



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA NA AMAZÔNIA

CRISLAINE SEABRA LEAL

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO DE
ARBOVÍRUS EMERGENTES NA AMAZÔNIA**

BELÉM-PA

2023

CRISLAINE SEABRA LEAL

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO DE
ARBOVÍRUS EMERGENTES NA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia da Universidade do Estado do Pará/Instituto Evandro Chagas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária na Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Marques de Carvalho.

BELÉM-PA

2023

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UEPA / SIBIUEPA**

Leal, Crislaine Seabra.

Caracterização físico-química das proteínas de fusão de arbovírus emergentes na Amazônia / Crislaine Seabra Leal. – Belém-Pa: UEPA; IEC, 2023.

48f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Marques de Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária na Amazônia)– Programa de Pós-graduação Mestrado em Biologia Parasitária na Amazônia. Universidade do Estado do Pará, 2023.

1. Arbovírus. 2. Biologia Computacional. 3. Doenças Transmissíveis Emergentes. 4. Físico-Química. 5. Proteínas Virais de Fusão. I. Carvalho, Carlos Alberto Marques de, orient. II. Instituto Evandro Chagas. III. Universidade do Estado do Pará. IV. Título.

CDD 22. ed. 614.575

CRISLAINE SEABRA LEAL

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO DE
ARBOVÍRUS EMERGENTES NA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia da Universidade do Estado do Pará/Instituto Evandro Chagas como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária na Amazônia.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Alberto Marques de Carvalho
Universidade do Estado do Pará, CCBS-UEPA

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz (UEPA/IEC) – Membro Titular

Prof. Dr. James Lima Ferreira (IEC) – Membro Titular

Profa. Dra. Maria Helena Cruz Rodrigues (UNIFAMAZ) – Membro Titular

Prof. Jorge Rodrigues de Souza (UEPA/IEC) – Membro Suplente

BELÉM-PA

2023

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 ASPECTOS ESTRUTURAIS E CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS VIRAIS	9
1.1.1 <i>Vírus Mayaro</i>	9
1.1.2 <i>Vírus da Encefalite de Saint Louis</i>	11
1.1.3 <i>Vírus Oropouche</i>	12
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	14
1.2.1 <i>Vírus Mayaro</i>	14
1.2.2 <i>Vírus da Encefalite de Saint Louis</i>	15
1.2.3 <i>Vírus Oropouche</i>	16
1.3 TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO	16
1.3.1 <i>Vírus Mayaro</i>	16
1.3.2 <i>Vírus da Encefalite de Saint Louis</i>	17
1.3.3 <i>Vírus Oropouche</i>	18
1.4 SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO.....	20
1.4.1 <i>Vírus Mayaro</i>	20
1.4.2 <i>Vírus da Encefalite de Saint Louis</i>	21
1.4.3 <i>Vírus Oropouche</i>	21
1.5 PROTEÍNAS DE FUSÃO VIRAIS.....	22
1.5.1 <i>Classes I, II e III</i>	22
1.5.2 <i>Proteína E1 de Alfavírus</i>	24
1.5.3 <i>Proteína E de Flavivírus</i>	25
1.5.4 <i>Proteína Gc de Ortobuniavírus</i>	25
1.6 BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL.....	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 METODOLOGIA	29
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	29
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	29
3.3 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS	29
3.4 DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES RESIDUAIS	29
3.5 PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS.....	29
3.6 IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS	30
3.7 ANÁLISE DE ANTIGENICIDADE POR HIDROFILICIDADE, ACESSIBILIDADE E	
FLEXIBILIDADE.....	30
4 RESULTADOS	31
4.1 PROPRIEDADES RESIDUAIS DAS PROTEÍNAS VIRAIS DE FUSÃO.....	31
4.2 ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS PREDITAS NAS PROTEÍNAS VIRAIS DE FUSÃO	32
4.3 POTENCIAL DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DAS PROTEÍNAS VIRAIS DE	
FUSÃO ³⁴	
4.4 PROPENSÃO ANTIGÊNICA DAS PROTEÍNAS VIRAIS DE FUSÃO	35
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES.....	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

RESUMO

Os vírus Mayaro (*Mayaro virus* – MAYV), da encefalite de Saint Louis (*Saint Louis encephalitis virus* – SLEV) e Oropouche (*Oropouche virus* – OROV) constituem membros negligenciados das três principais famílias de arbovírus de relevância médica e circulam na região amazônica como agentes etiológicos de surtos de enfermidades febris em seres humanos. Na qualidade de vírus envelopados, MAYV, SLEV e OROV dependem amplamente de suas proteínas de fusão de classe II (E1, E e Gc, respectivamente) para a entrada na célula hospedeira, mas muitos aspectos da biologia estrutural dessas proteínas permanecem ainda obscuros. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo caracterizar físico-quimicamente *in silico* as proteínas de fusão do MAYV, SLEV e OROV. As sequências aminoácídicas completas das proteínas E1 do MAYV, E do SLEV e Gc do OROV derivadas por tradução conceitual de regiões codificantes anotadas no genoma da sequência de referência dos respectivos vírus foram obtidas do banco de dados NCBI Protein em formato FASTA e submetidas às plataformas digitais PEPSTATS, PREDATOR, PROSCAN e PCPROF para determinação das propriedades residuais, predição de estruturas secundárias, identificação do potencial de modificações pós-traducionais e reconhecimento das propensões antigênicas, respectivamente. Quanto às propriedades residuais, as proteínas E1 do MAYV e E do SLEV apresentaram predominância do perfil apolar (56% e 55% dos aminoácidos, respectivamente), ao passo que a proteína Gc do OROV apresentou predominância do perfil polar (52% dos aminoácidos). Com relação às estruturas secundárias preditas, as proteínas E1 do MAYV e E do SLEV mostraram menos alfa-hélices (16,51% e 15,17%, respectivamente) do que folhas-beta (21,79% e 25,15%, respectivamente), enquanto o contrário foi observado na proteína Gc do OROV (20,39% de alfa-hélices e 12,14% de folhas-beta). No que diz respeito às modificações pós-traducionais, as proteínas E1 do MAYV, E do SLEV e Gc do OROV apresentaram maior potencial relativo para fosforilação por proteína-quinase C, N-miristoilação e fosforilação por caseína-quinase 2, respectivamente. Por fim, a convolução de pontuações de hidrofobicidade, acessibilidade e flexibilidade (HAF) resultou em maiores propensões antigênicas na metade N-terminal do que na metade C-terminal dessas três proteínas. Como conclusão, as proteínas E1 do MAYV e E do SLEV compartilham mais características físico-químicas entre si do que com a proteína Gc do OROV, embora todas elas sejam agrupadas sob a mesma classe de proteínas virais de fusão.

Palavras-chave: Arbovírus; Biologia Computacional; Doenças Transmissíveis Emergentes; Físico-Química; Proteínas Virais de Fusão.

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV), Saint Louis encephalitis virus (SLEV), and Oropouche virus (OROV) viruses are neglected members of the three main families of arboviruses with medical relevance and circulate in the Amazon region as etiological agents of outbreaks of febrile illnesses in humans. As enveloped viruses, MAYV, SLEV, and OROV largely depend on their class II fusion proteins (E1, E, and Gc, respectively) for entry into the host cell, but many aspects of the structural biology of such proteins remain unclear. In this sense, the present study aimed at physicochemically characterizing *in silico* the fusion proteins of MAYV, SLEV, and OROV. The complete amino acid sequences of MAYV E1, SLEV E, and OROV Gc proteins derived by conceptual translation from annotated coding regions in the reference sequence genome of the respective viruses were obtained from the NCBI Protein database in FASTA format and submitted to the PEPSTATS, PREDATOR, PROSCAN, and PCPROF web servers for determination of residual properties, prediction of secondary structures, identification of potential post-translational modifications, and recognition of antigenic propensities, respectively. As for the residual properties, MAYV E1 and SLEV E proteins showed a predominance of the non-polar profile (56% and 55% of the residues, respectively), whereas OROV Gc protein showed a predominance of the polar profile (52% of the residues). Regarding predicted secondary structures, MAYV E1 and SLEV E proteins showed less alpha-helices (16.51% and 15.17%, respectively) than beta-sheets (21.79% and 25.15%, respectively), while the opposite was observed in OROV Gc protein (20.39% alpha-helices and 12.14% beta-sheets). About post-translational modifications, MAYV E1, SLEV E, and OROV Gc proteins showed greater relative potential for protein kinase C phosphorylation, N-myristoylation, and casein kinase II phosphorylation, respectively. Finally, the convolution of hydrophilicity, accessibility, and flexibility (HAF) scores resulted in greater antigenic propensities in the N-terminus half than in the C-terminus half of these three proteins. As conclusion, MAYV E1 and SLEV E proteins share more physicochemical characteristics with each other than with the OROV Gc protein, although they are all grouped under the same class of viral fusion proteins.

Keywords: Arbovirus; Computational Biology; Emerging Communicable Diseases; Physicochemistry; Viral Fusion Proteins.

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus constituem um grupo diversificado de famílias virais que incluem patógenos emergentes e reemergentes, transmitidos de hospedeiros infectados para suscetíveis durante a alimentação sanguínea através de uma variedade de vetores artrópodes, principalmente, mosquitos hematófagos (Hilgenfeld & Vasudevan, 2018; Queiroz *et al.*, 2020). Sua transmissão ocorre através da picada de culicídeos, especialmente aqueles dos gêneros *Culex* e *Aedes*, que representam os principais vetores de arbovírus de importância médica, embora vários arbovírus possam ser transmitidos por outros artrópodes, como flebotomíneos e carrapatos (Fontaine *et al.*, 2018; Viglietta *et al.*, 2021).

Das espécies conhecidas, centenas são responsáveis por causar doenças zoonóticas, mantidas em ciclo de transmissão entre vetores e reservatórios vertebrados (Lopes *et al.*, 2014). Entre os arbovírus causadores de doença em humanos, aqueles pertencentes às famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Peribunyaviridae* respondem pelas maiores taxas de infecções e representam, atualmente, um grande problema de saúde pública mundial, principalmente em regiões tropicais, onde altas temperaturas e umidade favorecem a proliferação de mosquitos e, portanto, a transmissão desses vírus (Fontaine *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019).

As manifestações clínicas da infecção por arbovírus em humanos podem variar desde uma doença febril com erupções cutâneas ou artralgia até síndromes neurológicas, articulares e hemorrágicas (Alva-Urcia *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2019; Mutricy *et al.*, 2022). Geralmente, a doença febril acompanha sintomas como prostração, cefaleia, dor retroorbital e mialgia. A síndrome neurológica pode se manifestar como mielite, meningite e/ou encefalite, com mudanças de comportamento, paralisia, convulsões e problemas de coordenação, enquanto a síndrome hemorrágica é evidenciada por hemorragia, petéquias e choque combinado com plaquetopenia (Lopes *et al.*, 2014; Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Koeltz *et al.*, 2018).

Em consideração a diversos fatores virais/vetoriais e hospedeiros, as doenças transmitidas por vetores respondem por, aproximadamente, 17% da carga estimada de doenças infecciosas e, juntas, acarretam em mais de 700.000 mortes por ano mundialmente (Agboli *et al.*, 2022). Girard e colaboradores (2020) concluíram que, à medida que essas tendências continuam, as doenças arbovirais epidêmicas ameaçarão cada vez mais a segurança política e econômica global, podendo ocasionar uma

emergência de saúde pública mundial.

De acordo com Gubler (2013), as arboviroses têm se tornado importantes ameaças em regiões tropicais urbanas devido às rápidas mudanças climáticas, desmatamentos, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas, precariedade das condições sanitárias e falta de controle efetivo de vetores e prevenção de doenças infecciosas. O Brasil é constituído por uma grande extensão terrestre com vastas florestas na região amazônica, além de áreas florestais em porções das regiões Sudeste e Sul (IBGE, 2020). Apresenta também uma ampla região de pântano (pantanal), savana (cerrado) e seca (caatinga) no interior de diferentes estados com clima predominantemente tropical, sendo um local propício para a existência de vetores e, portanto, para a ocorrência de arboviroses (Lopes *et al.*, 2014).

Na região Norte do Brasil, a Amazônia engloba uma biodiversidade natural abundante, onde centenas de espécies de arbovírus já foram catalogadas, sobretudo nos estados do Pará e Amazonas (Rosa, 2016; Mourão *et al.*, 2015). Patógenos como o vírus Mayaro (MAYV), da família *Togaviridae*, e o vírus Oropouche (OROV), da família *Peribunyaviridae*, têm sido frequentemente identificados nessas regiões em pacientes com quadros febris inespecíficos ou com lesão neurológica (Saatkamp *et al.*, 2020; Chiang *et al.*, 2021). Da mesma forma, o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), da família *Flaviviridae*, tem sido detectado em diferentes estados brasileiros, sugerindo possível emergência (Moraes *et al.*, 2021).

Apesar de, normalmente, exibir alta especificidade hospedeira para sua manutenção enzoótica, esse grupo de vírus de RNA não dispõe de mecanismos para correção de erros de replicação introduzidos pela RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp), e exibem frequência de erro de aproximadamente 10^{-4} por nucleotídeo copiado (Coffey *et al.*, 2013). Essa alta frequência e capacidade mutacional, juntamente à variabilidade populacional e rápida replicação, caracterizam-nos como vírus de elevada plasticidade genética, o que lhes permite adaptação relativamente fácil a novos vetores e hospedeiros (Parameswaran *et al.*, 2012).

Favorecendo a investigação desses processos, a bioinformática estrutural é um campo interdisciplinar que compreende vários recursos e ferramentas que combinam biologia molecular, química e informática para o estudo de estruturas biomacromoleculares, especialmente proteínas (Paiva *et al.*, 2022). Por sua vez, as proteínas são macromoléculas formadas pela união de vários aminoácidos que podem assumir diferentes formas e tamanhos, desempenhando um papel fundamental na

estrutura, função e regulação de tecidos e órgãos (Sahoo & Chowdary, 2019).

As proteínas de fusão, por sua vez, estão presentes no envelope viral e atuam de modo a unir esta bicamada lipídica a uma membrana da célula hospedeira (Sahoo & Chowdary, 2019). Em sua maioria, as proteínas de fusão virais são induzidas a sofrer alterações conformacionais desencadeadas por mecanismos específicos, como ligação a receptores celulares e/ou alteração de pH. As mudanças conformacionais resultam na exposição de peptídeos de fusão hidrofóbicos ou alças de fusão que interagem com as membranas-alvo, causando desestabilização e mistura de lipídeos (Podbilewicz, 2014). Estas proteínas são agrupadas em três classes (I, II e III) com base em suas principais características estruturais (Tsurudome, 2005).

Dado que MAYV, SLEV e OROV constituem membros emergentes negligenciados das três principais famílias de arbovírus de relevância médica e circulam na região amazônica, podendo vir a causar surtos de doenças em seres humanos, essa pesquisa se propôs a investigar aspectos relevantes da estrutura das proteínas de fusão desses arbovírus a fim de revelar pontos críticos envolvidos na interação vírus-célula e fornecer pistas ao desenvolvimento racional de estratégias antivirais.

1.1 ASPECTOS ESTRUTURAIS E CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS VIRAIS

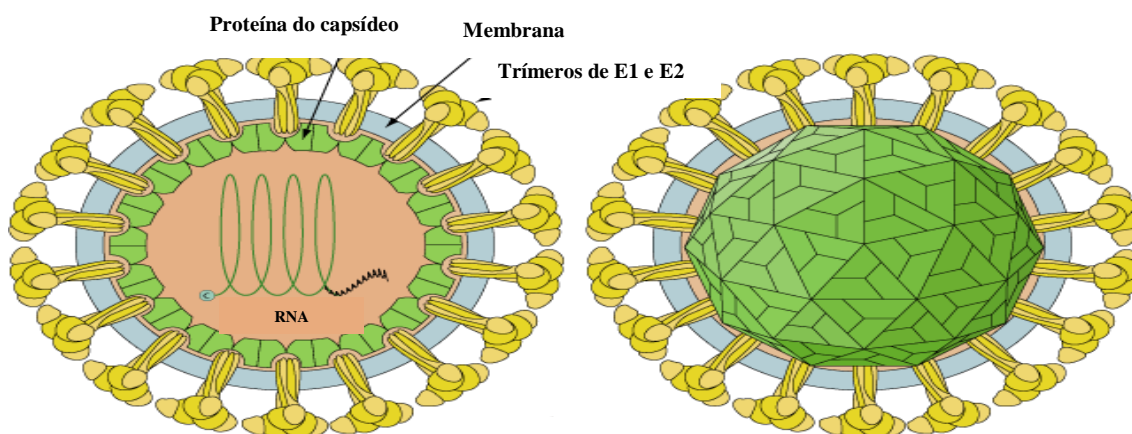
1.1.1 Vírus Mayaro

Sua sequência nucleotídica completa foi determinada em 2005 (Lavergne *et al.*, 2006) e, desde então, faz parte do Complexo da Floresta de Semliki devido à sua composição antigênica ser filogeneticamente similar à de outros sete alfavírus, como os vírus Bebaru, Chikungunya, Getah, Floresta de Semliki, Rio Ross, O'nyong-nyong e Una, que induzem uma doença clínica semelhante em pacientes infectados (Anderson *et al.*, 1975; Diagne *et al.*, 2020).

O MAYV se apresenta como um vírus envelopado de partícula icosaédrica medindo, aproximadamente, 70 nm de diâmetro, com um genoma que consiste em RNA de fita simples linear de polaridade positiva, que varia de 9,7 a 11,8 kb (Brown *et al.*, 2018). O nucleocapsídeo da partícula mede em torno de 40 nm e consiste em 240 cópias da proteína C dispostas em uma simetria T4 ao redor do RNA genômico, sendo coberto por uma bicamada lipídica (envelope) contendo trímeros de heterodímeros das duas glicoproteínas codificadas por estes vírus, E1 e E2, que, juntas, formam uma rede

de superfície icosaédrica regular (King *et al.*, 2012), como observado na Figura 1.

Figura 1: Representação esquemática da partícula de um alfavírus.

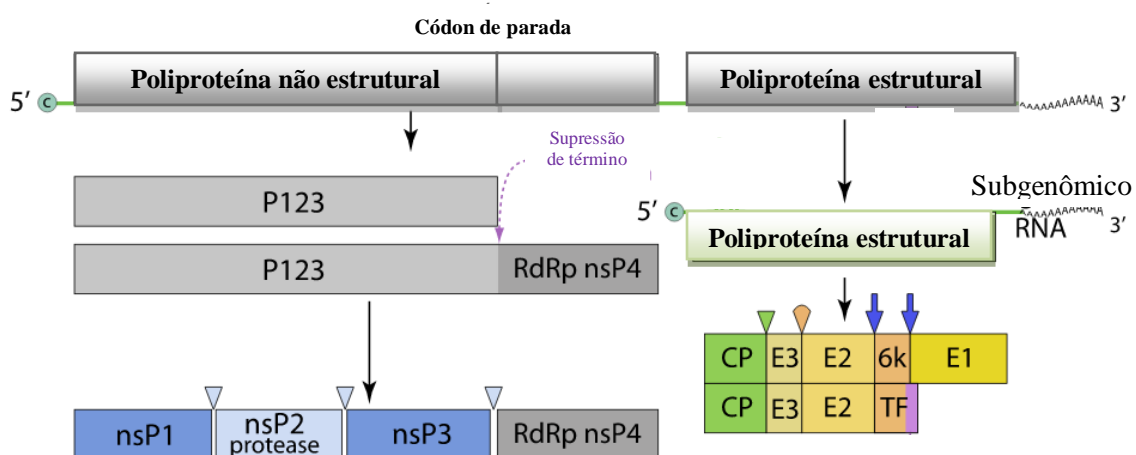


Legenda: Representação da partícula infecciosa dos alfavírus, composta pela proteína do capsídeo (C), trímeros das proteínas E1 e E2 e RNA genômico.

Fonte: Adaptado de: <https://viralzone.expasy.org/>.

O genoma de RNA contém dois quadros de leitura aberta (ORFs): o terço 5' do genoma codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), enquanto o terço 3' codifica cinco proteínas estruturais, que consistem na proteína do capsídeo (C), duas glicoproteínas do envelope (E1 e E2) e dois pequenos peptídeos (E3 e 6K) (Figura 2) (Nasar *et al.*, 2012; King *et al.*, 2012).

Figura 2: Representação esquemática da poliproteína genômica de um alfavírus.



Legenda: Genoma monopartido, linear, que consiste em RNA de fita simples (+) de 11-12 kb, capeado e poliadenilado.

Fonte: Adaptado de: <https://viralzone.expasy.org/>.

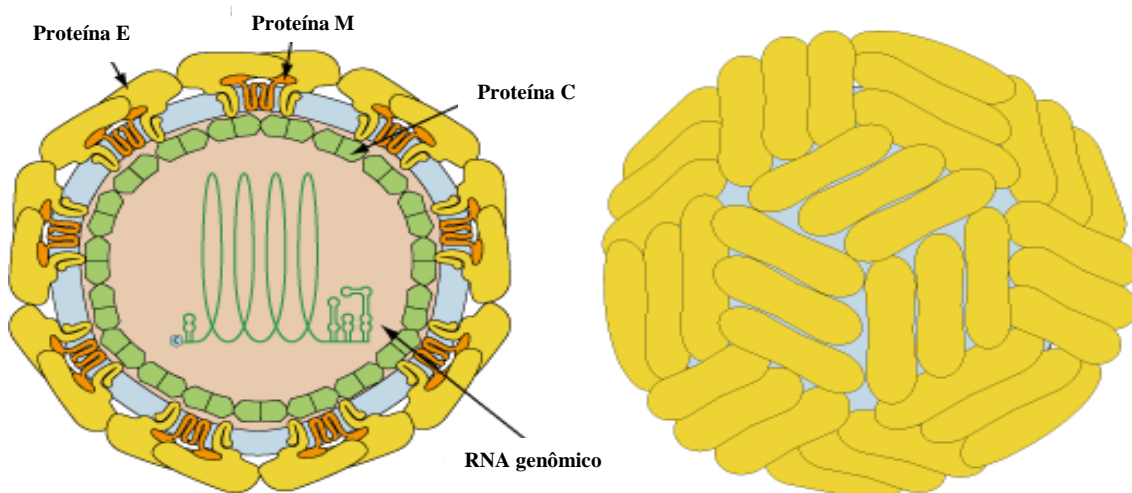
Análises filogenéticas indicam a existência de três genótipos principais:

disseminado (D), limitado (L) e novo (N) (Auguste *et al.*, 2010). O genótipo D contém cepas identificadas em vários países das Américas, como Trinidad e Tobago, Guiana Francesa, Peru, Venezuela e Bolívia, enquanto o filogrupa L foi encontrado apenas em alguns países, como Brasil e Haiti (Lednicky *et al.*, 2016). O filogrupa N contém apenas uma sequência conhecida, isolada no Peru em 2010 (Auguste *et al.*, 2015).

1.1.2 Vírus da Encefalite de Saint Louis

O vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, que se apresenta como um vírus de simetria icosaédrica, envelopado, com 50 nm de diâmetro e um genoma linear formado por RNA de fita simples de senso positivo com cerca de 10,2 kb, conforme mostra a Figura 3 (Zhang *et al.*, 2003).

Figura 3: Representação esquemática da partícula de um flavivírus.

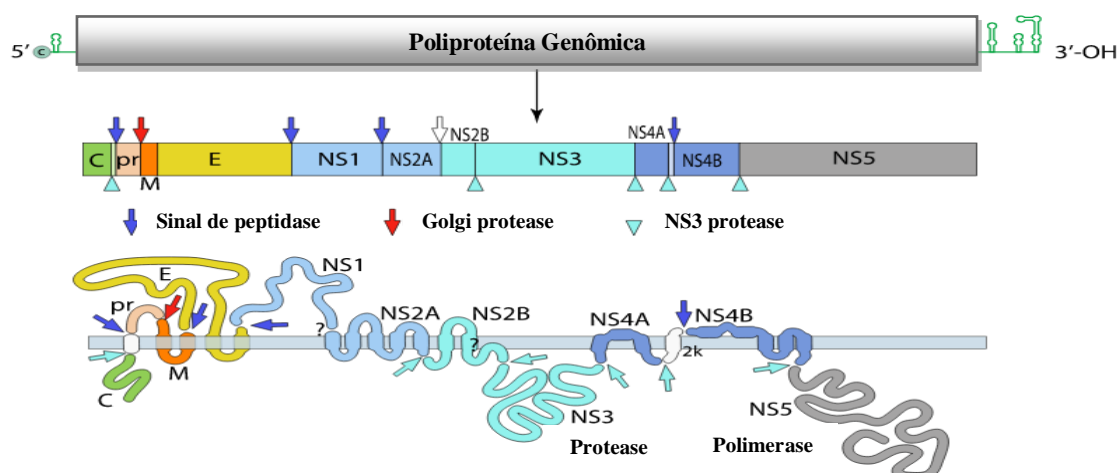


Legenda: Representação da partícula infecciosa dos flavivírus, composta pela proteína do capsídeo (C), membrana (M), proteína E e RNA genômico.

Fonte: Adaptado de: <https://viralzone.expasy.org/>.

Seu genoma contém um único e longo ORF que é traduzido em uma poliproteína. Após sucessivas sinalizações, a poliproteína é induzida a sofrer translocação através da membrana do retículo endoplasmático para ser, subsequentemente, clivada por proteases (Zhang *et al.*, 2003). Após clivagem, a poliproteína dá origem a três proteínas estruturais (C, E e prM) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 4) (Swetnam *et al.*, 2020).

Figura 4: Representação esquemática da poliproteína genômica de um flavivírus.



Legenda: Genoma monopartido, linear, que consiste em RNA de fita simples (+) de 10-11 kb.

Fonte: Adaptado de: <https://viralzone.expasy.org/>.

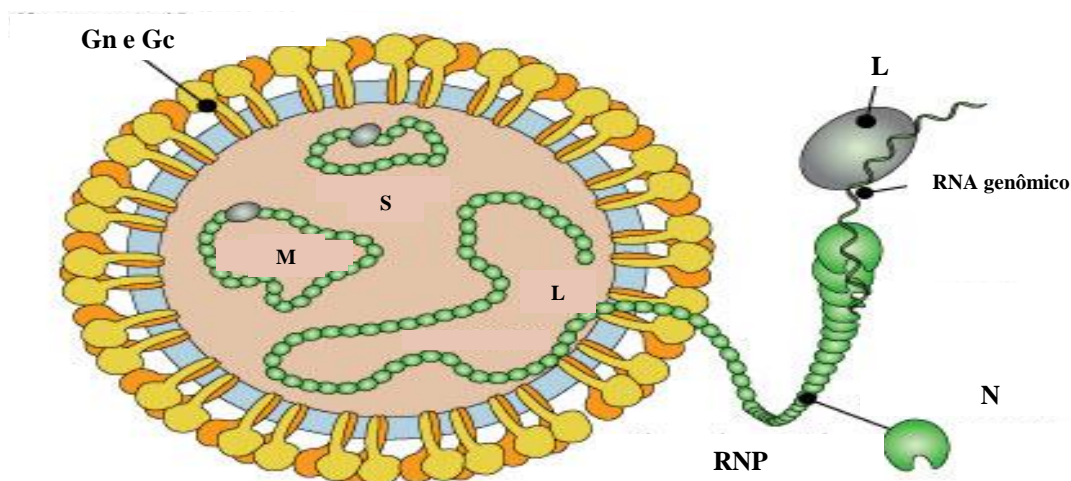
Análises filogenéticas baseadas em sequências completas do gene E agrupam cepas do SLEV em 8 genótipos virais (I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII) (Rodrigues *et al.*, 2010). Os genótipos I e II são prevalentes nos Estados Unidos e o genótipo V é amplamente distribuído na América do Sul. Os demais genótipos têm distribuição limitada, onde o genótipo III está supostamente confinado no sul da América do Sul, o IV está limitado à Colômbia e Panamá, o VI está no Panamá, o VII está na Argentina e o VIII foi detectado apenas na região amazônica do Brasil (Diaz *et al.*, 2018).

1.1.3 Vírus Oropouche

O vírus Oropouche (OROV) é um arbovírus do gênero *Orthobunyavirus* da família *Peribunyaviridae*, pertencente ao sorogrupo Simbu, caracterizado por sua alta diversidade genética. Este sorogrupo consiste em 25 espécies virais classificadas em sete complexos e dois subclados filogenéticos, denominados subclado A, composto pelos vírus Manzanilla e Oropouche, e subclado B, que inclui os vírus Simbu, Akabane, Sathuperi, Shamonda e Shuni (Rosa *et al.*, 2017).

O OROV se apresenta como um vírus envelopado de partícula aproximadamente esférica medindo de 80 a 120 nm de diâmetro, com um genoma linear segmentado que consiste em três fragmentos de RNA de fita simples de sentido negativo denominados pequeno (S), médio (M) e grande (L), que, juntos, medem aproximadamente 12,4 kb, envoltos por um capsídeo de simetria helicoidal (Elliott, 2014). Sua estrutura esquemática é ilustrada na Figura 5.

Figura 5: Representação esquemática da partícula de um ortobuniavírus.

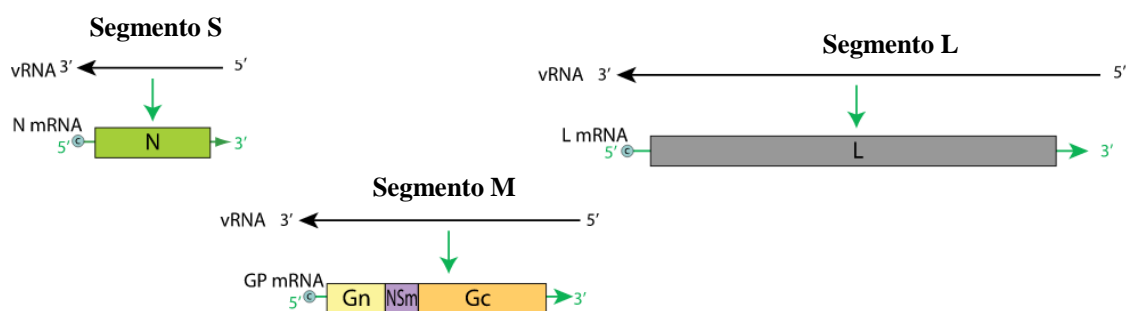


Legenda: Representação da partícula infecciosa dos ortobuniavírus, composta por ribonucleocapsídeo (RNP), nucleoproteína (N), enzima polimerase (L), duas glicoproteínas de superfície (Gn e Gc) e genoma composto por três segmentos – grande (L), médio (M) e pequeno (S) – de RNA.

Fonte: Adaptado de: <https://viralzone.expasy.org/>

O segmento S codifica uma proteína nucleocapsídica estrutural (N) e uma proteína não estrutural (NSs) a partir de dois ORFs sobrepostos. O segmento M contém um único ORF que codifica uma grande poliproteína que é clivada após ou durante a tradução, produzindo três proteínas virais, sendo duas glicoproteínas estruturais de superfície viral (Gn e Gc) e uma proteína não estrutural denominada NSm. O segmento L, por sua vez, contém um ORF que codifica a proteína L, uma RdRp que se encontra associada aos três segmentos de RNA viral (Figura 6) (Sakkas *et al.*, 2018).

Figura 6: Representação esquemática da poliproteína genômica de um ortobuniavírus.



Legenda: Genoma linear de RNA de fita simples (-) segmentado. O segmento L é de cerca de 6,9 kb, o segmento M de 4,5 kb e o segmento S de 1 kb.

Fonte: Adaptado de: <https://viralzone.expasy.org/>.

Análises filogenéticas realizadas em cepas de OROV indicam a existência de três

genótipos virais (I, II e III), identificados no Peru, Trinidad, Panamá e Brasil (Saeed *et al.*, 2000). Na sequência, um quarto genótipo (IV) foi relatado no Brasil (Vasconcelos *et al.*, 2011). O genótipo I é considerado o mais difundido no Brasil e inclui cepas isoladas nos estados do Acre, Amazonas, Maranhão, Pará e Tocantins e em Trinidad e Tobago (Nunes *et al.*, 2005; Terzian *et al.*, 2009); o genótipo II inclui cepas isoladas nos estados brasileiros do Amapá, Pará e Rondônia, assim como no Peru; o genótipo III inclui cepas isoladas no Acre, Minas, Gerais e Rondônia, no Brasil, além de cepas do Panamá; e o genótipo IV inclui cepas isoladas no estado brasileiro do Amazonas (Vasconcelos *et al.*, 2011). De acordo com a investigação realizada por Vasconcelos *et al.* (2011), o genótipo I inclui três subgenótipos (Ia, Ib e Ic), o genótipo II outros três (IIa, IIb e IIc) e o genótipo III inclui dois (IIIa e IIIb).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

1.2.1 Vírus Mayaro

O MAYV foi isolado pela primeira vez em Trinidad e Tobago a partir do sangue de cinco humanos sintomáticos infectados entre agosto e setembro de 1954 (Anderson *et al.*, 1975). No entanto, um estudo retrospectivo evidenciou a presença do MAYV em amostras coletadas durante as construções de canais no Panamá e na Colômbia, que ocorreram entre 1904 e 1914 (Srihongse *et al.*, 1973). Dagne *et al.* (2020) sugerem que a subnotificação de casos não se deve apenas à sintomatologia semelhante à de outros arbovírus, como os vírus Dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV), mas, também, à ocorrência de casos assintomáticos não diagnosticados.

Segundo um estudo acerca da distribuição do MAYV, o país com o maior número de casos de infecção pelo vírus registrado nas Américas é o Brasil, onde é considerado endêmico nas regiões Norte e Centro-Oeste (Esposito *et al.*, 2017). De um total de 495 casos da investigação, 199 deles foram identificados no estado de Goiás e 194 ocorreram no estado do Pará, com os demais casos identificados nos estados do Acre, Amazonas, Mato Grosso e São Paulo (Ganjian *et al.*, 2020). Essa estatística pode ser explicada pelo fato de o Brasil ser um país detentor de amplas florestas tropicais, que proporcionam condições ideais para o surgimento e a manutenção de arbovírus (Coffey *et al.*, 2013).

O primeiro surto de febre de Mayaro no Brasil ocorreu em 1957, próximo ao Rio Guamá, no Estado do Pará, atingindo cerca de 100 indivíduos. Os levantamentos

sorológicos realizados mostraram soroprevalência do MAYV de 2-40,9% (Causey *et al.*, 1957). No entanto, grande parte do conhecimento acerca de dados clínicos e epidemiológicos sobre a febre de Mayaro foi construído somente em 1978, durante um surto ocorrido no município de Belterra, também no Estado do Pará, quando 55 pacientes apresentaram exantema febril agudo e foram confirmados como portadores da doença (Pinheiro *et al.*, 1981).

Vários casos de infecções por MAYV autóctones ou importados também foram relatados em outros países das Américas e Europa. Na Venezuela, os primeiros casos humanos foram descritos em 2000, no estado de Miranda, onde quatro membros adultos da mesma família apresentaram testes sorológicos com altos títulos específicos de anticorpos IgM e IgG para MAYV (Torres *et al.*, 2004). No período de maio de 2000 a dezembro de 2007, o MAYV foi detectado em áreas rurais da Bolívia e Peru (Forshey *et al.*, 2010) e, em 2015, foi isolado de um menino de 8 anos com doença febril aguda em uma área semirural do Haiti (Lednicky *et al.*, 2016).

1.2.2 Vírus da Encefalite de Saint Louis

O SLEV está amplamente disperso por todo o Novo Mundo. Entretanto, a infecção clínica tem se tornado mais frequente nos EUA, onde o vírus foi originalmente relatado, bem como nas Américas do Norte, do Sul e Central (Swetnam *et al.*, 2020). Nos Estados Unidos, surtos focais esporádicos têm sido relatados desde que o SLEV foi detectado pela primeira vez, em 1933, durante um surto de encefalite humana em Saint Louis (Webster, 1933). A atividade endêmica na ausência de surtos também foi relatada nos estados estadunidenses da Flórida, Califórnia e Texas, além da Argentina (Swetnam *et al.*, 2020; Batallan *et al.*, 2021).

No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez na década de 1970, no estado do Pará, região Norte do Brasil (Pinheiro *et al.*, 1981). A prevalência do SLEV na população brasileira ainda permanece obscura em virtude da semelhança antigênica entre o SLEV e outros membros do gênero *Flavivirus*, que compromete os estudos epidemiológicos devido a reações cruzadas. Os poucos relatos disponíveis na literatura científica demonstram que a soroprevalência de SLEV varia de 3-43% na população brasileira, com predominância de 5% nas regiões Norte e Sudeste do país (Heinen *et al.*, 2015).

1.2.3 Vírus Oropouche

Os casos de febre causada pelo OROV foram relatados em diferentes locais em uma grande área geográfica, incluindo as Américas do Sul e Central. Após sua primeira descrição em Trinidad e Tobago, seu ressurgimento foi responsável por causar dezenas de epidemias no Brasil, Peru e Panamá (Sakkas *et al.*, 2018). O primeiro surto no Panamá foi registrado em 1989, na região Oeste da Cidade do Panamá, capital do país. No Peru, a febre de Oropouche foi documentada em 1992, quando o vírus causou um surto na cidade de Iquitos (Chavez *et al.*, 1992; Watts *et al.*, 1997).

No Brasil, desde seu primeiro relato em 1955, o OROV causou diversas epidemias supostamente restritas à região Norte, sobretudo no estado do Pará, onde atingiu diferentes municípios de distintas mesorregiões além da região metropolitana de Belém (Belém e Ananindeua), como Norte (Benfica, Caraparu, Castanhal e Santa Isabel), Nordeste (Abaetetuba, Augusto Corrêa, Baião, Bragança, Capanema, Curuçá, Tomé-Açu, Vigia e Viséu), Sudeste (Itupiranga), Baixo Amazonas (Belterra, Mojuí dos Campos e Santarém) e Ilha do Marajó (Porto de Moz) (Rosa *et al.*, 2017).

De 1980 a 2005, apenas casos esporádicos ou surtos autolimitados foram relatados na Amazônia brasileira, principalmente em pequenas aldeias, indicando uma potencial circulação silenciosa do vírus (Vasconcelos *et al.*, 2009). A fauna e a flora excepcionalmente diversificadas que cobrem grande parte do território brasileiro, particularmente na região amazônica, oferecem ótimas condições para a manutenção do OROV (Coffey *et al.*, 2013).

1.3 TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO

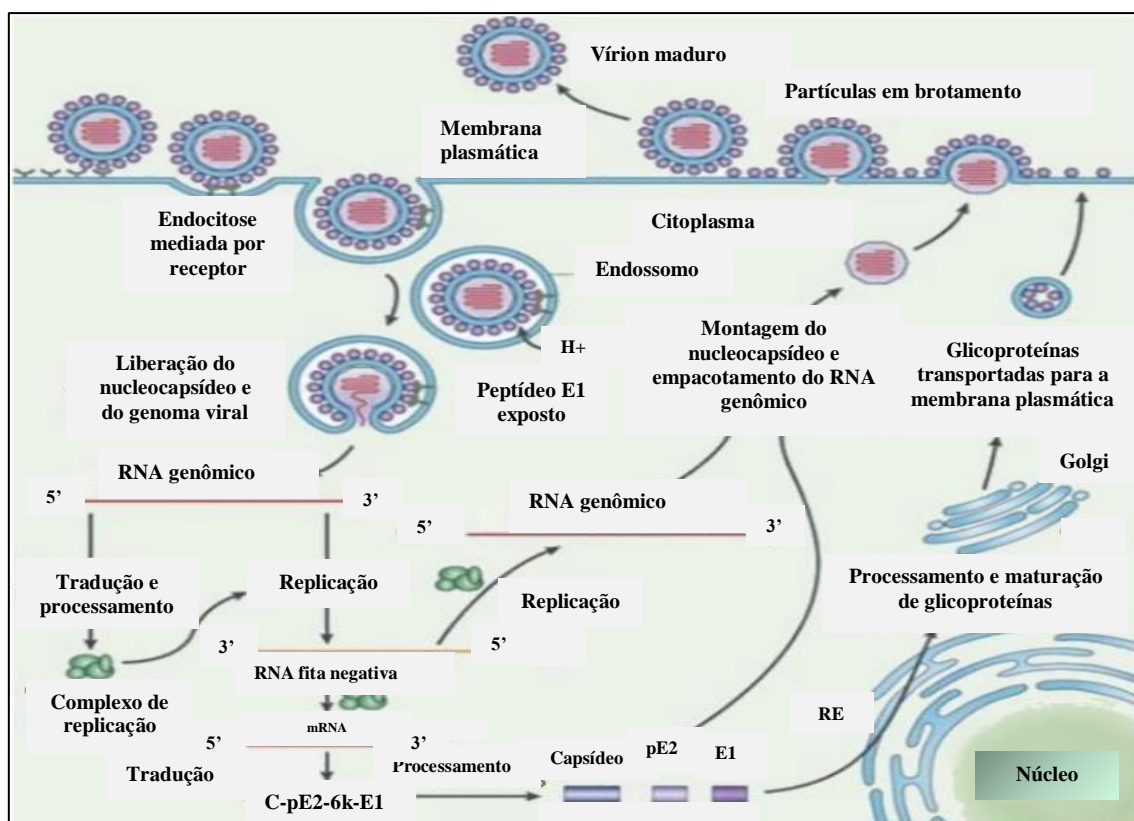
1.3.1 Vírus Mayaro

A transmissão do MAYV ocorre através da picada de mosquitos infectados do gênero *Haemagogus*, principalmente *Haemagogus janthinomys* (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018), embora já tenha sido isolado de outros gêneros de mosquitos, incluindo *Culex*, *Mansonia*, *Aedes*, *Psorophora* e *Sabethes* (Groot *et al.*, 1961).

Seu ciclo replicativo se inicia com a ligação do vírus à membrana plasmática das células-alvo por meio de receptores específicos, como o MXRA8, que promove a endocitose do vírus. Uma vez no citoplasma, o pH do endossomo diminui e promove a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando o RNA genômico, que é traduzido, inicialmente, em proteínas não estruturais e, posteriormente, em proteínas

estruturais. Estas últimas são, então, utilizadas para formar novos nucleocapsídeos e espículas do envelope viral, que, após combinados, resultam na geração de novas partículas virais que serão liberadas para o meio extracelular (Figura 7) (Diagne *et al.*, 2020).

Figura 7: Esquema do ciclo replicativo do MAYV.



Legenda: Representação esquemática do ciclo replicativo do MAYV. O ciclo tem início com a ligação do vírus à membrana plasmática da célula-alvo por meio de receptores específicos que promovem a endocitose viral, formando um compartimento endossomal. Uma vez no citoplasma, o pH do endossoma diminui, promovendo a liberação do RNA genômico que é traduzido em proteínas estruturais e não estruturais para formar novas espículas e nucleocapsídeos. Após combinados, estes resultam na formação de novas partículas virais que, por fim, serão liberadas para o meio extracelular.

Fonte: Adaptado de Diagne *et al.* (2020).

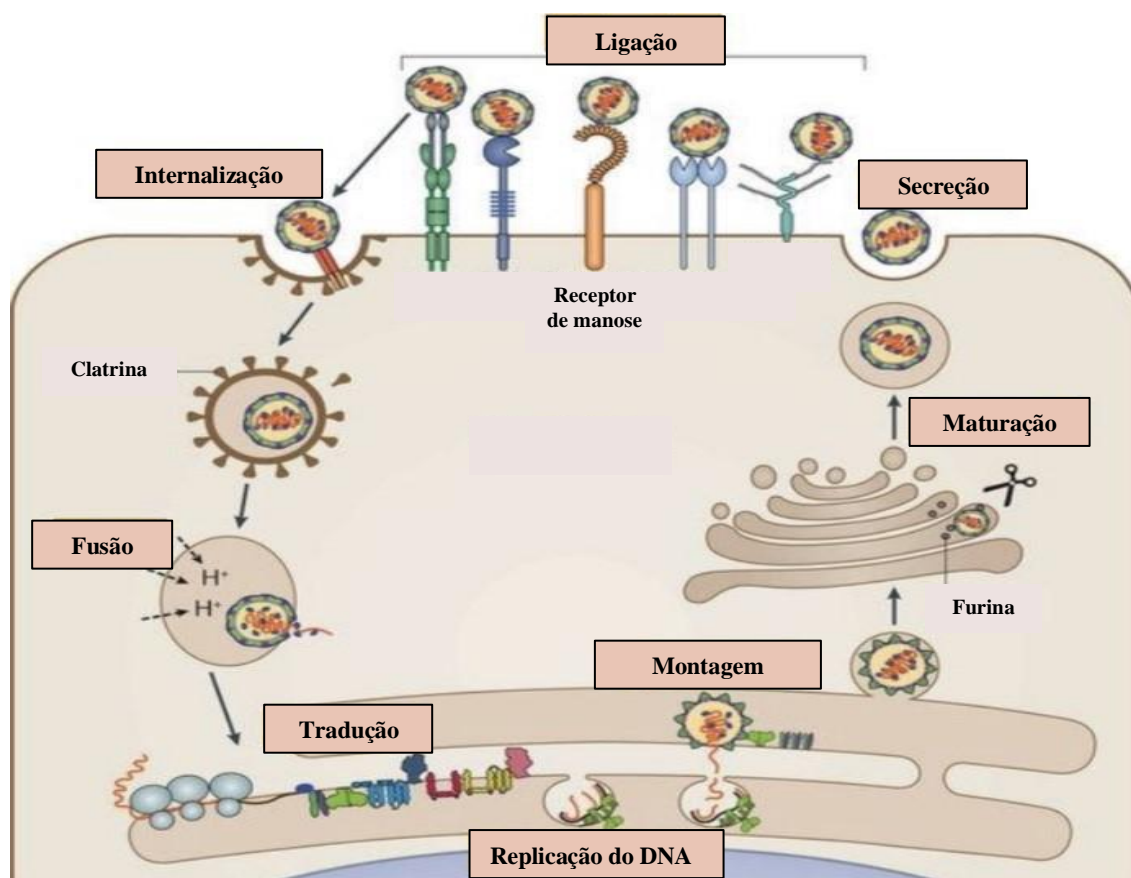
1.3.2 Vírus da Encefalite de Saint Louis

O SLEV é mantido em um ciclo enzoótico envolvendo mosquitos e aves. Sua transmissão ocorre através da picada de inúmeras espécies de mosquitos infectados do gênero *Culex*, incluindo *Cx. tarsalis*, *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* (Swetmam *et al.*, 2020).

Seu ciclo biológico se inicia com a ligação da proteína E do envelope viral aos receptores na célula hospedeira, incluindo a proteína de ligação à laminina (LBP) ou integrina $\alpha V\beta 3$, que medeiam a internalização viral por endocitose. Após fusão do envelope do vírus com a membrana endossomal, o genoma de RNA é liberado no

citoplasma e traduzido em uma poliproteína que dá origem a todas as proteínas estruturais e não estruturais. A replicação do genoma ocorre na superfície do retículo endoplasmático, onde o dsRNA é sintetizado a partir do RNA genômico e transcrito em mRNAs virais. Após sua montagem, o vírion brota no retículo endoplasmático e é transportado para o aparelho de Golgi, de onde é posteriormente liberado ao meio extracelular por exocitose (Figura 8) (Zhang *et al.*, 2003).

Figura 8: Esquema do ciclo replicativo do SLEV.



Legenda: Representação esquemática do ciclo replicativo do SLEV. O ciclo inicia com a ligação da proteína E do envelope viral a receptores da célula hospedeira, que medeia a internalização do vírus por endocitose. Após fusão, o genoma de RNA é liberado no citoplasma e traduzido em proteínas estruturais e não estruturais. A replicação do genoma ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE), onde o vírion brota e é transportado para o aparelho de Golgi para ser, posteriormente, liberado por exocitose.

Fonte: Adaptado de Neufeldt *et al.* (2018).

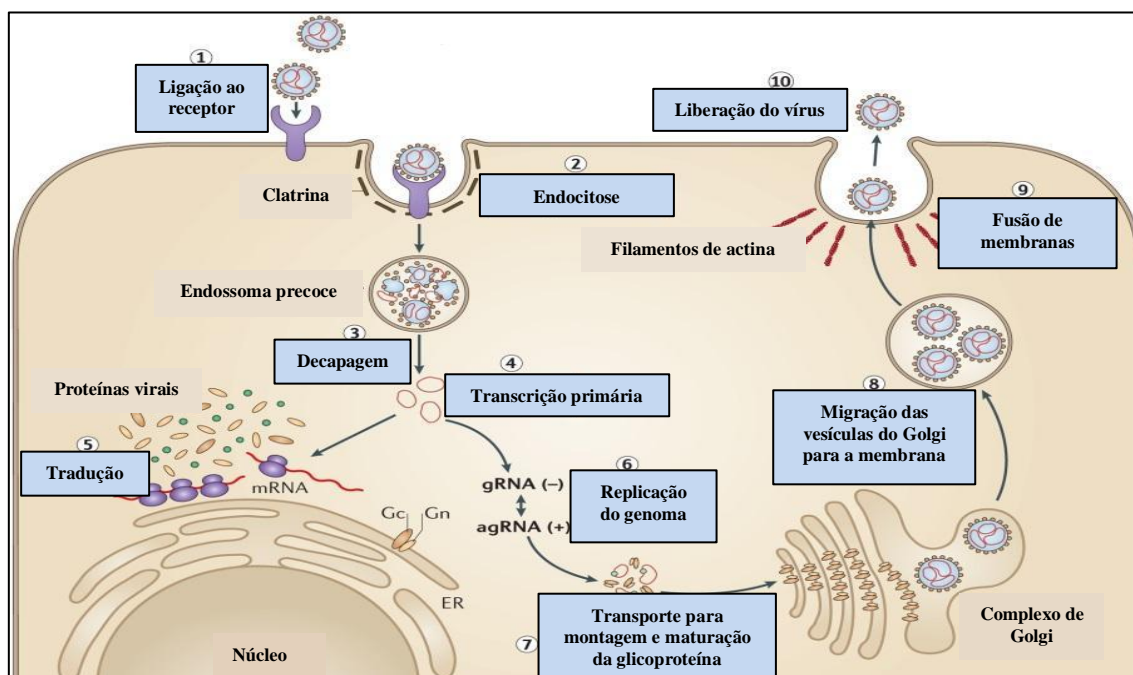
1.3.3 Vírus Oropouche

A transmissão do OROV ocorre através da picada de mosquitos infectados do gênero *Culicoides*, principalmente *Culicoides paraensis* (Sakkas *et al.*, 2018), embora estudos experimentais relatem que determinadas espécies da família *Culicidae*, como *Cx. quinquefasciatus*, podem estar também envolvidas na transmissão do vírus (Pinheiro

et al., 1982).

A replicação do OROV começa com a ligação viral aos receptores da célula hospedeira, mediada por uma ou ambas as glicoproteínas virais (Gn e Gc), seguida pela internalização do vírus por endocitose via clatrina e rotas independentes de dinamina. A alteração de pH das vesículas endocíticas leva ao desnudamento do vírion e à fusão do envelope viral com a membrana endossomal. A RdRp catalisa a transcrição primária de mRNAs virais, que são iniciados por *primers* derivados da célula hospedeira. Após a tradução dos mRNAs virais, as glicoproteínas Gn e Gc dimerizam e ficam no complexo de Golgi. As ribonucleoproteínas (RNPs) são transportadas para as membranas do complexo de Golgi, modificadas pela inserção de Gn e Gc, e as partículas virais brotam nas vesículas derivadas da membrana de Golgi. As vesículas de Golgi contendo partículas virais são transportadas para a superfície da célula, onde a fusão das membranas vesiculares com a membrana plasmática leva, então, à liberação dos vírions (Figura 9) (Elliott, 2014).

Figura 9: Esquema do ciclo replicativo do OROV.



Legenda: Representação esquemática do ciclo replicativo do OROV. O ciclo inicia com a ligação viral aos receptores da célula hospedeira mediada pelas glicoproteínas Gn e Gc, seguida de internalização por endocitose. Após tradução dos mRNAs virais, as glicoproteínas dimerizam e ficam no complexo de Golgi. Neste local, ocorre o brotamento do nucleocapsídeo, que é posteriormente transportado através de vesículas para a superfície da célula, onde a fusão das membranas vesiculares com a membrana plasmática leva à liberação de novos vírions.

Fonte: Adaptado de Elliott, 2014.

1.4 SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO

1.4.1 Vírus Mayaro

A sintomatologia da infecção por MAYV perpassa entre sintomas inespecíficos, leves e autolimitados, sendo que seu curso clínico é usualmente descrito em duas fases: aguda e subaguda (Pinheiro *et al.*, 1981). O curso da fase aguda é caracterizado por uma viremia transitória curta, que dura de 3 a 4 dias, seguida por um período de incubação de 7 a 12 dias, onde os sintomas sistêmicos se tornam evidentes. Entre os sintomas descritos na literatura, estão a tríade de febre abrupta, artralgia/artrite e exantema maculopapular, que pode vir associado a sangramentos (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018). As manifestações hemorrágicas são raras, mas foram descritas por Mourão *et al.* (2012).

Nos primeiros dias da doença, também é possível observar sintomas como febre, cefaleia, mialgia, erupção cutânea, vômitos e diarreia, além de dor especialmente nas grandes articulações e, menos frequentemente, artrite (Lopes *et al.*, 2014). O MAYV também pode causar uma doença aguda incapacitante, e mais de 50% dos casos podem ser seguidos por artralgia de longo prazo. Quando comparado à febre causada pelo CHIKV, a dor articular pode persistir por meses. Além disso, assim como outras infecções por alfavírus, o MAYV pode produzir complicações graves, como febre intermitente, miocardite e complicações neurológicas (Santiago *et al.*, 2015; Acosta-Ampudia *et al.*, 2018).

As técnicas sorológicas empregadas no diagnóstico da febre de Mayaro utilizam células infectadas, antígenos recombinantes de proteínas estruturais ou não estruturais e, até mesmo, o vírus inteiro para detectar e diferenciar os anticorpos IgM e IgG produzidos como resposta à infecção por MAYV. Entre os cinco testes sorológicos mais utilizados para a detecção do vírus, estão inibição da hemaglutinação (HI), fixação do complemento (CF), teste de neutralização (NT), ensaio imunoenzimático de captura de IgM (MAC-ELISA) e imunoensaio enzimático usando células infectadas como antígenos (EIA-ICC) (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018).

As metodologias moleculares também se tornaram valiosas ferramentas para a detecção de alfavírus devido à alta sensibilidade e especificidade no estágio virêmico inicial da doença, uma vez que os ácidos nucleicos virais geralmente permanecem no sangue por apenas 2 a 6 dias após a infecção. Em sua maior parte, são métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos, como o RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), o *nested* PCR para confirmação adicional da infecção e o RT-qPCR *multiplex*

para detecção simultânea de diferentes espécies de arbovírus (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018).

1.4.2 Vírus da Encefalite de Saint Louis

As infecções humanas causadas por SLEV são, em sua maioria, casos assintomáticos. As manifestações clínicas que podem surgir ao longo da infecção vão de sintomas leves, como mal-estar ou prostração, até casos graves, caracterizados clinicamente por cefaleia, febre alta, disfunção neurológica e alteração do nível de consciência, que podem vir acompanhadas de encefalite ou meningoencefalite (Rosa *et al.*, 2013). As taxas de letalidade em casos graves podem chegar a 30% e estão associadas a danos diretos ao SNC, principalmente em pacientes com idade igual ou superior a 70 anos (Clark *et al.*, 2012; Curren *et al.*, 2018).

A encefalite de Saint Louis pode ser diagnosticada através de isolamento viral, detecção de antígenos, caracterização de sequências moleculares e ensaios sorológicos. Da ampla gama de testes diagnósticos disponíveis, os ensaios sorológicos, como teste de neutralização por redução de placa (PRNT), *western blotting*, IF e ELISA para captura de anticorpos IgM e IgG, são os métodos de rotina mais aplicados em laboratórios e hospitais (Guzman & Kouri, 2004).

Para o isolamento viral, as amostras devem ser obtidas o mais rápido possível a fim de garantir a viabilidade do teste, uma vez que a carga e o período virêmicos são geralmente curtos. Os métodos moleculares, como RT-PCR e hibridização de ácido nucleico, são empregados no diagnóstico diferencial de infecções por flavivírus (Chong *et al.*, 2019).

1.4.3 Vírus Oropouche

A infecção por OROV em humanos é caracterizada por uma doença febril aguda que dura de 2 a 7 dias, geralmente acompanhada de cefaleia, mialgia, artralgia, anorexia, tontura, calafrios e fotofobia (Rosa *et al.*, 2017). Adicionalmente, a infecção pode vir acompanhada de sintomas como náuseas, vômitos, diarreia, congestão conjuntival, dor epigástrica e dor retroorbital (Sakkas *et al.*, 2018). Poucos dias após o episódio febril inicial, pode haver a recorrência das manifestações clínicas, geralmente com menor intensidade, visto que a viremia diminui significativamente a partir do 3º dia pós-início dos sintomas (Cardoso *et al.*, 2015).

Até o momento, não há indícios de fatalidade comprovadamente relacionada à febre de Oropouche (Rosa *et al.*, 2017). No entanto, análises de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes hospitalizados positivos para OROV no estado do Amazonas sugerem a possibilidade de ocorrência da doença em estágio grave, com comprometimento do sistema nervoso central (SNC) (Bastos *et al.*, 2012).

O diagnóstico da infecção por OROV é comumente realizado por meio de técnicas sorológicas e moleculares. Os procedimentos sorológicos utilizam diferentes antígenos para a detecção de anticorpos IgG e IgM específicos, que envolvem HI, CF e MAC-ELISA (Sakkas *et al.*, 2018). Adicionalmente, um teste de imunofluorescência indireta (IF) em leucócitos periféricos foi desenvolvido como uma ferramenta para detecção de antígenos do OROV (De Souza *et al.*, 2017). Em nível molecular, as técnicas baseadas em ácidos nucleicos, como *nested* RT-PCR e RT-qPCR *multiplex*, tornaram-se importantes ferramentas para um diagnóstico rápido e específico da infecção por OROV (Bastos *et al.*, 2012).

1.5 PROTEÍNAS DE FUSÃO VIRAIS

1.5.1 Classes I, II e III

As reações de fusão de membranas são mediadas por proteínas presentes no envelope viral, que atuam de modo a unir esta bicamada lipídica a uma membrana da célula hospedeira (Sahoo & Chowdary, 2019). Em sua maioria, as proteínas de fusão virais são induzidas a sofrer alterações conformacionais desencadeadas por mecanismos específicos, como ligação a receptores celulares e/ou alteração de pH. As mudanças conformacionais resultam na exposição de peptídeos de fusão hidrofóbicos ou alças de fusão que interagem com as membranas-alvo, causando desestabilização e mistura de lipídeos (Podbilewicz, 2014). Estas proteínas são agrupadas em três classes (I, II e III) com base em suas principais características estruturais (Figura 10) (Tsurudome, 2005).

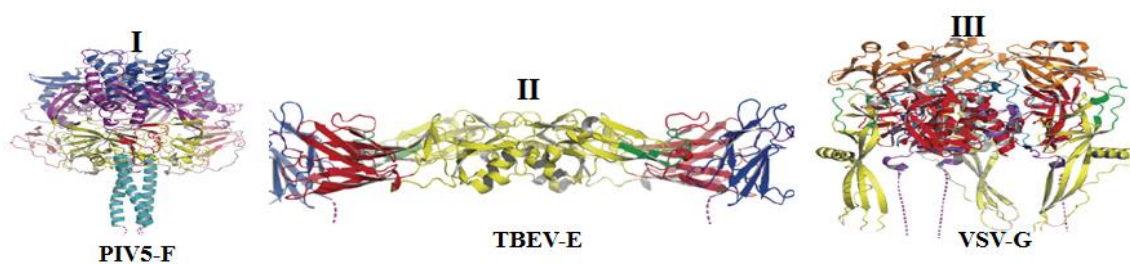
As proteínas de fusão virais de classe I se apresentam como homotrímeros transmembranares constituídos por uma estrutura secundária predominantemente em alfa-hélice. Na estrutura metaestável, seu peptídeo de fusão se encontra na porção N-terminal da interface do trímero, onde sofre maturação para o estado pré-fusão através de processamento proteolítico. Após mudança conformacional para a estrutura estável, seu estado pós-fusão resulta em trímeros de grampos com α -hélices centrais (Kielian & Rey, 2006).

A cadeia polipeptídica das proteínas de fusão virais de classe II é constituída essencialmente por folhas-beta, organizadas de modo que seu peptídeo de fusão seja encontrado na extremidade de uma alça interna. O procedimento de maturação para o estado de pré-fusão ocorre através de processamento proteolítico, que promove uma mudança conformacional de dímeros metaestáveis para trímeros estáveis. A estrutura pós-fusão resulta em trímeros de grampos compostos por folhas-beta (Kielian & Rey, 2006).

As proteínas de fusão virais de classe I englobam os retrovírus, filovírus, coronavírus, ortomixovírus e paramixovírus, enquanto as de classe II são encontradas em alfavírus (proteína E1), flavivírus (proteína E), ortobuniavírus (proteína Gc), rubivírus e flebovírus (DuBois *et al.*, 2013). Apesar de suas características estruturais marcadamente distintas, essas duas classes de proteínas de fusão virais compartilham características comuns de inserção de um peptídeo de fusão hidrofóbico na membrana-alvo e redobragem para conduzir o processo de fusão de membranas (Quadro 1) (Pohlmann & Simmons, 2014).

As proteínas de fusão virais de classe III compartilham uma organização tridimensional distinta daquela encontrada nas classes I e II. As características estruturais peculiares das proteínas de fusão dessa classe incluem a presença de cinco domínios, que formam uma superhélice trimérica, e a presença equivalente de alfas-hélices e folhas-beta (Dittmar & Zanker, 2011).

Os vírus codificantes de proteínas de fusão de classe III incluem herpesvírus, baculovírus e rabdovírus (glicoproteína B, glicoproteína 64 e glicoproteína G, respectivamente) (Dittmar & Zanker, 2011). Estudos apontam que estas proteínas estão envolvidas, também, em processos intracelulares, como maturação viral e saída do vírion das células infectadas, sugerindo que evoluíram para executar múltiplas funções (Lee *et al.*, 1997; Oomens *et al.*, 1999).

Figura 10: Proteínas de fusão de classes I, II e III.

Legenda: Ilustração das proteínas de classes I, II e III em estado de pré-fusão. I: glicoproteína F do vírus Parainfluenza 5 (PIV5-F); II: glicoproteína E do vírus da Encefalite Transmitida por Carrapatos (TBEV-E); III: glicoproteína G do vírus da Estomatite Vesicular (VSV-G).

Fonte: Adaptado de Podbilewicz, (2014).

Quadro 1: Comparação de proteínas virais de fusão de classes I e II.

Recurso	Classe I	Classe II
Mudança conformacional durante a fusão	Trímero de proteína de fusão metaestável para trímero de proteína de fusão estável	Dímero metaestável para trímero de proteína de fusão estável
Estrutura secundária predominante	Alfa-hélice	Folha-beta
Estrutura pós-fusão	Trímero de grampos com espiral α -helicoidal central	Trímero de grampos compostos de estrutura β
Maturação através de:	Processamento proteolítico da proteína de fusão	Processamento proteolítico da proteína companheira
Localização do peptídeo de fusão na estrutura metaestável	Peptídeo N-terminal enterrado na interface do trímero	Alça interna na ponta da proteína de fusão

Fonte: Adaptado de Keilian & Rey, 2006.

1.5.2 Proteína E1 de Alfavírus

A proteína de fusão E1 dos alfavírus apresenta características estruturais de uma proteína de fusão de classe II, similares entre as espécies. Possui três domínios ricos em folhas-beta, denominados III, I (domínio central) e II, da membrana proximal à extremidade distal, onde a ponta do domínio II é contemplada com *loops* de fusão internos. Em seu estado de pré-fusão, forma um heterodímero com a proteína de ligação E2, e, após a fusão membranar, um homotrímero (Kielian & Rey, 2006).

Durante o processo de fusão membranar, cada protômero de E1 rearranja três domínios para formar uma estrutura intermediária que, em seguida, se dobra para trás dando origem em uma conformação em grampo pós-fusão. Na sequência, E1 e E2 se dissociam e três protômeros de E1 substituem E2 a partir do centro trimérico. A

mudança de conformação de seu estado de pré para pós-fusão envolve rearranjos de domínios, mas não mudança de estrutura secundária. Em alfavírus, estes rearranjos de domínio são desencadeados por pH ácido (Keilian; Chanel & Liao, 2010; Sahoo & Chowdary, 2019).

1.5.3 Proteína E de Flavivírus

A proteína de fusão E dos flavivírus também apresenta características estruturais de uma proteína de fusão de classe II, similares entre as espécies. Esta possui cerca de 500 aminoácidos (aa) e três domínios ricos em folhas-beta: EDI, EDII e EDIII. Um domínio tronco conecta os domínios EDI-EDIII à região transmembranar (Bergamaschi *et al.*, 2019).

O domínio EDI é caracterizado por conter uma estrutura beta-barril de oito fitas além de um sítio conservado de N-glicosilação, e atua conectando os domínios EDII e EDIII. O domínio EDII é responsável pela estabilização do dímero e contém um segundo sítio de glicosilação e um *loop* de fusão, responsável pela fusão entre as membranas viral e do hospedeiro durante a infecção. EDIII, por sua vez, é caracterizado por uma estrutura de folhas-beta antiparalelas ancorada ao domínio tronco C-terminal. Em decorrência de sua alta flexibilidade, este domínio é relativamente independente das demais porções da proteína e atua na interação com receptores da membrana do hospedeiro para iniciar o processo de infecção (Bergamaschi *et al.*, 2019; Medits *et al.*, 2020).

1.5.4 Proteína Gc de Ortobuniavírus

Estruturas cristalinas em estado de pré-fusão revelam que a proteína Gc é uma proteína de fusão de classe II, de modo semelhante às glicoproteínas de alfavírus e flavivírus. Como estes, a proteína Gc compreende três domínios de folhas-beta: o domínio I (DI) é central, o domínio II (DII) está contido na região distal da membrana e o domínio III (DIII) está próximo à região proximal da membrana e se conecta ao tronco e ao domínio transmembranar (Guardado-calvo & Rey, 2017).

Como mencionado anteriormente, a estrutura de Gc em estado de pós-fusão também se assemelha àquelas de outras proteínas de fusão de classe II (Bignon *et al.*, 2019). Em pH ácido, Gc forma trímeros estabilizados por pontes salinas e uma única cauda N-terminal. O DIII é compactado contra a junção de DI e DII, e DII organiza-se

de modo a projetar o *loop* de fusão em direção à membrana alvo. Gc também contém um sítio de N-glicosilação conservado em DII, cuja função é estabilizar interações com DIII durante a fusão (Mittler *et al.*, 2019).

1.6 BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL

Inicialmente, informações acerca de proteínas eram restritas a sequências aminoacídicas. Em 1971, o Protein Data Bank (PDB) – catálogo de todas as estruturas de macromoléculas – foi estabelecido no Brookhaven National Laboratory, liderado por Walter Hamilton, e o sequenciamento genômico de organismos em conjunto ao aumento de estruturas macromoleculares tridimensionais disponíveis deram origem à bioinformática estrutural (Paiva *et al.*, 2022).

A bioinformática estrutural é uma subárea da bioinformática que se dedica ao estudo da estrutura tridimensional de proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas. Essa área combina métodos de bioinformática (modelos e algoritmos da Ciência da Computação), química, física, matemática e biologia molecular para modelar, analisar e prever a estrutura tridimensional de moléculas biológicas. Entre seus principais objetivos, estão a criação de métodos de uso geral para manipular informações sobre macromoléculas e a aplicação desses métodos para resolver problemas e gerar soluções e novos conhecimentos (Billota & Tradigo & Veltri, 2019).

A realização de análises funcionais de genomas em larga escala voltada para descrição de funções de genes e proteínas, bem como a busca da relação entre o genótipo e o fenótipo, envolve uma variedade de métodos, incluindo sistemas modelo (por exemplo, CRISPR-Cas9), que pode ser utilizado (Shen *et al.*, 2015). Do ponto de vista funcional, a análise de proteômica é tão importante quanto à análise genômica, exatamente porque estudos mostram que enquanto a expressão gênica nos níveis de DNA ou mRNA permanece inalterada, a função proteica pode ser alterada (Griffin *et al.*, 2002).

Em geral, cada método tem suas vantagens e desvantagens, e, apesar da bioinformática ser uma ferramenta valiosa na determinação de proteínas, seu uso deve ser complementado com técnicas experimentais para a obtenção de resultados mais robustos. Entre as vantagens da bioinformática na determinação de proteínas estão:

- Velocidade e eficiência: permite uma análise rápida e automatizada de grandes volumes de dados de sequências proteicas;

- Identificação de novas proteínas: ajuda a identificar proteínas desconhecidas a partir de sequências genéticas;
- Análise comparativa: permite a comparação de sequências proteicas inter-espécies;
- Predição estrutural: permite prever a estrutura 3D de proteínas com base em suas sequências aminoacídicas.

As previsões de bioinformática podem não ser totalmente precisas, pois dependem de algoritmos e modelos matemáticos, portanto, também existem desvantagens inerentes, como:

- Dependência de dados de referência: a qualidade dos resultados pode depender diretamente da qualidade e disponibilidade de dados de referência;
- Complexidade computacional: análise de proteínas pode ser computacionalmente intensiva, exigindo recursos computacionais avançados;
- Validação experimental: é imprescindível realizar experimentos laboratoriais para validar as previsões e garantir a confiabilidade dos resultados (Gasperskaja, 2017; Billota & Tradigo & Veltri, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar físico-quimicamente as proteínas de fusão do MAYV, SLEV e OROV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar suas propriedades residuais (pesos moleculares, pontos isoelétricos e polaridades aminoacídicas);
- Predizer seus conteúdos de estruturas secundárias e localização na cadeia polipeptídica;
- Identificar a presença de potenciais sítios de modificações pós-traducionais nas proteínas em questão;
- Analisar a antigenicidade dessas proteínas de fusão virais a partir de variáveis como hidrofobicidade, acessibilidade e flexibilidade.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Uma vez que o presente projeto se trata de um estudo *in silico*, baseado em ferramentas de bioinformática para exploração de dados secundários de domínio público, tem-se dispensada a apreciação por Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) ou Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). A pesquisa está cadastrada no SisGen sob o número AB8C48B.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídas nas análises as sequências de referência (RefSeq) das proteínas de fusão dos arbovírus MAYV, SLEV e OROV traduzidas conceitualmente a partir dos respectivos genomas virais, sendo excluídos das análises quaisquer fragmentos peptídicos que não estejam assinalados como constituintes estruturais das proteínas de interesse.

3.3 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS

As sequências aminoacídicas completas das glicoproteínas de fusão E1 do MAYV (NP_740694.1:1-436), E do SLEV (YP_009329949.1:1-501) e Gc do OROV (NP_982303.1:536-1359) foram obtidas do banco de dados NCBI Protein (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) e salvas em formato FASTA.

3.4 DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES RESIDUAIS

Os pesos moleculares, pontos isoelétricos e polaridades aminoacídicas das proteínas de fusão virais foram determinados através da plataforma PEPSTATS (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/), incluindo cargas N-terminais e C-terminais e considerando, para cada aminoácido, seu peso molecular médio.

3.5 PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS

A predição do conteúdo de estruturas secundárias e suas localizações nas respectivas cadeias polipeptídicas das três proteínas de fusão virais foi realizada através da plataforma PREDATOR (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_predator.html),

configurada para largura de saída em 70 aminoácidos e assinalamento de estruturas secundárias do tipo DSSP.

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS

A busca por padrões de consenso – sequências aminoacídicas onde normalmente ocorrem modificações pós-traducionais – foi realizada através da plataforma PROSCAN (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_proscan.html), configurada para nível de similaridade de 100% (sem incompatibilidades).

3.7 ANÁLISE DE ANTIGENICIDADE POR HIDROFILICIDADE, ACESSIBILIDADE E FLEXIBILIDADE

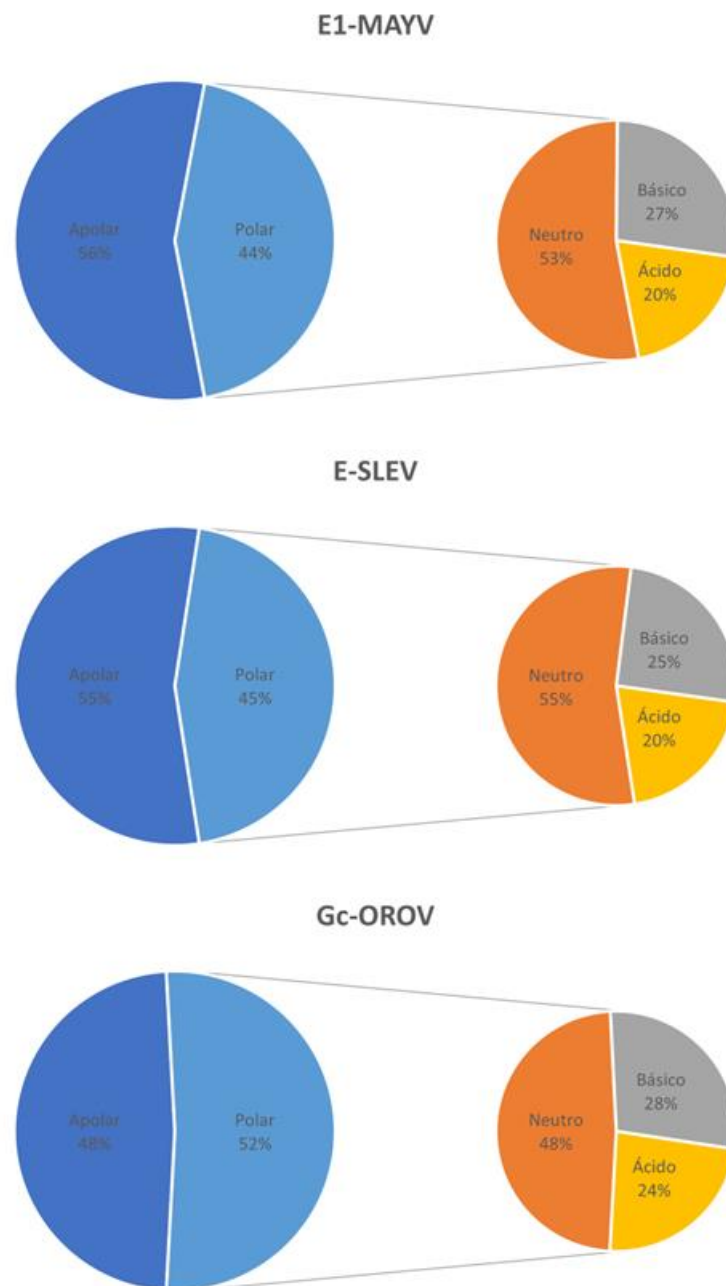
A antigenicidade ao longo das cadeias polipeptídicas das proteínas virais de fusão foi determinada a partir da convolução de variáveis de hidrofiliicidade, acessibilidade e flexibilidade utilizando a plataforma PCPROF (http://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_pcprof.html), ajustando o tamanho da janela de análise para 7 aminoácidos.

4 RESULTADOS

4.1 PROPRIEDADES RESIDUAIS DAS PROTEÍNAS VIRAIS DE FUSÃO

Os pesos moleculares das proteínas E1 do MAYV (436 resíduos), E do SLEV (501 resíduos) e Gc do OROV (824 resíduos) foram 47,47; 54,05 e 93,71 kDa, enquanto seus pontos isoelétricos foram 7,41; 7,42 e 6,99, respectivamente. As proteínas E1 do MAYV e E do SLEV apresentaram predominância do perfil apolar (56% e 55% dos resíduos, respectivamente), enquanto a proteína Gc do OROV apresentou predominância do perfil polar (52% dos resíduos); entre os resíduos polares, houve predominância de neutros sobre carregados (básicos mais ácidos) nas duas primeiras proteínas (53-55% vs. 45-47%, respectivamente) e o contrário na última (48% vs. 52%, respectivamente) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Propriedades residuais das proteínas de fusão do MAYV, SLEV e OROV.

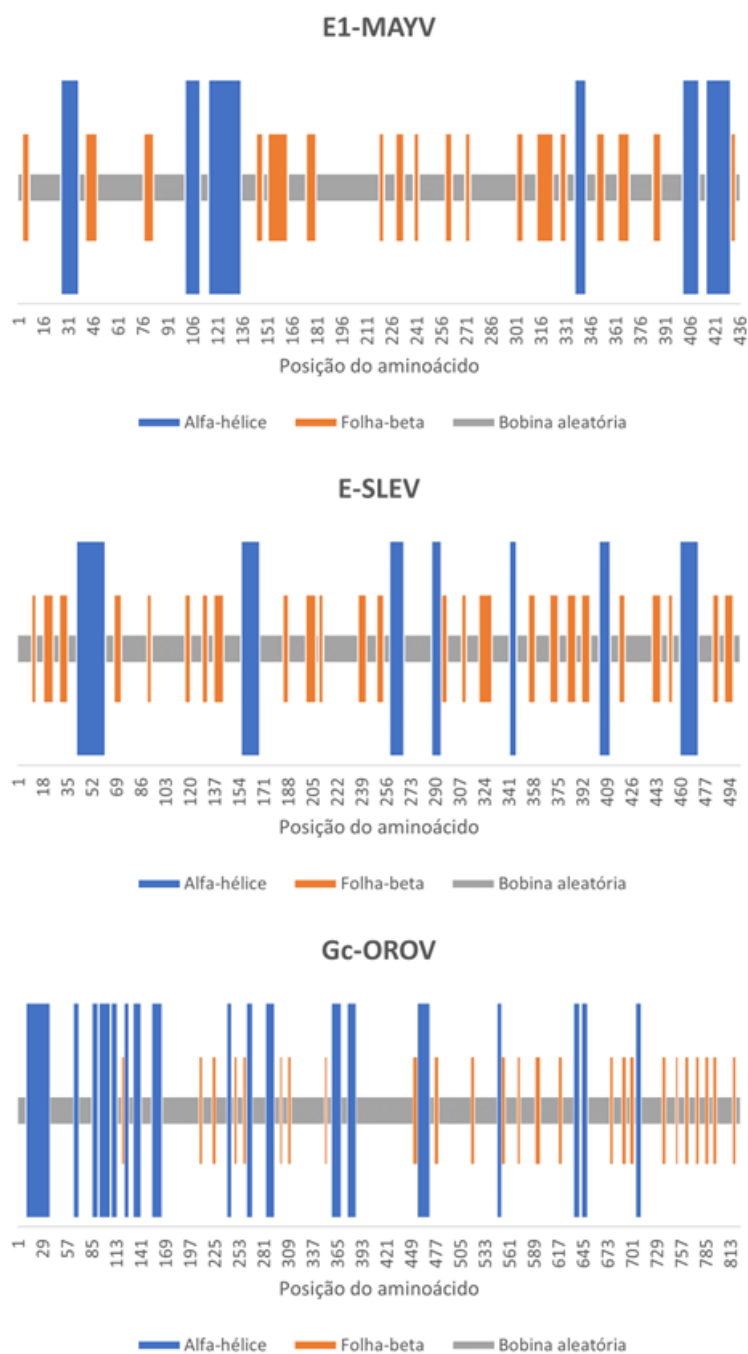


4.2 ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS PREDITAS NAS PROTEÍNAS VIRAIS DE FUSÃO

Embora bobinas aleatórias tenham prevalecido no conteúdo predito de estruturas secundárias das proteínas E1 do MAYV, E do SLEV e Gc do OROV (61,70%, 59,68% e 67,48%, respectivamente), as duas primeiras proteínas apresentaram menos alfa-hélices (16,51% e 15,17%, respectivamente) do que folhas-beta (21,79% e 25,15%, respectivamente), enquanto o oposto foi observado na última (20,39% alfa-

hélices e 12,14% folhas-beta). Além disso, a proteína E1 do MAYV mostrou uma mistura de alfa-hélices, folhas-beta e bobinas aleatórias previstas apenas nos terços N-terminal e C-terminal, já que o terço central foi previsto ter apenas as duas últimas estruturas secundárias, enquanto alfa-hélices, folhas-beta e bobinas aleatórias foram previstas de ocorrer nos três terços das proteínas E do SLEV e Gc do OROV (Gráfico 2).

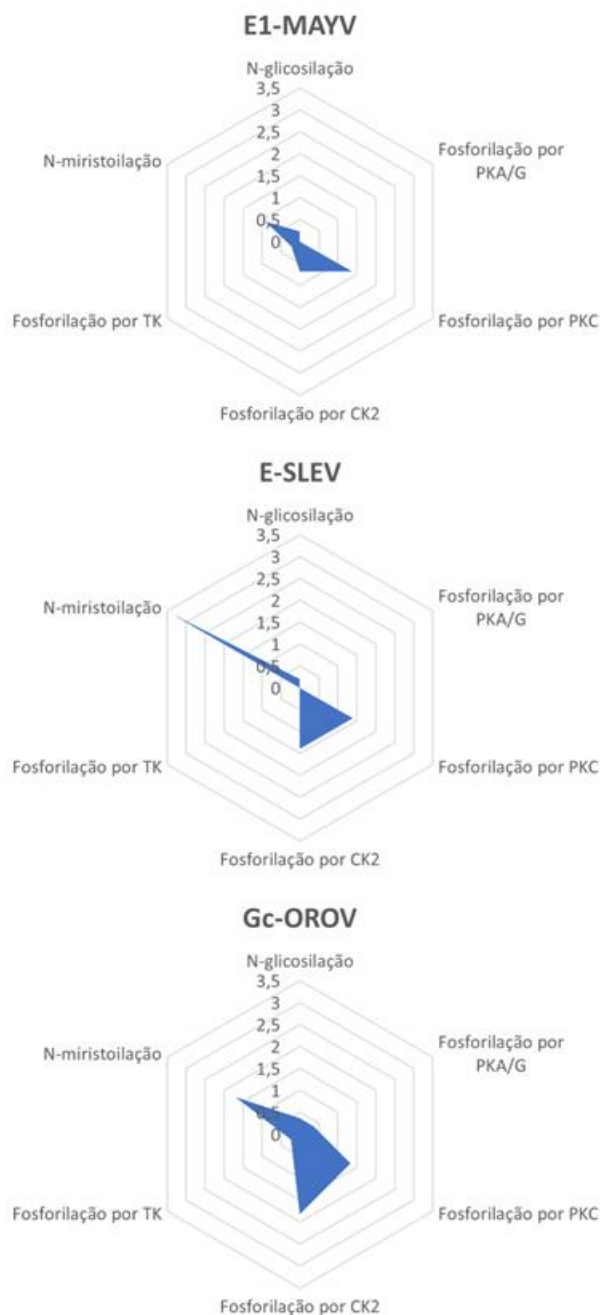
Gráfico 2: Estruturas secundárias previstas nas proteínas de fusão do MAYV, SLEV e OROV.



4.3 POTENCIAL DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DAS PROTEÍNAS VIRAIS DE FUSÃO

Padrões de consenso para N-glicosilação, fosforilação por proteína-quinase C (PKC), fosforilação por caseína-quinase II (CK2) e N-miristoilação foram encontrados nas três proteínas virais de fusão, mas em diferentes proporções: as proteínas E1 do MAYV, E do SLEV e Gc do OROV mostraram maior potencial relativo para fosforilação por PKC (1,38 sítio por 100 resíduos), N-miristoilação (3,39 sítios por 100 resíduos) e fosforilação por CK2 (1,82 sítio por 100 resíduos), respectivamente. Em relação à N-glicosilação, as proteínas E1 do MAYV e E do SLEV apresentaram, cada uma, um único sítio (nas posições aminoacídicas 141 e 154, respectivamente), e a proteína Gc do OROV apresentou três sítios (nas posições aminoacídicas 79, 141 e 622). Além disso, padrões de consenso para fosforilação por tirosina-quinase (TK) foram encontrados apenas nas proteínas E1 do MAYV e Gc do OROV (0,23 e 0,24 sítio por 100 resíduos, respectivamente), enquanto padrões de consenso para fosforilação por proteína-quinase dependente de cAMP e cGMP (PKA/G) foram encontrados apenas no último (0,36 sítio por 100 resíduos) (Gráfico 3).

Gráfico 3: Potencial de modificações pós-traducionais das proteínas de fusão do MAYV, SLEV e OROV (sítios por 100 resíduos).

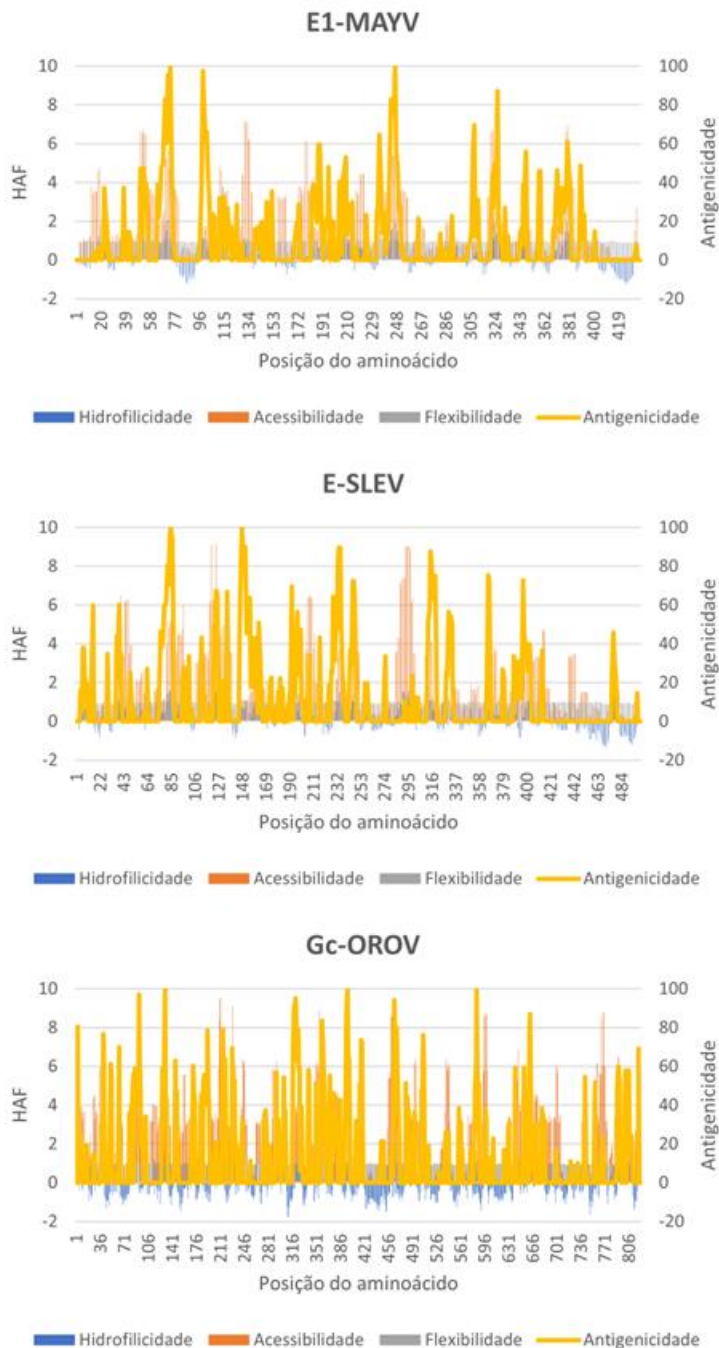


4.4 PROPENSÃO ANTIGÊNICA DAS PROTEÍNAS VIRAIS DE FUSÃO

A convolução das variáveis de hidrofobicidade, acessibilidade e flexibilidade resultou em maiores propensões antigênicas na metade N-terminal do que na metade C-terminal das três proteínas virais de fusão. Especificamente, tais propensões foram máximas em torno dos resíduos Pro74/Arg247 para a proteína E1 do MAYV, Arg85/Asp148 para a proteína E do SLEV e Asp131/Pro397/Gln585 para a proteína Gc

do OROV (Gráfico 4).

Gráfico 4: Propensão antigênica das proteínas de fusão do MAYV, SLEV e OROV a partir de variáveis de hidrofiliicidade, acessibilidade e flexibilidade (HAF).



5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, diversas doenças surgiram devido à ocorrência de vários surtos causados por diferentes arbovírus emergentes. Desde então, estes têm se tornado cada vez mais constantes e importantes ameaças, sobretudo em regiões de clima tropical, onde mudanças climáticas, desmatamento, migração populacional e precárias condições sanitárias contribuem para a replicação e transmissão viral (Lopes *et al.*, 2014). Em decorrência de diversos fatores virais/vetoriais e hospedeiros, as doenças transmitidas por vetores respondem por, aproximadamente, 17% da carga estimada de doenças infecciosas e, juntas, acarretam em mais de 700.000 mortes por ano (Agboli *et al.*, 2022).

Em geral, é aceito que as glicoproteínas são imprescindíveis para entrada do vírus na célula, porém, pouco se sabe ainda acerca de seu envolvimento nos eventos iniciais da infecção (Rosa *et al.*, 2017). Na condição de vírus envelopados, MAYV, SLEV e OROV dependem amplamente de suas proteínas de fusão de classe II (E1, E e Gc, respectivamente) que medeiam o processo de fusão das membranas virais e celulares. A fim de uma maior compreensão dos mecanismos de ação de uma proteína de fusão de membranas, informações estruturais de suas conformações pré e pós-fusão tornam-se cada vez mais necessárias.

Na região Norte do Brasil, a Amazônia engloba uma biodiversidade natural abundante, onde centenas de espécies de arbovírus já foram catalogadas, sobretudo nos estados do Pará e Amazonas (Rosa, 2016; Mourão *et al.*, 2015). Patógenos como o MAYV e o OROV têm sido frequentemente identificados nessas regiões em pacientes com quadros febris inespecíficos ou com lesão neurológica (Saatkamp *et al.*, 2020; Chiang *et al.*, 2021). Da mesma forma, o SLEV tem sido detectado em diferentes estados brasileiros, sugerindo possível emergência (Moraes *et al.*, 2021).

Apesar disso, esses patógenos continuam sendo um desafio para autoridades de saúde pública em regiões endêmicas, onde o monitoramento contínuo é imprescindível para controlar a dispersão e prevenir o surgimento de novos surtos (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018). A falta de apoio diagnóstico simplificado e preciso, além de alternativas profiláticas também são obstáculos a serem superados. Felizmente, o desenho racional de peptídeos antigênicos utilizando ferramentas *in silico* é uma realidade promissora no desenvolvimento de ensaios de imunodiagnóstico (Ali *et al.*, 2017).

A recente determinação da estrutura de pré-fusão da proteína gB do HCMV e a

estabilização funcional da proteína gB do HSV-1 pela adição de uma prolina a um elemento conservado (Liu *et al.*, 2021; Vollmer *et al.*, 2020), por exemplo, marcam um passo importante para utilização dessas proteínas no desenvolvimento de imunógenos e, depois disso, para diferentes alvos, incluindo DENV e CHIKV, entre outros (Hoque *et al.*, 2021).

Aqui, observamos que as proteínas E1 do MAYV e E do SLEV compartilham mais características físico-químicas entre si do que com a proteína Gc do OROV. Enquanto E1 e E demonstram uma predominância de perfil apolar, Gc tende a ser mais polar. Adhikari e colaboradores (2018) caracterizaram esta última como uma proteína levemente básica, estável e hidrofílica, corroborando nossos dados no que tange à predominância do caráter polar em seus aminoácidos.

Ali e colaboradores (2017) explicam que a média geral de hidropaticidade com valor negativo indica uma proteína de natureza hidrofílica, ou seja, que irá interagir com solventes polares. A média geral de hidropaticidade de seu estudo foi de -0,200 para proteína E do DENV a partir do servidor ProtParam, utilizando, no entanto, uma sequência de aminoácidos proveniente de formulação vacinal. Quanto à previsão de estrutura secundária da proteína E do SLEV, nossos achados mostraram menos alfa-hélices do que folhas-beta, assim como estudos realizados com DENV por Ali e colaboradores (2017), onde o resultado geral da previsão de estrutura secundária indicou presença de apenas 15,3% de alfa-hélices.

Apesar da importância de *Orthobunyavirus*, considerado o maior gênero dentro da ordem *Bunyavirales*, estudos acerca da organização estrutural de sua partícula infecciosa parecem escassos (Maes *et al.*, 2018). Com base em sua estratégia funcional, de fato prevê-se que a glicoproteína Gc pertença à classe II das proteínas de fusão de membrana, como um homólogo distante das glicoproteínas de fusão dos flavivírus e dos alfavírus (Bignon *et al.*, 2019). Entretanto, em termos estruturais, nossos achados a descrevem como uma molécula predominantemente polar, com maior percentual de alfa-hélices do que folhas-beta, típico de proteínas de fusão de classe I.

Em estudo recente, Hellert e colaboradores (2023) enfatizam que a identidade da sequência aminoacídica de Gc de ortobuniavírus e Gc de vírus em outras famílias da ordem *Bunyavirales* é muito baixa, ficando abaixo de 12%. Reforçando o nosso raciocínio, este mesmo estudo concluiu que a proteína Gc é diferente de qualquer outra proteína de fusão de classe II descrita até o momento (Hellert *et al.*, 2023).

Além disso, na presente investigação, as proteínas E1 do MAYV, E do SLEV e

Gc do OROV apresentaram maior propensão à fosforilação por PKC, N-miristoilação e fosforilação por CK2, respectivamente. Ardito e colaboradores (2017) salientam que a fosforilação é um dos mais conservados tipos de modificação pós-traducional, onde o grupo fosfato é adicionado a aminoácidos como serina, treonina ou tirosina através de uma reação reversível utilizando trifosfato de adenosina (ATP). Em consonância, estudos concluem que a fosforilação desempenha um papel fundamental na proteína, que vai desde interação e estabilidade proteica à regulação da transcrição, progressão do ciclo celular e apoptose (Keck *et al.*, 2015).

A miristoilação, por sua vez, é marcada pela ligação do grupo miristoil, mediada por N-miristoil transferases (NMT), à glicina N-terminal da proteína (Kumar *et al.*, 2021). Em concordância com nossos achados, os resultados *in silico* de Suwanmanee e colaboradores (2019) detectaram abundantes sítios de N-miristoilação em distintos sorotipos de DENV, determinando que os locais mais frequentes de miristoilação foram nas proteínas E, NS5 e NS3.

Nos últimos anos, a caracterização estrutural e funcional de diversas proteínas de fusão permitiu que etapas cruciais desse processo fossem elucidadas. Ao contrário dos membros da classe I, os peptídeos de fusão de classe II não estão localizados na porção N-terminal, mas formando uma alça interna que conecta as cadeias β na ponta do domínio II (Lozada *et al.*, 2021).

A resultante da interação entre os parâmetros de hidrofobicidade, acessibilidade e flexibilidade das proteínas deste estudo resultou em maior potencial de antigenicidade na metade N-terminal do que na metade C-terminal. Harrison e colaboradores (2008) apontam que, geralmente, é na região N-terminal de uma proteína de fusão que se encontra o domínio de ligação ao receptor.

Para proteína E1 do MAYV, um perfil de alta flexibilidade foi observado ao longo de grande extensão da proteína, sobretudo no que tange as regiões marcadas por alta hidrofobicidade e acessibilidade. Em decorrência de sua alta flexibilidade, por sua vez, o domínio C-terminal é relativamente independente das demais porções da proteína E do SLEV (Bergamaschi *et al.*, 2019; Medits *et al.*, 2020).

A avaliação da proteína Gc do OROV neste estudo revelou picos de hidrofobicidade, acessibilidade e flexibilidade no decorrer de toda a extensão da molécula. Em análise funcional da proteína Gc do vírus Bunyamwera, Shi e colaboradores (2009) indicaram que a metade C-terminal é essencial para mediar a reação de fusão celular, enquanto que a metade N-terminal é dispensável, sugerindo que

o peptídeo de fusão dos ortobuniavírus está localizado na região proximal da membrana.

Ainda que os dados aqui presentes se mostrem em linha com diferentes estudos disponíveis na literatura, ressalta-se a necessidade de análise experimental *in vitro*, já que o estudo considera apenas sequências de referência das proteínas de fusão, que não necessariamente refletem a diversidade de variantes existentes. Apesar das limitações, esta investigação esclarece os detalhes da biologia estrutural desses arbovírus para revelar pontos críticos da interação vírus-célula e fornecer pistas ao desenvolvimento racional de estratégias antivirais.

6 CONCLUSÕES

A utilização de ferramentas de bioinformática para análise de arbovírus emergentes realizada neste estudo permitiu a descrição de características peculiares de proteínas críticas para a infecção viral, fortes candidatas a alvos de estudos para o desenvolvimento de imunógenos. Em destaque, notamos que as proteínas E1 do MAYV e E do SLEV compartilham mais características físico-químicas entre si do que com a proteína Gc do OROV, embora todas sejam agrupadas sob a mesma classe de proteínas virais de fusão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-AMPUDIA, Y. *et al.* Mayaro: an emerging viral threat?. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2018.

ADHIKARI, U. K.; TAYEBI, M. RAHMAN, M. Immunoinformatics Approach for Epitope-Based Peptide Vaccine Design and Active Site Prediction against Polyprotein of Emerging Oropouche Virus. **Journal Of Immunology Research**. v. 2018, p. 22, 2018.

AGBOLI, E. *et al.* Arbovirus Epidemiology: The Mystery of Unnoticed Epidemics in Ghana, West Africa. **Microorganisms**. v. 10, p. 1914, 2022.

ALI, M. *et al.* Exploring dengue genome to construct a multi-epitope based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. **Scientific Reports**. v. 7, p. 9232, 2017.

ALVA-URCIA, C. *et al.* Emerging and reemerging arboviruses: a new threat in Eastern Peru. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187897, 2017.

ANDERSON, C. R. *et al.* Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, BWI. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1012-16, 1957.

ANDERSON, C. R. *et al.* Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, n. 4, p. 574-8, 1961.

ARDITO, F. *et al.* The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). **International Journal Of Molecular Medicine**. v. 40, p. 271-280, 2017.

AUGUSTE, A. J. *et al.* Evolutionary and ecological characterization of Mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 10, p. 1742, 2015.

AUGUSTE, A. J. *et al.* Isolation and characterization of sylvatic mosquito-borne viruses in Trinidad: enzootic transmission and a new potential vector of Mucambo virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 6, p. 1262, 2010.

BASTOS, M. S. *et al.* Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 4, p. 732, 2012.

BATALLÁN, G. P. *et al.* Autochthonous circulation of Saint Louis encephalitis and West Nile viruses in the Province of La Rioja, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 53, n. 2, p. 154-161, 2021.

BERGAMASCHI, G. *et al.* Computational Analysis of Dengue Virus Envelope Protein (E) Reveals an Epitope with Flavivirus Immunodiagnostic Potential in Peptide Microarrays. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 20, p. 1921, 2019.

BIGNON, E. A. *et al.* Molecular organization and dynamics of the fusion protein Gc at the hantavirus surface. **eLIFE**. v. 8, p. e46028, 2019.

BILOTTA, M. C.; TRADIGO, G.; VELTRI, P. Bioinformatics Data Models, Representation and Storage. **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology**. v. 1, p. 110-116, 2019.

- BROWN, R. S.; WAN, J. J.; KIELIAN, M. The alphavirus exit pathway: what we know and what we wish we knew. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 89, 2018.
- CAO-LORMEAU, V. *et al.* Guillain-Barré syndrome outbreak caused by Zika virus infection in French Polynesia. **Lancet**. doi, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, 2016.
- CARDOSO, B. F. *et al.* Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 745-754, 2015.
- CAUSEY, O. R. *et al.* Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Pará, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1017-23, 1957.
- CHAVEZ, R.; COLAN, E.; PHILIPS, I. Fiebre de Oropouche em Iquitos: reporte preliminar de 5 casos. **Rev. Farmacol. y Terap.** v. 1, p. 12-14, 1992.
- CHIANG, J. O. *et al.* Neurological disease caused by Oropouche virus in northern Brazil: should it be included in the scope of clinical neurological diseases?. **Journal of neurovirology**, v. 27, n. 4, p. 626-630, 2021.
- CHONG, H. Y. *et al.* Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. **Virus research**, v. 274, n. [S/I], p. 197770, 2019.
- CLARK, D. C.; BRAULT, A. C.; HUNSPERGER, E. The contribution of rodent models to the pathological assessment of flaviviral infections of the central nervous system. **Archives of virology**, v. 157, n. 8, p. 1423-1440, 2012.
- COFFEY, L. L. *et al.* Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future microbiology**, v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.
- CURREN, E. J. *et al.* St. Louis encephalitis virus disease in the United States, 2003–2017. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 99, n. 4, p. 1074, 2018.
- DE SOUZA, L. K. L. *et al.* Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. **Journal of medical virology**, v. 89, n. 6, p. 1108-1111, 2017.
- DIAGNE, C. T. *et al.* Mayaro virus pathogenesis and transmission mechanisms. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 738, 2020.
- DIAZ, A. *et al.* Reemergence of St. Louis encephalitis virus in the Americas. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 12, p. 2150-2157, 2018.
- DITTMAR, T.; ZANKER, K. S. Class III viral membrane fusion proteins, In: BACKOVIC, M.; JARDETZKY, T. S. **Cell Fusion in Health and Disease**. New York NY, USA:Springer. 2011, 91-101p.
- DUBOIS, R. M. *et al.* Functional and evolutionary insight from the crystal structure of rubella virus protein E1. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 552-556, 2013.
- ELLIOTT, R. M. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 673-685, 2014.
- ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil?. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21,

n. 5, p. 540-544, 2017.

FERREIRA, J. E. *et al.* Molecular characterization of viruses associated with encephalitis in São Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0209993, 2019.

FONTAINE, A. *et al.* Epidemiological significance of dengue virus genetic variation in mosquito infection dynamics. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 7, p. e1007187, 2018.

FORSHEY, B. M. *et al.* Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000–2007. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 8, p. e787, 2010.

GANJIAN, N.; RIVIERE-CINNAMOND, A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, n. [S/I], p. e14, 2020.

GASPERSKAJA, E; KUCINSKAS, V. The most common technologies and tools for functional genome analysis. **Acta medica lituanica**. v. 24, n. 1, p. 1-11, 2017.

GIRARD, M. *et al.* Arboviruses: A global public health threat. **Vaccine**, v. 38, n. 24, p. 3989-3994, 2020.

GRIFFIN, T. J. *et al.* Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular proteomics**, v. 1, n. 4, p. 323-333, 2002.

GROUT, H. *et al.* Virus isolations from forest mosquitoes in San Vicente de Chucuri, Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, n. 3, p. 397-402, 1961.

GUARDADO-CALVO, P.; REY, F. A. The Envelope Proteins of the Bunyavirales. **Advances in Virus Research**. v. 98, p. 0065-3527, 2017.

GUBLER, D. J. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century. **Tropical medicine and health**, v. 39, n. 4SUPPLEMENT, p. S3-S11, 2011.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International journal of infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

HARRISON, S. C. Viral membrane fusion. **Structural & Molecular Biology**. v. 15, n. 7, p. 690-698, 2008.

HEINEN, L. B. S. *et al.* Saint Louis encephalitis virus in Mato Grosso, central-western Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, p. 215-220, 2015.

HELLERT, J. *et al.* Structure, function and evolution of the Orthobunyavirus membrane fusion glycoprotein. **Cell reports**, v. 42, n. 3, p. 112-142, 2023.

HILGENFELD, R.; VASUDEVAN, S. G. (Ed.). Arboviruses: a family on the move. In: YOUNG, P.R. **Dengue and Zika: control and antiviral treatment strategies**. Singapore: Springer, 2018, 1-10p.

HOQUE, H. Implementation of in silico methods to predict common epitopes for vaccine development against Chikungunya and Mayaro viruses. **Heliyon**. v. 7, p. 06396, 2021.

KECK, F. *et al.* Phosphorylation of Single Stranded RNA Virus Proteins and Potential for Novel Therapeutic Strategies. **Viruses**. v. 7, p. 5257-5273, 2015.

KIELIAN, M.; CHANEL-VOS, C.; LIÃO, M. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. **Viruses**.

v. 2, p. 796-825, 2010.

KIELIAN, M.; REY, F. A. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 67-76, 2006.

KING, A. M.Q.; ADAMS, M. J.; CARTENS, E. B., LEFKOWITZ, E. (1ªEd.). *Togaviridae*, In: POWERS, A.; HUANG, H.; ROEHRIG, J., STRAUSS, E.; WEAVER, S. **Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Amsterdã, Holanda: Elsevier, 2012, 1103-1110p.

KOELTZ, A.; LASTERE, S.; JEAN-BAPTISTE, S. Intensive care admissions for severe chikungunya virus infection, French Polynesia. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 4, p. 794, 2018.

KUMAR, R. *et al.* Role of Host-Mediated Post-Translational Modifications (PTMs) in RNA Virus Pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, p. 323, 2020.

LAVERGNE, A. *et al.* Mayaro virus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. **Virus research**, v. 117, n. 2, p. 283-290, 2006.

LEDNICKY, J. *et al.* Mayaro virus in child with acute febrile illness, Haiti, 2015. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 11, p. 2000, 2016.

LEE, S. K.; LONGNECKER, R. The Epstein-Barr virus glycoprotein 110 carboxy-terminal tail domain is essential for lytic virus replication. **Journal of virology**, v. 71, n. 5, p. 4092-4097, 1997.

LIU, Y. *et al.* Prefusion structure of human cytomegalovirus glycoprotein B and structural basis for membrane fusion. **Structural Biology**. v. 7, p. eabf3178, 2021.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 10-10, 2014.

LOZADA, C. *et al.* Identification and Characteristics Of Fusion Peptides Derived From Enveloped Viruses. **Fusion Peptides From Enveloped Viruses**, v. 9, 2021.

MAES, P. *et al.* Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. **Archives of virology**, v. 163, n. 8, p. 2295-2310, 2018.

MEDITS, I. *et al.* Extensive flavivirus E trimer breathing accompanies stem zipper of the post-fusion hairpin. **EMBO reports**. v. 21, p. e50069, 2020.

MITTLER, E. *et al.* Hantavirus entry: Perspectives and recent advances. **Advances in Virus Research**. v. 104, p. 185-224, 2019.

MORAES, M. M. *et al.* Detection of Saint Louis encephalitis virus in two Brazilian states. **Journal Of Medical Virology**. v. 94, n. 2, 2021.

MOURÃO, M. P. G. *et al.* Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 20-26, 2015.

MOURÃO, M. P. G. *et al.* Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42-46, 2012.

MUTRICY, R. *et al.* Mayaro virus infection in French Guiana, a cross sectional study 2003–

2019. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 99, n. 2022, p. 105243, 2022.

NASAR, F. *et al.* Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 36, p. 14622-14627, 2012.

NUNES, M. R. T. *et al.* Oropouche virus isolation, southeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1610, 2005.

OOMENS, A. G. P.; BLISSARD, G. W. Requirement for GP64 to Drive Efficient Budding of *Autographa californica* Multicapsid Nucleo polyhedrovirus. **Virology**, v. 254, n. 2, p. 297-314, 1999.

PAIVA, V.A. *et al.* Protein structural bioinformatics: An overview. **Computers in Biology and Medicine**. v. 147, p. 105-695, 2022.

PARAMESWARAN, P. *et al.* Genome-Wide Patterns of Intrahuman Dengue Virus Diversity Reveal Associations with Viral Phylogenetic Clade and Interhost Diversity. **Journal Of Virology**. v. 86, n. 16, p. 8546-8558, 2012.

PINHEIRO, F. P. *et al.* An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 30, n. 3, p. 674-681, 1981

PINHEIRO, F. P. *et al.* Meningite associada as infeccoes por virus Oropouche. **Rev. Inst. Med. Trop.** v., n., p. 246-51, 1982.

PODBILEWICZ, B. Virus and cell fusion mechanisms. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 111-139, 2014.

PÖHLMANN, S.; SIMMONS, G. (Ed.). Class II fusion proteins, In: MODIS, Y. **Viral entry into host cells**. New York, NY, USA: Springer, 2013, 150-166p.

QUEIROZ, J. A. S. *et al.* Phylogenetic Characterization of Arboviruses in Patients Suffering from Acute Fever in Rondônia, Brazil. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 889, 2020.

RODRIGUES, S. G. *et al.* Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 10, p. 2420-2427, 2010.

ROSA, A. P. A. T. A história da Arbovirologia no Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brasil, de 1954 a 1998. **Revista Pan-Amazonica de Saude**, v. 7, n. ESP, p. 61-70, 2016.

ROSA, J. F. T. *et al.* Oropouche virus: clinical, epidemiological, and molecular aspects of a neglected Orthobunyavirus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 96, n. 5, p. 1019, 2017.

ROSA, R. *et al.* Isolation of Saint Louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 11, p. e2537, 2013.

SAATKAMP, C. J. *et al.* Mayaro virus detection in the western region of Para state, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, n. [S/I], p. e0055, 2020.

SAEED, M. F. *et al.* Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 3, p. 743-748, 2000.

SAHOO, B.; CHOWDARY, T. K. Conformational changes in Chikungunya virus E2 protein

upon heparan sulfate receptor binding explain mechanism of E2–E1 dissociation during viral entry. **Bioscience reports**, v. 39, n. 6, p. [S/I], 2019.

SAKKAS, H. *et al.* Oropouche fever: a review. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 175, 2018.

SANTIAGO, F. W. *et al.* Long-term arthralgia after Mayaro virus infection correlates with sustained pro-inflammatory cytokine response. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004104, 2015.

SHEN, H. *et al.* Functional genomic screening approaches in mechanistic toxicology and potential future applications of CRISPR-Cas9. **Reviews in mutation research**, v. 764, n. [S/I], p. 31-42, 2015.

SHI, X. *et al.* Functional analysis of the Bunyamwera orthobunyavirus Gc glycoprotein. **Journal of General Virology**. v. 90, p. 2483–2492, 2009.

SUWANMANEE, S. *et al.* Inhibition of *N*-myristoyltransferase1 affects dengue virus replication. **Microbiology Open**. v. 8, p. e00831, 2019.

SWETNAM, D. M. *et al.* Movement of st. Louis encephalitis virus in the western united states, 2014-2018. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008343, 2020.

TERZIAN, A. C. B. *et al.* Sporadic Oropouche Infection, Acre, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 2, p. 348, 2009.

TORRES, J. R. *et al.* Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 7, p. 1304, 2004.

TSURUDOME, M. Membrane fusion by virus. **Virus**, v. 55, n. 2, p. 207-219, 2005.

VASCONCELOS, H. B. *et al.* Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 800, 2011.

VASCONCELOS, H. B. *et al.* Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 2, p. 129-133, 2009.

VIGLIETTA, M. *et al.* Vector specificity of arbovirus transmission. **Frontiers in Microbiology**, v.12, n. [S/I], p. 3446, 2021.

VOLLMER, B. *et al.* The prefusion structure of herpes simplex virus glycoprotein B. **Virology**. v. 6, p. eabc1726, 2020.

WATTS, D. M. *et al.* Oropouche virus transmission in the Amazon River basin of Peru. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 56, n. 2, p. 148-152, 1997.

ZHANG, W. *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 10, n. 11, p. 907-912, 2003.