

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Amanda Gomes de Oliveira Carvalho

**Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento
de ferramentas para o uso em diagnóstico diferencial e
descoberta de novos antivirais contra flavivírus**

**Recife
2015**

Amanda Gomes de Oliveira Carvalho

**Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento
de ferramentas para o uso em diagnóstico diferencial e
descoberta de novos antivirais contra flavivírus**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzalez Gil, PhD.

Coorientador: Giovani Rota Bertani, PhD.

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Carvalho, Amanda Gomes de Oliveira

Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento de ferramentas para o uso em diagnóstico diferencial e descoberta de novos antivirais contra flavivírus/ Amanda Gomes de Oliveira Carvalho– Recife: O Autor, 2015.

103 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzalez Gil

Coorientador: Giovani Rota Bertani

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2015.**

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Vírus- genética 2. Flavivírus 3. Agentes antivirais I. Gonzalez Gil, Laura Helena Vega (orientadora) II. Bertani, Giovani Rota (coorientador) III. Título**

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-106

Amanda Gomes de Oliveira Carvalho

**Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento de ferramentas para o
uso em diagnóstico diferencial e descoberta de novos antivirais contra
flavivírus**

Aprovado em 02 / 03 / 2015

Banca Examinadora:

Dra. Laura Helena Vega Gonzalez Gil
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Rafael Dhalia
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Marli Tenório
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Tereza Magalhães
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Lindomar José Pena
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Recife
2015

Dedico este trabalho aos meus pais,
Romildo e Gerusa,
por todo o esforço e dedicação desde sempre.

Agradecimentos

Como foi longa esta caminhada na Universidade Federal de Pernambuco... Foram 10 anos de aprendizado, um tanto árduo, mas prazeroso. Mas só tenho a agradecer todas as oportunidades que a vida me proporcionou, onde conheci pessoas fascinantes e pude ter o privilégio de estudar técnicas pouco conhecidas no nosso país. Eu sei que ainda falta tanto e que o saber nunca cessa.

Agradeço aos meus pais, Romildo e Gerusa, por cada noite mal dormida e por cada gota de suor derramado em prol da minha educação. Agradeço ao meu querido esposo, Neto, pelo apoio de sempre. Sou grata ao meu professor de biologia, Emanuel Souto pelo despertar do meu interesse. E como poderia esquecer minha querida amiga, Déborah Camará, quem me avisou da seleção de estágio no LaViTE. Obrigada a Dra. Ana Silva, Dr. Eduardo Nascimento e Dra. Laura Gil pela oportunidade de ingressar na equipe do LaViTE, em 18 de maio de 2005. Que nesse ano aprendi o básico que levei para vida toda, como pipetar, como contar células na Neubauer, como ser cordial e amparar o colega de trabalho até mais tarde, como fez comigo o Dr. Eduardo Nascimento. Sou muito grata a Dra. Marli Tenório por tantas técnicas ensinadas e por ter me sugerido como aluna de IC à Dra. Laura Gil, que me recebeu de braços abertos. Mas não tenho nem como agradecer a ela, todos esses anos de aprendizado e formação em Virologia Molecular. Muito obrigada Dra. Laura Gil por tudo! Sou sua aluna desde pequeninha, mas não que eu seja grande, mas sou maior do que um dia já fui. Hoje mais um ciclo se completa e graças a você e ao Dr. Giovani Bertani, meu Coorientador no mestrado e doutorado. Obrigada a todos os professores da graduação e da pós-graduação. Gostaria de agradecer também à Dra. Tânia, do CPqRR, por toda a colaboração e envio dos extratos naturais. Quantos aos meus amigos... São muitos! Fui presenteada por tantos na UFPE, quanto no CPqAM! Obrigada: Verônica, Diégina, Mayara, Georgia, Telissa, Dóris, Janaína, Bruna, Fábila, Laís, José Valter, Kennya, Joelma, Andrea Rangel, Sabrina, Douglas, Raoni, Isabele, Priscila, Sandra, Deborah, Brena, André, Andresa, Helena, Clarissa, Ronaldo e Luanna e tantos outros. E como não posso esquecer, obrigada a FACEPE e o CNPq pelos anos de financiamento.

E a vida segue, e o meu futuro a Deus pertence...

*“A satisfação que nosso trabalho nos proporciona
é sinal de que soubemos escolhê-lo.”*
(Clarisse Lispector)

Resumo

Os Flavivírus estão entre os vírus emergentes mais importantes do mundo. Ainda não há tratamento específico para nenhum membro da família *Flaviviridae* e novos casos são continuamente anunciados, com centenas de mortes. Logo, é de prioridade o desenvolvimento de vacinas, antivirais e métodos de diagnóstico, precisos e rápidos, principalmente de baixo custo para este gênero. O objetivo deste trabalho foi desenvolver ferramentas para o uso em diagnóstico sorológico diferencial de flavivírus, em NB2, através do uso de técnicas de genética reversa e triagem em larga escala de extratos naturais com atividade antiviral contra flavivírus. Para o diagnóstico sorológico diferencial, foram construídas três quimeras substituindo as glicoproteínas estruturais prM/E do vírus da febre amarela (YFV) pelas dos vírus Ilhéus (ILHV), vírus rocio (ROCV) e vírus encefalite de São Luís (SLEV). As quimeras construídas apresentaram replicação atenuada em cultivo celular, quando comparadas ao vírus parental. A quimera YFV-WNV (vírus Oeste do Nilo), construída anteriormente, foi utilizada para o estabelecimento de um protocolo de diagnóstico sorológico por ELISA de captura. Analisou-se 164 amostras de soros de equinos do Estado de Pernambuco para o WNV por ELISA, resultando em 62 amostras positivas. Todos os quatro vírus quiméricos citados foram utilizados na validação dos resultados por PRNT₅₀. No diagnóstico diferencial por PRNT₅₀, de um total de 62 amostras positivas no ELISA, observaram-se três amostras positivas para WNV, 27 positivas para ILHV, quatro para o ROCV, quatro para o SLEV e uma para YFV17DD. No segundo enfoque do trabalho utilizou-se a linhagem celular BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES, contendo o replicon bicistrônico repórter do YFV e o vírus repórter YFV-GLuc para triar 5200 extratos, onde foram identificados 73 extratos naturais com possível atividade antiviral contra o YFV, confirmados por ensaio utilizando o YFV17DD. Essa técnica inovadora de triagem de drogas, em larga escala, deve auxiliar o desenvolvimento de antivirais contra flavivirose, assim como o protocolo de diagnóstico diferencial deverá auxiliar no correto diagnóstico e no monitoramento de flavivírus emergentes no Brasil.

Palavras-chave: Flavivírus, diagnóstico, antivirais.

Abstract

Flaviviruses are the most important emerging viruses in the world. Currently, there is no specific treatment for any member of the *Flaviviridae* family and new cases are continually announced, with hundreds of deaths. Therefore, efforts are concentrated in the development of vaccines, antiviral and new methods for accurate, rapid and especially low cost diagnosis. The aim of this study was to develop molecular tools to create a differential serological diagnostic system, under BSL-2 conditions, for emerging flaviviruses in Brazil and to screen in high-throughput natural extracts for antiviral compounds. For the differential serological diagnosis system, three chimeras were constructed by the replacement of the structural glycoproteins prM/E of YFV by prM/E of Ilheus virus (YFV-ILHV), Rocio virus (YFV-ROCV) or Saint Louis encephalitis virus (YFV-SLEV). The chimeric viruses constructed showed attenuated replication in cell culture, compared to the parental virus. The chimeric virus YFV-WNV (West Nile virus), constructed above, was used for establish a serological diagnostic protocol for capture ELISA. We analyzed 164 samples of equine sera from Pernambuco for WNV by ELISA, observing 62 positive samples. All four chimeric viruses mentioned were used to validate the ELISA results by PRNT₅₀. From the 62 samples positive by ELISA, we observed three positive for WNV, 27 for ILHV, four for ROCV, four for SLEV and one for YFV17DD, using the PRNT₅₀ as a differential diagnoses. In the second approach of the work, we used the cell line BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES, YFV bicistronic replicon containing the gene reporter, and the reporter virus YFV-GLuc to screen 5200 extracts. We identified 73 natural extracts with possible antiviral activity against YFV, confirmed by assay with the wild virus YFV17DD. This innovative technique for high throughput drug-screening, should help in the development of antivirals against flaviviruses, as well as, the differential diagnosis protocol should aid in the proper diagnosis and monitoring emerging flaviviruses in Brazil.

Keywords: Flavivirus, diagnosis, antivirals.

Lista de Ilustrações

Figura 1- Distribuição geográfica dos principais flavivírus de importância médica: vírus Oeste do Nilo (WNV), vírus encefalite de São Luís (SLEV), vírus encefalite japonesa (JEV), vírus dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV).	18
Figura 2- Representação esquemática do genoma (a) e da composição do vírion (b)	19
Figura 3- Ciclo replicativo dos flavivírus.	23
Figura 4- Ciclo de transmissão da febre amarela.	24
Figura 5- Esquema do curso do tempo e a produção de anticorpos, após a infecção por flavivírus, e quais as opções de protocolos de diagnóstico utilizar.	31
Figura 6- Estratégia de construção dos vírus quiméricos YFV/SLEV, YFV/ILHV e YFV/ROCV.	42
Figura 7- Desenho esquemático do ELISA de captura para a pesquisa de anticorpos do WNV em amostras de soro equino.	49
Figura 8- Purificados da digestão do vetor pBSC-YFV17D-T7 e da amplificação dos insertos utilizados na construção dos vírus quiméricos.	52
Figura 9- PCR de triagem de clones corretamente recombinados.	53
Figura 10- Imunofluorescência Indireta de células BHK-21 transfectadas com os vírus quiméricos e o YFV17D.	54
Figura 11- Confirmação da construção e recuperação das quimeras virais infectivas por RT-PCR.	55
Figura 12- Morfologia de placas dos vírus quiméricos e cepa parental YFV17DD.	56
Figura 13- Curva da cinética de crescimento das quimeras e vírus selvagem YFV17DD em células BHK-21.	57
Figura 14- Exemplo de esquema de ensaio para pesquisa de anticorpos neutralizantes em soros equinos no Estado de PE por PRNT50.	59
Figura 15- Representação esquemática da análise dos 5200 extratos da biblioteca da COLAB Fiocruz/MG.	63

- Figura 16-** Distribuição percentual dos extratos que inibiram a atividade da luciferase após um tratamento de 48 horas, com 20 μ g/mL, da linhagem BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolRES. 64
- Figura 17-** Análise da capacidade antiviral dos 94 substratos naturais selecionados a uma concentração de 40 μ g/mL após 48 horas de tratamento na linhagem celular BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolRES. 64
- Figura 18-** Análise da capacidade antiviral de 91 extratos naturais pré-selecionados em inibir a replicação do vírus da febre amarela repórter (YFV-GLuc) a uma concentração de 40 μ g/mL. 65
- Figura 19-** Análise da capacidade antiviral de 84 extratos naturais pré-selecionados em inibir a replicação do vírus da febre amarela cepa 17DD a uma concentração de 40 μ g/mL. 69

Lista de Tabelas

Tabela 1- Classificação com base na reação cruzada sorológica dos flavivírus	15
Tabela 2- Oligonucleotídeos usados na construção dos vírus quiméricos	42
Tabela 3- Pesquisa de anticorpos IgM e IgG em soros equinos brasileiros e americanos através do método de ELISA de captura.	58
Tabela 4- Títulos comparativos do PRNT ₅₀ para flavivirus em amostras de soro equino de Pernambuco positivas para WNV, triados por ELISA de captura.	59
Tabela 5- Amostras positivas no diagnóstico diferencial de flavivírus em amostras de equinos do Estado de Pernambuco, por PRNT.	61
Tabela 6- Porcentagem de inibição da atividade da luciferase dos 94 extratos naturais, selecionados, com possível atividade antiviral contra o vírus da febre amarela.	66

Lista de Abreviaturas e Símbolos

%	Por cento
µg	micrograma (10^{-6} gramas)
µL	microlitro (10^{-6} litros)
3'	Três linha
5'	Cinco linha
Kb	Kilobase
kDa	KiloDáton
mg	miligrama (10^{-3} gramas)
°C	Graus Celsius
α	Alfa
pb	Pares de bases
DENV	Vírus dengue (<i>dengue virus</i>)
DMSO	dimetil-sulfóxido (<i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E	Proteína estrutural do Envelope
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
IFA	Ensaio de Imunofluorescência Indireta
IFN	Interferon
ILHV	Vírus Ilhéus (<i>Ilheus virus</i>)
M	Proteína estrutural da Membrana
MEM	Meio essencial mínimo (<i>minimum essential medium</i>)
NB	Nível de Biossegurança
NTP	Nucleotídeo Trifosfato
PBS	Tampão Fosfato Salina (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placas (<i>plaque reduction neutralization test</i>)
RNA	Ácido Ribonucléico
ROCV	Vírus Rocio (<i>Rocio virus</i>)

SFB	Soro Fetal Bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
SLEV	Vírus Encefalite São Luís (<i>Saint Louis encephalitis virus</i>)
UTR	Região Não Codificadora (<i>untranslated regions</i>)
WNV	Vírus Oeste do Nilo (<i>West Nile virus</i>)
YFV	Vírus da Febre Amarela (<i>yellow fever virus</i>)
TBEV	Vírus da Encefalite transmitida por carrapato (<i>Tick-borne encephalitis virus</i>)

Sumário

Item	Página
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Ilustrações	viii
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xi
1. Introdução	14
2. Revisão da Literatura	15
2.1 Classificação do gênero <i>Flavivirus</i>	15
2.2 Biologia Molecular dos <i>Flavivirus</i>	18
2.3 Ciclo replicativo dos <i>Flavivirus</i>	22
2.4 Aspectos epidemiológicos do vírus da febre amarela (YFV)	23
2.5 Aspectos epidemiológicos do vírus encefalite São Luís (SLEV)	25
2.6 Aspectos epidemiológicos do vírus Ilheus (ILHV)	27
2.7 Aspectos epidemiológicos do vírus Rocio (ROCV)	28
2.8 Aspectos epidemiológicos do vírus Oeste do Nilo (WNV)	29
2.9 Diagnóstico Diferencial em Flavivírus	30
<i>2.9.1 O uso da genética reversa viral para o desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico diferencial de flavivírus</i>	33
2.10 Tratamento de Flaviviroses	34
<i>2.10.1 O uso da genética reversa viral para o desenvolvimento de ferramentas para a triagem em larga escala de antivirais contra flavivírus</i>	37
3. Objetivos	38
3.1 Objetivo Geral	39

3.2 Objetivos específicos	39
4. Materiais e Métodos	40
4.1. Cultivo de células e vírus	40
4.2. Construção dos vírus quiméricos e recuperação de partículas virais infecciosas	40
4.2.1 Preparação do vetor	40
4.2.2 Amplificação dos insertos para a recombinação	40
4.2.3 Recombinação homóloga em levedura	41
4.2.4 Extração de DNA da levedura e confirmação dos clones	43
4.2.5 Amplificação do genoma quimérico e transcrição <i>in vitro</i>	43
4.2.6 Recuperação dos vírus quiméricos	44
4.2.7 Caracterização <i>in vitro</i> dos vírus quiméricos	44
4.2.7.1 Confirmação da identidade dos clones	44
4.2.7.2 Avaliação da replicação dos vírus quiméricos	45
4.2.7.2.1 <i>Imunofluorescência indireta</i>	45
4.2.7.2.2 <i>Monitoramento do efeito citopático e análise da morfologia de placas</i>	45
4.2.7.2.3 <i>Avaliação da cinética de replicação viral</i>	46
4.3 Estabelecimento de protocolo de diagnóstico sorológico para o WNV por meio de ELISA de captura e confirmação por PRNT para SLEV, ILHV, ROCV, YFV17DD, DENV2 e WNV	46
4.3.1 Produção de antígenos em cultura de células	47
4.3.2 Padronização do ELISA de captura para WNV	47
4.3.3 Soros teste e condições padronizadas do ELISA de captura	48
4.3.4 Ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT) para flavivírus	49
4.4 Triagem de extratos antivirais, em larga escala, utilizando a linhagem celular BHK-21repYFV17D-LucNeolres	50
4.5 Triagem de extratos antivirais, em larga escala, utilizando o vírus repórter	50

YFV-GLuc

4.6 Confirmação da atividade dos extratos naturais frente aos vírus selvagens YFV17DD e DENV2	51
5. RESULTADOS OBTIDOS	52
5.1 Construção dos vírus quiméricos e recuperação de partículas virais infecciosas	52
5.2 Estabelecimento de um protocolo de diagnóstico sorológico para o WNV por meio de ELISA de captura e confirmação diferencial por PRNT para SLEV, ILHV, ROCV, YFV17DD, DENV2 e WNV.	57
5.2.1 ELISA de captura para WNV	58
5.2.2 Ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT) para flavivírus	58
5.3 Triagem de extratos naturais utilizando a linhagem celular BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES	61
5.4 Triagem de extratos naturais utilizando o vírus recombinante YFV-GLuc	64
5.5 Confirmação da atividade dos extratos naturais frente aos vírus selvagens YFV17DD e DENV2	68
6. Discussão	70
7. Conclusões	75
8. Perspectivas	76
9. Referências Bibliográficas	77
10. ANEXOS	82
11. Currículo Lattes	

1. INTRODUÇÃO

O vírus da febre amarela (YFV) é o protótipo do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, e vem sendo utilizado como vetor suporte para a construção de vírus quiméricos, vírus recombinantes e replicons através de genética reversa.

É de suma importância o melhor entendimento da biologia desses vírus já que no Brasil há em circulação 13 diferentes espécies, que em muitos casos resulta em erros de diagnósticos por gerarem reações cruzadas em testes sorológicos. O teste de neutralização por redução de placas (PRNT) é considerado padrão ouro para ensaios sorológicos de flavivírus devido a sua grande sensibilidade e especificidade, porém necessita da utilização de vírus vivo e alguns flavivírus são manipuláveis em nível de biossegurança 3, tais como o vírus do Oeste do Nilo (WNV), Ilheus (ILHV), Rocio (ROCV) e Encefalite São Luís (SLEV). Uma alternativa para essa dificuldade é a utilização de vírus quiméricos para a obtenção de antígenos em culturas de células, assim vírus selvagens, quando quiméricos, passam a ser manipuláveis num nível de biossegurança menor. Além de um diagnóstico exato, um tratamento adequado de viroses emergentes auxilia muito na diminuição da mortalidade em humanos.

Testes de drogas antivirais dependem de ensaios biológicos laboriosos e demorados que dificultam a triagem em larga escala. Muitos testes se baseiam na visualização do efeito citopático e ensaios de placa e, em ambos os casos, a análise em larga escala fica comprometida e o resultado pode demorar dias para ser obtido dependendo da cinética de replicação do vírus.

Nesse trabalho houve dois enfoques: o primeiro baseia-se no desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico sorológico diferencial para flavivírus utilizando vírus quiméricos construídos por genética reversa, e a técnica do ELISA de captura para a triagem de soros equinos com confirmação de resultados positivos através do teste PRNT, de padrão ouro, em NB2.

O segundo enfoque está na pesquisa de extratos naturais com possíveis atividades antivirais contra o YFV, triados em larga escala numa linhagem celular expressando um replicon repórter do YFV e confirmados através do uso de um YFV repórter, ambos construídos por genética reversa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Classificação do gênero *Flavivirus*

O gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, é composto por um grupo de vírus antigenicamente relacionados e sua distinção se dá apenas através de um teste específico de soroneutralização (CALISHER, 1989). Há uma classificação com base na reação cruzada sorológica que agrupa os flavivírus, transmitidos por artrópodes, em complexos: complexo do vírus Aroa, do vírus dengue, do vírus da encefalite japonesa, do vírus Ntaya e do vírus da febre amarela (Tabela 1) (MAEDA E MAEDA, 2013).

Tabela 1- Classificação com base na reação cruzada sorológica dos flavivírus

Modo de transmissão dos flavivírus	Grupo complexo antigênico	Vírus
Via mosquito	Complexo do vírus Aroa	Vírus Bussuquara, vírus Iguape, vírus Naranjal
	Complexo do vírus dengue	Vírus dengue 1, 2, 3 e 4
	Sorogrupo vírus da encefalite japonesa	Vírus da Encefalite Japonesa, vírus cacipacoré, vírus Murray Valley, vírus Ilhéus, vírus encefalite São Luís, vírus Rocio, vírus Oeste do Nilo, vírus Kunjin, vírus Usutu, vírus kokobera
	Grupo do vírus Ntaya	Vírus Bagaza, vírus Ntaya, vírus Tembusu e vírus Zyca

... continuação da Tabela 1

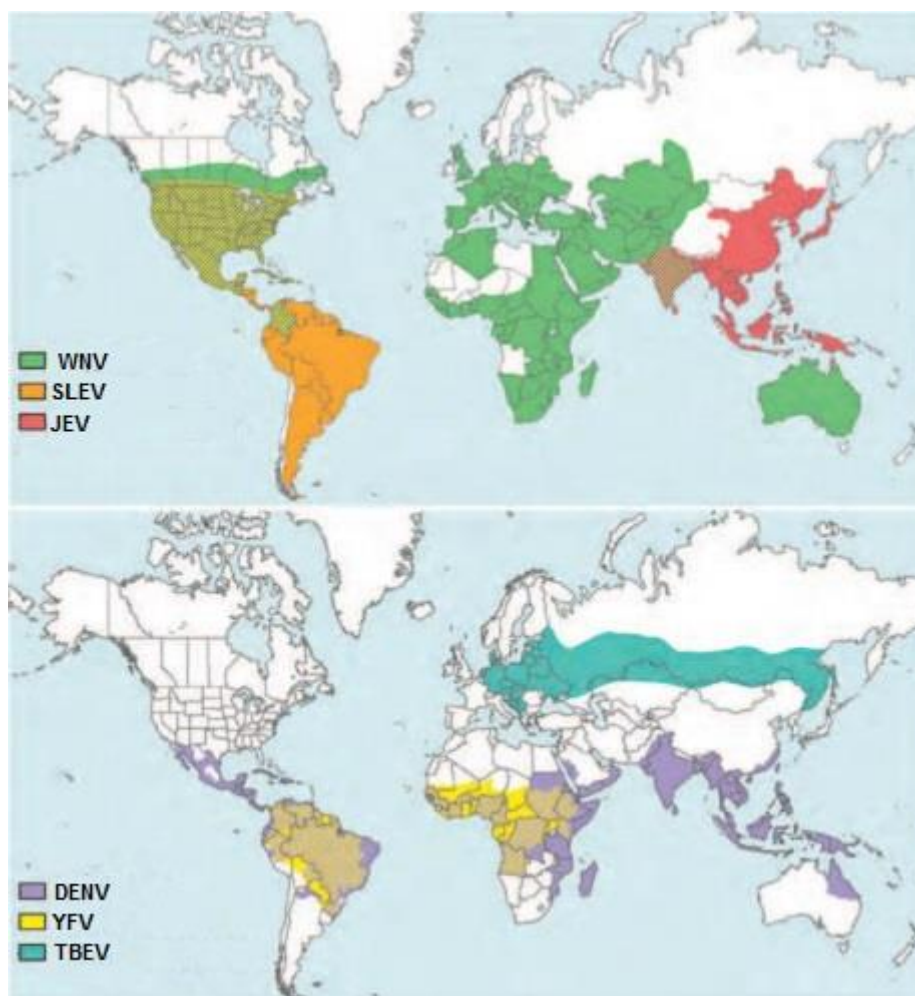
Via mosquito	Grupo vírus febre amarela	Vírus Banzi, vírus bouboui, vírus Edge Hill, vírus Jugra, vírus Saboya, vírus Sepik, vírus Uganda, vírus Wesselsbron e vírus da febre amarela
Via carrapato	Grupo de vírus transmitidos por carrapatos para mamíferos	Vírus da febre hemorrágica Omsk, vírus louping ill, vírus <i>forest kyasanur</i>
	Grupo de vírus transmitidos por carrapatos para aves marinhas	Vírus kadam, vírus meaban, vírus saumarez, vírus tyulenyi
Vetor desconhecido	Grupo do vírus morcego <i>entebbe</i>	Vírus morcegos entebbe, vírus yokose
	Grupo do vírus modoc	Vírus apoi, vírus cowbone ridge, vírus jutiapa, vírus modoc, vírus sal vieja, vírus san perlita
	Grupo do vírus rio bravo	Vírus morcego bukayasa, vírus ilha de carey, vírus morcego dakar, vírus leucoencefalite montana myotis, vírus morcego Phnom Pehh
	Gênero de vírus de insetos experimentais	Vírus agente de fusão celular, vírus morcego Tamana, vírus rio Kamiti

Fonte: Modificado de Maeda e Maeda (2013).

Cerca de metade dos flavivírus são causadores de doenças em humanos, tais como o vírus dengue (DENV), Febre Amarela (YFV), Oeste do Nilo (WNV), Encefalite Japonesa e Encefalite São Luís (SLEV). Outros flavivírus causam doenças em animais selvagens e domésticos de grande importância econômica e com potencial zoonótico (OJWANG, 2005). Muitos dos flavivírus são arboviroses (vírus transmitidos por artrópodes) e têm como vetores insetos culicídeos que disseminam as viroses através de repasto sanguíneo. A transmissão geralmente ocorre através do contato humano, no ambiente de matas, e pela sua ação no desmatamento e modificação do ambiente natural e reestruturação do ciclo vital dos hospedeiros reservatórios. Esses flavivírus, que causam doenças endêmicas de variabilidade natural, têm um grande potencial de emergência em novas áreas com clima e condições favoráveis e potencial de instalação, principalmente por ação do homem (MONATH, 2004).

Já caracterizada, a distribuição geográfica dos flavivírus se dá em diversos continentes. A encefalite japonesa (JEV) é um grave problema de saúde pública em países do sudeste da Ásia e do subcontinente indiano, com cerca de 50.000 casos e 15.000 mortes anuais (SOLOMON et al., 2000). A febre amarela é o principal problema de saúde pública da África do sul e subsaariana, sendo que mais de 30 países africanos estão em área de risco para o YFV (MAEDA E MAEDA, 2013). A febre da dengue é emergente em países da América Central e Sul, África e sul da Ásia, com uma estimativa de 390 milhões de infecções em humanos por ano, dos quais 96 milhões desenvolvem manifestações aparentes (BHATT et al., 2013; GUBLER, 1997). O vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV- *Tick-Borne Encephalitis Virus*) já foi identificado em mais de 20 países na Eurásia e leste da Ásia (GRITSUN et al., 2003). Logo, a distribuição geográfica dos flavivírus é bastante ampla (Figura 1).

Figura 1- Distribuição geográfica dos principais flavivírus de importância médica: vírus Oeste do Nilo (WNV), vírus encefalite de São Luís (SLEV), vírus encefalite japonesa (JEV), vírus dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV).
Fonte: Adaptado de Pierson e Diamond (2013).



No Brasil já foram identificados a presença de 12 flavivírus: Bussuquara, Cacipacoré, dengue (1, 2, 3 e 4), Iguape, Ilhéus, Rocio, encefalite de São Luís, febre amarela e Oeste do Nilo (BALEOTTI, 2003; FIGUEIREDO, 2000; SILVA, 2013; PAUVOLID-CORRÊA et al, 2011; 2014).

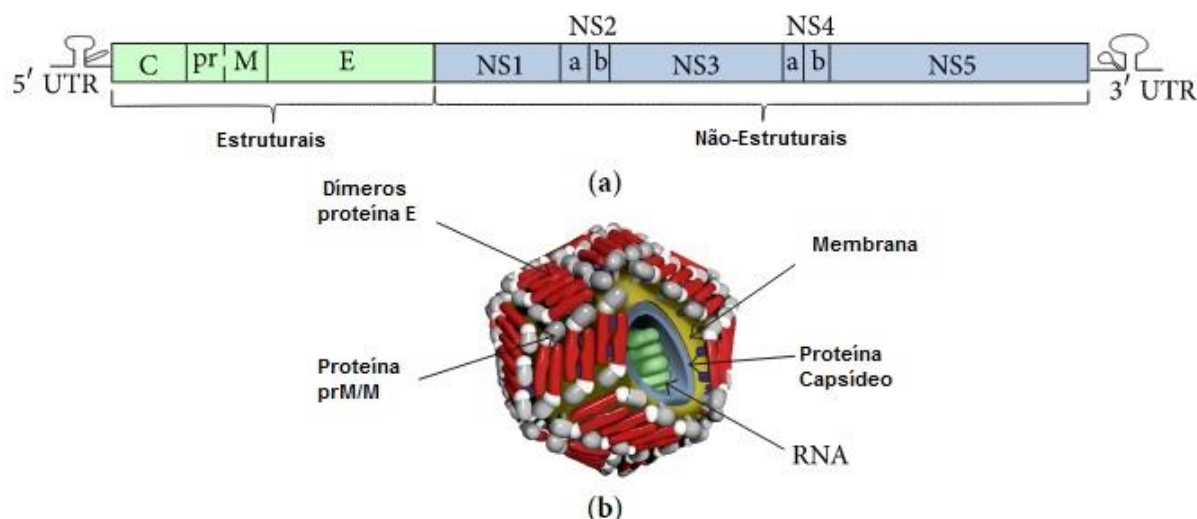
2.2 Biologia Molecular dos *Flavivirus*

Os flavivírus são vírus de RNA de fita simples, polaridade positiva, compreendendo um genoma de aproximadamente 11 Kb com uma estrutura cap na região 5' e a região 3' não poliadenilada. Membros desta família possuem uma estrutura esférica de aproximadamente 40 a 50 nm de diâmetro composto de um

núcleocapsídeo icosaédrico de 30 nm de diâmetro, circundado por um envelope viral derivado da célula hospedeira (GUBLER, 1997). O RNA viral possui uma 5' UTR de aproximadamente 100 pb, uma ORF, que codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 4000 aminoácidos e uma região 3' UTR de aproximadamente 500 pb (BATISTA, 2006; CHANG, 1997; ROEHRIG, 1997). O genoma quando traduzido, gera uma poliproteína que é processada por enzimas virais e da célula hospedeira em três proteínas estruturais, capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E) e em sete não estruturais (NS) 1, 2a, 2b, 3, 4a, 4b e 5. Clivagens em sítios específicos geram proteínas funcionais, que interagem com componentes virais e do hospedeiro para a produção da progênie viral durante o ciclo de replicação (JULANDER, 2013) (Figura 2).

Figura 2- Representação esquemática do genoma (a) e da composição do vírion (b). O genoma viral é composto por uma fita simples de RNA, polaridade positiva, 5' UTR com presença de cap e 3' UTR não poliadenilado. Após a tradução, há a geração de três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais. O vírion tem estrutura esférica, formado por um envelope que circunda um nucleocapsídeo icosaédrico.

Fonte: Adaptado de Chancey et al. (2014).



A proteína C é altamente básica por possuir um grande número de lisinas e argininas, característica necessária para a neutralização da carga negativa do RNA viral. Com um peso molecular de aproximadamente 11 kDa, esta proteína interage com o RNA viral formando a estrutura do nucleocapsídeo, e com a proteína estrutural do envelope, através de uma região hidrofóbica, sendo

portanto essencial para a formação da partícula viral. A região C-terminal dessa proteína apresenta um domínio hidrofóbico altamente conservado que atua como uma sequência sinal para a translocação da proteína precursora prM/E para o retículo endoplasmático (RE) da célula do hospedeiro, o qual é importante para o apropriado processamento destas proteínas (GUBLER, 2007).

A prM é uma glicoproteína de 26 kDa, precursora da proteína estrutural M de 8 kDa, sendo produzida durante o processo de maturação viral no complexo de Golgi. A clivagem da proteína prM, realizada por furinas durante a maturação viral, resulta no rearranjo das estruturas oligoméricas na superfície do vírion, promovendo a infecciosidade a partícula viral madura (CHANG, 1997; ROEHRIG, 1997; WENGLER E WENGLER, 1989).

A proteína estrutural E, uma glicoproteína de 53 a 54 kDa com cerca de 494 a 501 aminoácidos, é a maior componente da superfície do vírion. Essa proteína se encontra como um homotrímero na superfície das partículas maduras e pode ser achada intracelularmente em heterodímeros E-prM. É associada a muitas atividades biológicas, tais como: ligação ao receptor, hemaglutinação de eritrócitos, estimulação do sistema imune através da indução de anticorpos neutralizantes e proliferação de monócitos/macrófagos, adesão e fusão específica de membrana, penetração e montagem da partícula viral (HENCHAL et al., 1990; CHANG, 1997). A proteína do envelope é subdividida em três domínios distintos: DI, abrangendo a região central da molécula e contendo epítomos do subcomplexo e tipo específico; DII, o qual contém a maior parte dos contatos do homodímero de proteína E e apresenta epítomos de reação cruzada; DIII, localizado na porção C-terminal da proteína e tem relação com a virulência de determinadas cepas virais e ligação de anticorpos neutralizantes (CRILL E CHANG, 2004; FIGUEIREDO, 1999). A proteína E é caracterizada por conter a maior parte dos epítomos de anticorpos neutralizantes (COSTA et al., 2007).

As proteínas C, prM e E contêm uma sequência C-terminal hidrofóbica responsável pelo ancoramento na membrana e pela transferência do polipeptídeo para o lúmen do retículo endoplasmático (CHANG, 1997). Estas proteínas têm uma função primária na participação da formação da partícula viral. Já as proteínas NS são responsáveis pela replicação do RNA viral e evasão da resposta imune do hospedeiro (PUIG-BASAIGOITI, 2006).

A NS1 é uma glicoproteína de 39 a 41 kDa com doze resíduos conservados de cisteína e dois sítios de glicosilação nas posições 208 ou 209, os quais são importantes no processamento e secreção dessa proteína (CHANG, 1997; ROEHRIG, 1997). A NS1 é translocada para o retículo endoplasmático (RE) através de uma sequência sinal localizada na porção C-terminal hidrofóbica da proteína E do envelope, e é originada após o processamento e clivagem da proteína precursora NS1-2A. A dimerização dessa proteína ocorre após o processamento e pode ser encontrada nos compartimentos intracelulares, na superfície da célula e em forma secretada. NS1 está envolvida nas etapas de replicação do genoma viral e também tem sido implicada na patogenicidade da infecção (LINDENBACH E THIEL; RICE, 2007; YOUN et al, 2013). O genoma dos flavivírus é replicado via fita negativa (molde) que é acumulada durante os estágios da infecção, com regulação via concentração fita negativa – fita positiva dependendo do tempo de pós-infecção (YOUN et al, 2013).

A NS2A (24 kDa) embora não tenha sua função bem estabelecida, acredita-se que atue no processamento da NS1 e na replicação viral (CHANG, 1997; FALGOUT; CHANOCK; LAI, 1989). Possui um sítio de clivagem adicional dependente de serina protease, no qual resulta na liberação do C-terminal truncado com um produto de 22 kDa (NESTOROWICZ et al., 1994). A NS2B, uma proteína de 14 kDa, tem em seu N-terminal um cofator da serina protease ligado à tripsina e forma um complexo estável com a NS3 (CHAMBERS et al., 1993). Segundo Lindenbach e Rice (1999), NS1 e NS4A possuem interações gênicas vírus específicas. Estudos com mutantes mostraram que a inserção da mutação adaptativa em NS4A-N42Y trata-se de uma região putativa, em alfa-hélice, envolvida diretamente na interação com NS1. Mutantes que possuem essa mutação aumentaram a capacidade de replicação e expressão de NS1 de DENV, dentro do genoma de YFV17D.

A NS3 apresenta um peso molecular de 69 kDa, com um total de 618 a 623 aminoácidos altamente conservados na maioria dos flavivírus. Possui atividades enzimáticas multifuncionais, tais como serina protease, NTPase e RNA helicase trifosfatase (TEO E WRIGHT, 1997; ROEHRIG, 1997). A atividade protease é localizada na porção N-terminal, exigindo como cofator a proteína NS2B e atua também no processamento da poliproteína precursora em proteínas maduras, junto com proteases celulares (MURTHY et al., 2000). As atividades NTPase e

RNA helicase trifosfatase residem na porção C-terminal da proteína e são essenciais para a replicação do genoma viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A proteína NS4 é clivada, transformando-se em NS4A e NS4B, com peso molecular de 16 kDa para a NS4a e 28 kDa para a NS4B (Roehrig, 1997). Estudos indicam o envolvimento da NS4A na replicação do genoma viral através da interação com a proteína NS1 (LINDENBACH E RICE, 2007; LINDENBACH E RICE, 1999). NS4B também aparenta estar envolvida na replicação, por se apresentar junto ao sítio possivelmente envolvido na replicação do RNA viral (WESTAWAY et al., 1987).

A proteína NS5 (104 a 106 kDa) possui 900 aminoácidos e é a proteína mais conservada dos flavivírus. Acredita-se que possua função de RNA polimerase dependente de RNA, pois possui o motivo ácido aspártico glicina-glicina no qual está presente em todas as RNA polimerases dependentes de RNA (TAN et al., 1996). No N-terminal da NS5 há uma sequência homóloga a 2'O-metiltransferase, sendo esta provavelmente envolvida na metilação da estrutura 5' cap RNA (BALEOTTI, 2008; KOONIN, 1993; KÜMMERER, 2006; PUIG-BASAGOITI, 2006).

2.3 Ciclo replicativo dos *Flavivirus*

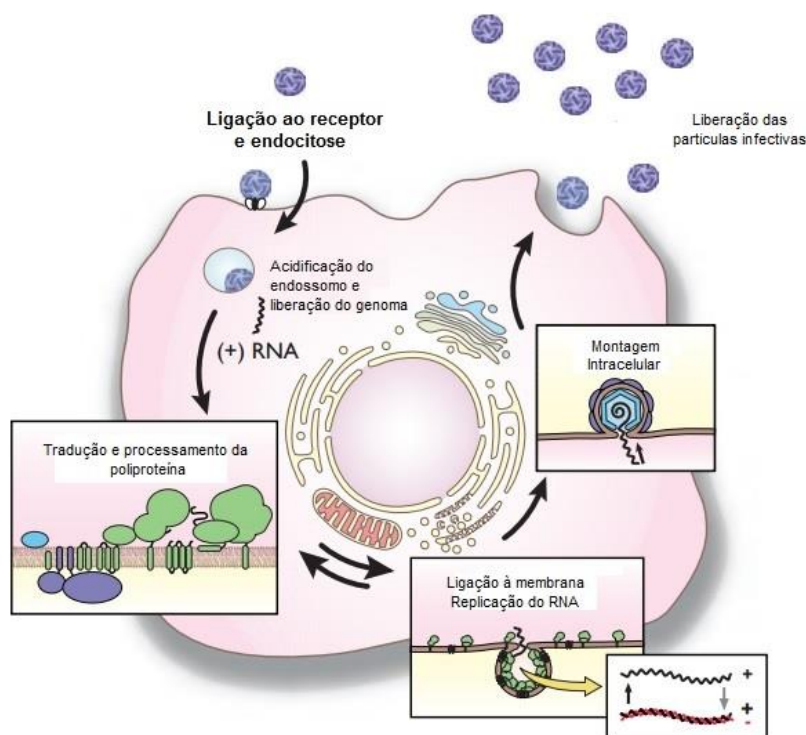
O ciclo replicativo dos flavivírus inicia-se quando o vírus entra na célula do hospedeiro após a interação da proteína E com o receptor na superfície celular, e ocorre a internalização via endocitose mediada por receptor (GARDNER E RYMAN, 2010). Um rearranjo conformacional de E ocorre no ambiente do endossomo num pH baixo, o qual facilita a fusão do envelope lipídico viral com a membrana endossomal e liberação do nucleocapsídeo dentro do citoplasma celular.

Com a liberação do nucleocapsídeo, há a tradução imediata do RNA viral, gerando uma poliproteína que é posteriormente processada por proteases virais e celulares. A tradução dos flavivírus é dependente de cap e é iniciada num códon AUG próximo à extremidade 5' do genoma. O processo de tradução e de replicação do genoma dos flavivírus ocorre em associação a estruturas

intracelulares membranas, derivadas do retículo endoplasmático (RE) (MACKENZIE, 2005).

Após a tradução, inicia-se a replicação do genoma viral com a síntese do genoma em fita RNA negativa, o qual serve como fita molde para a síntese da fita de RNA positiva. A síntese do RNA viral é assimétrica, com um acúmulo momentâneo de 10 vezes mais de fitas positivas em relação às negativas. Os RNAs de fita positiva produzidos podem ser utilizados para um novo ciclo de tradução ou serem empacotados pelas proteínas estruturais. A formação das partículas virais ocorre no lúmen do RE e a maturação dessas partículas virais ocorre via complexo de Golgi, local de clivagem da proteína prM em M (YU, 2008). A liberação de partículas maduras ocorre através da membrana celular hospedeira por exocitose (Figura 3) (PASTORINO et al., 2010).

Figura 3- Ciclo replicativo dos flavivírus. Após a interação da proteína E no receptor celular, a partícula vírica é internalizada por endocitose. O endossomo sofre acidificação e o genoma viral é liberado no citoplasma. Imediatamente há o início da replicação viral e produção de fitas negativas e positivas. O ciclo segue com a montagem do vírion através de organelas como o retículo endoplasmático e o complexo de golgi. O vírion é liberado por exocitose, aonde adquire o envelope. O rearranjo da prM em M confere ao vírion infecciosidade. Fonte: Adaptado de Lindenbach et al. 2013).



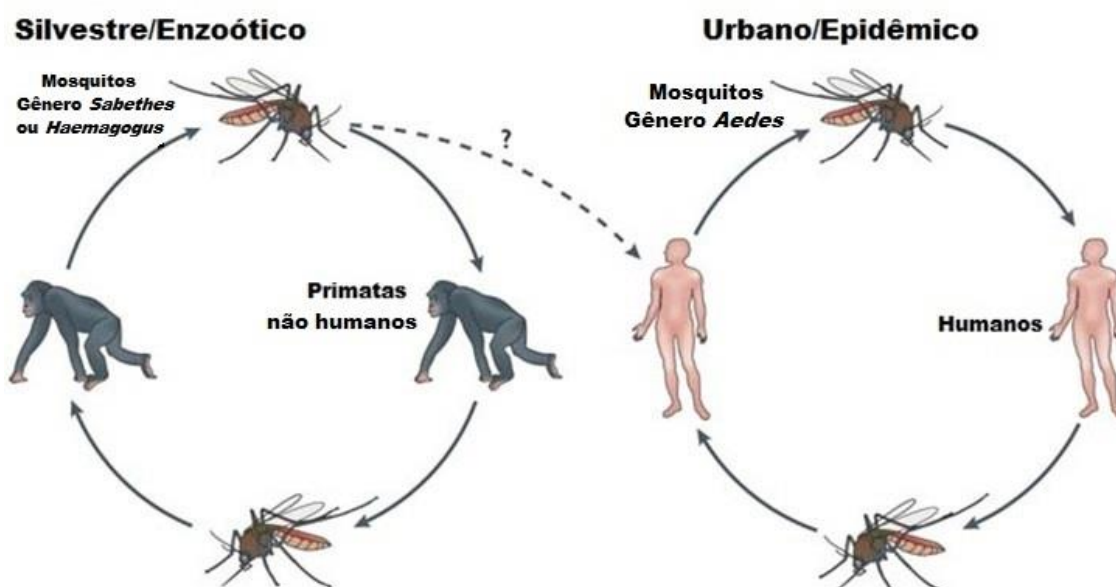
2.4 Aspectos epidemiológicos do vírus da febre amarela (YFV)

Desde meados de 1600 ao início do século 20, o YFV foi responsável por numerosas epidemias nas Américas, África e algumas partes da Europa, com casos fatais em mais de 20% (BEASLEY et al., 2015). O vírus da febre amarela ainda representa uma grande ameaça em 45 países endêmicos, 32 na África e 13 na América Central e do Sul, onde ao todo quase 900 milhões de pessoas estão em risco (WHO, 2013).

A transmissão do YFV pode ocorrer em áreas urbanas (homem-mosquito-homem), silvestres (primatas não humanos-mosquito-primatas não humanos) e rurais (regiões entre áreas de vegetação nativa e áreas de agricultura em expansão) (Figura 4).

Figura 4- Ciclo de transmissão da febre amarela. O ciclo silvestre se restringe ao ambiente de matas e envolve primatas não humanos e mosquitos do gênero *Sabethes* ou *Haemagogus*. No ciclo urbano os humanos são infectados ocasionalmente por mosquitos silvestres, que ao desenvolver viremia, pode infectar mosquitos do gênero *Aedes* e instalar um ciclo em perímetro urbano.

Fonte: Adaptado pela autora de Whitehead; Durbin; Murphy (2007).



No ciclo urbano, o vírus é transmitido de homem a homem pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* infectada pelo YFV. Neste ciclo não há

participação de animais domésticos na manutenção viral, apenas o homem é o hospedeiro responsável pela infecção dos mosquitos. Em geral, também é o homem que introduz o vírus numa área urbana. Uma vez introduzido o vírus no ambiente urbano, o paciente infectado desenvolverá viremia, podendo expressar a doença e servir de fonte de infecção a novos mosquitos. Assim, o ciclo se perpetua, até que se esgotem os suscetíveis ou se realize vacinação em massa da população para bloquear a transmissão (BEASLEY et al., 2015; VASCONCELOS, 2003).

Já o ciclo silvestre é mais complexo, pois a transmissão se processa entre primatas não humanos (macacos) e mosquitos silvestres. A transmissão transovariana do vírus no próprio mosquito ocorre tanto no ciclo silvestre, quanto no ciclo urbano. Esses mosquitos vivem habitualmente nas copas das árvores. Na América do Sul, os principais mosquitos transmissores da febre amarela silvestre são os pertencentes aos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (BEASLEY et al., 2015). Todos os gêneros de macacos do Novo Mundo são susceptíveis ao vírus da febre amarela e podem, portanto, atuar como hospedeiros deste arbovírus, pois são basicamente arborícolas e habitam o mesmo extrato arbóreo que o mosquito vetor. Os macacos que mais têm sido associados com a ocorrência de epizootias no Brasil são do gênero *Alouatta*, *Cebus* e *Callithrix*. Há evidências de participação de outros hospedeiros, como marsupiais, quando não há disponibilidade de primatas não humanos na região (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A febre amarela silvestre ocorre acidentalmente pela penetração do homem no ciclo enzoótico natural. Esta forma epidemiológica da doença é uma séria ameaça às populações rurais e um risco permanente para a introdução do vírus nas grandes cidades e pequenas localidades, infestadas pelo *Aedes aegypti* (BEASLEY et al., 2015). Assim, se um indivíduo que foi infectado na floresta por mosquitos silvestres chegar a um local infestado por *Aedes aegypti*, durante o período de viremia, pode iniciar um surto de febre amarela urbana (SANTUCCI, 2008).

A febre amarela pode ser definida como uma doença infecciosa viral aguda de curta duração e de gravidade variada, podendo ocorrer em formas oligossintomáticas, até formas fulminantes, em que os sintomas clássicos de icterícia, albuminúria e hemorragias estão presentes. O período de incubação

compreende 3 a 6 dias e é seguido pelo surgimento abrupto dos sintomas (BEASLEY et al., 2015). Casos em humanos ocorrem quando há exposição ao ciclo silvestre e quando há mobilidade desses humanos para regiões de alta densidade humana o risco de início de uma epidemia é bastante alto, e que no caso, ocorre de pessoa a pessoa (ciclo de transmissão urbana) através do vetor *Aedes aegypti* (SALL et al., 2010).

As únicas formas de evitar a febre amarela são a vacinação contra a doença, a educação da população para o controle do vetor e a conscientização sobre sua responsabilidade na prevenção da doença (VASCONCELOS, 2003). No Brasil, desde 1937, a vacina é produzida pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos (Fiocruz), utilizando-se a cepa 17DD e é indicada para todas as pessoas que vivem ou se dirigem para áreas nacionais de risco da doença (Região Norte, Centro Oeste, estado do Maranhão, parte dos estados do Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), onde há casos da doença em humanos ou circulação do vírus entre animais (macacos) e para algumas áreas internacionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

2.5 Aspectos epidemiológicos do vírus da Encefalite São Luís (SLEV)

O SLEV originou-se na América Central (KOPP et al., 2013). Mas está, atualmente, amplamente difundido nas Américas, encontrando-se do Canadá à Argentina. Há uma maior virulência em cepas isoladas nos Estados Unidos e no Canadá do que nas isoladas no Caribe e nas Américas Central e do Sul (SVOBODA et al., 2014). No Brasil, foi primeiramente isolado de um *pool* de *Sabethes belisarioi* coletados na Rodovia Belém-Brasília nos anos 60 (THEILER E DOWNS, 1973), desde então já foram relatados casos em humanos (ROCCO et al., 2005; TERZIAN et al., 2011) e em equinos (PAUVOLID-CORREA et al., 2010;2011; RODRIGUES et al., 2010; ROSA et al., 2013). Foram isoladas três cepas do sangue de pacientes sem sintomas neurológicos, duas de pacientes que apresentavam febre e icterícia (Estado do Pará) e uma de um paciente com suspeita de dengue (Estado de São Paulo) (PINHEIRO et al, 1981; VASCONCELOS et al., 1998).

É um vírus geneticamente relacionado ao vírus do Oeste do Nilo (*West Nile virus* – WNV), introduzido nos Estados Unidos em 1999 e que, rapidamente, se expandiu em direção ao sul das Américas (ROCCO, 2005; MATTAR et al., 2011; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2013; 2014).

O SLEV tem como hospedeiros reservatórios pássaros silvestres, marsupiais, preguiças, tatus e primatas, mas o homem é um hospedeiro acidental, não sendo responsável pela propagação da doença, pois os mosquitos infectados no repasto não atingem níveis virêmicos capazes de torná-los competentes para haver transmissão (FIGUEIREDO, 2000; PIERSON E DIAMOND, 2013). O ciclo é mantido pela infecção mosquito-ave-mosquito, com amplificação periódica de aves peri-domésticas e culicídeos da espécie *Culex*. As aves como pardais, pombos, gralhas azuis e robins desenvolvem formas inaparentes, mas com nível virêmico suficiente para infectar mosquitos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010). Em 2014, aves, da espécie *Zenaida auriculata*, foram apontadas como hospedeiras competentes do SLEV na cidade de Buenos Aires (Argentina), onde foram capturados mosquitos da espécie *Culex pipiens* e *Culex spp.*, positivos em testes sorológicos para o SLEV (BELTRÁN et al., 2014).

Equinos são hospedeiros terminais de arbovírus causadores de encefalite, mas não apresentam viremia elevada ou quadro clínico quando infectados com SLEV, através de repasto sanguíneo por culicídeos ou via inoculação subcutânea (REISEN, 2003; VASCONCELOS et al, 1998). Apesar de anticorpos contra o SLEV terem sido detectados em equinos infectados naturalmente, não há dados suficientes a respeito do real papel desses animais no ciclo de transmissão do SLEV na natureza (MARLENEE et al. 2004; METTLER et al., 1985). Apesar disso, têm sido utilizados como sentinelas e vem ajudando a comprovar a circulação do SLEV em vários países da América do Sul. Em 2011, foram relatadas as primeiras evidências de circulação do SLEV na Colômbia, com a detecção de 14 soros de equinos positivos para este flavivírus (MATTAR et al, 2011). Em 2012, nove amostras de soros de equinos, de um total de 74, provenientes da província de Santa Fé (Argentina), foram positivas no PRNT para o SLEV (TAURO et al., 2012). Em 2013, houve um relato de isolamento do SLEV proveniente de um cérebro de um cavalo com distúrbios neurológicos no Estado de Minas Gerais (ROSA et al., 2013) e evidências sorológicas foram encontradas em amostras de

equinos dos Estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Rio de Janeiro e São Paulo (SILVA et al., 2013).

O SLEV ocasiona esporadicamente casos graves, em humanos, de doenças neurológicas agudas no centro-oeste, sudoeste e ocidente dos Estados Unidos, sendo endêmico nesta região (MONATH, 2004). A encefalite é uma das mais graves manifestações clínicas de infecções por arbovírus, e pode levar à morte ou deixar sequelas graves, que se caracterizam por disfunção motora residual e/ou psicológica nos sobreviventes (RODRIGUES et al., 2010). Para o diagnóstico é preciso testes sorológicos específicos e sensíveis, pois há um risco de reação cruzada com anticorpos entre flavivírus. Em 2006, em São José do Rio Preto, houve um grande número de pessoas (cerca de 15.000 pessoas) doentes que foram diagnosticadas com infecção pelo vírus dengue, sorotipo 3, mas que na verdade também foram infectadas pelo SLEV (MONDINI, 2007; PIERSON E DIAMOND, 2013).

2.6 Aspectos epidemiológicos do vírus Ilhéus (ILHV)

O ILHV foi primeiramente isolado em 1944 de mosquitos *Aedes sp.* e *Psorophora sp.* capturados na cidade de Ilhéus na costa oriental do Brasil (CALISHER, 1989). Há diferentes vetores artrópodes capazes de transmitir a doença de ocorrência em todo o Brasil, mas estima-se que o mais importante deles seja o mosquito *Psorophora ferox*. Na Amazônia brasileira, o vírus tem sido isolado de pacientes febris, de macacos sentinelas, de morcegos e de diversas espécies de mosquitos (AZEVEDO, 2010). Aves silvestres têm sido implicadas como prováveis hospedeiros vertebrados do vírus, contudo foram também encontrados anticorpos ou se isolou o vírus de outros vertebrados, como roedores, marsupiais, desdentados, morcegos e macacos (DÉGALLIER, 1992). A doença em humanos usualmente é encontrada em casos esporádicos, associados a exposições em regiões de floresta, mas estudos mostram uma prevalência contra o ILHV mostrando que a maioria dos casos se dá em formas inaparentes ou oligossintomáticas. Em humanos, causa dor de cabeça severa, calafrios, mialgia, podendo apresentar suave síndrome encefalítica (NASSAR et al., 1997). Recentemente foi encontrada uma prevalência de anticorpos

neutralizantes para ILHV, SLEV, Cacipacoré e WNV em cavalos e mosquitos coletados no Pantanal brasileiro, mostrando a importância médica deste arbovírus na região de estudo (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2013; 2014). Em 2014, Plautino e colaboradores relataram a presença de anticorpos para ILHV, SLEV e ROCV em macacos-prego da espécie *Cebus libidinosus*, de cativeiro do Nordeste do Brasil, estudados durante os anos de 2008 e 2010. Os 100 soros analisados, por inibição da hemaglutinação (HI), demonstraram uma positividade de 46%.

2.7 Aspectos epidemiológicos do vírus Rocio (ROCV)

O vírus Rocio (ROCV) foi isolado de um caso humano fatal, em 1975, durante uma epidemia de encefalite nos municípios Peruíbe, Itanhaém e Mongaguá, na costa sul do Estado de São Paulo, Brasil (LOPES, 1978). A letalidade foi de 10% e a incidência de sequelas definitivas ficou em torno de 20% dos casos, tais como distúrbios olfativos e auditivos (Iversson; Tiriba, 1991). Assim como o ILHV, o ROCV não foi classificado, inicialmente, em nenhum dos complexos antigênicos dos flavivírus, mas possui reação cruzada com a maioria dos membros do subgrupo JE, especialmente o ILHV. Uma teoria afirma que o seu aparecimento súbito foi devido a uma mutação em uma cepa do ILHV. Ainda não há trabalhos que identifiquem a origem dos ROCV e ILHV, mas um estudo filogenético baseado numa sequência parcial do gene NS5 revelou uma relação mais estreita entre o ROCV e ILHV, e mais distinta do complexo JE (KUNO, 1998). Em testes sorológicos o ROCV apresenta relacionamento antigênico com outros flavivírus especialmente com ILHV, SLEV, JE e encefalite do Murray Valley (MVE) (KARABATSOS, 1985).

Muitos aspectos epidemiológicos do ROCV permanecem desconhecidos, e os fatores que o fizeram aparecer e desaparecer do litoral sul do Estado de São Paulo permanece um mistério. Estudos sorológicos sugerem a participação de aves silvestres no ciclo de transmissão do ROCV, uma vez que já foi isolado da espécie *Zenothrichia capensis*, podendo se tratar de um potencial reservatório. O ROCV também foi isolado do culicídeo *Psorophora ferox* e do *Aedes scapularis* (FIGUEIREDO, 2000). A transmissão do vírus foi associada ao contato contínuo do homem com o ambiente de florestas e a maioria dos casos foram observados

em jovens do sexo masculino em idade produtiva (15 - 30 anos) que foram envolvidos em atividades agrícolas (COIMBRA, 2008). Em 1995, casos de infecções em humanos pelo ROCV foram novamente relatados e novas epidemias tem grande probabilidade de ocorrer (STRAATMANN,1997). Recentemente, Silva e colaboradores (2013) relataram a presença de anticorpos neutralizantes para o ROCV em soros de equinos de diversos Estados brasileiros (Mato Grosso do Sul, Paraíba, Rio de Janeiro e São Paulo). O mesmo foi relatado por Pauvolid-Corrêa e colaboradores (2014) em amostras de equinos de sub-regiões do Pantanal brasileiro.

2.8 Aspectos epidemiológicos do vírus Oeste do Nilo (WNV)

Primeiramente isolado, em 1937, de um paciente com síndrome viral na província do Oeste do Nilo, na Uganda (GUBLER, 2007). Recentemente endêmico no hemisfério ocidental, o WNV é agrupado em duas linhagens (1 e 2) de acordo com a sequência de nucleotídeos da proteína E que pode apresentar deleções ou mutações que geram mudanças em aminoácidos. A linhagem 1 está associada a doenças em humanos e a 2 está restrita a infecções endêmicas zoonóticas na África (BRINTON, 2013). O WNV é transmitido no ciclo natural entre mosquitos do gênero *Culex* (vetor) e pássaros silvestres (hospedeiro amplificador). Adicionalmente aos pássaros, o WNV vem ocasionando doença e/ou morte em mais de 30 espécies de hospedeiros (acidentais e/ou terminais) vertebrados incluindo humanos, equinos, felinos, caninos, ungulados, roedores, morcegos e crocodilos (HAYES, 1988; GUBLER, 2007).

No continente americano o WNV foi isolado em 1999, em Nova Iorque-EUA, ocasionando 62 casos humanos confirmados e sete mortes naquele ano. No mesmo período houve uma extensa mortalidade em pássaros na mesma área geográfica (BLITVICH et. al., 2003B). A migração dos pássaros desloca o vírus do norte para o sul, logo a mobilidade do vírus se deu para o sul do continente, com relatos de infecções em pássaros e equinos no Caribe, Venezuela, Colômbia e Argentina (DIAZ et al., 2008; BERROCAL et. al., 2006; KOMAR E CLARK, 2006; MORALES, 2006; BOSCH et. al., 2007). O monitoramento da mortalidade de aves silvestres é um método eficaz aplicado na vigilância da introdução do WNV, ao longo do território dos EUA (EIDSON et al., 2001; WARD, 2005).

Equinos expostos a numerosas picadas de mosquitos, por sua sensibilidade aos flavivírus, vêm sendo utilizados como sentinelas para a atividade local de arbovírus, no qual podem ser detectados por triagem sorológica através da detecção de anticorpos vírus-específicos (DAVIDSON et al., 2005). Na Colômbia, foram relatados 32 casos de equinos soropositivos para WNV, entre 2006/2007 (MATTAR et al., 2011). Em 2012, na província de Santa Fé (Argentina) foram encontrados 12 equinos soropositivos para WNV de um total de 74 amostras de soro coletadas. Neste mesmo espaço amostral, houve 36 amostras positivas para o WNV e o SLEV simultaneamente (TAURO et al, 2012). No Brasil, no Estado da Paraíba e no pantanal brasileiro, foram recentemente relatados a presença de anticorpos neutralizantes contra o WNV em amostras de equinos (SILVA et al., 2013; PAUVOLID-CORRÊA, 2011; 2014). Em 2014, houve o primeiro relato de caso humano no Estado do Piauí, no Nordeste brasileiro. O paciente ficou sobre vigilância de agosto a novembro, quando saiu a confirmação por testes laboratoriais (WHO, 2014).

Pertencente ao sorogrupo do JEV, o WNV está intimamente relacionado a outros flavivírus como o SLEV e ROCV (BLITVICH et. al., 2003B; GUBLER, 2007). O período de incubação pode variar de 2 a 14 dias e os sintomas variam de casos assintomáticos a casos febris, parecido com a febre da dengue. Em 1% dos casos o vírus causa doença neuroinvasiva. As manifestações clínicas são variadas, tais como febre, dor de cabeça, “rash”, fadiga, mialgia, artralgia e, raramente, hepatite aguda, encefalite e meningite (BLITVICH et. al., 2003B).

2.9 Diagnóstico Diferencial em Flavivírus

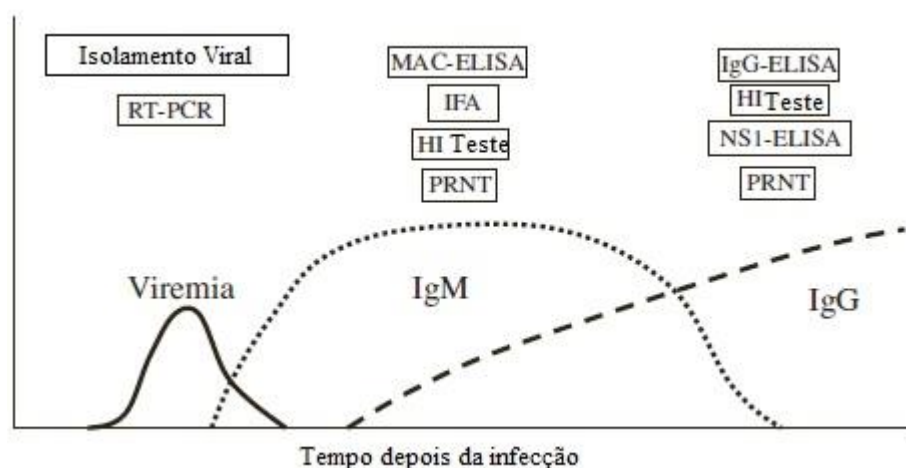
Devido ao grande impacto das flavivirose na saúde pública mundial é de suma importância o desenvolvimento de testes diagnósticos para esses vírus. Diversos testes moleculares e sorológicos têm sido utilizados para a detecção dos flavivírus. Em geral, os testes de diagnóstico mais utilizados são o isolamento viral, os moleculares como a transcrição reversa através da reação da cadeia da polimerase (RT-PCR) ou RT-PCR em tempo real e ainda os testes sorológicos como o ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de fixação do complemento, teste de inibição de hemaglutinação (HI) e testes de neutralização (PRNT). Os três

primeiros testes sorológicos são vantajosos por ser possível o uso de antígenos inativados, facilitando o manejo de flavivírus em nível de biossegurança (NB) 2 ao invés de NB3, porém muitas vezes resultam em reação cruzada de anticorpos entre as diferentes flavivirose. Esse fato é mais agravante quando múltiplos flavivírus coexistem em uma determinada região. Nos Estados Unidos o WNV e o SLEV coexistem e no Brasil o ILHV, SLEV, ROCV, YFV, DENV 1, 2, 3 e 4 e ainda, recentemente, o WNV (FIGUEIREDO, 2000; OLIVEIRA, 2011; PAUVOLID-CORRÊA et al, 2011; 2014).

No estágio inicial da infecção, os flavivírus replicam dentro de células dendríticas infectadas e desenvolvem viremia. Durante esse estágio, o RNA viral pode ser detectado por meio da RT-PCR e ainda pode-se isolar o vírus em cultura de células (MAEDA E MAEDA, 2013). Após os primeiros sinais clínicos da doença ocorrem, como resposta a infecção viral a produção de imunoglobulinas (Ig) M, seguida da IgG. Para o sorodiagnóstico nessa fase inicial, pode ser utilizado o ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgM (MAC-ELISA) para capturar IgM, o teste de inibição por hemaglutinação (HI) ou o PRNT usando flavivírus vivos. Para estágios mais tardios de infecção, a resposta é o desenvolvimento de anticorpos IgG, persistindo em animais infectados (Figura 5).

Figura 5- Esquema do curso do tempo e a produção de anticorpos após a infecção por flavivírus e quais as opções de protocolos de diagnóstico utilizar. Nos dias iniciais pós-infecção (período de viremia) os testes moleculares são os mais indicados ou o próprio isolamento viral. Após 6 dias de infecção (período de convalescência) os testes sorológicos para detecção de IgM (Mac-ELISA) são os mais utilizados. Outros métodos utilizados são: IFA, HI ou o PRNT. Com mais de 15 dias de infecção, os níveis de IgM diminuem e IgG aumentam, por isso os métodos sorológicos de detecção de IgG são os mais indicados. Outros métodos utilizados são o HI, IgG-ELISA, NS1-ELISA ou o PRNT.

Fonte: Maeda e Maeda (2013).



Para a detecção de IgG utiliza-se IgG-ELISA, teste HI e PRNT, teste NS1-ELISA e teste rápido de pesquisa de antígenos NS1 por cromatografia (CORDEIRO, 2012; GUBLER et al., 2007; MAEDA E MAEDA, 2012). A pesquisa de IgM e IgG ainda pode informar se a infecção foi primária (altos níveis de IgM após cinco dias de infecção e baixos níveis de IgG ou inexistente) ou secundária (altos níveis de IgG após sete dias de infecção e baixos níveis de IgM) (CORDEIRO, 2012). O MAC-ELISA é também o mais utilizado na fase convalescente (6 a 14 dias pós-infecção) por ser mais sensível, mas é o menos específico e demonstra ainda dificuldade na distinção entre infecções por flavivírus (HOGREFE et al., 2004). Para detectar IgG em amostras de soros, um ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) ou ELISA direto ou indireto são geralmente utilizados (FORAL et al., 2007; MALAN et al., 2003). Como a especificidade é baixa nesses testes, há a necessidade de outro teste confirmatório, geralmente usa-se o PRNT, por ser o mais específico.

O teste HI é um teste clássico utilizado para diagnóstico e classificação de flavivírus (NAGARKATTI E NAGARKATTI, 1980). Quantifica a quantidade total de anticorpos (IgM e IgG) e a base do teste se dá através da inibição da aglutinação de eritrócitos, induzida pelo vírus. Não é espécie-específico e pode ser utilizado para soro de qualquer animal. Outra vantagem é que não é necessária a utilização de nenhum anticorpo ou equipamento de alto custo. Porém, é um ensaio de um alto índice de reação cruzada entre os diferentes flavivírus, exceto da infecção primária (MAEDA E MAEDA, 2013).

O PRNT é o padrão-ouro para diagnóstico diferencial de flavivírus. As desvantagens estão relacionadas ao tempo e o custo, já que leva em torno de 7 dias para se obter o resultado e ainda requer um profissional altamente treinado e capaz de interpretar corretamente os resultados. Além do custo que é alto, o PRNT requer a utilização de vírus vivos e, dependendo do vírus, é necessário a utilização de um nível de biossegurança 3, tais como para o diagnóstico do WNV, SLEV, ROCV (CORDEIRO, 2012; MAEDA E MAEDA, 2013; ROEHRING et al., 2008). Num protocolo clássico de PRNT, as amostras de soro são serialmente diluídas e misturadas com um número fixo de vírus vivo. Se a amostra contém anticorpos neutralizantes (inibem a infecção em células susceptíveis) os anticorpos ligam-se ao vírus e formam complexos vírus-anticorpo. A mistura é então aplicada em monocamadas de células, para se quantificar o número da diluição capaz de neutralizar o vírus. A porcentagem de redução em número de placas na amostra testada é comparada ao controle (vírus não exposto a nenhum anticorpo contra ele). Utiliza-se geralmente um fator de 50 a 90% de redução no número de placas, devendo ser usado como o título do PRNT. Não há um consenso sobre a redução do número de placas (%), mas há um guia do procedimento para uma tentativa de padronização da técnica (MAEDA E MAEDA, 2013; ROEHRING et al., 2008)

2.9.1 O uso da genética reversa viral para o desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico diferencial de flavivírus

O estudo dos flavivírus foi grandemente beneficiado com o uso de sistemas de genética reversa, quando se apresentou o primeiro estudo com o YFV em 1989 (Aubry et al., 2015). Desde então, várias tecnologias vem sendo

desenvolvidas para diversos enfoques de estudo do gênero Flavivirus, inclusive o uso de vírus quiméricos para vacinas e diagnóstico diferencial. Para vacinas, o desenvolvimento das quimeras se baseia na observação que há equivalência entre os genes estruturais de alguns flavivírus, sem necessariamente haver uma modificação na capacidade replicativa do vírus recombinante (quimérico) criado. Esta estratégia confere longo período de proteção imune contra patógenos usando uma cepa vacinal como vetor suporte (*backbone*). As proteínas prM e E contém críticos antígenos determinantes que induzem anticorpos neutralizantes protetores (AUBRY et al., 2015; BRAY E LAI, 1991).

A necessidade do desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico de flavivírus manipulável em nível menor de biossegurança (NB2) levou a criação de novas tecnologias, tais como a construção de vírus quiméricos, pois flavivirose podem ser altamente patogênicas para humanos e no caso de infecções acidentais, podem causar sérios danos à saúde do operador do teste. Alguns protocolos utilizando vírus quiméricos vêm sendo desenvolvidos para diagnóstico diferencial e vacinas para WNV, SLEV, JEV e DENV (PUGACHEV et al., 2004; JOHNSON et al., 2009). A plataforma ChimeriVAX foi desenvolvida para flavivírus por Acambis (MONATH et al., 2002). A tecnologia da vacina se baseia na cepa vacinal do YFV17D geneticamente modificada (YF-VAX). O YFV serve de vetor suporte para a troca das proteínas estruturais prM e E do YFV pelas de outros flavivírus, como o WNV, dando origem ao vírus quimérico ChimeriVAX-WNV (MAEDA E MAEDA, 2013).

O uso de vírus quiméricos em protocolos de sorodiagnóstico é vantajoso devido à possibilidade de manipulação em NB 2, por serem fenotipicamente similares ao vírus parental YFV, embora são específicos para as proteínas heterólogas (prM e E) inseridas. Títulos de PRNT utilizando ChimeriVAX-DENV1, -DENV2, -DENV3, -DENV4, -JEV, -WNV, -SLEV foram semelhantes aos obtidos quando utilizou-se vírus selvagens (PUGACHEV et al., 2004; JOHNSON et al., 2009).

No presente estudo, é proposto o estabelecimento de uma plataforma de diagnóstico baseada na utilização de três quimeras, tendo como vetor suporte a cepa vacinal 17D do vírus da febre amarela. Estas quimeras foram construídas através da substituição das proteínas estruturais (prM/E) do YFV17D pelas dos vírus SLEV, ILHV, ROCV e WNV, mantendo deste modo toda a maquinaria

replicativa do vírus da febre amarela 17D. Posteriormente, para a triagem de soros, foi padronizado um teste de captura de anticorpos IgM e IgG contra o WNV. E para o diagnóstico diferencial, as amostras positivas foram validadas por PRNT, utilizando os vírus quiméricos construídos e adicionalmente os vírus YFV17DD e DENV2.

2.10 Tratamento de Flaviviroses

Atualmente não existe terapia antiviral específica para infecção por flavivírus em humanos. Há a prevenção de algumas infecções em humanos com as vacinas licenciadas para YFV, JEV e vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV) (HEINZ E STIASNY, 2012). A vacinação contra o YFV utiliza o vírus atenuado e continua sendo a forma mais efetiva de prevenção contra a doença. O tratamento é apenas sintomático e requer cuidados na assistência ao paciente que, sob-hospitalização, deve permanecer em repouso com reposição de líquidos e das perdas sanguíneas, quando indicado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Um agente antiviral ideal não deve interferir nos mecanismos de defesa celular contra a infecção viral, mas sim deve complementar a imunidade celular e a resposta humoral de anticorpos para deter a reprodução viral. A substância antiviral deve reunir diversas características como: apresentar grande espectro de atividade antiviral; ter potência suficiente para a completa inibição da replicação viral, pois inibição incompleta pode apenas prolongar a doença; ter propriedades farmacocinéticas favoráveis para reagir apenas no órgão alvo aonde a infecção viral pode estar localizada (SIMONI, 2003). Alguns antivirais vêm sendo testados e mostram certa eficácia contra alguns flavivírus.

A Ribavirina (1- β -D-ribofuranosil-1H-1, 2,4-triazole-3-carboxamida), descoberta em 1970 é considerada um dos mais importantes compostos na história da pesquisa de drogas antivirais, é uma purina com um amplo espectro de atividade contra uma variedade de vírus de DNA e RNA (MONATH, 2008). Foi primeiramente aprovada para uso em seres humanos no tratamento do vírus sincicial respiratório, também é utilizada em casos de febre Lassa (MCCORMICK et al. 1986). A ribavirina é um nucleosídeo análogo, cujo mecanismo de ação inclui a inibição da inosino monofosfato desidrogenase (IMPDH), requerido para a

síntese de novas guaninas, fundamental na replicação viral (GHOSH E BASU, 2008). Posteriormente, diversos outros mecanismos foram descritos sobre atividades antivirais da ribavirina, tais como: inibição da guanililtransferase do vírus Vaccinia pela ribavirina 5'-trifosfato (TP) (BOUGIE E BISAILLON, 2004), da RNA polimerase dependente de RNA do vírus da Influenza (ERIKSSON, 1977) e da helicase do reovírus (RANKIN, 1989).

Em 1970, houve o início da utilização do interferon (IFN) em ensaios clínicos em humanos, utilizando o IFN proveniente de leucócitos humanos. Sua produção em larga escala comercial avançou com o advento da tecnologia do DNA recombinante, onde o IFN passou a ser produzido por expressão protéica em *Escherichia coli*. O IFN- α humano é produzido sinteticamente, dando origens às variáveis IFN- α -2a e IFN- α -2b, aparentemente com eficácias semelhantes. Podem ser utilizados no tratamento de várias doenças: Hepatites B e C, leucemias, linfomas, melanomas e carcinoma de células renais. O IFN, em certos casos, pode suprimir a replicação do RNA do vírus da Hepatite C (HCV) para níveis indetectáveis. Além disso, o IFN pode normalizar os níveis séricos de amino-transferase. Mas, infelizmente, devido principalmente a mutações virais o efeito do IFN é temporário e uma resposta sustentada ocorre em apenas 8% a 9% de pacientes cronicamente infectados com HCV. Além disso, a maioria dos pacientes tem dificuldade para tolerar o tratamento com interferon (GARY, 2000).

A droga Bal-apiravir desenvolvida pela ROCHE vem sendo testada para eficácia em pacientes infectados pelo DENV, mas não vem demonstrando sucesso na redução da viremia ou duração da febre (NGUYEN et al., 2012). Alguns ensaios clínicos vêm sendo feitos para agentes efetivos contra flavivirose encefálicas, incluindo WNV e JEV (JULANDER, 2013). Nucleosídeos trifosfatados como o ácido micofenólico, pirazofurina, 2-thio- azauridina e o ciclopentenilcitosina foram descritos por possuírem uma ação inibitória contra o WNV (RAY E SHY, 2006). A Tiazofurina (2- β -D-ribofuranosilthiazole-4-carboxamida), um análogo sintético da ribavirina, é um inibidor inosina monofosfato desidrogenase, utilizado nos últimos estágios da leucemia. Esse composto foi testado em macacos rhesus infectados com YFV Dak 1279 e tratados com altas doses de tiazofurina (1100 mg/m²), mas não foi obtido sucesso (MONATH, 2008).

Drogas derivadas de alcalóides isoquinolonas, extraídos ou sintetizados da Amaryllidaceae, apresentaram boa atividade antiviral *in vitro*. Foram testadas as atividades antivirais de 18 alcalóides isoquinolínicos (de origem natural e sintética) contra vírus das famílias *Flaviviridae* e *Bunyaviridae* (GABRIELSEN, 1992). Brequinar, um análogo do ácido quinolinocarboxílico sintético, é um agente antiviral capaz de inibir o YFV e o DENV, em estudos *in vitro* (QUING et al., 2010). O composto Triaryl pyrazoline {[5-(4-chloro-phenyl)-3-thiophen-2-yl-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-phenyl-methanone}, em cultivos celulares, apresentou atividade antiviral para o vírus Oeste do Nilo, vírus dengue, vírus encefalite São Luís, vírus febre amarela e outros vírus com genoma de RNA. Relata-se que sua ação está na inibição da replicação viral e não na prevenção da entrada do vírus ou formação e liberação da partícula viral, porém estudos *in vivo* ainda devem ser realizados (PUIG-BASAGOITI, 2006; GOODELL, 2006).

2.10.1 O uso da genética reversa viral para o desenvolvimento de ferramentas para a triagem, em larga escala, de antivirais contra flavivírus

O sistema de genética reversa em vírus tem se mostrado uma potente ferramenta para investigações sobre o ciclo replicativo viral; papel das proteínas virais na patogenicidade; avaliação da função das proteínas virais no sistema imune do hospedeiro; desenvolvimento de vacinas; empacotamento do vírus e liberação da partícula viral (ZABEREZHNYI, 2004). O estudo dos flavivírus foi revolucionado com a utilização da genética reversa, já que possibilitou a manipulação do genoma e avaliação dos efeitos diretos das mudanças em sua biologia e patogênese (AUBRY et al., 2015).

A ferramenta mais utilizada em genética reversa em flavivírus é o desenvolvimento de clones infecciosos, que são poderosas ferramentas construídas a partir da clonagem do genoma completo do flavivírus em vetores de expressão. A partir dos clones infecciosos vêm sendo desenvolvidos sistemas de genética reversa denominados replicons, ou RNA auto replicativo, que são vetores subgenômicos considerados poderosas ferramentas para estudo da replicação viral, pesquisas de novas drogas antivirais e desenvolvimento de vacinas. A expressão de sequências heterólogas em replicons de flavivírus também pode ser mediada através da construção de replicons bicistrônicos,

sendo que neste caso a expressão do segundo cístron é dependente de um sítio interno para a ligação do ribossomo (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES) (AUBRY et al., 2015; BEASLEY et al., 2015; KHRAMYKH, 2000).

A habilidade para monitorar e quantificar a replicação viral por meio da atividade de genes repórteres gerou um grande número de aplicações para diversas análises na biologia de flavivírus, tanto *in vitro*, como *in vivo* (AUBRY et al., 2015). Os testes tradicionais são baseados no monitoramento da inibição da replicação através da observação dos efeitos citopáticos, quantificação da produção viral por ensaio de placas, ou pela avaliação da replicação do RNA viral por RT-PCR (CHAMBERS, 1990; KHRAMYKH, 2000). A inibição do efeito citopático é um método mais comum, mas também usa vírus vivo. A clonagem de genes repórteres em replicons e o desenvolvimento de linhagens celulares contendo esses replicons repórteres têm sido, recentemente, muito utilizada para triagem de drogas antivirais. Este tipo de ensaio possibilita um teste em larga escala, levando a testes rápidos e menos trabalhosos que os métodos tradicionais (OLIVEIRA, 2011; PUIG-BASAGOITI et al, 2006; NOUEIRY et al., 2007). Neste estudo, utilizou-se a plataforma de triagem em larga escala para antivirais contra o vírus da febre amarela, baseado numa linhagem celular contendo o replicon repórter bicistrônico do vírus da febre amarela (BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES). Juntamente com o vírus recombinante YFV-GLuc, uma ferramenta aliada aos testes dos possíveis agentes antivirais naturais, que foi utilizada na confirmação dos resultados obtidos com a linhagem celular (KASSAR, 2013).

Os extratos selecionados também foram utilizados para testes antivirais contra os vírus YFV17DD.

Devido à importância das flaviviroses na Saúde Pública e a falta de vacina e medicamentos eficientes disponíveis, é de prioridade o desenvolvimento de vacinas, antivirais e métodos de diagnóstico sorológicos diferenciais precisos e rápidos, principalmente de baixo custo contra flavivírus e sem a necessidade de manipulação em NB3.

3. Objetivos

3.1 Geral

Utilizar técnicas de genética reversa viral, em flavivírus, para pesquisas de antivirais e desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico sorológico diferencial de flavivirose emergentes no Brasil.

3.2 Específicos

3.2.1 Desenvolver um sistema de diagnóstico sorológico (ELISA e PRNT), em laboratório de biossegurança nível 2, por meio da construção e utilização de vírus quiméricos de febre amarela cepa 17D expressando as glicoproteínas prM/E do SLEV, ILHV, ROCV e WNV;

3.2.2 Utilizar a linhagem celular BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres, e o vírus recombinante YFV-GLuc, na triagem e identificação de extratos naturais com atividade antiviral contra o vírus da febre amarela.

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultivo de células e vírus

Células BHK-21 foram mantidas em meio MEM (*Minimum Essential Medium*), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e 1% antibióticos (penicilina 10.000UI/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL, Gibco). As células BHK-21-repYFV17D-LucNeolres foram mantidas nas mesmas condições, diferenciando-se apenas devido a adição de 500 µg/mL de Geneticina® (G418, Gibco) no meio de cultura. Os vírus YFV17DD e o vírus recombinante YFV17D-GLuc, o qual expressa o gene repórter *Gaussia* Luciferase, foram utilizados para confirmar a atividade antiviral dos extratos triados (KASSAR E GIL, manuscrito em preparação). Todo o estoque de células e vírus (crescidos em BHK-21) foi mantido a -80°C.

4.2. Construção dos vírus quiméricos e recuperação de partículas virais infecciosas

As construções foram realizadas através da técnica de recombinação homóloga em levedura, onde as sequências codificantes dos genes prM/E do YFV17D foram substituídos pelas sequências codificantes correspondentes dos genes prM/E dos SLEV, ILHV e ROCV. Foi utilizado o plasmídeo pBSC-YFV17D-T7 (construído anteriormente), o qual representa um vetor de baixa replicação com origens de replicação de bactéria/levedura.

4.2.1 Preparação do vetor

O vetor (4 µg) foi digerido com as enzimas de restrição RsrII e NarI (Biolabs), por 6 horas a 37°C, dando um fragmento de 19059 pb, que foi desfosforilado com 5U de fosfatase alcalina (Promega) por 45 minutos a 37°C, e 15 minutos a 65°C para inativar a enzima. Os produtos da digestão foram corridos num gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. A banda do tamanho esperado foi excisada do gel e purificada através do kit Qiaquick (Qiagen), segundo as indicações do fabricante.

4.2.2 Amplificação dos insertos para a recombinação

Foi amplificado um fragmento de 531 pb (inserto 1) a partir do plasmídeo pBSC-YFV17D-T7, contendo a sequência completa da 5'UTR do YFV17D, a sequência completa do gene capsídeo do YFV17D e os primeiros 50 nucleotídeos que codificam o gene prM do YFV17D. Esse primeiro fragmento foi comum para as três construções. As sequências prM/E dos SLEV, ROCV, ILHV foram amplificadas a partir de plasmídeos comerciais (inserto 2), contendo as sequências sintetizadas, com isso, evitou-se a necessidade de se manipular os vírus selvagens em laboratório, e logo, não houve a necessidade de instalações de nível de biossegurança 3. Os produtos de PCR gerados tinham 2055 pb. Os oligonucleotídeos utilizados nas amplificações por PCR estão descritos na Tabela 2. Utilizou-se a enzima Taq polimerase Hifi platinum (Invitrogen) para a amplificação de todos os fragmentos descritos acima. Os insertos foram corridos num gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. A banda do tamanho esperado foi excisada do gel e purificada através do kit Qiaquick (Qiagen) segundo as indicações do fabricante.

4.2.3 Recombinação homóloga em levedura

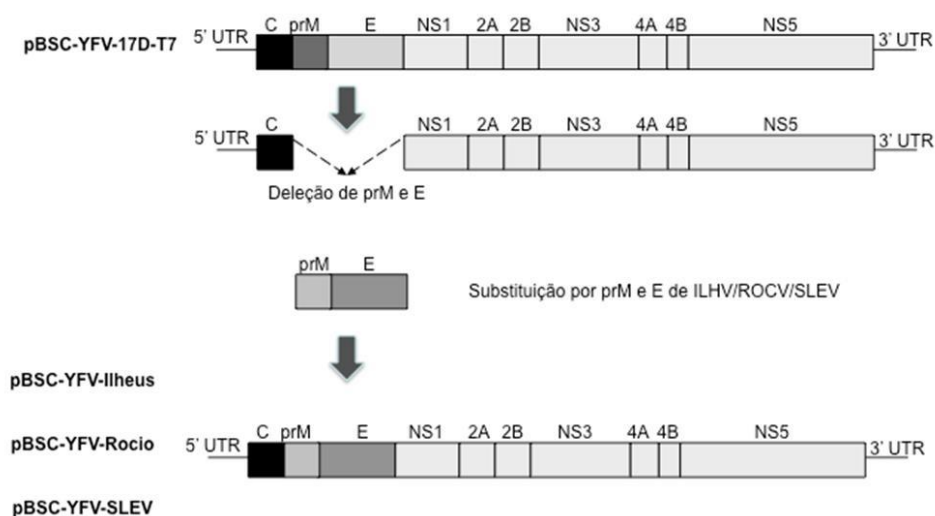
O vetor digerido e os dois fragmentos amplificados, para cada construção (Figura 6), foram recombinados transformando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa RFY206, pelo método de acetato de lítio (LiOAc) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Cada segmento de DNA do inserto possuía regiões com sequências homólogas, indispensáveis para a recombinação. Para isso, as leveduras foram crescidas em meio líquido YPD (*Yeast Peptone Dextrose*), a 30°C “overnight”. No dia seguinte, meio YPD foi inoculado com a levedura numa densidade óptica (OD) de 0,2, e posteriormente crescido a 30°C até atingir uma OD de 0,6, levando aproximadamente 3 horas. Ao atingir a OD desejada as leveduras foram centrifugadas, lavadas e transformadas com LiOAc, como descrito anteriormente. Após a transformação, as leveduras foram plaqueadas em placas contendo YNB (*Yeast Nitrogen Base*) sólido, na ausência do aminoácido triptofano (trp), e incubadas a 30°C por três dias.

Tabela 2- Oligonucleotídeos usados na construção dos vírus quiméricos

Quimera	Inserto	Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
Todas	1	pBSC-RsrII-T7-5'- YFV-F	caagcatgtaaatatcgtttgagttcgggCCGTAATAC GACTCACTATAGAGTAAATCCTGTGTGC TAATTGAGG
	1	RG362-R	ATCCACCCGTCATCAACAGCAT
	2	YFV-PrM-ILHV-F	TGGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGact caagatctcatcacacag
YFV17D-ILHV	2	ILHV-E-R	caaagttgatggcgcataccttgatcAGCATGCACAT TGACAGCCA
	2	YFV-PrM-ROCV-F	TGGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGact gcgctggggacataatc
	2	ROCV-E-R	caaagttgatggcgcatacctgaTCGGCATGGACG TTCATGGC
YFV17D-ROCV	2	YFV-PrM-SLEV-F	TGGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGattg caactgtcaacctacc
	2	SLEV-E-R	caaagttgatggcgcataccttgatcAGCTTGCACGC TGGTCGC
	2	SLEV-E-R	caaagttgatggcgcataccttgatcAGCTTGCACGC TGGTCGC
Todas confirmações		YFV-2980R	cagtctatggtgtattcaaag

Nota: Os oligonucleotídeos em maiúsculo representam as sequências para recombinação homóloga, e os minúsculos, as sequências de anelamento e amplificação por PCR.

Figura 6- Estratégia de construção dos vírus quiméricos YFV-SLEV, YFV-ILHV e YFV-ROCV. O DNA molde (pBSC-YFV17D-T7) foi digerido por enzimas de restrição liberando as proteínas prM e E. As proteínas prM/E dos ILHV, ROCV e SLEV tiveram suas sequências amplificadas por PCR. A clonagem foi feita por recombinação homóloga em levedura, gerando três plasmídeos diferentes. Fonte: Da autora.



4.2.4 Extração de DNA da levedura e confirmação dos clones

Três colônias positivas foram crescidas em 20 mL de meio YNB líquido, na ausência do trp, por 16 horas a 30°C numa agitação de 130 rpm em agitador orbital. A extração de DNA plasmideal foi realizada como descrito anteriormente (SAMBROOK E RUSSELL, 2001). Os clones foram confirmados por PCR utilizando os oligonucleotídeos YFV-prM-ILHV-F ou YFV-prM-ROCV-F ou YFV-prM-SLEV-F e YFV-2980-R (Tabela 2), gerando um fragmento de aproximadamente 2000 pb. Os clones confirmados tiveram uma cultura estocada a - 80°C em YNB/20% glicerol.

4.2.5 Amplificação do genoma quimérico e transcrição *in vitro*

A amplificação completa do genoma dos vírus quiméricos foi realizada numa reação de 50 µL, utilizando a enzima KlenTaq-LA (Clontech). A reação foi composta de 100 ng de DNA plasmideal (extraído de levedura), 1X do tampão KlenTaq-LA (Clontech), 1,3% DMSO, 0,4 M Betaína (Sigma), 200 µM de cada dNTP, 1U *KlenTaq-LA polymerase* e 20 pmol de oligonucleotídeos específicos. As condições de amplificação foram: 4 minutos à 95°C para desnaturações iniciais, seguidas de 32 ciclos, onde cada ciclo foi composto de 1 minuto de desnaturação a 93°C, 1 minuto de anelamento a 56°C, 8 minutos de extensão a 72°C, e 20 minutos finais de extensão a 72°C.

O genoma viral quimérico, amplificado por PCR, foi purificado por fenol-clorofórmio e precipitado com etanol. Os produtos de PCR contém na região 5' terminal a sequência para o promotor do bacteriófago T7, por isso para a transcrição *in vitro* foi utilizado o kit T7 MEGAscript (Ambion), seguindo as recomendações do fornecedor.

4.2.6 Recuperação dos vírus quiméricos

Para a recuperação dos vírus foram introduzidos em células BHK-21, por eletroporação, os RNAs dos vírus quiméricos sintetizados *in vitro*.

Para a eletroporação de células BHK-21 foram utilizados: 10 µg do RNA transcrito *in vitro* e 2×10^6 células BHK-21, ressuspendidas em 100µL de cytomix

(Ansari *et al.*, 2004). A eletroporação foi feita em cuvetas de 2 mm geladas, seguindo as seguintes condições: 600V, 99 mili segundos, 5 pulsos, 1 segundo de intervalo (eletroporador ECM-830, BTX). Estas condições de eletroporação apresentam uma eficiência de transformação de aproximadamente 30%. Após um intervalo de 5 minutos em temperatura ambiente, as células transfectadas foram ressuspensas em 7 mL de MEM completo e 5 mL da suspensão foram transferidos para frascos T25 e, os 2 mL restantes distribuídos em poços, de placas de 24 poços, contendo uma lamínula circular cada um, que posteriormente serviu para a realização de IFA. Os frascos e a placa foram mantidos a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂ em estufa.

4.2.7 Caracterização in vitro dos vírus quiméricos

4.2.7.1 Confirmação da identidade dos clones

Após três sucessivas passagens em cultivo celular, os sobrenadantes contendo os vírus quiméricos construídos e recuperados foram coletados e submetidos à extração de RNA utilizando o Kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN). O YFV17DD crescido em células VERO foi utilizado como controle positivo. Os RNAs foram reversamente transcritos pela enzima SuperScript III (Invitrogen) e os cDNAs produzidos, amplificados por PCR utilizando a enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Os produtos foram resolvidos em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. Posteriormente, os produtos foram purificados e enviados para sequenciamento. As reações para o sequenciamento foram realizadas com o kit *ABI BigDye terminator cycle sequencing* (Applied Biosystems) e os produtos desta reação foram separados em um sequenciador *ABI 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências adquiridas foram analisadas com o auxílio do pacote de *softwares Lasergene* (DNA Star).

4.2.7.2 Avaliação da replicação dos vírus quiméricos

A avaliação da replicação viral foi realizada por imunofluorescência indireta, monitoramento do efeito citopático, análise da morfologia de placas e cinética viral.

4.2.7.2.1 Imunofluorescência indireta

As células BHK-21 transfectadas com RNA transcrito *in vitro* foram acompanhadas durante 3 dias após eletroporação, através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpos policlonais específicos para flavivírus produzido em camundongos (Fluido ascítico hiperimune do grupo B, diluído 100X em PBS 1X). Como anticorpo secundário foi utilizado o anticorpo conjugado anti-camundongo IgG FITC, diluído 100X em PBS 1X. A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando-se o microscópio Leica DMI 4000B.

4.2.7.2.2 Monitoramento do efeito citopático e análise da morfologia de placas

O sobrenadante dos cultivos celulares foi centrifugado (1200 rpm), por 5 minutos e estocado a -80°C. Novas culturas celulares de BHK-21 foram infectadas com os vírus quiméricos recuperados. E após três passagens em cultivo celular analisou-se a morfologia de placas, através de titulação viral por ensaio de placa. O efeito citopático foi observado em todas as passagens após aproximadamente quatro dias de incubação. Diluições seriadas foram feitas e 1 mL de cada diluição foi inoculado em monocamadas celulares em placas de cultura celular de seis poços, contendo 3×10^5 célula/poço. Incubou-se por uma hora em estufa a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂, para a adsorção viral. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e 5 mL de meio semissólido (Agarose 1%, MEM 1X, 0,1% SFB, 0,05% penicilina/estreptomicina) foi adicionado em cada poço da placa. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ durante 6 dias. O título viral foi revelado adicionando-se 500 µL de MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), na concentração de 5 mg/mL em cada poço. A morfologia de placas dos vírus quiméricos foi comparada a do vírus selvagem YFV17DD.

4.2.7.2.3 Avaliação da cinética de replicação viral

Uma curva de crescimento dos vírus quiméricos, em comparação a do vírus selvagem YFV17DD, foi feita para a análise da cinética de replicação viral

em cultura de células BHK-21. Em placas de cultivo celular de 6 poços foram adicionadas 3×10^5 células/poço. Após 24 horas, os vírus foram inoculados numa MOI (Multiplicidade de infecção) de 0,3. Após uma hora de adsorção, a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido. Cada poço foi lavado 3 vezes com MEM. Em seguida, adicionou-se 2 mL de MEM completo (5% SFB e 1% antibióticos – penicilina/estreptomicina). O tempo 0 foi coletado logo em seguida e estocado a -80°C em 3 criotubos etiquetados. A coleta dos demais sobrenadantes se deu a cada 24 horas, perfazendo um total de 96 horas.

A titulação foi feita em placas de 24 poços, onde células BHK-21 foram semeadas numa concentração de 8×10^4 célula por poço. Diluições seriadas foram feitas e 0,2 mL de cada uma delas foi inoculado em cada poço, salvo o controle negativo. Incubou-se por uma hora em estufa a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂, para a adsorção viral. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e 0,5 mL de meio semissólido (Agarose 1%, MEM 1X, 0,1% SFB, 0,05% penicilina/estreptomicina) foi adicionado. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, durante 6 dias. A titulação foi revelada adicionando-se 50 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço. O gráfico foi plotado pelo cálculo do log de cada título viral em pfu/mL.

4.3 Estabelecimento de protocolo de diagnóstico sorológico para o WNV por meio de ELISA de captura e confirmação por PRNT para SLEV, ILHV, ROCV, YFV17DD, DENV2 e WNV

Esta etapa envolveu a produção e padronização de um teste ELISA para a detecção de IgM e IgG para o WNV em soro de equinos, utilizando-se o vírus quimérico YFV-WNV-3M, o qual foi previamente construído em nosso laboratório.

Numa segunda etapa, os vírus quiméricos construídos foram utilizados no teste PRNT para a verificação da especificidade dos resultados positivos no ELISA e para o diagnóstico diferencial dos demais flavivírus em estudo.

4.3.1 Produção de antígenos em cultura de células

Células de *Aedes albopictus* (C6/36) foram utilizadas para o crescimento do vírus quimérico YFV17D-WNV-3M, em quatro frascos T150, com uma

concentração de 1×10^6 células em cada frasco e utilizando um MOI de 0,1 para a inoculação do vírus. A adsorção foi feita por uma hora em estufa a 28°C. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 30 mL de meio L15 a 2% de SFB. As culturas permaneceram em estufa a 28°C durante 7 dias, acompanhando-se o efeito citopático diariamente. Após este período, o sobrenadante foi removido, e a monocamada celular lavada uma vez com 5 mL de PBS 1X estéril e posteriormente adicionou-se 1 mL de PBS 1X estéril em cada frasco. Em seguida foi feito o congelamento e descongelamento dos frascos, a -80°C/temperatura ambiente, sete vezes para a liberação dos antígenos virais. O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo falcon de 15 mL, adicionado Tween 20 numa concentração final de 1%, e incubado por 20 minutos a 4°C. Adicionou-se albumina sérica bovina (BSA) numa concentração final de 1%. Após aferição do volume, adicionou-se o mesmo volume de glicerol (v/v). Foram feitas alíquotas e o estoque mantido a -80°C.

4.3.2 Padronização do ELISA de captura para WNV

Para a padronização do ELISA de captura foram cedidas 25 amostras de soros de equinos, diagnosticadas como positivas para WNV, pela Dra. Judi Galeota Wheeler (Virology Diagnostic Center, University of Nebraska at Lincoln, Lincoln, NE).

Placas de ELISA de 96 poços, de meio diâmetro (Costar), foram sensibilizadas com 1 µg e 2 µg do anticorpo anti-IgG equino (goat anti-horse IgG – KPL#01-21-03) ou do anti-anticorpo anti-IgM equino (goat anti-horse IgM – KPL#01-21-07) diluído em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubado a 4°C durante 16 horas (*overnight*), em câmara úmida. Após o período de sensibilização, foram feitas 3 lavagens com PBS1X-0,1% Tween 20 para a remoção do anticorpo não adsorvido. A superfície dos orifícios foi bloqueada com 100 µL da solução de bloqueio (PBS 1X-BSA a 4%). A placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, foram feitas 3 lavagens com PBS1X-0,1% Tween 20, sendo acrescentado em seguida 100 µL de soro equino positivo ou negativo (diluído em 1:10 em PBS1X-BSA 0,5%) e apenas PBS1X-BSA 0,5% nos poços correspondentes ao branco. A placa foi incubada por mais uma hora a 37°C em câmara úmida e ao abrigo da luz. A seguir, foram feitas 3 lavagens com

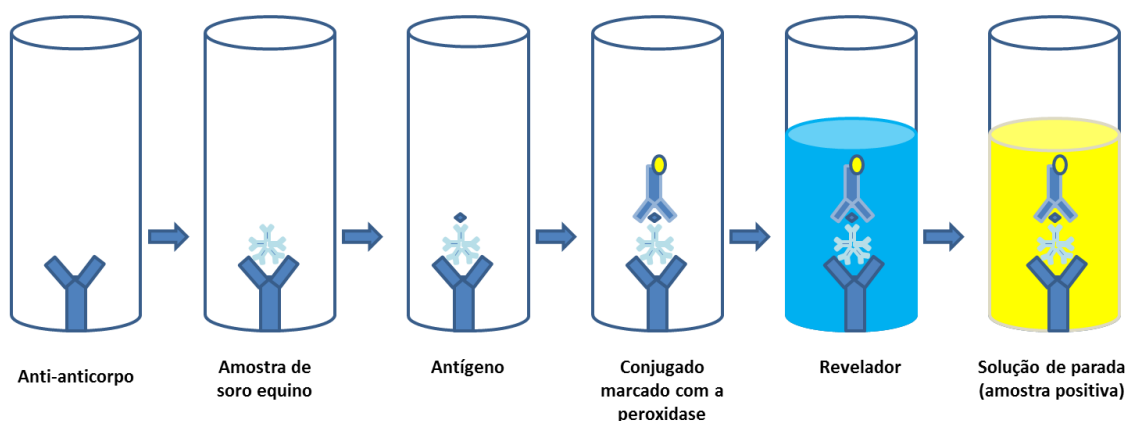
PBS1X-0,1% Tween 20, e acrescentou-se 100 µL do antígeno preparado em cultivo celular, nas diluições puro, 1:5 e 1:10, incubando por mais uma hora a 37°C em câmara úmida e ao abrigo da luz. Após 3 lavagens com PBS1X-0,1% Tween 20, mais uma incubação de uma hora foi realizada com o anticorpo secundário anti-flavivirus (CDC 6B6C-1) conjugado com peroxidase, 50 µL por poço, com as concentrações de 1:12.000 e 1:13.000 em teste. Após a incubação de uma hora a 37°C em câmara úmida, foram feitas cinco lavagens, acrescentando-se 100 µL do substrato (TMB) com incubação a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, monitorando-se o tempo, que variou para cada ensaio, seja ele para captura de IgG ou IgM. Após os 30 minutos, para IgG, e 1 hora, para IgM, foram adicionados 50 µL da solução stop (H₂SO₄ a 12,5%) e a feita leitura da densidade ótica (DO) a 450nm em espectrofotômetro. Foram consideradas positivas as amostras que apresentarem um valor de DO superior ao valor estabelecido para o ponto de corte (valor médio da DO obtida, com os soros negativos, multiplicado por 2,1).

4.3.3 Soros teste e condições padronizadas do ELISA de captura

Foram recebidas 164 amostras de soros de equinos do Estado de Pernambuco, gentilmente cedidas pelo Dr. Giovani Bertani. Essas amostras foram triadas para anticorpos IgG e IgM para o WNV. A concentração de uso dos anticorpos para a sensibilização das placas foram 1 µg/mL para pesquisa de IgG e 2 µg/mL para a pesquisa de IgM. A diluição de uso dos antígenos foi 1:5 para pesquisa de IgM e 1:10 para IgG. A diluição utilizada do conjugado foi a de 1:12.000. As demais condições foram mantidas (Figura 7).

Figura 7- Desenho esquemático do ELISA de captura para a pesquisa de anticorpos do WNV. Placas com 96 poços foram sensibilizadas por anti-anticorpo (IgM/IgG) específico para WNV. A etapas seguintes são a adição do soro equino, antígenos preparados em células C6/36, conjugado antinflavivírus marcado com peroxidase, solução TMB/revelador e solução de parada (ácido sulfúrico 12,5%).

Fonte: Da autora.



4.3.4 Ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT)

Para determinar a especificidade do teste de ELISA, devido a grande possibilidade de reações cruzadas do WNV com outros flavivírus, as amostras positivas no ELISA para o WNV foram submetidas ao PRNT, utilizando-se os vírus quiméricos YFV17D-WNV, YFV17D-ILHV, YFV17D-ROCV, YFV17D-SLEV e os parentais YFV17DD e DENV2 frente às amostras positivas.

Os soros foram diluídos partindo-se da diluição de 1:5-1:320 (crescentes na base 4) e incubadas frente aos vírus numa concentração constante (100 UFP/mL). Após uma incubação da solução anticorpo-vírus por uma hora em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. As soluções foram adicionadas em culturas de células de BHK-21 (100 µL por poço), previamente semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 6x10⁴ célula por poço. O mesmo se fez com os vírus sem incubação com soros (Controle Positivo). As placas foram incubadas por uma hora em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Os sobrenadantes foram retirados e 1 mL de meio semissólido foi acrescentado (Agarose 1%, MEM 1X, 0,1% SFB, 0,05% penicilina/estreptomicina) em cada poço. Duas amostras de soros equinos eram analisadas por placa. A revelação da placa se deu após quatro dias de incubação em estufa a 37°C numa atmosfera de

5% de CO₂. O meio semissólido foi retirado, as células fixadas com formalina (1:3,6) por 1 hora e corados com cristal violeta por 1 hora. Os títulos neutralizantes (PRNT₅₀) para os cinco vírus foram calculados. Amostras com PRNT₅₀ igual ou superior a 1:80 foram consideradas positivas. Os títulos nos PRNTs contra os cinco vírus foram comparados e considerou-se o critério de 4X mais para a definição do vírus predominante frente a reações cruzadas, estabelecendo o diagnóstico diferencial (PAUVOLID-CORRÊA, 2014).

4.4 Triagem de extratos antivirais em larga escala utilizando a linhagem celular BHK-21repYFV17D-LucNeolres

A linhagem celular BHK-21repYFV17D-LucNeolres, desenvolvida previamente (OLIVEIRA, 2011), foi semeada em placas de 96 poços, numa concentração de 2×10^4 células por poço. Após 24 horas, inoculou-se MEM completo contendo 20 µg/mL de cada extrato diluído em H₂O Milli Q / DMSO a 0,1%. Como controle positivo foi inoculado 100 µL de MEM contendo 1000 UI/mL de IFN-α 2b (Heber). E como controle negativo, as células foram tratadas apenas com 500 µg/mL de geneticina (G418). Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Após uma incubação de 48 horas as células foram lisadas em 20 µL de 1X tampão de lise (Luciferase Cell Culture Lysis 5X Reagent, PROMEGA) por 5 minutos. Para o ensaio de luciferase utilizou-se 20 µL de lisado celular e 100 µL do substrato luciferina utilizando o kit Luciferase 1000 Assay System (PROMEGA), a leitura foi realizada em luminômetro Berthold Mithras, tendo os valores resultantes expressos em *raw lights units* (RLU). Calculou-se a porcentagem de inibição em relação ao controle negativo, considerando-se os que inibiram 50% ou mais da atividade da luciferase. Nos casos positivos, o ensaio foi repetido utilizando-se uma concentração de 40 µg/mL do extrato (OLIVEIRA, 2011).

4.5 Triagem de extratos antivirais em larga escala utilizando o vírus repórter YFV-GLuc

Foram dispensadas 1×10^4 células BHK-21 por poço em placas de 96 poços contendo MEM completo. Após 24 horas, um MOI de 0,1 do vírus YFV-GLuc foi adsorvido por 1 hora na monocamada de células. Em seguida, as células foram tratadas com 40 µg/mL de cada extrato em teste. O experimento foi feito em duplicata. Os demais parâmetros e interpretações dos resultados são os mesmos utilizados no ensaio com a linhagem celular.

4.6 Confirmação da atividade dos extratos naturais frente aos vírus YFV17DD e DENV2

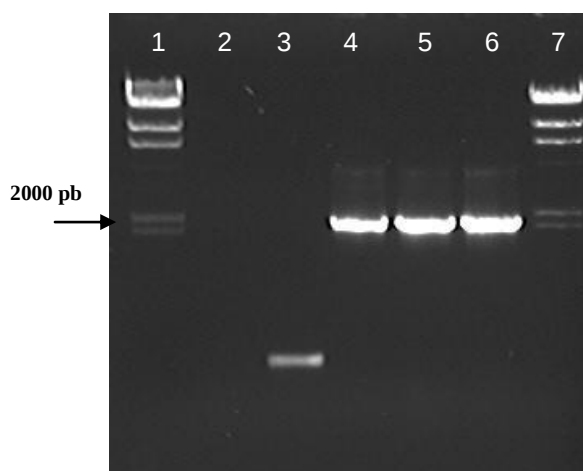
Para a confirmação da capacidade antiviral dos extratos selecionados, placas de 24 poços contendo 1×10^4 células por poço foram semeadas e incubadas por 24 horas antes do teste. Um MOI de 0,3 de cada vírus foi inoculado em cada poço (em duplicata) e adsorvido por uma hora a 37°C / 5% de CO₂. O sobrenadante foi retirado e cada poço foi lavado duas vezes com MEM puro. Em seguida, adicionou-se 500 µL de MEM 5% SFB e 40 µg/mL de cada extrato a ser testado. Como controle positivo, utilizou-se 1000 UI/mL de IFN alfa (Heber) e como controle negativo, DMSO 0,01%. A cada 24 horas a cultura foi observada em microscópio ótico para a identificação de possíveis efeitos citotóxicos. Após três dias os sobrenadantes foram coletados e titulados em placas de 24 poços como descrito anteriormente.

5. RESULTADOS OBTIDOS

5.1 Construção dos vírus quiméricos e recuperação de partículas virais infecciosas

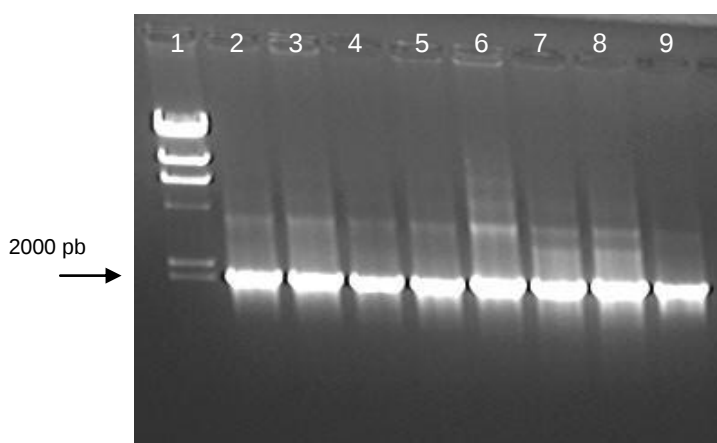
Os genes das proteínas prM/E dos vírus SLEV (EF158053.1, acessado em 13/03/2015), ILHV (AY632539.4, acessado em 13/03/2015) e ROCV (AY632542, acessado em 13/03/2015) foram sintetizados por uma empresa privada (GenScript), para evitar a necessidade da manipulação dos vírus selvagens em laboratório NB3. O material serviu de DNA molde para reações de PCR utilizando-se oligonucleotídeos contendo regiões para a amplificação dos genes prM/E de cada vírus (Tabela 2) e sequências sobrepostas, necessárias para a ocorrência de recombinação homóloga em levedura. O vetor pBSC-YFV17D-T7 foi digerido por enzimas de restrição. A banda alvo foi excisada do gel de agarose e purificada. Os produtos de PCR e da purificação da digestão foram corridos em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (Figura 8).

Figura 8- Fragmentos de DNA purificados da digestão do vetor pBSC-YFV17D-T7 e da amplificação dos insertos utilizados na construção dos vírus quiméricos. 1, 7 – Peso Molecular Lambda HIND III; 2 – Purificado da digestão de pBSC-YFV17D-T7 (não perceptível na foto); 3 – PCR I (comum a todas as construções); 4 – PCRII prM/E ILHV; 5 – PCRII prM/E ROCV; 6 – PCR II prM/E SLEV.



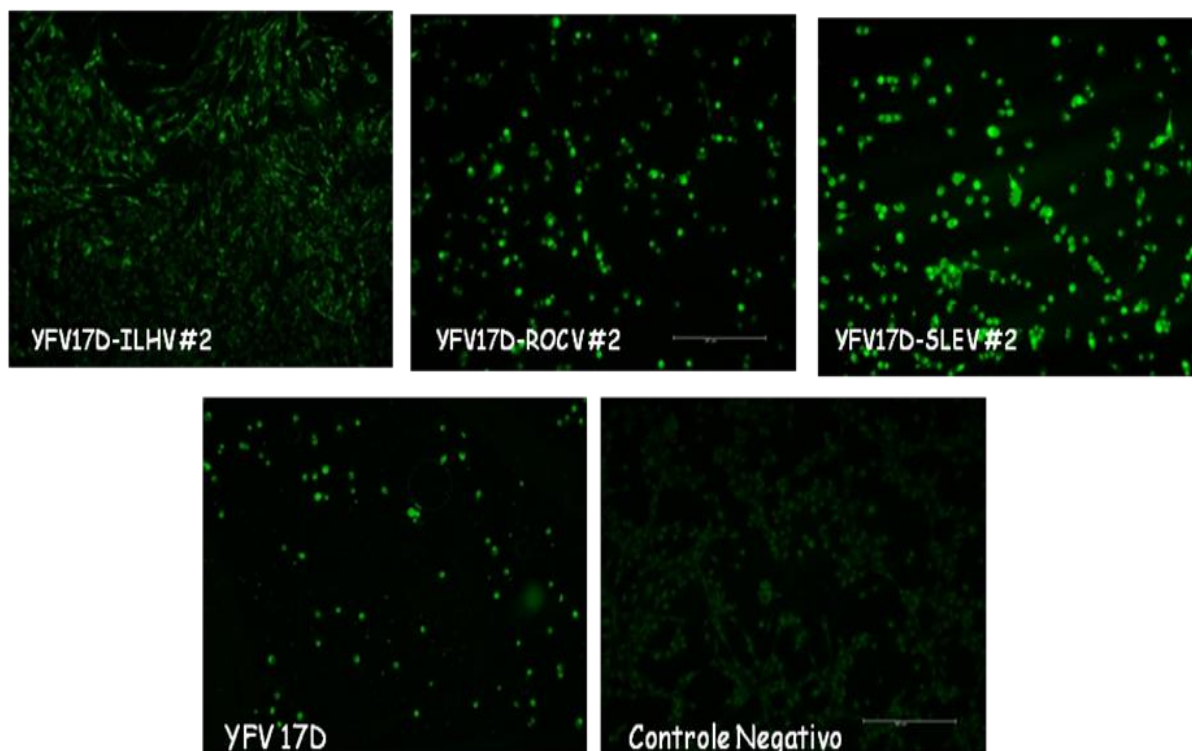
Não foi encontrada grande dificuldade na realização da recombinação homóloga em levedura, pois se trata de um protocolo bem estabelecido pelo grupo (QUEIROZ, 2013; SAMBROOK E RUSSELL, 2001). Foram escolhidas algumas colônias de cada placa para ser realizada a triagem dos clones, feita por reações de PCR. Os fragmentos esperados possuíam um tamanho de aproximadamente 2000 pb (Figura 9). Como foi observado, na figura 11, a construção foi confirmada nos clones YFV17D-ILHV, clone 1 e 2, YFV17D-ROCV, clone 1, 2 e 3, e YFV17D-SLEV, clone 1, 2 e 3.

Figura 9- PCR de triagem de clones corretamente recombinados. 1- Peso molecular Lambda HIND III; 2- pBSC-YFV17D-ILHV Clone 1; 3- pBSC-YFV17D-ILHV Clone 2; 4- pBSC-YFV17D-ROCV Clone 1; 5- pBSC-YFV17D-ROCV Clone 2; 6- pBSC-YFV17D-ROCV Clone 3; 7- pBSC-YFV17D-SLEV Clone 1; 8- pBSC-YFV17D-SLEV Clone 2; 9- pBSC-YFV17D-SLEV Clone 3.



Para a recuperação dos vírus quiméricos, amplificaram-se os genomas das quimeras confirmadas e posteriormente o RNA transcrito *in vitro* foi introduzido em células eucariotas BHK-21, por eletroporação. As células foram fixadas durante 24, 48, 72 e 96 horas após a transfecção e a confirmação de replicação das quimeras se deu através de imunofluorescência indireta (IFA) (Figura 10) e monitoramento do efeito citopático nas culturas. Apenas os clones 2 de cada construção mostraram positividade na IFA, após 72 horas de crescimento. O efeito citopático foi observado cinco dias após eletroporação, nos clones 2 de cada quimera construída.

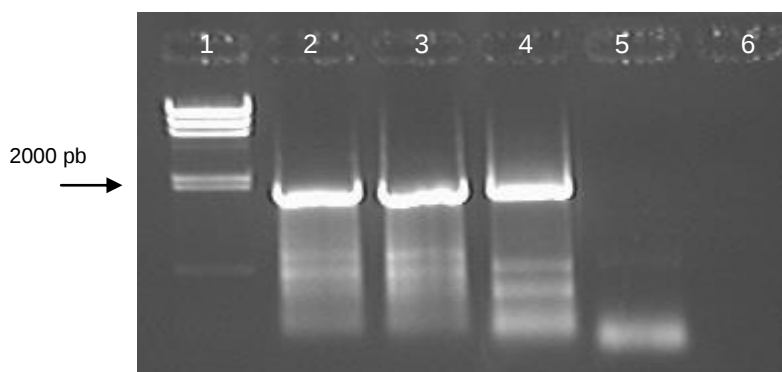
Figura 10- Imunofluorescência indireta de células BHK-21 transfectadas com transcrito *in vitro*, dos vírus quiméricos e o YFV17D. A IFA confirmou a replicação das quimeras após 72 horas da eletroporação. Aumento: 630x.



O sobrenadante das culturas foi clarificado e estocado a -80°C , após a observação de efeito citopático em 70% das células. Após as três sucessivas passagens em cultivo celular, os vírus recuperados foram utilizados para infectar novas culturas celulares de BHK-21 e o sobrenadante foi submetido à caracterização *in vitro*.

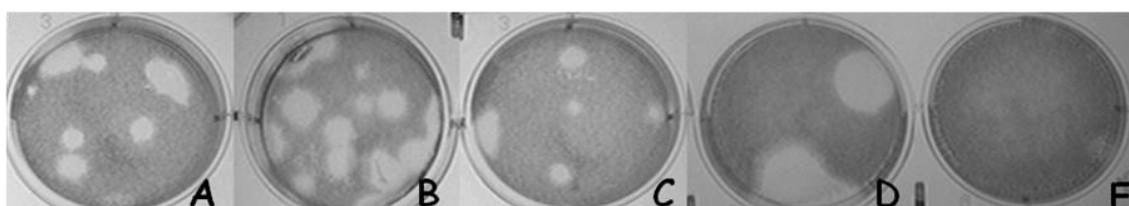
Os vírus recuperados foram submetidos a novos ensaios de imunofluorescência indireta, sendo todos confirmados por RT-PCR utilizando o cDNA produzido, utilizando oligonucleotídeos específicos para a amplificação das sequências codificantes das proteínas prM/E, de tamanho aproximado de 2000 pb (Figura 11). O DNA obtido do RT-PCR foi enviado para sequenciamento das proteínas prM/E clonadas, confirmando a identidade das sequências clonadas (Figura 12).

Figura 11- Confirmação da construção e recuperação das quimeras virais infectivas por RT-PCR. 1-Peso Molecular Lambda HIND III; 2- YFV17D-ILHV clone #2; 3- YFV17D-ROCV clone #2; 4- YFV17D-SLEV clone #2; 5- YFV17DD; 6- controle negativo.



Para o estudo fenotípico das quimeras virais construídas, foi analisada a morfologia de placas. Células BHK-21 foram semeadas em placas de seis poços e diluições seriadas dos vírus quiméricos recuperados foram inoculadas. Após seis dias o ensaio foi revelado por MTT. O vírus YFV17DD foi utilizado como controle positivo. Houve a confirmação da atenuação esperada, conforme descrito na literatura. Foram observados tamanhos de placas menores em todos os vírus quiméricos em relação às do controle positivo, o vírus parental YFV-17DD (Figura 13).

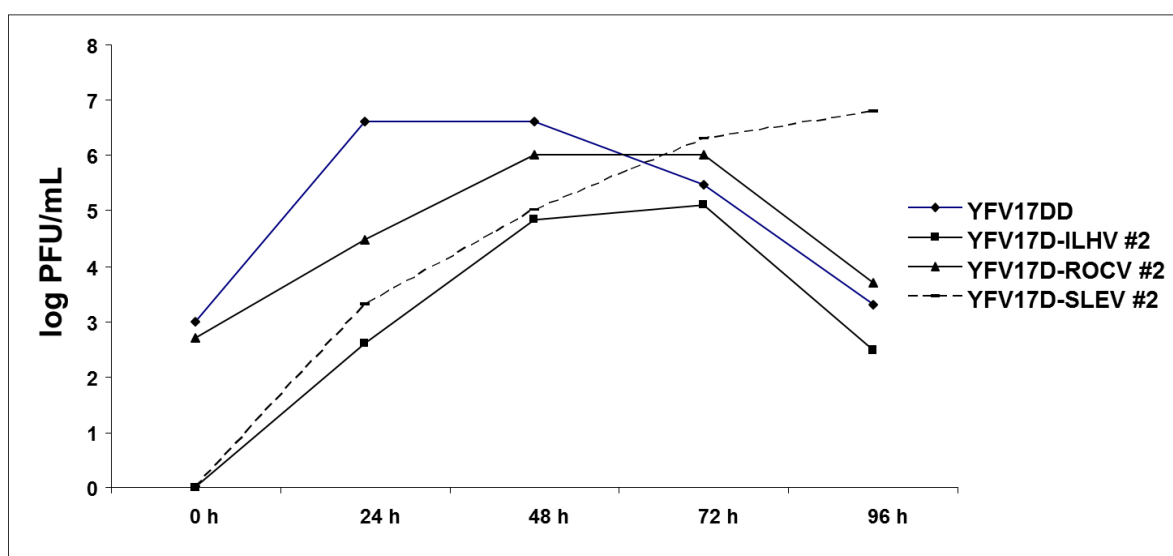
Figura 12- Morfologia de placas dos vírus quiméricos e cepa parental YFV17DD. YF17D-ILHV clone 2 (A), YFV17D-ROCV clone 2 (B), YFV17D-SLEV clone 2 (C), YFV17DD (D) e Controle Negativo (E).



Para a análise da cinética de replicação viral dos vírus quiméricos, células BHK-21 foram semeadas em placas de seis poços e após 24 horas foram infectadas numa MOI de 0,3. A cada 24 horas o sobrenadante foi coletado e estocado. Titulações dos tempos 0 a 96 horas foram feitas e os títulos calculados e plotados em log pfu/mL no gráfico (Figura 14). Nas primeiras 24 horas, observou-se uma diferença inicial maior nos títulos do YFV17DD em relação aos

vírus quiméricos construídos de aproximadamente 2 log ou mais. Após 48 horas, a diferença diminuiu para 0,5 log, mas após 72 horas o título do YFV17DD caiu e ainda difere dos vírus quiméricos, com aproximadamente 5 log pfu/mL a mais. O vírus quimérico YFV17D-SLEV demonstrou uma cinética de replicação mais lenta nas primeiras 24 horas, mas seu título continuou aumentando mesmo após 72 horas de incubação, diferente dos demais vírus analisados. O vírus quimérico YFV17D-ILHV foi o que se mostrou mais atenuado em relação aos demais vírus quiméricos construídos.

Figura 13- Curva da cinética de replicação das quimeras e vírus parental YFV17DD em células BHK-21. YFV17D-ILHV clone 2, YFV17D-ROCV clone 2, YFV17D-SLEV clone 2 e YFV17DD. Células BHK-21 foram infectadas com o vírus parental YFV17DD ou com os vírus quiméricos numa MOI de 0,3.



5.2 Estabelecimento de um protocolo de diagnóstico sorológico para o WNV por meio de ELISA de captura e confirmação diferencial por PRNT para SLEV, ILHV, ROCV, YFV17DD, DENV2 e WNV.

Foi feito um estoque dos vírus quiméricos construídos, propagados em BHK-21, cujo título foi de 1×10^5 pfu/mL, 4×10^5 pfu/mL e 4×10^5 pfu/mL das quimeras YFV17D-ILHV, YFV17D-ROCV e YFV17D-SLEV, respectivamente.

Posteriormente, os vírus quiméricos foram propagados em células C6/36, para a produção de antígenos, numa MOI 0,1. Foram estocados antígenos dos vírus quiméricos construídos, do vírus parental YFV17DD e do vírus quimérico YFV17D-WNV, construído previamente em nosso laboratório. Porém, como estavam disponíveis apenas anticorpos específicos para WNV, seguimos com a padronização do ELISA de captura em soros de equinos para este vírus apenas e posteriormente foram feitas confirmações diferenciais por ensaio de neutralização (PRNT) para todas as quimeras construídas.

5.2.1 ELISA de captura para WNV

Para a padronização do ELISA de captura para o WNV foram testadas 25 amostras de soros de equinos americanos, diagnosticadas como positivas para o WNV. Essas 25 amostras de soro foram testadas no protocolo proposto e foram confirmadas as positivities para IgG e IgM de WNV, com 52% delas (13 amostras) positivas na detecção de IgM e 80% das amostras (20 amostras) positivas para IgG.

Após a padronização do protocolo, 164 amostras de soro equino do Estado de Pernambuco foram analisadas por ELISA de captura, obtendo-se 44 soros positivos para anticorpos IgM e 31 para IgG do WNV (Tabela 3). As amostras positivas foram posteriormente validadas por PRNT, ensaio ouro para diagnóstico sorológico de flavivírus.

Tabela 3- Pesquisa de anticorpos IgM e IgG em soros equinos brasileiros e americanos através do método de ELISA de captura

Amostras de Equinos	Anticorpo contra WNV	
	IgM	IgG
25 americanas (EUA)	13 (52%)	20 (80%)
164 brasileiras (PE)	44 (26,8%)	31 (18,9%)

5.2.2 Ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT) para flavivírus

Para a validação dos resultados obtidos no ELISA de captura para WNV, os soros positivos, do Estado de Pernambuco, foram submetidos ao PRNT₅₀,

utilizando os vírus quiméricos YFV17D-WNV, YFV17D-ILHV, YFV17D-ROCV e YFV17D-SLEV e os vírus selvagens YFV17DD e DENV2 (Figura 15).

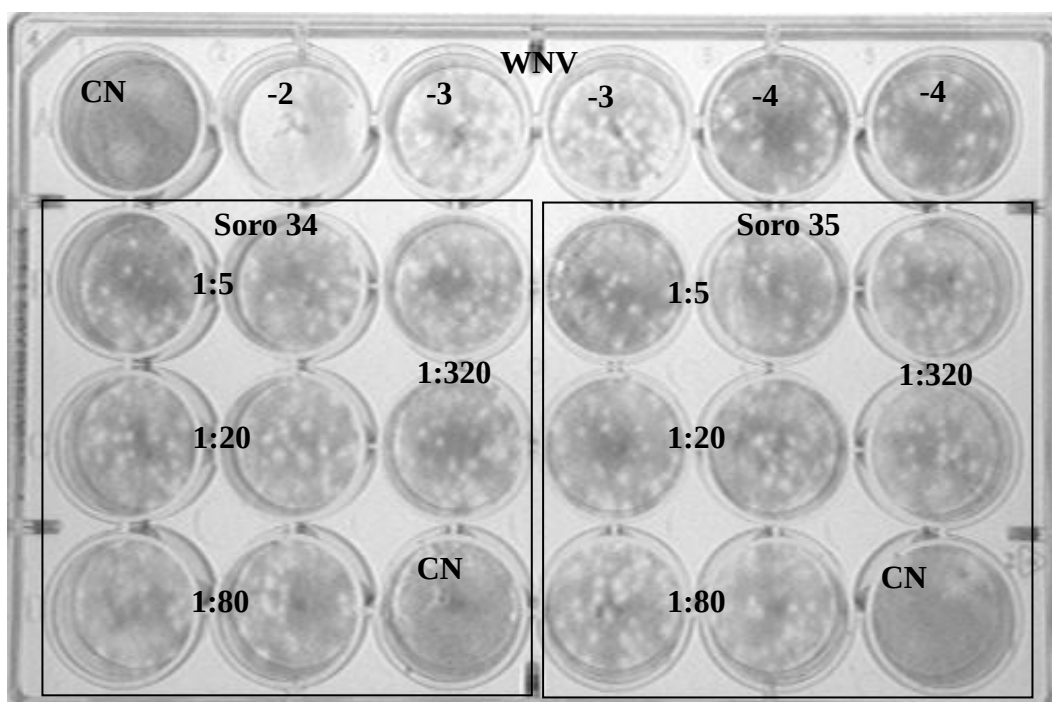


Figura 14- Exemplo de esquema de ensaio para pesquisa de anticorpos neutralizantes em soros equinos no Estado de PE por PRNT₅₀.

Partindo de diluição 1:5, as amostras de equinos do Estado de PE foram confirmadas diferencialmente para cinco flavivírus, faltando o DENV2. O título foi expresso como a maior diluição do soro equino capaz de neutralizar 50% do número de placas formadas pelo vírus. Tomando como positivas as amostras que mostraram uma recíproca de diluição a partir de $\geq 1:80$. As amostras que não foram monotípicas, considerou-se o princípio do 4X mais e a recíproca de diluição 4 vezes maior foi a considerada como predominante (Tabela 4). O resumo das amostras de soro positivas no PRNT₅₀ está disposto na tabela 5.

Tabela 4- Títulos comparativos do PRNT₅₀ para flavívirus em amostras de soro equino de PE positivas para WNV triados por ELISA de captura

ID	ELISA	WNV	ILHV	ROCV	SLEV	YFV17DD	DENV2
02	IgG	1:5	1:320	-	-	-	
03	IgM	1:5	1:320	-	-	-	
04	IgM	-	1:320	1:80	1:320	-	
06	IgG	-	1:320	-	-	-	
07	IgG	1:20	1:20	1:80	1:5	-	
08	IgG	1:20	1:320	1:20	-	-	
09	IgM, IgG	1:5	1:180	1:80	-	-	
10	IgM	1:20	1:20	1:20	-	-	
12	IgM	1:5	1:320	-	-	-	
14	IgG	1:320	-	-	-	-	
15	IgG	1:5	1:320	-	-	-	
16	IgG	1:5	1:20	-	-	-	
18	IgM, IgG	1:5	1:320	1:20	1:5	-	
19	IgM	1:5	1:320	1:80	1:5	-	
20	IgM	1:20	1:5	1:80	-	-	
21	IgM	1:5	1:5	1:20	1:5	-	
22	IgM, IgG	1:20	1:320	1:80	1:20	-	
23	IgG	1:5	1:20	1:320	1:5	-	
24	IgM, IgG	-	1:80	-	1:5	-	
25	IgM, IgG	1:5	1:320	-	1:5	-	
27	IgM	1:80	-	-	1:20		
28	IgM	1:80	1:320	1:80	1:5		
29	IgM	1:5	1:320	1:320	1:5		
30	IgM, IgG	1:20	1:5	-	1:5		
31	IgM	1:5	-	-	1:5		
32	IgM, IgG	1:5	1:5	1:20	1:5		
34	IgM	1:80	1:320	1:80	1:20		
35	IgM	1:80	-	1:5	1:5		
36	IgM, IgG	-	1:320	1:5	1:5		
37	IgM	1:5	320	-	1:5		
38	IgG	1:20	1:5	1:80	1:5		
39	IgM, IgG	1:20	1:5	1:5	1:20		
40	IgM, IgG	1:20	1:5	1:5	1:5		
41	IgM	1:20	1:20	-	1:5	1:5	-
42	IgM	1:5	1:5	1:5	1:5		
43	IgM	1:5	1:20	1:20	-		
44	IgM	-	1:5	1:5	1:80		
45	IgM	1:5	1:5	1:5	1:5		
49	IgG	1:5	1:5	1:20	1:320		
50	IgM	-	-	1:5	1:80		
56	IgG	-	1:5	-	1:5		
58	IgG		1:20	1:5	-	-	
59	IgM	1:20	1:20	1:20	1:20	1:5	-
62	IgG	1:5	1:320	1:5	1:5	-	
63	IgG	1:5	1:320	1:5	1:5	-	
67	IgM	-	1:320	1:20	1:5	-	
69	IgM	-	1:320	1:5	1:5	-	

ID	ELISA	WNV	ILHV	ROCV	SLEV	YFV17DD	DENV2
75	IgM	1:5	1:80	1:5	1:20	-	
79	IgM	1:5	1:320	-	1:5	-	
80	IgM,IgG	1:5	1:20	1:5	1:5	-	
85	IgG	1:5	1:5	1:5	1:20	-	
86	IgM	-	1:320	-	1:20	-	
99	IgG	1:5	1:20	1:80	1:5	-	
107	IgM,IgG	1:5	1:320	-	1:80	-	
122	IgG	1:20	1:320	1:5	1:5	1:5	
124	IgM	1:20	1:5	-	1:80	-	
126	IgM	-	1:5	-	1:20	-	
137	IgG	1:20	1:20	-	1:5	-	
144	IgG	1:5	1:20	-	-	-	
152	IgM	-	1:320	-	1:5	-	
156	IgM	-	1:320	-	-	-	
159	IgM	1:5	1:20	-	1:5	-	
160	IgM	1:5	1:5	-	1:20	-	
Total de Positivos	63	5	29	12	6	0	0

Tabela 5- Amostras positivas classificadas no diagnóstico diferencial de flavivírus em amostras de equinos do Estado de Pernambuco por PRNT

Total de Amostras Positivas no ELISA de Captura para WNV	PRNT ₅₀					
	WNV	ILHV	ROCV	SLEV	YFV17DD	DENV2
63	3	27	4	4	0	0

Das 63 amostras positivas obtidas na triagem dos soros equinos por ELISA de captura, três confirmaram ser por infecção do WNV. Porém, a maioria delas mostrou positividade para o ILHV, com 27 soros com reação monotípica, com títulos $\geq 1:80$. Quatro soros foram positivos para o ROCV, quatro para o SLEV e apenas um soro foi positivo para o YFV17DD. Houve três reações não monotípicas que não puderam chegar a uma classificação. O soro 04 foi positivo tanto para ILHV, quanto para SLEV (ambos com título de 1:320). O soro 09 apresentou título de 1:80 tanto para o ILHV, quanto para o ROCV. O mesmo foi observado nos resultados do soro 29, que apresentou título de 1:320 para ILHV e ROCV. Os resultados inconclusivos foram repetidos e demonstraram os mesmos resultados.

Ainda serão testados 61 soros para o DENV2 e 21 soros para o YFV17DD, e assim fechar o diagnóstico diferencial para os seis flavivírus testados.

5.3 Triagem de extratos naturais utilizando a linhagem celular BHK-21-repYFV17D-LucNeoIRES

O segundo enfoque deste trabalho está na pesquisa de extratos com atividade antiviral contra o YFV e caracterizou-se por uma continuação do trabalho de Oliveira (2011).

A linhagem celular BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES expressa constitutivamente um replicon bicistrônico repórter de febre amarela, o qual contém no primeiro cístron o gene repórter *Luciferase firefly* e o gene de seleção neomicina fosfotransferase, o qual confere resistência à droga genética, separados por uma sequência de ubiquitinação para o correto processamento das proteínas. Os genes foram clonados no sítio vazio, resultante da deleção da maior parte das proteínas estruturais prM e E do vírus, preservando-se completamente o gene da proteína C. No replicon, foi preservada a sequência dos 6 primeiros aminoácidos da proteína prM (sequência sinal da proteína C) e a sequência dos últimos 26 aminoácidos da proteína E (sequência sinal da proteína NS1). O segundo cístron é formado pela sequência IRES, do vírus da Encefalomiocardite (EMCV), para tradução interna, seguido da região que codifica as proteínas não estruturais do vírus da febre amarela. As UTRs 5' e 3' foram também preservadas (OLIVEIRA, 2011). Essa construção possibilita a triagem de compostos antivirais devido à possibilidade de monitoração da atividade da luciferase de maneira dependente da replicação das proteínas não estruturais do YFV. Através do uso deste sistema realizou-se a triagem de 5200 extratos naturais pertencente a uma coleção de Amostras para Bioensaios - COLAB do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ-MG, fornecidos gentilmente pela Dra. Tânia Alves do Laboratório de Química de Produtos Naturais. Cada ensaio analisou 80 extratos diferentes e é a característica de triar em larga escala que torna o ensaio um método promissor. Utilizaram-se duas concentrações padrão, na primeira triagem utilizou-se uma concentração de 20 µg/mL em 100 µL de MEM completo, caso o extrato apresente uma redução de mais de 50% da atividade da luciferase, ele era retestado no dobro da concentração inicial (triagem secundária) e se novamente

apresentar o índice de inibição na mensuração da atividade da luciferase maior que 50%, este efeito inibitório era confirmado com o uso de um vírus repórter (YFV-GLuc). Das 65 placas testadas, ou seja, dos 5200 extratos naturais testados, obteve-se um total de 393 extratos inibindo mais de 50% da atividade do gene repórter, sendo que destes, 45 foram citotóxicos (Figura 16 e 17). Destes 393 extratos, 348 foram retestados com a concentração de 40µg/mL e apenas 94 deles apresentaram uma inibição maior que 50% da atividade da luciferase firefly (Figura 18).

Figura 15- Representação esquemática da análise dos 5200 extratos da biblioteca da COLAB Fiocruz/MG.

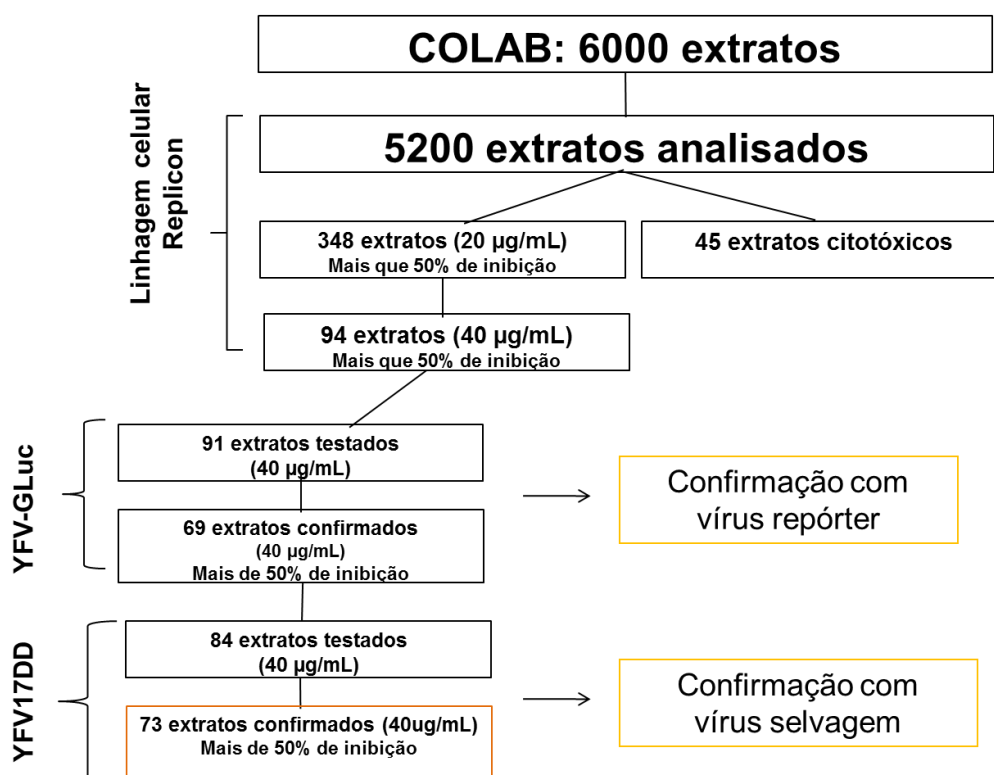


Figura 16- Distribuição percentual dos extratos que inibiram a atividade da luciferase após um tratamento de 48 horas, com 20 µg/mL, da linhagem BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES. *Total de extratos com inibição de mais de 50%: 393 extratos, sendo 45 citotóxicos.

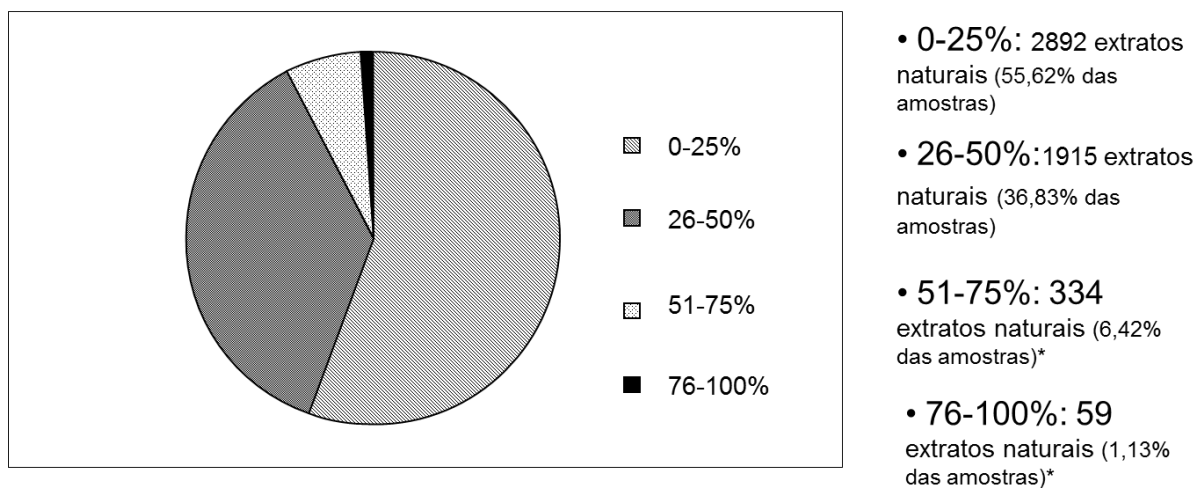
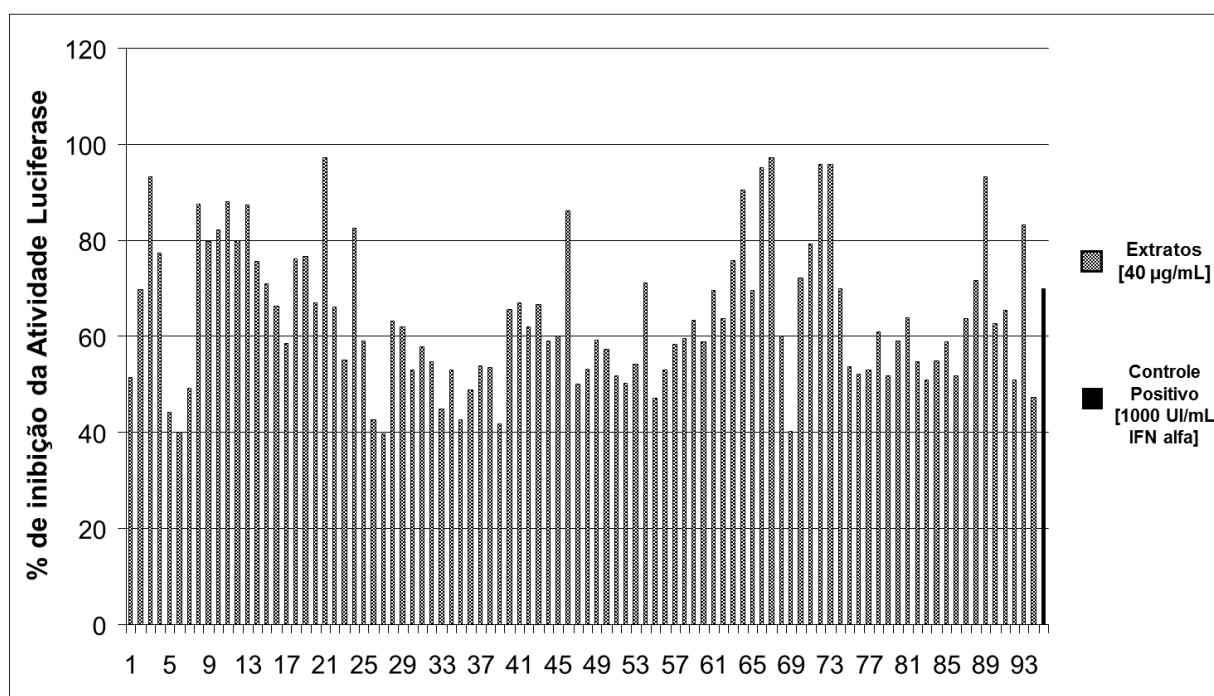


Figura 17- Análise da capacidade antiviral dos 94 substratos naturais selecionados a uma concentração de 40µg/mL após 48 horas de tratamento na linhagem celular BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES.

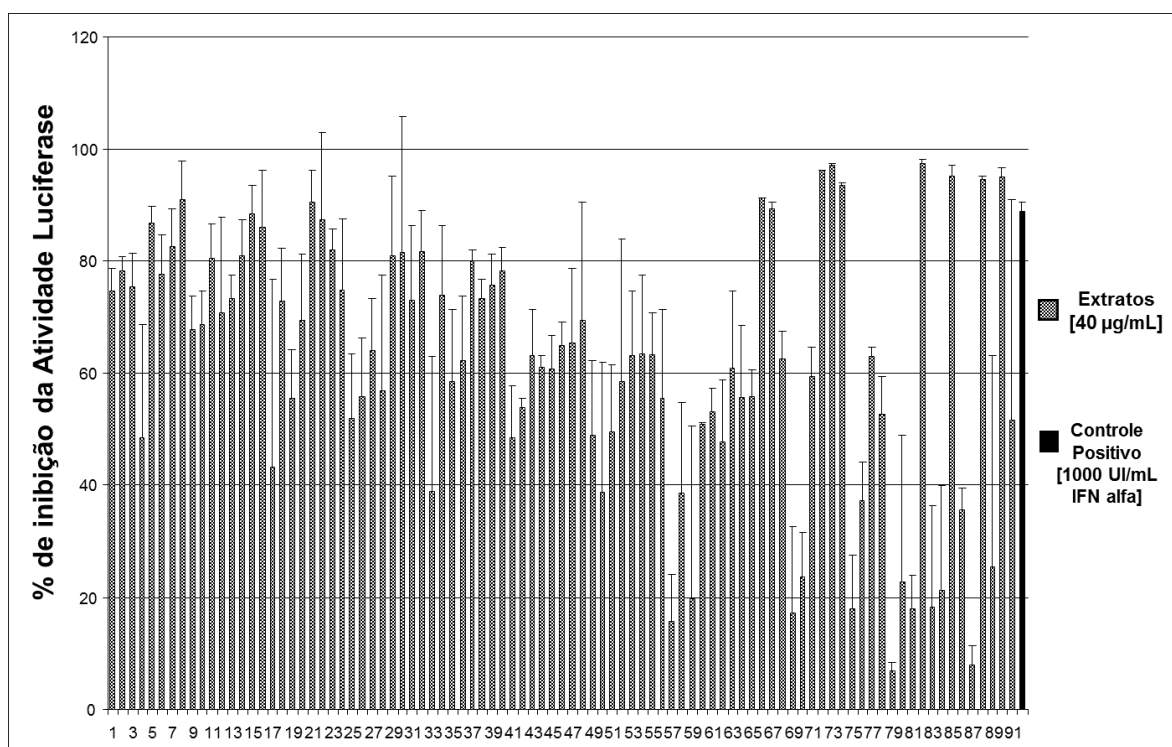


5.4 Confirmação da atividade antiviral utilizando o vírus recombinante YFV-GLuc

Dos 94 extratos selecionados a 40 µg/mL com o uso da linhagem celular BHK-21repYFV17D-LucNeoIRES, apenas 91 deles puderam ser testados quanto a sua capacidade de inibição da replicação do vírus YFV-GLuc, pois alguns não tinham a concentração suficiente disponível na COLAB.

Continuando com os testes, utilizou-se a mesma concentração de 40 µg/mL dos extratos em 100 µL de MEM completo. Esses extratos permaneceram por 48 horas em monocamadas de células BHK-21 infectadas por uma MOI de 0,1 do YFV-GLuc. Dos 91 extratos naturais testados, 69 deles mostraram uma resposta de cerca de 50% de inibição do gene repórter *Gaussia* Luciferase do vírus YFV-GLuc (Figura 19).

Figura 18- Análise da capacidade antiviral de 91 extratos naturais pré-selecionados em inibir a replicação do vírus da febre amarela repórter (YFV-GLuc) a uma concentração de 40 µg/mL.



Analisando as porcentagens de inibição resultantes dos testes na linhagem celular e com o vírus YFV-GLuc, foi observado que alguns dos extratos testados confirmaram um índice de inibição parecido ao encontrado na linhagem celular, outros inibiram um pouco menos. E tiveram, ainda, 12 extratos que demonstraram um percentual de inibição igual ou maior que o controle positivo, que é o YFV-GLuc incubado com 1000 UI/mL de IFN alfa. O controle positivo apresenta geralmente o percentual de inibição de 70 a 85% da atividade do gene repórter, seja ele firefly ou gaussia (Tabela 6).

Tabela 6 – Porcentagem de inibição da atividade da luciferase dos 94 extratos naturais, selecionados, com possível atividade antiviral contra o vírus da febre amarela

Linhagem Replicon			
Extrato	Vírus YFV-GLuc	20 ug/mL	40ug/mL
133	74,6	50,6±4	51,4
179	78,1	51,1±6	69,7
5071	75,3	51,3±0,7	93,1
5072	48,3	48±5,9	77,4
5073	86,6	65,4±3,5	44,1
5077	77,6	65,2±4	40
5078	82,7	45,4±1,2	49,3
5088	91,1	44,3±1,3	87,6
5091	67,7	43,9±2,2	79,7
5094	68,7	48,4±0,2	82,1
5104	80,4	44,9±0,5	88,1
5107	70,7	44,1±6,7	79,9
5117	73,4	45,4±4	87,2
5121	80,9	49,3±2,7	75,7
5124	88,3	48,5±3,2	70,9
5125	86,0	44,8±2,5	66,3
5126	43,1	54,6±1,9	58,6
5133	72,7	38,9±16,1	76,1
5143	55,4	49,3±1,7	76,7
5146	69,5	49,6±1,8	67
5150	90,5	77,5±1,6	97,4
5151	87,3	39,7±0,1	66,2

Linhagem Replicon

Extrato	Vírus		
	YFV-GLuc	20 ug/mL	40ug/mL
8146	81,9	57,6±25,8	55,2
8164	74,8	46,1±11,3	82,5
8179	51,9	54,5±12	59
8180	55,7	45,8±4,7	42,7
8187	64,1	48±7	39,8
8314	56,8	50,8±7	63,2
8355	80,9	70,3±4	62
8363	81,5	54,5±12,3	53
8630	72,9	53,6±4	57,8
8707	81,7	65,1±3	54,6
8896	38,9	62,5±28	45
9331	74,0	53,3±18	52,96
9332	58,5	59,4±0,2	42,72
9419	62,2	65,4±19,5	48,87
9627	80,0	60,9±7,6	53,94
9628	73,3	53,5±4,9	53,44
9629	75,7	50,6±2,9	41,81
9630	78,1	70,8±8,5	65,7
9635	48,3	57±5,8	67,18
9636	53,8	50,9±0,1	62,06
9637	63,1	59,4±17	66,7
9638	61,1	59,9±4,9	59,03
9642	60,6	73,9±7,4	60,02
9658	64,9	57,8±23,8	86,03
9659	65,2	63,3±3,6	50,01
9783	69,4	59,1±14,8	53,22
9810	49,0	55,6±10	59,21
9818	38,8	53±14	57,32
9831	49,6	80±9,5	51,73
9832	58,5	59,3±2,4	50,24
9839	63,1	80,1±9,5	54,07
9840	63,4	59,3±2,4	71,34
9841	63,3	57,7±3,7	47,17
9855	55,4	59±2,3	53,01
9863	15,6	55,6±19,7	58,36
9878	38,5	58,5±38	59,58

Linhagem Replicon

Extrato	Vírus YFV-GLuc	20 ug/mL	40ug/mL
9879	19,7	81,2±18,3	63,38
10119	50,7	45±9,5	58,67
10128	53,0	32±27	69,61
10130	47,6	26,7±15,8	63,76
10196	60,8	64,2±15	75,76
10197	55,7	78,6±3,8	90,41
10205	55,8	59,6±10,5	69,62
10209	91,1172*	69,7±35,9	95,2
10242	89,24122*	87,3±4,4	97,21
10635	62,6	53,8±14,9	60
10711	17,1	50,4±11,1	40,3
10718	23,6	61,9±12,6	72,3
10850	59,3	77,2±1,8	79,3
11491	96,1	59,5±3,6	95,88
11513	97,1	92,9±5,9	95, 90
11596	93,5	97,1±0,1	69,9
11598	17,9	52,4±7,5	53,6
11620	37,2	55,3±3,5	52,1
11682	62,9	53,5±28,6	52,9
11684	52,7	63,8±11,7	61,0
11686	6,9	52,4±15,4	51,8
11695	22,7	50,8±17	59,0
11703	17,9	56,8±24,2	63,8
11950	97,3	52,1±29,9	54,7
12003	18,3	60±3,6	51,0
12005	21,3	52,5±23	55,0
12015	95,0	62±3	58,7
12017	35,6	59,4±3	51,7
12131	7,8	76,5±4	63,6
12139	94,6	74,3±4	71,8
12403	25,3	53,9±3	51,09
12511	94,9	65,83±11,7	83,11
12610	51,5	54,2±15,5	47,4
C3 (25ug/ml)	EM FALTA	56,6±8,3	62,7
C5 (25ug/ml)	EM FALTA	58,6±2,6	65,4

*Citotóxico

5.5 Confirmação da atividade dos extratos naturais frente aos vírus selvagens YFV17DD e DENV2

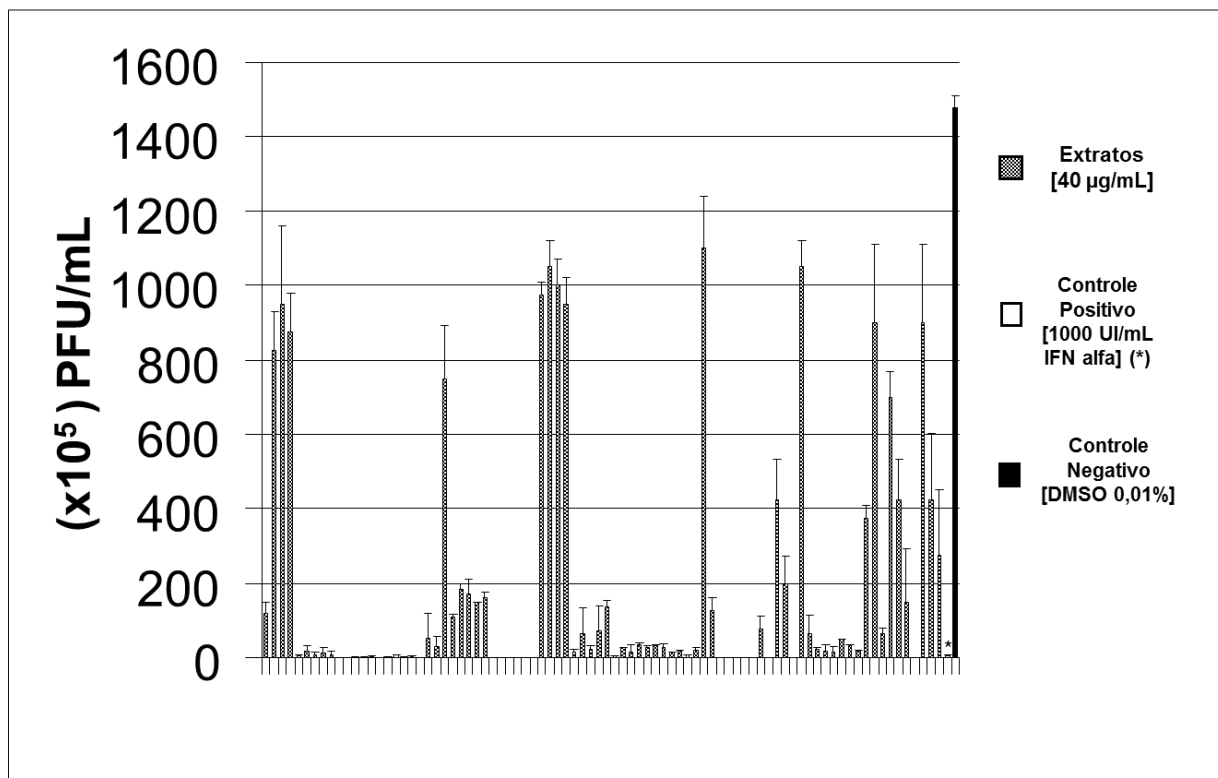
Os extratos naturais selecionados pela triagem, em larga escala, na linhagem celular BHK21-rep-YFV17D-LucNeoIRES e confirmados por ensaio utilizando o vírus repórter YFV-GLuc, foram testados com a cepa vacinal YFV17DD, infectando células BHK-21, num MOI de 0,3 e tratadas numa concentração de 40 µg/mL de cada extrato por 3 dias.

A figura 20 representa o resultado obtido deste teste, demonstrando o título de cada monocamada celular infectada e tratada com os extratos. O controle positivo, células BHK-21 tratadas com 1000 UI/mL de IFN alfa, em branco e com o asterisco (*), e o controle negativo, células BHK-21 tratadas com DMSO 0,01%, em preto. Os títulos estão expressos em 10^5 pfu/mL.

Os extratos que inibiram a replicação viral do YFV17DD em mais de 50%, ou seja, aqueles que apresentaram um título abaixo de $737,5 \times 10^5$ pfu/mL foram considerados confirmados para uma possível atividade antiviral contra o YFV17DD. Ao todo, dos 84 extratos testados com o YFV17DD, 73 demonstraram uma capacidade de inibir mais que 50% da replicação viral em relação ao controle negativo.

Os extratos (40 µg/mL) também foram testados em monocamadas de BHK-21 infectadas pelo DENV2, cepa 16681 (protótipo Tailândia), numa MOI de 0,3, durante 3 dias. Porém, as titulações ainda estão sendo feitas.

Figura 20- Análise da capacidade antiviral de 84 extratos naturais pré-selecionados em inibir a replicação da do vírus da febre amarela cepa 17DD a uma concentração de 40 µg/mL.



6. Discussão

Alguns flavivírus como o DENV, YFV, WNV, SLEV, ROCV e ILHV circulam em países tropicais e subtropicais como o Brasil e alguns são manipulados em níveis de biossegurança 3. Como alternativa, utiliza-se a construção de vírus quiméricos, por apresentarem atenuação, no qual possibilita sua manipulação em NB2. As quimeras YFV-ILHV, YFV-ROCV e YFV-SLEV foram construídas com sucesso, assim como a quimera YFV-WNV, construída anteriormente no Departamento de Virologia do CPqAM. Em nenhum momento houve a necessidade da manipulação dos vírus vivos, pois as sequências das proteínas prM/E foram obtidas no NCBI e sintetizadas comercialmente.

Na caracterização em cultivo celular, confirmou-se um atraso na taxa de replicação dos vírus quiméricos em relação ao vírus parental YFV17DD. Com 24 horas, pode-se observar uma velocidade equivalente entre as quimeras, mostrando a atenuação quando comparado ao vírus parental. No ponto de 48 horas de infecção, o vírus YFV 17DD chega ao maior pico de replicação viral e em seguida decai, de acordo com a mortalidade celular.

Os vírus quiméricos YFV-ILHV e YFV-ROCV também decaem seus títulos após 72 horas de infecção. Logo, o melhor momento para coletar estes vírus seria com 72 horas de infecção. O vírus quimérico YFV-SLEV foi o que demonstrou maior atenuação em sua cinética de replicação, pois mesmo após 72 horas o título ainda continuou aumentando. Talvez haja uma menor evasão da resposta imune celular ou uma adaptação do vírus no processamento e formação da partícula infectiva através da montagem do vírus utilizando proteínas heterólogas ao YFV, e na formação do envelope viral.

A análise fenotípica demonstrou uma diferença de tamanho das placas dos vírus quiméricos, em diâmetro, menor do que naquelas formadas pelo vírus YFV17DD, confirmando uma menor taxa de velocidade de replicação em relação ao vírus parental, como observado na curva de cinética de replicação viral. Análises de cinética viral para vírus quiméricos de YFV, com prM/E dos quatro sorotipos do DENV (ChimeriVax-DEN-1-4) demonstrou uma taxa de crescimento menor em células hepáticas como a HepG2 ou THLE-3, em relação ao vírus parental YFV17D. O mesmo não foi observado para essas quimeras em células

dendríticas, onde os títulos foram similares após 48 e 72 horas de infecção (~3 a 4,5 log (10) PFU/mL) (BRANDLER et al., 2005). Aqui, toda a manipulação foi feita em células BHK-21, seria necessário um estudo em outras linhagens celulares de organismos variados ou até mesmo com sistema de defesa antiviral deficiente. Talvez a velocidade de replicação seja diferente e confira títulos semelhantes ou muito distintos entre o vírus parental e os quiméricos.

As quimeras construídas neste trabalho serão muito úteis para estudos de patogenicidade e no monitoramento de circulação dos vírus WNV, ILHV, SLEV e ROCV no território brasileiro através de testes sorológicos utilizando-os como antígenos. Assim como no estabelecimento de vacinas para estes flavivírus através da formação de anticorpos neutralizantes frente à proteína E, a mais imunogênica dentre as proteínas estruturais. Esse tipo de vacina pode ser potencializada quando da inserção da proteína NS1 do vírus heterólogo ao YFV17D (ISHIKAWA et al., 2011). A grande importância da utilização de vírus quiméricos é devido a sua atenuação e consequentemente, a permissão da sua manipulação em NB2. Isso facilita o estudo e o emprego das ferramentas e protocolos que os envolvam, principalmente se tratando do SUS, que dispõe de poucos recursos e da impossibilidade da instalação de diversos laboratórios nível 3 de biossegurança em todo o Brasil.

O teste ELISA é o mais indicado para a realização de triagem sorológica de soros sanguíneos. Diversos protocolos para detecção de anticorpos por ELISA já foram descritos para flavivírus para triagem sorológica de vertebrados em larga escala, tais como aves (BLITVICH et al., 2003B), mamíferos domésticos (BLITVICH et al., 2003A), equinos (PAUVOLID-CORRÊA, 2011; 2014), répteis (PAUVOLID-CORRÊA, 2014) e humanos (CORDEIRO et al., 2009; CORDEIRO, 2012). O teste ELISA, apesar de ser um método rápido e sensível, pode gerar falsos negativos no caso de triagem sorológica de flavivírus devido à reação cruzada entre outros membros do mesmo gênero. O problema é maior em regiões em que vários flavivírus coexistem como na África, Ásia e no Brasil (CALISHER et al., 1989). Geralmente os resultados positivos são confirmados por meio do PRNT, padrão ouro em diagnóstico sorológico para flavivírus, teste capaz de mensurar a quantidade de anticorpos neutralizantes espécie-específicos em amostras de soro (CORDEIRO, 2012; JOHNSON et al, 2009). O PRNT também tem sido utilizado para a avaliação da imunidade protetora em vacinas candidatas

(HOMBACH et al., 2005; MONATH, 2002). Os soros equinos testados por meio do ELISA desenvolvido nesse trabalho mostraram um alto índice de reação cruzada entre o WNV e o ILHV, visto que, a maioria dos anticorpos neutralizantes mostrou ser específico ao ILHV, mesmo a triagem sendo específica para o WNV. Das 63 amostras positivas no ELISA de captura para WNV, apenas três foram validadas no PRNT para o mesmo flavivírus, logo o ELISA de captura não se mostrou específico para a triagem de WNV. A validação dos resultados no diagnóstico diferencial foi feita por PRNT e resultou em 27 amostras positivas para o ILHV, quatro para o ROCV, quatro para o SLEV. A evidência de anticorpos neutralizantes para WNV em equinos é inédita para o Estado de Pernambuco e até o momento nunca foi demonstrada evidência sorológica para esse flavivírus em nenhum vertebrado. Há ainda a corroboração dos resultados de evidências sorológicas em equinos para os ILHV, ROCV ou SLEV no Estado de PE, que segundo Platino e colaboradores (2014) há a presença desses vírus em macacos-prego, de cativeiro, no Nordeste brasileiro, inclusive em no Estado de Pernambuco. Esse fato demonstra a importância de um monitoramento das espécies de flavivírus em circulação no Brasil.

A utilidade dos vírus quiméricos em protocolos de diagnóstico diferencial por ELISA e validação através do teste de PRNT de flavivírus, foi comprovada e pode ser extrapolada para diagnóstico de qualquer outro vertebrado, inclusive humanos.

No segundo enfoque do trabalho, o de pesquisa de antivirais, relata-se que uma das dificuldades previstas em ensaios biológicos de triagem de antivirais que não utilizem o efeito citopático como agente identificador é o fato de existirem falsos positivos. Mas na triagem em larga escala, métodos tradicionais são laboriosos e inviáveis de se aplicar a um grande número de amostras. Como demonstrado anteriormente, a linhagem BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES mostrou grande sensibilidade na triagem de extratos naturais com possível atividade antiviral para o YFV (OLIVEIRA, 2011). Após duas triagens nas concentrações de 20 e 40 µg/mL dos extratos, chegou-se a um número de 94 extratos com possíveis atividades antivirais contra o YFV, provenientes de um total de 5200 extratos naturais pertencentes à COLAB. A diferença entre a triagem primária (20 µg/mL) e a secundária (40 µg/mL) está no fato de que na primária é feita em duplicata e a secundária, é feita apenas um poço para cada

extrato natural. Isso acontece devido à restrição da quantidade do extrato natural cedido pela COLAB. Essa falta de pelo menos uma réplica pode ser responsável pelo baixo número de amostras que passaram para a etapa de triagem seguinte, no qual se utiliza o vírus repórter.

Utilizou-se para a confirmação dos resultados obtidos na triagem com a linhagem celular contendo o replicon repórter o vírus recombinante YFV-GLuc. Com esse vírus foram retestados 91 extratos selecionados anteriormente pela linhagem celular e 69 deles confirmaram a inibição do gene repórter *Gaussia* Luciferase, de aproximadamente 50% ou mais, ou seja, 75,8% das amostras confirmaram a possibilidade de ter realmente propriedades antivirais contra o vírus da febre amarela, segundo esse teste.

A maior desvantagem nesse método, em geral, é a subestimação de compostos naturais que pudessem inibir a entrada do vírus na célula hospedeira, já que a triagem primária se dá numa linhagem celular que expressa um replicon, ou seja, avalia-se apenas a inibição da replicação viral, desse modo essa seria a principal vantagem conferida a ensaios que utilizem VLPs ou ainda vírus recombinantes (GOSH; BASU, 2008; KASSAR, 2013). Mas se tratando de praticidade, ensaios com VLPs são tão trabalhosos como os tradicionais e é inviável sua aplicabilidade em ensaios em larga escala (PATKAR et al., 2009).

Uma explicação plausível do porquê de alguns extratos naturais inibirem a replicação do vírus na linhagem celular, e não o vírus recombinante, é que apenas estão envolvidas na linhagem celular as proteínas não estruturais e a estrutural do capsídeo. Logo, na triagem utilizando o vírus repórter há a presença de todas as proteínas virais e desse modo o sistema de evasão da imunidade pode ser mais eficiente ou a montagem e liberação de partículas infectivas seja mais eficiente que a capacidade de inibição do extrato natural. Pode haver ainda aqueles que estejam inibindo o gene repórter Luciferase *firefly* e não consiga inibir a atividade do gene repórter *Gaussia* luciferase. Alguns extratos mostraram uma inibição menor que 50%, mas em todo caso demonstraram ainda uma taxa de inibição do gene repórter, mesmo que menor que a esperada, como foram observados nos extratos 8896, 9818 e 9878 que antes apresentavam mais de 50% de taxa de inibição, porém no teste com o YFV-GLuc apresentaram apenas cerca de 38% de inibição da atividade do gene repórter.

O teste com o YFV17DD demonstrou uma maior certeza de que os extratos naturais selecionados podem conter agentes antivirais contra o YFV. Dentre os extratos testados, alguns deles inibiram totalmente a atividade replicativa viral, ou seja, após 72 horas de infecção não foi encontrado nenhum título viral. O mesmo teste foi feito para o DENV2, mas está em fase de finalização.

Mesmo com algumas não confirmações, o teste de triagem de extratos naturais, em larga escala, para YFV mostrou-se bastante promissor. Esse fato confirma a utilização de replicons repórteres com êxito na triagem de antivirais para flavivírus. Diversos inibidores com alvo nas proteínas não estruturais vêm sendo identificados através de sistemas utilizando ensaios baseados na replicação viral (LIM et al., 2013). Testes por infecção com o DENV ou replicons do DENV têm sido utilizados para identificar compostos que inibam a replicação do DENV, com alvo na NS4B (JULANDER, 2013; PATKAR et al., 2009; UMAREDDY et al., 2006).

E em continuidade ao processo de testes, em colaboração com o Departamento de química natural do CPqRR/Fiocruz-MG, os extratos serão submetidos a fracionamento e estudo das frações para se averiguar a atividade antiviral contra o YFV. Para posteriormente, através de técnicas específicas, analisar as moléculas que compõem os extratos naturais para, a seguir, produzir sinteticamente as futuras drogas. Alguns extratos testados são de ambientes com condições extremas e de difícil acesso, mas que se mostraram bastantes promissores na supressão da replicação do YFV (FURBINO et al., 2014) e outros são da flora da Amazônia brasileira (COSTA et al., 2015).

Logo, a plataforma de triagem de extratos naturais contra o YFV, desenvolvida nesse trabalho, pode acelerar muito a descoberta de possíveis drogas antivirais contra flavivírus.

7. Conclusões

7.1 Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento de ferramentas para o uso em diagnóstico diferencial

- A técnica de clonagem por recombinação homóloga em levedura é eficiente na geração de vírus quiméricos de YFV17D expressando as proteínas prM/E do ILHV, ROCV, SLEV;
- Os vírus quiméricos construídos neste trabalho, YFV-ILHV, YFV-ROCV, YFV-SLEV e o construído anteriormente, YFV-WNV 3M, são capazes de infectar linhagens celulares eucarióticas de vários organismos, como mosquitos (C6/36) e *hamster* (BHK-21) e gerar partículas infectantes durante passagens sucessivas nas culturas celulares;
- Os vírus quiméricos YFV-ILHV, YFV-ROCV, YFV-SLEV demonstraram atenuação em relação ao vírus parental YFV17D, com cinética de replicação retardada e formação de placas com diâmetro reduzido;
- O protocolo de ELISA de captura foi eficiente para a triagem dos flavivírus WNV, ILHV, ROCV e SLEV em soros de equinos do Estado de PE utilizando os antígenos produzidos a partir do YFV-WNV 3M;
- O PRNT validou os resultados do ELISA de captura, demonstrando que há a provável circulação de WNV, ILHV, ROCV e SLEV no Estado de PE.

7.2 Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento de ferramentas para descoberta de novos antivirais contra flavivírus

- A linhagem celular BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres se mostrou eficiente na triagem em larga escala de extratos naturais com possível atividade antiviral contra o YFV;
- O vírus repórter YFV-GLuc é uma ferramenta eficiente na confirmação da provável atividade antiviral dos extratos naturais testados e triados pela linhagem celular BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres;
- Os extratos naturais selecionados podem realmente conter propriedades antivirais contra o YFV17DD, fato confirmado ensaio com o vírus selvagem.

8. Perspectivas

8.1 Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento de ferramentas para o uso em diagnóstico diferencial

- Finalizar o diagnóstico diferencial dos soros de equinos positivos no ELISA de captura para o YFV17DD e o DENV2 por PRNT;
- Analisar uma maior quantidade de amostras de soros equinos de diversos municípios do Estado de PE e de outros locais do Brasil;
- Extrapolar o sistema para triar soros de outros organismos, inclusive o homem;
- Utilizar os vírus quiméricos construídos neste trabalho como vetor vacinal para o ILHV, ROCV e SLEV no Brasil.

8.2 Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento de ferramentas para descoberta de novos antivirais contra flavivírus

- Avaliar a atividade antiviral dos 73 extratos selecionados para outros flavivírus;
- Continuar, em colaboração com o CPqRR – Fiocruz/MG, a análise da atividade antiviral das frações e moléculas de cada um dos 73 extratos selecionados;
- Triar outros extratos da COLAB e manter colaboração com outras bibliotecas de extratos naturais para ampliar o número de extratos estudados;

9. Referências Bibliográficas

AUBRY, F et al. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective, **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 114, p. 67-85, 2015.

AZEVEDO, R. S. S. et. al. Estudo Experimental sobre a patogenicidade do vírus Ilhéus em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). **Rev Pan Saúde**, Washington, v. 1, n.1, p.73-80, 2010.

BALEOTTI, F. G., MORELI, M. L., FIGUEIREDO, L. T. M. Brazilian Flavivirus phylogeny based on NS5, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 379-382, 2003.

BALEOTTI, F. G. et al. Brazilian *Flavivirus* Phylogeny Based on NS5. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n.3, p.379-382, 2008.

BATISTA, W. C. Mapeamento das Arboviroses do Estado de Rondônia. Tese (**Doutorado em Biotecnologia**) - Universidade Federal do Amazonas – Manaus, 2006.

BEASLEY, D. W. C. et al. Yellow Fever: Genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy, **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 115, p.48-70, 2015.

BELTRÁN, F. J. et al. Detección molecular de virus de encefalitis de saint louis en mosquitos de Buenos Aires, Argentina. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 74, p.433-436, 2014.

BERROCAL, L. et al. West Nile virus, ecology and epidemiology of an emerging pathogen in Colombia, **Revista de Salud Publica**, Bogotá, v. 8, n. 2, p. 218–228, 2006.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue, **Nature**, London, v. 496, p.504-507, 2013.

BLITVICH, B. J. et al. Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of West Nile Virus Antibodies in Domestic Mammals, **J Clin Microbiol**, Washington, v.41, n.6, p. 2676-2679, 2003A.

BLITVICH, B. J. et al. Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for detection of serum antibodies to West Nile in multiple avian species. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 41, p.1041-1047, 2003B.

BONALDO, M. C. et al. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines, **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, Austin, v. 10, n. 5, p.1256-1265, 2014.

BOSCH, I. et al. West Nile virus, Venezuela, **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.13, n. 4, p.651–653, 2014.

BOUGIE, I.; BISAILLON, M. The broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin as a substrate for a viral RNA capping enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, p. 22124-22130, 2004.

BRANDLER, S. et al. Replication of chimeric yellow fever virus-dengue serotype 1–4 virus vaccine strains in dendritic and hepatic cells, **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 72, n. 1, p.74-81, 2005.

BRAY, M. E LAI, C. J. Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 88, p.10342–10346, 1991.

BRINTON, M. A. Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus, **Viruses**, v. 6, p.13-53, 2013.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J. M. Antigenic relationships among flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal General Virology**, Rio de Janeiro, v. 70, p.37-43, 1989.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Saint Louis encephalitis**, 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/sle/>. Acesso em: 02 nov. 2010.

CHAMBERS, T. J. et al. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: Effects on proteolytic processing NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. **Journal of Virology**, Baltimore, v.67, p.6797-6807, 1993.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.44, p.649-688, 1990.

CHANCEY, C. et al. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus, **BioMed Research International**, Article ID 376230, in press, 2014.

CHANG, G. J. Molecular biology of dengue viruses. In: Gubler D J, Kuno G (Ed.). Dengue and Dengue and Hemorrhagic Fever. **CAB International**, New York, 1997, pp.175-198.

CRILL, D. W. E CHANG, G. J. J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **Journal of Virology**, Baltimore, v.78, n. 24, p.13975-13986, 2004.

CORDEIRO, M. T. Laboratory diagnosis for dengue. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v. 54, n. 18, p.S10-2, 2012.

COSTA, S.M. et al. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its

correlation to the immune response elicited in mice. **Virology**, New York, v. 358, n.2, p.413-423, 2007.

DÉGALLIER, N. et al. Modifications of arbovirus eco-epidemiology in Tucuruí, Para, Brazilian Amazônia, Related to the Construction of a Hydroelectric dam. In: Uren M F, Blok J, Manderson L H editores. **Arbovirus Research in Austrália**. Brisbane, 1992, pp. 393.

DIAZ, L. A. et al. West Nile virus in birds, Argentina, **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 4, p. 689–691, 2008.

EIDSON, M. et al. The West Nile Virus Avian Mortality Surveillance Group. Crow Deaths as a Sentinel Surveillance System for West Nile Virus in the Northeastern United States, 1999. **Emerg Infect Dis(CDC)**, Atlanta, v. 7, n. 4, p.615-620, 2001.

ERIKSSON, B. et. al. (1977) Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 11, p.946-951, 1977.

FALGOUT, B.; CHANOCK, R.; LAI, C.J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 63, n.5, p.1852-1860, 1989.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, p.1643-1649, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, p.15-20, 1999.

FORAL, T. M. et al. Fluorescent antibody test for rapid detection of West Nile virus antigen in avian tissues. **Avian Diseases**, Amherst, v. 51, p.601–605, 2007.

GABRIELSEN, B. Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.55, n.11, p.1569-1581, 1992.

GARDNER, C. L. E RYMAN, K. D. Yellow Fever: A Reemerging Threat. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia v. 30, p.237-260, 2010.

GARY, L. D. Current therapy for chronic hepatitis C., **Gastroenterology**, Baltimore, v.118, p.S104-S114, 2000.

GHOSH, D. E BASU, A. Present perspectives on flaviviral chemotherapy. **Drug Discovery Today**, London, v. 13, n.13/14, p.619-624, 2008.

GOODELL, J. R. et al. Identification of compounds with anti-West Nile virus activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Bethesda, v. 49, p.2127-2137, 2006.

GRITSUN, T. S. Tick-borne encephalitis. **Antiviral Res.**, Amsterdam, v. 57, n.1-2), p.129-46, 2003.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: Its history and resurgence as a global health problem. In: **Dengue and Dengue and Hemorrhagic Fever** (D. J. Gubler & G. Kuno, eds.), New York: CAB International, 1997, pp. 1-22.

GUBLER, D. J.; KUNO, G; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: **FIELDS' Virology**, ed 5. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp 1154-1252.

GUIRAKHOO, F. et al. Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. **Human Vaccine**, Cambridge, v. 2, n. 2, p.60-67, 2006.

GUY, B. et al. Preclinical and clinical development of YFV 17d-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. **Vaccine**, Guildford, v. 28, p.632-649, 2010.

HAYES, C. G. West Nile fever. In: Monath (Ed.), **The arboviroses: epidemiology and ecology**. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla, 1988, pp. 59-88.

HENCHAL, E. A. et al. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, Whashington, v. 3, n. 4,p.376-396, 1990.

HEINZ, F. X., STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, Guildford, v. 30, p.4301-4306, 2012.

HOGREFE, W. R. et al. Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus- and other flavivirus-specific antibodies. **J Clin Microbiol**, Bethesda, v. 42, p. 4641–4648, 2004.

HOMBACH, J. et al. Report on a WHO consultation on immunological endpoints for evaluation of new Japanese encephalitis vaccines, WHO, Geneva, 2-3 September, 2004, **Vaccine**, Guildford, v. 23, p.5205-5211, 2005.

IVERSSON, L. B., TIRIBA, A. C. Encefalite por arbovírus: Rocio. In: Veronesi R, Focaccia R, Dietze R (EDS). **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, v. 8, 1991, pp.166-173.

JULANDER, J. Experimental therapies for yellow fever. **Antiviral Research**, Baltimore, v. 97, p.169-179, 2013.

KARABATSOS, N. Internacional Catalogue of Arboviruses.Including certain other viruses of vertebrates. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, San Antonio-exas, v. 3, p.1071-1076, 1985.

KHROMYKH, A. A. Replicon-based vectors of positive strand RNA viruses. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, London, v. 2, p. 555-569, 2000.

KASSAR, T. C. Construção e Caracterização de vírus recombinante de febre amarela expressando o gene repórter da gaussia luciferase. (**Mestrado em Saúde pública**) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

KOMAR, N. E CLARK, G. G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean, **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 19, n.2, p.112–117, 2006.

KOONIN, E. V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 74, p. 733-740, 1993.

KOOP, A. et al. Provenance and geographic spread of St. Louis encephalitis virus. **mBio**, 4:e00322-13, 2013.

KÜMMERER, B. M. The Molecular Biology of Yellow Fever Virus. In: Molecular Biology of Flavivirus. **Horizon Bioscience**, Norfolk, 2006, pp.1-16.

KUNO, G. et. al. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal Virology**, Baltimore, v. 4, p.73–83, 1998.

LI, G. et al. Yellow fever virus infection in Syrian golden hamsters: relationship between cytokine expression and pathologic changes. **International Journal of Clinical Experimental Pathology**, Hamilton, v.1, p.169-179, 2008.

LIM, S. P. et al. Ten years of dengue drug discovery: Progress and prospects, **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 100, p.500-519, 2013.

LINDENBACH, B. D. et al. Flaviviruses in: **FIELDS' Virology**, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, v. 6, p.712-746, 2013.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: **FIELDS' Virology**, ed 5. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp.1101-1152.

LINDENBACH, B. D. E RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 73, p.4611-4621, 1999.

LOPES, O. S. et. al. Emergence of new arbovirus disease in Brazil. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 104, n.5, p.444-449, 1978.

MAEDA, A. E MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection, **The Veterinary Journal**, v. 195, p.33-40, 2013.

MACKENZIE, J. Wrapping things up about virus RNA replication. **Traffic**, Exeter, v. 6, p.967-977, 2005.

MALAN, A. K. et al. Detection of IgG and IgM to West Nile virus. Development of an immunofluorescence assay. **American Journal of Clinical Pathology**, Baltimore, v. 119, p. 508–515, 2003.

MARLENEE, N. L. et al. Detection of antibodies to West Nile and Saint Louis encephalitis viruses in horses. **Salud Publica Mex**, México, v. 46, n. 5, p.373-375, 2004.

MATTAR, S. et al. Seroconversion for West Nile and St. Louis encephalitis viruses among sentinel horses in Colombia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n.8, p.976-979, 2011.

MCCORMICK, J. et al. Lassa fever. Effective therapy with ribavirina. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 314, p.20-26, 1986.

METTLER, N. E. et al. Flavivirus: serological survey in horses from the Tandil area. **Rev Argent Microbiol**, Buenos Aires, v.17, n.1, p.47-49, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância Epidemiológica da Febre Amarela**. Brasília, 2004, pp. 63.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Febre Amarela. Brasília - DF, Brasil, 2008. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/index.php>. Acesso em 20 maio 2008.

MONATH, T. P. Treatment of yellow fever. **Antiviral Research**, Amsterdam, v.78, n. 1, p.116–124, 2008.

MONATH T P et. al. Diagnosis of flavivirus Infection. **USA Pat. 6.682.883**, 4p, 2004.

MONATH, T. P. Japanese encephalitis vaccines: current vaccines and future prospects. **Curr Top Microbiol Immunol**, Berlin, v. 267, p.105-138, 2002.

MONDINI, A. et al. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 13, n.1, p.176-178, 2007.

MORALES, M. A. et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006, **Emerging Infectious Diseases**, San Francisco, v. 12, n.10, p.1559–1561, 2006.

NAGARKATTI, P. S. E NAGARKATTI M. Comparison of haemagglutination (HI) and indirect fluorescent antibody (IFA) techniques for the serological diagnosis of certain flavivirus infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 83, p.115–117, 1980.

NASSAR, E. S. Human disease caused by an arbovirus closely related to Ilheus virus: report of five cases, **Intervirolgy**, New York, v.40, p. 247-252, 1997.

NESTOROWICZ, A.; CHAMBERS, T. J.; RICE, C. M. Mutagenesis of yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: Effects on proteolytic processing of the NS2A protein. **Virology**, New York, v. 199, p.114-123, 1994.

NGUYEN, N. M. et al. A randomized, Double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. **Journal of Infectious Diseases**, Washington, v. 207, n. 9, p. 1442-1450, 2012.

NOUEIRY, A O et al. Identification of Novel Small-Molecule Inhibitors of West Nile Virus Infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p.11992-12004, 2007.

OJWANG , J. O. et. al. Broad-spectrum inhibitor of viruses in the Flaviviridae family. **Antiviral Research**, Amsterdam, v.68, n.2, p.49-55, 2005.

OLDENBURG, K. R. et al. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 451-452, 1997.

OLIVEIRA, A. G. Desenvolvimento e aplicação biotecnológica de replicons repórteres para triagem de drogas antivirais contra o vírus da febre amarela. **Dissertação** (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011, pp.111.

PASTORINO, B. et al. Role of host factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 87, p.281-294, 2010.

PATKAR, C. G. et al. Identification of inhibitors of yellow fever virus replication using a replicon-based high-throughput assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 10, p.4103-4114, 2009.

PAUVOLID-CORREA, A. e VARELLA, R. B. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo, **Rev Bras Epidemiol**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 463-72, 2008.

PAUVOLID-CORREA, A. et al. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolandia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p.829-833, 2010.

PAUVOLID-CORREA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p.467-474, 2011.

PAUVOLID-CORREA, A. et al. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flavivirus in Equines of the Pantanal, Brazil, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e2706, 2014.

PIERSON, T. C. E DIAMOND, M. S. (2013) Flaviviruses in: **Fields' Virology** (2013) Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, v. 6, 2013, pp.747-794.

PINHEIRO, F. P. et al Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belém, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, Washington, v. 30, n.1, p.145-8, 1981.

PLATINO, O. L. et al. (2014) Levantamento soroepidemiológico para arbovírus em macaco-prego-galego (*Cebus flavius*) de vida livre no Estado da Paraíba e em macaco-prego (*Cebus libidinosus*) de cativeiro do Nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34, p.1-7, 2014.

PU, S. Y. et al. Successful Propagation of Flavivirus Infectious cDNAs by a Novel Method To Reduce the Cryptic Bacterial Promoter Activity of Virus Genomes, **Journal of Virology**, New York, v. 85, n. 6, p. 2927–2941, 2011.

PUGACHEV, K. V. et al. High fidelity of yellow fever RNA polymerase, **Journal of Virology**, New York, v. 78, p.1032-1038, 2004.

PUIG-BASAGOITI, F. et. al. Triaryl Pyrazoline Compound Inhibits Flavivirus RNA Replication. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 50, n. 4, p.1320-1329, 2006.

QUEIROZ, S. R. A. et. al. Construction of yellow fever virus subgenomic replicons by yeast-based homologous recombination cloning technique. **Anais da Acad Bras de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 159-168, 2013.

QUING, M. et al. Characterization of dengue virus resistance to brequinar in cell culture. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n.9, p. 3686-3695, 2010.

RANKIN, J. T. et al. Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirina against reovirus. **Virology**, New York, v.168, p.147-158, 1989.

RAY, D. E SHI, P. (2006) Recent Advances in Flavivirus Antiviral Drug Discovery and Vaccine Development. **Rec Pat on Anti-Inf Drug Disc**,v. 1, p.45-55, 2006.

REISEN, W. K. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. In: Maramorosch K, Murphy FA, Shatkin AJ, editors. **Advances in virus research**, San Diego, Academic Press, v. 61, 2003, pp.139-83.

ROCCO, I. M. et. al. St. Louis Encephalitis Virus: First Isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Revista Inst. Medicina tropical**, São Paulo, v. 47, n.5, p.281-285, 2005.

RODRIGUES, S. G. Epidemiologia do vírus da encefalite Saint Louis na Amazônia brasileira e no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: elevada prevalência de anticorpos em equinos. **Rev Pan-Amaz Saude**, Washington, v. 1, n.1, p.81-86, 2010.

ROEHRING, J. T., HOMBACH, J.; BARRETT, A. D. T. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. **Viral Immunol**, New York, v. 21, p.123-32, 2008.

ROEHRIG, J. T. Immunochemistry of dengue viruses. In: Gubler D J, Kuno G eds. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**, Cab International, New York, 1997, pp. 199-214.

ROSA, R. et al. Isolation of Saint louis encephalitis vírus from a horse with neurological disease in Brasil. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 7, e2537, 2013.

SALL, A. A. et al. Yellow Fever vírus exhibits slower evolutionary dynamics than dengue vírus. **J. Virol**, Baltimore, v. 84, p.765-772, 2010.

SANTOS, J. J. S. et al. Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n.8, p. 983-991, 2013.

SANTUCCI, S. G. Febre amarela - Informações para profissionais da saúde, 2008. [online] Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/index.html>. Acessado em 03 mai 2008.

SAXENA, D. et al. Development and evaluation of NS1 specific monoclonal antibody based antigen capture ELISA and its implications in clinical diagnosis of West Nile virus infection, **Journal of Clinical Virology**, Washington, v. 58, p.528-534, 2013.

SILVA, J. R. **Pesquisa de infecções por flavivírus da Encefalite Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por inquérito sorológico e isolamento viral. São Paulo**. Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2010, pp. 20-40.

SILVA, L. C. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil, **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 7, p.921–923, 2013.

SIMONI, I. C. Tratamentos Antivirais (Palestra). Instituto Biológico - Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n.1/2, p.41-44, 2003.

SHANKS, R. M. et al. (2009) New yeast recombineering tools for bacteria. **Plasmid**, New York, v. 62, n. 2, p.88-97, 2009.

SOLOMON, T. (2000) Japanese encephalitis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, Philadelphia, v. 68, n. 4, p. 405–415, 2000.

STRAATMANN, A. et. al. Evidências Sorológicas da Circulação do Arbovírus Rocio (*Flaviviridae*) na Bahia. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 30, n.6, p.511-515, 1997.

SVOBODA, W. K. et al. (2014) Serological evidence for Saint Louis encephalitis vírus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Paraná

River basin region, Southern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v.47, n. 3, p.280-286, 2014.

TAN, B. H. et al. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. **Virology**, New York, v. 216, p.317-325, 1996.

TAURO, L. et al. Serological detection of St. Louis encephalitis virus and West Nile virus in equines from Santa Fe, Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 4, p.553-556, 2012.

TERZIAN, A. C. et al. Detection of Saint Louis encephalitis virus in Dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. **Vector Borne Zoonotic Dis**, Larchmont, v.11, p.291-300, 2011.

THEILER, M.; DOWNS, W. G. **The Arthropod-Borne Viruses of Vertebrates**. Yale University Press, New Haven, 1973.

VASCONCELOS, P.F. C. Febre Amarela. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v. 36, n.2, p.275-293, 2003.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. (1998) Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, editors. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**, 1998, pp. 72-99

WARD, M. P. Epidemic West Nile virus encephalomyelitis: A temperature-dependent, spatial model of disease dynamics. **Prev Vet Med**, Amsterdam, v.71, p. 253-64, 2005.

WENGLER, G. E WENGLER, G. An analysis of the antibody response against West Nile virus E protein purified by SDS-PAGE indicates that this protein does not contain sequential epitopes for efficient induction of neutralizing antibodies. **Journal of General Virology**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 4, p. 987-992, 1989.

WESTAWAY, E. G. Flavivirus replication strategy. **Advances in Virus Research**, New York, v. 33, p.45-90, 1987.

WHITEHEAD, S. S.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.5, p.518-528, 2007.

WHO. **Yellow Fever Vaccine**, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/vaccines/en/yellowfever.shtml> Acesso em: Março de 2013.

WHO. **West Nile virus – Brazil**, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/15-december-2014-wnv/en/> Acesso em: Janeiro de 2015.

YOUN, S. et al. (2013) Non-structural protein-1 is required for West Nile virus replication complex formation and viral RNA synthesis, **Virology Journal**, London, v. 10, p.339, 2013.

YU, I. M. et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, Washington, v. 319, p.1834–1837, 2008.

ZABEREZHNYI, A. D. The technology of recombinant infectious genomes in studies of RNA-containing viruses. **Mol Gen Mikrobiol Virusol.**, Moskva, v. 4, p.13-19, 2004.

10. Anexos

10.1 Artigo a ser submetido:

- 1- Amanda G O Carvalho^{1,3}; Andrea N M R da Silva¹; Sabrina R Almeida Queiroz¹; Giovani R Bertani²; Laura H V G Gil. **Development of a Novel Reporter Yellow Fever Virus Replicon Cell Line for High-Throughput Antiviral Compounds Screening.**

10.2 Artigos publicados:

1. FURBINO, LAURA E. ; GODINHO, VALÉRIA M. ; SANTIAGO, IARA F. ; PELLIZARI, FRANCIANE M. ; ALVES, TÂNIA M. A. ; ZANI, CARLOS L. ; JUNIOR, POLICARPO A. S. ; ROMANHA, ALVARO J. ; CARVALHO, AMANDA G. O. ; GIL, LAURA H. V. G. ; ROSA, CARLOS A. ; MINNIS, ANDREW M. ; ROSA, LUIZ H.. **Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula.** Microbial Ecology, v. 67, p. 1, 2014.

10.3 Artigo Aceito:

1. COSTA, M. ; VIEIRA, M. ; ZANI, CARLOS L. ; ALVES, TÂNIA M. A. ; JUNIOR, POLICARPO A. S. ; ROMANHA, ALVARO J. ; GIL, L. H. V. G. ; CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G. ; ZILLI, J. E. ; VITAL, M. J. S. ; ROSA, CARLOS A. ; ROSA, LUIZ H. . **Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant Carapa guianensis Aublet (Meliaceae).** Biochemical Systematics and Ecology, 2015.

Development of a Novel Reporter Yellow Fever Virus Replicon Cell Line for High-Throughput Antiviral Compounds Screening

Amanda G O Carvalho^{1,3}; Andrea N M R da Silva¹; Sabrina R Almeida Queiroz¹; Giovani R Bertani²; Laura H V G Gil^{1*}

¹Department of Virology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ, Recife, Brazil.

²Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

³Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Keywords: Yellow Fever Virus; Reporter Replicon Cell Line; Antiviral Screening

*Corresponding author: lgilfiocruz@gmail.com (Phone: 00 55-81-2101.2564)

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Pernambuco

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE - Brasil | CEP: 50.740-465

ABSTRACT

The yellow fever virus (YFV), the prototype of the flavivirus genus, causes a spectrum of illness ranging from unapparent infection to acute hemorrhagic disease that can be fatal. There is no specific treatment and prevention includes vaccination and measures of controlling mosquitoes. Traditional methods for antiviral screening are laborious, time-consuming and difficult to use in high-throughput assays. In this study, we developed a novel cell-based assay for screening antiviral compounds based on a bicistronic reporter selectable YFV replicon. The constructed bicistronic replicon encodes the capsid-luciferase-ubiquitin-neomycin phosphotransferase genes in the first cistron, and the second cistron is translated by encephalomyocarditis virus (EMCV) internal ribosome entry site (IRES) and encodes for YFV nonstructural genes (NS1-NS5). A stable cell line was subsequently developed and used to evaluate the antiviral properties of about 5200 natural substrates. The antiviral activity of selected natural extracts was confirmed by using a yellow fever reporter virus. More than 80% of selected substrates confirmed the antiviral activity against

YFV in cell culture. The presented reporter replicon cell line provides a powerful tool to facilitate screening for YFV inhibitors and the natural extracts identified can greatly impact in the identification and development of antiviral drugs against the YFV.

1. Introduction

The yellow fever (YF) is a viral hemorrhagic fever, often lethal, transmitted to humans through the bite of mosquitoes. This disease remains endemic in large parts of South America and Africa causing endemic outbreaks, mainly in urban areas adjacent to tropical forests (STAPLES; MONATH, 2008). In the world, according to World Health Organization (WHO), approximately 200,000 new cases occur each year, causing around of 30,000 deaths annually, 90% occurring in Africa. There are 40 countries at risk of infection by the yellow fever virus, a total of 900 million people are susceptible to disease in Africa and in the South America (WHO, 2014). The yellow fever virus (YFV) belongs to the Flavivirus genus of *Flaviviridae* family, represented by approximately 70 virus types, most of them transmitted by arthropods (GUBLER, 1997).

The YFV has a single-stranded positive sense RNA genome with approximately 11 Kb. It's similar to the mRNA of the host genome in all aspects including a 5' end cap structure but differing by the absence of the polyadenylated (poly-A) tail at 3'end. The precursor polyprotein is processed by viral and host proteases into ten mature viral proteins: three structural [capsid (C), pre-membrane/membrane (prM/M) and envelope (E)] and seven non-structural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

There is not a specific and effective antiviral therapy for the YFV infection and the only way to prevent the disease is the vaccination (MONATH, 2008). The constant risk of the reemergence of this disease leads the development of new tools for antiviral high-throughput screening. Several types of screening assays for antiviral compounds are primarily based on live viruses, virus-like particle (VLP) and viral replicons. Traditional tests are based on monitoring of replication inhibition by observing cytopathic effects, quantification of virus production by plaque assay, or by evaluating the replication of viral RNA by RT-

PCR. These tests are laborious, time consuming and therefore unsuitable for high-throughput screening (CHAMBERS, 1990; KHRAMYKH, 1997; 2000). The reverse genetics system in RNA virus has proven to be a powerful tool for investigations of the viral replication cycle; role of the viral proteins in the pathogenicity, development of vaccines, virus packaging and release of viral particle, and antiviral drug screening (ZABEREZHNYI, 2004). By cloning a reporter gene in the viral genome or in sub-genomic replicons is possible to measure the replication by analyzing the expression of the reporter gene, such as luciferase. In this way, the level of luciferase expression reflects viral RNA replication, and can be used to monitor the suppression of viral replication by potential inhibitors. Alternatively, stable cell lines containing such reporter replicons can be developed by also cloning into the replicon, the genes for resistance to certain drugs, like neomycin phosphotransferase gene. This type of reporter cell line is considered a suitable high-throughput method for the screening of large number of new antiviral drugs (ROSSI, 2005; NOUEIRY, 2007; MOLENKAMP, 2003).

Reporters replicons can also be used to produce VLPs (Virus-Like Particle), by packaging the replicon RNA with viral structural proteins supplied in trans. Packaging of replicons in VLPs can be generated by co-transfecting cells with the reporter replicon RNA and a plasmideal or a vector expressing viral structural proteins in trans (PATKAR, 2007). Some studies have succeeded in the expression of flavivirus structural proteins using the Sindbis or Semliki Forest viruses as vectors for expression of structural proteins in a trans-packaging systems for flavivirus replicons (KHRAMYKH, et. al. 1997). Hence, the infection of permissive cells with VLPs leads to expression of the reporter gene cloned into the packaged replicon. It is a safe method that generates a single cycle of infection, and can advantageously be used to screen for potential inhibitors of viral entry and replication at the same time. However, becomes impractical for large scale screening because of the difficulty of producing large quantities of VLPs with the same efficiency (KHRAMYKH, et. al. 1998; PUIG-BASAGOITI et. al, 2006).

In the present study, we have developed a high-throughput screening system to identify natural extracts of flora and mycota with antiviral properties

against yellow fever virus, based on the development of a cell line containing the yellow fever virus bicistronic reporter replicon.

2. Materials and Methods

2.1 Cells and virus

The baby hamster kidney (BHK-21) cells were maintained in MEM medium (Minimal Essential Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% of antibiotics (penicillin 10.000IU/mL and streptomycin 10.000 µg/mL, Gibco). The BHK21-repYFV17D-LucNeolres cells were kept under similar conditions with addition of 500 µg/mL of Geneticin® (Gibco) in the culture medium. A yellow fever virus 17D strain expressing the *Gaussia* Luciferase reporter gene was used to confirm the compounds antiviral activity (Kassar & Gil, manuscript in preparation).

2.2 Construction of YFV-17D bicistronic replicon (rYFV17D-LucNeolres)

The subgenomic bicistronic repYFV17D-LucNeolres was derived from the plasmid pBSC-YFV-17D-T7, which contains the YFV-17D strain genome cloned into a yeast/*E. coli* shuttle vector (Gil et al. unpublished data). The first cistron of the bicistronic replicon contains the firefly luciferase and neomycin phosphotransferase genes separated by a sequence of ubiquitination. These genes were cloned in place of the deleted structural proteins prM and E. The replicon was retained in the sequences encoding the first 6 amino acids of the prM protein and the last 26 amino acids of the protein E, both sequences are important for the correct processing of the C and NS1 proteins, respectively. The second cistron is formed by internal ribosome entry site (IRES) of the encephalomyocarditis virus (EMCV), followed by the region encoding non-structural proteins of yellow fever virus (NS1-NS5) (Figure 1). A monocistronic replicon, rep-YFV17D-Luc was utilized as a positive control for expression of luciferase gene (QUEIROZ, 2013).

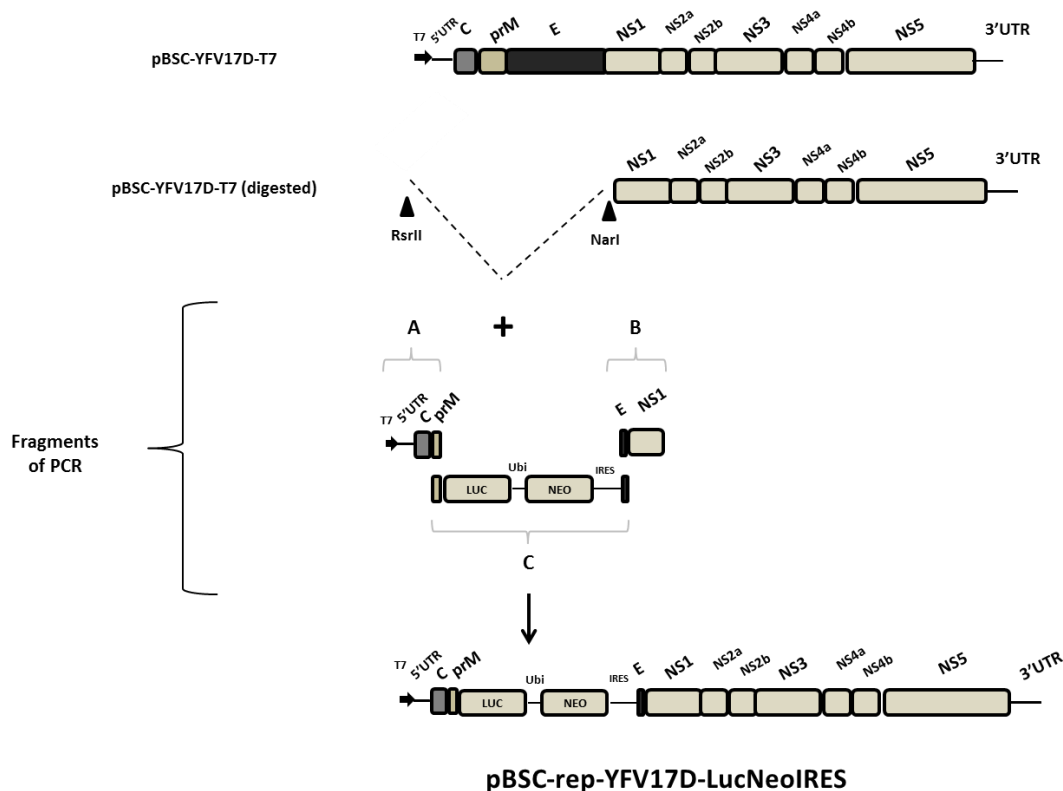


Figure 1 - Schematic representation of the yellow fever virus 17D genome and replicon.

The generation of the bicistronic replicon rep-YFV17D-LucNeoIres was based on homologous recombination (in yeast) between three PCR products and the plasmid vector pBSC-YFV-17D-T7 previously digested with NarI and RsrII restriction enzymes (New England Biolabs, Ipswich, MA). The first fragment (A) with 549 bp was amplified with the primers pBSC-RsrII-T7-5'-YFV-F and PrM/Cap-R (Table 1) and contains the sequence of T7 promoter, the 5'UTR region, the complete sequence of capsid protein and the first 18 nucleotides of the prM protein. The second fragment (B) with 3.362 bp was amplified with the primers YFV-Luc-Neo-F and EMCV-YFVc'Env-R (Table 1) and contains the first 18 nucleotides of the prM protein, the reporter gene luciferase firefly, the ubiquitination region, the sequence of neomycin phosphotransferase gene, the EMCV IRES followed by the ATG start codon and 25 nucleotides of the c-terminal sequence of E protein. The fragment (C) with 614 bp was amplified with the primers YFV-2375-F and YFV-2980-R (Table 1) and contains the signal sequence of the c-terminal region of E protein with 78

pb and the first 536 nucleotides of NS1 protein. The fragment A and C were amplified from the pBSC-YFV-17D-T7 plasmid and the fragment B was amplified from pBSC-LNBr plasmid, a vector carrying a bicistronic BVDV replicon (kindly provided by Dr. Ruben O. Donis, CDC Influenza Division, Atlanta, USA) (Figure 01). Oligonucleotides for PCR amplification and homologous recombination in yeast (Table 1).

Table 1- Oligonucleotides used on the construction of YFV17D bicistronic replicon

Fragment	Oligonucleotide	Sequence (5'-3')
A	pBSC-RsrII-T7- 5'-YFV-F	CAAGCATGTAAATATCGTTTGAGTTCGGTC CGTAATACGACTCACTATAGAGTAAATCCT GTGTGCTAATTGAGG
A	PrM/Cap-R	TTTCCGCACCAAGGTCACTC
B	YFV-Luc-Neo-F	CGGTGGAGTGACCTTGGTGCGGAAAATGG AAGACGCCAAAAACATAAAG
B	EMCV-YFVc'Env- R	TCATGGACATTGTCATGTTTCTTGTcatGGT ATTATCGTGTTTTTCAAAGG
C	YFV-2375-F	ACAAGAAACATGACAATGTCC
C	YFV-2980-R	CAGTCTATGGTGTATTCAAAG

The PCR fragments with 25bp overlapping sequences and digested vector were used to transform competent yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain RFY206 by lithium acetate (LiOAc) method (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). After transformation, yeast cells were inoculate on plates containing YNB (Yeast Nitrogen Base) solid in the absence of tryptophan (trp) and incubated at 30° C for three days. Positive colonies were grown in 20 mL of YNB liquid

medium in the absence of trp for 16 hours at 30°C under agitation at 130 rpm. The extraction of plasmid DNA was performed as described in the manufacturer's instructions (Plasmid Midi Kit, QIAGEN). The positive clones were confirmed by PCR with the two primers sets: 1- pBSC-RsrII-T7-5'-YFV-F and EMCV-YFVc'Env-R, amplified an amplicon of the 3253 bp, and 2- YFV-Luc-Neo-F and YFV-2980-R amplified an amplicon of the 3320 bp (Tabela 1).

2.3 *In vitro* RNA transcription and transfection

DNA template for *in vitro* transcription of the rep-YFV17D-LucNeolres genome were produced by PCR amplification of the region containing the bacteriophage T7 promoter and the entire replicon genome using KlenTaq polymerase (Clontech). To ensure a high quality DNA, full-length PCR product were purified by phenol-chloroform, ethanol precipitated and then *in vitro* transcribed using MegaScript T7 kit (Ambion) supplemented with a 7mG(ppp)G cap analogue (Ambion), following the manufacturer's recommendations.

The *in vitro*-transcribed RNA were transfected into BHK-21 cells by electroporation. 2×10^6 BHK-21 cell were trypsinised and washed with ice-cold 1X PBS, resuspended in 100 μ L Cytomix solution (Ansari et. al., 2004) and mixed with 20 μ g of transcribed RNA. Electroporation was performed in 2 mm cuvettes, under the following conditions: 600V, 99 milliseconds, 5 pulses, 1 second of interval (ECM BTX eletro cell manipulator 830™, BTX, Holliston, MA). After electroporation, cells allowed to recover for five min at room temperature and resuspended in 7 mL of complete growth medium. Replicon-electroporated cells were monitored on days 1-4 after electroporation by indirect immunofluorescence to detect viral protein expression. For this purpose, transfected cells were fixed with cold acetone at -20°C for 5 min and incubated at 37°C for 1 h with a 1:100 dilution of a hyperimmune ascitic fluid raised against group B flaviviruses (Instituto Evandro Chagas-MS, Brazil), rinsed with PBS, and again incubated with 1:100 dilution of a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Sigma-Aldrich) at 37°C for 1 h. Following final washing, dry and mounting, cells were visualized with a DMI 4000B fluorescence microscope (Leica).

2.4 Development of cell line BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres

After electroporation, the cells containing the replicon rep-FA17D-LucNeolres were maintained in 6 well plates for 10 days. During this interval the cells were washed with 1X PBS and complete MEM medium with 600 mg/mL Geneticin® (Gibco), added every 24 hours, to select resistant cells. Subsequently, these selected cells were cloned by limiting dilution, and clones were selected by high luciferase activity and indirect immunofluorescence assay. The cells clones were expanded and stored in liquid nitrogen until subsequent use.

2.5 Luciferase activity assay

The luciferase reporter gene activity was measured in replicon-transfected cells using Luciferase 1000 Assay System (PROMEGA) as recommended by the manufacturer. The measurement was held using a Berthold Mithras LB 940 and the light intensity were expressed in raw lights units (RLU).

2.5.1 Characterization of BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres cell line

The growth curve and luciferase time curve expression of chosen cell clone was monitored over a period of 5 days. BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres cells were plated in duplicate on 6 well plate at initial density of 1×10^5 cells/per well. Cell concentration, viability and luciferase activity were monitored every 24 hours. The viable cells were measure using Vi-Cell automated Cell Viability Analysis (Beckman Coulter) and luciferase activity was monitored as described above.

2.6 High-Throughput Screening of antiviral drugs against the yellow fever virus

2.6.1 Inhibition of bicistronic reporter YFV replicon replication by interferon alpha treatment

BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres cells were plated 24-well plates at 5×10^4 cells/well and treat with 100 or 1000 IU/mL of Human Interferon Alpha-2b (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba) during 3 days. Every 24 hours the culture

medium was changed in order to keep the drug activity. The luciferase activity was measured at 24, 48 and 72 hours after initial interferon treatment.

2.6.2 Natural extracts to test as antiviral compounds

The substrates used in this work belong to the Collection of Samples for Bioassay - COLAB from the Research Center René Rachou / FIOCRUZ-MG, kindly provided by Dra. Tania Alves from the Laboratory of Chemistry of Natural Products. Each plate stores 80 different substrates from flora and mycota.

2.6.3 High-Throughput Screening of substrates inhibitors of yellow fever virus

To perform the screening of antiviral compounds, the BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres cells were seeded in 96-well plate at the density of 2×10^4 cells per well. After 24 hours, the culture medium containing 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of G418 was removed and then replaced with complete MEM containing 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each natural extract diluted in Milli Q $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ DMSO, characterizing the initial analysis. As a positive control, cells were treated with 100 μL of MEM containing 1000 IU/mL of IFN α -2b, and as a negative control, cells were treated with complete MEM only containing 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of G418. All assays were performed in duplicate. The cells morphology and viability were analyzed every 24 hours through optical microscope during all incubation time. After 48 hour of incubation, the cells were lysed in 20 μL of 1X lysis buffer (Luciferase Cell Culture Lysis 5X Reagent, PROMEGA) for 5 minutes. For the luciferase assay was used 20 μL of cell lysate and 100 μL of the substrate luciferin using Luciferase 1000 Assay System (PROMEGA). The reading was done using luminometer Berthold Mithras LB 940, and the resulting values expressed in raw lights units (RLU). The values obtained in the treatment with the natural extracts tested were compared with the negative control, by calculating the percentage of inhibition. When the natural extract reduced 50% or more the luciferase activity compared to the negative control, the test was repeated using a concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of natural extract.

2.7 In vitro antiviral activity confirmation

To confirm the antiviral activity of the compounds, 1×10^4 /mL of BHK-21 cells was dispensed in 96-well plates containing complete MEM. After 24 hours, the cell monolayer was infected with YFV-GLuc virus at MOI of 0.1 for 1 hour and then treated with 40 µg/ml of each natural extract. After 48 hour of incubation the luciferase activity was monitored as described above. The experiment was done in duplicate.

3. Results

3.1 Construction and characterization of replicon rep-YFV17D-LucNeolres

The construction of bicistronic replicon, rep-YFV17D-LucNeolres, was realized by homologous recombination in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and confirmed by PCR. The PCR products with extension of the 3253 and 3320 bp were obtained only for one clone. *In vitro* transcribed mRNA of the selected clone was used to transfect BHK-21 cell line by eletroporation. The mRNA of the monocistronic replicon rep-YFV17D-Luc (QUEIROZ, 2013) was previously characterized and used as a positive control for firefly luciferase. The luciferase activity of rep-YFV17D-LucNeolres was initially evaluated in 48, 72 and 96 hours post electroporation. Due to the bicistronic character, the replicon rep-YFV17D-LucNeolres showed a lower expression of luciferase gene when compared with the monocistronic replicon rep-YFV17D-Luc at early times after cell transfection. However, cells transfected with the monocistronic construct lost the replicon RNA over the time, which did not occur with the bicistronic replicon due to the presence of a gene for resistance to G418 drug and selection of cells harboring the resistant replicon, leading to the increase of the reporter gene expression after 96 hours (Figure 2).

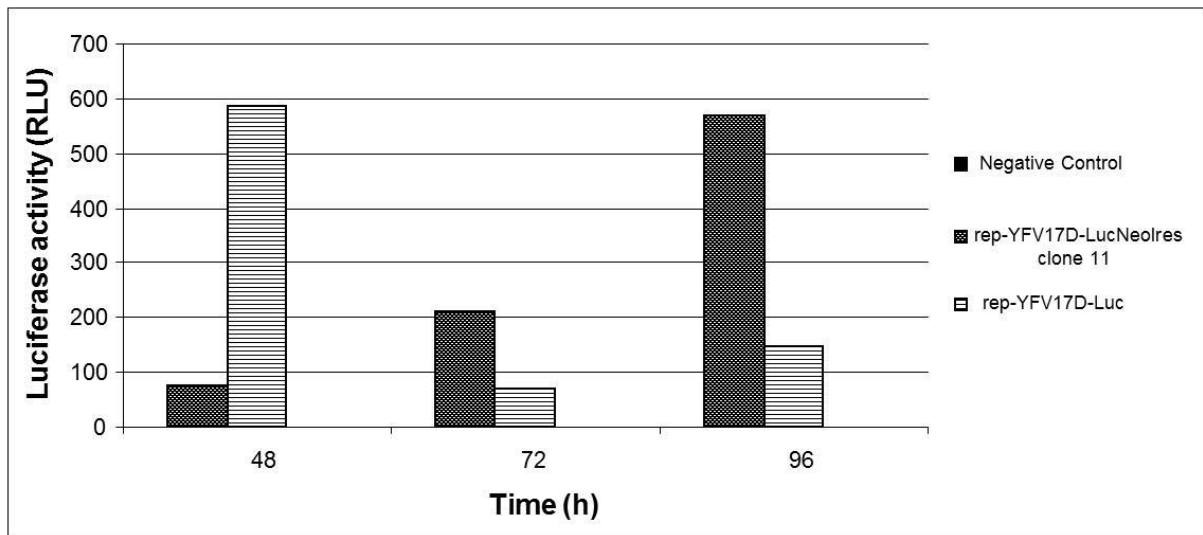


Figure 2- Analysis of luciferase reporter gene expression in cells transfected with the bicistronic replicon rep-YFV17D-LucNeolres and monocistronic replicon rep-YFV17D-Luc. Luciferase activities are expressed in Raw Light Units (RLU).

Efficient replication of the bicistronic replicon rep-YFV17D-LucNeolres was also confirmed by indirect immunofluorescence assay in cells transfected with RNA transcribed in vitro at 72 hours after transient transfection by electroporation (data not shown).

3.2 Development and characterization of stable cell line expressing the bicistronic reporter YFV replicon

The transfected cells with rep-YFV17D-LucNeolres were subjected to geneticin treatment for a period of 10 days and resistant cells were then cloned by limiting dilution. Ten cell clones were selected and all of them tested for luciferase activity. Cell clone 29 was chosen for further characterization and antiviral assay. On the capacity of proliferation of the selected cell clone over time, it was observed that the clone showed cell growth less efficient when compared with the original BHK-21 cells, used to develop the BHK21-rep-YFV17D-LucNeolres cell line. Probably due to the fact of using selective medium containing the geneticin drug and the presence of the bicistronic replicon itself, which possibly act negatively on cell growth (Figure 3A). The expression of firefly luciferase reporter gene was efficient and accompanied the growth of cells, increasing and decreasing in function of time and cell concentration over the course of five days (Figure 3B).

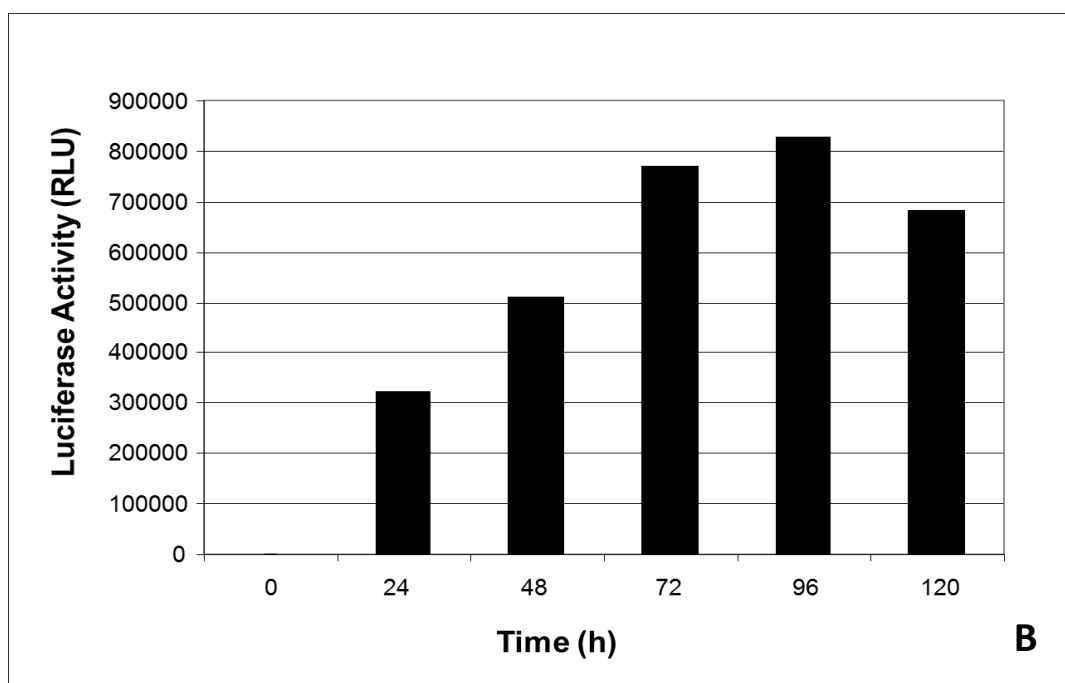
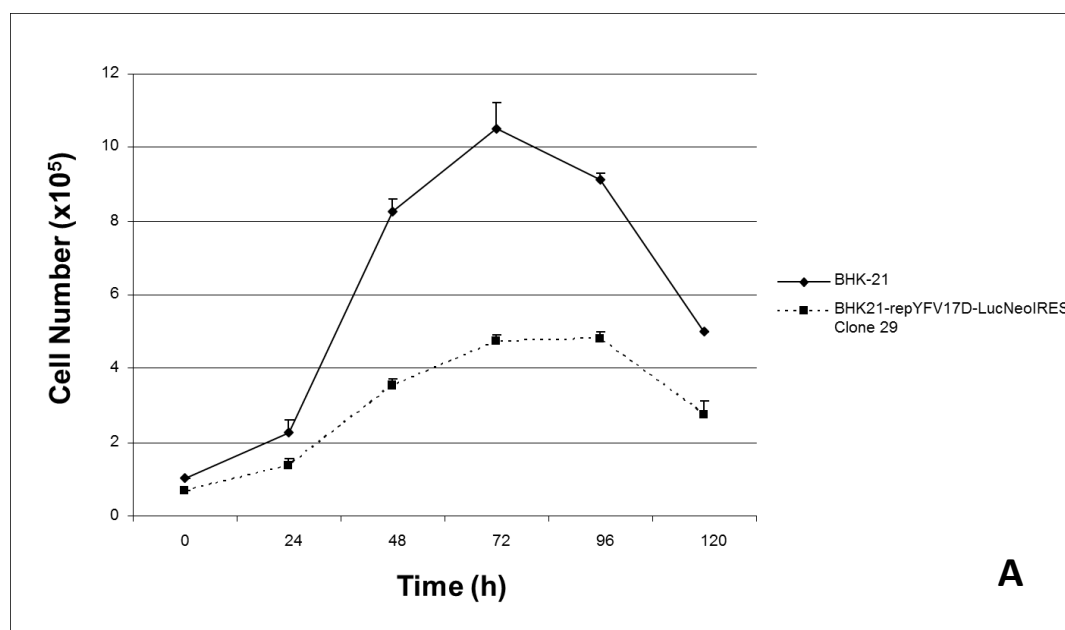


Figure 3 – Characterization of BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres clone 29. A. Growth curve of BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres compared to BHK-21 cell line. B. Luciferase activity of BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres clone 29 during five days.

The cell clone 29 showed the ability to maintain the plasmid and hence successive levels of luciferase expression even after freezing and thawing.

Even after 12 passages in cell culture, the fluorescence can be observed, showing that translation of viral proteins is continuous (Figure 4).

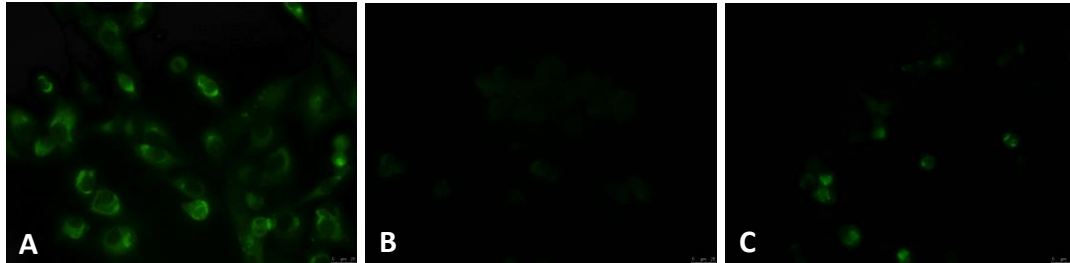


Figure 4- Indirect immunofluorescence of cells BHK-21-rep-YFV17DLucNeolres clone 29 (A), negative control (B) and YFV17D (C). Immunofluorescence using the primary antibody hyperimmune ascitic fluid of group B, polyclonal flavivirus. Increased 630x.

3.3 Inhibition of rep-YFV17D-LucNeolres replication by IFN- α treatment

For standardizing of antiviral drugs screening at large scale, the BHK-21-rep-YFV17D-LucNeolres cells were treated with IFN- α (human interferon α 2b) at a concentration of 100 and 1000 IU/mL in 24, 48 and 72 hours. As expected the expression of the luciferase reporter gene was markedly inhibited after treatment with both IFN- α concentrations. This inhibition was most obvious at the higher IFN- α concentration of 1000 IU/mL, reaching 77% and 96% inhibition after 48 and 72 hours post treatment, respectively (Figure 5).

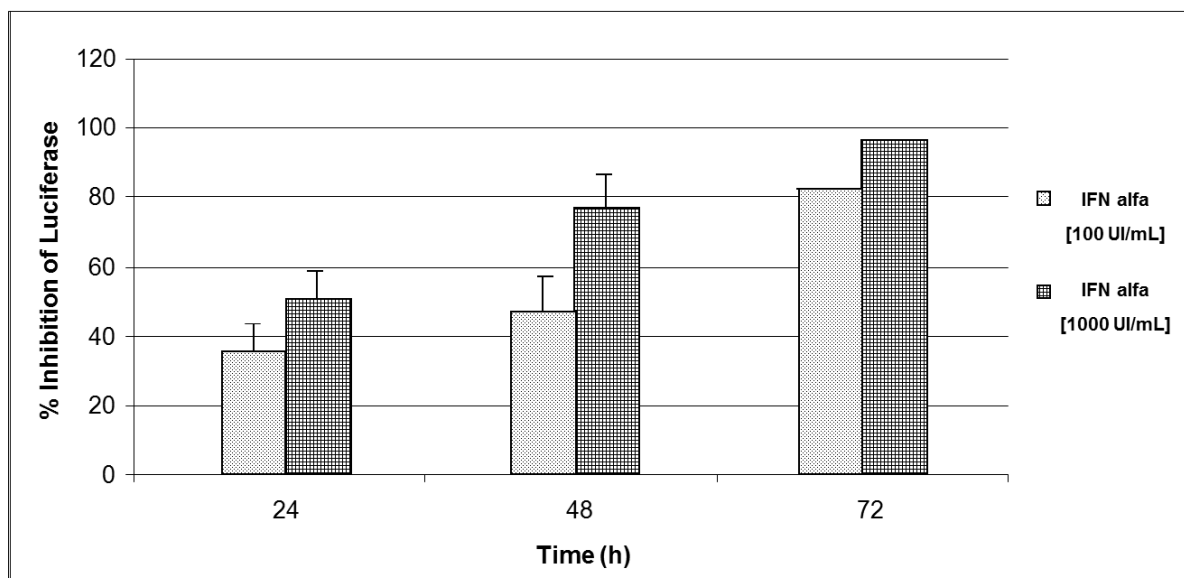


Figure 5- Inhibition of luciferase activity in BHK-21-YFV17D-LucNeolres cells after IFN- α treatment. The percentage inhibition of luciferase expression was calculated relative to negative control (untreated cells).

3.4 High-Throughput Screening of Natural Extracts

From the 5200 natural extracts tested, a total of 393 showed 50% of inhibition in the luciferase activity at concentration of 20 μ g/mL when compared to the negative control and from these 45 were cytotoxic (Figure 6). Therefore, a total of 348 extracts were retested at concentration of 40 μ g/mL and the results shown that only 94 from those 348 extracts were able to inhibit luciferase activity (Figure 7).

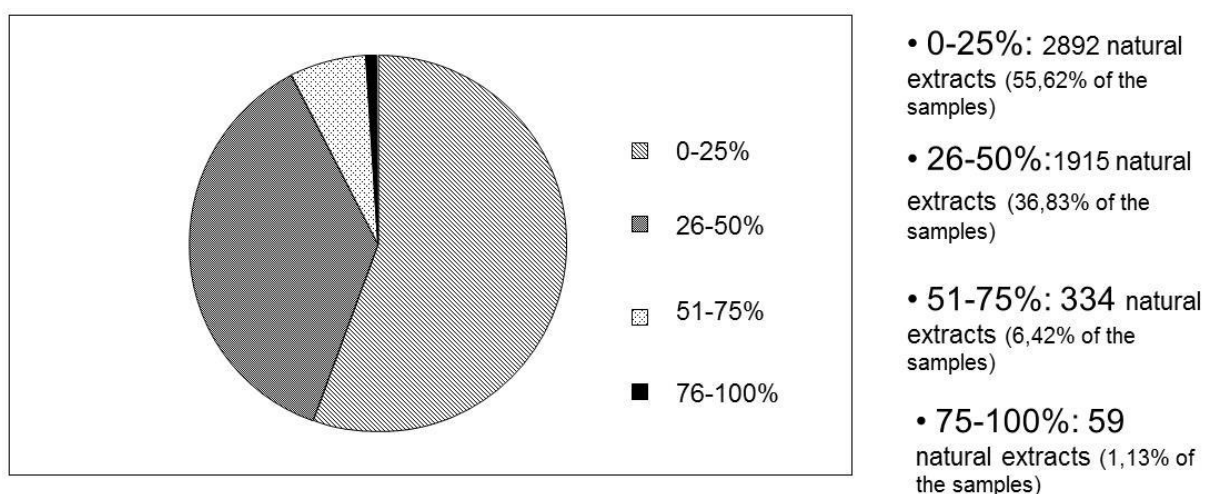


Figure 6- Percentage distribution of extracts that inhibited luciferase activity after treatment for 48 hours with 20µg/mL, the BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES.

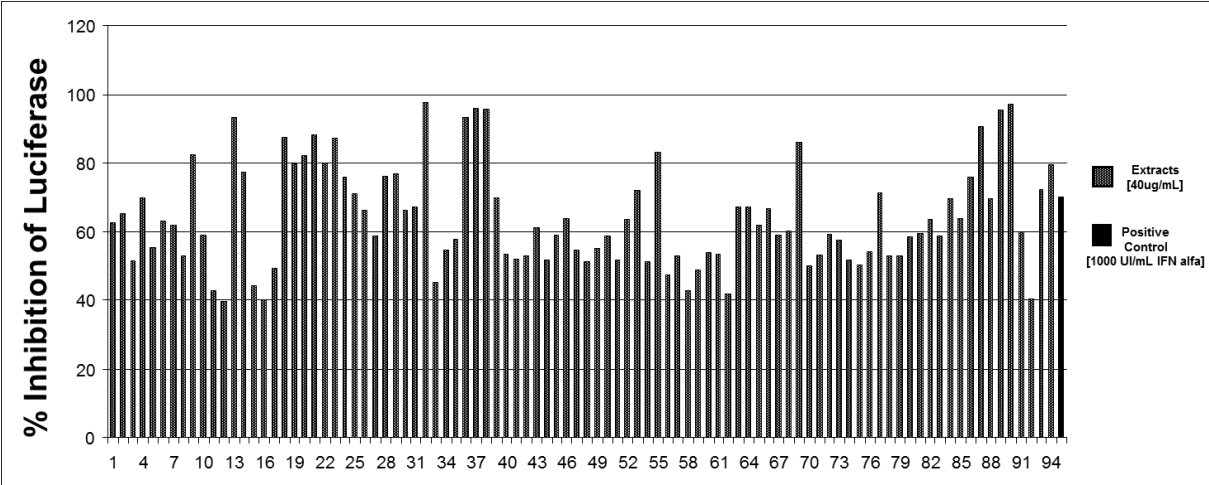


Figure 7– Luciferase activity inhibition of 94 selected natural substrates at a concentration of 40µg/mL.

5.4 Antiviral activity confirmation of selected natural extracts in cells infected with YFV-GLuc virus

From the 94 selected natural extracts only 91 was tested for their capacity to inhibit the reporter virus YFV-GLuc replication, three natural extracts were no availability in the concentration necessary to repeat the test. After 48 hours of exposure and at concentration of 40 µg/mL, 69 natural extracts were able to inhibit the virus *Gaussia* luciferase expression in 50% or higher. Twelve extracts showed greater inhibition than 88%, the percentage inhibition of the positive control (IFN-α) (Figure 10).

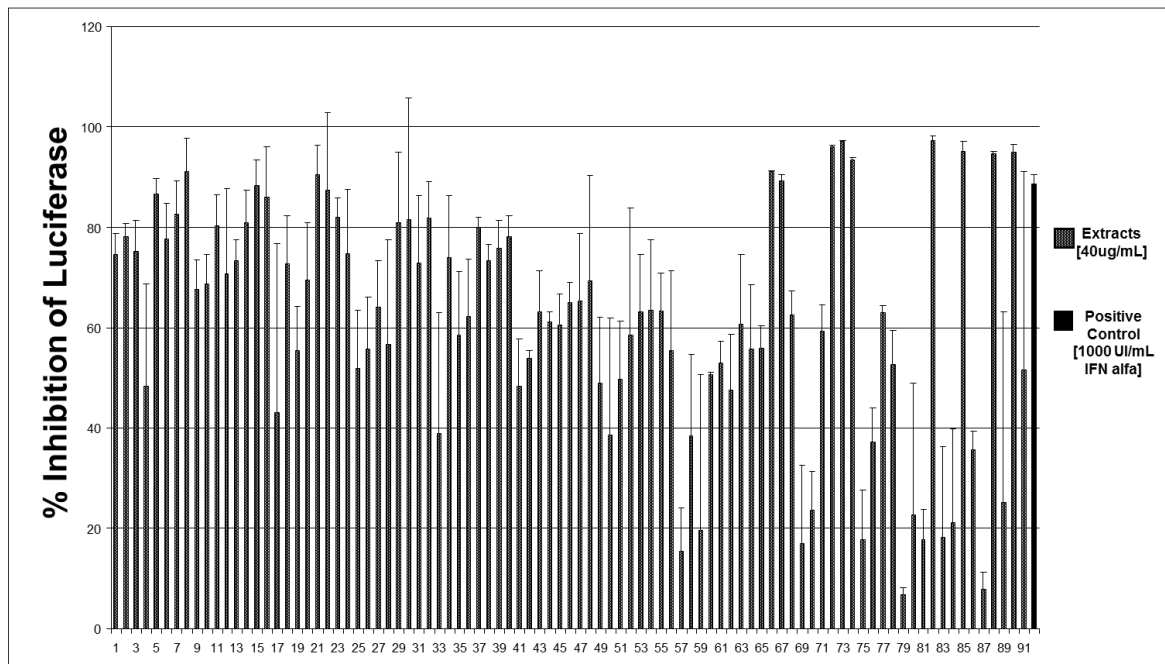


Figure 8- Analysis of the antiviral capacity of 91 natural substrates preselected to inhibit the replication of the reporter yellow fever virus (YFV-GLuc) at a concentration of 40µg/mL.

4 - DISCUSSION

Front of the necessity of discovering new antiviral agents for flaviviruses, this work proposed a high-throughput screening system based on the expression of a bicistronic reporter replicon of yellow fever virus. The construction strategy for the bicistronic replicon was performed in order to maintain the stability of the genome, which has 1,467 bp more than the complete genome of yellow fever virus and a total size of 12,299 bp. The method of cloning by homologous recombination in yeast, used in this study has helped to stabilize the genome of some flaviviruses, a major concern in the reverse genetics of flavivirus. This method has been successfully used for the construction and manipulation of infectious clones and replicons, and has the advantage of not relying on restriction sites or mutations, such as insertions in cloning systems in bacteria (QUEIROZ et. al., 2013; OLDENBURG et al., 1997; SANTOS, et al., 2013; SHANKS et al., 2009).

Most of these yellow fever replicons reported to date are monocistronic and were constructed by deletion of part or most structural protein, with or without inserting reporter genes such as GFP (green fluorescent protein), RFP (Red Fluorescent Protein), *Renilla* luciferase and *Firefly* luciferase or selection genes as the neomycin phosphotransferase (JONES; PATKAR; KUHN, 2005; MASON et al. 2006; QUEIROZ, 2013; SHUSTOV et al., 2007; PATKAR et al., 2009). However, for YFV bicistronic replicons there is only one description in which the IRES element responsible for the translation of the second cistron was inserted into the 3'UTR region of the viral genome, allowing only translation of a reporter gene or a selection gene, thus making it impossible the development of a reporter replicon cell line (JONES; PATKAR; KUHN, 2005). The bicistronic reporter-selectable YFV replicon developed in this study contains *Firefly* luciferase and neomycin phosphotransferase genes in the first cistron, and permitted the development of a stable cell line. The BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES cloned cell line were subjected to several passages, showing its stability through strong expression of the yellow fever viral proteins, the reporter and selection genes, even under freeze-thaw conditions.

The suitability of BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES cell line as a high throughput screening tool screening was demonstrated by the screening of 5.200 natural extracts. The method developed in this work to screen a large number of extract at the same time, consists of a simple, quick and cost-effective method, which becomes more advantageous than other high-throughput systems that utilize packaging of replicons into VLPs, which requires consecutive RNA transfections (PATKAR et al., 2009). The only advantage of replicons packaged by VLPs is the fact that one can also study the inhibition of recognition of cellular receptors for viruses (GOSH; BASU, 2008), but this method is inappropriate for large scale screening (PATKAR et al., 2009).

Every 24 hours, morphology of the cells in each well was observed to eliminate the possibility of a cytotoxic effect of the extracts tested. From all 5200 natural extracts tested using the developed replicon based high-throughput screening system, was observed that 45 extracts induced cytotoxicity. However, 94 natural extracts, showed non-cytotoxic with a possible antiviral activity detected by inhibition of 50% or more of luciferase activity in concentrations of

20 to 40µg/mL. So far, only 91 extracts were analyzed by limited sample available, but soon to be tested against the virus YFV-GLuc.

The cell line BHK-21-rep-YFV17D-LucNeoIRES has demonstrated high level confirmations of the test with the reporter virus YFV-GLuc, where the 91 samples that showed promise when tested on cell line constructed, 69 showed a degree of inhibition of reporter gene *Gaussia* luciferase of approximately 50% or more. Thus, 75,8% (69) of the samples which were incubated with reporter virus may have actually antiviral properties against yellow fever virus. Of the 69 extracts tested, 12 showed a percentage inhibition greater than the positive control luciferase. Of the 69 selected extracts, 12 of them showed a percentage inhibition greater than the positive control luciferase. No other system has identified a large number of promising extracts as described herein.

With the identification these extracts, the next step is the analysis by purification and fractionation of the extracts, in order to identify whether only a fraction or all of them that is capable of interacting with the replication of YFV. How to also test with other flaviviruses such as the four serotypes of dengue virus, West Nile virus, St. Louis encephalitis virus, Rocio virus and Ilheus virus. In a more distant future, if possible, the goal will be to identify molecules with antiviral activity and produce them synthetically.

The cell line described herein can be used in other applications, such as in the study of viral replication, trans-packaging, RNAi, viral pathogenesis, interaction between viral and cellular proteins, among others (MORAIS, et. al, 2013; MONATH, 2008; PASTORINO, et. al., 2010; USME-CIRO et. al., 2013).

Finally, the cell line developed in this work will be of great value for the primary screening of antiviral drugs against yellow fever virus and other flaviviruses, representing a powerful tool for accelerating discovery of potential inhibitors against flaviviruses.

5- References

ANSARI, et. al., 2004. Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly. **The Journal of Virology**, 78, 9612-9623.

CHAMBERS, T. J.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M., 1990. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. **Virology**, 177(1), 159-174

GUBLER, D. J., 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: Its history and resurgence as a global health problem. In: Gubler, D. J. & G. Kuno. **Dengue and Dengue and Hemorrhagic Fever**, New York: CAB International, pp. 1-22.

KHROMYKH, A. A., 2000. Replicon-based vectors of positive strand RNA viruses. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, 2, 555-569.

KHROMYKH, A. A.; VARNAVSKI, A. N.; WESTAWAY, E. G., 1998. Encapsidation of the flavivirus Kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin structural proteins in trans. **The Journal of Virology**, 72, 5967-5977.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G., 1997. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. **Journal of Virology**, 71, 1497-1505.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, HJ.; RICE, C. M., 2007. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: **FIELDS' Virology**, ed 5. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp 1101-1152.

MOLENKAMP et al., 2003. Yellow fever virus replicons as an expression system for hepatitis C virus structural proteins. **Journal of Virology**, 77 (2), 1644-1648.

MONATH, T. P., 2008. Treatment of yellow fever. **Antiviral Research**, 78, 116-124.

MORAIS, A. T.S. et. al, 2013. The eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L protein interacts with Flavivirus NS5 and may modulate yellow fever virus replication. **Virology Journal**, 10, 205.

NOUEIRY, A. O., et al., 2007. Identification of Novel Small-Molecule Inhibitors of West Nile Virus Infection. **Journal of Virology**, 81, 11992-12004.

PASTORINO, B., et. al., 2010. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Research**, 87, 281-294.

PUIG-BASAGOITI, F. et. al., 2006. Triaryl Pyrazoline Compound Inhibits Flavivirus RNA Replication. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50, 4, 1320-1329.

QUEIROZ S R A et. al., 2013. Construction of yellow fever virus subgenomic replicons by yeast-based homologous recombination cloning technique. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 85(1), 159-168.

ROSSI, S. L., 2005. Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. **Virology**, 331, 457-470.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W, 2001. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SANTOS, J. J. S et al., 2013. Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 108(8), 983-991.

STAPLES, J. E.; MONATH,T.P., 2008. Yellow fever: 100 years of discovery. **Journal of the American Medical Association**, 300(8), 960-962.

USME-CIRO, J. A. et. al., 2013. Cytoplasmic RNA viruses as potential vehicles for the delivery of therapeutic small RNAs. **Virology Journal**, 10, 185.

VAN DER GEER, J., HANRAADS, J.A.J., LUPTON, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. **J. Sci. Commun.**, 163, 51–59.

ZABEREZHNYI. A. D., 2004. The technology of recombinant infectious genomes in studies of RNA-containing viruses. **Molekuliarnaia genetika, mikrobiologia, i virusologia**, Moskva, 13-19.

Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula

Laura E. Furbino · Valéria M. Godinho · Iara F. Santiago · Franciane M. Pellizari ·
Tânia M. A. Alves · Carlos L. Zani · Policarpo A. S. Junior · Alvaro J. Romanha ·
Amanda G. O. Carvalho · Laura H. V. G. Gil · Carlos A. Rosa · Andrew M. Minnis ·
Luiz H. Rosa

Received: 1 November 2013 / Accepted: 20 January 2014 / Published online: 9 February 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract We surveyed diversity patterns and engaged in bioprospecting for bioactive compounds of fungi associated with the endemic macroalgae, *Monostroma hariatii* and *Pyropia endiviifolia*, in Antarctica. A total of 239 fungal isolates were obtained, which were identified to represent 48

taxa and 18 genera using molecular methods. The fungal communities consisted of endemic, indigenous and cold-adapted cosmopolitan taxa, which displayed high diversity and richness, but low dominance indices. The extracts of endemic and cold-adapted fungi displayed biological activities and may represent sources of promising prototype molecules to develop drugs. Our results suggest that macroalgae along the marine Antarctic Peninsula provide additional niches where fungal taxa can survive and coexist with their host in the extreme conditions. We hypothesise that the dynamics of richness and dominance among endemic, indigenous and cold-adapted cosmopolitan fungal taxa might be used to understand and model the influence of climate change on the maritime Antarctic mycota.

L. E. Furbino · V. M. Godinho · I. F. Santiago · C. A. Rosa ·
L. H. Rosa (✉)
Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas
Gerais, P. O. Box 486, CEP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil
e-mail: lhrosa@icb.ufmg.br

F. M. Pellizari
Laboratório de Ficologia e Qualidade de Água do Mar, Universidade
Estadual do Paraná, Paranaguá, PR, Brazil

T. M. A. Alves · C. L. Zani
Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas
René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil

P. A. S. Junior · A. J. Romanha
Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de
Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil

A. J. Romanha
Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil, Santa Catarina,
Brazil

A. G. O. Carvalho · L. H. V. G. Gil
Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil

A. G. O. Carvalho
Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, PE, Brazil

A. M. Minnis
Center for Forest Mycology Research, Northern Research Station,
US Forest Service, Madison, WI, USA

Introduction

Antarctica is considered to be one of the harshest and most pristine ecosystems in the world where low temperature, different pH levels, low organic nutrient and water availability, strong winds and UV radiation are found. Antarctica is being influenced by strong and rapid climate change, mainly in the Peninsula region [20]. For these reasons, the Antarctic Peninsula offers unique habitat for studying the effects of climate change on taxonomy and diversity, ecology and evolution as well as for making biotechnological discoveries.

Different studies have been conducted on the Antarctic biota, including taxonomic and ecological studies on bacteria, protists, micro- and macroalgae, fungi, plants and animals [47]. Fungi are widely distributed in Antarctica, and their

occurrence has been recorded from a number of substrates including soil, wood, plants, invertebrates and vertebrates [6]. Marine fungi are an ecologically important group of microorganisms that play key roles in the energy flow of oceans [26, 31]. Fungi in marine environments are present on a variety of substrata such as decaying wood, leaves, macroalgae and seagrasses [28]. However, according to Bhadury et al. [4], the diversity and functions of fungi in marine systems have been underestimated. Among the mycological studies in Antarctica, a few works have addressed marine fungi, which were detected in water [14, 15], wood baits [21] and water and marine sediments [53].

Marine algae have an important role in organic matter mineral cycling, particularly in the littoral and infralittoral ecosystem in shallow waters of the Antarctic. Nedzarek and Rakusa-Suszczewski [40] suggest that algal beds cover about 30 % of the bottom surface in the Maritime Antarctic, with an estimate of 74,000 tons of wet biomass around only in Admiralty Bay, King George Island. According to Wiencke and Clayton [58], the Antarctic macroalgae composition is characterised by a high degree of endemism and the macroalgae play a fundamental role as primary producers, food for marine herbivores as well as in habitat structure [8]. Macroalgae also represent the majority of biomass in Antarctica [39] and shelter different Antarctic macro- and microorganisms. The endemic Antarctic macroalgae *Monostroma hariatii* Gain (Chlorophyta) and *Pyropia endiviifolia* (A. Gepp & E. Gepp) H. G. Choi & M. S. Hwang (Rhodophyta) are among the most abundant species across the different islands and, consequently, represent promising targets to recover associated marine fungi living in the extreme conditions of Antarctica.

Natural products are molecules of secondary metabolism derived from plants, animals or microorganisms, which can represent starting points as prototype compounds for drug discovery research. During recent years, the relevance of microorganisms in bioprospecting for drug discovery has been increasing, and, among microbial sources, the bioactive molecules produced by fungi represent a chemical reservoir for discovering new compounds with antibiotic, antioxidant, immunomodulating, anticancer and antiparasitic compounds. Marine fungi have been recognised as potential sources of novel natural products for pharmaceutical, agricultural and industrial applications, especially due to their ability to produce new secondary metabolites with different biological activities. The goals of this study were (1) to determine the distribution patterns and diversity dynamics (richness, dominance and similarity) of the endemic, cold-adapted and cosmopolitan taxa within the fungal communities associated with endemic Antarctic macroalgae, *M. hariatii* and *P. endiviifolia*, across the Antarctica Peninsula and (2) to evaluate the potential of these fungi to produce bioactive compounds.

Material and Methods

Sample Collection

Fragments of 180 fresh thalli of *Monostroma hariatii* Gain and 210 of *Penicillium endiviifolia* (A. Gepp & E. Gepp) H. G. Choi & M. S. Hwang were collected during December 2010 and January of 2011 in intertidal transects along a rocky coastline that becomes ice-free during the Antarctic summer. The macroalgal samples were collected along a 350-km transect through Elephant, King George and Deception Islands, on the Antarctic Peninsula (Fig. 1). Additionally, Table 1 shows the coordinates where the macroalgal samples were collected and the physical and chemical water parameters (temperature, salinity, conductivity and pH) that were recorded at each site using a multi-parameter probe Hexis TCS.

Macroalgae Identification

Complete and fertile samples of the macroalgae were sorted, washed and preserved in seawater with 4 % formalin in the NPo Almirante Maximiano H41 ship's laboratory for macro- and micromorphological analyses. The identification of the macroalgal specimens was based on the publications of Wiencke and Clayton [58] and Quartino et al. [43]. Nomenclatural updates followed Guiry and Guiry [22]. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Instituto de Botânica (SP) in São Paulo, Brazil.

Fungal Isolation

Five discs 8 mm in diameter were cut from each macroalgal specimen and washed twice using sterile local seawater for 2 min. The discs were placed in Petri dishes containing marine agar (MA, Difco, USA) supplemented with 2 % glucose and chloramphenicol (Sigma, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for selective isolation of marine fungi. The plates were incubated for up to 60 days at 10 °C (a temperature chosen to isolate psychrophilic fungi that are capable of growth and reproduction in cold temperatures), and pure cultures of individual fungal colonies were transferred to new MA. Long-term preservation of fungi was carried out at −80 °C using cryotubes with sterile 15 % glycerol. All of the fungal isolates examined in this work were deposited into the Culture Collection of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal of Minas Gerais, Brazil (UFMGCB).

Fungal Identification

The protocol for DNA extraction from filamentous fungi followed Rosa et al. [45]. The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified with the universal primers ITS1

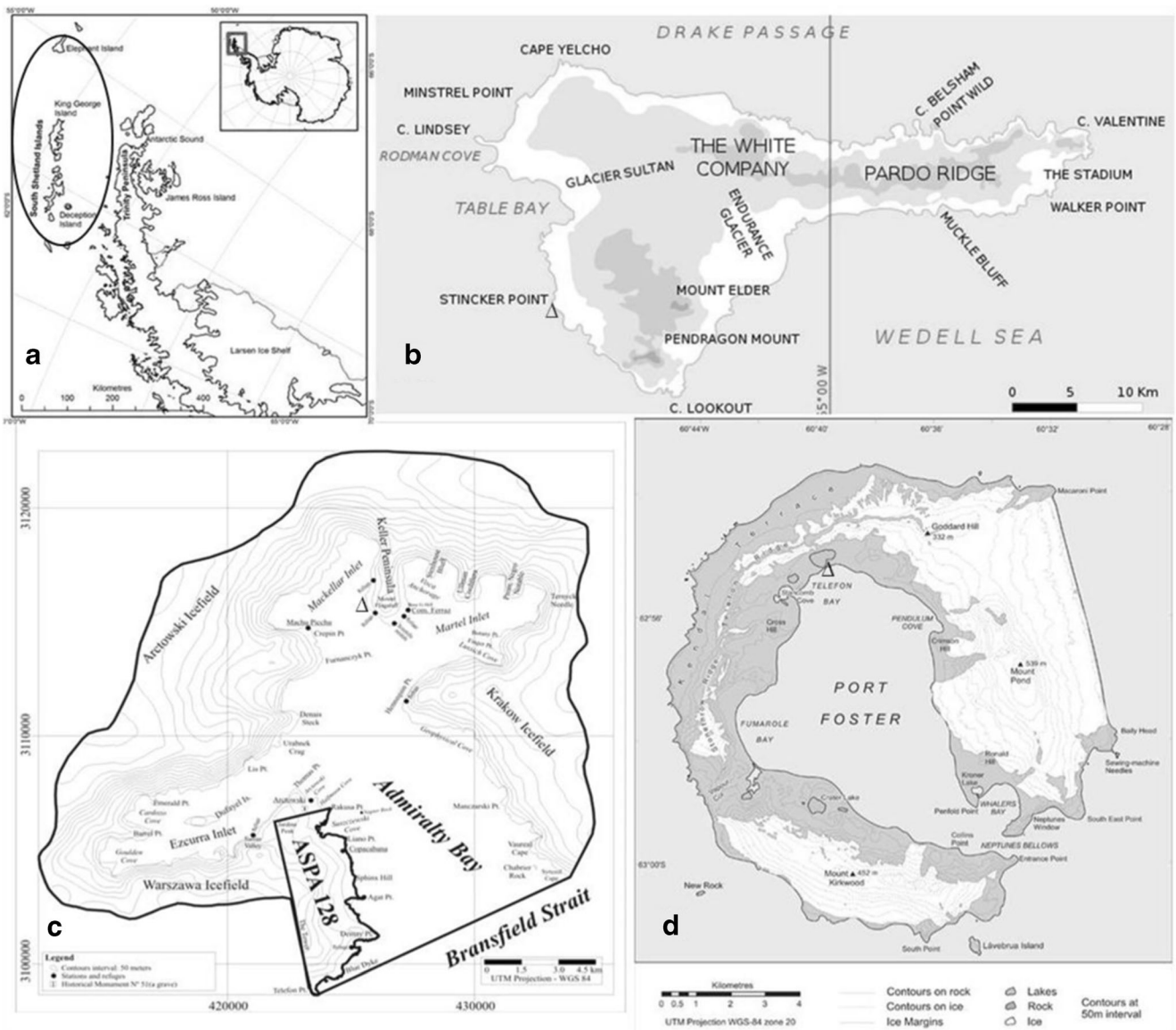


Fig. 1 Maps showing the positions of the islands sampled on the **a** Antarctic Peninsula across a transect of 350 km. Sampling sites Δ ; **b**= Stinker Point (61°07.935' S; 055°25.997' W) at Elephant Island; **c** Keller Peninsula (62°05.163' S; 058°24.784' W) at Admiralty Bay at King George Island; **d** Telefon Bay (62°55.192' S; 060°39.797' W) at Deception Island

Table 1 Locations, number of macroalgae specimens collected and physical–chemical water measures where the *Pyropia endiviifolia* and *Monostroma hariotti* were obtained

Location/macroalgae species	Number of specimens	Salinity (ppt)	Conductivity (mS cm ⁻¹)	Temperature (°C)	pH
Elephant Island					
<i>Pyropia endiviifolia</i>	60	33.0	50.6	2.1	7.74
<i>Monostroma hariotti</i>	60	35.2	55.4	2.1	8.24
King George Island					
<i>Pyropia endiviifolia</i>	60	32.8	27.23	0.5	7.74
<i>Monostroma hariotti</i>	60	32.8	27.23	0.5	7.74
Deception Island					
<i>Pyropia endiviifolia</i>	90	32.1	49.89	3.7	7.49
<i>Monostroma hariotti</i>	60	32.1	49.89	3.7	7.49

and ITS4 [57]. Amplification of the ITS region was performed as described by Rosa et al. [45]. Amplification of the β -tubulin gene was performed with the Bt2a and Bt2b primers [18] according to protocols established by Godinho et al. [19]. Yeasts were characterised via standard methods and the taxonomic keys of Kurtzman and Fell [32]. Yeast identities were confirmed by sequencing the D1–D2 variable domains of the large subunit ribosomal RNA gene using the primers NL1 and NL4 [33] and the ITS region using the primers ITS1 and ITS4 [57].

The obtained sequences were analysed with SeqMan P with Lasergene software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA), and a consensus sequence was obtained using Bioedit v. 7.0.5.3 software (Carlsbad, ON, Canada). Representative consensus sequences of algicolous fungal taxa were deposited into GenBank (Table 2). To achieve species-rank identification based on ITS and β -tubulin data, the consensus sequence was aligned with all sequences from related species retrieved from the NCBI GenBank database using BLAST [1]. Since sequences of the ITS region may be insufficient for recognising some fungal taxa [17], β -tubulin sequences, which are considered promising for a one-gene phylogeny [17], were used to elucidate the taxonomic positions of the taxa that could not be identified conclusively using ITS sequences. The following criteria suggested by Godinho et al. [19] were used to interpret BLAST results from the GenBank database. Taxa that displayed query coverage and identities $\leq 97\%$ or an inconclusive taxonomic position were subjected to phylogenetic ITS and β -tubulin-based analysis, with estimations conducted using MEGA Version 5.0 [51]. The maximum composite likelihood method was employed to estimate evolutionary distances with bootstrap values calculated from 1,000 replicate runs. To complete the molecular identification, the sequences of known-type fungal strains or reference sequences found in GenBank obtained from fungal species deposited in international culture collections were added to improve the accuracy of the phylogenetic analysis. The information about fungal classification generally follows Kirk et al. [30], MycoBank (<http://www.mycobank.org>) and Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>).

Diversity, Richness, Dominance and Distribution

To quantify species diversity, richness and evenness, we used the following indices: (1) Fisher's α , (2) Margalef's and (3) Simpson's, respectively. The similarities among fungal taxa from different areas were estimated using the Bray–Curtis measures. All diversity and similarity indices, rarefaction curves and the principal components analysis calculations were performed using the computer programme PAST, version 1.90 [23].

Fungal Cultivation and Preparation of Extracts for Biological Assays

All isolates of filamentous fungi were cultivated using solid state fermentation to produce crude extract according to protocols established by Santiago et al. [48]. We used 24-well microtiter plates to grow all yeasts and obtain their respective crude extracts. Each well of the plates was filled with 1.2 ml of sterile Marine Agar. After solidification, $10\ \mu\text{l}$ at 1×10^4 yeast cells ml^{-1} from each purified yeast colony was transferred to the corresponding well of a microtiter plate. The plates were incubated at $10 \pm 2\ ^\circ\text{C}$ for 15 days. After incubation, 1 ml of ethanol was added to each well, and the content was macerated, incubated at $10\ ^\circ\text{C}$ for 48 h and filtrated using sterilised cotton pieces. The ethanol phase was transferred to 1.5-ml tubes and dried by evaporation in a vacuum centrifuge at $35\ ^\circ\text{C}$. An aliquot of each dried fungal extract was dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO, Merck, USA) to prepare a $100\ \text{mg}\ \text{ml}^{-1}$ stock solution, which was stored at $-20\ ^\circ\text{C}$.

Assay for Antimicrobial Activity

Susceptibility testing against *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258 and *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740 was performed using a protocol established by Carvalho et al. [7]. All crude extracts (dissolved in DMSO) were diluted to a final concentration of $250\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ for use in the antimicrobial assay. The bacteria and yeast were grown at $37\ ^\circ\text{C}$ in Mueller–Hinton (Difco, USA) and Sabouraud (Himedia, India) media, respectively. After 24 h under these conditions, microbial inocula were prepared by diluting the cell suspensions appropriately in Mueller–Hinton and RPMI1640 (supplemented with 2% glucose) media for bacteria and yeast, respectively. Fifty microlitres of microbial inocula was added to each well in a 96-well plate and adjusted to $1\text{--}2 \times 10^8$ bacterial cells ml^{-1} and 1×10^6 yeast cells ml^{-1} . Twenty-five microlitres of extract and control solutions, as well as $25\ \mu\text{l}$ of each medium, was added to attain the desired concentrations, and the plates were incubated at $37\ ^\circ\text{C}$ for 24 h. As an indicator of microorganism growth, $10\ \mu\text{l}$ of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT/Sigma-USA) (dissolved in sterile water at $5\ \text{mg}\ \text{ml}^{-1}$) were added to each well and incubated at $37\ ^\circ\text{C}$ for 4 h. Formazan, a product of the reduction of MTT, was read at $\lambda_{570\ \text{nm}}$ in a microplate reader to measure the microbial growth. The results are expressed as percent inhibition in relation to the controls without drugs. Chloramphenicol ($32\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$) and amphotericin B ($2\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$) (both from Sigma/USA) were used as positive drug controls for the bacterial and yeast assays, respectively.

Table 2 Molecular identification of fungi associated with endemic Antarctic macroalgae *Monostroma hariatii* and *Pyropia endiviifolia*

Island/ macroalgae host	UFMGCB ^a	Number of isolates	Top BLAST search results [GenBank accession number]	Query cover (%)	Identity (%)	N° of bp analysed	Proposed taxa [GenBank accession number]
Elephant Island							
<i>Pyropia endiviifolia</i>	5966	20	<i>Cadophora malorum</i> (Kidd & Beaumont) W. Gams [JN585942]	100	100	593	<i>C. malorum</i> [KC811017 ^c]
	5949 ^{b,c}	20	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom [JQ781839]	100	99	587	<i>Penicillium</i> sp. 1 [KC811006 ^c ; KF578399 ^g]
	5941 ^b	8	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. [HM589344]	100	99	487	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 1 [KC810978 ^c]
	5936 ^b	7	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. [JX270556]	100	100	566	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 2 [KC810990 ^c]
	6286 ^{b,c}	3	<i>Penicillium steckii</i> K.M. Zalesky [HM469415]	100	99	414	<i>Penicillium</i> sp. 2 [KC81047 ^c ; KF578404 ^g]
	5938 ^b	2	<i>Penicillium</i> sp. [JX232275]	100	99	555	<i>Penicillium</i> sp. 3 [KC811044 ^c]
	5977	2	<i>Thelebolus globosus</i> Brumm. & de Hoog [JX171196]	99	100	539	<i>T. globosus</i> [KF373539 ^c]
	6305 ^{b,c}	2	<i>Penicillium pusillum</i> G. Smith [EF626951]	99	98	432	<i>Penicillium</i> sp. 4 [KC811052 ^c ; KF578401 ^g]
	5976 ^b	1	<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church [HF546383]	100	99	541	<i>Aspergillus</i> sp. 1 [KC811058 ^c]
	5973	1	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> Stchigel & Guarro [JQ692162]	100	100	536	<i>A. psychrotrophicus</i> [KC811040 ^c]
	5946 ^b	1	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz. [JX171167]	100	100	643	<i>Cladosporium lignicola</i> Link [KC811048 ^c]
	5940 ^{b,c}	1	<i>Aspergillus austroafricanus</i> Jurjevic, S. W. Peterson & B. W. Horn [JQ301891]	100	100	570	<i>Aspergillus protuberus</i> Munt.-Cvetk. [KC811041 ^c ; BKF578413]
	6025 ^b	1	<i>Mortierella</i> sp. [JQ670950]	100	99	634	<i>Mortierella antarctica</i> Linnem. [KC811043 ^c]
	5937	1	<i>Oidiodendron truncatum</i> G.L. Barron [FJ914713]	100	100	557	<i>O. truncatum</i> [KC811038 ^c]
	6297 ^{b,c}	1	<i>Penicillium dipodomycicola</i> (Frisvad, Filtenborg & Wicklow) Frisvad [JX232278]	100	99	486	<i>Penicillium</i> sp. 5 [KF373541 ^c ; KF578403 ^g]
	6006 ^{b,c}	16	<i>Penicillium steckii</i> [HM469415]	100	100	1456	<i>P. steckii</i> [KF419301 ^c ; KF623529 ^g]
	5998 ^{b,c}	6	<i>Penicillium chrysogenum</i> [JN561259]	100	99	587	<i>Penicillium</i> sp. 1 [KC811013 ^c ; KF578410 ^g]
	6002 ^{b,c}	2	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. [JQ781772]	100	98	530	<i>Aspergillus</i> sp. [KF373537 ^c ; KF578409 ^g]
<i>Monostroma hariatii</i>	6008 ^b	1	<i>Cladosporium</i> sp. [DQ092512]	100	100	510	<i>Cladosporium</i> sp. [KC811049 ^c]
	6020 ^{b,c}	1	<i>Penicillium citrinum</i> Thom [EU645682]	100	99	519	<i>P. citrinum</i> [KC811054 ^c ; KF578408 ^g]
	6024 ^{b,c}	2	<i>Penicillium commune</i> Thom [HQ710533]	100	99	532	<i>P. crustosum</i> Thom [KC811051 ^c ; KF578400 ^g]
	6023 ^{b,c}	1	<i>Penicillium islandicum</i> Sopp [FJ872071]	98	97	564	<i>P. crustosum</i> [KF373538 ^c ; KF578407 ^g]
King George Island							
<i>P. endiviifolia</i>	GP46L1	5	<i>Metschnikowia australis</i> (Fell & I.L. Hunter) Mendonça-Hagler, Hagler, Phaff & Tredick [U76526]	100	100	514	<i>M. australis</i> [KF419301 ^f]
	5954 ^b	4	<i>Cladosporium</i> sp. [HM999949]	99	100	485	<i>Cladosporium</i> sp. [KC810992 ^c]
	5963 ^b	3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. [JX270614]	99	100	434	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 1 [KC810996 ^c]
	6033 ^{b,c}	2	<i>Penicillium chrysogenum</i> [JQ781839]	100	100	587	<i>Penicillium</i> sp. [KC811004 ^c ; KF578405 ^g]
	6031	1	<i>Dipodascus australiensis</i> Arx & J.S.F. Barker [HQ115737]	98	99	395	<i>D. australiensis</i> [KC811059 ^c]
<i>M. hariatii</i>	MH47.1	35	<i>Metschnikowia australis</i> [U76526]	100	100	514	<i>M. australis</i> [KF373553 ^f]
	MH33.1	22	<i>Guehomyces pullulans</i> (Lindner) Fell & Scorzetti [AF105394]	99	99	625	<i>G. pullulans</i> [KF373551 ^f]

Table 2 (continued)

Island/ macroalgae host	UFMGCB ^a	Number of isolates	Top BLAST search results [GenBank accession number]	Query cover (%)	Identity (%)	N° of bp analysed	Proposed taxa [GenBank accession number]
	MH1.2	18	<i>Cryptococcus albidosimilis</i> Vishniac & Kurtzman [AF137601]	99	100	591	<i>Cr. albidosimilis</i> [KC811060 ^f]
	MH38.2	7	<i>Rhodotorula laryngis</i> Reiersøl [AF189937]	100	99	615	<i>Rh. laryngis</i> [KF373552 ^f]
	MH11.2	5	<i>Cryptococcus victoriae</i> M.J. Montes, Belloch, Galiana, M.D. García, C. Andrés, S. Ferrer, Torr.-Rodr. & J. Guinea [AF363647]	100	99	609	<i>Cr. victoriae</i> [KF373547 ^f]
	5414 ^b	5	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. [JX845282]	100	99	428	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 2 [KC811056 ^c]
	MH1.3	3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (A. Jörg.) F.C. Harrison [AF070432]	99	99	588	<i>R. mucilaginosa</i> [KF373546 ^f]
	5408 ^b	3	<i>Phoma herbarum</i> Westend. [AY293800]	98	99	478	<i>Phoma</i> sp. [KF373545 ^c]
	MH50.2	2	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i> (Fell, I.L. Hunter & Tallman) Hamam., Sugiy. & Komag. [AF075505]	99	99	600	<i>C. infirmominiatum</i> [KF373554 ^f]
	MH23.1	2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (Wickerham) Kurtzman & M. Suzuki [U45709]	99	99	561	<i>M. guilliermondii</i> [KF373548 ^f]
	MH3.3	1	<i>Cryptococcus adeliensis</i> Scorzett, I. Petrescu, Yarrow & Fell [AF137603]	99	99	641	<i>Cr. adeliensis</i> [KF373550 ^f]
	MH24.3	1	<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) F.C. Harrison [AF189945]	100	99	632	<i>Rh. minuta</i> [KF373549 ^c]
Deception Island							
<i>P. endiviifolia</i>	5958 ^{b,c}	4	<i>Penicillium dipodomycicola</i> [JX171186]	100	99	555	<i>Penicillium</i> sp. 1 [KF373535 ^c ; KF578412 ^g]
	P172L1	3	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> [U45709]	99	99	561	<i>M. guilliermondii</i> [KF373555 ^f]
	5955 ^b	2	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. [HM589344]	100	99	536	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 1 [KC810974 ^c]
	6304 ^b	2	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. [JX270343]	98	99	375	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 2 [KC810976 ^c]
	6291 ^b	2	<i>Verticillium leptobactrum</i> W. Gams [JQ782652]	100	98	484	<i>Verticillium</i> sp. [KC810999 ^c]
	6030 ^{b,c}	1	<i>Aspergillus</i> sp. [JN021552]	100	99	550	<i>Aspergillus</i> sp. 1 [KF373540 ^c ; KF578406 ^g]
	6298 ^b	1	<i>Penicillium chrysogenum</i> [JQ781839]	100	99	587	<i>Penicillium</i> sp. 2 [KC811001 ^c]
	6300 ^{b,c}	1	<i>Aspergillus versicolor</i> [FJ878625]	100	99	495	<i>Aspergillus</i> sp. 2 [KF373542 ^c ; KF578402 ^g]
	6310 ^b	1	<i>Aspergillus penicillioides</i> Speg. [FR727125]	100	100	499	<i>Aspergillus</i> sp. 3 [KF373543 ^c]
	6311 ^b	1	<i>Verticillium</i> sp. [JX270518]	99	95	466	<i>Lecanicillium</i> sp. [KF373544 ^c]
<i>M. harii</i>	5994 ^{b,c}	1	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. [FJ011542]	99	99	510	<i>Aspergillus tabacinus</i> Nakaz., Y. Takeda, Simo & A. Watan. [KF373536 ^c , KF578411 ^g]
	5995 ^b	1	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. [HM589337]	99	99	517	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 1 [KC811057 ^c]

Identification conducted using BLASTn searches of the ITS, β -tubulin and D1–D2 domains

^a UFMGCB Culture of Microorganisms and Cells from the Federal Universidade of Minas Gerais

^b Taxa subjected to phylogenetic analysis based on the ^b ITS1–5.8S–ITS2 region for elucidation of taxonomic positions

^c Taxa subjected to phylogenetic analysis based on the ^c β -tubulin region for elucidation of taxonomic positions

^d Taxonomic position suggested by the phylogenetic analyses

^e D1/D2 variable domains sequence deposited

^f ITS sequence deposited

^g β -tubulin gene sequence deposited

The assessment of antifungal activity against filamentous fungi was performed with the target *C. sphaerospermum* CCT 1740. *Cladosporium sphaerospermum* is a cosmopolitan dematiaceous fungus that causes serious problems in patients with respiratory tract disease as well as subcutaneous phaeohyphomycosis [25]. Conidia were harvested from 7- to 10-day-old cultures by flooding plates with 5 ml of 0.85 % sterile saline, and the resulting suspensions were filtered using a qualitative paper filter to remove the mycelial fragments. The conidia concentrations were determined photometrically from a standard curve of absorbance at 620 nm, and the suspensions were adjusted with 0.85 % sterile saline to a concentration of 1.0×10^6 conidia ml^{-1} [11, 56]. A reference method [39] for the broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast was adapted for the evaluation of antifungal activity against sporulating filamentous fungi [56]. Fifty microlitres of the conidial inocula were added to each well of a 96-well plate containing 25 μl of the extract (at 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$) or the control solution. The plates were incubated at 25 °C for 48 h. Fungal growth was evaluated by measuring the absorbance of each well at 620 nm at 48 h, and the mean absorbance values and standard errors were used to evaluate fungal growth inhibition. The fungicide benomyl ($1.16 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Sigma/USA) was used as a positive standard in all assays. The results are expressed as the percent inhibition in relation to controls without drugs. All antimicrobial assays were performed in duplicate.

In vitro assays with intracellular amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*

In vitro assays with amastigote forms of *T. cruzi* were performed according to protocols established by Romanha et al. [44]. Each extract was tested in triplicate. Benznidazole at its IC_{50} (1 $\mu\text{l ml}^{-1}$) was used as positive control. The results were expressed as the percentage of growth inhibition. All assays were performed in triplicate.

Yellow Fever Virus Antiviral Assay

The antiviral assay was performed using a BHK-21 cell line expressing the yellow fever virus (YFV) bicistronic replicon (BHK-21-repYFV17D-LucNeoIres), which contains the firefly luciferase reporter gene and neomycin phosphotransferase gene. The BHK-21-repYFV17D-LucNeoIres cell line was maintained in minimum essential medium (MEM), supplemented with 10 % fetal bovine serum, 1 % (v/v) penicillin/streptomycin, and 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of Geneticin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). YFV replicon cells were seeded in 96-well plates at a concentration of 2×10^4 cells per well in 100 μl of complete culture medium. After an interval of 24 h for cell adherence and subsequent observation of cell viability in each well, the culture medium was removed and then replaced with complete MEM containing 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of each fungal extract

in a total volume of 100 μl . Pegylated interferon- α 2b (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba) was used as positive control for inhibition of replicon replication at a concentration of 1,000 IU ml^{-1} . As negative controls, cells were treated with medium. Cell morphology and viability were evaluated by optical microscopy during the incubation period, in order to detect some possible cytotoxicity and avoid any misinterpretation of a possible inhibition of the replication of the reporter replicon due to cell death. After an incubation of 48 h, the cells were washed with phosphate-buffered saline and lysed in 20 μl of $1 \times$ lysis buffer (Promega, USA) for 5 min. The luciferase activity was determined from 20 μl of cell lysate using a commercial luciferase assay kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Luminescent signal was detected using Mithras LB 940 (Berthold Biotechnologies, Bad Wildbad, Germany). The assay was performed in duplicate, and the resulting values expressed in raw lights units. The values obtained from treatment with extracts were compared with that of the negative control by calculating the percentage inhibition value for each substrate relative to untreated cells (negative control).

Results

A total of 239 fungal isolates were recovered from 390 thalli (total of 1,950 tissue fragments) from the endemic Antarctic macroalgae, *M. hariatii* and *P. endiviifolia*. The numbers of fungal taxa and isolates differed between the two macroalgal species; 30 taxa and 104 isolates were recovered from *P. endiviifolia* and 20 taxa and 135 isolates from *M. hariatii*. The fungal isolates were identified by molecular sequencing of the ITS, β -tubulin and D1-D2 domains to represent 48 taxa and 18 different genera within the phyla Ascomycota (201 isolates), Basidiomycota (37 isolates) and Zygomycota (1 isolate) (Table 2).

Thirty-four fungal taxa presented low molecular similarities or inconclusive information in comparison with known fungal ITS sequences deposited in the GenBank database. The most frequent taxa associated with *M. hariatii* were *Metschnikowia australis*, *Guehomyces pullulans*, *Cryptococcus albidosimilis* and *Penicillium steckii*, with 35, 22, 18 and 16 isolates, respectively. *Cadophora malorum* (20), *Penicillium* sp. and *Pseudogymnoascus* species represented the most frequent fungi associated with *P. endiviifolia*. In general based on the isolate number, the most frequent species represented 56.5 % of the total fungal community; in contrast, 7.9 % of taxa were obtained as singletons and are rare components within the community. Two species of *Pseudogymnoascus* (*Pseudogymnoascus* sp. 1 and sp. 2) were found in the fungal community. *Pseudogymnoascus* sp. 1 and sp. 2 were recovered from *P. endiviifolia* and *Pseudogymnoascus* sp. 1 was recovered from *M. hariatii*.

Table 3 Diversity indices of fungal communities associated with the endemic Antarctic macroalgae *Pyropia endiviifolia* and *Monostroma hariatii* across the three Islands in Antarctica

Diversity index	Macroalgal species/Antarctic islands					
	<i>Pyropia endiviifolia</i>			<i>Monostroma hariatii</i>		
	Elephant	King George	Deception	Elephant	King George	Deception
Number of taxa	15	5	10	7	12	2
Number of isolates	71	15	18	29	104	2
Fisher- α	6.43	2.63	9.26	3.74	3.51	0
Margalef's	3.52	1.48	3.11	2.10	2.37	1.44
Simpson's	0.82	0.76	0.87	0.69	0.8	0.5

The diversity indices differed among the fungal communities of each macroalga across the three Antarctic Islands (Table 3). The fungal communities of *M. hariatii* collected in the Elephant and King George Islands showed higher diversity and richness indices in comparison with that of Deception Island. The fungal communities associated with *P. endiviifolia* collected in the Elephant and Deception Islands showed higher diversity and richness indices than King George Island.

The similarities among the fungal assemblages of the two macroalgae across the three Antarctic Islands were low. In addition, the fungal composition was variable among the macroalgal species collected in the three Islands. Figure 2a shows the Bray–Curtis values among the fungal assemblages of *M. hariatii* collected in the Elephant, King George and Deception Islands. According to Bray–Curtis values, the most similar fungal communities associated with *M. hariatii* were

found in King George and Elephant Island. Regarding *P. endiviifolia*, the Bray–Curtis index showed that the fungal assemblages of King George and Deception Islands were more similar (Fig. 2b). Additionally, the similarities of the fungal assemblages were compared between the two endemic macroalgal species (Fig. 3). The Bray–Curtis showed that the fungal assemblage of *M. hariatii* from Deception Island and *P. endiviifolia* from Elephant Island were similar and the assemblages of *P. endiviifolia* from King George and *P. endiviifolia* from Deception Islands were similar as well.

The principal component analysis revealed that salinity and pH exhibited a positive correlation with the fungal assemblages of *M. hariatii* from Elephant and King George Island as well as *P. endiviifolia* from King George Island (Fig. 4). Conductivity and temperature showed a positive correlation

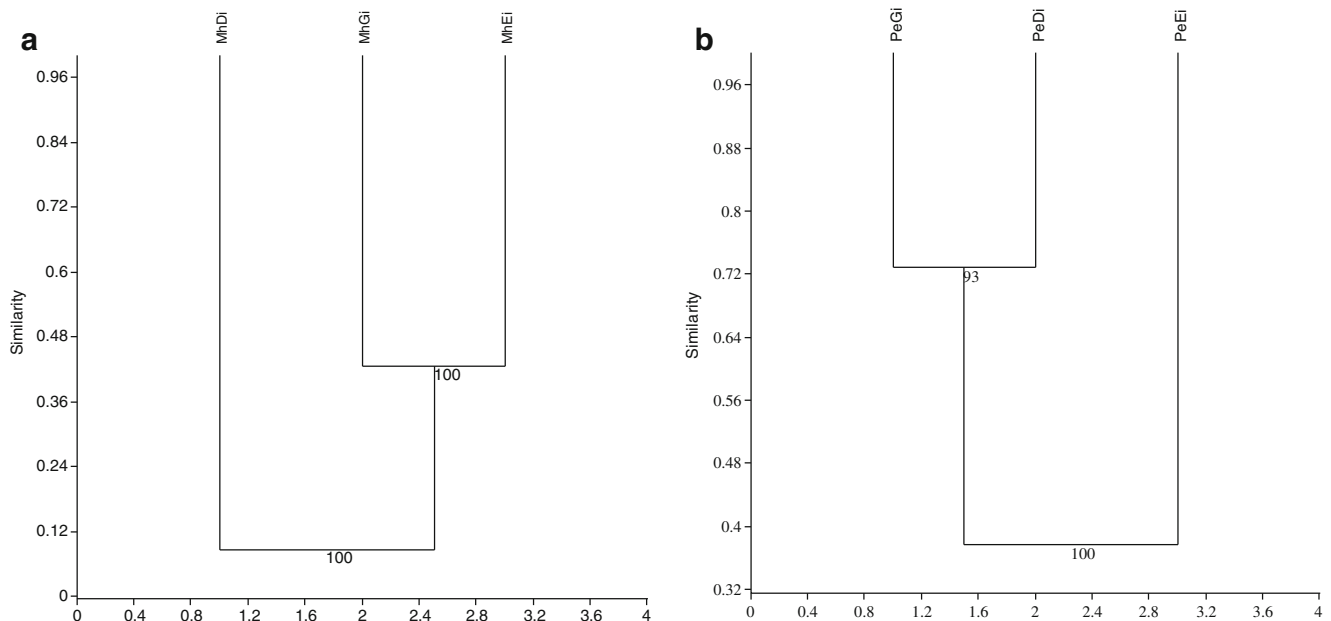


Fig. 2 Dendrograms showing the Bray–Curtis similarity measures for the fungal communities associated with the separated endemic Antarctic macroalgae *Monostroma hariatii* (a) and *Pyropia endiviifolia* (b). The results were obtained with 95 % confidence and bootstrap values calculated from 1,000 iterations. The sampled macroalgae were as follows:

MhEi, *Monostroma hariatii* from Elephant Island; MhGi, *Monostroma hariatii* from King George Island; MhDi, *Monostroma hariatii* from Deception Island; PeEi, *Pyropia endiviifolia* from Elephant Island; PeGi, *Pyropia endiviifolia* from King George Island; PeDi, *Pyropia endiviifolia* from Deception Island

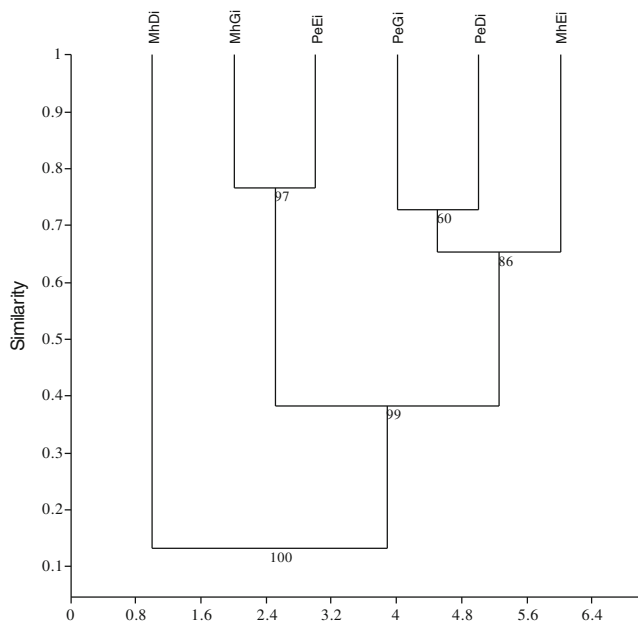


Fig. 3 Dendrogram showing the comparison of Bray–Curtis similarity measures for the fungal communities associated with the both endemic Antarctic macroalgae. The results were obtained with 95 % confidence and bootstrap values calculated from 1,000 iterations. The sampled macroalgae were as follows: PeEi, *Pyropia endiviifolia* from Elephant Island; MhEi, *Monostroma hariatii* from Elephant Island; PeGi, *Pyropia endiviifolia* from King George Island; MhGi, *Monostroma hariatii* from King George Island; PeDi, *Pyropia endiviifolia* from Deception Island; MhDi, *Monostroma hariatii* from Deception Island

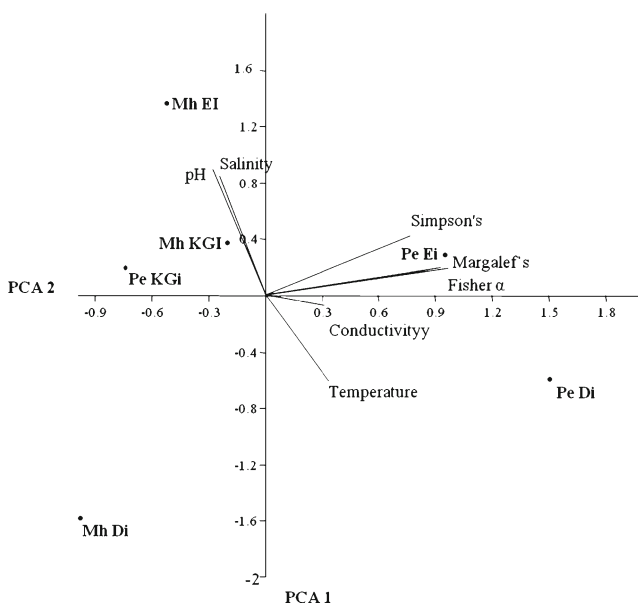


Fig. 4 Principal component analysis (PCA) plot calculated among the physico-chemical water parameters (temperature, salinity, pH and conductivity) obtained where the *Pyropia endiviifolia* (Pe) and *Monostroma hariatii* (Mh) were collected, as well as Fisher's (diversity), Margalef's (richness) and Simpson's (dominance) indices of the fungal assemblages associated with Antarctic macroalgae. EI Elephant Island, KGI King George Island, DI Deception Island

with Fisher's α , Margalef's and Simpson's indices for the fungal communities of *P. endiviifolia* from Elephant and Deception Islands.

A total of six algicolous fungal taxa were able to produce compounds with biological activities, which displayed values between 61 and 96 % of inhibition against the targets screened (Table 4). The extracts of *Pseudogymnoascus* species, *G. pullulans* and *M. australis* showed selective antifungal activities against *Candida albicans*, *C. krusei* and *Cladosporium sphaerospermum*. The extract of *Dipodascus australiensis* inhibited selectively the growth of *C. albicans*; *G. pullulans*, *M. australis* and *Pseudogymnoascus* sp. 1 were selective against *C. krusei*. Furthermore, *Pseudogymnoascus* sp. 2 displayed 95 % antifungal activity against the target *C. sphaerospermum*, which was approximately the same value of the control drug benomyl (94.5 % of inhibition). Additionally, the extract of *Penicillium steckii* inhibited 96 % of yellow fever virus, which was better than the control interferon alpha (IFN- α) (68 %). No extract displayed antibacterial or trypanocidal activities.

Discussion

Macroalgae have been cited as important repositories of fungal diversity in oceans; however, only few taxonomic, ecological and biotechnological studies were published until recent years. Complementing the works of Loque et al. [35] and Godinho et al. [19], the present study represents a continuation of the first comprehensive analysis addressing the fungal communities associated with two endemic macroalgae along the Antarctic Peninsula. The fungal taxa associated with *M. hariatii* and *P. endiviifolia* were comprised of a few dominant fungal species and a high number of singletons, showing a presence of rich fungal communities under extreme conditions.

The methods of distinguishing and defining endemic, indigenous or cosmopolitan fungal species in Antarctica remain under development. According to Ruisi et al. [47], (1) endemic species are characterised as true psychrophilic fungi that are able to actively grow and reproduce only in Antarctica; (2) indigenous species are taxa well adapted and able to grow and reproduce even at low temperatures (psychrotolerant species) or fast sporulating forms that are able to finish their lifecycles in a very short time; (3) ecotypes of cosmopolitan species able to grow actively, at least under Antarctic summer conditions, showing mesophilic-psychrotolerant behaviour as an adaptation to the cold Antarctic climate; and (4) cosmopolitan species are fungal propagules that are transported to Antarctica but are unable to grow under Antarctic conditions. Based on these criteria, the fungal species *M. australis* and *A. psychrotrophicus* are considered endemic to Antarctica;

Table 4 Biological activities of the extracts of fungal species associated with Antarctic macroalgae

		Inhibition of the targets (%)							
Fungal species	UFMGCB	Bacteria			Fungi			Virus Yellow fever	Protozoa <i>Trypanosoma cruzi</i>
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Cladosporium sphaerosperum</i>		
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 1	5941	0±1	0±3	0±3	29±13	61±1	0±5	45±12	2.8±2
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. 2	5936	0±2	0±2	0±5	58±20	29±2	95±11	0.4±7	0±5
<i>Dipodascus australiensis</i>	6031	0±5	0±5	0±4	71±19	41.5±5	0±3	44±3	10.4±2
<i>Guehomyes pullulans</i>	MH33.1	0±4	0±2	0±4	41.5±6	64±0	29±4	8±9	3±3
<i>Metschnikowia australis</i>	MH47.1.2	0±2	0±3	0±1	34.5±1	61±4	0±1	3±4	8±0.8
<i>Penicillium steckii</i>	6012	0±5	0±8	0±1	35±3	30±1	0±10	96±12	0±5
Control drugs	Chlo	100±5	98±12	83±6	—	—	—	—	—
	Amph B ³	—	—	—	100±23	100±13	—	—	—
	IFN-α	—	—	—	—	—	—	68±12	—
	Benz	—	—	—	—	—	—	—	45±5.3
	Ben	—	—	—	—	—	94.5±10	—	—

UFMGCB Culture of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal de Minas Gerais, *Chlo* chloramphenicol, *Amph B* amphotericin B, *IFN-α* interferon alpha, *Benz* benzimidazole, *Ben* benomyl

C. malorum, *Cryptococcus victoriae*, *Cryptococcus adeliensis*, *Pseudogymnoascus* species and *Mortierella antarctica* represent indigenous taxa; and *C. albidosimilis*, *G. pullulans*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Penicillium* species, *Phoma herbarum*, *Rhodotorula laryngis*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Rhodotorula minuta* represent cold-adapted cosmopolitan fungi with adaptations to survive in Antarctica. However, the biology and/or distributions of some species such as *D. australiensis*, *Oidiodendron truncatum* and several taxa identified only to generic rank remain more or less unknown.

Antarctomyces psychrotrophicus is not known outside of Antarctica and is an endemic, psychrophilic species of Thelebolales that has been isolated from soil of maritime and continental Antarctica [49], as an endophyte of *Deschampsia antarctica* [45], in association with the macroalga *Adenocystis utricularis* [35] and from lakes [20]. Hitherto now, *M. australis* was isolated only from Antarctic substrates including seawater [13], the stomach of the Antarctic krill species *Euphausia superba* [10], the algal thalli of *A. utricularis* at a high density [35], *Acrosiphonia arcta* and *Desmarestia menziesii* [19]. The discovery of *M. australis* in association with *M. hariatii* and *P. endiviifolia* from different areas of the Antarctic Peninsula reinforces the notion that this yeast may exhibit a specific ecological association with Antarctic macroalgae in the marine environment.

In Antarctica, *Cadophora* species were previously reported from a range of different substrates, namely mosses, a mummified seal carcass, skua feathers, soil, wood debris,

Colobanthus quitensis as an endophyte and lakes [2, 20, 46, 52]. *Cadophora* (Helotiales) has a phialophora-like morphology, but this genus is phylogenetically distinct from *Phialophora* [24]. According to Blanchette et al. [5], *Cadophora* species appear to have a circumpolar distribution in the Antarctic as well as the Arctic suggesting an adaptation to the extreme polar environment. *Cadophora malorum* was found in other substrate in Antarctica; however, this study represents the first record of *C. malorum* in association with Antarctic macroalgae in the marine environment.

Pseudogymnoascus species (aff. Thelebolales, Leotiomycetes, Ascomycota) were abundant and associated with both species of endemic Antarctic macroalgae. Although *Pseudogymnoascus* and *Geomyces* have historically been considered to represent the sexual and asexual stages of the same genus under a two name per fungus system of classification, respectively, Minnis and Lindner [37] treated the two as closely related but distinct genera under a one name per fungus system of classification based on phylogenetic placement of the type species. *Pseudogymnoascus* species, typically and historically identified under the name *Geomyces*, have been recorded frequently in Antarctica with a ubiquitous distribution and from a number of substrates including in the soils of cold regions [37], mosses [52], leaves of *C. quitensis* [46], thalli of macroalgae [16, 28] and freshwater lakes [20]. According to Lorch et al. [36] and Minnis and Lindner [38], the diversity of *Geomyces* and allies including *Pseudogymnoascus* as revealed by DNA sequence data is

greater than previously recognised based on traditional taxonomic methods. We found 36 isolates identified as *Pseudogymnoascus* sp. in association with Antarctic macroalgae. The results suggest that these *Pseudogymnoascus* isolates represent two species, which are found in the northern hemisphere. Although a critical taxonomic reevaluation of the diversity of *Geomyces* and allies is not available, existing information suggests that all three species recovered in this study may represent undescribed species, and these will be subject to further studies to elucidate their taxonomic positions in the context of a biogeographic study comparing northern and southern hemisphere isolates.

Some *Cryptococcus* species have been found frequently in various Antarctic substrates and many of them are psychrophilic [54]. *Cryptococcus albidosimilis* has been identified in Antarctic arid soil [55], but its presence in association with Antarctic macroalgae is reported first here. *Guehomyces pullulans* occurs in diverse habitats and can be found in soil and plants [12]. *Guehomyces pullulans* has also been found in soil of Antarctica [54]. The present study represents the first reports of *Cr. albidosimilis* and *G. pullulans* in association with marine algae in Antarctica.

In Antarctica, species of *Penicillium* have been described from different substrates such as soil and wood [2], lakes [20] and macroalgae [19, 35]. *Penicillium chrysogenum*, an extremophile, was isolated as a dominant species from permafrost in Antarctica [60] and the thalli of the macroalgae, *Adenocystis arcta*, *M. hariatii*, *P. decipiens* and *Ulva intestinalis* [19]. *Penicillium steckii* has a worldwide distribution; however, even if this species (recorded as *Penicillium citrinum*) was found in the Victoria Land, Antarctica [41], to our knowledge, there are no other reports of *P. steckii* from Antarctica or other reports of *P. steckii* from Antarctica or reports of it a association with tropical, temperate or polar macroalgae.

Additionally, 26 taxa displayed low similarity with sequences of fungi deposited in GenBank database or high similarities with unidentified fungi. These taxa showed different levels of sequence similarity with taxa identified as members of genera *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pseudogymnoascus* and *Verticillium*, which suggests that these fungi may represent new species. Further morphophysiological, phylogenetic and taxonomic studies will be necessary to determine if these fungi are known taxa adapted to the cold conditions of Antarctica or new species.

Our results showed that the fungal communities associated with *M. hariatii* and *P. endiviifolia* display considerable richness when compared with the results of other studies on tropical [50] and temperate [59] macroalgal hosts. The Simpson's index showed that a few taxa have approximately the same occurrence in the community, which may be attributed to the extreme conditions of the Antarctic environment. One of these dominant taxa was the yeast *M. australis*, which has been isolated only in Antarctica and for this reason is

considered an endemic species. In addition, a large number of single individuals (singletons) were recovered from the two endemic macroalgae. In Antarctica, the characterisation of fungal communities has shown that singletons are rare species that often represent more than half of the species within these communities [20]. The similarities analysis was low for the same and between the two macroalgal species across the three Antarctic Islands. Only the yeasts, *M. australis* and *M. guilliermondii*, occur in common in association with the *M. hariatii* and *P. endiviifolia*. However, we obtained only few isolates of these rare taxa and new studies using metagenomic techniques will be necessary to assist in understanding the relations among dominant and rare species within the fungal communities in associated with the endemic Antarctic macroalgae.

The symbiosis among fungi and marine macroalgae has been little studied, and the symbiotic relationships vary from parasitism to mutualism [28]. However, the specific ecological function of fungi associated with macroalgae is not well understood [28]. Some fungal genera found in association with endemic *M. hariatii* and *P. endiviifolia* have been recorded as parasites (*Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Rhodotorula* and *Verticillium*) and saprobes (*Cadophora*, *Cladosporium*, *Mortierella* and *Phoma*) [29] in marine ecosystems. However, the ecological role of the majority of genera such as *Antarctomyces*, *Cystofilobasidium*, *Dipodascus*, *Guehomyces*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma* and *Oidiodendron* remains unknown to poorly known.

According to Santiago et al. [48], the ability of Antarctic fungi to survive in extreme conditions suggests that they may display unusual biochemical pathways that allow them to generate specific or new molecules that could be used to develop new drugs. *Penicillium steckii* isolated from *Monostroma hariatii* was able to produce antiviral compounds, which displayed better antiviral activity than the value of control drug IFN- α . Some *Penicillium* taxa associated with macroalgae have been described as producers of bioactive compounds. One *Penicillium* species isolated from the macroalga *U. intestinalis* was observed to produce cytotoxic metabolites including penochalasiol A–C, penostatins A–I and penochalasiol D–H [27]. The antibacterial and cytotoxic compounds Di(2-ethyl hexyl) phthalate and fungisterol were isolated from *P. brevicompactum*, which was isolated from the associated macroalga, *Pterocladia* sp. [3]. The extracts of *P. chrysogenum* recovered from the Antarctic endemic macroalga, *P. decipiens*, yielded extract with high and selective antifungal and/or trypanocidal activities [19]. Additionally, the extracts from *Pseudogymnoascus* sp. 1 UFMGCB 5941, *Pseudogymnoascus* sp. 2 UFMGCB 5936, *D. australiensis* UFMGC6031, *Guehomyces pullulans* MH33.1 and *M. australis* MH47.1.2 displayed selective antifungal activity. Li et al. [34] isolated the geomycins B and C

from *Geomyces* sp. obtained from soil in Antarctica, which displayed antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* and antibacterial activity against *S. aureus*, *E. coli* and *Streptococcus pneumoniae*. A species identified under the catchall name, *Geomyces pannorum*, and isolated from leaf litter produces pannomycin, a *cis*-decalin secondary metabolite with potential antibacterial activity against *S. aureus* [42]. To our knowledge, there are no other reports that *D. australiensis*, *G. pullulans* and *M. australis* are able to produce bioactive metabolites with antimicrobial activities. All bioactive algicolous fungi found in association with *M. hariatii* and *P. endiviifolia* will be subjected to bioactivity-guided fractionation to isolate their bioactive compounds.

The Antarctic Peninsula is a pristine environment and represents one of the fastest changing regional climates on Earth, and its warming seems to have a profound influence on the marine environment [9]. Consequently, all biota living in the marine ecosystem of the Antarctic Peninsula are under the varying effects of climate change. We found fungal communities associated with endemic macroalgae with dominant and rare fungal species that are endemic, cold-adapted or cosmopolitan taxa, which displayed interesting dynamics (richness, dominance and similarities) between the hosts as well as along the Antarctic Peninsula. A decrease in endemic or cold-adapted fungal species associated with an increase of cosmopolitan taxa within the fungal communities associated with endemic macroalgae may reflect the influence of climate change in the maritime Antarctic Peninsula. For this reason, we hypothesise that observations on the balance and dynamics of richness, dominance and distribution among endemic, cold-adapted or cosmopolitan fungal taxa might be used to understand and model the influence of climate change on the maritime Antarctic microbiota. The extracts of fungi that displayed antimicrobial and antiviral activities may represent sources of promising prototype molecules to develop drugs, and this study highlights the need to discover and preserve this valuable fungal germplasm given that some cold-requiring species may not be able to persist in a warming environment.

Acknowledgements We acknowledge the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processes PROANTAR 557030/2009-9, Universal 471721/2013-1 and PROANTAR 407230/2013-0, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Process Universal 0050-13 and the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP 2084/07), the Program for Technological Development of Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ. A.M. Minnis received financial support from the US Forest Service, Northern Research Station and the Inter-Agency Agreement F11RG00184 grant from the US Fish and Wildlife Service. The results of this study are part of the Master Science degree of LE Furbino within the Programa de Pós-Graduação in Biotecnologia of UFOP and the Pos-Doctoral of VM Godinho of CNPq under supervision of LH Rosa.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402
- Arenz BE, Held BW, Jurgens JA, Farrell RL, Blanchette RA (2006) Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Bio Bioch* 38:3057–3064
- Atalla MM, Zeinab HK, Eman RH, Amani AY, Abeer AAEA (2011) Physiological studies on some biologically active secondary metabolites from marine-derived fungus *Penicillium brevicompactum*. www.Gate2Biotech.com, 1: 1–15
- Bhadury P, Bik H, Lambshead JD, Austen MC, Smerdon GR, Rogers AD (2011) Molecular diversity of fungal phylotypes co-amplified alongside nematodes from coastal and deep-sea marine environments. *PLoS ONE* 6:e26445:1–7
- Blanchette RA, Held BW, Arenz BE, Jurgens JA, Baltes NJ et al (2010) An Antarctic hot spot for fungi at Shackleton's historic hut on Cape Royds. *Microb Ecol* 60:29–38
- Bridge PD, Spooner BM (2012) Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal Ecol* 5:381–394
- Carvalho CR, Gonçalves VN, Pereira CB, Johann S, Galliza IV et al (2012) The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*) from the Brazilian savannah. *Symbiosis* 57:95–107
- Charpy-Roubaud C, Sourina A (1990) The comparative estimation of phytoplanktonic, microphytobenthic and macrophytobenthic primary production in the oceans. *Mar Microb Food Webs* 4:31–57
- Clarke A, Murphy EJ, Meredith MP, King JC, Peck LS et al (2007) Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. *Phil Trans Royal Soc* 362:149–166
- Donachie SP, Zdanowski MK (1998) Potential digestive function of bacteria in krill, *Euphausia superba* stomach. *Aquat Microb Ecol* 14: 129–136
- Espinell-Ingroff A, Kerkering TM (1991) Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 29:393–394
- Fell JW, Guého-Kellermann E (2011) *Guehomyces* Fell & Scorzetti (2004). In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The yeasts, a taxonomic study*, 5th edn. Elsevier, Amsterdam
- Fell JW, Hunter IL (1968) Isolation of heterothallic yeast strains of *Metschnikowia* Kamienski and their mating reactions with *Chlamydozoma* Wickerham spp. *Anton Leeuw* 34:365–376
- Fell JW, Hunter IL, Tallman AS (1973) Marine basidiomycetous yeasts (*Rhodospiridium* spp. n.) with tetrapolar and multiple allelic bipolar mating systems. *Can J Microbiol* 19:643–657
- Fell JW, Statzel AC (1971) *Sympodiomyces* gen. n., a yeast-like organism from southern marine waters. *Anton Leeuw* 37:359–367
- Frisvad JC, Samson RA (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* a guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud Mycol* 49:1–174
- Gazis R, Rehner S, Chaverri P (2011) Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Mol Ecol* 20:3001–3013
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61:1323–1330
- Godinho VM, Furbino LE, Santiago IF, Pellizzari FM, Yokoya N et al (2013) Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME* 7:1434–1451

20. Gonçalves VN, Vaz ABM, Rosa CA, Rosa LH (2012) Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* 82:459–471
21. Grasso S, Bruni V, Maio G (1997) Marine fungi in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Microbiologica* 20:371–376
22. Guiry MD, Guiry GM (2012) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 11 October 2012
23. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:1–9
24. Harrington TC, McNew DL (2003) Phylogenetic analysis places the phialophora-like anamorph genus *Cadophora* in the *Helotiales*. *Mycotaxon* 87:141–151
25. Hoog GS de, Guarro J, Gené J, Figueras MA (2000) *Atlas of clinical fungi*, 2nd edn. Centraalbureau voor Schimmeltcultures, Utrecht/Universitat Rovira i Virgili, Reus
26. Hyde KD, Lee SY (1995) Ecology of mangrove fungi and their role in nutrient cycling. What gaps occur in our knowledge? *Hydrobiologia* 295:107–118
27. Iwamoto C, Yamada T, Ito Y, Minoura K, Numata A (2001) Cytotoxic cytochalasins from a *Penicillium* species separated from a marine alga. *Tetrahedron* 57:2997–3004
28. Jones EB (2011) Fifty years of marine mycology. *Fungal Div* 50:73–112
29. Jones EBG, Sakayaro J, Suetrong S, Smorithipol S, Pang KL (2009) Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. *Fungal Div* 35:1–187
30. Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2011) *Dictionary of the Fungi*, 10th edn. CAB International, Wallingford
31. Kohlmeyer J, Kohlmeyer E (1979) *Marine mycology, the higher fungi*. Academic Press
32. Kurtzman CP, Fell JW (2011) *The yeast, a taxonomic study*, 5th edn. Amsterdam, Elsevier
33. Lachance MA, Bowles JM, Starmer WT, Barker JS (1999) *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian hibiscus flowers. *Can J Microbiol* 45:172–177
34. Li Y, Sun B, Liu S, Jiang L, Liu X, Zhang H, Che Y (2008) Bioactive steroidal acid derivatives from the Antarctic ascomycete Fungus *Geomyces* sp. *J Nat Prod* 71:1643–1646
35. Loque CP, Medeiros AO, Pellizzari FM, Oliveira EC, Rosa CA, Rosa LH (2010) Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. *Polar Biol* 33:641–648
36. Lorch JM, Lindner DL, Gargas A, Muller LK, Minnis AM, Blehert DS (2013) A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycologia* 105:237–252
37. Mercantini R, Marsella R, Cervellati MC (1989) Keratinophilic fungi isolated from Antarctic soil. *Mycopathologia* 106:47–52
38. Minnis AM, Lindner DL (2013) Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biol* 117:638–649
39. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standard. 5th ed. NCCLS document M11-A5. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA
40. Nedzarek A, Rakusa-Suszczewski S (2004) Decomposition of macroalgae and the release of nutrients in admiralty Bay, king George island, antarctica. *Polar Biosci* 17:16–35
41. Onofri S, Zucconi L, Tosi S (2007) Continental Antarctic fungi. IHW-Verlag, Eching bei München
42. Parish CA, Cruz M, Smith SK, Zink D, Baxter J et al (2009) Antisense-guided isolation and structure elucidation of pannomycin, a substituted *cis*-decalin from *Geomyces pannorum*. *J Nat Prod* 72: 59–62
43. Quartino ML, Zaixso HE, Boraso de Zaixso AL (2005) Biological and environmental characterization of marine macroalgal assemblages in Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Bot Mar* 48:187–197
44. Romanha AJ, de Castro SL, Soeiro MNC, Lannes-Vieira J, Ribeiro I et al (2010) *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:233–238
45. Rosa LH, Vaz ABM, Caligiome RB, Campolina S, Rosa CA (2009) Endophytic fungi associated with the Antarctic Grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). *Polar Biol* 32:161–167
46. Rosa LH, Vieira MLA, Santiago IF, Rosa CA (2010) Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* 73:178–189
47. Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S (2007) Fungi in Antarctica. *Rev Environ Sci Biotechnol* 6:127–141
48. Santiago IF, Alves TMA, Rabello A, Sales-Júnior PA, Romanha AJ et al (2012) Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles* 16:95–103
49. Stchigel AM, Cano J, MacCormack CW (2001) *Antarctomyces psychrotrophicus* gen. et sp. nov., a new ascomycete from Antarctica. *Mycol Res* 105:377–382
50. Suryanarayanan TS, Venkatachalam A, Thirunavukkarasu N, Ravishanker JP, Doble M, Geetha V (2010) Internal mycobiota of marine macroalgae from the Tamilnadu coast: distribution, diversity and biotechnological potential. *Bot Mar* 53:457–468
51. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
52. Tosi S, Casado B, Gerdol R, Caretta G (2002) Fungi isolated from antarctic mosses. *Polar Biol* 25:262–268
53. Vaz ABM, Rosa LH, Vieira MLA, Garcia V, Teixeira LCRS et al (2011) The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in antarctica. *Braz J Microbiol* 42:937–947
54. Vishniac HS (2006) Yeast biodiversity in the Antarctic. In: Rosa CA, Pétér G (eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 221–240
55. Vishniac HS, Kurtzman CP (1992) *Cryptococcus antarcticus* sp. nov. and *Cryptococcus albidosimilis* sp. nov. basidioblastomycetes from antarctic soils. *Int J Syst Bacteriol* 42:547–553
56. Wedge DE, Kuhajek JM (1998) A microbioassay for fungicide discovery. *SAAS Bull Biochem Biotechnol* 11:1–7
57. White TJ, Bruns TD, Lee SB (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis NA, Gelfand J, Sninsky J et al (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315–322
58. Wiencke C, Clayton MN (2002) *Antarctic seaweeds*. A.R.G. Gantner Verlag KG, Ruggell
59. Zuccaro A, Mitchell JI (2005) Fungal communities of seaweeds. In: Dighton J, White JFP, Oudemans P (eds) *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. CRC Press, /Taylor and Francis, Boca Raton, pp 533–579
60. Zucconi L, Selbmann L, Buzzini P, Turchetti B, Guglielmin M et al (2012) Searching for eukaryotic life preserved in Antarctic permafrost. *Polar Biol* 35:749–757



Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*)

Mariana Costa Ferreira ^a, Mariana de Lourdes Almeida Vieira ^a, Carlos Leomar Zani ^b, Tânia Maria de Almeida Alves ^b, Policarpo Ademar Sales Junior ^c, Silvane M.F. Murta ^c, Alvaro Jose Romanha ^{c, d}, Laura Helena Vega Gonzales Gil ^e, Amanda Gomes de Oliveira Carvalho ^{e, f}, Jerri Edson Zilli ^g, Marcos José Salgado Vital ^h, Carlos Augusto Rosa ^a, Luiz Henrique Rosa ^{a, *}

^a Department of Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Laboratory of Chemistry of Natural Product, René Rachou Research Center, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Laboratory of Cellular and Molecular Parasitology, René Rachou Research Center, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Federal University of Santa Catarina, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Florianópolis, SC, Brazil

^e Department of Virology and Experimental Therapy, Aggeu Magalhães Research Center, FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil

^f Department of Genetic, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^g Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^h Biodiversity Study Center, Federal University of Roraima, Roraima, RR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2014

Accepted 26 December 2014

Available online 29 January 2015

Keywords:

Endophytes

Ecology

Medicinal plant

Chagas's disease

Yellow fever

ABSTRACT

We investigated the endophytic fungal community associated with the Amazonian medicinal plant *Carapa guianensis* and its potential for providing bioactive compounds. A total of 162 endophytic fungal isolates were obtained and identified by molecular methods. These isolates were classified into 35 different taxa in the genera *Aspergillus*, *Beltrania*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Endomelanconiopsis*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pilidiella*, *Trichoderma*, and *Xylaria*. The most frequent colonisers recovered of *C. guianensis* were *Colletotrichum* sp. 1, *Diaporthe* cf. *mayteni*, and *Pestalotiopsis* sp. 1. The fungal community had a moderate richness but high diversity and evenness indices. *Colletotrichum* sp. and *Pilidiella wangiensis* displayed selective antibacterial activity; *Diaporthe* cf. *mayteni* and *Endomelanconiopsis endophytica* showed high activity against amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*; and *Colletotrichum* sp. *Guignardia mangiferae*, *Pestalotiopsis* sp., and *Diaporthe melonis* were able to inhibit yellow fever virus proliferation. Our results suggest that the plants living in the tropical forest, such as the Amazonian hotspot region, can live in symbiosis with hidden and underestimated rich communities of endophytic fungi, which deserve protocols and/or specific laws to keep its future conservation. The capability of these endophytic fungi to produce bioactive

* Corresponding author. Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, P. O. Box 486, CEP 31270-901, Brazil. Tel.: +55 31 3409 2751; fax: +55 31 3409 2730.

E-mail address: lhrosa@icb.ufmg.br (L.H. Rosa).

compounds may be part of their chemical defense and adaptive response to survive and colonizing the plant host in wild environment. Consequently, these fungal communities may provide a source of bioactive molecules, including those able to inhibit or control neglected tropical diseases.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Endophytic microorganisms are able to live in the tissues of virtually all plants around the world (Petrini, 1991). Among the endophytic microbes, fungi have been studied as these symbionts including species that can be mutualists, decomposers, or parasites when associated with their hosts (Bacon and White, 2000; Schulz and Boyle, 2005). Endophytic fungi include a high diversity of species in the phyla *Ascomycota*, *Basidiomycota*, and *Zygomycota* that have been described in association with different plants around the world and represent an important reservoir of worldwide fungal diversity. Many studies have discussed the diversity, ecology, and biotechnological applications of endophytic fungi associated with grasses and wood plants in temperate environments (Rosa et al., 2011). However, limited information is available about the diversity of endophytic fungal communities in tropical forests, which are endowed with a rich floral biodiversity.

Brazil has a rich biodiversity of plant species associated with a long tradition of herbal medicine, and many of these plants are used in the form of crude extracts, infusions, or plasters to treat common infections (Vieira et al., 2012). The leaves of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae), a tree also known as Andiroba, have been used to treat fever, ulcers, arthritic pain, and skin parasites. According to Strobel (2002), reasonable hypotheses should govern the plant selection strategy for the discovery of bioactive endophytic fungi; one strategy includes examining plants that exhibit medicinal or pharmacological activities. Medicinal plants around the world appear to harbour a high biodiversity of endophytic microbes, including many fungal species, which are potential producers of bioactive molecules (Phongpaichit et al., 2008; Huang et al., 2008; Rosa et al., 2010). Some of these molecules may be interesting prototypes for developing new drugs for human welfare. With this in mind, we investigated the phylogeny, taxonomy, and diversity of endophytic fungi associated with *C. guianensis*, an Amazonian medicinal plant, as well as their ability to produce antimicrobial, trypanocidal, and antiviral compounds.

2. Materials and methods

2.1. Plant collection and isolation of fungal endophytes

Specimens of *Carapa guianensis* were collected in September 2009 in the municipality of São João da Baliza (0°57'02"N, 59°54'41"W), a particular area in Roraima state in the Amazonian region of Brazil that is maintained as a permanent plot by Embrapa Roraima. *Carapa guianensis* specimens were identified by comparing collected plants with the voucher specimen deposited at the herbarium at the Universidade Federal de Roraima, Brazil, under the codes 2961, 2964, 2962, 2963, and 2960.

Leaves from 30 apparently healthy *C. guianensis* individuals were sampled. Three leaves were collected from each individual plant, placed in sterile plastic bags, and stored for less than 24 h at 10 °C before isolating the endophytic fungi. Ten fragments (approximately 0.5 cm long and 0.5 cm wide) of each leaf were cut by using a flame-sterilised blade in a laminar flow hood to prevent the air from contaminating the tissues. The fragments were surface-sterilised by immersing in 70% ethanol (1 min) and 2% sodium hypochlorite (3 min), followed by washing with sterile distilled water (2 min) (Collado et al., 1996). Five fragments were plated onto Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA, Difco, USA) and on agar; YM medium (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 2% glucose, and 2% agar); both were supplemented with chloramphenicol at 100 µg/mL. The plates were incubated at 25 °C for 60 days. To test the effectiveness of the surface sterilisation, 100 µl of the final rinsing water was plated on PDA and YM media and incubated under the same conditions. Hyphal growth was monitored over an eight-week period. Using an aseptic technique, endophytes were transferred to PDA in 60 mm Petri plates and photographed after they completed their growth. The long-term preservation of filamentous fungal colonies took place in cryotubes with 15% sterile glycerol at –80 °C and in sterile distilled water at room temperature. All pure cultures of the endophytic fungal isolates were deposited in the Culture Collection of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal de Minas Gerais.

2.2. Fungal identification

The DNA extraction protocol for fungi was taken from Rosa et al. (2009). The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified with universal primers ITS1 and ITS4 (White et al., 1990). The amplification and sequencing of the ITS region was performed as described by Rosa et al. (2009). The protocol established by Carbone and Kohn (1999) was used to amplify and sequence the elongation factor alpha gene. Amplification and sequencing of the β -tubulin gene were performed according to Glass and Donaldson (1995) and Godinho et al. (2013), respectively. The resulting sequences were analysed with SeqMan P LaserGene software (DNASTAR Inc.) and a consensus sequence was obtained using BioEdit v. 7.0.5.3 software. To achieve

Table 1Molecular identification of endophytic fungi associated with the Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet.

UFMGCB ^a	N° of isolates	Top BLAST search results (GenBank accession number)	Query cover (%)	Identity (%)	N° of bp analysed	Proposed taxa ^e (GenBank acc. n°)
4991 ^{b,c}	30	<i>Glomerella cingulata</i> (KJ174456)	100	100	458	^{b,c} <i>Colletotrichum</i> sp. 1 (KJ677011 ^f , KP189340 ^g)
4807 ^{b,c,d}	21	<i>Phomopsis</i> sp. (JN564476)	100	99	491	^d <i>Diaporthe</i> cf. <i>mayteni</i> (KJ677018 ^f , KP189348 ^g , KP189356 ^h)
4876 ^b	18	<i>Pestalotiopsis clavispora</i> (JN943634)	100	100	415	^b <i>Pestalotiopsis</i> sp. 1 (KJ677031 ^f)
4967 ^{b,c}	10	<i>Diaporthe phaseolorum</i> (JQ936146)	100	98	420	^{b,c} <i>Diaporthe</i> sp. 1 (KJ677015 ^f , KP189343 ^g)
4806 ^{b,c}	8	<i>Diaporthe endophytica</i> (AB899789)	99	98	463	^c <i>Diaporthe melonis</i> (KJ677014 ^f , KP189342 ^g)
4896 ^{b,c,d}	8	<i>Phomopsis</i> sp. (JN153049)	100	100	424	^b <i>Phomopsis</i> sp. 3 (KJ677021 ^f , KP189347 ^g , KP189355 ^h)
4992 ^b	7	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i> (EU683656)	100	99	481	^b <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> (KJ677022 ^f)
4826 ^{b,c,d}	6	<i>Phomopsis</i> sp. (FJ233186)	100	99	465	^{b,c,d} <i>Phomopsis</i> sp. 1 (KJ677019, KP189346 ^g , KP189354 ^h)
4811 ^{b,c}	5	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> (NR111862)	99	99	470	^{b,c} <i>Diaporthe citri</i> (KJ677017 ^f , KP189345 ^g)
4882 ^b	4	<i>Beltrania querna</i> (GU905994)	99	97	352	^b <i>Beltrania</i> sp. (KJ677004 ^f)
4884 ^b	4	<i>Colletotrichum boninense</i> (JF683320)	100	100	468	^b <i>Colletotrichum</i> sp. 2 (KJ677006 ^f)
4826 ^{b,c}	4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (JX258674)	100	98	415	^c <i>Colletotrichum karstii</i> (KJ677013 ^f , KP189337 ^g)
4915 ^c	3	<i>Colletotrichum fructicola</i> (JQ247637)	100	99	675	^c <i>Colletotrichum alienum</i> (KP189336 ^g)
4817 ^b	3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (JQ936225)	100	99	344	^b <i>Colletotrichum</i> sp. 3 (KJ677008 ^f)
4813 ^b	3	<i>Guignardia mangiferae</i> (FJ538342)	100	99	486	^b <i>Guignardia mangiferae</i> (KJ677028 ^f)
4863 ^{b,c}	3	<i>Phomopsis</i> sp. (KC847977)	100	99	360	^{b,c} <i>Phomopsis</i> sp. 2 (KJ677020 ^f , KP189349 ^g)
4876 ^{b,c}	2	<i>Aspergillus panamensis</i> (FJ491665)	90	92	462	^{b,c} <i>Aspergillus</i> sp. (KJ677003 ^f , KP189334 ^g)
5012 ^b	2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KF053200)	100	99	426	^b <i>Colletotrichum</i> sp. 4 (KJ677010 ^f)
4809 ^b	2	<i>Pestalotiopsis clavispora</i> (KF913515)	99	97	409	^b <i>Pestalotiopsis</i> sp. 2 (KJ677032 ^f)
4958 ^b	2	<i>Trichoderma koningiopsis</i> (KC884821)	100	99	457	^b <i>Trichoderma</i> sp. (KJ677034 ^f)
5015 ^b	2	<i>Xylaria adscendens</i> (GU300101)	100	99	373	^b <i>Xylaria</i> sp. 1 (KJ677025 ^f)
5005 ^{b,c}	2	<i>Xylaria</i> sp. (JN541225)	100	99	473	^{b,c} <i>Xylaria</i> sp. 2 (KJ677026 ^f , KP189353 ^g)
4860 ^b	2	<i>Colletotrichum karstii</i> (HM585409)	99	98	331	^b <i>Colletotrichum</i> sp. 5 (KJ677012 ^f)
4872 ^c	2	<i>Colletotrichum incarnatum</i> (GQ369606)	100	99	526	^c <i>Colletotrichum</i> sp. 6 (KP189341 ^g)
4902 ^b	1	<i>Botryosphaeria mamane</i> (KF531822)	100	99	311	^b <i>Botryosphaeria mamane</i> (KJ677005 ^f)
4953 ^c	1	<i>Colletotrichum fructicola</i> (JQ247637)	100	98	690	^c <i>Colletotrichum fructicola</i> (KP189335 ^g)
4956 ^b	1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (JF746167)	100	99	321	^b <i>Colletotrichum</i> sp. 7 (KJ677007 ^f)
5016 ^{b,c}	1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KC010540)	100	99	435	^{b,c} <i>Colletotrichum</i> sp. 8 (KJ677009 ^f , KP189338 ^g)
4922 ^c	1	<i>Colletotrichum siamense</i> (KC566250)	100	98	360	^c <i>Colletotrichum siamense</i> (KP189339 ^g)
4815 ^{b,c}	1	<i>Diaporthe</i> sp.(EF423542)	100	98	435	^{b,c} <i>Diaporthe</i> sp. 2 (KJ677016 ^f , KP189344 ^g)
4848 ^b	1	<i>Entonaema pallida</i> (KC771490)	100	97	475	^b <i>Xylaria</i> sp. 3 (KJ677023 ^f)
4914 ^b	1	Fungal endophyte (KF435721)	98	97	462	^b <i>Xylariasp.</i> 4 (KJ677024 ^f)
4903 ^b	1	<i>Fusarium fujikuroi</i> (KJ000444)	100	98	429	^b <i>Fusarium</i> sp. (KJ677027 ^f)
5014 ^{b,c}	1	<i>Penicillium griseofulvum</i> (KJ175262)	100	100	308	^c <i>Penicillium citrinum</i> (KJ677029 ^f , KP189351 ^g)
4855 ^{b,c}	1	<i>Penicillium verruculosum</i> (HM469420)	100	99	409	^c <i>Penicillium</i> sp. (KJ677030 ^f , KP189350 ^g)
4904 ^b	1	<i>Pilidiella wangiensis</i> (NR111764)	100	98	333	^b <i>Pilidiella wangiensis</i> (KJ677033 ^f)
4916 ^c	1	<i>Xylaria cubensis</i> (GQ502701)	100	98	300	^c <i>Xylaria cubensis</i> (KP189352 ^g)

^a UFMGCB = Culture of Microorganisms and Cells from the Federal University of Minas Gerais.^b Taxa subjected to phylogenetic analysis based on the ITS.^c β-tubulin.^d Elongation factor regions for elucidation of taxonomic positions.^e Taxonomic position suggested by the phylogenetic analyses.^f ITS.^g β-tubulin factor sequences deposited.^h Elongation factor sequences deposited.

species-rank identification based on ITS, the consensus sequence was aligned with all sequences from related species as retrieved from the NCBI GenBank database using BLAST (Altschul et al., 1997). The fungal consensus sequences were deposited in GenBank (see accession numbers in Table 1). However, according to Gazis et al. (2011), sequencing the ITS region may not reveal some fungal genera. For this reason, the criteria established by Godinho et al. (2013) were used to interpret the sequences from the GenBank database; the genus and species were accepted for query coverage and sequence identities when $\geq 99\%$. For query coverage and sequence identities of 98%, the genus and species were accepted, but with the term 'cf.' for query coverage and sequence identities between 95% and 97%, only the genus was accepted; and for query coverage and sequence identities $\leq 95\%$, the isolates were identified with the order or family name or labelled as 'unknown' fungi. However, taxa that displayed query coverage and identities $\leq 97\%$ or an inconclusive taxonomic position were subjected to phylogenetic ITS analysis with estimations by using MEGA Version 5.0 (Tamura et al., 2011). The maximum composite likelihood method was employed to estimate evolutionary distances with bootstrap values calculated from 1000 replicate runs. To complete the molecular identification, the sequences of known type fungal strains or reference sequences obtained from fungal species deposited in international culture collections found in GenBank were added to improve the accuracy of the phylogenetic analysis. Information about fungal taxonomic hierarchies follows the rules established by Kirk et al. (2008) and MycoBank (<http://www.mycobank.org>), in addition to the Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>) databases.

2.3. Diversity, richness, dominance and distribution

To quantify species diversity, richness, and evenness, we used the following indices: (i) Fisher's α , (ii) Margalef's, and (iii) Simpson's, respectively. All calculations of diversity indices were performed using the computer programme PAST, version 1.90 (Hammer et al., 2001).

2.4. Fungal cultivation and preparation of extracts for biological assays

All isolates of filamentous fungi were cultivated using solid state fermentation to produce crude extracts according to protocols established by Santiago et al. (2012). Five-millimetre-diameter plugs of each endophytic filamentous fungus were inoculated into the centre of Petri dishes (60 mm diameter, 20 ml PDA). The plates were incubated at 25 ± 2 °C for 15 days. The culture materials from each Petri dish were cut and transferred to 50 ml vial tubes containing 35 ml of ethanol (PA, $\geq 99.8\%$, Vetec, Brazil). After 48 h at 10 °C, the organic phase was decanted and the solvent was removed under a vacuum centrifuge at 35 °C. An aliquot of each dried fungal extract was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, USA) to prepare a 100 mg ml^{-1} stock solution, which was stored at -20 °C.

2.5. Assay for antimicrobial activity

Susceptibility testing against *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258 and *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740 was performed using a protocol established by Carvalho et al. (2012). All crude extracts (dissolved in DMSO) were diluted to a final concentration of $250 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ for use in the antimicrobial assay. The bacteria and yeasts were grown at 37 °C in Mueller-Hinton (Difco, USA) and Sabouraud (Himedia, India) media, respectively. After 24 h under these conditions, microbial inocula were prepared by diluting the cell suspensions appropriately in Mueller-Hinton and RPMI1640 (supplemented with 2% glucose) media for bacteria and yeasts, respectively. Fifty microlitres of microbial inocula were added to each well in a 96-well plate and adjusted to $1\text{--}2 \times 10^8$ bacterial cells ml^{-1} and 1×10^6 yeast cells ml^{-1} . Twenty-five microlitres of extract and control solutions, as well as 25 μl of each medium, were added to attain the desired concentrations and the plates were incubated at 37 °C for 24 h. As an indicator of microorganism growth, 10 μl of 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide (MTT/Sigma-USA) (dissolved in sterile water at 5 mg/ml) were added to each well and incubated at 37 °C for 4 h, after which t, a product of the reduction of MTT, was read at λ 570 nm in a microplate reader to measure microbial growth. The results were expressed as percent inhibition in relation to the controls without extracts or drugs. Chloramphenicol ($32 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), amphotericin B ($2 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) and benomyl (at $2 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) (both from Sigma/USA) were used as positive drug controls for the bacterial, yeast and filamentous fungus assays, respectively.

2.6. In vitro assays with intracellular amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*

In vitro assays with amastigote forms of *T. cruzi* were performed according to protocols established by Romanha et al. (2010). Each extract was tested in triplicate. Benznidazole at its IC_{50} ($1 \text{ } \mu\text{l ml}^{-1}$) was used as a positive control. The results were expressed as percentage of growth inhibition. All assays were performed in triplicate.

2.7. Yellow fever virus antiviral assay

The antiviral assay was performed according to protocols adopted by Furbino et al. (2014) using a BHK-21 cell line expressing the yellow fever virus (YFV) bicistronic replicon (BHK-21-repYFV17D-LucNeolres), which contains the firefly luciferase reporter and neomycin phosphotransferase genes. The assay was performed in duplicate and the resulting values were expressed in raw light units (RLU). The values obtained from treatment with extracts were compared with that of the negative control by calculating the percentage inhibition value for each substrate relative to the untreated cells (negative control). Interferon alpha ($\text{IFN-}\alpha$) at 1000 UI ml^{-1} was used as positive drug control.

3. Results

A total of 162 endophytic fungal isolates were obtained from healthy *C. guianensis* leaves and identified by molecular methods into 35 different Ascomycota taxa (Table 1, Figs. 1–3). The genera found as endophytes included *Aspergillus*, *Beltrania*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Endomelanconiopsis*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pilidiella*, *Trichoderma*, and *Xylaria*.

Among the endophytic fungi recovered, the dominant species were *Colletotrichum* sp. 1, *Diaporthe* cf. *mayteni*, and *Pestalotiopsis* sp. 1, which represented $\geq 11.11\%$ of the total isolate frequency within the community. Six taxa displayed intermediate frequency (≥ 0.3 and ≤ 11.11) with between ten and four isolates. Twenty-eight taxa (frequency ≤ 0.24) represented the minor components of the fungal community that yielded at least three isolates. Twenty fungal taxa presented low molecular similarities or inconclusive information compared with known fungal sequences deposited in the GenBank

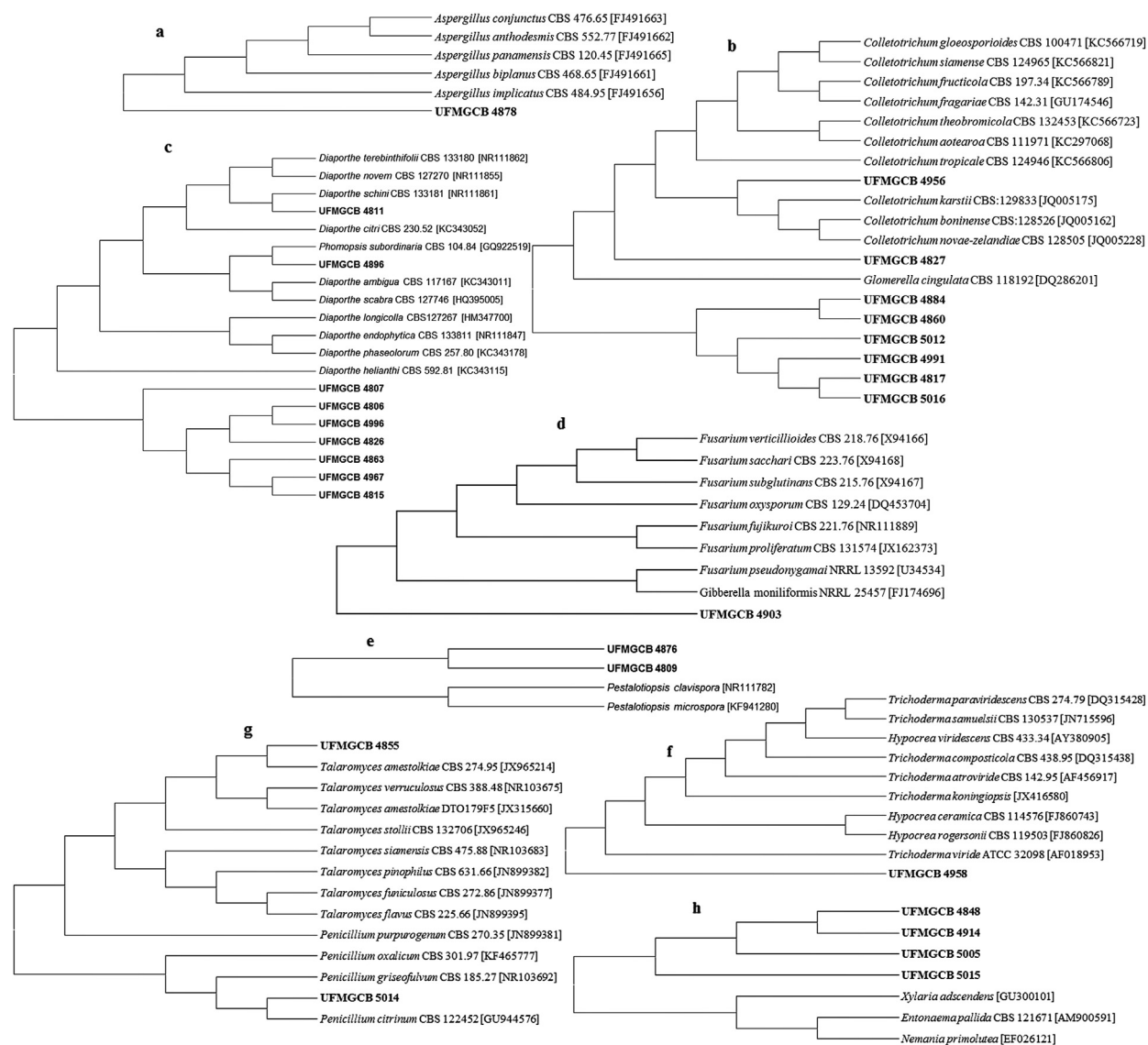


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the sequences of endophytic fungi (in bold) associated with *Carapa guianensis* compared with reference sequences of the closest species following BLAST analysis, deposited in the GenBank database. The trees were constructed on the basis of the ITS region sequences using the maximum composite likelihood method. The trees are represented by (a) *Aspergillus*, (b) *Colletotrichum*, (c) *Diaporthe*, (d) *Fusarium*, (e) *Pestalotiopsis* (f) *Trichoderma*, (g) *Penicillium*, and (h) *Xylaria*.

database. The endophytic fungal community of *C. guianensis* had a moderate richness (Margalef's index = 6.68), but high diversity (Fisher's alpha = 13.73), and evenness (Simpson's index = 0.91).

Among the 162 extracts assayed, nine fungal taxa produced bioactive compounds against the targets assayed (Table 2), when compared with the inhibition values of their respective drug controls. *Colletotrichum* sp. and *Pilidiella wangiensis* displayed selective antibacterial activity against the Gram negative bacterium *E. coli*. *Diaporthe* cf. *mayteni* and *Endome-lanconiopsis endophytica* showed high trypanocidal activities against amastigote forms of *T. cruzi*. Additionally, *Colletotrichum* sp., *Guignardia mangiferae*, *Pestalotiopsis* sp., and *Diaporthe melonis* were able to inhibit yellow fever virus proliferation.

5. Discussion

The diversity of the endophytic fungi associated with *Carapa guianensis* was consistent with the studies of endophytes from other medicinal plants (Phongpaichit et al., 2008; Carvalho et al., 2012; Vieira et al., 2012). The most frequent endophytic isolates were the members of *Colletotrichum*. Several species of the genus *Colletotrichum* are known to be endophytes that inhabit several plant hosts (Marcelino et al., 2008; Rosa et al., 2010). *Diaporthe* (the teleomorph stage of *Phomopsis*) was the

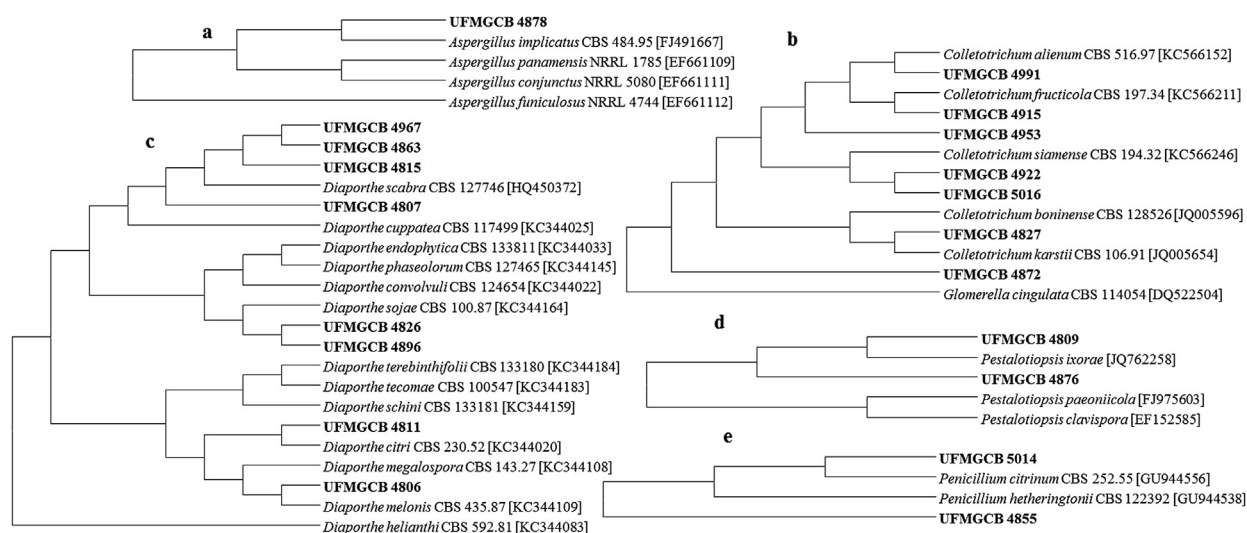


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the sequences of endophytic fungi (in bold) associated with *Carapa guianensis* Aublet compared with reference sequences of the closest species following BLAST analysis, deposited in the GenBank database. The trees were constructed on the basis of the β -tubulin region sequences using the maximum composite likelihood method. The trees are represented by (a) *Aspergillus*, (b) *Colletotrichum*, (c) *Diaporthe*, (d) *Pestalotiopsis*, and (e) *Penicillium*.

most common genus found associated with *C. guianensis*. The *Diaporthe/Phomopsis* complex includes plant pathogens and endophytic species (Van Niekerc et al., 2005; Santos et al., 2010) and was found as endophyte in association with medicinal plants such as *Taxus chinensis* (Liu et al., 2008), *Taxus globosa* (Soca-Chafre et al., 2011), and shrubs in India (Naik et al., 2008). Different endophytic *Pestalotiopsis* species have been isolated from plant species living in tropical and subtropical regions. Additionally, *Pestalotiopsis* is considered to be a dominant endophytic genus in nature (Wei et al., 2007).

Within the endophyte community on *C. guianensis*, 28 taxa were obtained in low frequencies with an abundance $\leq 0.24\%$, which, despite representing minor components, included species that are able to produce bioactive compounds. These results suggest that singletons also represent important components of the endophytic fungal communities, especially for bio-prospecting programmes to discover bioactive molecules. Additionally, our results reinforce the hypothesis of Carvalho et al. (2012), suggesting that these singleton species may include rare, endemic, or new cryptic species that could have an important ecological role for their host plants.

A total of 20 endophyte taxa recovered showed low similarity with sequences of fungi deposited in the GenBank database. These taxa showed different levels of sequence similarity with taxa identified to genera (*Aspergillus*, *Beltrania*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Trichoderma*, and *Xylaria*) and may represent new fungal species. However, additional morphological and phylogenetic taxonomic studies will be necessary to determine the correct identification of these fungal species and to ascertain whether they represent new taxa.

Colletotrichum sp., *Pilidiella wangiensis*, *Diaporthe* cf. *mayteni*, *Endomelanconiopsis endophytica*, *Guignardia mangiferae*, *Pestalotiopsis* sp., and *Diaporthe melonis* were able to produce bioactive compounds against the targets assayed. The complex of *Colletotrichum/Glomerella* species have been described as prolific endophytic bioactive fungi with antimicrobial (Liu et al., 2003) and cytotoxic (Rosa et al., 2010) activities. *Diaporthe* cf. *mayteni* UFMGCB 4830 and *D. melonis* UFMGCB 4988 displayed trypanocidal and antiviral activities, respectively. The *Diaporthe/Phomopsis* endophytic complex is characterised as a high producer of bioactive compounds. Agusta et al. (2006) isolated (–)-epicytoskyrin, a compound produced by an endophytic *Diaporthe* sp. that exhibits moderate cytotoxic activity against KB cells. Two azaphilones, phomoeuphorbins A and C, were

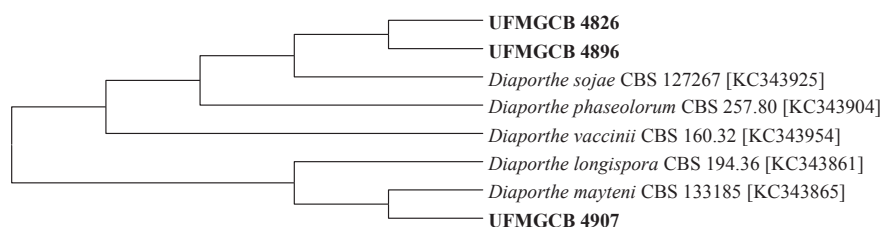


Fig. 3. Phylogenetic analysis of the sequences of endophytic *Diaporthe* (in bold) associated with *Carapa guianensis* compared with reference sequences of the closest species following BLAST analysis, deposited in the GenBank database. The trees were constructed on the basis of elongation factor region sequences using the maximum composite likelihood method.

Table 2Biological activities of extracts of endophytic fungi species associated with *Carapa guianensis* Aublet.

Endophytic taxa	^a UFMGCB	^b <i>E. coli</i>	^c <i>S. aureus</i>	^d <i>P. aeruginosa</i>	^e <i>C. albicans</i>	^f <i>C. krusei</i>	^g <i>C. sphaerospermum</i>	^h <i>T. cruzi</i>	ⁱ Yellow fever virus
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	4991	95.4 ± 9	27 ± 0	0 ± 1	12 ± 35	8 ± 1	54 ± 4	0 ± 2	—
<i>Colletotrichum</i> sp. 6	4872	98 ± 0	0 ± 0	0 ± 6	4 ± 16	34.5 ± 17	0 ± 1	1.6 ± 1	—
<i>Colletotrichum</i> sp. 8	4918	100 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 3	0 ± 66	5 ± 1	55 ± 0.75
<i>Diaporthe</i> cf. <i>mayteni</i>	4830	18 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	20 ± 0	22 ± 0	19 ± 0	100 ± 13	—
<i>Diaporthe melonis</i>	4988	3 ± 0	0 ± 2	0 ± 3	22 ± 3	48 ± 18	0 ± 4	5 ± 1	52 ± 4
<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	4995	2 ± 4	0 ± 7	0 ± 0	33 ± 10	34 ± 14	0 ± 4	86 ± 3	—
<i>Guignardia mangiferae</i>	4976	27 ± 22	0 ± 0	0 ± 3	58 ± 17	53 ± 6	0 ± 4	10 ± 1	55 ± 18.6
<i>Phomopsis subordinaria</i>	4986	4 ± 13	0 ± 0	0 ± 4	25 ± 5	65.4 ± 0	0 ± 3	3 ± 1	59 ± 2
<i>Pilidiella wangiensis</i>	4904	99 ± 4	26 ± 0	0 ± 2	27 ± 0	32 ± 5	0 ± 12	9 ± 1	—
Control drugs	Chlo ^j	100 ± 5	98 ± 12	83 ± 6	—	—	—	—	—
	Amph ^k	—	—	—	100 ± 23	100 ± 13	—	—	—
	IFN- α ^l	—	—	—	—	—	—	—	68 ± 12
	Benz ^m	—	—	—	—	—	—	45 ± 5	—
	Ben ⁿ	—	—	—	—	—	94.5 ± 10	—	—

— = no activities.

^a UFMGCB Culture of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal de Minas Gerais.^b *Escherichia coli* ATCC 11775.^c *Staphylococcus aureus* ATCC 12600.^d *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.^e *Candida albicans* ATCC 60193.^f *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*) ATCC 6258.^g *Cladosporium phaeospermum* CCT 1740.^h *Trypanosoma cruzi*.ⁱ Yellow Fever Virus.^j Chlo = chloramphenicol (at 32 µg ml⁻¹).^k Amph B = amphotericin B (at 2 µg ml⁻¹).^l IFN- α = interferon alpha (at 1000 UI ml⁻¹).^m Benz = benznidazole (at 1 µl ml⁻¹).ⁿ Ben = Benomyl (at 2 µg ml⁻¹). The endophytic fungal extracts were assayed for antimicrobial activity at 250 µg ml⁻¹ and at 20 µg ml⁻¹ for trypanocidal and antiviral activities. In bold, the most promising values of antimicrobial, antiparasitic, and antiviral (in percentage) with the mean and coefficient of variation.

produced by the endophytic fungus *Phomopsis euphorbiae* and were recovered from *Trewia nudiflora*, which also displayed cytotoxicity against the cell lineage C8166 (Yu et al., 2008). The extract of the endophyte *Phomopsis* sp. displayed selective antifungal activity against the opportunistic yeast *C. albicans* (Carvalho et al., 2012).

Guignardia mangiferae UFMGCB 4976 showed promising antiviral activity. *Guignardia* taxa are endophytes that can remain latent in their host plants for a prolonged period or display disease symptoms when their hosts are growing under adverse environmental conditions (Rodrigues et al., 2004). Siqueira et al. (2011) reported *Guignardia bidwellii* as endophytes of the Brazilian medicinal plant *Lippia sidoides*. Additionally, *Guignardia* species were found in association with a medicinal plant from the Brazilian savanna, *Stryphnodendron adstringes*; among them *G. mangiferae* was able to produce antifungal activity against the yeast *C. albicans* (Carvalho et al., 2012).

Pilidiella wangiensis UFMGC 4904 was able to selectively inhibit the growth of *E. coli*. *Pilidiella wangiensis* was described from *Eucalyptus* sp. in Australia by Crous et al. (2012). Species of *Pilidiella* have been reported as plant pathogens (Van Niekerk et al., 2004). However, Ho et al. (2012) isolated *Pilidiella* sp. as an endophyte in *Lindera aggregata*, a medicinal herb of Taiwan. As *P. wangiensis* has shown potential as a producer of antibacterial activity, further investigation is required to certify whether *P. wangiensis* found in the leaves of *C. guianensis* is a pathogen or endophyte. The extract of *Endomelanconiopsis endophytica* UFMGC 4995 displayed trypanocidal activity. Rojas et al. (2008) described *Endomelanconiopsis* as a new anamorph genus in the *Botryosphaeriaceae*. *Endomelanconiopsis endophytica* was first isolated as a dominant endophytic fungus from healthy leaves of *Theobroma cacao* (cacao, Malvaceae) and *Heisteria concinna* (*Erythrolaceae*) in Panama.

Endophytic fungi are able to produce different bioactive compounds, which are important from an ecological perspective as well as from a biotechnological standpoint (Kusari et al., 2012). According to Fischbach and Walsh (2009) ecology is an important biological science and the basis to bioprospection programs. Additionally, to characterize and understand the symbiosis (mutualism, parasitism, competition, and predation) between fungi with their hosts in natural environments may offer good opportunities to biotechnological applications. We detected endophytic fungal species in symbiosis with the medicinal Amazonian plant *C. guianensis* able to produce compounds with antibacterial, trypanocidal, and antiviral activities, suggesting that the tissues of plants used as folk medicine may represent a natural microhabitat able to shelter fungal strains producer of bioactive metabolites. The capability of these endophytic fungi to produce bioactive compounds may be part of their chemical defense and adaptive response to survive and colonizing the plant host in wild environment.

Our results show that the medicinal Amazonian plant *C. guianensis* shelter a diverse fungal community, including a few dominant taxa contrasting with high numbers of singletons, followed by intermediate species, which represent a prolific source of compounds with antibacterial, trypanocidal, and antiviral activities. To our knowledge, this study is the first report of the trypanocidal activity of *E. endophytica* and *D. cf. mayteni* and the antiviral activity of *G. mangiferae* and *D. melonis*. These

results suggest that the plants living in the tropical forest, such as the Amazonian hotspot region, can live in symbiosis with hidden and underestimated rich communities of endophytic fungi, which deserve protocols and/or specific laws to keep its future conservation. Additionally, taxonomic, and ecology studies between endophytic fungi with their hosts may provide a source of bioactive molecules, including those able to inhibit or control neglected tropical diseases.

Acknowledgements

This work received support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROCAD-NF – CAPES) (23038.003478/2013-92), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico and Tecnológico, CNPq Universal 471721/2013-1 and 470453/2012-5, and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (0050-13), Process Universal 0050-13. The authors thank the Program for Technological Development of Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities. We also thank Dr. M.A. Soares for your help with sequence deposit.

References

- Agusta, A., Ohashi, K., Shibuya, H., 2006. Bisanthraquinone metabolites produced by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. Chem. Pharm. Bull. 54, 579–582.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389–3402.
- Bacon, C.W., White, J.F., 2000. Microbial Endophytes. Dekker, New York.
- Carbone, I., Kohn, L.M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91, 553–556.
- Carvalho, C.R., Gonçalves, V.N., Pereira, C.B., Johann, S., Galliza, I.V., Alves, T.M.A., Rabello, A., Sobral, M.E.G., Zani, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2012. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. Symbiosis 57, 95–107.
- Collado, J., Platas, G., Peláez, F., 1996. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. Nova Hedwig. 63, 347–360.
- Crous, P.W., Braun, U., Hunter, G.C., Wingfield, M.J., Verkley, G.J.M., Shin, H.D., Nakashima, C., Groewald, J.Z., 2012. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. Stud. Mycol. 75, 35–114.
- Fischbach, M.A., Walsh, C.T., 2009. Antibiotics for emerging pathogens. Science 325 (5944), 1089–1093.
- Furbino, L.E., Godinho, V.M., Santiago, I.F., Pellizari, F.M., Alves, T.M.A., Zani, C.L., Junior, P.A.S., Romanha, A.J., Carvalho, A.G.O., Gil, L.H.V.G., Rosa, C.A., Minnis, A.M., Rosa, L.H., 2014. Diversity Patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae across the Antarctic Peninsula. Microb. Ecol. 67, 775–787.
- Gaziz, R., Rehner, S., Chaverri, P., 2011. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. Mol. Ecol. 20, 3001–3013.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1323–1330.
- Godinho, V.M., Furbino, L., Santiago, I.F., Pelizzari, F.M., Yokoya, N.S., Pupo, D., Diclá, A., Alves, T.M., Junior, P.A., Romanha, A.J., Zani, C.L., Cantrell, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2013. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. ISME J. 7, 77–145.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 4, 4–9.
- Ho, M.Y., Chung, W.C., Huang, H.C., Chung, W.H., 2012. Identification of endophytic fungi of medicinal herbs of *Lauraceae* and *Rutaceae* with antimicrobial property. Taiwan J. 7, 229–241.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H., Sun, M., 2008. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. Fungal Div. 33, 61–75.
- Kirk, P., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A., 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, tenth ed. CAB International, Wallingford, UK.
- Kusari, S., Hertweck, C., Spiteller, M., 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. Chem. Biol. 19 (7), 792–798.
- Liu, L., Tian, R., Liu, S., Chen, X., Guo, L., Che, Y., 2008. Pestaloficiols A-E, bioactive cyclopropane derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. Bioorg. Med. Chem. 16, 6021–6026.
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M., Parker, B.L., 2003. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). J. Invertebr. Pathol. 82, 139–147.
- Marcelino, J., Giordano, R., Gouli, S., Gouli, V., Parker, B.L., Skinner, M., TeBeest, D., Cesnik, R., 2008. *Colletotrichum acutatum* var. *florinae* (teleomorph: *Glomerella acutata* var. *florinae* var. nov.) infection of a scale insect. Mycologia 100, 353–374.
- Naik, S.B., Shashikala, J., Krishnamurthy, Y.L., 2008. Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. Fungal Ecol. 1 (2), 89–93.
- Petrini, O., 1991. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J., Hirano, S.S. (Eds.), Microbial Ecology of Leaves. Springer-Verlag, New York, pp. 179–197.
- Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V., Sakayaroj, J., 2008. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 48, 367–372.
- Rodrigues, K.F., Sieber, T.N., Orünig, C.R., Holdenrieder, O., 2004. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. Mycol. Res. 108, 45–52.
- Rojas, E.L., Herre, E.A., Mejía, L.C., Arnold, A.E., Chaverri, P., Samuels, J.G., 2008. *Endomelanconiopsis*, a new anamorph genus in the *Botryosphaeriaceae*. Mycologia 100, 760–775.
- Romanha, A.J., de Castro, S.L., Soeiro, M.N.C., Lannes-Vieira, J., Ribeiro, I., Talvani, A., Bourdin, B., Blum, B., Olivieri, B., Zani, C., Spadafora, C., Chiari, E., Chatelain, E., Chaves, G., Calzada, J.E., Bustamante, J.M., Freitas-Junior, L.H., Romero, L.L., Bahia, M.T., Lotrowska, M., Soares, M., Andrade, S.G., Armstrong, T., Degraive, W., Andrade, Z., 2010. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 233–238.
- Rosa, L.H., Vieira, M.L.A., Cota, B.B., Johann, S., Alves, T.M.A., Zani, C.L., Rosa, C.A., 2011. Endophytic fungi of tropical forests: a promising source of bioactive prototype molecules for the treatment of neglected diseases. In: Ekinci, D. (Ed.), Drug Development – a Case Study Based Insight into Modern Strategies. Intech, Croatia, pp. 1–18.
- Rosa, L.H., Gonçalves, V.N., Caligiorne, R.B., Alves, T.M.A., Rabello, A., Sales, P.A., Romanha, A.J., Sobral, M.E.G., Rosa, C.A., Zani, C.L., 2010. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. Braz. J. Microbiol. 41, 114–122.
- Rosa, L.H., Vaz, B.M., Caligiorne, R.B., Campolina, S., Rosa, C.A., 2009. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). Polar Biol. 32, 161–167.
- Santiago, I.F., Alves, T.M.A., Rabello, A., Sales Junior, P.A., Romanha, A.J., Zani, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2012. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. Extremophiles 16, 95–103.
- Santos, J.M., Correia, V.G., Phillips, A.J.L., 2010. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction *in vitro* and biological species definition. Fungal Biol. 14, 255–270.

- Schulz, B., Boyle, C., 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109, 661–686.
- Siqueira, V.M., Conti, R., Araújo, J.M., Souza-Motta, C.M., 2011. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* 53, 89–95.
- Soca-chafre, G., Rivera-Orduna, F.N., Hidalgo-Lara, M.E., Hernandez-Rodriguez, C., Marsch, R., Flores-Cotera, L.B., 2011. Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa*. *Fungal Biol.* 111, 143–156.
- Strobel, G., 2002. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.* 5, 535–544.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Van Niekerk, J.M., Groenewald, J.Z., Farr, D.F., Fourie, P.H., Halleen, F., Crous, P.W., 2005. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevine. *Australas. Plant Pathol.* 34, 27–39.
- Van Niekerk, J.M., Groenewald, J.Z., Verkley, G.J.M., Fourie, P.H., Wingfield, M.J., Crous, P.W., 2004. Systematic reappraisal of *Coniella* and *Pilidiella*, with specific reference to species occurring on *Eucalyptus* and *Vitis* in South Africa. *Mycol. Res.* 108, 283–303.
- Vieira, M.L.A., Hughes, A.F.S., Gil, V.B., Vaz, A.B.M., Alves, T.M.A., Zani, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2012. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*). *Can. J. Microbiol.* 58, 1–13.
- Wei, J.G., Xu, T., Guo, L.D., Liu, A.R., Zhang, Y., Pan, X.H., 2007. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of *Podocarpaceae*, *Theaceae* and *Taxaceae* in southern China. *Fungal Divers* 24, 55–74.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D. H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- Yu, B.Z., Zhang, G.H., Du, Z.Z., Zheng, Y.T., Xu, J.C., Luo, X.D., 2008. Phomoeuphorbins A–D, azaphilones from the fungus *Phomopsis euphorbiae*. *Phytochemistry* 69, 2523–2526.

11. Currículo Lattes

Amanda Gomes de Oliveira Carvalho
Curriculum Vitae

Março/2015

Amanda Gomes de Oliveira Carvalho

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Amanda Gomes de Oliveira Carvalho

Nome em citações bibliográficas CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.; OLIVEIRA, AMANDA G.; CARVALHO, AMANDA G. O.

Sexo Feminino

Endereço profissional Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Av. Professor Moraes Rego, s/n
Cidade Universitária - Recife
50670-420, PE - Brasil
Telefone: 81 21012564

URL da home page: www.cpqam.fiocruz.br

Endereço eletrônico

E-mail para contato : amanda@cpqam.fiocruz.br

e-mail alternativo : amanda2307@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2011 - 2015** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento de ferramentas para o uso em diagnóstico diferencial e descoberta de novos antivirais contra flavivírus, Ano de obtenção: 2015
Orientador: Laura Helena Vega Gonzales Gil
Co-orientador: Giovani Rota Bertani
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
Palavras-chave: Quimeras, Febre Amarela, Rocio, São Luis, Ilhéus, Antivirais
Áreas do conhecimento : Virologia Molecular
- 2009 - 2011** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Desenvolvimento de linhagem celular expressando o replicon bicistrônico do vírus da Febre Amarela: tecnologia avançada para triagem de drogas antivirais contra flavivírus, Ano de obtenção: 2011
Orientador: Laura Helena Vega Gonzales Gil
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
Palavras-chave: Febre Amarela, Replicon, Antivirais
Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos, Virologia Molecular
- 2004 - 2008** Graduação em Ciências Biológicas/Bacharelado.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Clonagem e expressão das proteínas PrM/E, NS1 e NS3 do vírus da dengue sorotipo 3
Orientador: Laura Helena Vega Gonzales Gil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Desenvolvimento de Fármacos.
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores d.
Universidade Federal de Pernambuco/ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, UFPE /

CPQAM, Brasil

2009 - 2009	Curso de curta duração em Introdução a Norma NIT-DICLA-035 e seus documentos. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Terapia Gênica. Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Genética Forense. Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Brasil, Ano de obtenção: 2006
2006 - 2006	Curso de curta duração em Imunogenética. Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Brasil, Ano de obtenção: 2006
2005 - 2005	Curso de curta duração em Curso Prático em Cultivo Celular. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Recife, Brasil, Ano de obtenção: 2005
2005 - 2005	Curso de curta duração em Ética Aplicada a Pesquisas Envolv. Seres Humanos. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil, Ano de obtenção: 2005
2005 - 2005	Curso de curta duração em Informação e Sensibilização em Biossegurança. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Recife, Brasil, Ano de obtenção: 2005
2004 - 2004	Extensão universitária em Preparação de Lâminas Histológicas. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil, Ano de obtenção: 2004

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2013 - 2013	Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Professor Convidado, Regime: Parcial Outras informações: Ministrando a aula de Herpesviridae na Disciplina de Virologia Molecular II, para a Pós-Graduação em Genética (PPGG) da UFPE.
2012 - 2012	Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Iniciação à Docência, Regime: Parcial Outras informações: Auxiliando nas aulas de Genética Molecular e Bioinformática da Disciplina Genética Molecular do curso de graduação em Ciências Biológicas/Bacharelado da UFPE. Orientada pelos professores Ederson Akio Kido e Paulo Andrade.
2011 - 2015	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estudante de Doutorado em Genética , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva Outras informações: Desenvolvendo o projeto Construção de vírus quiméricos do vírus da febre amarela 17D expressando proteínas estruturais dos vírus da encefalite São Luís, Ilhéus e Rocio para uso em diagnóstico diferencial sob a orientação da Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil e Coorientação do Dr. Giovani Rota Bertani no Programa de Pós Graduação em genética (PPGG).
2011 - 2011	Vínculo: Professor visitante , Enquadramento funcional: Professor Convidado, Regime: Parcial Outras informações: Aula ministrada sobre a família Papillomaviridae na disciplina Virologia Molecular I para o curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco - PPGG.
2007 - 2008	Vínculo: Assistente de ensino , Enquadramento funcional: Monitor da Disciplina Genética Molecular , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Outras informações:
Auxiliando em aulas de noções gerais de genética molecular e bioinformática.

2. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPQAM

Vínculo institucional

- 2011 - 2015** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estudante de Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Estudante de doutorado em genética na Universidade Federal de Pernambuco, orientada pela Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil no desenvolvimento do projeto Construção de vírus quiméricos do vírus da febre amarela 17D expressando proteínas estruturais dos vírus da encefalite São Luís, Ilhéus e Rocio para uso em diagnóstico diferencial.
- 2011 - 2011** Vínculo: Professor visitante , Enquadramento funcional: Professor Convidado, Regime: Parcial
Outras informações:
Ministrou aula sobre a Família Papillomaviridae na disciplina Virologia Molecular I do curso de Pós-Graduação em saúde pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/PE.
- 2009 - 2011** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estudante de Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Estudante de mestrado em genética e biologia molecular da Universidade Federal de Pernambuco, orientada por Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil no desenvolvimento do projeto Desenvolvimento e Aplicação biotecnológica de replicons repórteres para a triagem de drogas antivirais contra o vírus da febre amarela.
- 2008 - 2009** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Técnico Nível Superior , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Atuando no projeto Construção de clones infecciosos do vírus da Dengue sorotipo 1, 2 e 3 isolados em Recife.Desenvolvendo genotipagem de HLA locus A, B, C e DRDQ de pacientes infectados pelo vírus Hepatite A.
- 2006 - 2008** Vínculo: Bolsista PIBIC FIOCRUZ/CNPq , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Projeto Desenvolvimento da Vacina da Dengue, Subprojeto: Clonagem e Análise da expressão dos clones das Proteínas PrM/E, NS1, NS3 e NS5 do DENV Tipo 3.
- 2005 - 2006** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiária Técnica Separação de Células PBMC , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Diagnóstico Sorológico para o vírus da dengue através de ensaios imunoenzimáticos - ELISA..

Atividades

08/2006 - 08/2008 Outra atividade técnico-científica, CPqAM
*Especificação:
Iniciação Científica bolsista PIBIC/CNPQ*

05/2005 - 07/2006 Estágio, CPqAM
*Estágio:
Estágio em andamento*

Áreas de atuação

1. Virologia Molecular
2. Genética Molecular e de Microorganismos
3. Biologia Molecular
4. Imunologia

Projetos

Projetos de pesquisaProjetos de pesquisa**2007 - 2009** Desenvolvimento de um sistema de genética reversa viral completo para os sorotipos 1, 2 e 3 do vírus da dengue, isolados no Brasil

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (2);

Integrantes: Amanda Gomes de Oliveira Carvalho; Georgia Freitas Guimarães; Ernesto T. A. Marques; Laura Helena Vega Gonzales Gil (Responsável); Jefferson José da Silva Santos; Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva; Sabrina Ribeiro de Almeida

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Razoavelmente , Lê Bem
Espanhol	Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente
Português	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. COSTA, M., VIEIRA, M., ZANI, CARLOS L., ALVES, TÂNIA M. A., JUNIOR, POLICARPO A. S., ROMANHA, ALVARO J., GIL, L. H. V. G., **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, ZILLI, J. E., VITAL, M. J. S., ROSA, CARLOS A., ROSA, LUIZ H.

Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant Carapa guianensis Aublet (Meliaceae). Biochemical Systematics and Ecology. , v.59, p.36 - 44, 2015.

Referências adicionais : Inglês.

2. FURBINO, LAURA E., GODINHO, VALÉRIA M., SANTIAGO, IARA F., PELLIZARI, FRANCIANE M., ALVES, TÂNIA M. A., ZANI, CARLOS L., JUNIOR, POLICARPO A. S., ROMANHA, ALVARO J., **CARVALHO, AMANDA G. O.**, GIL, LAURA H. V. G., ROSA, CARLOS A., MINNIS, ANDREW M., ROSA, LUIZ H.

Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula. Microbial Ecology. , v.67, p.1 - , 2014.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1007/s00248-014-0374-9]

3. MORAIS, ANA TS, TERZIAN, ANA CB, DUARTE, DANILO VB, BRONZONI, ROBERTA VM, MADRID, MARIA CFS, GAVIOLI, ARIELI F, GIL, LAURA HVG, **OLIVEIRA, AMANDA G**, ZANELLI, CLESLEI F, VALENTINI, SANDRO R, RAHAL, PAULA, NOGUEIRA, MAURICIO L

The eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L protein interacts with Flavivirus NS5 and may modulate yellow fever virus replication. Virology Journal. , v.10, p.205 - , 2013.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1186/1743-422x-10-205]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **CARVALHO, AMANDA G. O., BERTANI, G. R., GIL, LAURA H. V. G.**
UTILIZAÇÃO DE GENÉTICA REVERSA PARA O DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA A TRIAGEM DE EXTRATOS NATURAIS COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA FLAVIVÍRUS In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

XX Encontro de Genética do Nordeste., 2014.

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

2. **CARVALHO, AMANDA G. O., BERTANI, G. R., GIL, LAURA H. V. G.**
"UTILIZAÇÃO DE GENÉTICA REVERSA PARA O DESENVOLVIMENTO DE TESTE PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FLAVIVÍRUS In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

XX Encontro de Genética do Nordeste., 2014.

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

3. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.**
Construction of Yellow Fever Virus 17D Chimeric Virus Expressing the Structural Proteins of Brazilian Dengue Virus Serotype 4 In: XXIV Congresso Brasileiro de Virologia, 2013, Porto Seguro.

Virus Reviews and Research. Novo Hamburgo: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2013. v.18. p.33 - 33

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

4. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., KASSAR, T. C., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.**
Screening of 5200 Natural Extracts and Identification of Several Compounds with Antiviral Activity Against Yellow Fever Virus In: XXIV Congresso Brasileiro de Virologia, 2013, Porto Seguro.

Virus Reviews and Research. Novo Hamburgo: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2013. v.18. p.16 - 16

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

5. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.**
CONSTRUCTION OF YELLOW FEVER VIRUS 17D CHIMERIC EXPRESSING THE STRUCTURAL PROTEINS OF SAINT LOUIS ENCEPHALITIS, ILHEUS AND ROCIO VIRUSES FOR USE IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2012, Foz do Iguaçu.

Virus Reviews and Research. Belo Horizonte: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2012. v.17. p.427 - 428

Palavras-chave: Chimerical virus, Encefalite São Luis, Yellow Fever, Rocio, Ilhéus

Áreas do conhecimento : Virologia Molecular, Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

6. **GUIMARAES, G. F., CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., MARQUES, E. T. A., GIL, L. H. V. G.**
Desenvolvimento de plasmídeos vacinais contra os quatro sorotipos da dengue In: VII Reunião Regional da FESBE, 2012, Maceió.

VII Reunião Regional da FESBE., 2012.

Palavras-chave: Dengue, Clonagem, Vacinas

Áreas do conhecimento : Imunologia, Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Financiamento: Federação de Sociedades de Biologia Experimental

7. **SILVA, M. M. C., CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., OLIVEIRA, R. A. S., CALZAVARA-SILVA, C. E.**

STUDY OF TYPE I IFN LEVELS ON SERUM SAMPLES OF PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL FORMS OF DENGUE In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2012, Foz do Iguaçu.

Virus Reviews and Research. Belo Horizonte: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2012. v.17.

Palavras-chave: Dengue, Interferon alfa

Áreas do conhecimento : Imunologia

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

8. **MORAIS, A. T. S., DUARTE, D. V. B., BRONZONI, R. V. B., MADRID, M. C. F. S., GIL, L. H. V. G., CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., ZANELLI, C. F., VALENTINE, S. R., RAHAL, P., NOGUEIRA, M. R.**

The eIF3L Protein Interacts with flavivirus NS5 and Modulates Yellow Fever Virus In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2012, Foz do Iguaçu.

Virus Reviews and Research. Belo Horizonte: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2012. v.17. p.20 - 21

Áreas do conhecimento : Imunologia

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

9. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, SILVA, A. N. M. R., ALMEIDA, S. R., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

TRIAGEM EM LARGA ESCALA DE DROGAS ANTIVIRAIS CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA BASEADA NUM SISTEMA DE LINHAGEM CELULAR EXPRESSANDO UM REPLICON REPÓRTER BICISTRÔNICO In: VII Reunião Regional da FESBE, 2012, Maceió.

VII Reunião Regional da FESBE. , 2012.

Palavras-chave: Antivirais, Febre Amarela, Linhagem Celular

Áreas do conhecimento : Virologia Molecular, Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético

10. GIL, L. H. V. G., **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, ALMEIDA, S. R., SILVA, A. N. M. R., BERTANI, G. R.

Development and Application of a Novel Bicistronic Reporter-Selectable Yellow Fever Virus Replicon for High-Throughput Screening of Viral Inhibitors. In: American Society For Virology, 2011, Minneapolis.

American Society for Virology. , 2011. p.264 - 264

Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

11. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, ALMEIDA, S. R., SILVA, A. N. M. R., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

Development and Validation of High Throughput screening assay for inhibitors of Yellow Fever virus replication In: XXI Encontro Nacional de Virologia, 2010, Gramado.

Virus Reviews & Research. Rio de Janeiro: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2010. v.15. p.67 - 67

Áreas do conhecimento : Virologia Molecular, Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

12. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, ALMEIDA, S. R., SILVA, A. N. M. R., SANTOS, J. J. S., BERTANI, G. R., MARQUES, E. T. A., GIL, L. H. V. G.

DEVELOPMENT OF A CELL LINE BASED ON YELLOW FEVER VIRUS BICISTRONIC REPLICON: ADVANCED TECHNOLOGY FOR ANTIVIRAL SCREENING AGAINST FLAVIVIRUS In: XX NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 2009, BRASÍLIA.

VIRUS REVIEWS AND RESEARCH. RIO DE JANEIRO: JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR VIROLOGY, 2009. v.14. p.255 - 256

Palavras-chave: Yellow Fever, Linhagem Celular, Replicon

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular, Virologia Molecular

Setores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

13. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, MAIA, R. C. C., GIL, L. H. V. G., MARQUES, E. T. A.

Expressão das Proteínas PrM/E, NS1, NS3 e NS5 do Vírus da Dengue Tipo 3 em células eucariotas In: 12ª Jornada de Iniciação Científica do CPqAM, 2008, Recife.

12ª Jornada de Iniciação Científica do CPqAM. Recife: Gráfica A Única, 2008. p.14 - 14

Palavras-chave: Dengue, Expressão, Proteínas

Áreas do conhecimento : Microbiologia, Imunologia, Virologia Molecular

Setores de atividade : Desenvolvimento de Produtos Tecnológicos Voltados Para A Saúde Humana, Produtos e Processos Biotecnológicos Vinculados À Saúde Humana Ou dos Animais

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

14. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, DHALIA, R., GIL, L. H. V. G., MARQUES, E. T. A.

Clonagem das proteínas PrM-E, NS1 e NS3 do vírus da Dengue Tipo 3 In: XV Reunião Anual de Iniciação Científica, 2007, Rio de Janeiro.

XV Reunião Anual de Iniciação Científica / XJornada Científica de Pós-Graduação. , 2007.

Palavras-chave: Dengue, Clonagem, DNA

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular, Genética Molecular e de Microorganismos

Setores de atividade : Produtos e Processos Biotecnológicos Vinculados À Saúde Humana Ou dos Animais

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

15. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, DHALIA, R., GIL, L. H. V. G., MARQUES, E. T. A.

Clonagem das proteínas PrM-E, NS1 e NS3 do vírus da Dengue Tipo 3 In: 11ª Jornada de Iniciação

Científica do CPqAM, 2007, Recife.

11ª Jornada de Iniciação Científica do CPqAM. , 2007.

Palavras-chave: Dengue, Clonagem, DNA

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos,Biologia Molecular

Setores de atividade : Saúde Humana

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

16. CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., SANTOS, J. J. S., VIEIRA, D. B., ANDRADE, R. C. R., GUIMARAES, G. F., MARQUES, E. T. A., GIL, L. H. V. G.

Cloning of Structural and Non-Structural Dengue Virus Type - 3 Genes In: XVIII National Meeting of Virology, 2007, Búzios - RJ.

Virus reviews & Research. Rio de Janeiro: IMPRINTA EXPRESS LTDA, 2007. v.12. p.227 - 227

Palavras-chave: Dengue, Clonagem, DNA

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular,Genética Molecular e de Microorganismos,Imunologia

Setores de atividade : Produtos e Processos Biotecnológicos Vinculados À Saúde Humana Ou dos Animais

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

17. GUIMARAES, G. F., SILVA, A. M., CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., RIBEIRO, M. R. C. G., CORDEIRO, M. T., MARQUES, E. T. A.

Comparação de Técnicas de Purificação de RNA para Diagnóstico Molecular de Dengue In: Encontro de Genética do Nordeste, 2006, Recife.

XVII Encontro de Genética do Nordeste. , 2006. v.1. p.34 - 34

Palavras-chave: Dengue, Extração, PCR

Áreas do conhecimento : Genética Humana e Médica

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

CONSTRUÇÃO DE VÍRUS QUIMÉRICOS DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA 17D EXPRESSANDO PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DOS VÍRUS DA ENCEFALITE SÃO LUÍS, ILHÉUS E ROCIO PARA USO EM DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL In: II Jornada da Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2012, Recife.

II Jornada da Pós-Graduação em Genética da UFPE. , 2012.

Palavras-chave: Quimeras, Febre Amarela, Encefalite São Luís, Ilhéus, Rocio

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos,Virologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Apresentação de trabalho e palestra

1. CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

Construction of Yellow Fever Virus 17D Chimeric Virus Expressing the Structural Proteins of Brazilian Dengue Virus Serotype 4, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Chimerical virus, Yellow Fever, Dengue

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Bahia; Cidade: Porto Seguro; Evento: XXIV Congresso Brasileiro de Virologia; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Virologia

2. CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., KASSAR, T. C., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

Screening of 5200 Natural Extracts and Identification of Several Compounds with Antiviral Activity Against Yellow Fever Virus, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Antivirais, Linhagem Celular, Yellow Fever

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Bahia; Cidade: Porto Seguro; Evento: Congresso Brasileiro de Virologia; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Virologia

3. GUIMARAES, G. F., CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., MARQUES, E. T. A., GIL, L. H. V. G.

Desenvolvimento de plasmídeos vacinais contra os quatro sorotipos da dengue, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Dengue, Clonagem, Proteínas

Áreas do conhecimento : Virologia Molecular,Imunologia,Genética Humana e Médica

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Alagoas; Cidade: Maceió; Evento: VII Reunião Regional da FESBE; Inst.promotora/financiadora: Federação de Sociedades de Biologia Experimental

4. CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

Construção de vírus quiméricos do vírus da febre amarela 17D expressando proteínas estruturais dos vírus da encefalite São Luís, Ilhéus e Rocio para uso em diagnóstico diferencial., 2011.

(Outra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Encefalite São Luis, Febre Amarela, Ilhéus, Rocio

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Cidade Universitária; Cidade: Recife; Evento: I Jornada da Pós-Graduação em Genética UFPE; Inst.promotora/financiadora: Programa de Pós-graduação em Genética da UFPE

5. SILVA, M. M. C., **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

Establishment of an interferon specific reporter cell line to investigate virus-induced interferon signaling in vitro, 2010. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular,Imunologia

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Center of Training and Events of UFRGS-FAURGS; Cidade: Gramado; Evento: XXI Encontro Nacional de Virologia; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Virologia

6. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, SILVA, A. N. M. R., ALMEIDA, S. R., SANTOS, J. J. S., MARQUES, E. T. A., GIL, L. H. V. G.

Construção de Replicon Bicistrônico do vírus da Febre Amarela para o uso em triagem de drogas antivirais, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos,Virologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Pernambuco; Cidade: Recife; Evento: XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

7. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, SILVA, A. N. M. R., ALMEIDA, S. R., SANTOS, J. J. S., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

CONSTRUCTION OF SUBGENOMIC BICISTRONIC REPLICON OF YELLOW FEVER VIRUS, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Yellow Fever, Replicon, Bicistronic

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular,Virologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Ceará; Cidade: Fortaleza; Evento: IX Reunião Regional da SBBq; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

8. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, GIL, L. H. V. G., MAIA, R. C. C., MARQUES, E. T. A.

Expressão das Proteínas PrM/E, NS1, NS3 e NS5 do Vírus da Dengue Tipo 3 em células eucariotas, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Dengue, Expressão, Proteínas

Áreas do conhecimento : Virologia Molecular,Biologia Molecular,Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Manguinhos; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: XVI Reunião Anual de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Fundação Oswaldo Cruz

Demais produções bibliográficas

1. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE REPLICONS REPÓRTERES PARA TRIAGEM DE DROGAS ANTIVIRAIS CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA.. Dissertação de Mestrado. , 2011. (Outra produção bibliográfica)

Palavras-chave: Antivirais, Febre Amarela, Linhagem Celular, Replicon

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos,Biologia Molecular,Virologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Português.

Orientador: Laura Helena Gonzales Gil, PhD.Co-Orientador: Giovani Bertani, PhD.Banca Examinadora: Dr. Rafael Dhalia, Dra. Marli Tenório e Dra. Tereza Magalhães.

2. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, SILVA, A. N. M. R., GIL, L. H. V. G.

Clonagem e Expressão das Proteínas PrM/E, NS1 e NS3 do Vírus da Dengue Sorotipo 3. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação - Monografia. , 2008. (Outra produção bibliográfica)

Palavras-chave: Clonagem, Dengue, Expressão, Proteínas

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos,Biologia Molecular,Virologia Molecular

Setores de atividade : Produtos e Processos Biotecnológicos Vinculados À Saúde Humana Ou dos Animais

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Orientadora:Dra. Laura Helena Vega Gonzales GilCo-orientadora: Andréa Nazaré Rangel Monteiro da Silva, MSc.Banca Examinadora: Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia; Sabrina Ribeiro de Almeida, MSc.

Educação e Popularização de C&T

Artigos completos publicados em periódicos

1. COSTA, M., VIEIRA, M., ZANI, CARLOS L., ALVES, TÂNIA M. A., JUNIOR, POLICARPO A. S., ROMANHA, ALVARO J., GIL, L. H. V. G., **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, ZILLI, J. E., VITAL,

M. J. S., ROSA, CARLOS A., ROSA, LUIZ H.

Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology.* , v.59, p.36 - 44, 2015.

Referências adicionais : Inglês.

2. FURBINO, LAURA E., GODINHO, VALÉRIA M., SANTIAGO, IARA F., PELLIZARI, FRANCIANE M., ALVES, TÂNIA M. A., ZANI, CARLOS L., JUNIOR, POLICARPO A. S., ROMANHA, ALVARO J., **CARVALHO, AMANDA G. O.**, GIL, LAURA H. V. G., ROSA, CARLOS A., MINNIS, ANDREW M., ROSA, LUIZ H.

Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecology.* , v.67, p.1 - , 2014.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1007/s00248-014-0374-9]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **CARVALHO, AMANDA G. O.**, BERTANI, G. R., GIL, LAURA H. V. G.

UTILIZAÇÃO DE GENÉTICA REVERSA PARA O DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA A TRIAGEM DE EXTRATOS NATURAIS COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS CONTRA FLAVIVÍRUS In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

XX Encontro de Genética do Nordeste. , 2014.

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

2. **CARVALHO, AMANDA G. O.**, BERTANI, G. R., GIL, LAURA H. V. G.

“UTILIZAÇÃO DE GENÉTICA REVERSA PARA O DESENVOLVIMENTO DE TESTE PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE FLAVIVÍRUS In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

XX Encontro de Genética do Nordeste. , 2014.

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

3. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

Construction of Yellow Fever Virus 17D Chimeric Virus Expressing the Structural Proteins of Brazilian Dengue Virus Serotype 4 In: XXIV Congresso Brasileiro de Virologia, 2013, Porto Seguro.

Virus Reviews and Research. Novo Hamburgo: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2013. v.18. p.33 - 33

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

4. **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, KASSAR, T. C., BERTANI, G. R., GIL, L. H. V. G.

Screening of 5200 Natural Extracts and Identification of Several Compounds with Antiviral Activity Against Yellow Fever Virus In: XXIV Congresso Brasileiro de Virologia, 2013, Porto Seguro.

Virus Reviews and Research. Novo Hamburgo: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2013. v.18. p.16 - 16

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

5. MORAIS, A. T. S., DUARTE, D. V. B., BRONZONI, R. V. B., MADRID, M. C. F. S., GIL, L. H. V. G., **CARVALHO, A. G. O. ou OLIVEIRA, A. G.**, ZANELLI, C. F., VALENTINE, S. R., RAHAL, P., NOGUEIRA, M. R.

The eIF3L Protein Interacts with flavivirus NS5 and Modulates Yellow Fever Virus In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2012, Foz do Iguaçu.

Virus Reviews and Research. Belo Horizonte: Journal of the Brazilian Society for Virology, 2012. v.17. p.20 - 21

Áreas do conhecimento : Imunologia

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

Participação em eventos, congressos, exposições, feiras e olimpíadas

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIV Congresso Brasileiro de Virologia**, 2013. (Congresso) Construction of Yellow Fever Virus 17D Chimeric Virus Expressing the Structural Proteins of Brazilian Dengue Virus Serotype 4.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIV Congresso Brasileiro de Virologia**, 2013. (Congresso)
Screening of 5200 Natural Extracts and Identification of Several Compounds with Antiviral Activity Against Yellow Fever Virus.

3. **II Jornada da Pós-Graduação em Genética da UFPE**, 2012. (Outra)
CONSTRUÇÃO DE VÍRUS QUIMÉRICOS DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA 17D EXPRESSANDO PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DOS VÍRUS DA ENCEFALITE SÃO LUÍS, ILHÉUS E ROCIO PARA USO EM DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIII Congresso Brasileiro de Virologia**, 2012. (Congresso)
CONSTRUCTION OF YELLOW FEVER VIRUS 17D CHIMERIC EXPRESSING THE STRUCTURAL PROTEINS OF SAINT LOUIS ENCEPHALITIS, ILHEUS AND ROCIO VIRUSES FOR USE IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIII Congresso Brasileiro de Virologia**, 2012. (Congresso)
STUDY OF TYPE I IFN LEVELS ON SERUM SAMPLES OF PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL FORMS OF DENGUE.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIV Congresso Brasileiro de Virologia**, 2013. (Congresso)
Construction of Yellow Fever Virus 17D Chimeric Virus Expressing the Structural Proteins of Brazilian Dengue Virus Serotype 4.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIV Congresso Brasileiro de Virologia**, 2013. (Congresso)
Screening of 5200 Natural Extracts and Identification of Several Compounds with Antiviral Activity Against Yellow Fever Virus.

3. **II Jornada da Pós-Graduação em Genética da UFPE**, 2012. (Outra)
CONSTRUÇÃO DE VÍRUS QUIMÉRICOS DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA 17D EXPRESSANDO PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DOS VÍRUS DA ENCEFALITE SÃO LUÍS, ILHÉUS E ROCIO PARA USO EM DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIII Congresso Brasileiro de Virologia**, 2012. (Congresso)
CONSTRUCTION OF YELLOW FEVER VIRUS 17D CHIMERIC EXPRESSING THE STRUCTURAL PROTEINS OF SAINT LOUIS ENCEPHALITIS, ILHEUS AND ROCIO VIRUSES FOR USE IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Reunião Regional da FESBE**, 2012. (Congresso)
Desenvolvimento de plasmídeos vacinais contra os quatro sorotipos da dengue.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIII Congresso Brasileiro de Virologia**, 2012. (Congresso)
STUDY OF TYPE I IFN LEVELS ON SERUM SAMPLES OF PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL FORMS OF DENGUE.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Reunião Regional da FESBE**, 2012. (Congresso)
TRIAGEM EM LARGA ESCALA DE DROGAS ANTIVIRAIS CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA BASEADA NUM SISTEMA DE LINHAGEM CELULAR EXPRESSANDO UM REPLICON REPÓRTER BICISTRÔNICO.

8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Jornada da Pós-Graduação em Genética UFPE**, 2011. (Encontro)
Construção de vírus quiméricos do vírus da febre amarela 17D expressando proteínas estruturais dos vírus

da encefalite São Luís, Ilhéus e Rocio para uso em diagnóstico diferencial..

9. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXI Encontro Nacional de Virologia**, 2010. (Encontro)
Development and Validation of High Throughput screening assay for inhibitors of Yellow Fever virus replication.

10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXI Encontro Nacional de Virologia**, 2010. (Encontro)
Establishment of an interferon specific reporter cell line to investigate virus-induced interferon signaling in vitro.

11. **ENTOMOL 4 - IV Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais**, 2010. (Congresso)

12. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP**, 2009. (Congresso)
Construção de Replicon Bicistônico do vírus da Febre Amarela para o uso em triagem de drogas antivirais.

13. Conferencista no(a) **Clonagem: Tecnologia a serviço da saúde**, 2009. (Oficina)
I Fórum de Biotecnologia.

14. Avaliador no(a) **XVII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco**, 2009. (Congresso)
XVII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco.

15. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **IX Reunião Regional da SBBq**, 2008. (Congresso)
CONSTRUCTION OF SUBGENOMIC BICISTRONIC REPLICON OF YELLOW FEVER VIRUS.

16. Apresentação Oral no(a) **12ª Jornada de Iniciação Científica do CPqAM**, 2008. (Seminário)
Expressão das Proteínas PrM/E, NS1, NS3 e NS5 do Vírus da Dengue Tipo 3 em células eucariotas.

17. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XV Reunião Anual de Iniciação Científica**, 2007. (Encontro)
Clonagem das proteínas PrM-E, NS1 e NS3 do vírus da Dengue Tipo 3.

18. Apresentação Oral no(a) **11ª Jornada de Iniciação Científica do CPqAM**, 2007. (Seminário)
Clonagem das proteínas PrM-E, NS1 e NS3 do vírus da Dengue Tipo 3.

19. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XVIII National Meeting of Virology**, 2007. (Encontro)
CLONING OF STRUCTURAL AND NON-STRUCTURAL DENGUE VIRUS TYPE-3 GENES.

20. **II Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2007. (Congresso)

21. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Encontro de Genética do Nordeste**, 2006. (Encontro)
Encontro de Genética do Nordeste.

Áreas do conhecimento : Genética, Imunologia, Bioquímica
Setores de atividade : Neurociências, Saúde Humana

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	3
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	18
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	6
Apresentações de trabalhos (Outra).....	2
Demais produções bibliográficas.....	2

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	11
Participações em eventos (seminário).....	2
Participações em eventos (oficina).....	1
Participações em eventos (encontro).....	6
Participações em eventos (outra).....	1

Outras informações relevantes**1 Domínio de Técnicas:**

- Cultivo celular: Cultivo de células provenientes de diferentes organismos, construção de linhagens celulares expressando replicons de Febre Amarela, transfecção de células por eletroporação e lipossomos.
 - Virologia: Cultivo e titulação de vírus, construção de replicons de flavivírus
 - Biologia Molecular: Clonagem e expressão de genes virais, extração de DNA plasmidial em pequena, média e larga escala, purificação, sequenciamento, clonagem por recombinação homóloga em leveduras, transcrição in vitro, PCR e Western Blot.
- Diagnóstico: ELISA IgM para Dengue, HLA do locus A, B, C e DRDQ para Dengue, Febre Amarela e Hepatite A e separação de células PBMC .