo do ácido tricarboxílico.
<i>TF</i>	- proteína <i>transframe.</i>
<i>UTR</i>	- região não traduzida.

O presente estudo tem como objetivo avaliar o perfil metabólico extracelular de células Vero infectadas pelo vírus Mayaro. Neste estudo metabolômico o uso da ressonância magnética nuclear combinado a métodos analíticos multivariados, ferramentas de reconhecimento padrão que demonstraram variações metabólicas que podem ser atribuídas ao efeito da infecção do vírus Mayaro. As células Vero foram infectadas e incubadas em períodos de 2, 6 e 12 horas. Em cada período ocorrem variações diferenciadas nos níveis de vários metabólitos, como aminoácidos, ácidos orgânicos, composto de guanidina, monoamina, carboidratos e ácidos graxos. Esses compostos orgânicos são metabólitos envolvidos na via da glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, via das pentoses-fosfato, e via da oxidação dos ácidos graxos (via da β -oxidação). Este estudo demonstra *footprinting analysis* que representa o efeito da ação do vírus no metabolismo da célula Vero, além disso, essas análises indicaram o estado metabólico intracelular, e contribuem para o conhecimento da influência do microorganismo no metabolismo celular.

Palavras-chave: 1. Alphavirus; 2. Células Vero; 3. Metabolismo.

This study aimed at assessing the extracellular metabolic profile of Vero cells infected by Mayaro virus. In this metabolomic study, the use of nuclear magnetic resonance associated to multivariate analytical methods, devices of standard recognition, showed metabolic variations which can be attributed to the effect of Mayaro virus infection. Vero cells were infected and incubated for 2, 6 and 12 hour periods. Differentiated variations in the levels of several metabolites such as amino acids, organic acids, guanidine compound, monoamine, carbohydrates and fatty acids have occurred in each period. These organic compounds are metabolites involved in the glycolysis pathway, tricarboxylic acid cycle, pentose phosphate pathway, and the oxidation pathway of fatty acids (via the β -oxidation). This study demonstrates footprinting analysis representing the effect of the virus action on the Vero cell metabolism, furthermore, these analyzes point out the intracellular metabolic state, improving the knowledge of the microorganism influence on cellular metabolism.

Keywords: 1. Alphavirus; 2. Vero Cells; 3. Metabolism.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

O gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*, inclui 29 espécies de vírus ⁽¹⁾ que podem ser classificados antigenicamente em pelo menos oito complexos (Tabela 1). Os primeiros registros de doenças associadas aos *Alphavirus* são datados desde os séculos 18 e 19, quando epidemias de encefalite fatal em equinos no nordeste dos Estados Unidos (EUA) e surtos de artrite no sudeste asiático foram reconhecidos e registrados. ⁽²⁻⁵⁾ No entanto, doenças artríticas induzidas por *Alphavirus* são muito mais antiga do que estas datas, mas não foram descritas com clareza ou diferenciadas de infecções mais prevalentes. A primeira associação clara do *Alphavirus* com doenças articulares veio em 1953, quando o vírus chikungunya (CHIKV) foi isolado do sangue de indivíduos na Tanzânia com artrite severa. ⁽⁶⁾ Durante os anos posteriores, uma série de vírus causadores de artrite, frequentemente acompanhada por uma erupção cutânea, foram isolados na África, Austrália e América do Sul. ^(7, 8, 9) O primeiro *Alphavirus* a ser cultivado, foi o vírus da encefalite equina ocidental (WEEV), isolado em 1930 a partir de tecidos do sistema nervoso central (SNC) de dois cavalos envolvidos em uma epidemia de encefalite equina no vale San Joaquin na Califórnia, EUA. ⁽¹⁰⁾ Em 1933, Kelser ⁽¹¹⁾ mostrou que WEEV poderia ser transmitido por mosquitos. Em 1952 ocorreu o primeiro isolamento proveniente de *pool* de mosquito *Culex* spp coletado próximo de Sindbis, Egito. ^(12, 13)

Em geral, *Alphavirus* patogênico para os seres humanos são divididos em vírus que causam doenças caracterizadas por eritema cutâneo e artrite, encontrados principalmente no velho mundo, e vírus que causam encefalite, encontrados principalmente no novo mundo. ⁽²⁾ Mamíferos como humanos e cavalos, tendem a desenvolver doença grave ou fatal, mas são hospedeiros sem importância para os ciclos de transmissão do vírus endêmico, mas podem ser importantes para a manutenção de epidemias. ⁽²⁾

Em 1967 esses vírus foram adicionados a uma lista de vírus transmitidos por artrópodes, e definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como arbovírus. ⁽¹⁴⁾ Esses vírus são geograficamente restritos em suas distribuições e foram encontrados em todos os continentes e em muitas ilhas. ⁽²⁾ São mantidos na natureza principalmente através da transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis (mamíferos e aves) e artrópodes hematófagos (mosquitos), além disso, piolhos e ácaros são vetores artrópodes hematófagos para alguns *Alphavirus*, e peixes são hospedeiros para *Alphavirus* aquáticos. ⁽²⁾ O vírus se multiplica e produz viremia nos vertebrados, nos artrópodes eles se multiplicam nos tecidos, e são passados para outros vertebrados por picadas de artrópodes, após um período de extrínseca incubação. ⁽¹⁴⁾ Em 1954, os arbovírus foram divididos por Casals e Brown em três grupos sorológicos A, B, e C, com base na reatividade cruzada dos testes de inibição de hemaglutinação (HI). ⁽¹⁴⁾ Vírus da encefalite eqüina oriental (EEEV), WEEV, vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEEV) constituem arbovírus do grupo A. A reação cruzada do segundo conjunto, inclui dengue, encefalite St. Louis e vírus da febre amarela, constituindo os arbovírus do grupo B e os vírus não reativos foram designados

grupo C. ⁽¹⁴⁾

Tabela 1. *Alphavirus*, abreviações, características biológicas, e associação com doenças. (Griffin DE. 2012)

Vírus (abreviação)	Complexo Antigênico	Principal Hospedeiro Vertebrado (reservatório)	Distribuição Geográfica	Doença Humana	Animal Doente
Aura (AURAV)	WEE	?	América do Sul	-	-
Barmah Forest (BFV)	BF	Aves	Austrália	Febre, artrite, exantema	-
Bebaru (BEBV)	SF	?	Ásia	-	-
Cabassou (CABV)	VEE	?	Guiana Francesa	-	-
Chikungunya (CHIKV)	SF	Primatas	África, Sudeste da Ásia, Filipinas, Indonésia	Febre, artrite, exantema	-
Encefalite Equina Oriental ou do Leste (EEEV)	EEE	Aves	América do Norte, América do Sul, Caribe	Febre, encefalite	Cavalo, faisão, ema, pombo, peru
Everglades (EVEV)	VEE	Mamíferos	Florida	Febre, encefalite	-
Fort Morgan (FMV)	WEE	Aves	Colorado	-	-
Getah (GETV)	SF	Mamíferos	Ásia	Febre	Cavalo
Highlands J (HJV)	WEE	Aves	América do Norte	-	Cavalo, peru, ema, faisão, pato, grua
Mayaro (MAYV)	SF	Mamíferos	América do Sul	Febre, artrite, exantema	-
Middelburg (MIDV)	MID	?	África	-	-
Mosso das Pedras/78V3531	VEE	?	América do Sul	-	-
Mucambo (MUCV)	VEE	?	América do Sul, Caribe	-	-
Ndumu (NDUV)	NDU	?	África	-	-
O'nyong-nyong (ONNV)	SF	?	Leste da África	Febre, artrite, exantema	-
Pixuna (PIXV)	VEE	Mamíferos	Brasil	-	-
RioNegro/AG80 (RNV)	VEE	Mamíferos	Argentina	-	-

Ross River (RRV)	SF	Mamíferos	Austrália, Pacífico Sul	Febre, artrite, exantema	-
Alfavírus Salmonid (SAV)	?	Peixe	Atlântico Norte	-	Truta, salmão
Semliki Forest (SFV)	SF	?	África	Febre, encefalite	Cavalo
Sindbis (SINV)	WEE	Aves	Austrália, África, Norte da Europa, Oriente Médio	Febre, artrite, exantema	-
Elefantes Marinhos do Sul (SESV)	?	Focas	Antártica	-	-
Tonate (TONV)	VEE	?	América do Sul	Febre, encefalite	-
Trocaria (TROV)	WEE	?	América do Sul	-	-
Una (UNAV)	SF	?	América do Sul, Trinidad	-	Cavalo
Encefalite Equina Venezuelana (VEEV)	VEE	Mamíferos	América do Sul, América do Norte	Febre, encefalite	Cavalo
Encefalite Equina Ocidental ou do Oeste (WEEV)	WEE	Aves, Mamíferos	América do Sul, América do Norte	Febre, encefalite	Cavalo, ema
Whataroa (WHAV)	WEE	Aves	Nova Zelândia, Austrália	-	-

1.2 Vírus Mayaro

Entre as espécies de *Alphavirus*, destaca-se o vírus Mayaro (MAYV), agrupado no complexo antigênico Semliki Forest (SF) (Tabela 1), isolado pela primeira vez em Trinidad (1954), Caribe, de amostras de trabalhadores florestais com sintoma febril. ⁽¹⁵⁾ No Brasil, mais especificamente no estado do Pará, em áreas do rio Guamá (1955), no município de Belterra (1978), em Conceição do Araguaia (1981) e Benevides (1991) o MAYV foi isolado de várias amostras de trabalhadores rurais com febre e dor de cabeça. ⁽¹⁵⁾ No estado do Mato Grosso em 1968, evidências sorológicas detectaram a circulação do MAYV entre Índios

Xavantes. ⁽¹⁶⁾ Em 2008, um surto do MAYV foi detectado em um assentamento localizado no município de Santa Bárbara, Pará. ⁽¹⁵⁾

Estudos posteriores demonstraram que o vírus tem uma ampla distribuição no norte da América do Sul e na bacia do rio Amazonas. ⁽¹⁷⁾ Os casos humanos são esporádicos e ocorrem principalmente em pessoas com contato recente com florestas tropicais úmidas. ⁽¹⁵⁾ Em janeiro 2010, um turista francês diagnosticado com infecção do MAYV, desenvolveu febre alta e artralgia na volta de uma viagem de 15 dias na bacia do Amazonas. ⁽¹⁸⁾ Um estudo transversal utilizando entrevistas e métodos soropidemiológicos, entre indivíduos da guarnição militar na floresta amazônica equatoriana, verificou que 338 indivíduos estudados (174 do litoral do Equador, 73 da zona andina, e 91 nativos da floresta amazônica) apresentaram soroprevalência para infecção do MAYV 20 vezes maior (46%) do que indivíduos (2%) das outras áreas. ⁽¹⁹⁾ Em Manaus, capital do Amazonas, no período de 2007-2008 foi detectado por imunoenensaio enzimático anticorpos IgM para o MAYV, em 33 pacientes de ambos os sexos com idade de 6-65 anos. ⁽²⁰⁾ Em agosto 2011, um turista suíço de 27 anos apresentou sintomas clínicos com persistentes dores nas articulações periféricas, após retorno das férias de 3,5 semanas nas proximidades de Tarapoto, uma pequena cidade situada na floresta tropical da bacia amazônica no norte do Peru, o diagnóstico foi de infecção pelo MAYV, confirmado por teste de imunofluorescência e ensaios de neutralização. ⁽²¹⁾ Um estudo com 335 amostras de sangue de comunidades indígenas na região do rio negro, indicou que 41,5% das amostras tinham anticorpos contra o MAYV, demonstrando que é comum a infecção na região. ⁽²²⁾ No período de 2010-2013 um estudo longitudinal prospectivo

investigou manifestações clínicas e resposta sorológica, entre 2.094 indivíduos febris na região da bacia amazônica peruana, 16 indivíduos confirmaram infecção pelo MAYV. ⁽²³⁾ Em agosto de 2013, uma turista alemã apresentou manifestações clínicas após 2,5 semanas de férias na Guiana Francesa, através do ensaio de imunofluorescência indireta confirmou-se infecção pelo MAYV. ⁽²⁴⁾ No período de outubro de 2011 a julho de 2012, ocorreu um surto de dengue no estado do Mato Grosso, através de investigações moleculares e técnica de isolamento detectou-se MAYV em 15 (2,5%) de 604 pacientes, 12 pacientes apresentaram co-infecção de MAYV e dengue tipo 4. ⁽²⁵⁾

A principal via de transmissão do MAYV é por artrópodes, pela picada de mosquitos, os principais mosquitos vetores são do gênero *Haemagogus* que habitam as florestas e os hospedeiros vertebrados são mamíferos, principalmente primatas não humanos. ^(15, 26, 27) A manutenção natural do ciclo de replicação ocorre em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Mosquitos infectados por alimentação em um hospedeiro virêmico são capazes de transmitir o vírus num período de 4 a 10 dias mais tarde (incubação), e permanecer persistentemente infectados. ⁽²⁾ A manutenção deste ciclo necessita de um hospedeiro de amplificação que desenvolva uma viremia de magnitude suficiente para infectar mosquitos por alimentação. Para muitos *Alphavirus*, os seres humanos são hospedeiros incapazes de infectar mosquitos de forma eficiente. ⁽²⁸⁾ Estudos citam a transmissão via aerossol e contaminação em ambientes de laboratório. ^(15, 26)

A infecção pelo MAYV causa sintomas clínicos que incluem dor de cabeça, febre, artrite, vômitos, diarreia e eritema que duram de 3 a 5 dias. ⁽²⁹⁾ O

diagnóstico pode ser obtido através do isolamento do vírus a partir de sangue, por sorologia utilizando ensaio imunoenzimático para captura de IgM e por detecção do material genético. (30, 31, 32)

1.2.1 Agente infeccioso

Mayaro é um vírus envelopado, possui RNA de fita simples, polaridade positiva, apresenta uma simetria icosaédrica e diâmetro de 60-70 nm. (1, 33) O RNA fica dentro do capsídeo que é formado por uma única proteína e que apresenta um arranjo icosaédrico. (1) O vírus é sensível ao éter e detergente. O nucleocapsídeo é envolvido pelo envelope lipídico derivado da membrana plasmática da célula hospedeira, no envelope estão inseridas glicoproteínas codificadas pelo vírus, E1 e E2. (34,35) Estas proteínas formam heterodímeros que são agrupados para formar trímeros como 80 botões na superfície do vírus. (36, 37)

O material genômico tem 11-12 kb em tamanho e está organizado em proteínas não estruturais (nsP) na região 5'UTR (região não traduzida) e proteínas estruturais na região 3'UTR (Figura 1). (38, 39, 40) As nsP são codificadas a partir do RNA genômico 49S composto de uma fita simples, não segmentada, capeada, e o RNA mensageiro senso positivo e poliadenilado é infeccioso. (41, 38) As proteínas estruturais são codificadas a partir de um RNA subgenômico 26S. As quatro nsP tem função na replicação do RNA viral e na produção do RNA subgenômico. (42)

A tradução do RNA subgenômico 26S gera uma poliproteína viral que codifica 5 proteínas estruturais, C, E3, E2, 6K e E1. (43, 44) A porção N-terminal da proteína C presume-se ligação ao RNA genômico viral, enquanto que a

porção mais conservada de C-terminal interage com a cauda citoplasmática de E2 e com outras cópias da proteína C de modo a formar o nucleocapsídeo. ⁽³⁸⁾

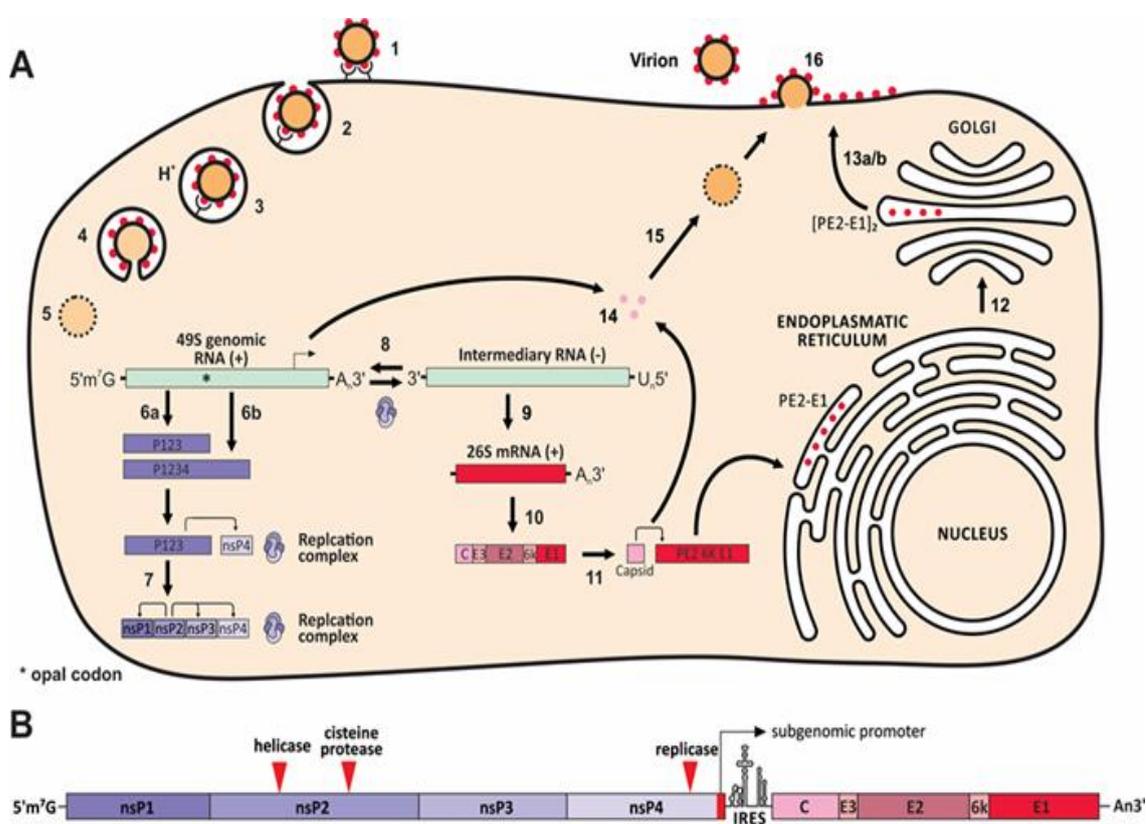


Figura 1. (A) Figura ilustrativa do ciclo de replicação do *Alphavirus*. (B) Figura ilustrativa do esquema estrutural da poliproteína. (Kuhn RJ. 2012)

A glicoproteína E3 é pequena e rica em cisteína, serve como uma sequência sinal para pE2 (precursor de E3 e E2), é clivada a partir de E2 pela

peptidase celular furina no complexo trans-Golgi, permanece associada no complexo *spike* ou peplômero sob condições ácidas, muitas vezes se desprende quando o *vírião* brota na superfície da célula infectada. ⁽⁴⁵⁾ Atua mediando à dobragem correta de E2, é necessária para PE2 heterodimerizar com E1 na etapa de transporte até a superfície celular, e como parte do heterodímero PE2-E1, E3 previne ativação prematura de E1. ⁽⁴⁶⁾ A glicoproteína E2 é uma proteína transmembrana que possui dois ou três sítios de N-glicosilação e contém os epítomos mais importantes para anticorpos neutralizantes. ⁽⁴⁶⁾ A porção intracitoplasmática tem um segundo trecho de aminoácidos hidrofóbicos amarrados à superfície interna da membrana. ⁽⁴⁶⁾ A proteína 6K serve como um peptídeo sinal de E1, é clivada a partir de E1 e E2 pela peptidase sinal celular, tem importante função no brotamento e pequenas quantidades são incorporadas dentro do *vírião*. ^(47, 48) A proteína E1 possui um ou dois sítios de N-glicosilação, uma cauda curta intracitoplasmática (um ou dois resíduos de aminoácidos) posicionada no trecho interno conservado de aminoácidos hidrofóbicos na porção N-terminal, que serve como peptídeo de fusão para entrada do vírus na célula. ⁽⁴⁹⁾ Padrões de glicosilação e de conteúdo lipídico é determinado pela célula hospedeira. ⁽⁵⁰⁾

1.2.2 Mecanismos de replicação

Os *Alphavirus* possuem uma ampla variedade de hospedeiros, tanto em termos de espécies de animais susceptíveis como em linhagens celulares sensíveis a replicação do vírus. Essa extensa variabilidade de hospedeiros tem gerado especulações sobre a natureza dos receptores, e duas hipóteses propõem explicar este fenômeno. ⁽¹⁴⁾ A primeira, afirma que na glicoproteína viral

E2, superfície do vírus, múltiplos sítios ligam-se a receptores celulares distintos. A segunda propõe que o vírus usa receptores de ubiquitina, que são altamente conservados entre espécies, incluindo os mamíferos e mosquitos. O mecanismo de ligação a receptores, provavelmente é a combinação destas duas hipóteses a estratégia de fixação do *Alphavirus* na célula. ⁽¹⁴⁾

O vírus Sindbis (SINV) pertence ao gênero *Alphavirus*, tem sido muito estudado devido em grande parte ao seu fácil crescimento em cultura de célula, e sua habilidade em causar doença leve ou inaparente em humanos, estudos que demonstram os mecanismos de replicação dos *Alphavirus*, cita o SINV como cepa referência (Figura 1). ⁽⁵¹⁾ O ciclo de vida do *Alphavirus* inicia a partir da ligação do vírus a receptores celulares específicos, prosseguindo pela via endocítica para ter acesso ao interior da célula. O vírus é endocitado dentro de vesículas formadas pela via dependente de clatrina. ⁽⁵²⁾ A fusão da membrana celular com o envelope viral é desencadeada pela exposição a condições ácidas, desestabilizando o heterodímero E1-E2 e desassociando as duas glicoproteínas, resultando na exposição do peptídeo de fusão (E1). ^(53, 54) Com a trimerização de E1 o peptídeo de fusão é inserido dentro da membrana alvo pela via dependente de colesterol, formando um poro nas duas membranas, e então o nucleocapsídeo é liberado para o citoplasma. Em condições ácidas, o nucleocapsídeo é desmontado e o RNA genômico é liberado no citoplasma. ^(55, 56, 57)

O *Alphavirus* quando infecta a célula hospedeira produz três tipos de RNAs: RNA fita (+) genômico 49S, RNA (-) complementar e RNAm subgenômico 26S. ⁽⁵⁸⁾ A síntese desses três RNAs são regulados fortemente pelo complexo

proteico formado pelas quatro nsPs. O RNA genômico 49S atua como RNAm sintetizando duas poliproteínas (P123 e P1234).⁽⁵⁹⁾ A tradução do RNAm no nucleotídeo 60 sintetiza P123 que gera as nsPs e P1234 que gera as proteínas estruturais. P123 é pequena, mas muito abundante, a sua tradução termina no códon *opal*.⁽⁶⁰⁾ P1234 é extensa e pouco abundante, e é produto da tradução do códon *opal*. O processamento da P123 ocorre pela ação da protease codificada pelo vírus, localizada dentro da nsP2.^(61, 62) A tradução da P123 gera as quatro nsP (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), que formam um complexo de replicação, atuando e regulando a replicação do RNA genômico 49S, a síntese de fitas (-) e a síntese RNAm subgenômico 26S.⁽⁶³⁾

As proteínas estruturais são produzidas na fase intermediária da replicação do vírus. Fitas (-) complementares são transcritas em fitas (+) genômica na fase da replicação do RNA genômico 49S, e simultaneamente a fase de síntese das proteínas estruturais, RNAm subgenômico 26S são transcritos a partir de fitas (-), traduzidos próximo a região codificante de C-terminal de P1234, e geram as cinco proteínas estruturais, seguindo a ordem de tradução C, PE2 (E3+E2), 6K e E1.⁽⁶⁰⁾ A síntese de fitas (-) depende de vários fatores, elementos de sequência conservados (CSE), complexo proteico P123+nsP4, e fatores do hospedeiro.⁽⁶⁴⁾

A presença da estrutura secundária tipo grampo (*hairpin*), situado entre nucleotídeos 77 e 139 no RNAm subgenômico 26S, aumenta o processo de tradução da poliproteína estrutural.⁽⁶⁵⁾ A poliproteína é processada por proteases virais e celulares, gerando autênticas proteínas estruturais. A proteína C é a primeira a ser traduzida e logo após o ribossomo retirar as junções entre

ela e PE2, é liberada imediatamente por autoproteólise. ⁽⁶⁶⁾ A proteína C codifica uma protease semelhante a serina no domínio C-terminal, com dobramento (*fold*) semelhante ao da quimiotripsina. ⁽⁶⁷⁾ A proteína C sendo liberada forma-se outra porção N-terminal de PE2, que tem a função de sinalizar a translocação de PE2 ao retículo endoplasmático (RE). ⁽⁶⁸⁾ A proteína 6K é liberada por clivagens de sinalase celular. A clivagem em 6k permite a translocação de E1 para RE. ^(69, 70)

As proteínas do envelope ou glicoproteínas PE2+E1 translocadas para o RE, são processadas e submetem-se a modificações pós traducionais como glicosilação, onde cadeias grandes de manose são adicionadas aos sítios de N-glicosilação de PE2 e E1. ⁽⁷¹⁾ Estudos demonstraram uma série de complexos dobramentos intermediários, auxiliados por chaperones, e junto à troca e formação de ligações dissulfeto, resultando na heterodimerização de E2 e E1. ⁽⁷²⁾ Ocorre também o processo de oligomerização de PE2+E1, necessário para saída das glicoproteínas do RE e seguir para o complexo de Golgi. Quando o heterodímero (E2+E1) atinge a rede do trans- Golgi, e antes de chegar à membrana plasmática, PE2 é clivada pela peptidase celular furina, resultando no processo de maturação das glicoproteínas E2 e E1, com isso forma-se o complexo *spike* das glicoproteínas, saindo do Golgi em direção a membrana plasmática. ^(73, 74) A proteína E3 é liberada ou fica associada ao complexo *spike* após a clivagem do seu precursor PE2. Esta clivagem é necessária para ativação da fusão e entrada do vírus em uma nova célula. ^(75, 76) Estudos demonstraram que vacúolos citopáticos atuam guiando as glicoproteínas para regiões de brotamento. ⁽⁷⁷⁾

Em paralelo ao processamento e maturação das glicoproteínas do envelope no RE, ocorre à etapa de montagem do nucleocapsídeo no citoplasma, após a clivagem autoproteolítica na proteína C, ela é liberada e se associa transitoriamente ao ribossomo, iniciando a encapsidação do RNA genômico para que ocorra a montagem do nucleocapsídeo. ^(78, 79) Estudos revelaram a conservação de componentes estruturais e funcionais, que regulam o sinal do empacotamento do RNA genômico em diversos *Alphavirus*. ⁽⁷⁹⁾ Com a montagem do nucleocapsídeo e a formação do *spike* de glicoproteínas, o ciclo de replicação segue para o estágio final, o brotamento do vírus. Para que ocorra o brotamento, é necessária uma interação efetiva do nucleocapsídeo com o *spike* de glicoproteínas. ⁽⁸⁰⁾ Além dessa interação, a presença do colesterol na membrana plasmática e o metabolismo de lipídios da célula hospedeira também são necessários para o brotamento do vírus. ^(81, 82)

1.2.3 Propagação e ensaio em cultura de tecidos

Isolamentos iniciais de *Alphavirus* podem ser feitos utilizando a metodologia clássica de inoculação intracerebral em camundongos lactentes, no qual é um hospedeiro muito suscetível à infecção como a maioria dos *Alphavirus*. ^(6, 15, 83) Muitos *Alphavirus* podem também ser isolados e propagados eficientemente em fibroblastos primários de embrião de pinto (CEF) e numa ampla variedade de linhagens celulares contínuas de mamíferos, tais como células epiteliais humanas (HeLa, MRC5), células de rim de *hamster* (BHK), células de rim de macaco (Vero), fibroblastos de rato e células de neuroblastoma. ^(15, 84)

A maioria dos *Alphavirus* formam placas em células de mamífero ou de

aves susceptíveis, sob uma camada de ágar (*overlay*).⁽⁸⁵⁾ Linhagens de células de mosquito (C6/36) também são sensíveis à replicação, mas muitas vezes sem efeito citopático (ECP).^(86, 87) O primeiro ensaio em placas de um vírus isolado de animal, foi WEEV em células CEF, o ensaio em placas continua sendo um método prático e sensível para quantificar o vírus infeccioso.⁽⁸⁸⁾ O tamanho da placa é determinado pelo tipo de ágar utilizado, também está associada à ligação do vírus a carga negativa de polissacarídeos sulfatados presentes no ágar, e pela eficiência da replicação.^(89, 90)

1.3 Características biológicas

1.3.1 Hemaglutinação

Os *Alphavirus* podem hemaglutinar eritrócitos aviários (por exemplo, gansos, galinhas), a hemaglutinação tem sido utilizada como um método de quantificação do vírus e inibição da hemaglutinação (HI) para medição de anticorpos antivirais.⁽⁹¹⁾ Hemaglutinação requer exposição prévia do vírus ao pH ácido, inicialmente depende da glicoproteína E1, o que reflete, provavelmente, a ligação do domínio de fusão da glicoproteína E1 com lipídios da membrana do eritrócito.⁽⁹¹⁾ E2 também participa da hemaglutinação porque alguns anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para E2 também têm atividade HI.^(92, 93) O teste de HI tem sido útil para determinar as relações antigênicas entre os *Alphavirus*.⁽⁹⁴⁾

1.3.2 Receptores celulares

A ligação do vírus à superfície da célula e a entrada na célula é um processo que depende de vários componentes, inicialmente das glicoproteínas virais E1 e E2, da ligação com moléculas da superfície celular, do pH baixo no

endossoma, e da fusão com lipídios da membrana. ^(90, 95) Variação em qualquer um desses componentes afeta a eficiência da infecção e provavelmente células susceptíveis não sejam infectadas *in vivo*. ^(90, 95) A ligação específica vírus e célula é determinada principalmente pela glicoproteína E2. ^(90, 95) O papel importante de E2 na interação inicial vírus-célula é evidenciado pela habilidade de MAb anti-E2 inibir a ligação do vírus a célula, anticorpos anti-idiotípico específicos a MAb - E2 reconhecem supostos receptores do vírus nas células, e alterações de aminoácidos em E2 afeta a ligação do vírus a diferentes tipos celulares. ^(96, 97)

A identificação de receptores específicos de *Alphavirus* tem sido difícil, e pode ser complicada pelo uso experimental de cepas que são adaptadas a replicação em cultura de tecido. ⁽⁹⁸⁾ Como cada *Alphavirus* infecta uma variedade de hospedeiros, incluindo aves, mamíferos, e mosquitos, o vírus deve usar um processo evolutivo bem conservado, uma molécula da superfície celular ou múltiplas moléculas como receptores para o início da infecção. ⁽²⁾ Nenhum dos receptores de *Alphavirus* identificados parece ser de uso exclusivo, o que sugere a possibilidade de vários receptores. Em alternativa, os *Alphavirus* utilizam combinações de co-receptores para alcançar uma ampla variedade de hospedeiros, e evidenciam um tropismo específico observado *in vivo*. ⁽²⁾

O primeiro receptor de *Alphavirus* a ser identificado foi a molécula do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC) em células humanas e de camundongos. ⁽⁹⁹⁾ Esta molécula não é absolutamente necessária, porque células que não expressam moléculas de MHC podem ainda ser infectadas. ⁽⁹⁹⁾ A elevada afinidade para o receptor da laminina foi identificado

como um receptor em células BHK e como um provável receptor em células de mosquito C6/36. O receptor integrina ligante de colágeno (VLA-1, CD49a/CD29) é usado como receptor nas células HeLa. ^(95, 100) O tipo de célula em que o vírus é cultivado pode influenciar nas interações iniciais vírus - receptor. Sulfato de heparina (HS) pertence à família dos glicosaminoglicanos, é uma molécula importante na ligação inicial para várias cepas de *Alphavirus*. ⁽¹⁰¹⁾ A glicoproteína E2 contém um domínio de ligação à heparina, que se sobrepõe ao epítipo neutralizante E2c. As alterações de aminoácidos nesta região está direcionada mais a resíduos carregados positivamente, aumentando a eficiência de ligação a células em cultura de tecidos. ^(98, 102, 103)

A entrada na célula após a ligação inicial requer endocitose, seguida por uma mudança conformacional no trímero dos heterodímeros E1-E2 induzidos pela exposição a um pH baixo na entrada do endossoma. ^(104, 105) Os *Alphavirus* podem interagir e se fundir com as membranas lipossômicas que não tenham o receptor da proteína viral. ⁽¹⁰⁵⁾ A fusão é uma propriedade da glicoproteína E1, uma proteína de fusão de classe II com uma homologia estrutural a proteína E dos flavivírus. ⁽²⁾ A dissociação da proteína E1 de E2, em associação com membranas que contêm colesterol, formam trímeros E1 estáveis. Durante esta mudança conformacional, o peptídeo de fusão no interior E1 é exposto e inserido na monocamada externa da bicamada lipídica. ⁽²⁾ A etapa de fusão necessita de condições ideais, como a presença de colesterol e esfingolípídeos na membrana da célula alvo e o pH exato. Mudanças de aminoácidos em E1 afetam a capacidade de fusão. ^(106, 107)

1.3.3 Efeitos sobre células de vertebrados

Os *Alphavirus* replicam-se rapidamente em linhagem de células de vertebrados, a liberação de partículas virais ocorre em 4 a 6 horas após a infecção. No momento da entrada do vírus, ocorre um aumento na permeabilidade, talvez por causa da formação de poros pelas proteínas E1, 6K e/ou *transframe* (TF). ^(2, 108) A inserção de glicoproteínas recém-sintetizadas na membrana plasmática torna as células infectadas capazes de induzir energia metabólica, trifosfato de adenosina (ATP) dependente da formação de sincícios, e também pela exposição ao pH ácido. ^(2, 109) A infecção provoca extensos ECP, caracterizado por arredondamento celular, encolhimento, e vesículas citoplasmáticas, a morte celular ocorre por indução de apoptose em 24 a 48 horas. ⁽¹¹⁰⁾

1.3.4 Efeitos sobre células de invertebrados

Estudos de infecção utilizando *Alphavirus* em linhagens celulares derivados de larvas *Aedes albopictus* e *Ae. Aegypti* demonstraram diferenças na replicação entre as células de vertebrados e invertebrados. ^(2, 111) A cinética de replicação do vírus é semelhante, frequentemente o vírus amadurece dentro de estruturas vesiculares na célula e são liberados por exocitose, ao invés da via membrana plasmática. ^(87, 112) Em linhagem de células de mosquito, os *Alphavirus* são muito propensos a causar infecção persistente não citopática ou por um processo de morte celular sem apoptose. ^(87, 111, 113)

1.3.5 Composição antigênica

Todos os *Alphavirus* estão relacionados e compartilham sítios antigênicos comuns, foi demonstrado em testes de HI, fixação de complemento (CF) com

soros policlonais e por lise de linfócitos-T citotóxicos em células. ^(94, 114) Provavelmente, a reatividade antigênica cruzada reflete nas sequências conservadas na proteína C e glicoproteína E1, conferindo a mesma proteção cruzada. ⁽¹¹⁴⁾ Essa reatividade cruzada formou a base para a classificação original de um dos sorogrupos de arbovírus, o grupo A (*Alphavirus*), ainda é um valioso método de identificação e classificação inicial de *Alphavirus*. ^(14, 94) Os vírus que possuem proximidades antigênicas dentro do sorogrupo formam um complexo antigênico. Sete complexos antigênicos foram identificados dentro do sorogrupo *Alphavirus*: Barmah Forest (BF), EEE, Middelburg (MID), Ndumu (NDU), Semliki Forest (SF), VEE e WEE (Tabela 1). ⁽²⁾

Os anticorpos para E1 são mais propensos a reagir de forma cruzada com outros *Alphavirus* do que anticorpos anti-E2. Isto confirma dados de sequências conservadas na proteína E1. ^(92, 115) Ensaio de ligação competitiva utilizando MAbs identificaram cerca de sete epítomos na glicoproteína E1. A maioria dos epítomos da região E1 não são expostos na superfície do vírus, mas estão presentes na superfície de células infectadas ou na etapa de exposição do ácido nucleico do vírus. ^(115, 116, 117) O epítomo E1-157 está envolvido na etapa de exposição do ácido nucleico. Anticorpos monoclonais neutralizantes distinguem cepas diferindo apenas nos resíduos 72 e 313 de E1. ^(116, 118, 119)

Anticorpos contra E2 são geralmente específicos do vírus. Ensaio de ligação competitiva utilizando MAbs identificaram 4-5 epítomos na glicoproteína E2. ^(92, 120) As atividades biológicas dos anticorpos anti-E2 *in vitro* incluem HI, neutralização da infectividade do vírus, e o bloqueio de ligação do vírus na superfície da célula. Muitos MAbs anti-E2 têm atividade tanto neutralizante como

inibitória de hemaglutinação, sugerindo que estas funções se sobrepõem e que a alteração conformacional em E2 que ocorre após a exposição ao pH ácido é menos drástica do que em E1. ^(118, 121, 122)

1.4 Evolução e filogenia

Os *Alphavirus* que replicam em artrópodes, aves, reptéis, peixes e mamíferos, derivam de um único *protoalphavirus* desconhecido e fazem parte da superfamília de vírus. ^(123, 124) Esta superfamília, inclui vírus de RNA de plantas com uma organização genética semelhante e proteínas replicase, mas diversas proteínas do capsídeo. ^(123, 124) Entre os *Alphavirus*, os aminoácidos importantes para a estrutura secundária (por exemplo, resíduos cisteína) foram conservados nas glicoproteínas E1, E2 e E3, o que sugere que a estrutura tridimensional do vírus é semelhante para todos. A proteína do capsídeo e E1 são as mais conservadas das proteínas estruturais, ao passo que E2 é mais divergente. ⁽¹²⁵⁾ Regiões altamente conservadas nos genes nsP1 e nsP4 têm permitido o desenvolvimento de *primers* para detectar uma variedade de *Alphavirus* por transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). ⁽¹²⁶⁾ Critérios atuais de classificação de espécie de *Alphavirus* combinam genética, ecologia, e informação antigênica. ⁽²⁾ As espécies geralmente têm ciclos de transmissão distintos e diferem em mais de 23% ao nível de nucleotídeos, e 10% na sequência de aminoácidos quando genes da proteína E1 são comparados. ⁽²⁾

Igualmente como acontecem com outros vírus de RNA, os *Alphavirus* sofrem alteração genética principalmente por acúmulo de mutações pontuais no RNA genômico. Isto ocorre a uma taxa evolutiva lenta $1-7$ substituições $\times 10^{-4}$ de nucleotídeos por ano, no entanto, é estimado para outros vírus de RNA 5

substituições $\times 10^{-3}$ de nucleotídeos por ano. ^(127, 128) A recombinação entre *Alphavirus* pode ser demonstrada *in vitro*, mas é rara e geralmente coloca o vírus quimérico em desvantagem replicativa. ^(124, 129) Ocorreu ocasionalmente na natureza uma recombinação natural e bem sucedida entre dois *Alphavirus* distintos, um evento que se estima ter ocorrido há milhares de anos. ^(124, 125) Os *Alphavirus* provavelmente são originários da América e do velho mundo, posteriormente, expandiram para o resto do mundo. ^(130,131) Estudos de reconstrução filogenética apoiam esta visão da evolução dos *Alphavirus*, a maior divergência de sequência está dentro dos vírus do novo mundo do que os vírus do velho mundo, e do relacionamento antigênico entre o MAYV na América do Sul e o vírus Semliki Forest (SFV) na África. ⁽⁹⁴⁾

O MAYV apresenta dois genótipos distintos, D e L, ambos apresentam uma afinidade filogenética com o vírus Una. ⁽²⁶⁾ O genótipo D circula no planalto central, na região amazônica do Brasil, Peru, Bolívia, Venezuela, Colômbia, Argentina e Trinidad. O genótipo L parece ocorrer somente na região amazônica do estado do Pará. ⁽²⁶⁾

Os *Alphavirus* são transmitidos por uma variedade de invertebrados, principalmente espécies de mosquito. No entanto, o vírus geralmente tem um vetor principal ou preferido para o ciclo enzoótico. ⁽²⁾ A maioria dos *Alphavirus* pode infectar uma grande variedade de vertebrados, como aves, mamíferos, peixes e atuam como propagador primário e hospedeiro (Tabela 1). O vetor invertebrado específico e o hospedeiro vertebrado usado por um *Alphavirus* irá contribuir de forma significativa para determinar a distribuição geográfica do vírus. ⁽²⁾ Experimentos *in vitro* modelam a evolução utilizando passagem do vírus

em células de vertebrados, células de invertebrados, ou alternando células de vertebrados e invertebrados, isso mostrou o aumento da *fitness* de replicação nas passagens, pouco acúmulo de mutações vai se alternando nas replicações, tal como acontece na natureza, entre células de vertebrados e invertebrados. (132, 133)

Estudos sugerem que períodos curtos de transmissão e a mobilidade do hospedeiro influência na diversidade genética e evolução dos *Alphavirus* geograficamente. (128, 134) Vírus que se hospedam em espécies de hospedeiros aviários enzoóticos, propagam-se por extensas regiões geográficas e evoluem dentro de poucos genótipos altamente conservados, enquanto que vírus que habitam hospedeiros mamíferos enzoóticos tem uma extensão de dispersão mais limitada, evoluem dentro de múltiplos genótipos restritos geograficamente. (135, 136) Algumas cepas de *Alphavirus* associadas com epidemias ou epizootias são antigenicamente e biologicamente distinguíveis de cepas enzoóticas. (137, 138)

1.5 Patogenicidade em vertebrados

1.5.1 Entrada do vírus

A principal via de transmissão dos *Alphavirus* em vertebrados é através da picada de um mosquito infectado. Os mosquitos salivam durante a alimentação e depositam saliva infectada com vírus extravascularmente. (139) Os títulos do vírus na saliva são os mais elevados, no início após o mosquito ser infectado e ao longo do declínio, com taxas de transmissão após 1 a 2 semanas, mas os mosquitos permanecem infectados por toda a vida. (140, 141)

1.5.2 Locais primários de replicação

Os sítios iniciais de replicação do vírus provavelmente variam com o vírus

e hospedeiro. ^(142, 143) Após inoculação subcutânea, o vírus pode infectar o músculo esquelético no local ou ser absorvido infectando células Langerhans da pele. Células de Langerhans e dendríticas transportam o vírus para os gânglios linfáticos local de drenagem da inoculação, que também podem ser infectados. ^(142, 143, 144) A infecção destas células apresentadoras de antígeno próximas da pele pode ser uma via comum para iniciar a infecção natural. ⁽²⁾

1.5.3 Propagação

Os *Alphavirus* induzem uma viremia substancial em hospedeiros amplificadores e hospedeiros susceptíveis à doença. ⁽¹⁴⁵⁾ A capacidade de montagem e de manter uma viremia, depende da produção contínua e eficiente do vírus em um sítio primário de replicação, da entrada do vírus no sistema vascular, e da eliminação lenta a partir do sangue. ⁽¹⁴⁵⁾ Estudos em animais mostraram que os vírus de formação de placas pequenas são geralmente menos virulento, porque eles são eliminados mais rapidamente da circulação do que os vírus de formação de placas grandes. ^(146, 147) Este fenômeno está relacionado com a capacidade do vírus em se ligar a pequenas placas HS e, assim, de ser rapidamente removido da circulação pelos glicosaminoglicanos altamente sulfatados no fígado. ⁽¹⁰²⁾ A capacidade de invadir órgãos-alvo, em parte, depende da duração e grau de viremia, mas também de outras características invasivas do vírus. ⁽¹⁴⁸⁾

A viremia pode ser acompanhada por uma produção de interferon (IFN), de outras citocinas pró-inflamatórias, e febre. ⁽²⁾ O vírus se espalha através do sangue para outros tecidos alvos. À medida que a resposta imune é induzida, a viremia é terminada, mas a febre é renovada com aparecimento de uma resposta

inflamatória mononuclear no tecido infectado. ⁽²⁾ Em infecções que conduzem exantema e artrite, as dores nas articulações geralmente aparecem cedo, após a infecção e antes do aparecimento do exantema. ⁽¹⁵⁾

1.5.4 Tropismo celular e tecidual

Os vírus que replicam inicialmente no músculo esquelético e gânglios linfáticos perto do local da inoculação, muitas vezes se espalham através da corrente sanguínea para locais distantes dos músculos esqueléticos e de outros tecidos linfáticos. ^(149, 150) Em camundongos, os miócitos cardíacos, osteoblastos, cérebro, neurônios da medula espinhal, e células de gordura marrom são locais secundários de replicação frequentes para muitos *Alphavirus*. ^(151, 152)

Nos seres humanos, a pele é um alvo para *Alphavirus* que causam exantema cutâneo, nas articulações a infecção viral causa artrite, no sistema nervoso causa encefalomielite. ⁽¹⁵³⁻¹⁵⁸⁾ Pesquisas realizadas a partir de biópsias de pele identificaram *Alphavirus*. As células-alvo para replicação na pele são epidérmicas basais e células epiteliais do ducto écrino (glândulas sudoríparas). ⁽¹⁵⁵⁾ As células-alvo específicas de infecções que conduzem a artrite não são bem conhecidas. ⁽¹⁵⁰⁾ Em camundongos, infectam condrócitos e células do periósteo (tecido de cartilagem articular). ^(150, 152) Células sinoviais humanas e macrófagos sustentam infecção *in vitro* e o RNA viral é detectado em espécimes de biópsia sinovial. ^(159, 160)

O mecanismo pelo qual *Alphavirus* encefalíticos entram no SNC não está totalmente esclarecido. ⁽²⁾ Estudos em ratos demonstraram infecção ou transporte por células endoteliais cerebrovasculares, infecção de células epiteliais do plexo coróide, infecção de neurônios olfativos e transporte por

nervos periféricos. ⁽¹⁶¹⁾ Neuroinvasividade é um componente de virulência que varia entre os vírus e cepas de vírus. Uma vez dentro do sistema nervoso central, o vírus pode se espalhar de uma célula para outra ou por meio do líquido cefalorraquidiano (LCR). ^(162, 163) Para a maioria dos *Alphavirus* encefalíticos, a célula alvo dentro do SNC é o neurônio e os danos para esta célula pode ser grave e irreversível. ^(163, 164)

1.6 Resposta imune

1.6.1 Resposta inata

O IFN é um componente importante na resposta do hospedeiro à infecção de *Alphavirus*. ^(2, 145) Em experimentos com animais o IFN tipo I é induzido abundantemente após infecção de *Alphavirus* e, provavelmente, nos seres humanos ocorra uma semelhança. ^(101, 156) Cepas de *Alphavirus* variam na sua capacidade de induzir o IFN, e a quantidade de IFN produzida é geralmente relacionada com o nível de replicação viral. ^(156, 165)

Os animais podem ser protegidos contra a infecção letal, se tratados com IFN ou indutor de IFN antes ou logo após a infecção. ^(166, 167) Os animais que não conseguem responder ao IFN por causa de deleções no receptor de IFN ou ausência de moléculas sinalizadoras de IFN desenvolvem infecções fatais, mesmo quando infectados com cepas de vírus avirulentos. ^(168, 169) Além disso, a ausência de uma resposta de IFN permite a replicação do vírus em células que normalmente se mantêm não infectadas. ⁽²⁾ O IFN parece atuar principalmente no início da replicação do vírus, sendo induzido durante o tempo da resposta imune específica. ^(2, 170)

O tratamento de células com IFN inibe a replicação do *Alphavirus*. A

ligação e a entrada do vírus não são afetadas e o RNAm é traduzido. ^(167, 171, 172) Etapas de replicação posteriores, incluindo a formação de complexos de replicação, síntese de proteínas estruturais, e morfogênese, são inibidas. ^(173, 174) Cepas virais variam na sua sensibilidade para atividades antivirais do IFN e isso pode ou não se correlacionar com a virulência. ^(168, 175) Mutações associadas com alteração de sensibilidade para IFN foram mapeadas nas regiões 5'UTR, nsP1 e nsP2. ^(168, 176)

1.6.2 Resposta adaptativa para vírus específico

A Resposta imune celular e humoral é induzida por infecção. A resposta imune celular manifesta-se pela presença de linfócitos reativos a vírus em drenagem nos nódulos linfáticos e no sangue, nos tecidos infectados ocorre a infiltração de células mononucleares, essa resposta celular aparece dentro de 3 a 4 dias após a infecção. ^(177, 178, 179) Ambas parecem desempenhar um papel importante na recuperação da infecção e proteção contra a reinfeção. ⁽²⁾

1.6.3 Imunidade humoral

Anticorpo IgM específico ao vírus é detectável muito cedo na doença humana, sua investigação é frequente no diagnóstico rápido de infecções. Anticorpo IgA específico ao vírus também aparece no início da infecção, mas diminui rapidamente. Anticorpo IgG aparece no soro após 7 a 14 dias e é mantido em níveis relativamente elevados por anos. ⁽¹⁸⁰⁻¹⁸⁴⁾ Muitas evidências apoiam a hipótese de que, a recuperação da infecção por *Alphavirus* depende em grande parte da resposta de anticorpos. ^(167, 185) A rapidez na síntese de anticorpos no hospedeiro é um resultado preditivo a encefalite, por isso que pacientes sem evidência de anticorpos num tempo avançado da doença são mais propensos a

morrer. ⁽¹⁸⁶⁾ Anticorpo pode neutralizar a infectividade do vírus e isto promove a depuração do vírus através do sistema reticuloendotelial, em conjunção com o complemento. O aparecimento de anticorpos tem correlação com a suspensão de viremia. ^(2, 185, 187)

1.6.4 Imunidade celular

A infecção induzida por *Alphavirus* estimula a produção de citocinas linfoproliferativa específica de vírus e linfócitos T citotóxicos. ^(188, 189) Após a inoculação do vírus na epiderme, as células Langerhans aumentam a expressão de antígeno de classe II do MHC, bem como, moléculas acessórias e co-estimuladora que aumentam a ativação de células T. ⁽¹⁹⁰⁾ As células T desempenham um papel na depuração do vírus e na proteção de aerossóis. ⁽¹⁹¹⁾

1.7 Virulência

Virulência é avaliada pela capacidade do vírus em causar doença fatal e, para *Alphavirus*, isto reflete geralmente na gravidade da doença neurológica. ⁽¹⁹²⁾ O grau de virulência é influenciado pelas características do hospedeiro e do vírus. ^(150, 193) Um determinante de virulência inicial do vírus é a susceptibilidade ao IFN mediada pela inibição da replicação. Vírus com maior susceptibilidade a IFN são atenuados comparados com vírus com menor susceptibilidade ao IFN. ⁽¹⁶⁸⁾ A capacidade de uma cepa viral causar doença fatal ou uma complicação relacionada à infecção depende também muitas vezes do fundo genético do hospedeiro, mas os determinantes específicos de susceptibilidade genética estão sendo identificados. ⁽¹⁹⁴⁾ Cepas avirulentas de *Alphavirus* podem replicar mal, mesmo em animais recém-nascidos, enquanto que cepas virulentas normalmente podem replicar e assim causar doença em adultos, e também nos

animais recém-nascidos. ^(195, 196)

Para *Alphavirus* encefalíticos, outro fator determinante da virulência viral é a capacidade de entrar no SNC de forma eficiente (neuroinvasividade). ^(197, 198) Muitas cepas de *Alphavirus* podem causar doença fatal após inoculação intracerebral ou intranasal, mas não após administração subcutânea ou intraperitoneal. ^(198, 199) O tempo de depuração do vírus no sangue muitas vezes está correlacionado com a virulência, cepas virulentas são frequentemente mais lentas na eliminação do que as cepas avirulentas. ^(198, 200) Viremia é uma função do nível de replicação periférica e rapidez de apuramento. ^(147, 198) Replicação periférica, viremia, neuroinvasividade e neurotropismo (capacidade de se replicar em células do SNC) contribuem para a virulência e tendem a ser influenciados pelas diferentes características moleculares do vírus. ⁽²⁾

1.7.1 Persistência

Estudos indicam que *Alphavirus* pode persistir após o aparecimento de uma resposta imune, na depuração do vírus a partir da circulação, e na eliminação aparente do vírus infeccioso a partir do tecido. ⁽²⁰¹⁾ Casos graves e progressivos de encefalite em humanos são citados e exames patológicos de tecidos do SNC, após meses e anos de resolução da encefalite aguda, mostraram um processo inflamatório ativo. ⁽²⁰²⁾ Proteínas e RNA virais podem ser detectados no sistema nervoso por um longo período. Postula-se que a persistência do vírus é devida falha do sistema imune em eliminar células infectadas. ^(195, 203-205)

1.8 Infecção congênita

Os *Alphavirus* podem ser transmitidos via placenta, experimentos em

animais indicam a proteção do feto quando acontece a transferência de IgG materno antiviral antes da infecção, mas quando a infecção fetal ocorre antes os anticorpos não medeiam a recuperação. ⁽²⁰⁶⁾ A infecção congênita em macacos induz malformações do cérebro e do olho, em seres humanos, não foram observadas anomalias, no entanto, o início da infecção pode levar a morte fetal. ^(207, 208)

1.9 Patologia em mosquitos

Os *Alphavirus* têm habilidade em infectar mosquitos com eficiente replicação e disseminação, as glândulas salivares são essenciais para a manutenção do ciclo de transmissão natural. ⁽²⁾ Nem todos os mosquitos que se alimentam de sangue de um hospedeiro virêmico são infectados, e nem todos os mosquitos infectados desenvolvem na glândula salivar a infecção e a capacidade de transmissão do vírus. ⁽²⁾ Muitos *Alphavirus* preferencialmente infectam uma variedade limitada de espécies de mosquitos, e esta especificidade de hospedeiro desempenha um papel importante na determinação da distribuição geográfica do vírus. ⁽²⁾ Mesmo dentro de uma espécie, as cepas de mosquitos podem variar na susceptibilidade à infecção por *Alphavirus*. ⁽²⁾ O período de incubação extrínseca, ou seja, o tempo entre uma refeição de sangue infectado e capacidade de transmitir a infecção, depende da rapidez com que o vírus replica e se dissemina nas glândulas salivares do mosquito. ⁽²⁾ Este período é relativamente curto (2-7 dias) para *Alphavirus* comparado com outros arbovírus. ⁽²⁰⁹⁾ Estudos recentes relataram que o MAYV pode ser transmitido via transovariana, o vírus é transmitido do mosquito adulto para sua progênie. ^(22, 26)

1.10 Abordagem metabolômica

A metabolômica tem evoluído a partir de um ramo pouco conhecido da química analítica, expandindo-se em diversas aplicabilidades, como descoberta de drogas ou desenvolvimento, toxicologia clínica, estudos nutricionais, fenotipagem quantitativa de plantas e microorganismos, e identificação de biomarcadores.⁽²¹⁰⁾ Os avanços técnicos ampliaram a sua utilização por centenas de laboratórios em todo o mundo.⁽²¹¹⁾

A metabolômica mudou o paradigma no campo da bioquímica analítica, é a área mais recente da biologia de sistemas, é definida como área pós-genômica mais emergente, estuda o metaboloma, termo sugerido pela primeira vez por Stephen Oliver em 1998, significa o conjunto de todos os compostos (metabólitos) de baixa massa molecular (< 1000 Da) produzidos e/ou modificados por um organismo no ambiente intracelular e extracelular.⁽²¹²⁻²¹³⁾

É datada desde a Grécia antiga a relação de alterações em tecidos e fluidos biológicos como indicativo de doença.⁽²¹⁴⁾ A partir da idade média, foram amplamente usadas tabelas de diagnóstico contendo características dos cheiros, sabores e cores da urina para várias condições médicas, tais características têm origem metabólica.⁽²¹⁴⁾ Em 1960 utilizou-se o primeiro método matemático para modelar o metabolismo das células, técnicas foram desenvolvidas, como cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massa (MS) para quantificar concentrações de metabólitos.⁽²¹⁴⁾ Em meados da década de 80 desenvolveu-se a ressonância magnética nuclear (RMN), sensível o suficiente para identificar metabólitos em fluidos biológicos não alterados, isto

conduziu a descoberta de alterações no perfil de metabólitos, causadas por certas doenças e por efeito colateral adverso a medicamentos.⁽²¹⁴⁾

Conceitos atuais na metabolômica, do ponto de vista analítico substituíram a classificação proposta por Oliver Fiehn em 2002.⁽²¹⁵⁻²¹⁶⁾ Há duas abordagens principais para analisar o metaboloma, a primeira é análise direcionada que determina um grupo de metabólitos pré-definidos, ignorando outros metabólitos detectáveis na análise. A outra abordagem é o perfil metabólico subdividido em *fingerprinting* metabólico que determina o perfil de metabólitos intracelulares, e *footprinting* metabólico que determina o perfil de metabólitos extracelulares.⁽²¹⁵⁻²¹⁶⁾ O perfil metabólico determina um conjunto de metabólitos ou produtos derivados dos mesmos, quando analisados podem ser identificados ou não, se for detectável na amostra por técnica analítica vem acompanhado de uma estimativa de quantidade absoluta ou relativa.⁽²¹⁷⁾ É comum fazer uso de separações cromatográficas para o perfil metabólico, mas a utilização de poderosos detectores químicos como RMN, espectroscopia de infravermelho usando transformação de Fourier (FT-IR), ou espectrometria de massa de ionização *electrospray* (ESI-MS) classificam rapidamente as amostras por análise de dados multivariados ou quimiometria.⁽²¹⁸⁾

Análise de metabólitos é muito mais complexa do que análise de DNA (genômico) e RNAm (transcriptômico), que se baseiam na análise química de biopolímeros composto de 4 nucleotídeos diferentes, no caso da proteína (proteoma) é consideravelmente complexo, se baseia na análise de biopolímeros formados por 22 aminoácidos diferentes, esses biopolímeros possuem similaridade na sua composição química, isso facilita o desenvolvimento de

métodos analíticos.⁽²¹⁰⁾ Na análise do metaboloma, são identificados milhares de compostos químicos com baixa massa molecular e propriedades químicas diferentes, como espécies iônicas, carboidratos hidrofílicos, álcoois e cetonas voláteis, aminoácidos e ácidos orgânicos, lipídeos hidrofóbicos e produtos naturais complexos.⁽²¹⁰⁾ Com essa diversidade de elementos químicos combinado a variações de concentração (pmoles a mmoles), torna análise de todo o metaboloma da célula uma tarefa muito difícil de ser realizada.⁽²¹⁰⁾

Análise dos metabólitos inicia com a preparação das amostras, foram desenvolvidos métodos eficientes acoplados aos poderosos detectores químicos de alta especificidade, tais como RMN, FT-IR, ou ESI-MS.⁽²¹⁹⁾ A preparação das amostras é uma etapa crucial para analisar o metaboloma, o primeiro passo é interromper rapidamente o metabolismo celular, denominado de *quenching* celular.⁽²²⁰⁻²²¹⁾ A literatura cita várias metodologias, no entanto, a técnica em nitrogênio líquido ou em solução de metanol frio (< - 40°C) são as mais empregadas. Os níveis de metabólitos variam rapidamente com quaisquer alterações no ambiente da célula, por isso a interrupção instantânea do metabolismo celular. Os metabólitos extracelulares possuem uma meia-vida maior do que os intracelulares.⁽²²⁰⁻²²¹⁾

A segunda etapa na preparação da amostra é a separação da biomassa celular do meio de cultura extracelular, essa técnica analisa metabólitos extracelulares em cultura de células ou microrganismos.⁽²²⁰⁻²²¹⁾ Se for identificação de metabólitos intracelulares, esses são extraídos do meio intracelular, as técnicas de extração utilizam solventes orgânicos para cada classe de metabólito, evitando ao máximo perdas por degradação e/ou reação

bioquímica, a extração os tornam acessíveis as diferentes técnicas analíticas. ⁽²²⁰⁻²²¹⁾ Após extração vem à concentração da amostra intracelular, geralmente a amostra fica diluída no volume do solvente orgânico usado na extração, a concentração é feita por liofilização, evaporação a vácuo dos solventes, ou por micro-extração em estado sólido. ⁽²²⁰⁻²²¹⁾

Após a preparação da amostra, segue a etapa de análise no detector químico, como RMN, esse método de detecção e identificação de metabólitos celulares, é muito utilizado na caracterização estrutural de compostos desconhecidos, e na análise do metaboloma celular. ⁽²¹⁰⁾ No entanto, existem situações que o espectro de RMN de ¹H não fornece dados suficientes para se caracterizar um metabólito desconhecido. Outro método de RMN de ¹³C é pouco sensível, e demorado para analisar uma única amostra. Os equipamentos para RMN são caros comparados aos de MS. ⁽²¹⁰⁾

Após análise dos metabólitos, os dados obtidos são convertidos em informações interpretáveis. Existem duas maneiras para converter os dados metabolômicos: a primeira é fazer uma classificação das amostras sem identificar os metabólitos, essa abordagem utiliza a quantificação relativa dos diferentes metabólitos, como por exemplo a intensidade de picos, esses diferentes compostos são classificados com uma nomenclatura aleatória, sem a identidade do composto, como por exemplo o tempo de retenção ou massa molar dos picos, ou compostos A, B, etc. ⁽²²⁰⁻²²¹⁾ Essa abordagem é feita quando não se consegue identificar compostos detectados, geralmente isso ocorre quando a amostra é injetada direto na RMN, sem separação prévia dos compostos da amostra através da cromatografia ou eletroforese. ⁽²²⁰⁻²²¹⁾ Esse método é

empregado para classificar formas mutantes com relação a tipos selvagens, classificar estágios diferentes no desenvolvimento de uma célula ou organismo, e também diferenciar entre células sadias e enfermas, sem identificar, necessariamente, a causa das alterações.⁽²²⁰⁻²²¹⁾ Contudo, as informações são limitadas por não identificar os metabólitos detectados, o que dificulta caracterizar qual via metabólica ativa foi alterada na célula, impedindo uma integração direta dos dados metabolômicos com dados das outras áreas da genômica funcional.⁽²²⁰⁻²²¹⁾

A segunda maneira é identificar um máximo de metabólitos possíveis dos que foram detectados. Essa abordagem evidencia o potencial de análise do metaboloma, na identificação e quantificação (relativa e absoluta) dos diversos metabólitos detectados nas amostras.^(219,222-223) Quando se observa alterações nos níveis de metabólitos específicos, evidenciasse a identificação de alterações em vias metabólicas específicas, e junto possibilita identificar e caracterizar novas vias metabólicas.⁽²¹⁰⁾ Contudo, facilita a integração com dados obtidos nas diferentes áreas da genômica funcional, caracterizando mutações e genes silenciosos, e elucidando mecanismos regulatórios do metabolismo celular.⁽²¹⁰⁾ Para esse tipo de abordagem, é necessária uma análise estatística dos dados, para saber se a variação no nível de cada metabólito é significativa, geralmente, são utilizados o teste t ou análise de variância (MANOVA), além disso, para esse tipo de análise são necessárias réplicas das amostras, em cultivo celular são feitas de três a seis réplicas, o uso do controle depende do estudo em questão.⁽²²³⁻²²⁴⁾

Os dados metabolômicos são multivariados e difíceis de serem visualizados, no entanto, neste tipo de análise no tratamento dos dados, o importante é ilustrar com clareza a visualização e apresentação dos dados, o ponto principal a ser ilustrado, são as principais diferenças nos níveis de metabólitos presentes nas amostras quando comparados entre si.⁽²¹⁰⁾

Os dados gerados a partir da multiplicidade de amostras (multiplicidade de variáveis) são tratados por diversos métodos analíticos softwares que estão disponíveis na internet e no mercado, alguns são gratuitos. Os principais métodos são análise do componente principal ou *Principal Component Analysis* (PCA), análise de discriminantes múltiplos ou *Fischer Discriminant Analysis* (FDA) e técnicas de agrupamento ou *clustering*.⁽²²⁰⁾ Esses métodos podem definir o perfil metabólico de uma amostra, ou seja, o perfil pode ser definido empiricamente como o conjunto de todos os metabólitos ou produtos derivados (identificados ou desconhecidos) detectado pela análise da amostra, utilizando um determinado método analítico, juntamente com estimativa da quantidade (relativa ou absoluta) de cada metabólito.⁽²¹³⁾

Outros métodos alternativos estão sendo explorados para melhorar a interpretação dos dados metabolômicos, além da integração com dados proteômicos e transcriptômicos.⁽²¹⁰⁾ Um dos métodos é a visualização em rede metabólica, na qual os compostos com níveis aumentado e diminuído são indicados direto na rede metabólica, usando uma escala de cores.⁽²²³⁾ O outro é o modelo de chips de DNA ou DNA *microarrays*, no qual o nome do metabólito substitui o nome do gene em colunas contendo duas variáveis, essas variáveis são nomeadas por exemplo como tipo selvagem (amostra padrão) e tipo mutante

(amostra analisada), cores indicam se o nível do metabólito aumentou ou diminuiu na amostra analisada comparado amostra padrão.⁽²²³⁻²²⁴⁾

Os dados metabolômicos estão integrados em diversas aplicações, como na caracterização funcional de genes redundantes e/ou genes silenciosos, são genes que estão ativos quando outros são deletados ou mutatos.⁽²²⁵⁾ Outra atuação está na biotecnologia, a engenharia metabólica é hoje uma área consagrada, atua no melhoramento modificando as propriedades de um organismo ou linhagem, utilizando a tecnologia do DNA recombinante.⁽²²⁶⁻²²⁷⁾ A tecnologia metabolômica também atua nos estudos de plantas, avanços no conhecimento dos metabólitos vegetais, gerou uma alta qualidade de controle nos alimentos que consumimos, também destaca-se uma outra atuação, no monitoramento e avaliação de alimentos contendo organismos geneticamente modificados. Atualmente a metabolômica de plantas é a área que apresenta maior avanço.^(210,228)

A combinação de estudos genômicos, transcriptômicos e/ou proteômicos junto com a metabolômica, ajudou na compreensão e interpretação de vários processos biológicos complexos.⁽²¹¹⁾ A partir desses estudos surgiram hipóteses, como possíveis pontos de regulação em nível molecular do funcionamento celular, definindo o fenótipo de células e tecidos alterados em resposta a modificações genéticas e ambientais, além de esclarecer diferenças como alterações nos níveis de RNAm que nem sempre correspondia as alterações nos níveis de proteínas, e quando traduzida, uma proteína podia ou não estar enzimaticamente ativa, esses resultados nem sempre correspondiam as alterações fenotípicas.⁽²²⁹⁻²³⁰⁾ Análises do metaboloma é o complemento

fundamental na determinação das funções gênicas.^(210,214) A dinâmica do complexo sistema regulatório operante dentro da célula é conduzida pelas vias metabólicas, os metabólitos atuam como substratos, produtos e cofatores das reações bioquímicas celulares, desempenham uma função importante na conexão das diferentes vias metabólicas que operam dentro da célula.⁽²³¹⁾

Dentro deste cenário, o sistema biológico, detectores químicos sensíveis com alta especificidade, integrados a métodos analíticos aumentaram significativamente as taxas de descobertas em estudos metabolômicos, tornando-se uma ferramenta geradora de hipóteses poderosas na ciência moderna.⁽²³²⁾ Isto significa que a funcionalidade do sistema biológico, em termos de interações entre numerosos compostos bioquímicos pode ser elucidado. O dinamismo desta área relativamente nova, tem o reconhecimento do seu potencial para aplicação em estudos biológicos.⁽²³²⁾

1.11 Relevância do estudo

A alta incidência de doenças causadas por arbovírus (dengue e chikungunya) está associada a vários fenômenos (climáticos e ambientais) que afetaram o nicho ecológico desses vírus zoonóticos; a degradação do meio ambiente também afetou os reservatórios de animais hospedeiros e dos vetores artrópodes (mosquitos e carrapatos), os quais compõem o ciclo silvestre (enzoótico) desses vírus. Esse ciclo enzoótico (manutenção) sofreu mutações e tornou-se potencialmente urbano; mudanças e adaptações do nicho ecológico de vários gêneros de vetores *Culex*, *Aedes albopictus* e *Ae. Aegypti*, combinado a grandes aglomerações urbanas, aumentou o potencial de transmissão desses vírus.

Esse fenômeno de vírus zoonótico que gera mutações induzindo uma melhor capacidade de transmissão por mosquitos vetores antropofílicos (ciclo urbano), tornando-se bem sucedido na sua propagação por várias regiões até causar epidemias, é referente ao vírus chikungunya. O MAYV também é capaz de induzir mutações e adaptar-se a um novo ciclo enzoótico, ou seja, mutações no seu ciclo de manutenção ampliarão sua susceptibilidade a outras espécies de mosquitos vetores (antropofílicos), e o nicho ecológico desses vetores está adaptado ao cotidiano doméstico e urbano, o que potencializará o ciclo biológico do MAYV a tornar-se um ciclo urbano, aumentando, dessa maneira, a incidência de infecções em várias regiões do Brasil.

Recentemente na região amazônica (Manaus) ocorreu um surto de doença febril causada por MAYV, com ciclos de transmissão noturno em áreas urbanas e semiurbanas. Isto destaca preocupações sobre o potencial de urbanização do MAYV no Brasil, um cenário de futuras epidemias, resultando em mais um problema de saúde pública.

Desde a década de 50 tem sido relatado surtos do MAYV na região norte do Brasil, causando uma doença febril aguda leve, o que caracteriza uma viremia transitória com duração de três e cinco dias, acompanhada por eritema cutâneo, mal-estar, dores de cabeça, dor nos olhos, mialgia, e artralgia que pode durar vários dias ou semanas. A febre mayaro, como é conhecida na literatura, apresenta uma clínica não específica, que é confundida muitas vezes com a febre causada pelo vírus chikungunya e dengue.

O MAYV tem o seu ciclo biológico na natureza como uma zoonose de primatas, tornando-se infectante pela picada de mosquitos do gênero

Haemagogus (principal vetor) que vivem em copas de árvores; o seu ciclo enzoótico é similar ao do vírus da febre amarela. A presença de humanos em florestas tropicais da América Sul (habitat zoonótico) por motivos de trabalho, viagem ou residência, deu início aos casos de doença febril causadas pelo MAYV.

A doença febril aguda causada pelo MAYV ainda é negligenciada, pelo fato dos sintomas clínicos serem não específicos e confundidos com outras viroses; também o diagnóstico laboratorial para o MAYV é realizado em poucos locais no Brasil. As formas graves da doença resultam em artralgia incapacitante crônica, não havendo estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatogênese do MAYV que induzem a artralgia, o que destaca a importância de investigar e entender esses mecanismos que contribuem para doença, ou seja, quais vias metabólicas o vírus precisa para sua replicação.

A análise metabolômica detecta e identifica diversos metabólitos que atuam no metabolismo celular; análise dos dados evidencia diferenças no nível de regulação do metabólito, além de identificar alterações em vias metabólicas específicas da célula. Estudos demonstram que alterações nas vias metabólicas causadas por um patógeno estão associadas aos sintomas clínicos da doença, além do que, revelam novos marcadores moleculares que podem auxiliar nas pesquisas de novos e seletivos fármacos, conduzindo a uma terapêutica mais eficiente.

Contudo, o presente estudo tem como objetivo analisar os níveis de regulação dos metabólitos extracelulares em células Vero infectadas pelo MAYV, o que poderá indicar o estado de regulação dos metabólitos intracelulares, além

de evidenciar possíveis vias metabólicas usadas por esse vírus durante seu ciclo de replicação, e definir o perfil metabólico das alterações. Vale ressaltar que esse é o primeiro estudo na literatura focalizando esse assunto.

1.12 Objetivos

1.12.1 Objetivo geral

Analisar metabólitos extracelulares produzidos em células Vero infectadas pelo MAYV.

1.12.2 Objetivos específicos

1. Comparar o perfil metabólito extracelular obtido de células Vero infectadas e não infectadas.
2. Analisar alterações de vias metabólicas induzidas pela infecção do MAYV em células Vero.
3. Comparar o nível de metabólitos em células Vero nos períodos de 2, 6 e 12 horas pós-infecção.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Linhagem celular

Utilizou-se célula Vero (ATCC n° CCL-81), uma linhagem contínua e aneuploidia, originária de células epiteliais renais extraídas de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). A linhagem foi desenvolvida por Yasumura e Kawakita na Universidade de Chiba, em Chiba, Japão.⁽²³³⁾ A linhagem celular foi nomeada Vero, da abreviação *Verda Reno*, que significa renal verde no idioma esperanto.⁽²³⁴⁾ Usou-se também, uma linhagem celular contínua o clone C6/36 (ATCC n° CRL-1660), originária de larvas de mosquitos *Aedes albopictus*.⁽²³⁵⁾ Ambas são susceptíveis ao isolamento e propagação de arbovírus.⁽²³⁶⁾

2.1.2 Vírus

A cepa de MAYV BeAr 20290 foi utilizada nos experimentos, isolada de mosquito *Haemagogus* em 1960 pelo Instituto Evandro Chagas (IEC). A cepa foi propagada inicialmente com uma passagem em cérebro de camundongo recém-nascido (espécie *Mus musculus*), através da inoculação pela via intracerebral e posteriormente inoculados em células C6/36 para produção do estoque viral.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação do meio de cultura

Utilizou-se o meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Cultilab, Campinas, Brasil) como meio de cultura para célula Vero, e o meio Leibovitz (L-15) (Cultilab) para célula de mosquito clone C6/36.

Num copo de beaker ou erlenmeyer colocou-se 9,77g do MEM em 1 litro de água Milli-Q. Para dissolver o MEM, usou-se uma barra e um agitador magnético, em seguida, foi adicionado 2,2g de bicarbonato de sódio 8,4% para ajustar o pH em 7,2 a 7,4. Em câmara de fluxo laminar o meio foi filtrado num sistema para filtração sob pressão utilizando uma membrana esterilizante de 0,22 μm (Nalgene -Thermo Scientific, USA), depois foram adicionados antibióticos (penicilina, estreptomicina, e gentamicina) (Sigma, USA) e fungicida (anfotericina) (Gibco, USA). Para testar a eficiência da filtração, adicionou-se um pequeno volume do meio MEM 1x (5-10 mL) em um tubo falcon e incubou-se a 37°C por 1 semana, para verificar o crescimento de microrganismos. Quando se confirmou a esterilidade do meio MEM 1x preparou-se o meio de crescimento adicionando 10% de suplemento rico em proteínas, soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) estéril e inativado a 56°C por 30 minutos, o meio foi conservado na geladeira a 4°C.

O preparo do meio L-15 foi semelhante à descrição anterior, 14,11g do L-15 em 1 litro de água Milli-Q, sem adicionar bicarbonato de sódio 8,4%. Após confirmar a esterilidade do meio L-15 preparou-se o meio de crescimento adicionando 10% SFB, também foi conservado em geladeira a 4°C.

2.2.2 Repique celular

Para manutenção da linhagem celular Vero, usou-se garrafa média (75 cm²) e semeou-se com densidade $8,5 \times 10^6$ de células, para formação da monocamada e confluência acima de 90%. Antes de iniciar o repique, foi feita uma observação da monocamada e da morfologia das células no microscópio óptico (MO).

Após a observação microscópica, o meio de crescimento MEM (10% SFB) da garrafa média foi descartado e a monocamada celular foi lavada (2x) com 3 mL de solução salina fosfatada (PBS 1x), para retirada de inibidores e competidores que poderiam interferir na ação da tripsina junto a ligações intercelulares. Em seguida, adicionou-se suavemente 1000 µL de tripsina (Cultilab) sobre a monocamada, agitando levemente a garrafa para espalhar a tripsina. Incubou-se a 28°C por 5-10 minutos para acelerar o processo de desprendimento das células na superfície da garrafa. Quando as células estavam totalmente soltas da superfície, foi acrescentado 9 mL do meio de crescimento MEM (10% SFB) homogeneizando suavemente a suspensão celular com pipeta, evitando a formação de bolhas. Foi adicionado 1 mL da suspensão celular em garrafas novas, completando o volume da garrafa com 14 mL do meio de crescimento MEM (10% SFB), e agitando levemente para espalhar as células na superfície da garrafa. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, e feita à observação microscópica do crescimento celular após 24 e 48 horas.

A linhagem celular C6/36 foi mantida em meio de crescimento L-15 (10% SFB), e semeada em garrafa média (75 cm²) para obter uma monocamada de

confluência entre 80-90%. Antes de iniciar o repique, foi feita uma observação da monocamada e da morfologia das células no MO. Em seguida, o meio de crescimento L-15 (10% SFB) foi descartado não totalmente para facilitar o desprendimento da monocamada, não se utilizou tripsina, foram efetuadas sucessivas batidas na garrafa com a mão, e 5-10 minutos de incubação a 28°C para acelerar o desprendimento das células na superfície da garrafa. Após a incubação e mais sucessivas batidas na garrafa, às células desprenderam-se totalmente da superfície, foi adicionado à suspensão celular 10 mL do meio de crescimento L-15 (10% SFB), homogeneizando suavemente com a pipeta, evitando a formação de bolhas. Foi adicionado 3 mL da suspensão celular em garrafas novas, completando o volume da garrafa com 12 mL do meio de crescimento L-15 (10% SFB), e agitando levemente para espalhar as células na superfície da garrafa. As garrafas foram incubadas em estufa a 28°C, e feita à observação microscópica do crescimento celular após 24 e 48 horas.

2.2.3 Infecção da célula C6/36

Para produzir o estoque MAYV, células C6/36 foram cultivadas em garrafa grande (150 cm²) com 90% de confluência da monocamada. Um volume de 10 mL da suspensão celular do clone C6/36 foi adicionado na garrafa grande, completando o volume da garrafa com 15 mL de meio de crescimento L-15 (10% SFB). Após 24 horas de incubação a 28°C a monocamada estava formada para etapa de infecção. O meio de crescimento L-15 (10% SFB) foi descartado e inoculado 200 µL da alíquota da cepa BeAr 20290, seguindo 1 hora de incubação a 28°C, nesse tempo a garrafa foi agitada gentilmente em intervalos de 15 em 15 minutos para facilitar adsorção do vírus na membrana celular. Após a etapa

de adsorção, foram adicionados 25 mL do meio de manutenção L-15 (1% SFB), após 24 h de incubação a 28°C foram feitas observações diárias no MO para visualização do ECP, no 6º dia de observação, a monocamada estava totalmente destruída, com presença característica de sincícios. O sobrenadante celular infectado foi aliquotado e congelado a -80°C, para procedimentos posteriores.

2.2.4 Teste de plaqueamento em meio semi-sólido

Para titular a cepa BeAr 20290, iniciou-se tripsinizando uma garrafa média de célula Vero para semear uma placa de 24 *wells* com densidade $0,22 \times 10^6$ de células. Adicionou-se 80 µL da suspensão celular em cada orifício da placa, completando com 2 mL do meio de crescimento MEM (10% SFB), observou-se a monocamada com 80-90% de confluência em MO após 24 horas de incubação em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Antes de infectar a célula, o vírus foi diluído 1:10 em séries de 10x, utilizou-se o meio MEM (1x) sem SFB como diluente e o preparo das diluições foram realizadas no gelo. A seguir, o meio de crescimento MEM (10% SFB) contido na placa foi descartado e inoculado 100 µL das diluições 10⁻⁵ a 10⁻⁹ com quatro réplicas para cada diluição, e simultaneamente 200 µL do diluente (sem o vírus) foi adicionado em cada orifício correspondente ao controle negativo, a placa foi suavemente agitada para espalhar o inóculo, depois se seguiu a etapa de adsorção por 1 hora em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Antes de completar o tempo de adsorção, preparou-se a mistura (*overlay*) semi-sólida, contendo 25 mL de carboximetil celulose 2% (CMC), 25 mL de meio MEM (2x) e 5 mL SFB (10%). Concluída a etapa de adsorção, 2 mL do *overlay* semi-sólido foi adicionado em cada orifício, para evitar contaminação os orifícios

correspondentes ao controle negativo foram adicionados primeiro e depois as diluições do vírus. Foram feitas observações diárias no MO após 24 h de incubação a 37°C com 5% de CO₂, em 72 h *overlay* foi removido e adicionado 300 µL de formaldeído (10%) para fixar a monocamada celular por 30 minutos, a seguir o formaldeído foi descartado cuidadosamente com pipeta sorológica sem encostar a monocamada, e 200 µL de cristal violeta (2%) foi adicionado para corar por 10 minutos, logo em seguida o excesso de cristal violeta foi removido suavemente em água corrente da torneira e a placa ficou invertida para secar. Para calcular o título do vírus utilizou-se a seguinte fórmula: número de unidades formadora de placas (PFU) da última diluição do vírus que apresente lise celular dividido por 4 (número de réplicas da diluição) vezes 10, o resultado determina o número de partículas virais em 1 mL (PFU/mL).⁽²³⁷⁾

2.2.5 Infecção da célula Vero

Para analisar alterações do metaboloma da célula Vero infectada pelo MAYV, semeou-se 6 placas de 6 *wells* com densidade $1,1 \times 10^6$ de células, a partir do repique celular de 2 garrafas médias. Um volume de 400 µL da suspensão celular foi adicionado em cada orifício das placas, completando com 3 mL do meio de crescimento MEM (10% SFB), observou-se a monocamada com 100% de confluência em MO após 24 horas de incubação em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Três placas foram previamente selecionadas a infecção para cada tempo de 2, 6 e 12 h, e as outras três designadas ao controle negativo de cada período. Nas placas destinadas a infecção, o meio de crescimento MEM (10% SFB) foi descartado e inoculado sobrenadante celular infectado com MOI (multiplicidade da infecção) de 5, simultaneamente o meio de crescimento MEM

(10% SFB) das placas controle também foi descartado e adicionado 2 mL do MEM sem SFB. As seis placas foram incubadas para adsorção do vírus por 1 hora em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação foi adicionado 2 mL do MEM sem SFB nas placas infectadas, e novamente levadas a estufa. A seguir, os sobrenadantes celulares infectados e não infectados das seis placas foram colhidos em tubos falcon, em períodos pré-definidos de 2, 6 e 12 h pós-infecção (p.i.) e congelados a - 80°C, para análises de RMN.

2.2.6 Pré-lavagem do Vivaspin

Filtro Vivaspin® (GE Healthcare, USA) de ultrafiltração de 3 kDa possui uma coluna de filtração com membrana contendo quantidades residuais de glicerina e azida de sódio, que interferem em análises RMN. Antes de adicionar as amostras no vivaspin, foi feita uma pré-lavagem da membrana adicionando 2 mL de água purificada, com centrifugação a 4000 rpm, à 4°C, no tempo de 24 minutos. Essa etapa foi feita em 20 ciclos de lavagem, para remoção de resíduos dos contaminantes. Recomenda-se no mínimo 10 ciclos de lavagem para remoção dos contaminantes do vivaspin e para sua utilização em RMN. Após a lavagem, o vivaspin foi armazenado na geladeira (4°C) com água purificada, cobrindo a superfície da membrana, para posteriores procedimentos de RMN.

2.2.7 Preparação das amostras para RMN

Todos os sobrenadantes de células Vero infectados e não infectados, coletados no período de 2, 6 e 12 h p.i., foram descongelados e adicionados nos vivaspin, em seguida centrifugados a 4000 rpm, por 10-15 min à 4°C, para

filtragem dos metabólitos extracelulares. Foi adicionado 550 μL do filtrado em 50 μL de água deuterada D_2O , e transferido para tubos RMN de 5 mm para análise de RMN.

2.2.8 Espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN foram gerados no equipamento Bruker Avance III HD operando em 600 MHz, e equipado com uma criosonda de canal triplo. A sequência de pulsos padrão da Bruker *noesygppr1d* foi usada, para supressão da água com tempo de mistura de 100ms. Dezesesseis *scans* foram coletados com quatro *dummy scans*. Largura espectral de 14 ppm foi utilizado e 32K pontos de dados. Tempo de reciclo foi definido para 5s com 0,2ms de recuperação de gradiente. Todos os experimentos foram realizados a uma temperatura de 293K. Antes da transformação de Fourier, um alargamento de linha de 1 Hz foi aplicado a cada decaimento livre da indução (FID- *Free Induction Decay*). Em seguida, a correção automática da linha de base foi realizada e verificada manualmente.

2.2.9 Análises estatística e quimiométrica

Antes da análise, todos os espectros foram referenciados em relação ao sinal de dubleto do grupo metila em lactato, que aparece na posição 1,33 ppm no espectro de RMN. A região de água entre 4,7-5,1 ppm foi removida. Os pontos de dados restantes foram carregados no *software* de estatística R versão 3.0.3 (<http://www.cran.r-project.org>) e analisados pelas ferramentas do pacote *muma* ⁽²³⁸⁾ e algoritmos desenvolvidos localmente. O teste estatístico de Welch foi utilizado para as duas populações, para inferir sinais que diferem em intensidade entre amostras controle e amostras infectadas. Além disso, medidas de *fold change* foram calculados e apresentados em valores de \log_2 . Apenas sinais que

apresentaram valores de P menores que 5% no teste t Welch, e log2 de *fold change* maior do que 1 foram incluídos para análises posteriores. Análise do componente principal (PCA-*Principal Component Analysis*), análise do discriminante por mínimo quadrado parcial (PLS-DA -*Partial Least Square - Discriminant Analysis*) e sua variante ortogonal (OPLS-DA) foram realizadas com o auxílio do pacote *muma* usando o conjunto de dados completo. Foram utilizados scores dos três métodos acima mencionados para visualização de diferenças em ambas as amostras. Além disso, scores do método PLS-DA foram utilizados adicionalmente para a seleção de sinais importantes responsáveis pela discriminação entre amostras controle e infectadas, com base nos sinais que foram avaliados previamente no teste t Welch e *fold change*. Os sinais com elevados valores absolutos de scores foram considerados para identificação do respectivo metabólito. Para a avaliação da concentração de metabólitos entre amostras controle e infectadas, *boxplots* foram utilizados para comparação do comportamento dinâmico em 2, 6 e 12 h p.i.

Para identificar metabólitos importantes para a divisão de grupos específicos (controle e infectado), assim como visualizados em gráficos PCA, PLS-DA e OPLS-DA, foi utilizado o *software* *chenomx* versão 8.1 (<http://www.chenomx.com>). Para análise dos dados RMN foram usados bancos de dados *online Human Metabolome Database* (HMDB) (211) e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoma* (KEGG).⁽²³⁹⁾

3 RESULTADOS

3.RESULTADOS

3.1 Teste de plaqueamento em meio semi-sólido

Na titulação utilizou-se uma alíquota da cepa BeAr 20290, proveniente do estoque viral, revelando no teste de plaqueamento um título de 1×10^7 PFU/mL.

3.2 Alterações metabólicas em sobrenadantes infectados e não infectados

Filtrados de sobrenadantes de células Vero infectados e não infectados analisados por RMN e métodos estatísticos multivariados, geraram um perfil metabólico extracelular ou *metabolic footprinting* atribuído ao vírus comparado ao controle. Foram detectados e identificados vários aminoácidos, ácidos orgânicos (ácido ceto-gama, ácido ceto-alfa, ácido hidrox-beta, ácido carboxílico, ácido dicarboxílico, ácido amino-alfa e ácido fenilpropanoico), composto de guanidina (poliamina), monoamina (fenol), carboidratos (monossacarídeo) e ácidos graxos (acil glicina e ácido graxo hidrox), esses compostos orgânicos são metabólitos envolvidos na via da glicólise, no ciclo do ácido cítrico (Krebs ou ácido tricarboxílico ou TCA), na via das pentoses-fosfato, e na via da oxidação dos ácidos graxos (via da β -oxidação). (Tabelas 2 e 3).

3.3 Resultados das alterações metabólicas pela espectroscopia de RMN

Os espectros das amostras infectadas foram diferentes dos não infectados, e os metabólitos que foram significativamente diferentes entre não infectados e infectados foram identificados. A partir dos resultados obtidos, observou-se que o efeito da infecção do MAYV em células Vero afetou o metabolismo de aminoácidos, metabolismo energético da célula (ciclo TCA, vias da glicólise e das pentoses-fosfato) e o metabolismo de ácidos graxos.

Uma análise comparativa entre os três períodos de infecção, revelou um nível de metabólitos diferenciado para cada período comparado com as amostras controle (não infectadas). Em amostras infectadas no período de 2 h p.i. triptofano, 3-fenilpropionato, valina, carnitina, 3-hidroxisobutirato (ácido 3-hidroxisobutírico), 2-oxoglutarato (ácido oxoglutárico), e piruvato apresentaram altos níveis diferenciados. (Tabela 2)

Em amostras de 6 h p.i., tiramina, galactose, glicose, creatina, creatina fosfato, galactarato, serina, e metilguanidina apresentaram aumento comparados as amostras controle. Nas amostras de 12 h p.i., τ (tau)-metilhistidina revelou alto nível comparado as amostras controle.

Vários metabólitos foram detectados e identificados simultaneamente nos três períodos de infecção (Tabela 3), alguns metabólitos apresentaram aumento nas amostras infectadas comparados ao controle (Figura 3) e outros revelaram altos níveis nas amostras não infectadas. (Figura 4)

Tabela 2. Metabólitos identificados em sobrenadantes de células Vero não infectados (C) e infectados com MAYV (I) com níveis diferenciados para cada período p.i.

Composto identificado	Deslocamento químico ppm	Intensidade relativa do pico no período p.i. (h)		
		2	6	12
Triptófano	7.33	C 12,29 ± 9,75 I 23,69 ± 7,42	ND	ND
3-fenilpropionato	7.33	C 12,29 ± 9,75 I 23,69 ± 7,42	ND	ND
Valina	3.60	C 11,13 ± 8,15 I 43,96 ± 31,55	ND	ND
Carnitina	3.55	C 10,88 ± 7,16 I 42,12 ± 8,4	ND	ND
3-hidroxisobutirato	2.44	C 26,94 ± 12,01 I 49,99 ± 14,67	ND	ND
2-oxoglutarato	2.44	C 26,94 ± 12,01 I 49,99 ± 14,67	ND	ND
Piruvato	2.37	C 22,75 ± 20,53 I 123,53 ± 89,26	ND	ND
Tiramina	6.89	ND	C 24,45 ± 9,42 I 62,16 ± 33,93	ND
Galactose	3.93	ND	C 21,79 ± 6,9 I 80,47 ± 24,76	ND
Glicose	3.92	ND	C 10,44 ± 2,28 I 27,27 ± 7,22	ND
Creatina	3.94	ND	C 24,19 ± 5,45 I 54,21 ± 17,76	ND
Creatina fosfato	3.94	ND	C 24,19 ± 5,45 I 54,21 ± 17,76	ND
Galactarato	3.93	ND	C 21,79 ± 6,9 I 80,47 ± 24,76	ND
Serina	3.93	ND	C 21,79 ± 6,9 I 80,47 ± 24,76	ND
Metilguanidina	2.81	ND	C 0,82 ± 1,84 I 5,12 ± 6,51	ND
τ(tau)- metilhistidina	7.73	ND	ND	C 18,36 ± 14,04 I 97,97 ± 5,03

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, a diferença significativa entre não infectados e infectados baseia-se no teste *t* Welch em que $P < 0,05$.
ND: não detectado.

Tabela 3. Metabólitos identificados em sobrenadantes de células Vero não infectados (C) e infectados com MAYV (I).

Composto identificado	Deslocamento químico ppm	Intensidade relativa do pico no período p.i. (h)		
		2	6	12
Glicina	3.55	C 10.88 ± 7.16 I 42.12 ± 8.4	C 22.73 ± 3.61 I 100.68 ± 61.62	C 20.73 ± 14.76 I 386.11 ± 27.77
Acetato	1.91	C 6.69 ± 4.8 I 34.84 ± 6.49	C 120.47 ± 24.45 I 322.94 ± 203.49	C 164.61 ± 94.07 I 751.94 ± 46.93
Alanina	1.48	C 13.46 ± 8.49 I 49.14 ± 4.73	C 33.06 ± 2.4 I 90.29 ± 38.81	C 40.62 ± 26.64 I 230.12 ± 8.26
Treonina	1.31	C 23.46 ± 16.02 I 48.01 ± 8.68	C 3.17 ± 2.07 I 10.2 ± 9.24	C 56.64 ± 26.95 I 299.28 ± 16.77
Tirosina	6.89	C 7.98 ± 6.84 I 27.94 ± 9.41	C 24.45 ± 9.42 I 62.10 ± 33.93	C 20.21 ± 16.95 I 114.2 ± 6.1
Glutamina	2.44	C 26.94 ± 12.01 I 49.99 ± 14.67	C 20.99 ± 4.37 I 49.11 ± 11.23	C 60.98 ± 44.85 I 206.22 ± 13.6
Metionina	2.13	C 34.53 ± 19.61 I 69.04 ± 22.79	C 49.9 ± 17.38 I 27.37 ± 18.83	C 97.57 ± 7.78 I 117.68 ± 65.46
Arginina	3.25	C 15.75 ± 9.28 I 34.52 ± 7.86	C 20.99 ± 4.37 I 49.11 ± 11.23	C 152.73 ± 45.68 I 115.91 ± 10.2
N-fenilacetilglicina	3.75	C 12.29 ± 9.75 I 23.69 ± 7.42	C 20.99 ± 4.37 I 49.11 ± 11.23	C 22.31 ± 5.6 I 42.76 ± 12.37
Lisina	1.90	C 7.34 ± 5.44 I 26.65 ± 9.8	C 20.99 ± 4.37 I 49.11 ± 11.23	C 22.31 ± 5.6 I 42.76 ± 12.37

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão, a diferença significativa entre não infectados e infectados baseia-se no teste *t* Welch em que $P < 0,05$.

3.4 PCA, PLS-DA e OPLS-DA

A Figura 2 mostra gráficos de PCA e OPLS-DA em dois componentes e PLS-DA em um componente obtidos de dados de RMN a partir de sobrenadantes não infectados e infectados no período de 2, 6 e 12 h p.i. O gráfico de PCA em 2 h p.i. apresenta agrupados claramente separados, nos gráficos de PCA em 6 e 12 h p.i., ocorre uma aproximação, mas os agrupados das amostras infectadas e das amostras controle apresentam diferenças. Os gráficos de PLS-DA e OPLS-DA, confirmam uma clara distinção entre os agrupados infectados e controle nos três períodos de infecção.

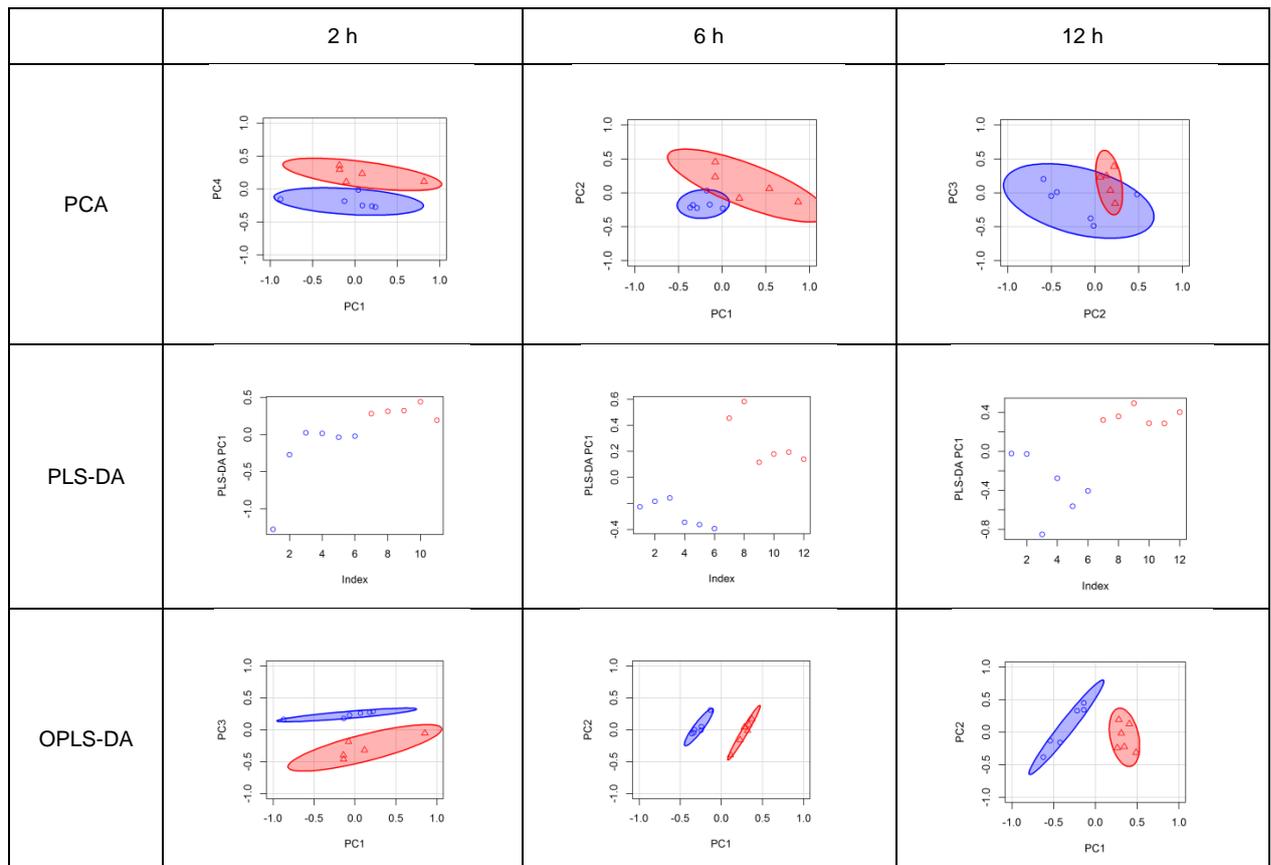


Figura 2. Gráficos de agrupamento obtidos de sobrenadantes de células Vero não infectados (○= azul) e infectados com MAYV (△= vermelho) em 2, 6, e 12 h p.i. Baseados em dados de RMN.

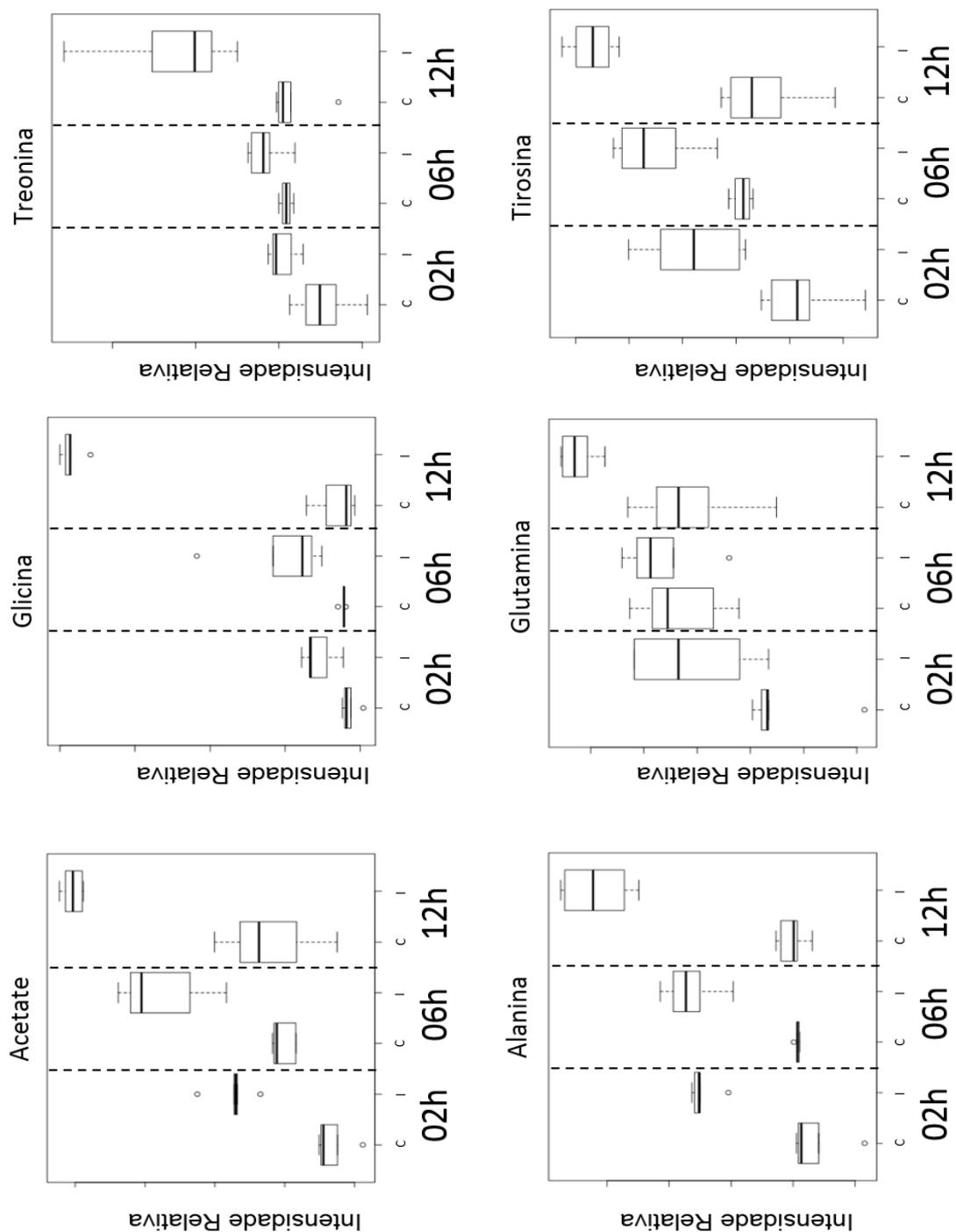


Figura 3. Representação gráfica de metabólitos identificados com altos níveis em sobrenadantes de células Vero infectados com MAYV (I) e baixos níveis em sobrenadantes não infectados (C). Os gráficos são baseados em dados de RMN.

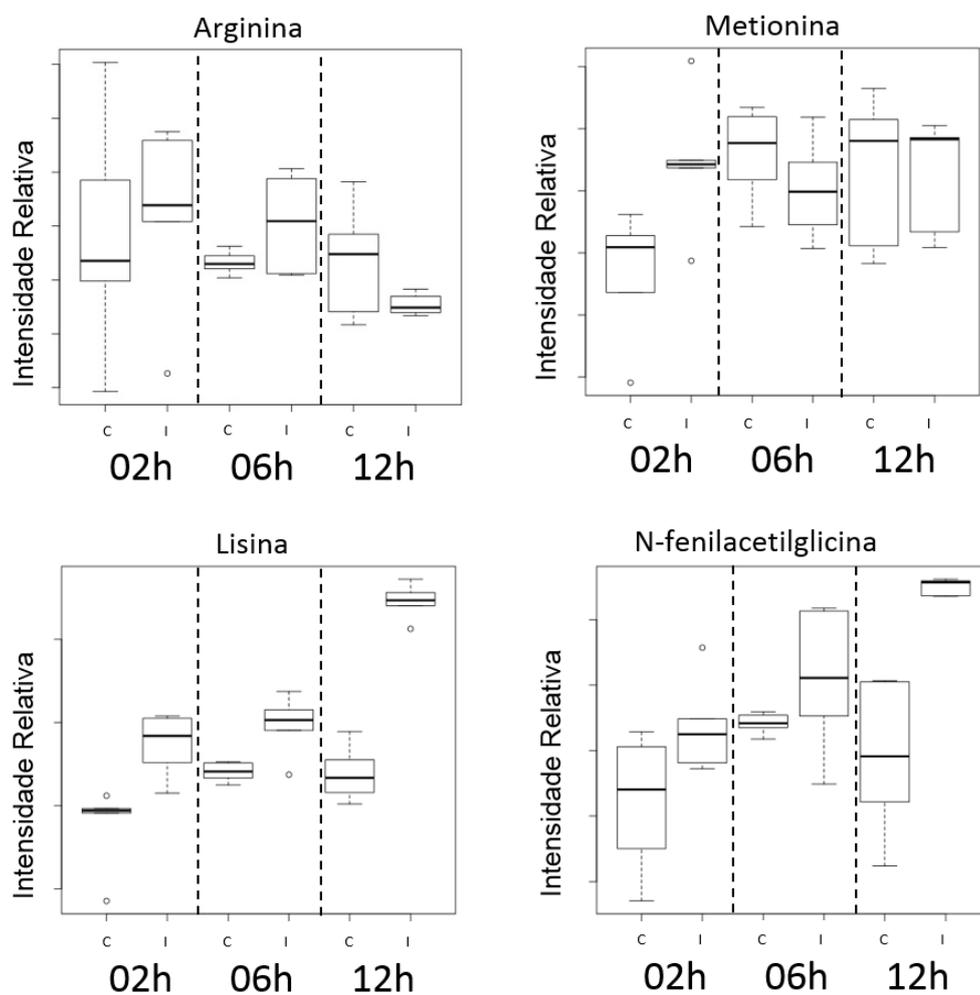


Figura 4. Representação gráfica da variação dos níveis de metabólitos identificados em sobrenadantes de células Vero não infectados (C) e infectados com MAYV (I). Os gráficos são baseados em dados de RMN.

4 DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, dados gerados das análises de RMN evidenciaram um perfil metabólico referente as alterações citopáticas causadas pela replicação do MAYV em células Vero (Tabelas 2 e 3). *Metabolic footprinting* obtido é atribuído a variações no nível de vários metabólitos (aminoácidos, ácidos orgânicos, composto de guanidina, monoamina, carboidratos e ácidos graxos) detectados e identificados em sobrenadantes de células Vero infectadas. Esta variação no nível desses compostos orgânicos, pode ser atribuída a efeitos da infecção do MAYV em células Vero. Esses metabólitos são mostrados nas Figuras 3 e 4 e Tabelas 2 e 3.

O fluxo de compostos extracelulares pode dar uma visão sobre os processos metabólicos intracelulares, variações no nível de metabólitos em células infectadas comparado a células não infectadas, representa o efeito das reações bioquímicas celulares em resposta a ação do vírus. A partir dessas variações é possível deduzir vias metabólicas afetadas indicando possíveis rotas de ação do vírus.

Vários metabólitos apresentaram altos níveis diferenciados em cada período de 2, 6 e 12 h nas amostras infectadas, será discutido a seguir.

4.1 Sobrenadantes de células Vero infectados no período de 2 h

Resultados obtidos do *footprinting patterns* evidenciam diferentes vias metabólicas afetadas quando células Vero são infectadas com MAYV. Observou-se em amostras infectadas no período de 2 h aumento no nível de vários metabólitos comparado as amostras controle, esses compostos são

aminoácidos triptofano (aromático) e alanina (alifático) (Tabelas 2, 3 e Figura 3), ácidos cetos como o piruvato e ácido oxoglutarico, são metabólitos que possuem uma ligação direta em reações bioquímicas, ou seja, o catabolismo da alanina (via da glicólise) produz piruvato diretamente, por transaminação com o α -cetoglutarato, o ácido oxoglutarico é um produto da reação de descarboxilação do oxalosuccinato, que no final dessa reação gera o α -cetoglutarato (ciclo TCA).⁽²⁴⁰⁻²⁴²⁾ A cadeia lateral do triptofano é clivada (via da glicólise), produzindo alanina e, portanto, piruvato, o inverso também acontece, o piruvato é o precursor na biossíntese da alanina, por transaminação com o glutamato (via da glicólise).⁽²⁴⁰⁻²⁴²⁾ Resultados obtidos por RMN analisando células endoteliais (EA.hy926- célula somática híbrida, origem *homo sapiens*) infectadas com vírus da dengue sorotipo 3 (DENV-3), o aumento do triptofano ocorreu em 48 h p.i., descrito por Birungi et al. ⁽²⁴³⁾

Além disso, outros metabólitos também apresentaram altos níveis diferenciados nas amostras infectadas no período de 2 h p.i., 3-fenilpropionato (ácido fenilpropanoico) análogo da fenilalanina apresentou alto nível comparado ao controle, essa observação está de acordo com aumento do aminoácido aromático tirosina em amostras infectadas (2 h p.i.), nas amostras controle apresentou diminuição no nível (Tabelas 2, 3 e Figura 3), 3-fenilpropionato tem uma biofunção no metabolismo da fenilalanina,⁽²⁴⁴⁾ e a tirosina é um produto na via de degradação da fenilalanina (catabolismo),⁽²⁴²⁾ isso sugere alterações na regulação bioquímica na via de catabolismo da fenilalanina (via da glicólise). Os resultados obtidos por RMN analisando células EA.hy926 infectadas com vírus

da dengue sorotipo 1 (DENV-1), demonstrou-se alto nível de tirosina em 48 h p.i., descrito por Birungi et al. ⁽²⁴³⁾

O ácido 3-hidroxisobutírico é um ácido hidroxi-beta detectado e identificado com aumento em amostras infectadas (2 h p.i.) comparado ao controle (Tabela 2), é um ácido orgânico que atua como intermediário no metabolismo da valina. ⁽²⁴⁵⁾ O aminoácido alifático valina também apresentou aumento em amostras infectadas no período de 2 h comparado com amostras controle. Essas observações sugerem que o alto nível do ácido 3-hidroxisobutírico, da valina e do piruvato citado anteriormente, provavelmente está associado a via de síntese da valina (via da glicólise). Vale ressaltar que o piruvato é precursor da valina. ⁽²⁴²⁾

Um outro metabólito conhecido como carnitina apresentou aumento em amostras infectadas no período de 2 h comparado as amostras controle. É um ácido graxo hidroxi que tem uma biofunção na oxidação mitocondrial dos ácidos graxos (via da β -oxidação), além de atuar no metabolismo da alanina, aspartato, e aminoácidos essenciais. ⁽²⁴⁶⁻²⁴⁷⁾ Neste período de 2 h p.i., também foi detectado e identificado o alto nível de acetato em amostras infectadas comparado as amostras controle (Tabelas 2, 3 e Figura 3). O acetato (ácido acético) é um ácido carboxílico que tem uma biofunção no metabolismo do piruvato e biossíntese de ácidos graxos. ⁽²⁴⁸⁾ A hidrólise da acetil-CoA gera ácido acético (acetato). ⁽²⁴⁹⁾ A oxidação dos ácidos graxos na mitocôndria gera acetil-CoA. ⁽²⁴⁹⁾ Essas observações geram a hipótese de que o aumento da carnitina e acetato em 2 h p.i., pode estar interligado a regulação da acetil-CoA na via da β -oxidação, e esta regulação sendo adaptada pelo vírus no processo infeccioso.

4.2 Sobrenadantes de células Vero infectados no período de 6 h

Em amostras infectadas no período de 6 h foi detectado e identificado o aumento no nível de glicose, galactose e galactarato comparado as amostras controle. (Tabela 2) Neste período ocorre a liberação de partículas virais, e no momento da entrada do vírus, ocorre um aumento na permeabilidade da membrana plasmática, talvez por causa da formação de poros pelas proteínas virais E1, 6K e TF.⁽²⁾ A inserção de glicoproteínas recém-sintetizadas na membrana plasmática torna as células infectadas capazes de induzir energia metabólica, ATP dependente da formação de sincícios, e também pela exposição ao pH ácido.⁽²⁾ A presença de sincícios e o meio extracelular com acidez foram observados em MO, nos experimentos conduzidos neste estudo de infecção das células Vero pelo MAYV no período de 6 h (dados não mostrados). Essas observações associadas ao aumento desses carboidratos (monossacarídeos- via da glicólise) gera a hipótese de que esses metabólitos podem estar regulando a produção de ATP dependente da formação de sincícios. Além disso, esses resultados estão de acordo com análises enzimática, que evidenciaram alterações no metabolismo da glicose em células Vero infectadas pelo MAYV, descrito por El-Bacha et al. ⁽²⁵⁰⁾

Vale ressaltar, a galactose quando transformada em um intermediário glicolítico (via da glicólise) atua no metabolismo do açúcar de nucleotídeo (via das pentoses-fosfato) ⁽²⁵¹⁾ e o galactarato é um produto da oxidação da galactose.⁽²⁵²⁾ Essa observação sugere que no período de 6 h p.i., o efeito avançado da infecção pode estar influenciando na regulação bioquímica do metabolismo do açúcar de nucleotídeo. Outra hipótese também valida esses

resultados, o alto nível desses metabólitos glicolíticos (glicose, galactose e galactarato) sugere que o processo replicativo do vírus no período de 6 h não teve grande impacto na regulação do ATP celular. Essa observação concorda com o estudo descrito por Genzel et al. ⁽²⁵³⁾ no qual relata considerações teóricas (modelo matemático) sobre recursos energéticos na replicação do vírus influenza em células MDCK (células de rim de canino) para o desenvolvimento de vacina contra gripe, o fornecimento de precursores celulares e ATP para a síntese do genoma viral e proteínas específicas do vírus, podem não ser um limiar para formação de partículas virais. O Estudo descrito por Sidorenko et al. ⁽²⁵⁴⁾ também analisa quantitativamente (modelo matemático) a utilização de recursos celulares (MDCK) para formação de partículas do vírus influenza, e a dinâmica global para todo o ciclo da infecção; o modelo matemático permite a estimativa de consumo dos recursos celulares pela replicação do vírus, o ATP celular não foi significativamente influenciado pela propagação do vírus.

O composto orgânico tiramina (monoamina) derivado do aminoácido aromático tirosina ⁽²⁵⁵⁾ apresentou um alto nível diferenciado em amostras infectadas no período de 6 h comparado as amostras não infectadas. Neste período o aminoácido tirosina também apresentou aumento em amostras infectadas (Tabelas 2, 3 e Figura 3), em amostras controle apresentou diminuição no nível. Essas observações sugerem que o aumento da tiramina pode estar associado ao aumento no nível de tirosina.

Diferentemente dos períodos de 2 h e 12 h p.i., a creatina e creatina fosfato conhecidos como ácidos carboxílicos apresentaram altos níveis nas amostras infectadas em 6 h comparado as amostras controle. Esses metabólitos integram

a lançadeira (*shuttle*) de energia das células, o grupo fosfato do ATP de alta energia é transferido para creatina formando creatina fosfato. ⁽²⁵⁶⁻²⁵⁷⁾ Esses compostos têm uma biofunção no metabolismo da arginina, prolina, glicina, serina e treonina, ⁽²⁵⁶⁻²⁵⁷⁾ alguns desses aminoácidos foram detectados e identificados com aumento nas amostras infectadas no período de 6 h comparado as amostras não infectadas (Tabelas 2, 3 e Figuras 3 e 4). Somente no período de 6 h p.i. o aminoácido serina apresentou um alto nível diferenciado nas amostras infectadas, e diminuição nas amostras não infectadas. Resultados obtidos por RMN analisando células EA.hy926 infectadas com DENV-3, o aumento de serina ocorreu em 48 h p.i., descrito por Birungi et al. ⁽²⁴³⁾ Vale ressaltar, que essas reações de transferência de grupo fosfato do ATP (creatina fosfato), fornece energia para reações anabólicas, como a biossíntese de aminoácidos, que são moléculas precursoras de proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e polissacarídeos. ^(249,258) Essas observações sugerem que o aumento de creatina e creatina fosfato pode estar associado com altos níveis desses aminoácidos no período de 6 h p.i.

Outro composto orgânico, metilguanidina (composto de guanidina) apresentou um alto nível nas amostras infectadas no período de 6 h comparado as amostras controle. (Tabela 2) Esse metabólito tem uma biofunção no catabolismo de proteína. ⁽²⁵⁹⁾ A detecção e identificação do metabólito metilguanidina gera uma associação as vias catabólicas, o catabolismo libera energia química na forma de ATP, NADH, NADPH E FADH₂, que são transportadores de energia e são usados em vias anabólicas para converter precursores pequenos (aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e bases

nitrogenadas) em macromoléculas celulares como proteínas, polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucleicos.⁽²⁵⁸⁾ No período de 6 h ocorre a liberação de partículas virais, para que ocorra a montagem das partículas é necessário a biossíntese de proteínas celulares e virais no processo replicativo do vírus. O vírus causa adaptações metabólicas para sintetizar novas partículas virais. Essas observações sugerem que o aumento do metilguanidina pode estar associado a produção de energia (ATP), essa energia pode estar sendo usada nas vias de biossíntese de macromoléculas.

Vale ressaltar, que *footprinting analysis* (extracelular) podem fornecer informações importantes sobre metabólitos intracelulares,⁽²⁶⁰⁾ ou seja, indica o estado de regulação dos metabólitos intracelulares.

4.3 Sobrenadantes de células Vero infectados no período de 12 h

Neste período as amostras infectadas quando observadas em MO apresentam extensos ECP com destruição parcial da monocamada celular. A partir de dados gerados das análises de RMN evidenciou-se um alto nível diferenciado do metabólito τ (tau)-metilhistidina em amostras infectadas no período de 12 h, nas amostras controle apresentou diminuição no nível. (Tabela 2) Esse metabólito é um ácido orgânico, tem uma biofunção na síntese de proteínas e biossíntese de aminoácidos,⁽²⁶¹⁾ além disso, é um produto da reação bioquímica (metilação) que degrada a interação entre actina e miosina (proteínas motoras).⁽²⁶¹⁾ Filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários conferem estrutura e organização ao citoplasma e forma à célula.⁽²⁶²⁾ Filamentos de actina e microtúbulos também auxiliam na produção de movimento das organelas, da célula inteira, e macromoléculas que se movem dentro da

célula.⁽²⁶²⁾ Neste período de 12 h p.i. o ECP está avançado, caracterizado por encolhimento celular quando se observa em MO, ou seja, o citoesqueleto da célula é afetado, essas observações associadas ao aumento do τ (tau)-metilhistidina, gera uma hipótese ligada a alterações na regulação bioquímica das proteínas do citoesqueleto, actina e miosina.

Vale ressaltar, que a secreção de metabólitos reflete claramente a atividade metabólica celular, o fluxo de produtos extracelulares depende de reações metabólicas (anabolismo e catabolismo) que controlam mecanismos reguladores muito complexos, para assegurar que os metabólitos se desloquem através de cada via na direção e na velocidade correta para combinar exatamente com as condições variáveis da célula.⁽²⁶³⁻²⁶⁴⁾

4.4 Metabólitos detectados e identificados nos três períodos p.i.

Alguns metabólitos como aminoácidos, ácido carboxílico, e acil glicina foram detectados e identificados com aumento em amostras infectadas e amostras não infectadas nos três períodos de infecção (Tabela 3 e Figuras 3 e 4).

Os aminoácidos glicina, alanina, treonina, tirosina e glutamina apresentaram aumento nas amostras infectadas nos períodos de 2, 6 e 12 h, nas amostras não infectadas apresentaram diminuição no nível. Estes aminoácidos quando degradados (catabolismo) são convertidos em glicose, são glicogênicos, no entanto, treonina e tirosina são cetogênicos (corpos cetônicos) e glicogênicos.⁽²⁴¹⁾ O aminoácido glutamina é a principal fonte biológica de grupos amino para uma ampla gama de processos biossintéticos, possui um papel central no metabolismo de aminoácidos em mamíferos.⁽²⁴²⁾ Portanto, o aumento

de glutamina reflete no metabolismo de aminoácidos, essa observação pode estar associada ao aumento de glicina, alanina, treonina, e tirosina nos três períodos de infecção. Além da interligação com glutamina, outras associações metabólicas ao aminoácido tirosina nos períodos de 2 e 6 h p.i., e com aminoácidos glicina e treonina no período de 6 h p.i. foram discutidas anteriormente.

O acetato ou ácido acético, é um ácido carboxílico que também apresentou aumento nos três períodos de infecção, atua no metabolismo do piruvato e biossíntese de ácidos graxos.⁽²⁴⁸⁾ A hidrólise da acetil-CoA gera acetato, acetil-CoA é um intermediário chave nas reações bioquímicas na via da glicólise, ciclo TCA, via da β -oxidação e biossíntese de ácidos graxos.^(240,249,265) Essa observação gera a hipótese de que o alto nível do acetato nos três períodos de infecção, pode estar interligada aos mecanismos de regulação da acetil-CoA, e estes mecanismos regulatórios adaptados ao processo de replicação do vírus. Foi discutido anteriormente, a ligação do acetato com outro metabólito que apresentou um alto nível diferenciado no período de 2 h p.i.

Os aminoácidos metionina, arginina e lisina apresentaram níveis altos e variáveis, nas amostras não infectadas e nas amostras infectadas. O aminoácido metionina apresentou aumento nas amostras não infectadas nos períodos de 6 e 12 h p.i., diminuição nas amostras infectadas de 6 h p.i., e nas infectadas de 12 h apresentou aumento. O aminoácido arginina também apresentou aumento nas amostras controle em 12 h p.i., diminuição nas amostras infectadas (Tabela 3 e Figura 4). Os três aminoácidos participam das vias anabólicas e catabólicas do ciclo TCA, metionina e arginina são glicogênicos, lisina é cetogênico.⁽²⁴¹⁾ O

alto nível dos aminoácidos metionina e arginina nas amostras controle pode estar associado ao mecanismo de homeostasia da célula, produção e consumo de energia (ATP). Nas amostras infectadas o aumento da metionina em 2 e 12 h p.i., arginina em 2 e 6 h p.i. e lisina em 2, 6 e 12 h p.i., podem estar interligados ao alto nível de glutamina, que é um aminoácido central no metabolismo de aminoácidos. Foi discutido anteriormente, que o aumento de arginina em amostras infectadas, pode estar associado a dois ácidos carboxílicos que apresentaram altos níveis diferenciados no período de 6 h p.i.

Outro composto orgânico conhecido como N-fenilacetilglicina, um acil glicina, é um conjugado de glicina do ácido fenilacético, (266) são geralmente metabólitos menores de ácidos graxos.⁽²⁶⁶⁾ Medições do N-fenilacetilglicina está relacionado ao acúmulo anormal de fosfolipídeos (lipídeos de membrana) em muitos tecidos,⁽²⁶⁶⁾ os fosfolipídeos são representados por glicerofosfolipídeos e esfingolipídeos.⁽²⁶⁷⁾ O N-fenilacetilglicina apresentou um alto nível nas amostras infectadas nos três períodos de infecção, diminuição nas amostras controle. (Tabela 3 e Figura 4) Vale ressaltar, para que ocorra a entrada do vírus na célula, a etapa de fusão necessita de condições ideais, como a presença de colesterol e esfingolipídeos na membrana da célula alvo e o pH exato,⁽²⁾ além disso, na fase de brotamento da partícula viral, é necessário uma interação efetiva do nucleocapsídeo com o *spike* de glicoproteínas.⁽¹⁴⁾ Além dessa interação, a presença do colesterol na membrana plasmática e o metabolismo de lipídios da célula hospedeira também são necessários para o brotamento do vírus.⁽¹⁴⁾ Essa observação gera a hipótese de que o aumento do N-fenilacetilglicina em

amostras infectadas, pode estar associado a regulação bioquímica de lipídeos de membrana em resposta a infecção do MAYV.

5 CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Estudando o exometaboloma ou *metabolic footprinting* de células Vero evidenciou-se um fluxo de produtos extracelulares em diferentes períodos de infecção do MAYV, além disso gerou um perfil bioquímico que reflete o estado metabólico da célula. Nossos resultados demonstraram níveis metabólicos diferenciados para cada período de infecção, o que viabilizou observações que o alto e variável nível dos metabólitos está associado aos avanços progressivos das alterações citopáticas, causadas pela replicação do MAYV em células Vero. Além disso, esses resultados foram possíveis com ajuda da espectroscopia de RMN acoplada a métodos analíticos multivariados, que são ferramentas de reconhecimento padrão como PCA, PLS-DA e OPLS-DA.

Houve diferenças significativas entre o perfil metabólico de células Vero não infectadas comparado as infectadas com o MAYV. Várias biomoléculas foram detectadas e identificadas como aminoácidos, ácidos orgânicos, composto de guanidina, monoamina, carboidratos e ácidos graxos, esses compostos orgânicos são indicativos de possíveis vias afetadas pela ação do vírus.

A partir das análises extracelular, a infecção do MAYV parece afetar o metabolismo de aminoácidos (via da glicólise e ciclo TCA), há indícios de alteração na via das pentoses-fosfato, além disso a infecção pode estar associada a β -oxidação de ácidos graxos. O presente estudo é a primeira evidência de alterações metabólicas extracelular causadas pelo MAYV em células Vero. No futuro, outros estudos poderão investigar com mais detalhes as

vias afetadas, e confirmar os metabólitos específicos observados em gráficos padrão de PCA, PLS-DA e OPLS-DA. Análise metabolômica é o conhecimento chave, integrado a dados genômicos e proteômicos, poderá esclarecer mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatogênese do MAYV.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012; <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (acesso 9 de março de 2015).
2. Griffin DE. Alphaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editores. Fields Virology. 6a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 651-89.
3. Tesh RB. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. *Ann Rev Med* 1982;33:31–40.
4. Carey DE. Chikungunya and dengue. A case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci* 1971;26:243-62.
5. Hanson RP. An epizootic of equine encephalomyelitis that occurred in Massachusetts in 1831. *Am J Trop Med Hyg* 1957;6:858-62.
6. Ross RW. The Newala epidemic The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg* 1956;54:177–91.
7. Williams MC, Woodall JP. O'nyong-nyong fever: An epidemic virus disease in East Africa. II. Isolation and some properties of the virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1961;55:135–41.
8. Causey OR, Maroja OM. Mayaro vírus: A new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the River Guamá in Pará, Brazil and isolation of Mayaro virus as causative agent. *Am J Trop Med Hyg* 1957;6:1017-23.

9. Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. *Ann Trop Med Parasitol* 1975;69:49-64.
10. Meyer KF, Haring CM, Howitt B. The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquin Valley. *Science* 1931;74:227-8.
11. Kelser RA. Mosquitoes as vectors of the virus of equine encephalomyelitis. *J Am Vet Med Assoc* 1933;82:767-71.
12. Taylor RM, Hurlbut HS. The isolation of coxsackie-like viruses from mosquitoes. *J Egypt Med Assoc* 1953;36:489-94.
13. Taylor RM, Hurlbut HS, Work TH, Kingston JR, Frothingham TE. Sindbis virus: a newly recognized arthropod-transmitted virus. *Am J Trop Med Hyg* 1955;4:844-6.
14. Porterfield JS. Comparative and historical aspects of the Togaviridae and Flaviviridae. In: Schlesinger S, Schlesinger MJ, editores. *The Togaviridae and Flaviviridae*. New York: Plenum Press; 1986. p. 1-19.
15. Leão RNQ, Bichara CNC, Neto HF, Vasconcelos PFC. Febre do Mayaro. In: Leão RNQ, editor. *Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia*. 2a ed. Belém: Samauma; 2013. p. 569-74.
16. Neel JV, Andrade AHP, Brown GE, Eveland WE, Goobar J, Sodeman WA, et al. Further studies of the Xavante Indians: IX. Immunologic status with respect to various diseases and organisms. *Am J Trop Med Hyg* 1968;17:486-98.

17. Mota MTO, Ribeiro MR, Vedovello D, Nogueira ML. Mayaro vírus: a neglected arbovirus of the Americas. *Future Virology*. No prelo 2015.
18. Receveur MC, Grandadam M, Pistone T, Malvy D. Infection with Mayaro vírus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, January, 2010. *Euro Surveill* 2010;15:pii:19.563.
19. Izurieta RO, Macaluso M, Watts DM, Tesh RB, Guerra B, Cruz ML. Hunting in the rainforest and Mayaro virus infection: An emerging Alphavirus in Ecuador. *J Glob Infect Dis* 2011;3:317-23.
20. Mourão MPG, Bastos MDS, Figueiredo RP, Gimaque JBL, Galusso EDS, Kramer VM, et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012;12:42-6.
21. Neumayr A, Gabriel M, Fritz J, Günther S, Hatz C, Schmidt-Chanasit J, et al. Mayaro virus infection in traveler returning from Amazon Basin, northern Peru. *Emerg Infect Dis* 2012;18:695-6.
22. Abad-Franch F, Grimmer GH, Paula VS, Figueiredo LTM, Braga WSM, Luz SLB. Mayaro vírus infection in Amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1846.
23. Halsey ES, Siles C, Guevara C, Vilcarrromero S, Jhonston EJ, Ramal C, et al. Mayaro vírus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010-2013. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1839-42.

24. Friedrich-Jänicke B, Emmerich P, Tappe D, Günther S, Cadar D, Schmidt-Chanasit J. Genome analysis of Mayaro virus imported to Germany from French Guiana. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1255-7.
25. Zuchi N, Heinem LBS, Santos MAM, Pereira FC, Shhessarenko RD. Molecular detection of Mayaro vírus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014;109:820-3.
26. Figueiredo MLG, Figueiredo LTM. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2014;47:677-83.
27. Muñoz M, Navarro JC. Mayaro: a re-emerging Arbovirus in Venezuela and Latin America. *Biomedica* 2012;32:286-302.
28. Kissling RE, Chamberlain RW, Sikes RK, Eidson ME. Studies on the North American arthropod-borne encephalitides. III. Eastern equine encephalitis in wild birds. *Am J Hyg* 1954;60:251-65.
29. Pinheiro FP, Freitas RB, Travassos da Rosa JF, Gabbay YB, Mello WA, Leduc JW. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. *Am J Trop Med Hyg* 1981;30:674-81.
30. Calisher CH, El-Kafrawi AO, Al-Deen Mahmud MI, Travassos da Rosa AP, Bartz CR, Brummer-Korvenkontio M, et al. Complex-specific immunoglobulin M antibody patterns in humans infected with alphaviruses. *J Clin Microbiol* 1986;23:155-9.

31. Tesh RB, Watts DM, Russell KL, Damodaran C, Calampa C, Cabezas C, et al. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. *Clin Infect Dis* 1999;28:67-73.
32. Bronzoni RV, Moreli ML, Cruz AC, Figueiredo LT. Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;98:456-61.
33. Kostyuchenko VA, Jakana J, Liu X, Haddow AD, Aung M, Weaver SC, et al. The structure of Barmah Forest virus as revealed by cryo-electron microscopy at a 6-angstrom resolution has detailed transmembrane protein architecture and interactions. *J Virol* 2011;85:9327–33.
34. Mi S, Stollar V. Expression of Sindbis virus nsP1 and methyltransferase activity in *Escherichia coli*. *Virology* 1991;184:423-7.
35. Ooi YS, Dubé M, Kielian M. BST2/tetherin inhibition of alphavirus exit. *Viruses* 2015;7:2147-67.
36. Peränen J, Laakkonen P, Hyvönen M, Kääriäinen L. The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology* 1995;208:610-20.
37. Zeng X, Mukhopadhyay S, Brooks CL. Residue-level resolution of alphavirus envelope protein interactions in pH-dependent fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:2034-9.
38. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: Gene expression, replication and evolution. *Microbiol Rev* 1994;58:491–562.

39. Forrester NL, Palacios G, Tesh RB, Savji N, Guzman H, Sherman M, et al. Genome-scale phylogeny of the alphavirus genus suggests a marine origin. *J Virol* 2012;86:2729–38.
40. Hahn CS, Lustig S, Strauss EG, Strauss JH. Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5997–6001.
41. Kinney RM, Pfeffer M, Tsuchiya KR, Chang GJ, Roehrig JT. Nucleotide sequences of the 26S mRNAs of the viruses defining the Venezuelan equine encephalitis antigenic complex. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:952–64.
42. Kuhn RJ. *Togaviridae*. In: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. 6a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 629-50.
43. Chung BY, Firth AE, Atkins JF. Frameshifting in alphaviruses: a diversity of 3-stimulatory structures. *J Mol Biol* 2010;397:448–56.
44. Firth AE, Chung BY, Fleeton MN, Atkins JF. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20 year enigma. *Virology* 2008;5:108.
45. Welch WJ, Sefton BM. Two small virus-specific polypeptides are produced during infection with Sindbis virus. *J Virol* 1979;29:1186-95.
46. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, et al. Glycoprotein organization of chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 2010;468:709–12.
47. Brown DT, Edwards J. Structural changes in alphavirus accompanying the process of membrane penetration. *Virology* 1992;3:519-27.

48. Gaedigk-Nitschko K, Ding MX, Levy MA, Schlesinger MJ. Site-directed mutations in the Sindbis virus 6K protein reveal sites for fatty acylation and the underacylated protein affects virus release and virion structure. *Virology* 1990;175:282-91.
49. Repik PM, Strizki JM, Galili U. Differential host-dependent expression of alpha-galactosyl epitopes on viral glycoproteins: a study of eastern equine encephalitis virus as a model. *J Gen Virol* 1994;75(Pt 5):1177-81.
50. Keegstra K, Burke D. Comparison of the carbohydrate of Sinbis virus glycoproteins with the carbohydrate of host glycoproteins. *J Supramol Struct* 1977;7:371-9.
51. Strauss EG, Rice CM, Strauss JH. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology* 1984;133:92–110.
52. DeTulleo L, Kirchhausen T. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J* 1998;17:4585–93.
53. Smit JM, Bittman R, Wilschut J. Low-pH-dependent fusion of Sindbis virus with receptor-free cholesterol- and sphingolipid-containing liposomes. *J Virol* 1999;73:8476-84.
54. Gibbons DL, Erk I, Reilly B, Navaza J, Kielian M, Rey FA, et al. Visualization of the target-membrane inserted fusion protein of Semliki Forest virus by combined electron microscopy and crystallography. *Cell* 2003;114:573–83.

55. Ahn A, Gibbons DL, Kielian M. The fusion peptide of Semliki Forest virus associates with sterol-rich membrane domains. *J Virol* 2002;76:3267–75.
56. Gibbons DL, Ahn A, Chatterjee PK, Kielian M. Formation and characterization of the trimeric form of the fusion protein of Semliki Forest Virus. *J Virol* 2000;74:7772–80.
57. Wahlberg JM, Bron R, Wilschut J, Garoff H. Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. *J Virol* 1992;66:7309–18.
58. De Groot RJ, Hardy RH, Shirako Y, Strauss JH. Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the nonstructural proteinase: Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo. *EMBO J* 1990;9:2631–8.
59. Lemm JA, Rice CM. Roles of nonstructural polyproteins and cleavage products in regulating Sindbis virus RNA replication and transcription. *J Virol* 1993;67:1916–26.
60. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 1994;58:491–562.
61. Ding M, Schlesinger MJ. Evidence that Sindbis virus nsP2 is an autoprotease which processes the virus nonstructural polyprotein. *Virology* 1989;171:280–4.
62. Hardy WR, Strauss JH. Processing the nonstructural proteins of Sindbis virus: Nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and trans. *J Virol* 1989;63:4653–64.

63. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:491-500.
64. Kuhn RJ, Hong Z, Strauss JH. Mutagenesis of the 3'-nontranslated region of Sindbis virus RNA. *J Virol* 1990;64:1465–76.
65. Frolov I, Schlesinger S. Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation. *J Virol* 1996;70:1182-90.
66. Aliperti G, Schlesinger MJ. Evidence for an autoprotease activity of Sindbis virus capsid protein. *Virology* 1978;90:366–9.
67. Hahn CS, Strauss JH. Site-directed mutagenesis of the proposed catalytic amino acids of the Sindbis virus capsid protein autoprotease. *J Virol* 1990;64:3069–73.
68. Skoging U, Liljeström P. Role of the C-terminal tryptophan residue for the structure-function of the alphavirus capsid protein. *J Mol Biol* 1998;279:865-72.
69. Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett* 1988;235:16–24.
70. Rikkonen M, Peranen J, Kaariainen L. ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *J Virol* 1994;68:5804–10.

71. Keegstra K, Sefton B, Burke D. Sindbis virus glycoproteins: effect of the host cell on the oligosaccharides. *J Virol* 1975;16:613-20.
72. Rice CM, Strauss JH. Association of Sindbis virion glycoproteins and their precursors. *J Mol Biol* 1982;154:325–48.
73. Sanz MA, Madan V, Carrasco L, Nieva JL. Interfacial domains in Sindbis virus 6K protein. Detection and functional characterization. *J Biol Chem* 2003;278:2051-7.
74. Garoff H, Sjöberg M, Cheng RH. Budding of alphaviruses. *Virus Res* 2004;106:103-16.
75. Heidner HW, McKnight KL, Davis NL, Johnston RE. Lethality of PE2 incorporation into Sindbis virus can be suppressed by second-site mutations in E3 and E2. *J Virol* 1994;68:2683–92.
76. Presley JF, Polo JM, Johnston RE, Brown DT. Proteolytic processing of the Sindbis virus membrane protein precursor PE2 is nonessential for growth in vertebrate cells but is required for efficient growth in invertebrate cells. *J Virol* 1991;65:1905–9.
77. Soonsawad P, Xing L, Milla E, Espinoza JM, Kawano M, Marko M. Structural evidence of glycoprotein assembly in cellular membrane compartments prior to Alphavirus budding. *J Virol* 2010;84:11145–51.
78. Kim DY, Firth AE, Atasheva S, Frolova EI, Frolov I. Conservation of a packaging signal and the viral genome RNA packaging mechanism in alphavirus evolution. *J Virol* 2011;85:8022–36.

79. Weiss B, Nitschko H, Ghattas I, Wright R, Schlesinger S. Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. *J Virol* 1989;63:5310–8.
80. Jose J, Przybyla L, Edwards TJ, Perera R, Burgner JW, Kuhn RJ. Interactions of the cytoplasmic domain of Sindbis virus E2 with nucleocapsid cores promote alphavirus budding. *J Virol* 2012;86:2585–99.
81. Marquardt MT, Phalen T, Kielian M. Cholesterol is required in the exit pathway of Semliki Forest virus. *J Cell Biol* 1993;123:57–65.
82. Ng CG, Coppens I, Govindarajan D, Pisciotta J, Shulaev V, Griffin DE. Effect of host cell lipid metabolism on alphavirus replication, virion morphogenesis, and infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:16326–31.
83. Howitt B. Recovery of the virus of equine encephalomyelitis from the brain of a child. *Science* 1938;88:455–6.
84. Lanciotti RS, Ludwig ML, Rwaguma EB, Lutwama JJ, Kram TM, Karabatsos N, et al. Emergence of epidemic O'nyong-nyong fever in Uganda after a 35-year absence: genetic characterization of the virus. *Virology* 1998;252:258-68.
85. Raghoebar RS, Grace TD, Filshie BK, Bartley W, Dalgarno L. Ross River virus replication in cultured mosquito and mammalian cells: virus growth and correlated ultrastructural changes. *J Gen Virol* 1973;21:109-22.
86. Stevens TM. Arbovirus replication in mosquito cell lines (Singh) grown in monolayer or suspension culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970;134:356-61.

87. Stollar V, Shenk TE, Koo R, Igarashi A, Schlesinger RW. Observations of *Aedes albopictus* cell cultures persistently infected with Sindbis virus. *Ann N Y Acad Sci* 1975;266:214-30.
88. Dulbecco R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1952;38:747-52.
89. Brown LN, Packer RA. Some factors affecting plaque size of western equine encephalomyelitis virus. *Am J Vet Res* 1964;25:487-93.
90. Byrnes AP, Griffin DE. Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate. *J Virol* 1998;72:7349-56.
91. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.
92. Boere WAM, Harmsen T, Vinje J, Benaissa-Trouw BJ, Kraaijeveld CA, Snipe H. Identification of distinct antigenic determinants on Semliki Forest virus by using monoclonal antibodies with different antiviral activities. *J Virol* 1984;52:575-82.
93. Razumov IA, Khusainova AD, Agapov EV, Gaidamovich SYa, Pereboev AV, Kolykhalov AA, et al. Analysis of the hemagglutination activity domains of the Venezuelan equine encephalomyelitis and eastern equine encephalomyelitis viruses. *Intervirology* 1994;37:356-60.

94. Calisher CH, Shope RE, Brandt W, Casals J, Karabatsos N, Murphy FA, et al. Proposed antigenic classification of registered arboviruses I. Togaviridae, Alphavirus. *Intervirology* 1980;14:229-32.
95. Ludwig GV, Kondig JP, Smith JF. A putative receptor for Venezuelan equine encephalitis virus from mosquito cells. *J Virol* 1996;70:5592-9.
96. Byrnes AP, Griffin DE. Binding of Sindbis virus to cell-surface heparan sulfate. *J Virol* 1998;72:7349–56.
97. Dubuisson J, Rice CM. Sindbis virus attachment: isolation and characterization of mutants with impaired binding to vertebrate cells. *J Virol* 1993;67:3363-74.
98. Klimstra WB, Ryman KD, Johnston RE. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J Virol* 1998;72:7357–66.
99. Helenius A, Morein B, Fries E, Simons K, Robinson P, Schirrmacher V, et al. Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:3846-50.
100. Wang KS, Kuhn RJ, Strauss EG, Ou S, Strauss JH. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J Virol* 1992;66:4992-5001.

101. Gardner CL, Ebel GD, Ryman KD, Klimstra WB. Heparan sulfate binding by natural eastern equine encephalitis viruses promotes neurovirulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:16026–31.
102. Byrnes AP, Griffin DE. Large-plaque mutants of Sindbis virus show reduced binding to heparan sulfate, heightened viremia and slower clearance from the circulation. *J Virol*;74:644–51.
103. Helenius A, Kartenbeck J, Simons K, Fries E. On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol* 1980;84:404-20.
104. White J, Helenius A. A pH-dependent fusion between the Semliki Forest virus membrane and liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:3273-7.
105. Corver J, Moesby L, Erukulla RK, Reddy KC, Bittman R, Wilschut J. Sphingolipid-dependent fusion of Semliki Forest virus with cholesterol-containing liposomes requires both the 3-hydroxyl group and the double bond of the sphingolipid backbone. *J Virol* 1995;69:3220-3.
106. Kielian MC, Helenius A. Role of cholesterol in fusion of Semliki Forest virus with membranes. *J Virol* 1984;52:281-3.
107. Muñoz A, Castrillo JL, Carrasco L. Modification of membrane permeability during Semliki Forest virus infection. *Virology* 1985;146:203-12.
108. Kempf C, Kohler U, Michel MR, Koblet H. Semliki Forest virus-induced polykaryocyte formation is an ATP-dependent event. *Arch Virol* 1987;95:111-22.

109. Levine B, Huang Q, Isaacs JT, Reed JC, Griffin DE, Hardwick JM. Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the Bcl-2 cellular oncogene. *Nature* 1993;361:739–42.
110. Gliedman JB, Smith JF, Brown DT. Morphogenesis of Sindbis virus in cultured *Aedes albopictus* cells. *J Virol* 1975;16:913-26.
111. Miller ML, Brown DT. Morphogenesis of Sindbis virus in three subclones of *Aedes albopictus* (mosquito) cells. *J Virol* 1992;66:4180-90.
112. Karpf AR, Brown DT. Comparison of Sindbis virus-induced pathology in mosquito and vertebrate cell cultures. *Virology* 1998;240:193-201.
113. Linn ML, Mateo L, Gardner J, Suhrbier A. Alphavirus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize a cross-reactive epitope from the capsid protein and can eliminate virus from persistently infected macrophages. *J Virol* 1998;72:5146-53.
114. Hunt AR, Roehrig JT. Biochemical and biological characteristics of epitopes on the E1 glycoprotein of western equine encephalitis virus. *Virology* 1985;142:334-46.
115. Ahn A, Klimjack MR, Chatterjee PK, Kielian M. An epitope of the Semliki Forest virus fusion protein exposed during virus-membrane fusion. *J Virol* 1999;73:10029-39.
116. Schmaljohn AL. Protective monoclonal antibodies define maturational and pH-dependent antigenic changes in Sindbis virus E1 glycoprotein. *Virology* 1983;130:144–54.

117. Griffin DE. Roles and reactivities of antibodies to alphaviruses. *Semin Virol* 1995;6:249-55.
118. Stanley J, Cooper SJ, Griffin DE. Alphavirus neurovirulence: monoclonal antibodies discriminating wild-type from neuroadapted Sindbis virus. *J Virol* 1985;56:110-9.
119. Vрати S, Fernon CA, Dalgarno L, Weir RC. Location of a major antigenic site involved in Ross River virus neutralization. *Virology* 1988;162:346-53.
120. Dalrymple JM, Schlesinger S, Russell PK. Antigenic characterization of two sindbis envelope glycoproteins separated by isoelectric focusing. *Virology* 1976;69:93-103.
121. Pedersen CE Jr, Slocum DR, Eddy GA. Immunological studies on the envelope component of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Infect Immun* 1973;8:901-6.
122. Roehrig JT, Day JW, Kinney RM. Antigenic analysis of the surface glycoproteins of a Venezuelan equine encephalomyelitis virus (TC-83) using monoclonal antibodies. *Virology* 1982;118:269-78.
123. Koonin EV, Dolja VV. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993;28:375-430.
124. Strauss JH, Strauss EG. Recombination in alphaviruses. *Semin Virol* 1997;8:85-94.

125. Forrester NL, Palacios G, Tesh RB, Savji N, Guzman H, Sherman M, et al. Genome scale phylogeny of the alphavirus genus suggests a marine origin. *J Virol* 2012;86:2729–38.
126. Grywna K, Kupfer B, Panning M, Drexler JF, Emmerich P, Drosten C, et al. Detection of all species of the genus Alphavirus by reverse transcription-PCR with diagnostic sensitivity. *J Clin Microbiol* 2010;48:3386–7.
127. Burness AT, Pardoe I, Faragher SG, Vрати S, Dalgarno L. Genetic stability of Ross River virus during epidemic spread in nonimmune humans. *Virology* 1988;167:639-43.
128. Clinis MJ, Kang W, Weaver SC. Genetic conservation of Highlands J viruses. *Virology* 1996;218:343-51.
129. Kuhn RJ, Griffin DE, Owen KE, Niesters HG, Strauss JH. Chimeric Sindbis-Ross River viruses to study interactions between alphavirus nonstructural and structural regions. *J Virol* 1996;70:7900-9.
130. Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH, et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J Virol* 2001;75:10118–31.
131. Weaver SC, Kang W, Shirako Y, Rumenapf T, Strauss EG, Strauss JH. Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *J Virol* 1997;71:613–23.

132. Coffey LL, Vasilakis N, Brault AC, Powers AM, Tripet F, Weaver SC. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:6970–5.
133. Weaver SC, Brault AC, Kang W, Holland JJ. Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. *J Virol* 1999;73:4316-26.
134. Weaver SC, Hagenbaugh A, Bellew LA, Gousset L, Mallampalli V, Holland JJ, et al. Evolution of alphaviruses in the eastern equine encephalomyelitis complex. *J Virol* 1994;68:158-69.
135. Mackenzie JS, Poidinger M, Lindsay MD, Hall RA, Sammels LM. Molecular epidemiology and evolution of mosquito-borne flaviviruses and alphaviruses enzootic in Australia. *Virus Genes* 1995;11:225-37.
136. Sammels LM, Lindsay MD, Poidinger M, Coelen RJ, Mackenzie JS. Geographic distribution and evolution of Sindbis virus in Australia. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 3):739-48.
137. Powers AM, Oberste MS, Brault AC, Rico-Hesse R, Schmura SM, Smith JF, et al. Repeated emergence of epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus. *J Virol* 1997;71:6697-705.
138. Rico-Hesse R, Weaver SC, de Siger J, Medina G, Salas RA. Emergence of a new epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis virus in South America. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5278-81.

139. Turell MJ, Tammariello RF, Spielman A. Nonvascular delivery of St. Louis encephalitis and Venezuelan equine encephalitis viruses by infected mosquitoes (Diptera: Culicidae) feeding on a vertebrate host. *J Med Entomol* 1995;32:563-8.
140. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, et al. Two chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 2007;2:e1168.
141. Mims CA, Day MF, Marshall ID. Cytopathic effect of Semliki Forest virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 1966;15:775-84.
142. Hiruma M, Ide S, Hohdatsu T, Yamagishi H, Tanaka Y, Fujisaki Y. Polymyositis in mice experimentally inoculated with Getah virus. *Nihon Juigaku Zasshi* 1990;52:767-72.
143. Grimley PM, Friedman RM. Arboviral infection of voluntary striated muscles. *J Infect Dis* 1970;122:45-52.
144. MacDonald GH, Johnston RE. Role of dendritic cell targeting in Venezuelan equine encephalitis virus pathogenesis. *J Virol* 2000;74:914-22.
145. Postic B, Schleupner CJ, Armstrong JA, Ho M. Two variants of Sindbis virus which differ in interferon induction and serum clearance. I. The phenomenon. *J Infect Dis* 1969;120:339-47.
146. Jahrling PB. Virulence heterogeneity of a predominantly avirulent western equine encephalitis virus population. *J Gen Virol* 1976;32:121-8.

147. Jahrling PB, Scherer WF. Growth curves and clearance rates of virulent and benign Venezuelan encephalitis viruses in hamsters. *Infect Immun* 1973;8:456-62.
148. Lustig S, Halevy M, Ben-Nathan D, Rice CM, Kober D. The role of host immunocompetence in neuroinvasion of Sindbis virus. *Arch Virol* 1999;144:1159-71.
149. Johnson RT. Virus invasion of the central nervous system: a study of Sindbis virus infection in the mouse using fluorescent antibody. *Am J Pathol* 1965;46:929-43.
150. Aguilar MJ. Pathological changes in brain and other target organs of infant and weanling mice after infection with non-neuroadapted western equine encephalitis virus. *Infect Immun* 1970;2:533-42.
151. Monath TP, Kemp GE, Cropp CB, Chandler FW. Necrotizing myocarditis in mice infected with western equine encephalitis virus: Clinical, electrocardiographic, and histopathologic correlations. *J Infect Dis* 1978;138:59-66.
152. Murphy FA, Taylor WP, Mims CA, Marshall ID. Pathogenesis of Ross River virus infection in mice. II. Muscle, heart, and brown fat lesions. *J Infect Dis* 1973;127:129-38.
153. Garen PD, Tsai TF, Powers JM. Human eastern equine encephalitis: immunohistochemistry and ultrastructure. *Mod Pathol* 1999;12:646-52.

154. Fraser JR, Cunningham AL, Clarris BJ, Aaskov JG, Leach R. Cytology of synovial effusions in epidemic polyarthritis. *Aust NZJ Med* 1981;11:168-73.
155. Fraser JR, Ratnamohan VM, Dowling JP, Becker GJ, Varigos GA. The exanthem of Ross River virus infection: histology, location of virus antigen and nature of inflammatory infiltrate. *J Clin Pathol* 1983;36:1256-63.
156. Hoarau JJ, Jaffar Bandjee MC, Krejbich TP, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, et al. Persistent chronic inflammation and infection by chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J Immunol* 2010;184:5914–27.
157. Malherbe H, Strickland-Cholmley M, Jackson AL. Sindbis virus infection in man: report of a case with recovery of virus from skin lesions. *S Afr Med J* 1963;37:547–52.
158. Steele KE, Twenhafel NA. Pathology of animal models of alphavirus encephalitis. *Vet Pathol* 2010;47:790–805.
159. Linn ML, Aaskov JG, Suhrbier A. Antibody-dependent enhancement and persistence in macrophages of an arbovirus associated with arthritis. *J Gen Virol* 1996;77(Pt 3):407-11.
160. Cunningham AL, Fraser JR. Ross River virus infection of human synovial cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1985;63(Pt 2):199-204.
161. Charles PC, Walters E, Margolis F, Johnston RE. Mechanism of neuroinvasion of Venezuelan equine encephalitis virus in the mouse. *Virology* 1995;208:662-71.

162. Jackson AC, Moench TR, Griffin DE. The pathogenesis of spinal cord involvement in the encephalomyelitis of mice caused by neuroadapted Sindbis virus infection. *Lab Invest* 1987;56:418–23..
163. Oliver KR, Fazakerley JK. Transneuronal spread of Semliki Forest virus in the developing mouse olfactory system is determined by neuronal maturity. *Neuroscience* 1998;82:867–77.
164. Jackson AC, Moench TR, Trapp BD, Griffin DE. Basis of neurovirulence in Sindbis virus encephalomyelitis of mice. *Lab Invest* 1988;58:503–9.
165. Burdeinick-Kerr R, Wind J, Griffin D. The synergistic roles of antibody and interferon in noncytolytic clearance of Sindbis virus from different regions of the central nervous system. *J Virol* 2007;81:5628–36.
166. Finter NB. Interferon as an antiviral agent in vivo: quantitative and temporal aspects of the protection of mice against Semliki Forest virus. *Br J Exp Pathol* 1966;47:361-71.
167. Jahrling PB, Navarro E, Scherer WF. Interferon induction and sensitivity as correlates to virulence of Venezuelan encephalitis viruses for hamsters. *Arch Virol* 1976;51:23-35.
168. Spotts DR, Reichert RA, Kalkhan MA, Kinney RM, Roehrig JT. Resistance to alpha/beta interferons correlates with the epizootic and virulence potential of Venezuelan equine encephalitis viruses and is determined by the 5'-noncoding region and glycoproteins. *J Virol* 1998;72:10286–91.

169. Byrnes AP, Durbin JE, Griffin DE. Control of Sindbis virus infection by antibody in interferon-deficient mice. *J Virol* 2000;74:3905-8.
170. Ho M, Breinig MK. Conditions for the production of an interferon appearing in chick cell cultures infected with Sindbis virus. *J Immunol* 1962;89:177-86.
171. Despres P, Griffin JW, Griffin DE. Antiviral activity of alpha interferon in Sindbis virus-infected cells is restored by anti-E2 monoclonal antibody treatment. *J Virol* 1995;69:7345-8.
172. Rebello MC, Fonseca ME, Marinho JO, Rebello MA. Interferon action on Mayaro virus replication. *Acta Virol* 1993;37:223-31.
173. Friedman RM, Fantes KH, Levy HB, Carter WB. Interferon action on parental Semliki forest virus ribonucleic acid. *J Virol* 1967;1:1168-73.
174. Muñoz A, Carrasco L. Action of human lymphoblastoid interferon on HeLa cells infected with RNA-containing animal viruses. *J Gen Virol* 1984;65(Pt 2):377-90.
175. Brown A, Officer JE. An attenuated variant of eastern encephalitis virus: biological properties and protection induced in mice. *Arch Virol* 1975;47:123-38.
176. Rosenblum CI, Stollar V. SVMPA, a mutant of sindbis virus resistant to mycophenolic acid and ribavirin, shows an increased sensitivity to chick interferon. *Virology* 1999;259:228-33.
177. Doherty PC. Quantitative studies of the inflammatory process in fatal viral meningoencephalitis. *Am J Pathol* 1973;73:607-22.

178. Griffin DE, Johnson RT. Cellular immune response to viral infection: in vitro studies of lymphocytes from mice infected with Sindbis virus. *Cell Immunol* 1973;9:426-34.
179. Griffin DE. Role of the immune response in age-dependent resistance of mice to encephalitis due to Sindbis virus. *J Infect Dis* 1976;133:456–64.
180. Calisher CH, Meurman O, Brummer-Korvenkontio M, Halonen PE, Muth DJ. Sensitive enzyme immunoassay for detecting immunoglobulin M antibodies to Sindbis virus and further evidence that Pogosta disease is caused by a western equine encephalitis complex virus. *J Clin Microbiol* 1985;22:566-71.
181. Calisher CH, Emerson JK, Muth DJ, Lazuick JS, Monath TP. Serodiagnosis of western equine encephalitis virus infections: relationships of antibody titer and test to observed onset of clinical illness. *J Am Vet Med Assoc* 1983;183:438-40.
182. Carter IW, Fraser JR, Cloonan MJ. Specific IgA antibody response in Ross River virus infection. *Immunol Cell Biol* 1987;65(Pt 6):511-3.
183. Carey DE, Myers RM, DeRanitz CM, Jadhav M, Reuben R. The 1964 chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1969;63:434-45.
184. Kurkela S, Manni T, Myllynen J, Vaheri A, Vapalahti O. Clinical and laboratory manifestations of Sindbis virus infection: prospective study, Finland, 2002–2003. *J Infect Dis* 2005;191:1820–9.

185. Griffin DE, Johnson RT. Role of the immune response in recovery from Sindbis virus encephalitis in mice. *J Immunol* 1977;118:1070–5.
186. Calisher CH, Berardi VP, Muth DJ, Buff EE. Specificity of immunoglobulin M and G antibody responses in humans infected with eastern and western equine encephalitis viruses: application to rapid serodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1986;23:369-72.
187. Jahrling PB, Hesse RA, Anderson AO, Gangemi JD. Opsonization of alphaviruses in hamsters. *J Med Virol* 1983;12:1-16.
188. Aaskov JG, Fraser JR, Dalglish DA. Specific and non-specific immunological changes in epidemic polyarthritis patients. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1981;59(Pt 5):599-608.
189. Mokhtarian F, Griffin DE, Hirsch RL. Production of mononuclear cell chemotactic factors during Sindbis virus infection of mice. *Infect Immun* 1982;35:965-73.
190. Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Phenotypic changes in Langerhans' cells after infection with arboviruses: a role in the immune response to epidermally acquired viral infection? *J Virol* 1996;70:4761-6.
191. Causey OR, Causey CE, Maroja OM, Macedo DG. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1961;10:227-49.

192. Meek AD, Faragher SG, Weir RC, Dalgarno L. Genetic and phenotypic studies on Ross River virus variants of enhanced virulence selected during mouse passage. *Virology* 1989;172:399-407.
193. Bradish CJ, Allner K, Maber HB. The virulence of original and derived strains of Semliki forest virus for mice, guinea pigs and rabbits. *J Gen Virol* 1971;12:141-60.
194. Thach DC, Kleeberger SR, Tucker PC, Griffin DE. Genetic control of neuroadapted Sindbis virus replication in female mice maps to chromosome 2 and associates with paralysis and mortality. *J Virol* 2001;75:8674–80.
195. Donnelly SM, Sheahan BJ, Atkins GJ. Long-term effects of Semliki Forest virus infection in the mouse central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997;23:235-41.
196. Steele KE, Davis KJ, Stephan K, Kell W, Vogel P, Hart MK. Comparative neurovirulence and tissue tropism of wild-type and attenuated strains of Venezuelan equine encephalitis virus administered by aerosol in C3H/HeN and BALB/c mice. *Vet Pathol* 1998;35:386-97.
197. Jahrling PB, Gorelkin L. Selective clearance of a benign clone of Venezuelan equine encephalitis virus from hamster plasma by hepatic reticuloendothelial cells. *J Infect Dis* 1975;132:667-76.
198. Marker SC, Ascher MS. Specific in vitro lymphocyte transformation with Venezuelan equine encephalitis virus. *Cell Immunol* 1976;23:32-8.

199. Jahrling PB, Heisey GB, Hesse RA. Evaluation of vascular clearance as a marker for virulence of alphaviruses: disassociation of rapid clearance with low virulence of venezuelan encephalitis virus strains in guinea pigs. *Infect Immun* 1977;17:356-60.
200. Jahrling PB, Hilmas DE, Heard CD. Vascular clearance of Venezuelan equine encephalomyelitis viruses as a correlate to virulence for rhesus monkeys. *Arch Virol* 1977;55:161-4.
201. Levine B, Hardwick JM, Griffin DE. Persistence of alphaviruses in vertebrate hosts. *Trends Microbiol* 1994;2:25-8.
202. Noran HH. Chronic equine encephalitis. *Am J Pathol* 1944;20:259–67.
203. Seamer JH, Boulter EA, Zlotnick I. Delayed onset of encephalitis in mice passively immunized against Semliki Forest virus. *Br J Exp Pathol* 1971;52:408-14.
204. Griffin DE, Metcalf T. Clearance of virus infection from the CNS. *Curr Opin Virol* 2011;1:216–21.
205. Metcalf TU, Griffin DE. Alphavirus-induced encephalomyelitis: Antibody-secreting cells and viral clearance from the nervous system. *J Virol* 2011;85:11490–501.
206. Milner AR, Marshall ID. Pathogenesis of in utero infections with abortigenic and non-abortigenic alphaviruses in mice. *J Virol* 1984;50:66-72.

207. Aaskov JG, Nair K, Lawrence GW, Dalglish DA, Tucker M. Evidence for transplacental transmission of Ross River virus in humans. *Med J Aust* 1981;2:20-1.
208. London WT, Levitt NH, Kent SG, Wong VG, Sever JL. Congenital cerebral and ocular malformations induced in rhesus monkeys by Venezuelan equine encephalitis virus. *Teratology* 1977;16:285-96.
209. Scott TW, Weaver SC. Eastern equine encephalomyelitis virus: epidemiology and evolution of mosquito transmission. *Adv Virus Res* 1989;37:277-328.
210. Villas-Bôas SG, Gombert AK. Análise do metaboloma. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* ano IX 2006;36:58-69.
211. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D603-D10.
212. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998;16:373-8.
213. Villas-Bôas SG, Rasmussen S, Lane GA. Metabolomics or metabolite profiles? *Trends in Biotechnology* 2005;23:385-6.
214. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature* 2008;455:1054-6.
215. Fiehn O, Kloska S, Altmann T. Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:82-6.

216. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2001;2:155-68.
217. Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 2004;22:245-52.
218. Villas-Bôas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev* 2005;24:613-46.
219. Bino RJ, Hall RD, Fiehn O, Kopka J, Saito K, Draper J, et al. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci* 2004;9:418-25.
220. Villas-Bôas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev* 2005;24:613-46.
221. Villas-Bôas SG, Hojer-Pedersen J, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast* 2005;22:1155-69.
222. Nielsen J, Oliver S. The next wave in metabolome analysis. *Trends Biotechnol* 2005;23:544-6.
223. Villas-Bôas SG, Moxley JF, Akesson M, Stephanopoulos G, Nielsen J. High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts. *Biochem J* 2005;388(Pt 2):669-77.

224. Villas-Bôas SG, Noel S, Lane GA, Attwood G, Cookson A. Extracellular metabolomics: a metabolic footprinting approach to assess fiber degradation in complex media. *Anal Biochem* 2006;349:297-305.
225. Weckwerth W, Loureiro ME, Wenzel K, Fiehn O. Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7809-14.
226. Kuyper M, Toirkens MJ, Diderich JA, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res* 2005;5:925-34.
227. Overkamp KM, Bakker BM, Kötter P, Luttik MA, Van Dijken JP, Pronk JT. Metabolic engineering of glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2814-21.
228. Regulation no 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 september 2003 on genetically modified food and feed [Editorial]. *Official Journal of European Union* 2003;L268:1-23.
229. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19:1720-30.
230. Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 2003;62:817-36.
231. Nielsen J. It is all about metabolic fluxes. *J Bacteriol* 2003;185:7031-5.

232. Villas-Bôas SG. Analytical techniques & applications of metabolomics in systems medicine and systems biotechnology. 2013; <http://csbj.org/> (acesso 5 de novembro de 2014).
233. Yasumura Y, Kawakita M. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho* 1963;21:1201-19.
234. Shimizu B, Seno K, Koyama H, Kuroki T, editores. Manual of selected cultured cell lines for bioscience and biotechnology. Tokyo: Kyoritsu Shuppan; 1993.
235. Singh KR. Propagation of arboviruses in Singh's Aedes cell lines. I. Growth of arboviruses in Aedes albopictus and A. aegypti cell lines. *Curr Top Microbiol Immunol* 1971;55:127-133.
236. Figueiredo LT. The use of Aedes albopictus C6/36 cells in the propagation and classification of arbovirus of the Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae families. *Rev Soc Bras Med Trop* 1990;23:13-8.
237. Condit RC. Principles of Virology. In: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. 6a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 31-3.
238. Gaude E, Chignola F, Spiliotopoulos D, Spitaleri A, Ghitti M, Garcia-Manteiga JM. muma, An R package for metabolomics univariate and multivariate statistical analysis. *Current Metabolomics* 2013;1:180–9.
239. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D199–D205.

240. Nelson DL, Cox MM. Ciclo do Ácido Cítrico. In: Strange L, Soltvedt B, editores. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 623 e 635.
241. Nelson DL, Cox MM. Oxidação de Aminoácidos e Produção de Ureia. In: Strange L, Soltvedt B, editores. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 688 e 692.
242. Nelson DL, Cox MM. Biossíntese de Aminoácidos, Nucleotídeos e Moléculas Relacionadas. In: Strange L, Soltvedt B, editores. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 857 e 864-9.
243. Birungi G, Chen SM, Loy BP, Ng ML, Li SFY. Metabolomics approach for investigation of effects of dengue virus infection using the EA.hy926 cell line. *J Proteome Res* 2010;9:6523-34.
244. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB00764> (acesso 1 de junho de 2015).
245. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB00023> (acesso 1 de junho de 2015).
246. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB00062> (acesso 1 de junho de 2015).
247. Nelson DL, Cox MM. Catabolismo de Ácidos Graxos. In: Strange L, Soltvedt B, editores. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 652.

248. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB00042> (acesso 1 de junho de 2015).
249. Nelson DL, Cox MM. Bioenergética e Tipos de Reações Bioquímicas. In: Strange L, Soltvedt B, editores. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 505 e 511.
250. El-Bacha T, Menezes MMT, Silva MCA, Sola-Penna M, Da Poian AT. Mayaro vírus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. *Mol Cell Biochem* 2004;266:191-8.
251. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB00143> (acesso 7 de junho de 2015).
252. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB00639> (acesso 7 de junho de 2015).
253. Genzel Y, Schulze-Horsel J, Mohler L, Sidorenko Y, Reichl U. Influenza vaccines- challenges in mammalian cell culture technology. *Cell Technol Cell Prod* 2007:503-8.
254. Sidorenko Y, Reichl U. Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotechnol Bioeng* 2004;88:1-14.
255. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB00306> (acesso 7 de junho de 2015).
256. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB00064> (acesso 7 de junho de 2015).

257. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB01511> (acesso 7 de junho de 2015).
258. Nelson DL, Cox MM. Bioenergética e Metabolismo. In: Strange L, Soltvedt B, editores. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 487.
259. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB01522> (acesso 7 de junho de 2015).
260. Mapelli V, Olsson L, Nielsen J. Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. Trends Biotechnol 2008;26:490-7.
261. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB00479> (acesso 7 de junho de 2015).
262. Nelson DL, Cox MM. Fundamentos da Bioquímica. In: Strange L, Soltvedt B, editores. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 8.
263. Kell DB, Brown M, Davey HM, Dunn WB, Spasic I, Oliver SG. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. Nat Rev Microbiol 2005;3:557-65.
264. Nelson DL, Cox MM. Princípios da Regulação Metabólica. In: Strange L, Soltvedt B, editores. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 570.

265. Nelson DL, Cox MM. Biossíntese de lipídeos. In: Strange L, Soltvedt B, editores. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 805.
266. Knox C, Young N, Wishart D. <http://hmdb.ca/metabolites/HMDB00821> (acesso 7 de junho de 2015).
267. Nelson DL, Cox MM. Lipídeos. In: Strange L, Soltvedt B, editores. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 350 e 354.