

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-graduação em Microbiologia**

Matheus Soares Arruda

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR MAYARO VIRUS EM  
PRIMATAS NÃO HUMANOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS (2017-2020) E  
OTIMIZAÇÃO DE TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL ALTERNATIVO PARA  
INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO POR MAYARO VIRUS.**

Belo Horizonte

2023

Matheus Soares Arruda

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR MAYARO VIRUS EM  
PRIMATAS NÃO HUMANOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS (2017-2020) E  
OTIMIZAÇÃO DE TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL ALTERNATIVO PARA  
INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO POR MAYARO VIRUS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond.

Belo Horizonte

2023

043

Arruda, Matheus Soares.

Investigação molecular da infecção por Mayaro virus em primatas não humanos no Estado de Minas Gerais (2017-2020) e otimização de teste de neutralização viral alternativo para investigação da infecção por Mayaro virus [manuscrito] / Matheus Soares Arruda. – 2023.

110 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Alphavirus. 3. Sorologia. 4. Epidemiologia. 5. Arbovirus. I. Drumond, Betânia Paiva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE: **MATHEUS SOARES ARRUDA**

Nº REGISTRO: **2021661509**

Às 14:00 horas do dia 28 de abril de 2023, reuniu-se por via remota, a Comissão Examinadora composta pelas Dras. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Livia Sacchetto Pengo (Faculdade de Medicina de São José do io preto) e a Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond (Orientadora), para julgar o trabalho final "Investigação Molecular da Infecção Por Mayaro virus em Primatas Não Humanos no Estado de Minas Gerais (2017-2020) e Otimização de Teste de Neutralização Viral Alternativo para Investigação da Infecção por Mayaro virus", do aluno Matheus Soares Arruda, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond - orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 28 de abril de 2023

Membros da banca:

Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Profa. Dra. Livia Sacchetto Pengo

De acordo:

Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond

(Orientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza  
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por Livia Sacchetto Pengo, Usuário Externo, em 02/05/2023, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Betania Paiva Drumond, Professora do Magistério Superior, em 02/05/2023, às 14:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Membro de comitê, em 02/05/2023, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 05/05/2023, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2176968 e o código CRC D589B181.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Centers for Research in Emerging Infectious Diseases (CREID/NIAID/NIH), de RTI International (*grants* 1U01AI151378 e X.XXX.0217530) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido na realização deste projeto.

Aos colaboradores do CREATE-NEO, Dra. Kathryn Hanley e Dr Nikos Vasilakis, pela disponibilidade e empenho em contribuir com esse projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG, pelo apoio e disponibilidade em ajudar durante todo o processo.

Aos professores e colegas do Laboratório de Vírus, pelo aprendizado, trocas, apoio, bons momentos e amizade.

A Naty, Livia e Iza, por todo empenho em transmitir conhecimento e por todo apoio de sempre.

Ao ArboTeam, em especial Gabi, Thaís, Gabriel e Erik, que participaram ativamente e contribuíram muito para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos, que foram porto seguro em diversos momentos, com destaque para Gabi e Thaís, me ajudaram a segurar a barra nos momentos mais difíceis.

À minha família, que investiu na minha educação, apoiou as minhas decisões, me deu condições de ir atrás dos meus sonhos e sempre me deu todo amor e carinho que eu precisei.

E à minha orientadora, Betânia, que é exemplo para mim como profissional e como pessoa, por não medir esforços em alcançar seus objetivos ao mesmo tempo em que se dedica ao crescimento profissional e pessoal de seus orientandos.

## RESUMO

O Mayaro virus (MAYV; gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*) é o agente etiológico causador da febre do Mayaro, uma doença caracterizada por sinais clínicos como febre, dor nas articulações e exantema. O MAYV é transmitido a primatas não humanos (PNH) pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Haemagogus* spp. que, por sua vez, também podem transmitir o vírus a humanos, que se tornam hospedeiros acidentais num fenômeno conhecido como *spillover*. No Brasil, o MAYV e o yellow fever virus (YFV), causador da febre amarela (FA), compartilham vetores e hospedeiros, além de apresentarem sobreposição de áreas onde circulam. Nesse contexto, este trabalho visa a investigar a presença do genoma de MAYV em amostras de PNH coletadas durante os recentes surtos de febre amarela no estado de Minas Gerais e otimizar um ensaio de neutralização viral (PRNT) com a utilização de amostras de fígado de animais experimentais substituindo soro para investigar a infecção por MAYV. Para a investigação molecular, foram testadas, pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR), 732 amostras de fígado de PNH de vida livre para detecção de região do genoma de MAYV. Para a padronização do teste de neutralização, foram utilizadas amostras de fígado de animais experimentais em substituição ao soro em protocolo adaptado de PRNT. Não foi possível detectar a presença do genoma de MAYV nas amostras de fígado de PNH. Foi observada neutralização em amostras de animais experimentais infectados, o que não foi observado, na mesma proporção, em animais não infectados. A técnica de neutralização viral adaptada nesse trabalho se mostrou promissora para uso na investigação da presença de anticorpos neutralizantes em amostras de fígado obtidas de carcaças, e poderá ser de grande valia para os esforços de vigilância epidemiológica de arbovírus no país. A não detecção de genoma de MAYV nas amostras de fígado de PNH não exclui a possibilidade de circulação, ou mesmo de introdução futura do vírus em MG, sendo necessário um trabalho de vigilância continuado para monitoramento de eventuais surtos.

Palavras-chave: Mayaro virus; primatas não humanos; PRNT; sorologia; epidemiologia; arbovírus; neutralização viral.

## ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV; genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*) is the etiologic agent causing Mayaro fever, a disease characterized by clinical signs such as fever, joint pain, and exanthema. MAYV is transmitted to non-human primates (NHP) by the bite of female mosquitoes of the genus *Haemagogus* spp. which, in turn, can also transmit the virus to humans, who become accidental hosts in a phenomenon known as spillover. In Brazil, MAYV and yellow fever virus (YFV), which causes yellow fever (YF), share vectors and hosts, besides presenting overlapping areas where they circulate. In this context, this work aims to investigate the presence of MAYV genome in samples of NHP collected during recent outbreaks of yellow fever in the state of Minas Gerais and to optimize a viral neutralization assay (PRNT) using liver samples from experimental animals as a serum substitute to investigate MAYV infection. For the molecular investigation, 732 liver samples from free-living NHP were tested by polymerase chain reaction (PCR) for the detection of a MAYV genome region. For the standardization of the neutralization test, liver samples from experimental animals were used in place of serum in an adapted PRNT protocol. The presence of the MAYV genome could not be detected in NHP liver samples. Neutralization was observed in samples from experimental animals, which was not observed to the same extent in uninfected animals. The viral neutralization technique adapted in this work showed promise for use in the investigation of the presence of neutralizing antibodies in liver samples obtained from carcasses and may be of great value for epidemiological surveillance efforts of arboviruses in the country. The non-detection of MAYV genome in liver samples from PNH does not exclude the possibility of circulation, or even future introduction of the virus in MG, requiring continued surveillance work to monitor any outbreaks.

Keywords: Mayaro virus; non-human primates; PRNT; serology; epidemiology; arboviruses; viral neutralization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do vírion dos alfavírus	12
Figura 2 - Organização do genoma e proteínas dos alfavírus	12
Figura 3 - Ciclo de multiplicação viral dos alfavírus	14
Figura 4 - Dinâmica de transmissão do MAYV	18
Figura 5 - Primatas do Novo Mundo	19
Figura 6 - Distribuição de casos de detecção do MAYV na América Latina	23
Figura 7 – Fluxograma de trabalho	27
Figura 8 - Distribuição dos percentuais de neutralização para cada diluição (infectados e mock)	40
Figura 9 - Dispersão dos valores de neutralização	41
Figura 10 - Comparação dos percentuais de neutralização por diluição	43
Figura 11 - Curvas de neutralização viral	44
Figura 12 - Regressão linear dos percentuais de neutralização por diluição	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primatas não humanos testados por RT-qPCR para detecção do genoma de MAYV 28	
Tabela 2 - Iniciadores para detecção do gene $\beta$ -actina por RT-PCR	31
Tabela 3 - Iniciadores e sonda para detecção de MAYV por RT-PCR	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arbovírus – vírus transmitidos por artrópodes (do inglês, *arthropod-borne viruses*)

°C – graus Celsius

µg - micrograma

µL - microlitro

C – proteína do capsídeo

C57BL/6 – linhagem de camundongos isogênicos

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CHIKV - chikungunya virus

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPV - vesículas derivadas do endossomo

DMSO – dimetilsulfóxido

Dra. – doutora

Dr. – doutor

EEEV - vírus da encefalite equina do leste

ELISA – ensaio imunoenzimático (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FA – febre amarela

HEPES - ácido 4 – (2-hidroxietil) -1-piperazin etanol sulfônico

IgM – imunoglobulina M

kb - quilobases

kg - quilograma

LZOON - Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte

MAYV - Mayaro virus

MEM - meio essencial mínimo

MG – Minas Gerais

mg – miligrama

mL - mililitro

mM – milimolar

mm – milímetro

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

nm - nanômetro

nsP1 - proteína não estrutural 1

nsP2 - proteína não estrutural 2

nsP3 - proteína não estrutural 3

nsP4 - proteína não estrutural 4

ORF – janela de leitura aberta (do inglês, *open reading frame*)

ONNV - O'nyong-nyong virus

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)

PFU - unidades formadoras de placas (do inglês, *plaque-forming units*)

PNH – primatas não humanos

PRNT – ensaio de neutralização viral (do inglês, *plaque reduction neutralization assay*)

RNA – ácido ribonucleico

RNase - ribonuclease

RT-qPCR – PCR quantitativa

SFB - soro fetal bovino

SFV - Semliki Forest virus

TF – proteína *transframe*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEEV - vírus da encefalite equina venezuelana

WEEV - vírus da encefalite equina do oeste

YFV – yellow fever virus

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Gênero <i>Alphavirus</i> .....	14
1.2 Estrutura e organização do genoma .....	14
1.3 Ciclo de multiplicação viral .....	17
1.4 Patogênese da febre do Mayaro .....	19
1.6 Ciclo de Transmissão.....	20
1.7 Primatas não humanos: características e papel como hospedeiros de arbovírus .....	22
1.8 Epidemiologia.....	24
1.9 Ensaios para detecção de infecção por MAYV .....	26
2. JUSTIFICATIVA .....	28
3. OBJETIVOS .....	29
3.1 Objetivo geral .....	29
3.2 Objetivos específicos .....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Amostras biológicas.....	30
4.1.2 Cultivo de células Vero.....	32
4.1.3 Amostras de vírus .....	32
4.1.4 Amostras de fígado de animais experimentais .....	32
4.2 Investigação molecular da infecção por MAYV .....	33
4.3 Investigação sorológica da infecção por MAYV.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5.1 Investigação de MAYV em PNH .....	38
5.2 Adaptação de ensaio de neutralização viral .....	40
6. CONCLUSÃO.....	51
7.1 Participação em eventos científicos .....	51
7.2 Organização de eventos científicos.....	51
7.3 Apresentação de trabalhos em eventos científicos.....	51
7.4 Cursos e atividades de extensão.....	52
7.5 Participação em orientação de trabalho de conclusão de curso .....	52

7.6 Artigos publicados e submetidos para publicação em periódicos .....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
9. ANEXOS .....	64
ANEXO A - Infecção de animais experimentais .....	64
ANEXO B - Documentos CEUA.....	66
ANEXO C - Publicações em periódicos.....	83

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Gênero *Alphavirus*

O gênero *Alphavirus* (família *Togaviridae*) é composto por mais de 30 espécies de vírus (CHEN et al., 2018) de importância médica e veterinária, entre os quais estão o Mayaro vírus (MAYV), o chikungunya vírus (CHIKV), o vírus da encefalite equina do leste (EEEV), o vírus da encefalite equina do oeste (WEEV) e o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), sendo todos estes encontrados no Brasil (FORSHEY et al., 2010; GRIFFIN, 2013). Os alfavírus são transmitidos, majoritariamente, por mosquitos hematófagos, e apresentam ampla gama de hospedeiros, que varia entre peixes, aves e mamíferos. Os alfavírus que causam doenças em humanos podem ser divididos entre aqueles que provocam exantema e artralgia, como CHIKV, MAYV e O'nyong-nyong vírus (ONNV), e aqueles responsáveis por causar encefalite, como o VEEV, EEEV e WEEV (BESSAUD et al., 2006; GRIFFIN, 2013; WEAVER; REISEN, 2010).

### 1.2 Estrutura e organização do genoma

O vírion, de aproximadamente 70 nm de diâmetro, é composto por um nucleocapsídeo icosaédrico, constituído da proteína C, que contém uma única molécula de RNA genômico (figura 1). O nucleocapsídeo é envolto por uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro que contém colesterol e esfingolipídios importantes para a penetração e montagem e, em associação com glicoproteínas transmembrana E1 e E2, formam o envelope viral. Pequenas quantidades das proteínas 6K – que funcionam como peptídeo-líder da proteína E1 e intensifica a liberação de partículas virais – e da proteína TF – que aumenta a infectividade das partículas virais e previne a síntese de E1 – também podem ser encontradas no vírion (KUHN, 2013).

As características filogenéticas do MAYV são baseadas em estudos com o gene E1 ou com o genoma completo, e o agrupam no clado do vírus Semliki Forest, sendo que o MAYV apresenta reatividade cruzada com outros vírus desse clado (HASSING et al., 2010). O genoma viral dos alfavírus consiste de uma fita simples de RNA, de polaridade positiva, formado por, aproximadamente, 11,7 kb. Ele apresenta duas janelas de leitura aberta (ORFs) (figura 2[A]), que codificam quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) (figura 2[D]) e seis proteínas estruturais (C, E1, E2, E3, 6K, *transframe* - TF) (figura 2[F]). As proteínas não estruturais são codificadas pelo RNA genômico, enquanto as proteínas estruturais são

codificadas por um RNA subgenômico (figura 2[C]), de polaridade positiva, denominado RNA 26S (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

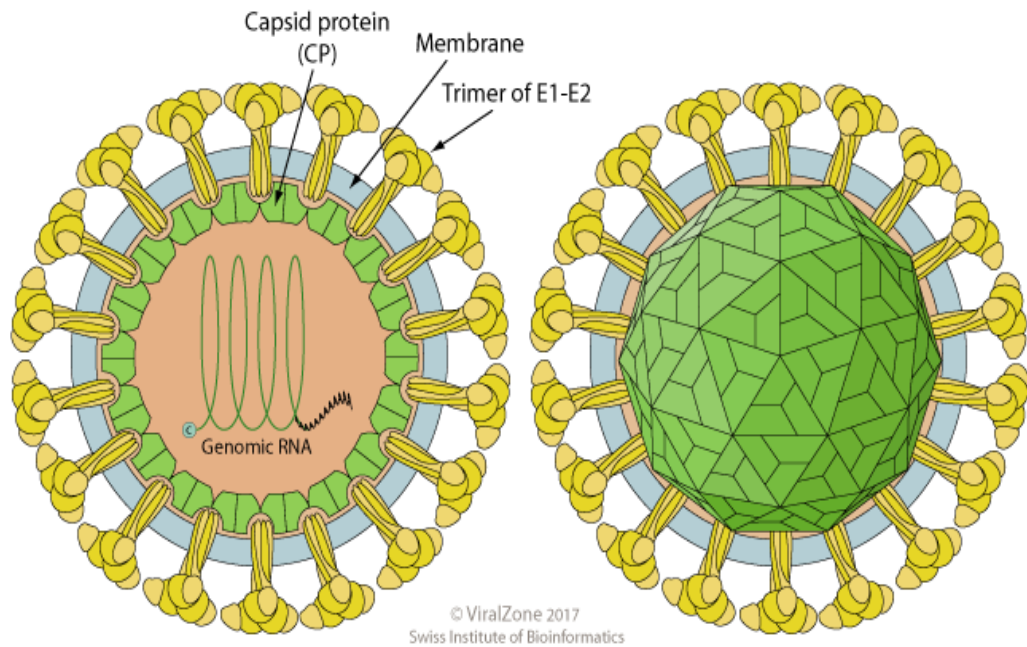


FIGURA 1: ESTRUTURA DO VÍRION DOS ALFAVÍRUS. Esquema demonstrando o genoma do MAYV, as proteínas que formam o nucleocapsídeo, o envelope lipídico viral e os receptores de superfície do vírion. FONTE: VIRALZONE, 2017.

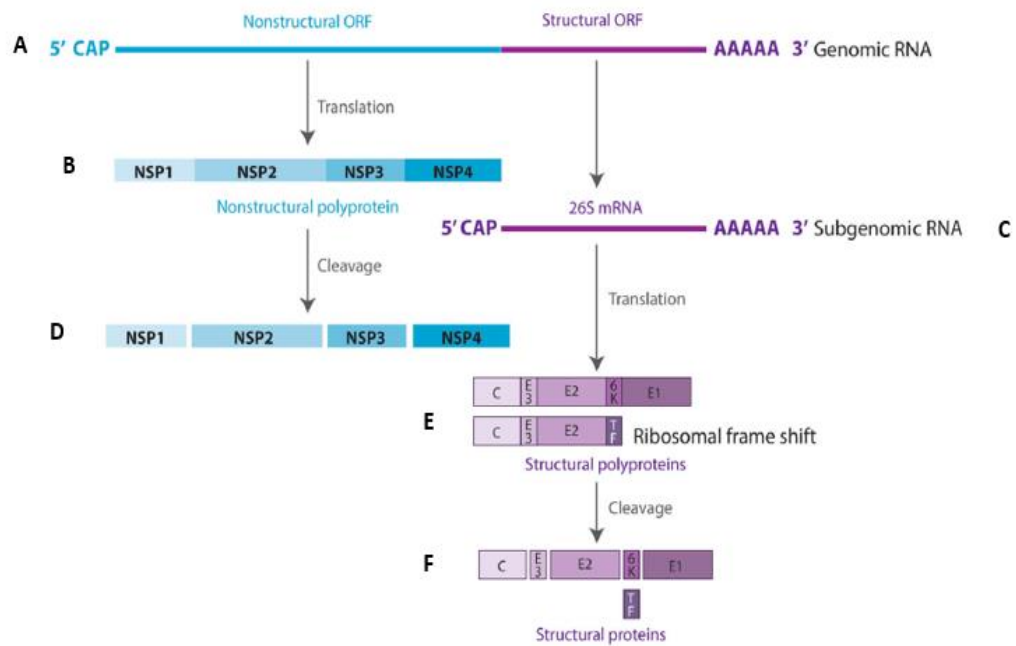


FIGURA 2: ORGANIZAÇÃO DO GENOMA E PROTEÍNAS DOS ALFAVÍRUS. O genoma apresenta duas ORFs que codificam quatro proteínas não estruturais e seis proteínas estruturais. FONTE: adaptado de ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018.

A proteína E1 é responsável pela fusão do envelope viral com o endossomo da célula hospedeira. Essa interação se dá por meio de um peptídeo localizado no domínio hidrofóbico altamente conservado da proteína, que está presente nos membros do gênero *Alphavirus* (BOGGS et al., 1989; OMAR; KOBLET, 1988). A glicoproteína E2 é necessária no processo de ligação entre os ligantes virais e receptores celulares (GAROFF et al., 1980; SMITH et al., 1995), enquanto a proteína E3, mesmo não tendo papel estrutural bem definido, serve de sequência-sinal para a inserção das partes não processadas da poliproteína no retículo endoplasmático. Em seguida, a peptidase sinal do hospedeiro realiza o processamento da poliproteína estrutural (figura 2[E]) (LOBIGS; ZHAO; GAROFF, 1990; MELANCON; GAROFF, 1987).

Acredita-se que a proteína nsP1 esteja envolvida em mecanismos de iniciação e manutenção das fitas de RNA de polaridade negativa intermediárias, durante o processo de replicação do genoma, além de desempenharem também um papel na interação entre o complexo de replicação viral, formado pelas quatro proteínas não estruturais, e as membranas citoplasmáticas. Essa proteína possui atividade de *capping* e metilação de RNAs genômicos e subgenômicos recém-sintetizados (BOURAÏ et al., 2012; SREEJITH et al., 2012).

A proteína nsP2 possui uma região N-terminal com diferentes funções enzimáticas, incluindo a atividade de helicase, e uma região C-terminal que codifica uma protease viral necessária para o processamento da poliproteína não-estrutural (SAISAWANG et al., 2015; VASILJEVA et al., 2001).

As funções da proteína nsP3 ainda não estão bem elucidadas, mas sabe-se que ela apresenta um domínio N-terminal altamente conservado e um domínio C-terminal com grandes variações, que apresenta pouca homologia com outros alfavírus. O domínio N-terminal é necessário para a replicação do RNA viral, cujo intermediário de dupla-fita está presente em associação com a proteína nsP3 durante o ciclo de multiplicação viral (FOY et al., 2013; SHIN et al., 2012).

Acredita-se que a proteína nsP4 atue como um *scaffold* para outras proteínas não estruturais e que seu domínio C-terminal possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA (JONES et al., 2013).

### 1.3 Ciclo de multiplicação viral

O ciclo de multiplicação do MAYV é conhecido a partir de estudos realizados com outros alfavírus. Ele tem início com a adsorção das partículas virais às células hospedeiras (figura 3[1]), o que acontece pela interação entre a proteína E2 do envelope viral e receptores celulares ainda não conhecidos (DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015).

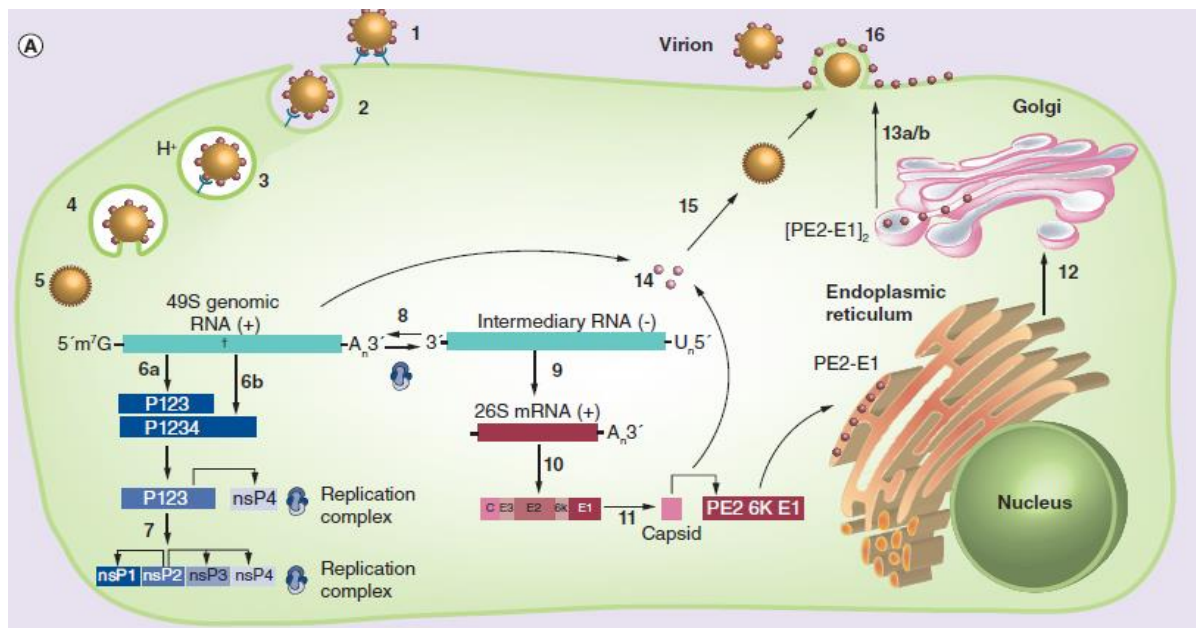


FIGURA 3: CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL DOS ALFAVÍRUS. O ciclo tem início com a adsorção e penetração, por endocitose mediada por clatrina, dos vírions. Depois da liberação e desnudamento do nucleocapsídeo no citoplasma, o genoma viral é replicado e traduzido. Os vírions são liberados por brotamento pela membrana citoplasmática. FONTE: DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015.

Após a adsorção, os vírus penetram na célula por meio de endocitose mediada por clatrina (figura 3[2]). A redução de pH no interior do endossomo causa a dissociação do heterodímero das proteínas E1 e E2, expondo o peptídeo de fusão da proteína E1, que se insere na membrana do endossomo. Este processo, que é dependente de colesterol, leva a uma grande mudança conformacional em E1, o que possibilita a fusão das membranas e subsequente formação de um poro, por onde o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma (figura 3[4]) (KUHN, 2013). Depois de sua liberação no citoplasma, o nucleocapsídeo passa pelo processo de desnudamento (figura 3[5]), que parece ocorrer por meio de interações com ribossomos, promovendo a liberação do genoma viral. Tem início, então, o processo de replicação do genoma viral (MARSH; HELENIUS, 2006).

Em seguida, ocorre a tradução de duas poliproteínas, precursoras de proteínas não estruturais, a partir do genoma. A poliproteína P123 (figura 3[6a]) é mais curta e abundante, enquanto a poliproteína P1234 (figura 3[6b]) é maior, sendo produzida em menores quantidades (KUHN, 2013). A poliproteína P1234 é clivada para produzir P123 e nsP4 (SHIN et al., 2012), que, juntas, formam um complexo de replicação temporário (figura 3[7]) que apresenta certa instabilidade, mas é responsável pela produção de uma fita de RNA de senso negativo intermediário, que, por sua vez, serve de molde para a síntese de RNA genômico e subgenômico (LULLA; LULLA; MERITS, 2012).

Esse complexo se localiza associado a pequenas estruturas vesiculares, denominadas esférulas, que se formam na membrana plasmática. Nelas, ocorre a síntese de RNA dupla-fita intermediário, que fica protegido da degradação e de receptores de reconhecimento de padrões moleculares da célula (SILVA; DERMODY, 2017). À medida em que a infecção avança, as esférulas são internalizadas em grandes vesículas derivadas do endossomo (CPV I), que são direcionadas à periferia do núcleo celular, onde a maturação do CPV I é concluída (SPUUL et al., 2010). O acúmulo de p123 promove, então, o processamento dessa poliproteína em outras proteínas não estruturais, que interagem para formar um complexo de replicação estável, cuja mudança de conformação induz uma afinidade pela fita de polaridade negativa, o que interrompe sua síntese e inicia a produção de RNA genômico e subgenômico (KUHN, 2013).

A tradução do RNA subgenômico (figura 3[10]) leva à síntese de uma poliproteína estrutural, que sofre autoclivagem (figura 3[11]) para liberação da proteína C, seguida de clivagem das proteínas 6K e E1 por sinalases do hospedeiro (SOLIGNAT et al., 2009). A poliproteína restante, chamada pE2, é levada com a glicoproteína E1 para o retículo endoplasmático, por onde acessam o complexo de Golgi (figura 3[12]) e interagem para formar o complexo pE2-E1. Este, por sua vez, é transportado em vesículas secretórias em direção à membrana plasmática (figura 3[13]) e, ao final do processo, pE2 sofre clivagem, originando E2 e E3, no interior de vesículas trans-Golgi (GAROFF; SJÖBERG; CHENG, 2004). A formação do CPV II, que contém glicoproteínas E1 e E2, além de nucleocapsídeos, em seu interior, permite o transporte dessas proteínas pelo complexo de Golgi até a membrana plasmática (JOSE; TAYLOR; KUHN, 2017; MENDONÇA et al., 2023).

A montagem dos vírions ocorre pela interação da proteína C com ribossomos e com o RNA genômico (figura 3[14]), o que promove o acúmulo de partículas constituídas desses componentes no citoplasma da célula. Então, glicoproteínas do envelope associadas à membrana são recrutadas e glicosiladas durante seu transporte entre o citoplasma e a membrana

plasmática (figura 3[15]). Essas glicoproteínas, ao se ligarem aos nucleocapsídeos, auxiliam na fusão entre membranas e no posterior brotamento (figura 3[16]) dos vírions nascentes (GAROFF; SJÖBERG; CHENG, 2004).

#### 1.4 Patogênese da febre do Mayaro

As arboviroses (doenças causadas por vírus transmitidos por vetores artrópodes) são doenças que apresentam manifestações clínicas semelhantes entre diferentes arbovírus (PANIZ-MONDOLFI et al., 2016). O MAYV faz parte de um grupo de alfavírus conhecidos como artritogênicos, que são responsáveis por causar uma doença aguda caracterizada por artrite, artralgia, febre, exantema, dores de cabeça e musculares (MEJÍA; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018). Em humanos, os principais sinais clínicos de infecção por MAYV em humanos incluem, também, calafrios, dor nos olhos e manifestações gastrointestinais, e são muito semelhantes ao que pode ser observado em outras arboviroses, como febre chikungunya e dengue (AGUILAR-LUIS et al., 2020; MOURÃO et al., 2012), o que causa dificuldades no diagnóstico e aumenta as chances de possíveis erros. O vírus também pode causar complicações severas, como miocardite, hemorragias e problemas neurológicos (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018). Os sinais clínicos podem ser observados de três a 10 dias pós-infecção, com um período de viremia curto, que varia entre quatro e sete dias. O mais prevalente entre eles é a artrite, cuja duração pode ser de dias, meses e até anos (ASSUNÇÃO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; DA POIAN, 2013).

A literatura sobre patogênese do MAYV em PNH é escassa, sendo prevalentes os trabalhos que descrevem o curso da infecção em humanos. O MAYV infecta o hospedeiro pelo repasto sanguíneo de um mosquito infectado (TESH et al., 1999). Ocorre, então, a multiplicação viral no local da inoculação, o que estimula o recrutamento de monócitos e consequente infecção deles pelos vírus (DIAGNE et al., 2020). Por meio dos monócitos infectados e via sistema linfático, o MAYV acessa a corrente sanguínea, por onde alcança os principais sítios de multiplicação, nos quais ocorre a produção consistente e profusa de partículas virais. A partir deles, o vírus se dissemina para articulações, músculos e ossos (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012). Estudos anteriores apontaram que a infecção por MAYV induz a produção TNF- $\alpha$  em macrófagos que, associada a um aumento de espécies reativas de oxigênio em células humanas e murinas na fase aguda de multiplicação viral, parece causar um quadro inflamatório característico de artrite (CAMINI et al., 2017; CAVALHEIRO et al., 2016). Em estudos

realizados em PNH para avaliar a infecção por CHIKV, foram observadas três fases de infecção, nas quais houve sinais clínicos como febre, exantema, linfopenia (baixo nível de linfócitos no sangue), monocitopenia (redução da contagem de monócitos no sangue) e granulocitose (quantidade anormalmente elevada de granulócitos no sangue ou nos tecidos), bem como a persistência do CHIKV em macrófagos, órgãos linfoides e no fígado (HIGGS; ZIEGLER, 2010).

Até então, não foram reportados óbitos em humanos causados pela febre do Mayaro e, apesar de a doença apresentar manifestações clínicas geralmente mais leves que outras arboviroses, o MAYV tem potencial de causar efeitos prejudiciais e duradouros à saúde humana, como a artralgia que, quando presente, pode durar meses, causando impactos tanto na saúde do indivíduo, quanto no coletivo, por aumentar a procura por serviços médicos e reduzir a produtividade no trabalho (THEILACKER et al., 2013).

#### 1.6 Ciclo de Transmissão

Os alfavírus são transmitidos por vetores artrópodes, geralmente insetos, que se infectam ao fazer o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados, tornando-se capazes de transmitir as partículas virais a outro hospedeiro num período de quatro a dez dias. Sendo assim, é importante que os hospedeiros vertebrados apresentem viremia suficiente para promover a infecção dos vetores, de modo a manter o ciclo de transmissão entre vetores e hospedeiros (GRIFFIN, 2013).

A transmissão do MAYV (figura 4) envolve mosquitos hematófagos do gênero *Haemagogus* sp., principalmente *Haemagogus janthinomys*, e hospedeiros vertebrados, incluindo PNH, que são infectados em ambiente silvestre. Os mosquitos são infectados ao fazer repasto sanguíneo, podendo transmitir o vírus a novos hospedeiros (DE THOISY et al., 2003; PERALTA; MONTGOMERY; SEYMOUR, 1983). Em mosquitos, também já foi demonstrada a possibilidade de transmissão vertical (da fêmea para a prole) do MAYV (MAIA et al., 2019). Acredita-se que o ser humano é infectado ao entrar em contato com áreas de mata, onde os vetores estão presentes, num fenômeno conhecido como *spillover* (ABAD-FRANCH et al., 2012; WEAVER; REISEN, 2010). Apesar de não haver descrição de ocorrência de um ciclo urbano do MAYV, uma vez que os vetores artrópodes descritos para o vírus são encontrados apenas em ambientes silvestres, e que não foi demonstrada a participação de vetores urbanos naturalmente infectados na transmissão do MAYV (DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015;

LEDUC et al., 1981; TESH et al., 1999), surtos recentes de febre do Mayaro foram registrados em grandes centros urbanos no Norte e Centro-Oeste do país (DA COSTA et al., 2017; DE PAULA SILVEIRA-LACERDA et al., 2021; DOS SANTOS SOUZA MARINHO et al., 2022; ZUCHI et al., 2014).

Além disso, estudos anteriores demonstraram, em laboratório, a competência de mosquitos experimentalmente infectados do gênero *Aedes* sp., altamente antropofílicos (vivem próximo ao ser humano) e adaptados ao ambiente urbano, de transmitirem o MAYV (LONG et al., 2011), o que também foi observado em mosquitos do gênero *Anopheles* spp. (BRUSTOLIN et al., 2018). Isso constitui um cenário preocupante quanto à possibilidade de ocorrência de surtos de febre do Mayaro em áreas urbanas, além do possível estabelecimento de um ciclo de transmissão urbana do vírus. A crescente degradação ambiental também é causa de preocupação, pois as mudanças cada vez maiores em ambientes silvestres provocam a aproximação entre vetores hematofagos, originalmente sem hábitos antropofílicos, com o ser humano, o que pode se tornar outro fator que contribui com o maior risco de emergência de novas doenças, entre elas a febre do Mayaro, em áreas densamente povoadas (EL-SAYED; KAMEL, 2020).

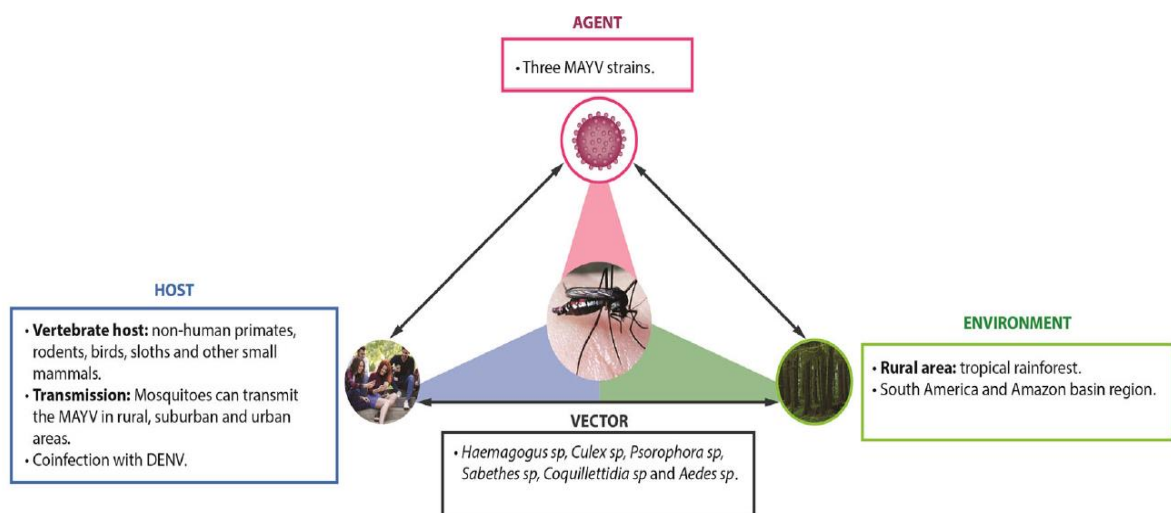


FIGURA 4: DINÂMICA DE TRANSMISSÃO DO MAYV. A transmissão das diferentes linhagens de MAYV ocorre, principalmente, na região amazônica, mas acomete também outras partes da América do Sul. A presença de hospedeiros vertebrados e de mosquitos hematofagos antropofílicos, como *Aedes* spp., capazes de transmitir o vírus experimentalmente, em áreas urbanas, constitui um potencial problema de saúde pública. FONTE: ACOSTA-AMPUDIA et al, 2018.

### 1.7 Primatas não humanos: características e papel como hospedeiros de arbovírus

Os animais pertencentes ao grupo taxonômico Platyrrhini, conhecidos como primatas do Novo Mundo ou neotropicais, são PNH endêmicos das Américas Central e do Sul. Nesse grupo, estão inseridas as famílias Atelidae, Aotidae, Callitrichidae, Cebidae e Pitheciidae, cujos membros podem ser encontrados em diferentes áreas do território brasileiro (PAGLIA et al., 2012). Indivíduos das famílias Atelidae, Callitrichidae e Cebidae podem ser encontrados mesmo em áreas urbanas densamente povoadas e, por serem potenciais hospedeiros de diferentes arbovírus, esses animais são utilizados como ferramentas de vigilância epidemiológica, contribuindo com o monitoramento da circulação desses vírus e com o controle de epidemias (BICCA-MARQUES; DE FREITAS, 2010; KUNO et al., 2017).



FIGURA 5: PRIMATAS DO NOVO MUNDO. As imagens ilustram representantes das famílias Aotidae (macaco-coruja), Atelidae (bugio), Callitrichidae (sagui) e Cebidae (macaco-prego). FONTE: adaptado de DUNN; CRISTÓBAL-AZKARATE, 2016.

Os PNH neotropicais que habitam as matas brasileiras são animais de hábitos diurnos e majoritariamente arborícolas, havendo grande variação no tamanho, peso e comportamento de cada espécie (DUNN; CRISTÓBAL-AZKARATE, 2016). Essas características os tornam susceptíveis a mosquitos hematófagos, como *Haemagogus* sp. (BICCA-MARQUES; DE FREITAS, 2010; DE ABREU et al., 2019). Os PNH estão envolvidos nos ciclos de transmissão de diferentes arbovírus, atuando como hospedeiros. Entre eles, estão o vírus da dengue, o vírus da Zika e o YFV, membros do gênero *Flavivirus*, que apresentam PNH como hospedeiros em seus ciclos de transmissão silvestre na Ásia, África e Brasil, respectivamente (VALENTINE; MURDOCK; KELLY, 2019; WEAVER et al., 2018). O CHIKV, que é um alfavírus, assim como o MAYV, também se mantém num ciclo de transmissão silvestre no continente africano

ao infectar PNH (WEAVER; LECUIT, 2015). Esses vírus são ameaças à saúde pública no Brasil, uma vez que eles circulam no país em áreas onde há ocorrência de PNH vivendo próximo a populações humanas, podendo se multiplicar nesses animais e causar surtos de doenças graves em pessoas por meio de eventos de *spillover* (FIGUEIREDO, 2007; GUBLER, 2002).

Os PNH são encontrados, majoritariamente, em ambiente silvestre. Porém, alguns gêneros apresentam a capacidade de sobreviver em ambientes altamente urbanizados (BICCA-MARQUES; DE FREITAS, 2010; DUARTE; GOULART; YOUNG, 2012). Isso os torna objetos de estudo de interesse para a saúde pública (MACKAY; ARDEN, 2016), uma vez que patógenos emergentes são, em sua maioria, parasitas de animais silvestres que, ao infectarem seres humanos a partir do contato com esses animais, provocam doenças que podem ocasionar cenários preocupantes, como epidemias (JONES et al., 2008). No caso dos PNH, que são evolutivamente mais proximamente relacionados ao ser humano que a outros animais, as chances de ocorrer *spillover* de patógenos, como os arbovírus, de PNH infectados para pessoas é ainda maior, dadas as semelhanças fisiológicas entre ambos os grupos (WOLFE et al., 1998).

Trabalhos anteriores revelaram a presença de anticorpos contra MAYV em PNH capturados em áreas de mata próximas a centros urbanos (BATISTA et al., 2012, 2013). Considerando que esses animais são considerados os principais hospedeiros do vírus, esses estudos demonstram a ocorrência de infecção natural por MAYV em PNH no Brasil (DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015; FREITAS et al., 1981). Considerando a possibilidade de infecção de PNH, incluindo espécies encontradas em áreas urbanas, e o potencial de transmissão do MAYV por mosquitos hematófagos antropofílicos, são necessários mais estudos sobre a circulação do vírus nessas populações animais, de modo continuado, para que seja possível avaliar o risco de emergência do MAYV em cidades do país.

No caso da vigilância epidemiológica em PNH, os mesmos métodos sorológicos são utilizados, sendo necessário realizar a captura e coleta de sangue desses animais (BATISTA et al., 2012, 2013). Porém, não é possível coletar o sangue de animais encontrados mortos, o que prejudica tanto a realização de ensaios sorológicos, quanto a detecção por métodos moleculares, considerando a rápida degradação de moléculas de RNA em cadáveres (SAMPAIO-SILVA et al., 2013). Considerando que, muitas vezes, a vigilância é feita com amostras provenientes de animais mortos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005), é importante que haja métodos alternativos que possibilitem a detecção do MAYV e outros arbovírus nessas amostras.

## 1.8 Epidemiologia

O MAYV foi isolado pela primeira vez em 1954, em amostras de sangue de quatro homens que trabalhavam em área de mata e de uma mulher que residia em área urbana no condado de Mayaro, em Trinidad e Tobago (ANDERSON et al., 1957). Entretanto, houve detecção de anticorpos para o vírus em amostras de soro obtidas de pessoas que trabalharam na construção do Canal do Panamá, entre 1904 e 1914 (SRIHONGSE; STACY; GAULD, 1973).

Desde a primeira descrição de um caso de infecção por MAYV, diversos casos foram reportados, em diferentes países, ao longo do continente americano, o que aponta para a capacidade de disseminação do MAYV e seu potencial como patógeno reemergente (GANJIAN; RIVIERE-CINNAMOND, 2020). Entre os casos confirmados de infecção pelo vírus em humanos, estão 24 registrados na Bolívia, entre os anos de 2000 e 2007 (FORSHEY et al., 2010); um no Equador, entre 2000 e 2007, e cinco em 2019 (FORSHEY et al., 2010; PAHO; WHO, 2019); 14 na Guiana Francesa (PAHO; WHO, 2019; TALARMIN et al., 1998), cinco no Haiti entre 2014 e 2015 (BLOHM et al., 2019; LEDNICKY et al., 2016), dois no México em 2001 (NAVARRETE-ESPINOSA; GÓMEZ-DANTÉS, 2006), um no Panamá (SRIHONGSE; STACY; GAULD, 1973) e 23 casos na Venezuela (AUGUSTE et al., 2015; TORRES et al., 2004).

O Brasil apresenta o maior número de casos registrados de infecção por MAYV em humanos nas Américas (figura 6), tendo sido identificados diversos casos nas regiões Norte e Centro-Oeste (DA COSTA et al., 2017; DE CURCIO et al., 2022; DE PAULA SILVEIRA-LACERDA et al., 2021; DOS SANTOS SOUZA MARINHO et al., 2022; ESPOSITO; FONSECA, 2017). O primeiro caso de infecção por MAYV no país foi descrito em 1955, no estado do Pará, quando seis linhagens do vírus foram isoladas do soro de seis pacientes, sendo descrito, pela primeira vez, o genótipo L (do inglês, *limited*), comumente identificado no norte do Brasil (BLOHM et al., 2019; CAUSEY; MAROJA, 1957; ESPOSITO; FONSECA, 2017). Neste estudo, também foram testadas, por sorologia, amostras provenientes de pacientes residentes da mesma área para detecção de anticorpos neutralizantes contra o Semliki Forest virus (SFV). O SFV é um alfavírus restrito ao continente africano, mas que pode apresentar reação cruzada com o MAYV devido ao fato de esses vírus serem proximamente relacionados (ESPOSITO; FONSECA, 2017; HASSING et al., 2010). Das amostras testadas, 18,9% foram positivas, sendo estas consideradas casos de infecção por MAYV devido ao desconhecimento da circulação do SFV no país (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; CAUSEY et al., 1957).

No final da década de 1970, na cidade de Belterra, também no estado do Pará, houve um surto de febre do Mayaro em que se constatou, por testes sorológicos, que aproximadamente 20% da população local foi acometida, sendo possível observar, inclusive, grande proporção de casos de infecção sintomática (LEDUC et al., 1981). Depois de sua introdução no Brasil, o MAYV se tornou endêmico na região amazônica, circulando entre vetores e hospedeiros silvestres, e causando surtos esporádicos em populações humanas locais, havendo também a ocorrência de casos em humanos fora da região (ESPOSITO; FONSECA, 2017).

Nos últimos anos, casos de infecção por MAYV vêm sendo confirmados nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil. Em 2008, ocorreu um surto de febre do Mayaro no estado do Pará em que foram confirmados, por sorologia, 36 casos humanos (AZEVEDO et al., 2009). No mesmo período, entre 2007 e 2008, houve confirmação, por sorologia e reação em cadeia da polimerase (PCR), de 33 casos de infecção por MAYV em pacientes na cidade de Manaus, durante um surto de doença febril aguda (MOURÃO et al., 2012). Em um surto de dengue ocorrido entre 2011 e 2012 no estado de Mato Grosso, 604 amostras de pacientes que apresentavam sinais clínicos de doença febril aguda foram submetidas a reações de PCR para detecção de alfavírus. Do total, 15 amostras foram positivas para a detecção do genoma do MAYV (ZUCHI et al., 2014). Recentemente, entre os anos de 2017 e 2022, outros estudos confirmaram a presença do genoma do vírus em mosquitos *Aedes aegypti* (DE CURCIO et al., 2022), por meio de testes moleculares, e em amostras obtidas de pacientes que apresentavam sintomatologia suspeita, por meio de testes moleculares e sorológicos (DA COSTA et al., 2017; DE PAULA SILVEIRA-LACERDA et al., 2021; DOS SANTOS SOUZA MARINHO et al., 2022) nas regiões Norte e Centro-Oeste.

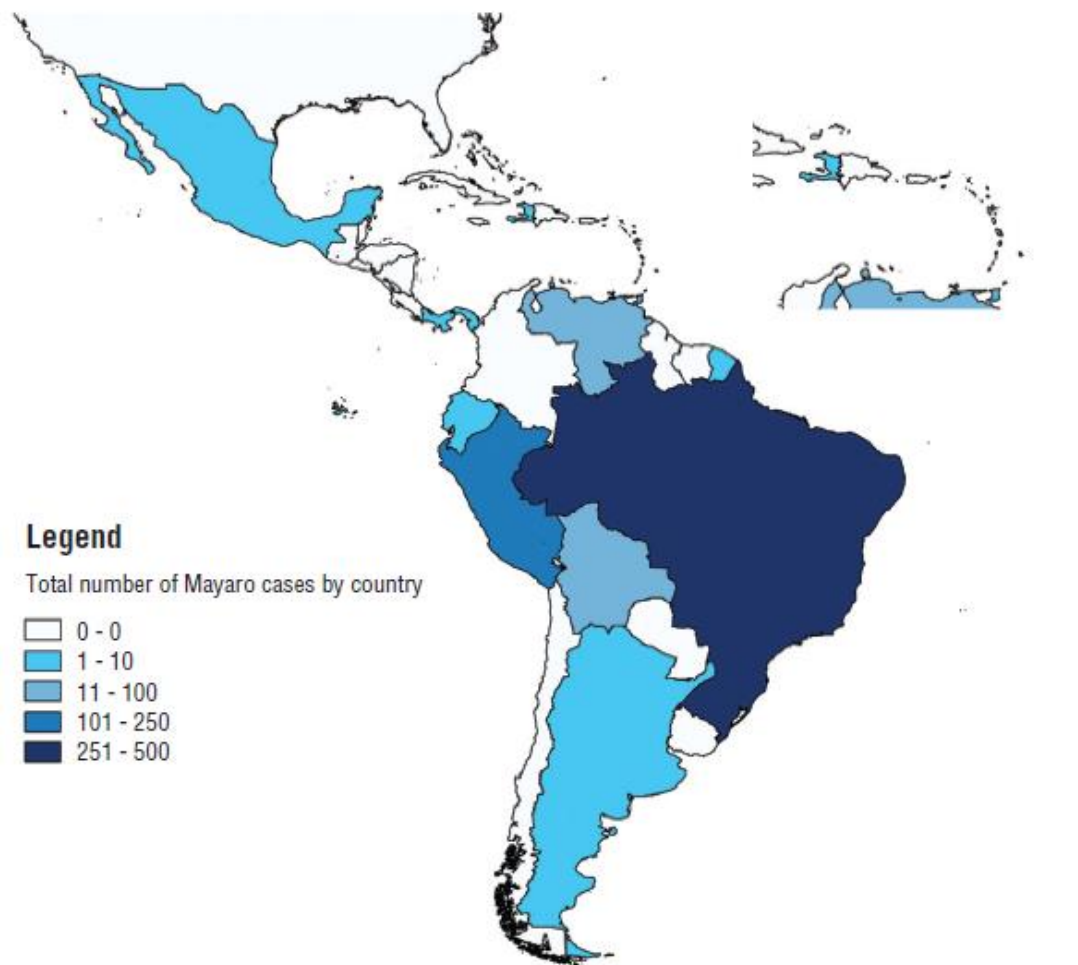


FIGURA 6: DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE DETECÇÃO DO MAYV NA AMÉRICA LATINA. O mapa indica os países da América Latina em que houve detecção de MAYV, de 1954 a 2019. Foram considerados apenas casos autóctones. FONTE: GANJIAN; CINNAMOND, 2020.

### 1.9 Ensaio para detecção de infecção por MAYV

A detecção do MAYV pode ser feita por meio de PCR e ensaios sorológicos, como PRNT, inibição da hemaglutinação e ELISA (DIAGNE et al., 2020; LEDUC et al., 1981; NAVECA et al., 2017). Para a realização de ensaios sorológicos, é necessário que haja amostras de soro disponíveis, uma vez que esses testes foram padronizados com a utilização desse material (BEWLEY et al., 2021; RUSSELL et al., 1967). A realização de isolamento viral, apesar de ser o método mais eficiente de detecção, é dificultada no caso do MAYV devido à viremia curta (AZEVEDO et al., 2009; DIAGNE et al., 2020), o que também constitui um empecilho para a detecção por PCR.

No caso do MAYV, é necessário que sejam feitos esforços no sentido de estimular os trabalhos de investigação molecular e sorológica do vírus no Brasil, uma vez que são escassas as informações providas por órgãos públicos de saúde sobre o MAYV, além de também haver menos trabalhos publicados sobre ele, quando comparado a outros vírus (DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023a). Como forma de aprimorar a vigilância epidemiológica do MAYV, que atualmente é feita por meio da coleta de soro de pacientes e de animais (BATISTA et al., 2012, 2013; BRUNINI et al., 2017; DOS SANTOS SOUZA MARINHO et al., 2022), seria interessante a utilização de amostras de órgãos provenientes de carcaças, o que já é feito na vigilância do YFV (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Entretanto, devido à impossibilidade de coletar soro de carcaças, seria preciso que outros tipos de amostra fossem utilizados. Estudos prévios (GAMBLE; PATRASCU, 1996) tiveram êxito na realização de ensaios imunoenzimáticos com a utilização de amostras de tecido maceradas, o que aponta para a possibilidade de uso desse tipo de material.

Antes da realização desse projeto, a Dra. Natalia da Silva executou, durante seu doutorado, ensaios de neutralização preliminares que visavam a determinar a viabilidade, *a priori*, do uso de amostras de fígado de PNH maceradas em substituição a amostras de soro nesses experimentos. Para isso, foram selecionados animais PCR-positivos para YFV. Paralelamente, também foi utilizado um teste rápido de detecção de IgM (EcoDiagnóstica, Brasil). Os resultados observados por ela apontaram para a viabilidade do uso de macerados de fígado, além de ter sido observada uma possível neutralização de uma das amostras no ensaio de neutralização, sendo que a mesma amostra também apresentou resultado IgM positivo no teste rápido.

Sendo assim, amostras de fígado de animais experimentais (descrito em detalhe na seção Anexos) foram utilizadas em ensaios de citotoxicidade para confirmação da viabilidade do uso desse tipo de material em testes de neutralização. Para tal, o Dr. Erik Reis, durante o desenvolvimento de suas atividades de pós-doutorado, preparou e inoculou diferentes diluições de amostras de fígado macerado em placas contendo células Vero (ATCC, EUA), seguido do uso de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO) e espectrofotômetro para leitura do resultado. Os resultados obtidos demonstraram que houve viabilidade celular superior a 80% na menor diluição utilizada (1:20), com aumento progressivo de viabilidade, alcançando 100% na maior diluição (1:640).

Considerando os resultados obtidos anteriormente, a utilização de amostras de fígado provenientes de carcaças em testes sorológicos mostra-se viável, o que possibilita a adaptação de ensaios de neutralização viral para padronizar o uso desse tipo de material.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A crescente degradação ambiental, impulsionada pelo uso da terra para cultivo de plantações e criação de gado, e o aumento da urbanização expõem populações humanas a patógenos, vetores e hospedeiros presentes em áreas de mata. Isso é causado pela escassez de recursos, que força a aproximação entre animais silvestres, em busca de alimento e abrigo, e ambientes rurais e urbanos. No caso de viroses reemergentes, como a febre do Mayaro, existem fatores preocupantes, como a presença de mosquitos hematófagos com potencial de se tornarem vetores urbanos do MAYV, e também a cocirculação de outros arbovírus. O fato de a febre do Mayaro provocar, muitas vezes, um quadro clínico semelhante a outras arboviroses, pode mascarar a circulação deste e de outros vírus emergentes, causando um problema de saúde pública ao dificultar a correta identificação do patógeno e, portanto, o correto manejo clínico e epidemiológico de eventuais surtos.

O MAYV compartilha vetores e hospedeiros com outros arbovírus, como o yellow fever virus (YFV) e o chikungunya virus (CHIKV), além de circular em áreas sobrepostas às aquelas em que comumente ocorre detecção deles. Além disso, a depender da gravidade da doença causada por esses vírus, sinais clínicos semelhantes podem ser observados. Desse modo, existe a possibilidade de circulação concomitante do MAYV e de outros arbovírus nas mesmas áreas, por meio dos mesmos vetores e afetando os mesmos hospedeiros, causando surtos de doenças clinicamente semelhantes, em certos casos. Ademais, esses fatores dificultam a detecção do MAYV, que pode ser confundido e tratado como outra arbovirose, o que oculta, acidentalmente, dados epidemiológicos importantes para a vigilância do vírus no país.

Esse cenário, somado à quantidade limitada de trabalhos que investigam a dinâmica de circulação do MAYV no Brasil, aponta para a necessidade de melhor elucidar as lacunas do conhecimento sobre a epidemiologia do vírus, de modo a fornecer ferramentas que viabilizem a vigilância epidemiológica e a prevenção e controle de possíveis epidemias futuras. Sendo assim, esse trabalho se propõe a: (1) investigar a presença do genoma viral, por meio de testes moleculares, que indiquem infecção por MAYV em amostras de PNH obtidas durante o período de 2017 a 2020, no estado de Minas Gerais; (2) otimizar um teste de neutralização viral, baseado

na técnica clássica de PRNT, com utilização de amostras de fígado ao invés de soro. Isso foi feito para que se obtivesse uma técnica sorológica de diagnóstico para complementar o uso da PCR, para auxiliar na confirmação de infecção em carcaças de animais, das quais não é possível obter amostras de soro. Com isso, visamos a dar suporte a estudos paralelos que buscam entender a dinâmica de circulação, epidemiologia, diversidade e evolução do YFV na região, baseando-se na hipótese de que diferentes arbovírus podem ter circulado concomitantemente, pela ação de mosquitos vetores, nas áreas acometidas pelo recente surto de febre amarela no estado.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar a circulação de MAYV em PNH no estado de Minas Gerais e padronizar um ensaio de neutralização viral que possibilite a utilização de amostras provenientes de carcaças em substituição a amostras de soro.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Realizar a investigação molecular da presença do genoma de MAYV em amostras de fígado de PNH coletadas em Minas Gerais, de 2017 a 2020, por RT-qPCR.

Otimizar um ensaio de neutralização viral para utilização de amostras de fígado, substituindo amostras de soro, para investigação de anticorpos neutralizantes anti-MAYV em animais experimentais.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido seguindo o seguinte fluxograma de trabalho (figura 7):

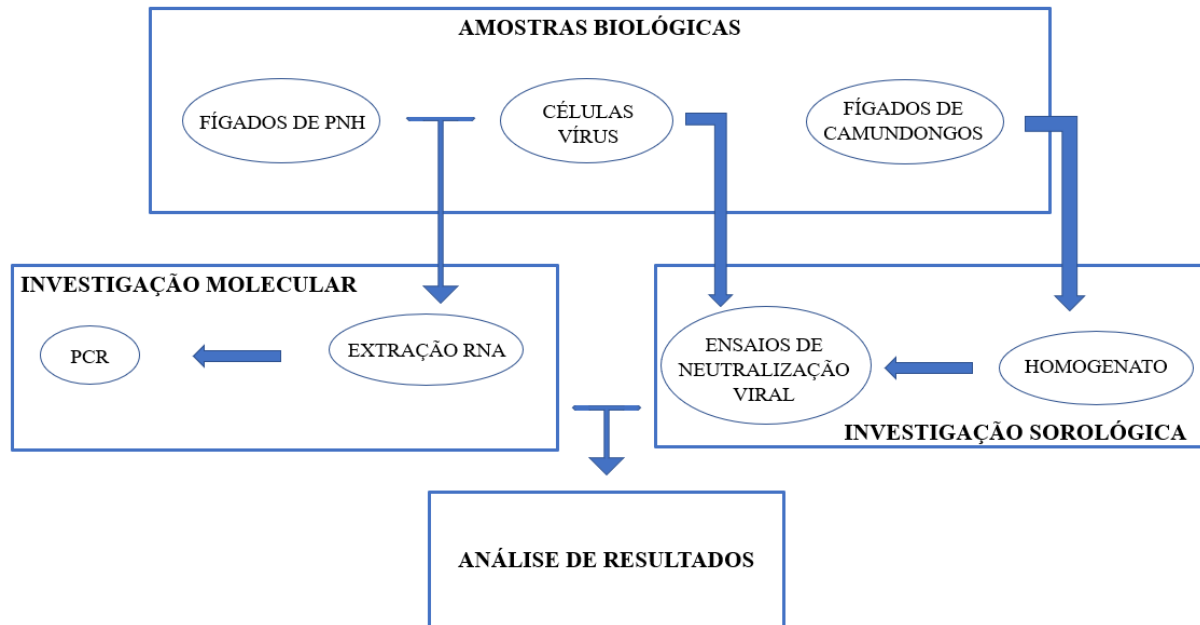


FIGURA 7: Fluxograma de trabalho.

##### 4.1 Amostras biológicas

As amostras biológicas dos PNH utilizadas neste trabalho foram obtidas do Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOOM). Carcaças de PNH foram coletadas durante vigilância de febre amarela no estado de Minas Gerais (MG), sem que fossem estabelecidos critérios que determinassem a representação de diferentes grupos ou espécies (amostragem de conveniência). No total, amostras de fígado de 732 PNH dos gêneros *Alouatta* sp. (n=53), *Callicebus* sp. (n=41), *Sapajus* sp. (n=4) e *Callithrix* sp. (n=540), provenientes de áreas rurais (n=182) e urbanas (n=456) de cada uma das 12 mesorregiões do estado (Norte de Minas, Noroeste de Minas, Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Vale do Rio Doce, Central Mineira, Metropolitana de Belo Horizonte, Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Oeste de Minas, Zona da Mata, Campo das Vertentes, Sul e Sudoeste de Minas), foram recebidas entre 2017 e 2021. Alguns animais não tiveram o gênero/espécie determinado (n=94). As carcaças foram classificadas pelo estado de conservação, sendo divididos em bom (n=492), intermediário (n=147) e ruim (n=93), a depender do estágio de decomposição, que foi determinado levando em consideração fatores como o aspecto (brilhoso ou opaco), cor, cheiro, consistência e presença de parasitas nas carcaças (SACCHETTO et al., 2020). As amostras de fígado foram

armazenadas em microtubos com e sem RNA *later*<sup>TM</sup> *Stabilization Solution* (Invitrogen, EUA) - solução que preserva as moléculas de RNA presentes na amostra. Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Vírus (nível de biossegurança 2) da UFMG, onde foram armazenadas a -70°C. O total (n=732) de amostras foi utilizado nesse trabalho para investigação da presença do genoma de MAYV (tabela 1).

Tabela 1: Primatas não humanos testados por RT-qPCR para detecção do genoma de MAYV

Ano	Espécie/gênero	Área de procedência			TOTAL
		Urbana	Rural	Sem informação	
2017	<i>Callithrix</i> sp.				276
	<i>Callicebus</i> sp.	195	78	3	
	<i>Alouatta</i> sp.				
	<i>Sapajus</i> sp.				
2018	<i>Callithrix</i> sp.				291
	<i>Callicebus</i> sp.	164	75	52	
	<i>Alouatta</i> sp.				
2019	<i>Callithrix</i> sp.				125
	<i>Callicebus</i> sp.	68	19	38	
2020	<i>Callithrix</i> sp.				40
	<i>Callicebus</i> sp.	29	10	1	
	<i>Alouatta</i> sp.				
<b>TOTAL</b>		456	182	94	<b>732</b>

As amostras, preservadas em RNA *later*<sup>TM</sup> *Stabilization Solution*, são oriundas de animais dos gêneros *Alouatta*, *Callicebus*, *Sapajus* e *Callithrix*.

Esta parte do projeto foi submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) e aprovada para recebimento e armazenamento de amostras biológicas de PNH (protocolo CEUA: 98/2017), conforme

determina a Lei 11.794/2008 e o Decreto 6.899/2009 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Anexo B).

#### 4.1.2 Cultivo de células Vero

Neste trabalho, foram utilizadas células Vero CCL81 (ATCC/EUA), que são uma linhagem celular contínua, oriundas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). As células foram usadas para a produção de estoques virais, titulações de amostras de vírus e realização de testes de neutralização baseados na técnica clássica de neutralização viral por redução de placas. As células foram mantidas em meio MEM (Meio essencial mínimo Eagle – Cultiab, Brasil) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB – Cultiab, Brasil) suplementado com bicarbonato, 1% de glutamina (2 mM) e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 2 µg/mL de anfotericina B), e incubadas em estufa para cultivo de células a uma temperatura de 37°C e a uma concentração de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (FRESHNEY, 2010).

#### 4.1.3 Amostras de vírus

Amostras de isolados de MAYV (BeAr20290; genótipo L), gentilmente cedidas pelo Dr. Maurício Lacerda Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo) foram utilizadas neste estudo para infectar células Vero, com diferentes objetivos. Entre eles, estão: obter controles positivos, a partir do sobrenadante, para utilização em PCR e produzir vírus (*pools* semente e trabalho) para utilização na infecção de animais experimentais e na realização de testes de neutralização. Os estoques virais foram produzidos e titulados de acordo com metodologia descrita anteriormente (BAER; KEHN-HALL, 2014), e o título viral obtido foi de  $5,4 \times 10^7$  PFU/mL. A amostra de vírus utilizada nesse trabalho foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código de cadastro A144135.

#### 4.1.4 Amostras de fígado de animais experimentais

Para a realização dos ensaios de neutralização foram usadas amostras de fígado de camundongos C57BL/6 anteriormente infectados com  $2 \times 10^5$  unidades formadoras de placas

(PFU) de MAYV (seis animais), ou inoculados com sobrenadante de células Vero não infectadas (*mock* – seis animais), por via intraplantar. Após a infecção, os animais foram observados por 21 dias, quando foram eutanasiados e os fígados foram coletados e armazenados em microtubos de 1,5 mL, a -20°C. A manutenção e infecção dos animais foi executada em colaboração com o Dr. Erik Reis e a aluna de mestrado Thaís Costa. Além disso, foram obtidas amostras de animais que haviam sido submetidos a punção cardíaca para extração de sangue, em estudo anterior ao presente trabalho. O soro obtido de animais infectados foi utilizado como controle positivo, e as amostras de fígado foram armazenadas para posterior utilização em ensaios de neutralização para determinar a presença ou ausência de anticorpos. A metodologia completa pode ser encontrada na seção Anexos (Anexo A).

Esta parte do projeto foi submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) e aprovada para utilização de animais em experimentação (protocolos CEUA: 33/2021; 176/2021), conforme determina a Lei 11.794/2008 e o Decreto 6.899/2009 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### 4.2 Investigação molecular da infecção por MAYV

Para investigar a presença do genoma viral do MAYV nas amostras de fígado, inicialmente realizou-se extração de RNA total. O RNA viral foi obtido a partir de fragmentos de fígado (20 a 30 mg) que foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL contendo 600 µL de tampão de lise (Buffer RLT – QIAGEN, EUA) e quatro esferas (*beads*) de borossilicato de 2 mm cada (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os microtubos foram, então, colocados em um batedor de *beads* (Mini-Beadbeater-16, BioSpec Products, EUA) para maceração das amostras. Os macerados obtidos foram utilizados para extração de RNA total seguindo o protocolo do kit de extração de ácidos nucleicos (*Purification of Total RNA from Animal Tissues, RNeasy® Mini Handbook, 4th edition, 2012*) de acordo com a recomendação do fabricante (RNeasy® Mini Kit, QIAGEN, EUA). Ao final do processo, o RNA total foi eluído com 65 µL de *RNase-free water* provida pelo fabricante, e o eluato obtido foi armazenado em ultrafreezers a -70°C. Todas as etapas de extrações foram realizadas utilizando-se um controle negativo, que consiste da realização do processo de extração sem utilizar amostra, para garantir que não haja contaminação cruzada durante a extração.

As amostras de RNA total foram submetidas a PCR em tempo real (RT-PCR) *one step*. A reação *one step* envolve o uso de transcriptase reversa para síntese de cDNA a partir de RNA em uma única etapa. Os testes foram realizados em duplicata, em aparelho StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, EUA), utilizando o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (Promega, EUA). Para determinar se houve êxito na extração de RNA total, foram realizadas reações de RT-PCR utilizando iniciadores específicos para amplificar parte do gene que codifica a proteína  $\beta$ -actina (REZENDE et al., 2019) (tabela 2), uma proteína altamente conservada nos hospedeiros, que estão envolvidas na motilidade, estrutura e integridade celular.

Nesse trabalho, foram extraídas e testadas, por RT-qPCR, 732 amostras de fígado de PNH. Aquelas que apresentaram temperatura de melting ( $T_m$ ) diferente do esperado ( $T_m=82^\circ\text{C}\pm 1$ ) para o fragmento do gene de  $\beta$ -actina foram testadas novamente por RT-PCR. Em caso de nova divergência de  $T_m$ , outra extração de RNA total foi realizada. Assim que as amostras testadas para  $\beta$ -actina apresentaram  $T_m$  esperado, elas foram utilizadas em reações de RT-PCR para amplificação de uma região do genoma de MAYV, sendo testadas em duplicata.

Para detecção do genoma de MAYV, foi utilizada a metodologia descrita por Naveca e colaboradores (2017) (NAVECA et al., 2017), que consiste da utilização de iniciadores e sonda específicos para a amplificação da região genômica correspondente à proteína não estrutural 1 (nsP1) do MAYV, gerando um fragmento de 59 bases (tabela 3). Foram utilizados um controle positivo, obtido a partir da extração de RNA total do sobrenadante de células infectadas com MAYV, e controles negativos, sendo um controle de extração, um controle obtido da extração de RNA total do sobrenadante de células não infectadas, e um controle contendo apenas água livre de nucleases (*non-template control*).

Tabela 2: Iniciadores para detecção do gene  $\beta$ -actina por RT-PCR

Iniciadores	Sequência
$\beta$ -ACT_FWD	5'- CCAACCGCGAGAAGATGA -3'
$\beta$ -ACT_REV	5'- CCAGAGGCGTACAGGGATAG -3'

FWD: iniciador *forward* (senso); REV: iniciador *reverse* (antissenso). Fonte: REZENDE et al., 2019.

Tabela 3: Iniciadores e sonda para detecção de MAYV por RT-PCR

Iniciadores e sonda	Sequência
MAYV_FNF	5'-CACGGACMTTTTGCCTTCA-3'
MAYV_FNR	5'-AGACTGCCACCTCTGCTKGAG-3'
MAYV_FNP	5'-HEX-ACAGATCAGACATGCAGG-3'

FNF: iniciador *forward* (senso); FNR: iniciador *reverse* (antissenso); FNP: sonda. Fonte: NAVECA et al., 2017.

#### 4.3 Investigação sorológica da infecção por MAYV

Além da investigação molecular, ensaios sorológicos são importantes para a investigação da exposição de animais ao MAYV. Contudo, dada a indisponibilidade de soro nas carcaças coletadas pelo LZOON, foi proposta uma adaptação de teste de neutralização, visando a uma futura aplicação na investigação da infecção por MAYV nos PNH. Em uma etapa inicial, foram utilizados animais experimentais (infectados com MAYV ou não infectados – *mock*) para padronização de um teste de neutralização viral adaptado, no qual foram utilizadas amostras de homogenato de fígado macerado em vez de soro. A padronização baseou-se em metodologias descritas anteriormente (BEWLEY et al., 2021; GAMBLE; PATRASCU, 1996; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2015).

Para o preparo de amostras a serem utilizadas na padronização do teste de neutralização, fragmentos de 50 mg de fígado foram depositados, cada um, em microtubos de 1,5 mL contendo 200 µL de meio MEM (meio essencial mínimo Eagle – Cultiab, Brasil) e quatro esferas (*beads*) de borossilicato de 2 mm cada (Sigma-Aldrich, Alemanha). Esses tubos foram levados a um batedor de *beads* (Mini-Beadbeater-16, BioSpec Products, EUA), por dois minutos, para maceração. Em seguida, o macerado foi centrifugado a 8000 x g, por dez minutos (Microfuge 16, Beckman Coulter, EUA), e o sobrenadante foi coletado. Cinco novas centrifugações foram feitas, nas mesmas condições, para obtenção de sobrenadante livre de *debris* celulares (homogenato). O homogenato coletado foi aquecido a 56°C em termobloco (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Alemanha), por 30 minutos, para inativação do sistema do complemento, e utilizado nas etapas seguintes do PRNT.

Inicialmente, 80 µL de homogenato foram adicionados a 720 µL de MEM 1% SFB 1% HEPES (ácido 4 – (2-hidroxietil) -1-piperazin etanol sulfônico; agente tamponante), com um volume final de 800 µL, gerando uma diluição de 1:10. Este material foi centrifugado a 16000 x g, por três minutos, e um volume de, aproximadamente, 750 µL foi transferido para uma placa

de 96 poços. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas do homogenato na base 2, em placa de 96 poços, por meio da transferência de 350 µL das diluições 1:10 para poços contendo 350 µL de MEM, de modo a obter uma diluição 1:20, e assim por diante, até a diluição 1:160.

Em paralelo, diluições do MAYV foram feitas, a partir do título viral, com meio MEM suplementado com 1% de SFB e 1% de HEPES, para se obter uma concentração de 100 a 150 PFU/poço. Após a realização das diluições, 300 µL de vírus foram adicionados a 300 µL dos homogenatos diluídos (diluições 1:20 a 1:160), como descrito acima, e incubados a 37°C por uma hora, de modo a possibilitar a ligação vírus-anticorpo e conseqüente neutralização pela ação dos anticorpos na amostra.

Um volume de 180 µL da mistura vírus-homogenato de cada diluição foi adicionado, em triplicata, em cada poço das placas de 12 poços. Estas foram incubadas por uma hora, com intervalos de 10 minutos, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para ocorrer adsorção das partículas virais à monocamada celular. Após a adsorção, foi adicionada solução de carboximetilcelulose 3% e meio 199 2x (Gibco-Life Technologies, EUA) com 2% de SFB a cada poço, e as placas foram incubadas, nas mesmas condições de temperatura e pressão, por dois dias. Decorrido esse tempo, as células foram fixadas com solução de formalina 3,7%, por uma hora, e coradas com solução de cristal violeta 1%, por 30 minutos.

Para cada um dos experimentos foram incluídos controles. Em cada placa de 12 poços, foram incluídos dois poços destinados ao controle de vírus, e um poço controle de células não infectadas. Para análise dos resultados, foram consideradas apenas as placas de 12 poços que não apresentaram placas de lise no controle de células, e que apresentaram placas de lise suficientes nos controles de vírus. Para cada placa, foi calculada a média do número de PFU dos dois poços de controle de vírus e essa média foi usada para calcular a porcentagem de neutralização viral em cada poço teste.

Durante a realização dos experimentos, foram feitos testes com controles positivos ou negativos. Homogenatos de fígado de camundongos não infectados com MAYV foram usados como controle negativo. Soro de camundongos experimentalmente infectados com MAYV foram usados como controle positivo (controle positivo 1). Um segundo controle positivo, consistindo de uma mistura, em igual proporção, de soro positivo de animal infectado com MAYV e homogenato de fígado de animal não infectado com MAYV (controle positivo 2), foi também usado, para verificar uma possível interferência do homogenato de fígado no processo de neutralização.

Antes da realização das análises estatísticas, foram estabelecidos critérios para selecionar os experimentos que não apresentassem resultados que sugerissem erros de técnica. Para isso, levou-se em consideração a quantidade de PFU nos controles de vírus, que deveriam apresentar em torno de 100 PFU, com variação máxima de 50%. Também foram consideradas as porcentagens de neutralização observadas nos controles positivo 1, positivo 2 e negativo, além do padrão de neutralização geral de cada diluição das amostras. Também foi considerado um coeficiente de variação entre as replicatas dos três experimentos (para cada grupo – infectados e *mock*) menor ou igual a 25%, sendo desconsiderados aqueles em que fosse observada variação acima desse valor (BEWLEY et al., 2021).

Para verificar a normalidade da distribuição dos dados, optou-se pela utilização de análise gráfica (Q-Q plot) e pelo teste estatístico de Shapiro-Wilk. A verificação de normalidade por dois métodos foi escolhida para aumentar a precisão do resultado, uma vez que um n amostral pequeno pode enviesar o resultado do teste de Shapiro-Wilk. Considerando-se o tamanho amostral e a distribuição dos dados, foi escolhido o teste de Wilcoxon/Mann-Whitney, que é um teste estatístico não-paramétrico usado para comparar tendências centrais de duas amostras independentes de tamanhos iguais, quando os requisitos para aplicação do teste t de Student não são cumpridos (RICHARDSON; OVERBAUGH, 2005). Foram feitas comparações entre o grupo infectado e o grupo *mock* para cada uma das diluições de homogenato, de modo a determinar se havia diferença significativa entre elas (nível de significância  $p=0.05$ ).

As medianas das porcentagens de neutralização (considerando as triplicatas das três réplicas experimentais,  $n=9$ ) observadas em cada diluição (1:20, 1:40, 1:80 ou 1:160), dos animais infectados ( $n=6$ ) foram comparadas com as medianas das porcentagens de neutralização observadas em cada diluição dos animais *mock* ( $n=6$ ) (por exemplo: medianas de neutralização observadas na diluição 1:20 do grupo infectado foram comparadas com as medianas de neutralização na diluição 1:20 do grupo *mock*). As análises estatísticas foram feitas com o programa R (versão 4.2.3) e o pacote ggpubr versão 0.6.0 (KASSAMBARA, 2023).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Investigação de MAYV em PNH

O surto de febre amarela que teve início em 2016 possibilitou ao nosso grupo de pesquisa a montagem de um banco de amostras biológicas proveniente de carcaças de PNH. Essas amostras foram encaminhadas ao nosso grupo no contexto de vigilância de febre amarela, para que contribuíssemos com os esforços de detecção do YFV no estado de MG. A disponibilidade de amostras possibilitou a investigação da presença de outros vírus nesses animais, o que nos levou a testar, por meio de RT-PCR, as amostras para a presença do genoma de MAYV. Não foi possível detectar o genoma de MAYV em nenhuma das 732 amostras testadas nesse trabalho.

A ausência de amostras com resultado detectável para o genoma de MAYV nesse trabalho pode indicar a ausência de circulação do vírus em MG, considerando que o método de RT-PCR é muito sensível, sendo possível detectar poucas cópias de RNA viral presente na amostra (NAVECA et al., 2017). Por outro lado, fatores como a rápida degradação do RNA em um organismo após sua morte, atrelado ao fato de que o fígado é um dos primeiros órgãos onde se inicia o processo de decomposição, podem ocasionar uma perda significativa de material genético viral após a morte do hospedeiro (JAVAN et al., 2019; SAMPAIO-SILVA et al., 2013). Somado a isso, a viremia em infecções por MAYV é frequentemente baixa e curta, com dois a três dias de duração (ALTO et al., 2020; BINN; HARRISON; RANDALL, 1967; VASCONCELOS et al., 1998), o que pode representar outro fator que dificulta a detecção do genoma viral por métodos moleculares.

Sendo assim, considerando que as amostras de fígado utilizadas nesse trabalho são provenientes de carcaças, a não detecção de RNA nas amostras não significa, necessariamente, que os animais não haviam sido infectados antes da morte (DIAGNE et al., 2020). Além disso, o tempo de viremia curto observado nas infecções por MAYV pode, também, dificultar a detecção do genoma do vírus. Somado a isso, há o fato de que pode ter ocorrido uma infecção não letal em um animal em algum momento de sua vida, o que somente poderia ser avaliado por meio de um teste sorológico (BATISTA et al., 2012, 2013). Anticorpos apresentam uma durabilidade maior que o RNA no organismo, podendo ser encontrados, inclusive, por algum tempo após a morte, o que demonstra, mais uma vez, a importância de se considerar abordagens sorológicas no diagnóstico a partir de carcaças de animais (DIAS et al., 2022; SAMPAIO-SILVA et al., 2013; TRYLAND et al., 2006) .

Outro ponto a se considerar ao analisar a ausência de amostras positivas nesse trabalho é o viés causado pelo método de amostragem das carcaças. A maioria (n=456) dos animais testados foram coletados em áreas urbanas, principalmente na mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte (BH). Isso ocorreu devido ao fato de os animais serem, muitas vezes, encontrados pela população local, que comunica o fato às autoridades de saúde, que, por sua vez, fazem a coleta (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Como a região metropolitana de BH possui uma maior malha urbana, quando comparada a outras regiões do estado, e como a quantidade de pessoas circulando em diferentes locais é maior, a probabilidade de um animal ser encontrado é maior que em áreas de outras regiões, em que a carcaça poderia estar em local de difícil acesso ou menos frequentado pela população, onde provavelmente não seria encontrada (IBGE, 2021a, 2021b).

Esse viés de amostragem pode indicar que os animais testados poderiam, de fato, não estar infectados pelo MAYV no momento da morte. Além disso, o histórico de circulação do vírus no Brasil, que ocorre nas regiões Norte e Centro-Oeste (DOS SANTOS SOUZA MARINHO et al., 2022; ESPOSITO; FONSECA, 2017; ZUCHI et al., 2014), reforça a ideia de que, no caso de uma possível detecção de PNH infectado com MAYV em MG, a probabilidade de que esta ocorra em amostra de animal advindo de uma área geograficamente mais próxima da região Centro-Oeste do país, em especial o estado de Goiás, é maior. Também é preciso considerar que a maioria das amostras testadas (n=540) são provenientes de animais do gênero *Callithrix* sp., e que esse gênero de PNH não possui representantes cujas amostras foram positivas em testes moleculares e sorológicos em estudos recentes (BATISTA et al., 2012, 2013).

Como demonstrado por Lorenz e colaboradores (2019) (LORENZ; FREITAS RIBEIRO; CHIARAVALLI-NETO, 2019), por meio de modelagens estatísticas que consideraram fatores como bioma, pluviosidade e densidade populacional, MG é uma área de risco para exposição ao MAYV, uma vez que o estado apresenta condições ambientais e antrópicas favoráveis à circulação do vírus. Somado a isso, está o fato de que grandes centros urbanos do estado possuem populações de PNH vivendo próximas a pessoas, além da presença de mosquitos hematófagos antropofílicos, como as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que apresentam competência vetorial para transmitir o MAYV quando experimentalmente infectados (PEREIRA et al., 2020).

Ademais, estudos prévios descreveram a detecção da infecção por MAYV em larvas e mosquitos adultos (DE CURCIO et al., 2022) na região Centro-Oeste do país, demonstrando

que ela ocorre naturalmente. Sendo assim, ao considerarmos a crescente degradação ambiental, surge a possibilidade de maior contato entre hospedeiros silvestres e vetores que circulem em áreas rurais, o que poderia promover a disseminação do MAYV para populações humanas. O contato entre pessoas infectadas em ambientes rurais e habitantes de áreas urbanas criaria, então, o risco de estabelecimento de um ciclo de transmissão urbano do vírus.

Considerando o histórico da circulação do MAYV em regiões próximas ao estado de MG (BRUNINI et al., 2017; DE CURCIO et al., 2022), somado ao potencial risco da ocorrência de surtos do vírus devido a fatores ambientais e antrópicos, é possível que o MAYV já tenha sido introduzido e circule em MG, mas que, possivelmente, não tenha havido circulação concomitante dele e do YFV durante o recente surto de FA. Por outro lado, há que se considerar também a possibilidade de o MAYV não ter sido introduzido no estado de MG, uma vez que a detecção do vírus não foi descrita na região até então (LIMA et al., 2021; LORENZ; FREITAS RIBEIRO; CHIARAVALLOTTI-NETO, 2019). Sendo assim, a vigilância epidemiológica em PNH se torna ainda mais importante, para que uma eventual introdução do vírus em MG possa ser detectada, de modo a fornecer informações às autoridades de saúde para melhor manejo de casos. Também é importante que esse acompanhamento seja feito no atual contexto de surtos de CHIKV em MG, já que as infecções por ambos os vírus podem apresentar sinais clínicos semelhantes (IZURIETA et al., 2018; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b).

## 5.2 Adaptação de ensaio de neutralização viral

A partir dos homogenatos preparados com amostras de fígado coletadas dos camundongos experimentais, foram realizados ensaios de neutralização baseados na técnica clássica de ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT).

Durante os testes preliminares de neutralização, diferentes condições foram testadas. Inicialmente, foram realizados testes em placas de seis poços (dados não apresentados). Essa metodologia limitava o número de diluições e replicatas por placa. Sendo assim, optou-se por utilizar placas de 12 poços, que possibilitariam o uso de menos placas para testar mais diluições, além de ser possível acondicionar mais replicatas da mesma diluição em uma placa.

Optou-se por utilizar fígados provenientes de animais que não passaram por punção cardíaca, de modo a melhor mimetizar o que ocorreria num cenário em que amostras de carcaças

de animais encontrados no ambiente fossem testadas. Sendo assim, os fígados de animais submetidos a punção cardíaca foram usados em controles negativos. Nas amostras de animais *mock* observou-se, num primeiro momento, porcentagens de neutralização significativas, o que estimulou a introdução de mais etapas de centrifugação das amostras (dados não apresentados). Isso se mostrou efetivo, uma vez que os níveis de neutralização em animais *mock* foram reduzidos, sem prejuízo do padrão observado em animais infectados.

Os ensaios de neutralização foram realizados, inicialmente, utilizando-se diluições de amostras de homogenato na base 2, a saber: 1:20 a 1:1280. Desse modo, a cada diluição, a quantidade de anticorpos hipotéticos presentes nas amostras seria reduzida pela metade. Após a realização de alguns testes (dados não apresentados), observou-se que, a partir da diluição 1:160, não se observava mais atividade neutralizante nos homogenatos de animais infectados, o que levou ao abandono das diluições subsequentes a essa.

Nos experimentos de neutralização viral pela redução de placas usando homogenatos de fígados de animais infectados e *mock*, foram observados padrões diferentes de redução de PFU nos controles virais. Assim, optou-se pelo uso de solução tamponante (HEPES) em uma tentativa de solucionar o problema, e isto surtiu o efeito esperado.

Usando as condições pré-estabelecidas, conforme descrito acima, foram feitos três experimentos independentes, e em cada um destes, as amostras foram testadas em triplicata. Em um caso, houve perda de monocamada em poços referentes às diluições 1:20, 1:40 e 1:80 do animal 2 (*mock*) durante um experimento. Sendo assim, para este animal foram considerados os dados provenientes de dois experimentos (três triplicatas de duas réplicas experimentais). Para os demais animais, foram considerados resultados de todos experimentos (três triplicatas de três réplicas experimentais).

Para visualizar os perfis de redução de placas de lise, foram feitos gráficos de densidade, para cada diluição, comparando animais infectados e *mock* (figura 8). Para a construção dos gráficos, foram considerados os valores percentuais de neutralização observados em cada poço dos três experimentos realizados para cada grupo de animal (infectado e *mock*). Assim, cada animal representado apresenta 36 valores, correspondentes a nove poços (três poços por diluição por experimento), referentes a cada diluição (exceto animal 2 *mock*). Os perfis de distribuição de porcentagens de neutralização em cada poço apontam para uma maior neutralização em amostras provenientes de animais infectados, quando comparados aos *mock*.

No entanto, pode-se observar algumas áreas onde nota-se uma sobreposição da distribuição dos valores de neutralização quando comparados testes feitos com homogenato de animais infectados e *mock*. Estas áreas de sobreposição vão aumentando à medida que a diluição aumenta. Foi feita, então, análise da dispersão dos valores de neutralização de cada animal individualmente, por diluição (figura 9).

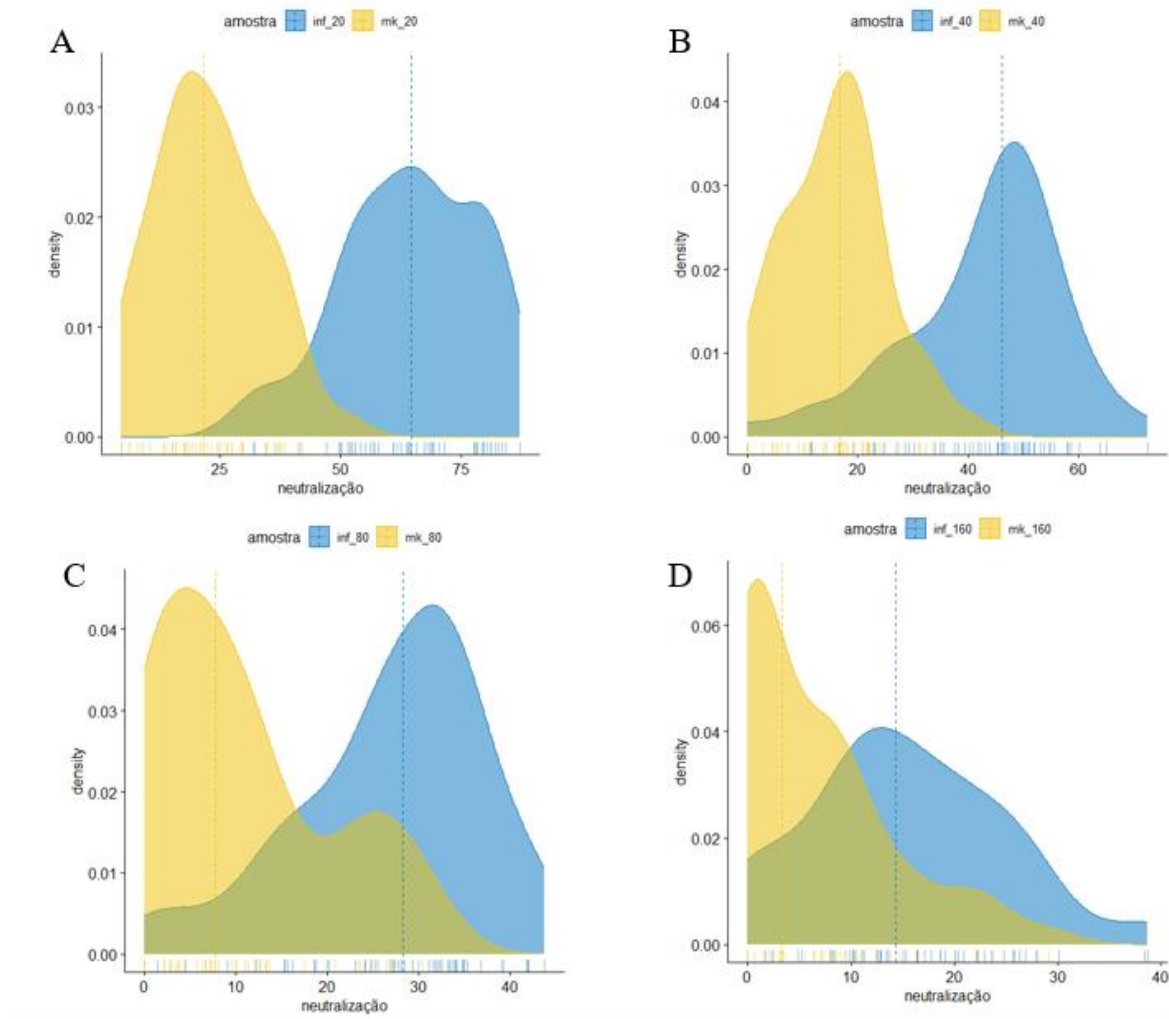


FIGURA 8: DISTRIBUIÇÃO DOS PERCENTUAIS DE NEUTRALIZAÇÃO PARA CADA DILUIÇÃO (INFECTADOS E *MOCK*). Representação gráfica da densidade dos percentuais de neutralização para cada poço de cada diluição, comparando animais infectados (azul) e *mock* (amarelo), nas diluições 1:20 (A), 1:40 (B), 1:80 (C) e 1:160 (D). Linhas tracejadas representam as medianas. É possível observar maiores percentuais de neutralização nos poços em que foram inoculadas amostras de homogenato de fígado infectado incubadas com vírus. Para o animal 2 (*mock*), foram considerados dados de dois experimentos (três replicatas de duas réplicas experimentais). O aumento progressivo da área de sobreposição das distribuições, relacionado diretamente ao aumento da diluição, demonstra um aumento na ocorrência de poços com percentuais de neutralização similares entre infectados e *mock*. O percentual de neutralização parece estar relacionado à diluição.

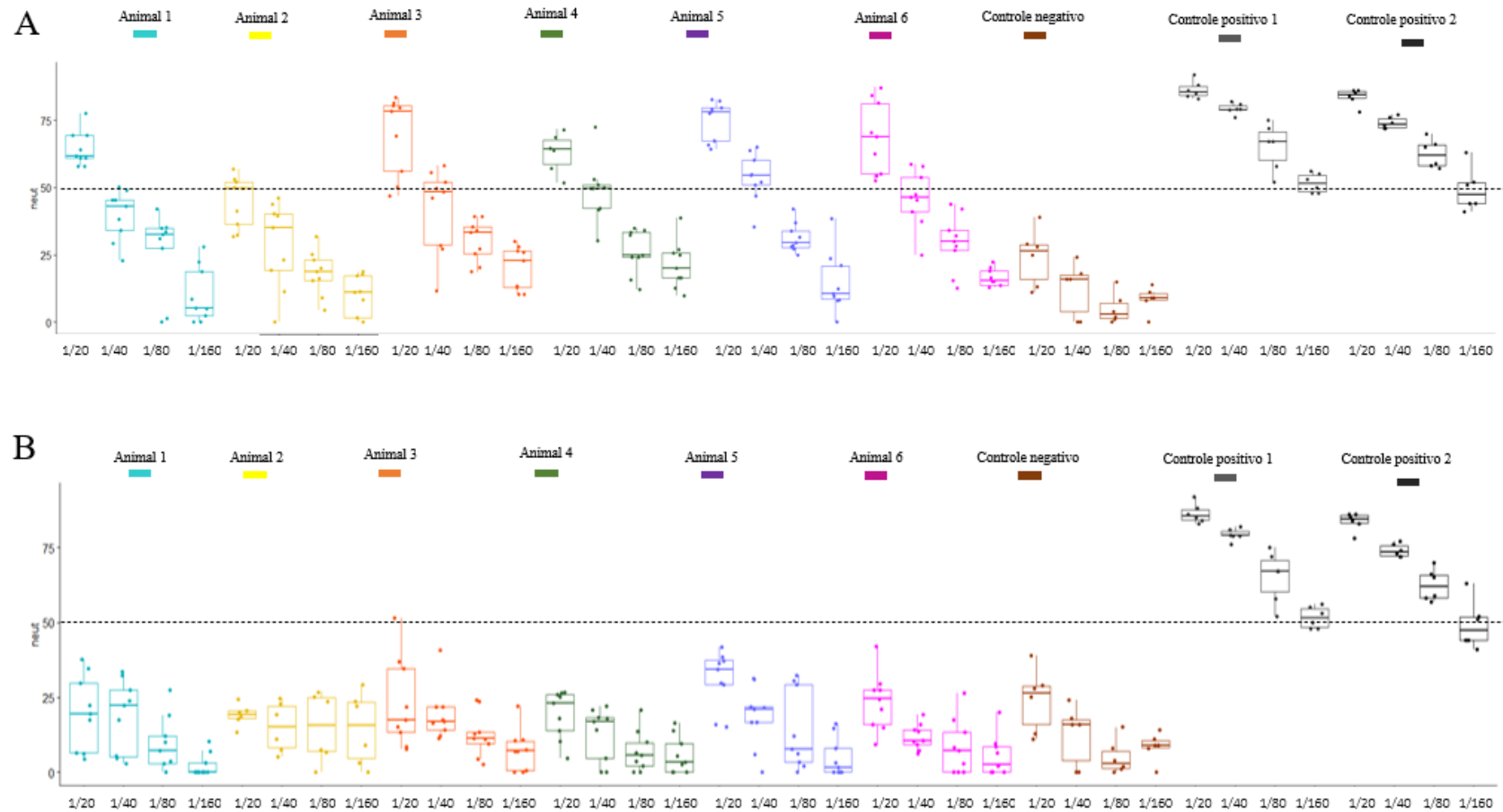


FIGURA 9: DISPERSÃO DOS VALORES DE NEUTRALIZAÇÃO. A figura ilustra a dispersão dos percentuais de neutralização por animal. Estão representados animais infectados (A), *mock* (B) e controles (ambos os gráficos; três últimos grupos de boxplot, à direita). É possível observar que os valores medianos de neutralização ficaram acima de 50 % (linha tracejada) nos seis animais infectados, na diluição 1:20, e acima de 50% na diluição 1:40 de três animais. Todas as medianas dos animais *mock* foram abaixo de 50%. Para o animal 2 (*mock*), foram considerados dados de dois experimentos (três replicatas de duas réplicas experimentais).

Nos animais *mock*, não foram observados valores medianos de neutralização acima de 25%, na diluição 1:20, na maioria dos animais (n=5). A exceção foi o animal 5, que apresentou uma mediana de neutralização de 34% na diluição 1:20 (figura 9). Já nos animais infectados, observou-se valores medianos de neutralização superiores a 60%, com exceção do animal 2, na diluição 1:20. Na diluição 1:20, cinco animais infectados apresentaram valores que variaram entre 64% e 78% de neutralização, enquanto o animal 2 apresentou uma mediana de neutralização de 49,6%.

No geral, observa-se uma heterogeneidade de percentuais de neutralização quando se compara as triplicatas de duas ou três réplicas experimentais (considerando cada diluição de cada animal) (figuras 8 e 9). As diferenças observadas podem estar relacionadas à própria técnica, que é muito sensível a pequenas variações de execução, ou mesmo ao tipo de material utilizado, que não é o convencional para esse ensaio. Portanto, é esperado que o padrão de neutralização apresente variações em relação ao que é observado em ensaios de neutralização virais tradicionais (LINDSEY; CALISHER; MATHEWS, 1976).

Na comparação entre as amostras do grupo de animais infectados e do grupo *mock* (figura 10), na diluição 1:20, observou-se diferença estatística significativa ( $W = 36$ ,  $p = 0.002165$ ) entre as medianas de neutralização viral. Também foi possível observar diferenças significativas entre as porcentagens de neutralização obtidas para animais infectados, quando comparados aos *mock*, na diluição 1:40 ( $W = 36$ ,  $p = 0.004998$ ), na diluição 1:80 ( $W = 36$ ,  $p = 0.002165$ ) e na diluição 1:160 ( $W = 34$ ,  $p = 0.008658$ ).

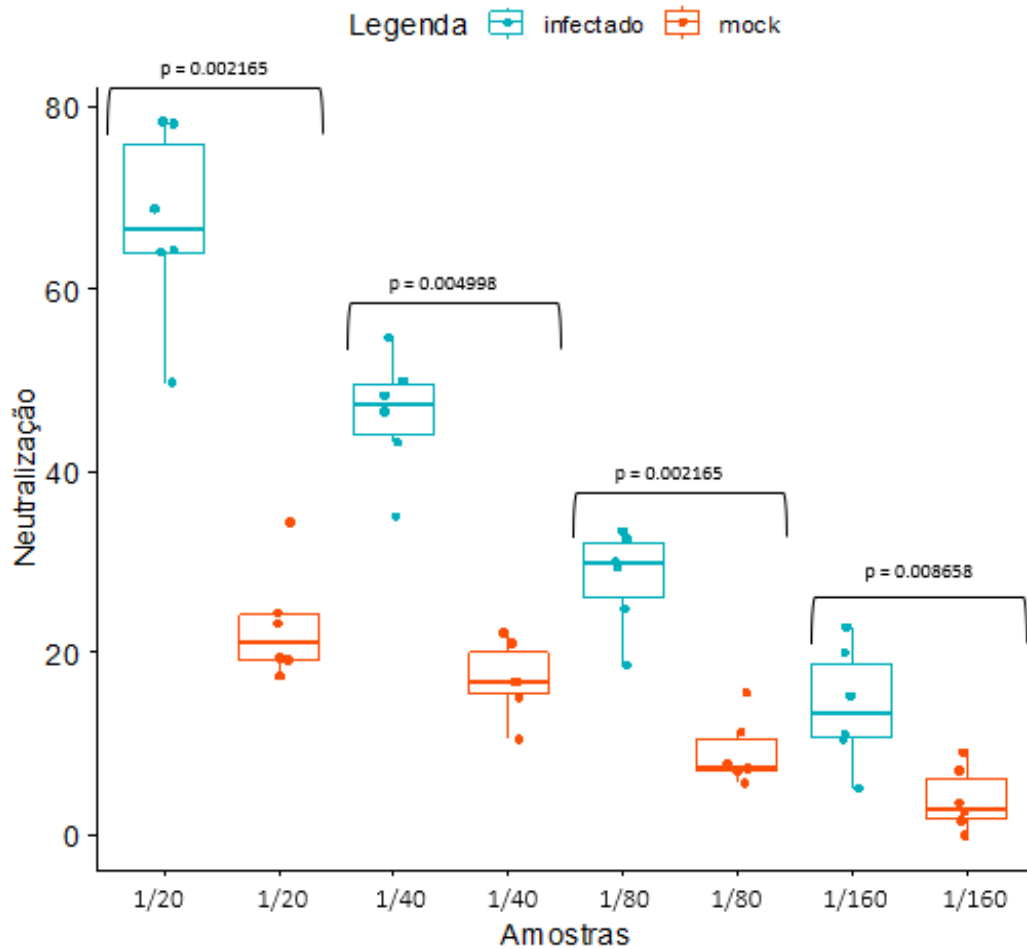


FIGURA 10: COMPARAÇÃO DOS PERCENTUAIS DE NEUTRALIZAÇÃO POR DILUIÇÃO. Gráfico ilustrando as porcentagens de neutralização observadas nos animais infectados e *mock*. Valores obtidos pela mediana de todos os poços correspondentes a cada diluição. Para um animal infectado, foram considerados os valores obtidos em dois experimentos ao invés de três. Teste Wilcoxon/Mann-Whitney. Nível de significância  $p < 0,05$ . Para o animal 2 (*mock*), foram considerados dados de dois experimentos (três replicatas de duas réplicas experimentais).

Ao se plotar a neutralização mediana por animal e por diluição, foram observados, entre os testes feitos com amostras de animais *mock* e infectados (figura 11), perfis de curva que pareciam ter inclinações diferentes. Foi feita então uma análise de regressão linear para verificar se havia uma correlação entre a diluição e a porcentagem de neutralização observada, e se eram distintas entre animais infectados e *mock*.

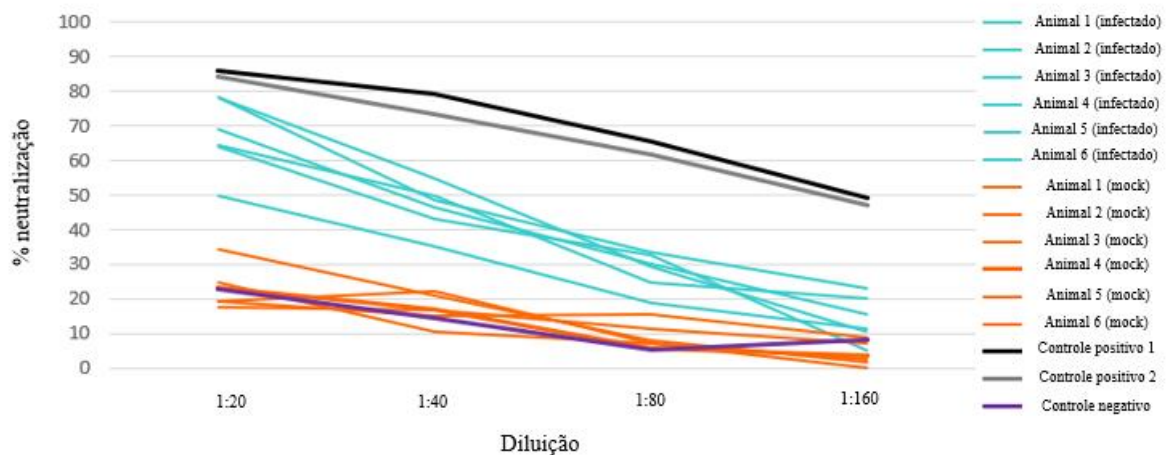


FIGURA 11: CURVAS DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL. O gráfico representa as medianas dos percentuais de neutralização, por animal e por diluição. É possível perceber uma inclinação nas curvas do gráfico, o que sugere uma correlação entre neutralização e diluição. Para o animal 2 (*mock*), foram considerados dados de dois experimentos (três replicatas de duas réplicas experimentais).

Usando os dados de animais infectados, foi feita uma regressão linear (figura 12), por meio da qual foi possível observar que 85% da neutralização viral nos animais infectados é explicada pela diluição ( $R^2 = 0,85$ ;  $p=1.084e-10$ ), enquanto que, para os animais *mock*, 70% da neutralização viral foi explicada pelas diluições ( $R^2 = 0,70$ ;  $p= 3.505e-07$ ). Esses dados sugerem a presença de componentes com atividade neutralizante nas amostras dos animais infectados, comparados aos *mock*. Levando em consideração que as amostras são advindas de animais infectados com MAYV, e que o fígado é um órgão altamente vascularizado (LORENTE; HAUTEFEUILLE; SANCHEZ-CEDILLO, 2020), fortalece-se a hipótese de que esses componentes poderiam ser anticorpos neutralizantes.

Considerando a porcentagem de neutralização inespecífica observada em animais *mock* nas menores diluições, levantou-se a hipótese de que deve haver algum componente presente no próprio órgão, como *debris* celulares e teciduais, que não foram removidos durante o processo de centrifugação, representando matéria orgânica que adsorve a partículas virais, de modo a desempenhar uma atividade, mais facilmente observada nas menores diluições, que poderia ser erroneamente interpretada como neutralização viral por anticorpos. Essa hipótese é reforçada pelo estudo de Holland e McLaren (1959) (HOLLAND; MCLAREN, 1959), que constataram que a presença de células lisadas reduz a contagem de PFU observada em poços contendo monocamada infectada. Isso explica, portanto, a menor contagem de placas de lise e consequente aumento do percentual de neutralização em menores diluições dos homogenatos

de animais *mock*. Em nossos ensaios de neutralização, porém, esse efeito foi reduzido à medida em que as amostras foram diluídas, podendo ser observada redução expressiva na neutralização, em animais *mock*, da menor diluição (1:20) para a diluição subsequente (1:40). Entre os próximos passos deste projeto, está a utilização de filtros para filtrar as amostras de homogenato de animais infectados, de modo a determinar, por meio de novos testes, se será possível observar diminuição na neutralização inespecífica, usando amostras de animais *mock* e infectados.

Os resultados dos ensaios de neutralização viral demonstram a viabilidade do uso de amostras de fígado em substituição ao soro, uma vez que se observou significativa neutralização pelas amostras de animais infectados, em diferentes diluições das replicatas biológicas, sendo proporcional à diluição da amostra, com destaque para as diluições 1:20 e 1:40, que apresentaram maiores valor de neutralização. Isso sugere a presença de anticorpos neutralizantes em amostras de fígado provenientes de carcaças preservadas a baixas temperaturas, o que configura uma importante constatação.

Os valores de percentual de neutralização comumente utilizados para considerar uma amostra como positiva (possui anticorpos neutralizantes) em ensaios que utilizam soro são iguais a ou maiores que 50% (*cutoff*) (RASULOVA et al., 2022; SIMÕES et al., 2012). Com base nos resultados obtidos, sugere-se *cutoff* de ao menos 60%, além da realização do teste com diluições seriadas, para se averiguar se a redução da neutralização é proporcional à diluição, como observado no presente trabalho.

É importante ressaltar, porém, que resultados negativos nesses ensaios podem ser atribuídos, em certos casos, a diferenças na resposta imune de um animal (GARTNER, 2012; VIDAL, 2017), que pode ter produzido menos anticorpos após a infecção, ou mesmo pode ter tido contato com menores quantidades de partículas virais. Esses fatores poderiam interferir no perfil de neutralização, fazendo com que um animal previamente exposto ao vírus tenha um resultado negativo no teste.

Para a padronização desse ensaio, animais experimentais foram infectados durante a execução desse projeto para que se obtivesse órgãos que pudessem ser potenciais locais de maior concentração de anticorpos. Para tal, levantou-se a hipótese de que o fígado seria um bom candidato, levando em conta que o órgão é muito vascularizado e que é um sítio de replicação primário do MAYV (DIAGNE et al., 2020; LORENTE; HAUTEFEUILLE; SANCHEZ-CEDILLO, 2020), o que faria dele um bom candidato a conter anticorpos. Também foi levada em consideração, para a escolha do fígado, a maior disponibilidade de amostras desse

órgão, provenientes de PNH, entre as que possuímos para serem estudadas, sendo que também temos como perspectiva a utilização de homogenatos de amostras de fígado de PNH para a realização dos ensaios de neutralização adaptados.

Nossos resultados de detecção de atividade neutralizante viral, usando amostras de tecido sólido são corroborados por estudo prévio. O uso de amostras de tecidos advindos de carcaças foi feito em estudo anterior, que avaliou a eficácia do uso de tecidos de porcos infectados na realização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (GAMBLE; PATRASCU, 1996). No estudo, foram utilizadas amostras de soro de porcos experimentalmente infectados, coletadas periodicamente, e amostras de língua e músculo maceradas em kits comerciais de ELISA. Os resultados obtidos demonstraram a viabilidade do uso de tecidos sólidos, em comparação ao soro, nesses ensaios. Similarmente, outro trabalho avaliou a viabilidade do uso de líquido secretado por amostras de diafragma de porcos naturalmente infectados em ELISA. O líquido, obtido após congelamento e descongelamento das amostras, se mostrou um material útil para detecção de anticorpos contra *Trichinella spiralis* por ELISA (BECK et al., 2005). Ainda, estudos anteriores demonstraram a possibilidade de detecção de anticorpos por ELISA em amostras de fluidos corporais obtidos de carcaças de animais mantidas sob refrigeração (10°C) por até nove dias (TRYLAND et al., 2006).

Estes dados em conjunto abrem perspectivas para o uso de homogenato de fígado também em ELISA, o que ainda deverá ser avaliado. Neste trabalho, optamos por avaliar a presença de anticorpos contra o MAYV, pelo teste de neutralização, porque este avalia a presença de anticorpos neutralizantes, e não anticorpos totais, como no ELISA, possibilitando não somente a detecção dos anticorpos, mas também a visualização do efeito biológico (redução de placas). Sendo assim, a técnica de neutralização adaptada nesse trabalho poderá ser de grande valia para a vigilância epidemiológica de arbovírus, especialmente como uma complementação laboratorial, nos programas baseados em vigilância passiva e a análise de carcaças de animais, como o programa de vigilância de FA. na vigilância passiva, o que se baseia, em grande parte, no uso de carcaças de animais encontradas pela população (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

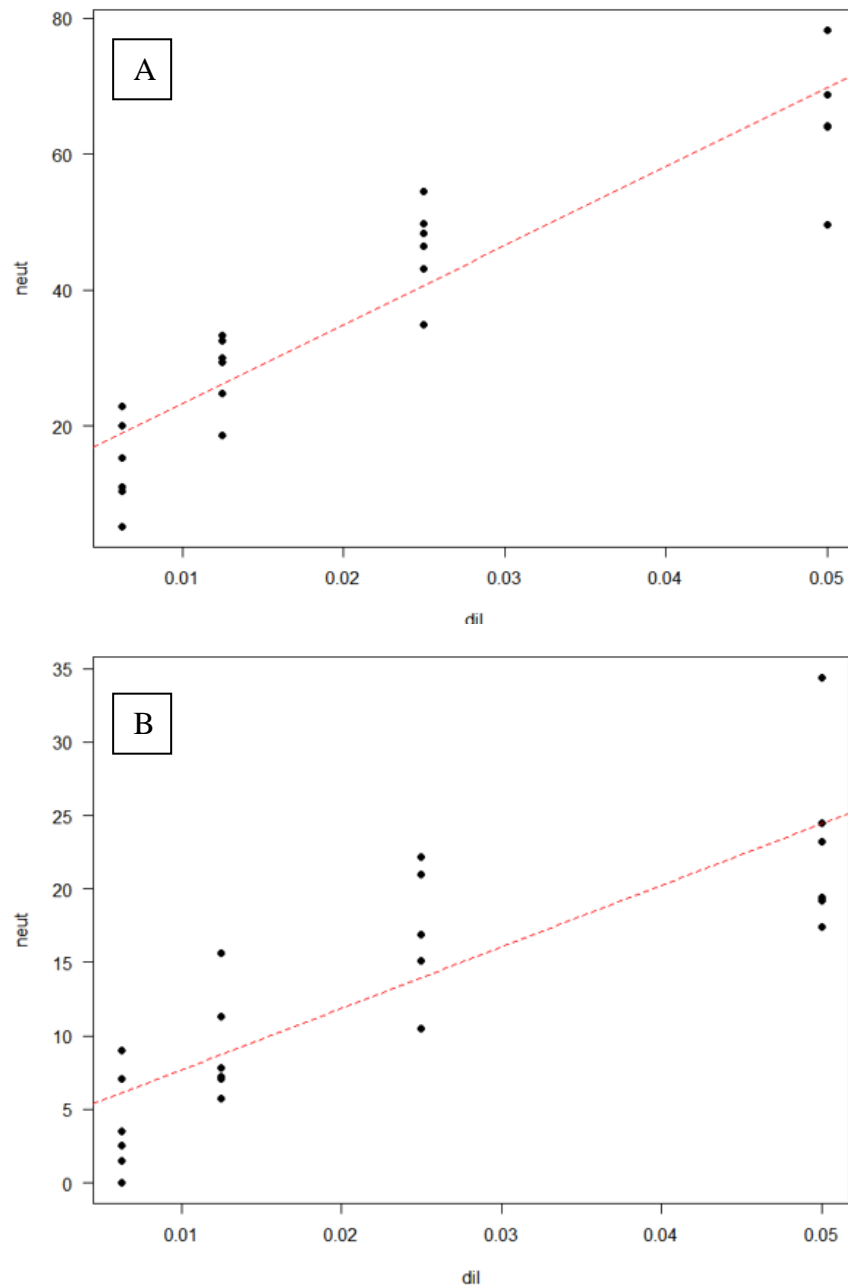


FIGURA 12: REGRESSÃO LINEAR DOS PERCENTUAIS DE NEUTRALIZAÇÃO POR DILUIÇÃO. Gráficos de regressão linear das diluições das amostras de animais infectados (A) e *mock* (B). É possível observar um aumento gradual no percentual de neutralização das maiores diluições (amostra mais diluída) para as menores diluições (amostra menos diluída), indicando uma correlação entre diluição e neutralização. Valores para (A): ( $R^2 = 0,85$ ;  $p=1.084e-10$ ; neutralização =  $11 + 1162 \times diluição$ ). Diluições representadas em decimais (1:20 = 0.05; 1:40 = 0.025; 1:80 = 0.0125; 1:160 = 0.00625). Valores para (B): ( $R^2 = 0,70$ ;  $p= 3.505e-07$ ; neutralização =  $3.4+ 419 \times diluição$ ). Para o animal 2 (*mock*), foram considerados dados de dois experimentos (três replicatas de duas réplicas experimentais).

## 6. CONCLUSÃO

Esse trabalho demonstrou a ausência de fragmentos de genoma de MAYV detectáveis nas amostras de PNH, o que poderia indicar a não circulação do vírus no estado de MG, e o desenvolvimento de uma técnica adaptada do ensaio de neutralização viral (PRNT) clássico, que utiliza amostras de órgãos no lugar de soro. Os resultados aqui descritos são importantes para o trabalho de vigilância epidemiológica, que deve ser contínuo, e fornecem novos meios de detecção que poderão ser de grande valia para o manejo de eventuais surtos de febre do Mayaro e outras arboviroses.

## 7. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO

### 7.1 Participação em eventos científicos

XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa. 2021.

VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM. 2021.

Simpósio de Microbiologia de Rondônia. 2021.

XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia. 2022.

IX Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM. 2022.

### 7.2 Organização de eventos científicos

VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG - Conecta SIM. 2021. Carga horária: 30h

### 7.3 Apresentação de trabalhos em eventos científicos

**Arruda, Matheus Soares;** Silva, Natalia Ingrid Oliveira; Costa, Thais Alkifeles; Oliveira, Gabriela Fernanda Garcia; Mello, Érica Munhoz de; Drumond, Betânia Paiva. Dynamics Of Mayaro Virus Circulation In Non-Human Primates In Minas Gerais State During Yellow Fever Outbreak. Em: XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa. 2021.

**Arruda, Matheus Soares;** Silva, Natalia Ingrid Oliveira; Thaís Alkifeles; Oliveira, Gabriela Fernanda Garcia; Mello, Érica Munhoz de; Drumond, Betânia Paiva. Investigation of intrahost

and interhost diversity of Yellow fever virus. Em: 25th International Bioinformatics Workshop On Virus Evolution And Molecular Epidemiology. 2021.

Erik Vinicius de Sousa Reis, Thaís Alkifeles Costa, **Matheus Soares Arruda**, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira, Nidia Esther C Arias, Kathryn A. Hanley, Nikos Vasilakis, Betânia Paiva Drumond. Investigation of neutralizing antibodies against arboviruses using hepatic tissue. Em: XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia. 2022.

#### 7.4 Cursos e atividades de extensão

Biosafety Level 2-3. (Carga horária: 8h). University of Texas Medical Branch, UTMB, Estados Unidos. 2021.

Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2021.

25th International Bioinformatics Workshop On Virus Evolution And Molecular Epidemiology. (Carga horária: 60h). Katholieke Universiteit Leuven, KU Leuven, Bélgica. Realizado em Belo Horizonte. 2021.

Integração na Equipe de Diagnóstico de COVID-19 do Laboratório de Vírus da UFMG. Período: maio a dezembro de 2021.

#### 7.5 Participação em orientação de trabalho de conclusão de curso

Gabriel Dias Moreira. Investigação Molecular da Infecção por Alfavírus em Primatas Não Humanos no Estado de Minas Gerais de 2017 a 2019. 2022.

#### 7.6 Artigos publicados e submetidos para publicação em periódicos

REZENDE, Izabela Mauricio De; Adriana Regina Campolina CENACHI, Thais Alkifeles COSTA, Gabriela Fernanda Garcia OLIVEIRA, Livia RABELO, Leticia Mattos MENEZES, Indiara PENIDO, Leonardo Soares PEREIRA, **Matheus Soares ARRUDA**, Andreza Parreiras GONÇALVES, Pedro Augusto ALVES, Erna Geessien KROON, Carlos Eduardo CALZAVARA-SILVA, Dario Brock RAMALHO, Olindo Assis MARTINS-FILHO, Andrea TEIXEIRA-CARVALHO, A. Desiree LABEAUD e Betânia Paiva DRUMOND. Wild-type Yellow fever virus in cerebrospinal fluid from fatal cases in Brazil, 2018. **Frontiers in Virology**, [S. l.], v. 2, 2022. ISSN: 2673-818X. DOI: 10.3389/fviro.2022.936191. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fviro.2022.936191/full>.

Natalia Ingrid Oliveira SILVA, Gregory F ALBERY, **Matheus Soares ARRUDA**, Gabriela Garcia OLIVEIRA, Thaís Alkifeles COSTA, Érica Munhoz de MELLO, Gabriel Dias MOREIRA, Erik Vinicius REIS, Simone Agostinho da SILVA, Marlise Costa SILVA, Munique Guimarães de ALMEIDA, Daniel J. BECKER, Colin J. CARLSON, Nikos VASILAKIS, Kathryn HANLEY, Betânia Paiva DRUMOND. Ecological drivers of sustained enzootic yellow fever virus transmission in Brazil, 2017-2021. **bioRxiv** 2022.10.19.512702; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.19.512702> (submetido para publicação)

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, Fernando; GRIMMER, Gustavo H.; DE PAULA, Vanessa S.; FIGUEIREDO, Luiz T. M.; BRAGA, Wornei S. M.; LUZ, Sérgio L. B. Mayaro Virus Infection in Amazonia: A Multimodel Inference Approach to Risk Factor Assessment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 6, n. 10, 2012. ISSN: 19352727. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001846.

ACOSTA-AMPUDIA, Yeny; MONSALVE, Diana M.; RODRÍGUEZ, Yhojan; PACHECO, Yovana; ANAYA, Juan Manuel; RAMÍREZ-SANTANA, Carolina. Mayaro: an emerging viral threat? **Emerging Microbes and Infections**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2018. ISSN: 22221751. DOI: 10.1038/s41426-018-0163-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>.

AGUILAR-LUIS, Miguel Angel et al. An emerging public health threat: Mayaro virus increases its distribution in Peru. **International Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 92, p. 253–258, 2020. ISSN: 18783511. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.01.024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.024>.

ALTO, Barry W.; CIVANA, Ayse; WIGGINS, Keenan; EASTMOND, Bradley; SHIN, Dongyoung. Effect of Oral Infection of Mayaro Virus on Fitness Correlates and Expression of Immune Related Genes in *Aedes aegypti*. **Viruses**, [S. l.], v. 12, n. 7, 2020. ISSN: 19994915. DOI: 10.3390/v12070719.

ANDERSON, Charles R.; WATTLE, George H.; AHIN, Norman W.; DOWNS, Wilbur G.; REESE, Alick A. Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 1012–1016, 1957. ISSN: 0002-9637. DOI: 10.4269/ajtmh.1957.6.1012. Disponível em: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.1957.6.1012>.

ASSUNÇÃO-MIRANDA, Iranaia; CRUZ-OLIVEIRA, Christine; DA POIAN, Andrea T. Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2013, p. 1–11, 2013. ISSN: 2314-6133. ISBN: 9781617613524. DOI: 10.1155/2013/973516. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/973516/>.

AUGUSTE, Albert J. et al. Evolutionary and ecological characterization of Mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 21, n. 10, p. 1742–1750, 2015. ISSN: 10806059. DOI: 10.3201/eid2110.141660.

AZEVEDO, Raimunda S. S. et al. Mayaro fever virus, Brazilian amazon. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 1830–1832, 2009. ISSN: 10806040. DOI: 10.3201/eid1511.090461.

BAER, Alan; KEHN-HALL, Kylene. Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], n. 93, p. 1–10, 2014. ISSN: 1940087X. DOI: 10.3791/52065.

BATISTA, Paulo Mira; ANDREOTTI, Renato; ALMEIDA, Paulo Silva De; MARQUES, Alisson Cordeiro; RODRIGUES, Sueli Guerreiro; CHIANG, Jannifer Oliveira; VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da**

**Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 46, n. 6, p. 684–690, 2013. ISSN: 00378682. ISBN: 0037868201812. DOI: 10.1590/0037-8682-0181-2013.

BATISTA, Paulo Mira; ANDREOTTI, Renato; CHIANG, Jannifer Oliveira; FERREIRA, Milene Silveira; VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Monitoramento soroepidemiológico em animais-sentinela e vetores como parte da vigilância de arbovírus, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 168–173, 2012. ISSN: 00378682. DOI: 10.1590/S0037-86822012000200006.

BECK, R.; GAŠPAR, A.; MIHALJEVIĆ, Ž.; MARINCULIĆ, A.; STOJČEVIĆ, D.; BRSTILO, M. Evaluation of ELISA for detection of Trichinella antibodies in muscle juice samples of naturally infected pigs. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 132, n. 1–2, p. 91–95, 2005. ISSN: 03044017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.05.034. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401705002645>.

BESSAUD, Maël; PEYREFITTE, Christophe N.; PASTORINO, Boris A. M.; GRAVIER, Patrick; TOCK, Fabienne; BOETE, Fabrice; TOLOU, Hugues J.; GRANDADAM, Marc. O'nyong-nyong virus, Chad. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 1248–1250, 2006. ISSN: 10806059. DOI: 10.3201/eid1208.060199.

BEWLEY, Kevin R. et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 3114–3140, 2021. ISSN: 1754-2189. DOI: 10.1038/s41596-021-00536-y. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41596-021-00536-y>.

BICCA-MARQUES, Júlio César; DE FREITAS, David Santos. The Role of Monkeys, Mosquitoes, and Humans in the Occurrence of a Yellow Fever Outbreak in a Fragmented Landscape in South Brazil: Protecting Howler Monkeys is a Matter of Public Health. **Tropical Conservation Science**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 78–89, 2010. ISSN: 1940-0829. DOI: 10.1177/194008291000300107. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/194008291000300107>.

BINN, L. N.; HARRISON, V. R.; RANDALL, R. Patterns of viremia and antibody observed in rhesus monkeys inoculated with chikungunya and other serologically related group A arboviruses. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 782–5, 1967. ISSN: 0002-9637. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4965218>.

BLOHM, Gabriela et al. Mayaro as a Caribbean traveler: Evidence for multiple introductions and transmission of the virus into Haiti. **International Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 87, p. 151–153, 2019. ISSN: 18783511. DOI: 10.1016/j.ijid.2019.07.031. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.07.031>.

BOGGS, William M.; HAHN, Chang S.; STRAUSS, Ellen G.; STRAUSS, James H.; GRIFFIN, Diane E. Low pH-dependent sindbis virus-induced fusion of bhk cells: Differences between strains correlate with amino acid changes in the E1 glycoprotein. **Virology**, [S. l.], v. 169, n. 2, p. 485–488, 1989. ISSN: 00426822. DOI: 10.1016/0042-6822(89)90178-5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0042682289901785>.

BOURAI, Mehdi et al. Mapping of Chikungunya Virus Interactions with Host Proteins Identified nsP2 as a Highly Connected Viral Component. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 86, n. 6, p. 3121–3134, 2012. ISSN: 0022-538X. DOI: 10.1128/jvi.06390-11.

BRUNINI, Sandra; FRANÇA, Divânia Dias Silva; SILVA, Juliana Brasiel; SILVA, Leandro Nascimento; SILVA, Flúvia Pereira Amorim; SPADONI, Mariana; REZZA, Giovanni. High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil - Volume 23, Number 6—June 2017 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 1025–1026, 2017. ISBN: 8900030000.

BRUSTOLIN, Marco; PUJHARI, Sujit; HENDERSON, Cory A.; RASGON, Jason L. Anopheles mosquitoes may drive invasion and transmission of Mayaro virus across geographically diverse

regions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 1–11, 2018. ISSN: 19352735. ISBN: 1111111111. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006895.

CAMINI, Fernanda Caetano; DA SILVA CAETANO, Camila Carla; ALMEIDA, Letícia Trindade; DA COSTA GUERRA, Joyce Ferreira; DE MELLO SILVA, Breno; DE QUEIROZ SILVA, Silvana; DE MAGALHÃES, José Carlos; DE BRITO MAGALHÃES, Cintia Lopes. Oxidative stress in Mayaro virus infection. **Virus Research**, [S. l.], v. 236, n. November 2016, p. 1–8, 2017. ISSN: 18727492. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.04.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.04.017>.

CAUSEY, O. R.; MAROJA, O. M. 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. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 1017–23, 1957. ISSN: 0002-9637. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13487974>.

CAVALHEIRO, Mariana G.; DA COSTA, Leandro Silva; CAMPOS, Holmes S.; ALVES, Letícia S.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, Iranaia; DA POIAN, Andrea T. Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: Involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v. 88, n. 3, p. 1485–1499, 2016. ISSN: 16782690. DOI: 10.1590/0001-3765201620150685.

CHEN, Rubing; MUKHOPADHYAY, Suchetana; MERITS, Andres; BOLLING, Bethany; NASAR, Farooq; COFFEY, Lark L.; POWERS, Ann; WEAVER, Scott C. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 99, n. 6, p. 761–762, 2018. ISSN: 0022-1317. DOI: 10.1099/jgv.0.001072. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae>. Acesso em: 8 abr. 2023.

CHEN, Weiqiang et al. Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 111, n. 16, p. 6040–6045, 2014. ISSN: 10916490. DOI: 10.1073/pnas.1318859111.

DA COSTA, Vivaldo Gomes; DE REZENDE FÉRES, Valéria Christina; SAIVISH, Marielena Vogel; DE LIMA GIMAQUE, João Bosco; MORELI, Marcos Lázaro. Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 62, p. 84–85, 2017. ISSN: 18783511. DOI: 10.1016/j.ijid.2017.07.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.07.016>.

DE ABREU, Filipe Vieira Santos et al. Haemagogus leucocelaenus and Haemagogus janthinomys are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. **Emerging Microbes and Infections**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 218–231, 2019. ISSN: 22221751. DOI: 10.1080/22221751.2019.1568180. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>.

DE CURCIO, Juliana Santana; SALEM-IZACC, Silvia Maria; PEREIRA NETO, Luiz Moreira; NUNES, Eliane Blanco; ANUNCIAÇÃO, Carlos Eduardo; SILVEIRA-LACERDA, Elisângela de Paula. Detection of Mayaro virus in Aedes aegypti mosquitoes circulating in Goiânia-Goiás-Brazil. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 104948, 2022. ISSN: 1769714X. DOI: 10.1016/j.micinf.2022.104948. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.104948>.

DE OLIVEIRA MOTA, Mânlio Tasso; RIBEIRO, Milene Rocha; VEDOVELLO, Danila; NOGUEIRA, Maurício Lacerda. Mayaro virus: A neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1109–1122, 2015. ISSN: 17460808. DOI: 10.2217/fvl.15.76.

DE PAULA SILVEIRA-LACERDA, Elisângela et al. Molecular epidemiological investigation of Mayaro virus in febrile patients from Goiania City, 2017–2018. **Infection, Genetics and Evolution**, [S. l.], v. 95, n. March, 2021. ISSN: 15677257. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104981.

DE THOISY, Benoît; GARDON, Jacques; ALBA SALAS, Rosa; MORVAN, Jacques; KAZANJI, Mirdad. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 9,

n. 10, p. 1326–1329, 2003. ISSN: 10806040. DOI: 10.3201/eid0910.030161.

DIAGNE, Cheikh Tidiane; BENGUE, Michèle; CHOUMET, Valérie; HAMEL, Rodolphe; POMPON, Julien; MISSÉ, Dorothée. Mayaro virus pathogenesis and transmission mechanisms. **Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1–23, 2020. ISSN: 20760817. DOI: 10.3390/pathogens9090738.

DIAS, Helver Gonçalves et al. Retrospective molecular investigation of Mayaro and Oropouche viruses at the human-animal interface in West-central Brazil, 2016–2018. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. e0277612, 2022. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0277612. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0277612>.

DOS SANTOS SOUZA MARINHO, Robson et al. Re-emergence of Mayaro virus and coinfection with chikungunya during an outbreak in the state of Tocantins/Brazil. **BMC Research Notes**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–7, 2022. ISSN: 17560500. ISBN: 1310402206153. DOI: 10.1186/s13104-022-06153-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13104-022-06153-6>.

DUARTE, Marina H. L.; GOULART, Vinícius D. L. R.; YOUNG, Robert J. Designing laboratory marmoset housing: What can we learn from urban marmosets? **Applied Animal Behaviour Science**, [S. l.], v. 137, n. 3–4, p. 127–136, 2012. ISSN: 01681591. DOI: 10.1016/j.applanim.2011.11.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168159111003698>.

DUNN, Jacob C.; CRISTÓBAL-AZKARATE, Jurgi. **New World Monkeys**. 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/new-world-monkeys-148121150/>. Acesso em: 8 abr. 2023.

DUPUIS-MAGUIRAGA, Laurence; NORET, Marion; BRUN, Sonia; LE GRAND, Roger; GRAS, Gabriel; ROQUES, Pierre. Chikungunya disease: Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 6, n. 3, 2012. ISSN: 19352727. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001446.

EL-SAYED, Amr; KAMEL, Mohamed. Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 27, n. 18, p. 22336–22352, 2020. ISSN: 16147499. DOI: 10.1007/s11356-020-08896-w.

ESPOSITO, Danillo Lucas Alves; FONSECA, Benedito Antonio Lopes Da. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 540–544, 2017. ISSN: 16784391. DOI: 10.1016/j.bjid.2017.06.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007. ISSN: 0037-8682. ISBN: 9788575413814. DOI: 10.1590/S0037-86822007000200016. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/dsg7h>.

FORSHEY, Brett M. et al. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in western south America, 2000-2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 4, n. 8, p. 2000–2007, 2010. ISSN: 19352735. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000787.

FOY, Niall J.; AKHRYMUK, Maryna; AKHRYMUK, Ivan; ATASHEVA, Svetlana; BOPDA-WAFFO, Alain; FROLOV, Ilya; FROLOVA, Elena I. Hypervariable Domains of nsP3 Proteins of New World and Old World Alphaviruses Mediate Formation of Distinct, Virus-Specific Protein Complexes. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 87, n. 4, p. 1997–2010, 2013. ISSN: 0022-538X. DOI: 10.1128/jvi.02853-12.

FREITAS, Ronaldo B.; DA ROSA, Jorge F. Travassos; LEDUC, James W.; PINHEIRO, Francisco P.; GABBAY, Yvone B.; MELLO, Wyller A. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 674–681, 1981. ISSN: 0002-9637. DOI: 10.4269/ajtmh.1981.30.674. Disponível em: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.1981.30.674>.

FRESHNEY, R. Ian. **Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications**. 6<sup>a</sup> ed., Danvers, MA. ISBN: 978-0-470-52812-9.

GAMBLE, H. R.; PATRASCU, I. V. Whole Blood, Serum, and Tissue Fluids in an Enzyme Immunoassay for Swine Trichinellosis. **Journal of Food Protection**, [S. l.], v. 59, n. 11, p. 1213–1217, 1996. ISSN: 0362028X. DOI: 10.4315/0362-028X-59.11.1213. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0362028X22053194>.

GANJIAN, Niloofar; RIVIERE-CINNAMOND, Ana. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, [S. l.], v. 44, p. 1–11, 2020. ISSN: 16805348. DOI: 10.26633/RPSP.2020.14.

GAROFF, Henrik; FRISCHAUF, Anne Marie; SIMONS, Kai; LEHRACH, Hans; DELIUS, Hajo. Nucleotide sequence of cDNA coding for semLiki forest virus membrane glycoproteins. **Nature**, [S. l.], v. 288, n. 5788, p. 236–241, 1980. ISSN: 00280836. DOI: 10.1038/288236a0.

GAROFF, Henrik; SJÖBERG, Mathilda; CHENG, R. Holland. Budding of alphaviruses. **Virus Research**, [S. l.], v. 106, n. 2 SPEC.ISS., p. 103–116, 2004. ISSN: 01681702. DOI: 10.1016/j.virusres.2004.08.008.

GARTNER, K. Commentary: Random variability of quantitative characteristics, an intangible epigenomic product, supporting adaptation. **International Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 342–346, 2012. ISSN: 0300-5771. DOI: 10.1093/ije/dyr221. Disponível em: <https://academic.oup.com/ije/article-lookup/doi/10.1093/ije/dyr221>.

GRIFFIN, Diane E. Alphaviruses. In: **Fields Virology**. 6<sup>a</sup> ed., Philadelphia. p. 651–686. ISBN: 1-4511-0563-0.

GUBLER, Duane J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 330–342, 2002. ISSN: 01884409. DOI: 10.1016/S0188-4409(02)00378-8.

HASSING, Robert Jan; LEPARC-GOFFART, Isabelle; BLANK, Sybrandus N.; THEVARAYAN, Subashini; TOLOU, Hugues; VAN DOORNUM, Gerard; VAN GENDEREN, Perry J. Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. **Journal of Infection**, [S. l.], v. 61, n. 4, p. 343–345, 2010. ISSN: 01634453. DOI: 10.1016/j.jinf.2010.06.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2010.06.009>.

HIGGS, Stephen; ZIEGLER, Sarah A. A nonhuman primate model of chikungunya disease. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 120, n. 3, p. 657–660, 2010. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI42392. Disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/42392>.

HOLLAND, John J.; MCLAREN, Leroy C. THE MAMMALIAN CELL-VIRUS RELATIONSHIP. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 109, n. 5, p. 487–504, 1959. ISSN: 1540-9538. DOI: 10.1084/jem.109.5.487. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/109/5/487/2633/THE-MAMMALIAN-CELL-VIRUS-RELATIONSHIP-II-ADSORPTION>.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Minas Gerais. [S. l.], 2021a. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/panorama>.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Belo Horizonte**. 2021b. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/belo-horizonte/panorama>.

IZURIETA, Ricardo O.; DELACURE, David A.; IZURIETA, Andres; HOARE, Ismael A.; ORTIZ, Miguel Reina. Mayaro virus: The jungle flu. **Virus Adaptation and Treatment**, [S. l.], v. 10, p. 9–17, 2018. ISSN: 11791624. DOI: 10.2147/VAAT.S128711.

JAVAN, Gulnaz T.; FINLEY, Sheree J.; TUOMISTO, Sari; HALL, Ashley; BENBOW, M. Eric; MILLS, DeEtta. An interdisciplinary review of the thanatomicrobiome in human decomposition. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 75–83, 2019. ISSN: 1547-769X.

DOI: 10.1007/s12024-018-0061-0. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12024-018-0061-0>.

JONES, Kate E.; PATEL, Nikkita G.; LEVY, Marc A.; STOREYGARD, Adam; BALK, Deborah; GITTLEMAN, John L.; DASZAK, Peter. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, [*S. l.*], v. 451, n. 7181, p. 990–993, 2008. ISSN: 14764687. DOI: 10.1038/nature06536.

JONES, Philip H.; MARIC, Martina; MADISON, Marisa N.; MAURY, Wendy; ROLLER, Richard J.; OKEOMA, Chioma M. BST-2/tetherin-mediated restriction of chikungunya (CHIKV) VLP budding is counteracted by CHIKV non-structural protein 1 (nsP1). **Virology**, [*S. l.*], v. 438, n. 1, p. 37–49, 2013. ISSN: 00426822. ISBN: 6176321972. DOI: 10.1016/j.virol.2013.01.010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004268221300041X>.

JOSE, Joyce; TAYLOR, Aaron B.; KUHN, Richard J. Spatial and temporal analysis of alphavirus replication and assembly in mammalian and mosquito cells. **mBio**, [*S. l.*], v. 8, n. 1, 2017. ISSN: 21507511. DOI: 10.1128/mBio.02294-16.

KASSAMBARA, Alboukadel. **ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready**. 2023. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=ggpubr>.

KUHN, Richard J. Togaviridae. In: **Fields Virology**. 6<sup>a</sup> ed., Philadelphia. p. 629–650. ISBN: 1-4511-0563-0.

KUNO, Goro; MACKENZIE, John S.; JUNGLEN, Sandra; HUBÁLEK, Zdeněk; PLYUSNIN, Alexander; GUBLER, Duane J. Vertebrate reservoirs of arboviruses: Myth, synonym of amplifier, or reality? **Viruses**, [*S. l.*], v. 9, n. 7, p. 1–28, 2017. ISSN: 19994915. DOI: 10.3390/v9070185.

LEDNICKY, John et al. Mayaro virus in child with acute febrile illness, Haiti, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, [*S. l.*], v. 22, n. 11, p. 2000–2002, 2016. ISSN: 10806059. DOI: 10.3201/eid2211.161015.

LEDUC, James W.; PINHEIRO, Francisco P.; PETERSON, Norman E.; HOCH, Alfred L. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [*S. l.*], v. 30, n. 3, p. 689–698, 1981. ISSN: 0002-9637. DOI: 10.4269/ajtmh.1981.30.689. Disponível em: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.1981.30.689>.

LIMA, William Gustavo; PEREIRA, Rosângela Santos; DA CRUZ NIZER, Waleska Stephanie; BRITO, Júlio César Moreira; GODÓI, Isabella Piassi; CARDOSO, Valbert Nascimento; FERNANDES, Simone Odília Antunes; FERREIRA, Jaqueline Maria Siqueira. Rate of exposure to Mayaro virus (MAYV) in Brazil between 1955 and 2018: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Virology**, [*S. l.*], v. 166, n. 2, p. 347–361, 2021. ISSN: 14328798. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1007/s00705-020-04889-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04889-9>.

LINDSEY, H. S.; CALISHER, C. H.; MATHEWS, J. H. Serum dilution neutralization test for California group virus identification and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, [*S. l.*], v. 4, n. 6, p. 503–510, 1976. ISSN: 0095-1137. DOI: 10.1128/jcm.4.6.503-510.1976. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.4.6.503-510.1976>.

LOBIGS, M.; ZHAO, H. X.; GAROFF, H. Function of SemLiki Forest virus E3 peptide in virus assembly: replacement of E3 with an artificial signal peptide abolishes spike heterodimerization and surface expression of E1. **Journal of Virology**, [*S. l.*], v. 64, n. 9, p. 4346–4355, 1990. ISSN: 0022-538X. DOI: 10.1128/jvi.64.9.4346-4355.1990.

LONG, Kanya C.; ZIEGLER, Sarah A.; THANGAMANI, Saravanan; HAUSSER, Nicole L.; KOCHER, Tadeusz J.; HIGGS, Stephen; TESH, Robert B. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [*S. l.*], v. 85, n. 4, p. 750–757, 2011. ISSN: 00029637. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.11-0359.

LORENTE, Sylvie; HAUTEFEUILLE, Mathieu; SANCHEZ-CEDILLO, Aczel. The liver, a functionalized vascular structure. **Scientific Reports**, [*S. l.*], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. ISSN:

20452322. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1038/s41598-020-73208-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73208-8>.

LORENZ, Camila; FREITAS RIBEIRO, Ana; CHIARAVALLLOTI-NETO, Francisco. Mayaro virus distribution in South America. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 198, n. July, p. 105093, 2019. ISSN: 18736254. DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.105093. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105093>.

LULLA, Aleksei; LULLA, Valeria; MERITS, Andres. Macromolecular Assembly-Driven Processing of the 2/3 Cleavage Site in the Alphavirus Replicase Polyprotein. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 553–565, 2012. ISSN: 0022-538X. DOI: 10.1128/jvi.05195-11.

MACKAY, Ian M.; ARDEN, Katherine E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 724–734, 2016. ISSN: 1769714X. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.10.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.10.007>.

MAIA, L. M. S.; BEZERRA, M. C. F.; COSTA, M. C. S.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M. E. B.; RIBEIRO, A. L. M.; MIYAZAKI, R. D.; SLHESARENKO, R. D. Natural vertical infection by dengue virus serotype 4, Zika virus and Mayaro virus in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 437–442, 2019. ISSN: 13652915. DOI: 10.1111/mve.12369.

MARSH, Mark; HELENIUS, Ari. Virus entry: Open sesame. **Cell**, [S. l.], v. 124, n. 4, p. 729–740, 2006. ISSN: 00928674. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.007.

MEJÍA, Carla Ruth; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Tropical arthritogenic alphaviruses. **Reumatologia Clínica**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 97–105, 2018. ISSN: 18851398. DOI: 10.1016/j.reuma.2017.01.006.

MELANCON, P.; GAROFF, H. Processing of the SemLiki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 61, n. 5, p. 1301–1309, 1987. ISSN: 0022-538X. DOI: 10.1128/jvi.61.5.1301-1309.1987.

MENDONÇA, Diogo C.; REIS, Erik V. S.; ARIAS, Nídia E. C.; VALENCIA, Hugo J.; BONJARDIM, Cláudio A. A study of the MAYV replication cycle: Correlation between the kinetics of viral multiplication and viral morphogenesis. **Virus Research**, [S. l.], v. 323, n. October 2022, 2023. ISSN: 18727492. DOI: 10.1016/j.virusres.2022.199002.

MOURÃO, Maria Paula Gomes; BASTOS, Michele De Souza; DE FIGUEIREDO, Regina Pinto; GIMAQUE, João Bosco Lima; DOS SANTOS GALUSSO, Elizabeth; KRAMER, Valéria Munique; DE OLIVEIRA, Cintia Mara Costa; NAVECA, Felipe Gomes; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Mayaro fever in the city of manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 42–46, 2012. ISSN: 15303667. DOI: 10.1089/vbz.2011.0669.

NAVARRETE-ESPINOSA, Joel; GÓMEZ-DANTÉS, Héctor. Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social. [S. l.], p. 347–353, 2006.

NAVECA, Felipe Gomes; DO NASCIMENTO, Valdinete Alves; DE SOUZA, Victor Costa; NUNES, Bruno Tardelli Diniz; RODRIGUES, Daniela Sueli Guerreiro; DA COSTA VASCONCELOS, Pedro Fernando. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and oropouche-like viruses. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 112, n. 7, p. 510–513, 2017. ISSN: 16788060. DOI: 10.1590/0074-02760160062.

OMAR, Adames; KOBLET, Hans. SemLiki forest virus particles containing only the E1 envelope glycoprotein are infectious and can induce cell-cell fusion. **Virology**, [S. l.], v. 166, n. 1, p. 17–23, 1988. ISSN: 10960341. DOI: 10.1016/0042-6822(88)90141-9.

PAGLIA, A.P., FONSECA, G.A.B. DA, RYLANDS, A. B., HERRMANN, G., AGUIAR, L. M. S., CHIARELLO, A. G., LEITE, Y. L. R., COSTA, L. P., SICILIANO, S., KIERULFF, M. C. M., MENDES, S. L., TAVARES, V. DA C., MITTERMEIER, R. A. & Patton J. L. **Lista anotada dos mamíferos do Brasil**. [s.l.: s.n.]. 2–76 p. ISBN: 978-1-934151-49-5. Disponível em:

[https://www.conservation.org/docs/default-source/brasil/annotated\\_checklist\\_of\\_brazilian\\_mammals\\_2nd\\_edition.pdf](https://www.conservation.org/docs/default-source/brasil/annotated_checklist_of_brazilian_mammals_2nd_edition.pdf).

PAHO, Pan American Health Organization; WHO, World Health Organization. Mayaro Fever. **Epidemiological Alert**, [S. l.], n. May, p. 1–5, 2019.

PANIZ-MONDOLFI, Alberto E.; RODRIGUEZ-MORALES, Alfonso J.; BLOHM, Gabriela; MARQUEZ, Marilianna; VILLAMIL-GOMEZ, Wilmer E. ChikDenMaZika Syndrome: The challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–4, 2016. ISSN: 14760711. DOI: 10.1186/s12941-016-0157-x.

PAUVOLID-CORRÊA, Alex; SOARES JULIANO, Raquel; CAMPOS, Zilca; VELEZ, Jason; NOGUEIRA, Rita Maria Ribeiro; KOMAR, Nicholas. Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 110, n. 1, p. 125–133, 2015. ISSN: 16788060. ISBN: 0074027601403. DOI: 10.1590/0074-02760140383.

PERALTA, P. H.; MONTGOMERY, G. G.; SEYMOUR, C. Serologic Evidence of Natural Togavirus Infections in Panamanian Sloths and Other Vertebrates \*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 854–861, 1983. ISSN: 0002-9637. DOI: 10.4269/ajtmh.1983.32.854. Disponível em: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.1983.32.854>.

PEREIRA, Thiago Nunes; CARVALHO, Fabiano Duarte; DE MENDONÇA, Silvana Faria; ROCHA, Marcele Neves; MOREIRA, Luciano Andrade. Vector competence of aedes aegypti, aedes albopictus, and culex quinquefasciatus mosquitoes for Mayaro virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 1–13, 2020. ISSN: 19352735. ISBN: 1111111111. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007518.

RASULOVA, Madina et al. A High-Throughput Yellow Fever Neutralization Assay. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 10, n. 3, 2022. ISSN: 2165-0497. DOI: 10.1128/spectrum.02548-21. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.02548-21>.

REZENDE, Izabela Maurício De et al. Yellow Fever Virus Genotyping Tool and Investigation of Suspected Adverse Events Following Yellow Fever Vaccination. **Vaccines**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 206, 2019. ISSN: 2076-393X. DOI: 10.3390/vaccines7040206. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-393X/7/4/206>.

RICHARDSON, Barbra A.; OVERBAUGH, Julie. Basic Statistical Considerations in Virological Experiments. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 79, n. 2, p. 669–676, 2005. ISSN: 0022-538X. DOI: 10.1128/JVI.79.2.669-676.2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.79.2.669-676.2005>.

RULLI, Nestor E.; ROLPH, Michael S.; SRIKIATKHACHORN, Anon; ANANTAPREECHA, Surapee; GUGLIELMOTTI, Angelo; MAHALINGAM, Suresh. Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute chikungunya virus disease by bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein-1 synthesis. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 204, n. 7, p. 1026–1030, 2011. ISSN: 00221899. DOI: 10.1093/infdis/jir470.

RUSSELL, Philip K.; NISALAK, Ananda; SUKHAVACHANA, Pairatana; VIVONA, Stefano. A Plaque Reduction Test for Dengue Virus Neutralizing Antibodies. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 99, n. 2, p. 285–290, 1967. ISSN: 0022-1767. DOI: 10.4049/jimmunol.99.2.285. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/99/2/285/68866/A-Plaque-Reduction-Test-for-Dengue-Virus>.

SACCHETTO, Lívia et al. Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. e0008658, 2020. ISSN: 1935-2735. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008658. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0008658>.

SAISAWANG, Chonticha; SILLAPEE, Pornpan; SINSIRIMONGKOL, Kwanhathai; UBOL, Sukathida; SMITH, Duncan R.; KETTERMAN, Albert J. Full length and protease domain activity of

chikungunya virus nsP2 differ from other alphavirus nsP2 proteases in recognition of small peptide substrates. **Bioscience Reports**, [S. l.], v. 35, p. 1–9, 2015. ISSN: 15734935. DOI: 10.1042/BSR20150086.

SAMPAIO-SILVA, Fernanda; MAGALHÃES, Teresa; CARVALHO, Félix; DINIS-OLIVEIRA, Ricardo Jorge; SILVESTRE, Ricardo. Profiling of RNA Degradation for Estimation of Post Mortem Interval. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. e56507, 2013. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0056507. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0056507>.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância de Epizootias em Primatas Não-Humanos**. 1ª ed., Brasília. 7–53 p. ISBN: 85-334-0975-3.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **FEBRE DO MAYARO - VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA**. 2023a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-do-Mayaro/vigilancia>. Acesso em: 9 abr. 2023.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022 - vol 54**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01>.

SHIN, Gye-hwa; YOST, Samantha A.; MILLER, Matthew T.; ELROD, Elizabeth J.; GRAKOU, Arash; MARCOTRIGIANO, Joseph. Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 109, n. 41, p. 16534–16539, 2012. ISSN: 00278424. DOI: 10.1073/pnas.1210418109.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. The Journal of Clinical Investigation Ecology and epidemiology. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI84417>.

SIMÕES, Marisol; CAMACHO, Luiz Antonio B.; YAMAMURA, Anna M. Y.; MIRANDA, Emily Hime; CAJARAVILLE, Ana Carolina R. A.; DA SILVA FREIRE, Marcos. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. **Biologicals**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 399–404, 2012. ISSN: 10451056. DOI: 10.1016/j.biologicals.2012.09.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105612001467>.

SMITH, Thomas J.; CHENG, R. Holland; OLSON, Norman H.; PETERSON, Peter; CHASE, Elaine; KUHN, Richard J.; BAKER, Timothy S. Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 92, n. 23, p. 10648–10652, 1995. ISSN: 00278424. DOI: 10.1073/pnas.92.23.10648.

SOLIGNAT, Maxime; GAY, Bernard; HIGGS, Stephen; BRIANT, Laurence; DEVAUX, Christian. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, [S. l.], v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009. ISSN: 00426822. ISBN: 8015815967. DOI: 10.1016/j.virol.2009.07.024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682209004565>.

SPUUL, Pirjo; BALISTRERI, Giuseppe; KÄÄRIÄINEN, Leevi; AHOLA, Tero. Phosphatidylinositol 3-Kinase-, Actin-, and Microtubule-Dependent Transport of SemLiki Forest Virus Replication Complexes from the Plasma Membrane to Modified Lysosomes. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 84, n. 15, p. 7543–7557, 2010. ISSN: 0022-538X. DOI: 10.1128/jvi.00477-10.

SREEJITH, R. et al. Mapping interactions of Chikungunya virus nonstructural proteins. **Virus Research**, [S. l.], v. 169, n. 1, p. 231–236, 2012. ISSN: 01681702. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.08.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.08.006>.

- SRIHONGSE, S.; STACY, H. G.; GAULD, J. R. A survey to assess potential human disease hazards along proposed sea level canal routes in Panamá and Colombia. IV. Arbovirus surveillance in man. **Military medicine**, [*S. l.*], v. 138, n. 7, p. 422–6, 1973. ISSN: 0026-4075. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4198483>.
- STRAUSS, James H.; STRAUSS, Ellen G. The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Reviews**, [*S. l.*], v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994. ISSN: 01460749. DOI: 10.1128/membr.58.3.491-562.1994.
- TALARMIN, A. et al. Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification, and seroprevalence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [*S. l.*], v. 59, n. 3, p. 452–456, 1998. ISSN: 0002-9637. DOI: 10.4269/ajtmh.1998.59.452. Disponível em: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.1998.59.452>.
- TESH, Robert B. et al. Mayaro virus disease: An emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clinical Infectious Diseases**, [*S. l.*], v. 28, n. 1, p. 67–73, 1999. ISSN: 10584838. DOI: 10.1086/515070.
- THEILACKER, Christian; HELD, Jürgen; ALLERING, Ludger; EMMERICH, Petra; SCHMIDT-CHANASIT, Jonas; KERN, Winfried V.; PANNING, Marcus. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **BMC Infectious Diseases**, [*S. l.*], v. 13, n. 1, p. 2011–2014, 2013. ISSN: 14712334. DOI: 10.1186/1471-2334-13-369.
- TORRES, Jaime R.; RUSSELL, Kevin L.; VASQUEZ, Clovis; BARRERA, Roberto; TESH, Robert B.; SALAS, Rosalba; WATTS, Douglas M. Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, [*S. l.*], v. 10, n. 7, p. 1304–1306, 2004. ISSN: 10806040. DOI: 10.3201/eid1007.030860.
- TRYLAND, Morten; HANDELAND, Kjell; BRATBERG, Anna Marie; SOLBAKK, Inge Tom; OKSANEN, Antti. Persistence of antibodies in blood and body fluids in decaying fox carcasses, as exemplified by antibodies against *Microsporium canis*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, [*S. l.*], v. 48, n. 1, p. 1–4, 2006. ISSN: 0044605X. DOI: 10.1186/1751-0147-48-10.
- VALENTINE, Matthew John; MURDOCK, Courtney Cuin; KELLY, Patrick John. Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. **Parasites and Vectors**, [*S. l.*], v. 12, n. 1, p. 1–18, 2019. ISSN: 17563305. DOI: 10.1186/s13071-019-3732-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3732-0>.
- VASCONCELOS, PEDRO F. C; TRAVASSOS DA ROSA, AMELIA P. A; PINHEIRO, FRANCISCO P; SHOPE, ROBERT E; DEGALLIER, NICOLAS; TRAVASSOS DA ROSA, Elizabeth S. **Arboviruses Pathogenic for man in Brazil**. Belém: Evandro Chagas Institute, 1998. ISBN: 8586784-01-X.
- VASILJEVA, Lidia; VALMU, Leena; KÄÄRIÄINEN, Leevi; MERITS, Andres. Site-specific Protease Activity of the Carboxyl-terminal Domain of SemLiki Forest Virus Replicase Protein nsP2. **Journal of Biological Chemistry**, [*S. l.*], v. 276, n. 33, p. 30786–30793, 2001. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.M104786200.
- VIDAL, José. Individual differences in the antibody response of inbred C57Bl/6J mice and their relation to individual differences in open-field behavior. **Anuario de Psicología**, [*S. l.*], v. 47, n. 1, p. 17–22, 2017. ISSN: 00665126. DOI: 10.1016/j.anpsic.2017.05.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0066512617300041>.
- WEAVER, Scott C.; CHARLIER, Caroline; NIKOS, Vasilakis; LECUIT, Marc. Viral, Other Emerging Vector-borne. **Annu Rev Med.**, [*S. l.*], v. 69, p. 395–408, 2018. DOI: 10.1146/annurev-med-050715-105122.Zika.
- WEAVER, Scott C.; LECUIT, Marc. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, [*S. l.*], v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015. ISSN: 0028-

4793. DOI: 10.1056/nejmra1406035.

WEAVER, Scott C.; REISEN, William K. **Present and future arboviral threats**. [s.l.: s.n.]. 328–345 p. ISSN: 01663542. ISBN: 4097472429. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008.

WOLFE, Nathan D.; ESCALANTE, Ananias A.; KARESH, William B.; KILBOURN, Annelisa; SPIELMAN, Andrew; LAL, Altaf A. Wild primate populations in emerging infectious disease research: The missing link? **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 149–158, 1998. ISSN: 10806040. DOI: 10.3201/eid0402.980202.

ZUCHI, Nayara; DA SILVA HEINEN, Letícia Borges; DOS SANTOS, Marcelo Adriano Mendes; PEREIRA, Fernanda Carla; SLHESARENKO, Renata Dezengrini. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 109, n. 6, p. 820–823, 2014. ISSN: 16788060. DOI: 10.1590/0074-0276140108.

## 9. ANEXOS

### ANEXO A - Infecção de animais experimentais

Camundongos *C57 black* (C57BL/6) foram adquiridos, com permissão do CEUA/UFMG, e acondicionados em gaiolas próprias para manejo desses animais, com condições ambientais apropriadas, bem como com disponibilidade de alimento e água periodicamente trocados. A manutenção e infecção dos animais foi executada em colaboração com o Dr. Erik Reis e a aluna de mestrado Thais Costa.

Esses animais foram infectados, em coortes de seis, com sobrenadante de células Vero contendo  $2 \times 10^5$  unidades formadoras de placas (PFU) de MAYV, por via intraplantar. Para tal, foram utilizadas seringas de 0,3 mL (BD Ultra-Fine™, EUA), sendo aplicado o equivalente a 10  $\mu$ L na área intraplantar dos animais. Também foram utilizados animais *mock*, divididos em grupos de seis, que foram inoculados com sobrenadante de células Vero não infectadas, seguindo os mesmos parâmetros utilizados para os animais infectados.

Os animais foram monitorados periodicamente por 21 dias, a partir do momento da infecção, com o intuito de observar eventuais sinais clínicos graves que provocassem sofrimento desnecessário aos animais. Ao final desse período, os animais infectados, bem como os animais *mock*, foram eutanasiados mediante administração de aproximadamente, 0,2 mL (para cada 20 g de peso do animal) de uma solução elaborada a partir de: 1,0 mL de Cetamina 10% (100mg/kg); 0,5 mL de Cloridrato de Xilazina 2% (10 mg/kg) e 8,5 mL de água para injeção. Após confirmação de que cada animal estava completamente sedado, foi executado deslocamento cervical com auxílio de pinça cirúrgica posicionada na base do crânio, por tração da cauda.

Então, para um dos grupos de animais infectados, foi feita punção cardíaca, seguida de centrifugação a 1300g por dez minutos, para obtenção de soro contendo anticorpos, que foram utilizados como controles nos experimentos de neutralização. Em seguida, o fígado de cada um foi coletado e armazenado em microtubos de 1,5 mL, a -20°C. Para o outro grupo de animais infectados, o fígado foi coletado sem que houvesse coleta de sangue por meio de punção cardíaca prévia, sendo os órgãos armazenados nas mesmas condições, até processamento. Nos animais *mock*, foi feita coleta de fígado sem que houvesse coleta de sangue. Não foi feita punção cardíaca nos animais para mimetizar as condições em que uma carcaça é encontrada.

## ANEXO B - Documentos CEUA



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

## CEUA

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS EM ANIMAIS SILVESTRES E DOMÉSTICOS EM MINAS GERAIS", protocolo do CEUA: 98/2017 sob a responsabilidade de Betania Paiva Drumond que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 26/09/2022.

Vigência da Autorização	26/06/2022 a 25/06/2024
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Espécie silvestre brasileira / ----
Nº de animais	540
Peso/Idade	234mg / 2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de peça (amostra biológica) coletadas na rotina (sangue, swab oral, swab anal) por veterinários do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primates não humanos, gambás e outros mamíferos e roedores
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
<b>*Espécie/linhagem</b>	Espécie silvestre brasileira / ----
Nº de animais	200
Peso/Idade	2kg / 2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de amostras (sangue, swab oral e anal) coletados na rotina do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Aves
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
<b>*Espécie/linhagem</b>	Primata não-humano / ---

Nº de animais	490
Peso/Idade	5kg / 2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Carcças recebidas no Laboratório de Zoonoses da da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOON-BH)
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1

Atividade(s)	Recebimento de carcaça ou peça (amostra biológica de tecidos coletada de carcaças- fragmentos de vísceras e órgãos, swab oral e anal) coletados na rotina do CCZ-BH
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primates nao humanos
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do interior de Minas Gerais
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	100
Peso/Idade	33mg / 4(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais usados no Laboratório de Zoonoses da da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOON- BH)
<b>*Espécie/linhagem</b>	Morcego / Não definida
Nº de animais	300
Peso/Idade	100g / 12(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais recebidas do CCZ-BH
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Coleta de carcaças recebidas no CCZ
Espécie/Grupos Taxonômicos	Mamífero/morcego
Local(is)	Grande Belo Horizonte

<b>Dados dos animais agrupados (uso do biotério)</b>	
<b>*Espécie/linhagem</b>	Morcego / Não definida
Nº de animais	300
Idade	12(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais recebidas do CCZ-BH
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Coleta de carcaças recebidas no CCZ
Espécie/Grupos Taxonômicos	Mamífero/morcego
Local(is)	Grande Belo Horizonte
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	100
Idade	4(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais usados no Laboratório de Zoonoses da da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOON- BH)
<b>*Espécie/linhagem</b>	Espécie silvestre brasileira / ----
Nº de animais	200
Idade	2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de amostras (sangue, swab oral e anal) coletados na rotina do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Aves

Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
<b>*Espécie/linhagem</b>	Espécie silvestre brasileira / ----
Nº de animais	540
Idade	2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de peça (amostra biológica) coletadas na rotina (sangue, swab oral, swab anal) por veterinários do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primatas não humanos, gambás e outros mamíferos onívoros
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
<b>*Espécie/linhagem</b>	Primata não-humano / ---
Nº de animais	490
Idade	2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças recebidas no Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOON-BH)
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de carcaça ou peça (amostra biológica de tecidos coletada de carcaças- fragmentos de vísceras e órgãos, swab oral e anal) coletados na rotina do CCZ-BH
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primatas não humanos
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do interior de Minas Gerais

## Considerações posteriores:

26/09/2022	Pedido de Prorrogação Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 26/09/2022. Validade: 26/06/2022 à 25/06/2024.
26/06/2017	Aprovado na reunião do dia 26/06/2017. Validade: 26/06/2017 à 25/06/2022

Belo Horizonte, 11/04/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516

[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS EM ANIMAIS SILVESTRES E DOMÉSTICOS EM MINAS GERAIS", protocolo do CEUA: 98/2017 sob a responsabilidade de Betania Paiva Drumond que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 26/09/2022.

Vigência da Autorização	26/06/2022 a 25/06/2024
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Espécie silvestre brasileira / ----
Nº de animais	540
Peso/Idade	234mg / 2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de peça (amostra biológica) coletadas na rotina (sangue, swab oral, swab anal) por veterinários do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primates não humanos, gambás e outros mamíferos e roedores
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
<b>*Espécie/linhagem</b>	Espécie silvestre brasileira / ----
Nº de animais	200
Peso/Idade	2kg / 2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de amostras (sangue, swab oral e anal) coletados na rotina do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Aves
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
<b>*Espécie/linhagem</b>	Primata não-humano / ---
Nº de animais	490
Peso/Idade	5kg / 2(anos)
Sexo	indiferente

Origem	Carcças recebidas no Laboratório de Zoonoses da da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOON-BH)
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1

Atividade(s)	Recebimento de carcaça ou peça (amostra biológica de tecidos coletada de carcaças- fragmentos de vísceras e órgãos, swab oral e anal) coletados na rotina do CCZ-BH
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primatas nao hurmanos
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do interior de Minas Gerais
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	100
Peso/Idade	33mg / 4(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais usados no Laboratório de Zoonoses da da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOON- BH)
<b>*Espécie/linhagem</b>	Morcego / Não definida
Nº de animais	300
Peso/Idade	100g / 12(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais recebidas do CCZ-BH
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Coleta de carcaças recebidas no CCZ
Espécie/Grupos Taxonômicos	Mamífero/morcego
Local(is)	Grande Belo Horizonte

<b>Dados dos animais agrupados (uso do biotério)</b>	
<b>*Espécie/linhagem</b>	Morcego / Não definida
Nº de animais	300
Idade	12(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais recebidas do CCZ-BH
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Coleta de carcaças recebidas no CCZ
Espécie/Grupos Taxonômicos	Mamífero/morcego
Local(is)	Grande Belo Horizonte
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	100
Idade	4(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças de animais usados no Laboratório de Zoonoses da da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOON- BH)
<b>*Espécie/linhagem</b>	Espécie silvestre brasileira / ----
Nº de animais	200
Idade	2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de amostras (sangue, swab oral e anal) coletados na rotina do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Aves

Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
<b>*Espécie/linhagem</b>	Espécie silvestre brasileira / ----
Nº de animais	540
Idade	2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Animais recebidos no CETAS-IBAMA
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de alíquota de peça (amostra biológica) coletadas na rotina (sangue, swab oral, swab anal) por veterinários do CETAS-IBAMA
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primatas não humanos, gambás e outros mamíferos erodores
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do entorno
<b>*Espécie/linhagem</b>	Primata não-humano / ---
Nº de animais	490
Idade	2(anos)
Sexo	indiferente
Origem	Carcaças recebidas no Laboratório de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte (LZOOM-BH)
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	1
Atividade(s)	Recebimento de carcaça ou peça (amostra biológica de tecidos coletada de carcaças-fragmentos de vísceras e órgãos, swab oral e anal) coletados na rotina do CCZ-BH
Espécie/Grupos Taxonômicos	Primatas nao hurmanos
Local(is)	Belo Horizonte e cidades do interior de Minas Gerais

Considerações posteriores:

26/09/2022	Pedido de Prorrogação Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 26/09/2022. Validade: 26/06/2022 à 25/06/2024.
26/06/2017	Aprovado na reunião do dia 26/06/2017. Validade:26/06/2017 à 25/06/2022

Belo Horizonte, 11/04/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de um teste serológico, ensaio de neutralização viral (PRNT), utilizando órgãos sólidos de animais", protocolo do CEUA: 33/2021 sob a responsabilidade de Betania Paiva Drumond que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/03/2021.

Vigência da Autorização	08/03/2021 a 07/03/2026
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / A129
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Microbiologia ICB
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / A129
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Microbiologia ICB
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / A129
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Microbiologia ICB
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / A129
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Microbiologia ICB
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente

Origem	Bioterio Central
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / C57BL/6
Nº de animais	6

Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Central
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Central
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Central

<b>Dados dos animais agrupados (uso do biotério)</b>	
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / A129
Nº de animais	12
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Microbiologia ICB
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / A129
Nº de animais	12
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Microbiologia ICB
<b>*Espécie/linhagem</b>	Banco de amostras / C57BL/6
Nº de animais	24
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Central

Considerações posteriores:

08/03/2021	Aprovado na reunião on-line do dia 08/03/2021. Validade: 08/03/2021 à 07/03/2026
------------	---

Belo Horizonte, 11/04/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de um teste sorológico, ensaio de neutralização viral (PRNT), utilizando órgãos sólidos de animais e comparação com teste padrão usando soro", protocolo do CEUA: 176/2021 sob a responsabilidade de Betania Paiva Drumond que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 23/08/2021.

Vigência da Autorização	23/08/2021 a 22/08/2026
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (a129)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (a129)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (a129)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (a129)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / C57BL/6

Nº de animais	6
---------------	---

Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Central UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Central UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Central UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (C57Bl6)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (C57Bl6)
Nº de animais	6
Peso/Idade	25g / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas

<b>Dados dos animais agrupados (uso do biotério)</b>	
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / C57BL/6
Nº de animais	24
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Bioterio Central UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (a129)
Nº de animais	24
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo Knockout / IFNAR-/- (C57Bl6)
Nº de animais	12
Idade	3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunologia das Doenças Infecciosas

Considerações posteriores:

23/08/2021	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 23/08/2021. Validade: 23/08/2021 à 22/08/2026.
------------	---

Belo Horizonte, 11/04/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite  
CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de  
Minas Gerais Avenida Antônio  
Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º  
Andar, Sala 2005 31270-901 –  
Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) -  
[cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

Anexo C – Publicações em periódicos

**Title**

Ecological drivers of sustained enzootic yellow fever virus transmission in Brazil, 2017-2021

**Short title:** Ecological drivers of enzootic yellow fever in Brazil

**Authors:** Natalia Ingrid Oliveira Silva<sup>1,#\*</sup>, Gregory F Albery<sup>2a,2b\*</sup>, Matheus Soares Arruda<sup>1\*\*</sup>, Gabriela Garcia Oliveira<sup>1\*\*</sup>, Thaís Alkifeles Costa<sup>1</sup>, Érica Munhoz de Mello<sup>1,3</sup>, Gabriel Dias Moreira<sup>1</sup>, Erik Vinicius Reis<sup>1</sup>, Simone Agostinho da Silva<sup>3</sup>, Marlise Costa Silva<sup>3</sup>, Munique Guimarães de Almeida<sup>3</sup>, Daniel J. Becker<sup>4</sup>, Colin J. Carlson<sup>5,2a</sup>, Nikos Vasilakis<sup>6-8</sup>, Kathryn Hanley<sup>9</sup>, Betânia Paiva Drumond<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2a</sup>Department of Biology, Georgetown University, Washington, DC

<sup>2b</sup>Leibniz Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Berlin, Germany

<sup>3</sup>Laboratório de Zoonoses - Centro de Controle de Zoonoses, Prefeitura de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup>Department of Biology, University of Oklahoma, Norman OK USA

<sup>5</sup> Center for Global Health Science and Security, Georgetown University, Washington, D.C.

<sup>6</sup> Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, 301 University Blvd., Galveston, TX 77555-0609, USA

<sup>7</sup>Center for Vector-Borne and Zoonotic Diseases, The University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555-0609, USA

<sup>8</sup> Institute for Human Infection and Immunity, University of Texas Medical Branch, 301 University Blvd., Galveston, TX 77555-0610, USA

<sup>9</sup>Department of Biology, New Mexico State University, Las Cruces 88003; 575 312 3850

\*These authors share the first authorship. \*\* These authors contributed equally to this work.

# Current affiliation: Department of Pathology, University of Texas Medical Branch,  
Galveston, TX 77555-0609, USA

**Correspondence to:** Betânia Paiva Drumond, Department of Microbiology, Universidade  
Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil [betaniadrumond@gmail.com](mailto:betaniadrumond@gmail.com),  
[betaniadrumond@ufmg.br](mailto:betaniadrumond@ufmg.br)

**Abstract:**

Beginning December 2016, sylvatic yellow fever (YF) outbreaks spread into southeastern Brazil, and Minas Gerais state experienced two sylvatic YF waves (2017 and 2018). Following these massive YF waves, we screened 187 free-living non-human primate (NHPs) carcasses collected throughout the state between January 2019 and June 2021 for YF virus (YFV) using qPCR. One sample belonging to a *Callithrix*, collected in June 2020, was positive for YFV. The viral strain belonged to the same lineage associated with 2017-2018 outbreaks, showing the continued enzootic circulation of YFV in the state. Next, using data from 781 NHPs carcasses collected in 2017-18, we used generalized additive mixed models (GAMMs) to identify the spatiotemporal and host-level drivers of YFV infection and intensity (an estimation of genomic viral load in the liver of infected NHP). Our GAMMs explained 65% and 68% of variation in virus infection and intensity, respectively, and uncovered strong temporal and spatial patterns for YFV infection and intensity. NHP infection was higher in the eastern part of Minas Gerais state, where 2017-2018 outbreaks affecting humans and NHPs were concentrated. The odds of YFV infection were significantly lower in NHPs from urban areas than from urban-rural or rural areas, while infection intensity was significantly lower in NHPs from urban areas or the urban-rural interface relative to rural areas. Both YFV infection and intensity were higher during the warm/rainy season compared to the cold/dry season. The higher YFV intensity in NHPs in warm/rainy periods could be a result of higher exposure to vectors and/or higher virus titers in vectors during this time resulting in the delivery of a higher virus dose and higher viral replication levels within NHPs. Further studies are needed to better test this hypothesis and further compare the dynamics of YFV enzootic cycles between different seasons.

## Author Summary

In 2017 and 2018 massive sylvatic yellow fever (YF) outbreaks took place in Minas Gerais Brazil. To investigate yellow fever virus (YFV) circulation following these massive outbreaks, we investigated samples from 187 free-living non-human primate (NHPs) collected between January 2019 and June 2021. One sample belonging to a *Callithrix*, collected in June 2020 was positive for YFV. This virus was closely related to YFV from previous outbreaks (2017-2018) showing the continued enzootic circulation of YFV in the state. Next, we investigated the drivers of YFV infection and intensity (an estimation of viral load in each infected NHP) during the 2017-18 outbreaks. The odds of YFV infection in NHPs were lower in urban areas compared to rural ones as expected in sylvatic cycles. There were strong temporal and spatial patterns were observed for YFV infection and intensity, especially in the eastern part of Minas Gerais state. The higher YFV infection and intensity observed during the warm/rainy season (as opposed to the cold/dry one) could be related to higher exposure to vectors and/or higher virus titers in vectors during this time. The possible delivery of a higher virus dose in NHPs could lead to higher viral replication levels within NHPs explaining the higher intensity of infection during warm/rainy season. Further studies are needed to better test this hypothesis and further compare the dynamics of YFV enzootic cycles between different seasons.

## Keywords:

Arbovirus, flavivirus, yellow fever virus, epizootics, non-human primates, monkeys, zoonosis, surveillance, enzootic cycle, sylvatic yellow fever, Generalized additive mixed models, GAMMs



**Introduction:**

Mosquito-borne yellow fever virus (YFV; family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) originated in tropical and subtropical areas of Africa and was introduced to South America after European colonization (1). YFV was almost certainly transported to the Americas via infected humans or *Aedes aegypti* mosquitoes, and while the urban cycle of yellow fever (YF) in South America continued to be maintained by *Ae. aegypti* (2–4), the virus also spilled back into non-human primates (NHPs) and arboreal, hematophagous, primatophilic mosquitoes of the genera *Haemagogus* and *Sabethes* (3). In Brazil, the urban cycle of YF has not been documented in Brazil since 1942 (3,4). However, sylvatic YF cycles have persisted within the Brazilian Amazon Basin (2–4) with periodic expansions towards the Central and Southern regions of the country during the warm and rainy seasons (December to May in Southeast Brazil) (3–5). The YF surveillance program in Brazil focuses on the investigation of suspected human cases, NHP epizootics, and entomological surveillance (6), with annual reports spanning the typical transmission seasons of the disease (July to June of the following year).

In recent decades, many experts have warned that new urban outbreaks could arise from sylvatic YFV cycles in South America and deplete the limited supply of YFV vaccine (1,7–10). Although these fears have not yet been realized in their entirety, between 2016 and 2018 Brazil faced the largest sylvatic YF outbreak since the eradication of urban YF. The virus spread rapidly in the Southeast region of the country, reaching densely populated areas, causing thousands of cases and deaths in both NHPs and humans, and raising the specter of full-blown urban transmission mediated by *Ae. aegypti* (3,4,11–15). Between 2016 - 2019, 2,251 YF human cases were confirmed in the Southeast region of Brazil, with 772 deaths reported (3,4,16). Additionally, during this period, approximately 15,000 NHPs deaths were reported in the country, with the confirmation of at least 1,500 cases linked to YFV (3).

Although YF waned in Minas Gerais state during 2018, YF cases were confirmed in humans or NHPs in São Paulo, Paraná and Santa Catarina states in 2019(3,16–18). YF epizootics have been confirmed outside the Brazilian Amazon Basin during the YF monitoring periods of Jul 2020/Jun 2021 (Midwest: Goiás state and Federal District; Southeast: São Paulo state, and South region: Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul states) (19), and Jul 2021/Jun 2022 (South: Santa Catarina, and Rio Grande do Sul states, and Southeast region: Minas Gerais state) (20).

YF epizootics in NHPs often precede and overlap the occurrence of human cases (3,21), as was observed in the recent outbreaks in Brazil (22,23). Although neotropical NHPs are highly susceptible to YFV infection and sentinels for viral circulation, the susceptibility of different NHP genera and species to YFV infection is still poorly characterized (3). Some insights have been provided by investigations of NHPs during the recent epizootics in Brazil. *Callithrix* spp. (marmoset) specimens showed lower genomic viral loads (estimated by the threshold for cycle quantification value (Cq) in RT-PCR assays) compared to *Alouatta* spp. (howler monkey), *Callicebus* spp. (titi monkey) (11,24–26), and *Sapajus* spp. (capuchin monkey) specimens (24–26). Histopathological and immunohistochemical analyses also suggested differences among NHP genera in susceptibility to YFV infection (24,26) and mortality rates to the virus (26). *Alouatta* was the most affected group of NHP, with the highest proportional YF-related mortality rate. *Callicebus*, *Alouatta*, and *Sapajus* had similar genomic YFV loads, but the highest proportional mortality rate was observed in *Alouatta* infections. *Callithrix* had the lowest genomic viral loads and proportionally lowest mortality rates (26).

NHP population dynamics and susceptibility to viral infection play key roles in viral transmission and spillover (27), as do the ecological dynamics and interactions between YFV and its vectors, hosts, and abiotic factors (4,28). Not surprisingly, previous studies have

demonstrated that NHP immunity to YFV and infection prevalence are key missing variables in predictive models, representing a significant gap in our understanding of YFV transmission that impairs our ability to forecast spillover (28). The recent reemergence of sylvatic YF in Brazil into highly densely populated regions with low vaccination coverage in Southern Brazil clearly exposes the inadequate monitoring of YFV circulation in mosquitoes and NHPs and the underestimation of the risk of YF beyond the endemic areas. Although the seasonality of YF is well defined, little is known about the environmental, climatic, vector, and host drivers involved (29). Some studies have already shown that some abiotic variables such as vegetation, rainfall, temperature, and human population size are important drivers in the transmission of YFV (29). Coupled field surveillance and modeling approaches could provide crucial advances in containing, and possibly averting, future YFV outbreaks (2,4).

Here, we investigated the occurrence of YFV in NHPs from Minas Gerais state between 2019-2021, following the outbreaks in 2017 and 2018. We used generalized additive mixed models (GAMMs) to identify the spatiotemporal drivers of YF infection and intensity in NHPs, specifically testing the hypotheses that: (i) NHP and human YFV infection prevalence would be synchronized, with peaks in NHP infections preceding those in humans, as transmission from NHP to humans is thought to occur but the reverse is not; and (ii) that YFV infections of NHP would show spatial structure across the state of Minas Gerais and among different land cover types.

## **Materials and Methods**

### **Study area and samples**

The samples and data analyzed in this study were collected from Minas Gerais, the epicenter of the YF outbreak in 2017 and 2018 in Brazil, with records of 1,002 cases and 340

deaths of humans, between July 2016 – June 2018 (30). Minas Gerais borders the states of São Paulo, Rio de Janeiro, and Espírito Santo in Southeast Brazil (Fig 1a). It has a total population of 21,168,791 inhabitants, with approximately 85% living in urban areas and the remaining population living in rural areas (31). The state is mainly covered by three biomes: Atlantic Forest, Cerrado (Brazilian Savana), and Caatinga, where different genera of NHPs can be found, including *Alouatta*, *Callithrix*, *Sapajus*, *Callicebus*, and *Brachyteles* (woolly spider monkeys) (32–34).

From January 2019 to July 2021, a total of 543 carcasses of free-living NHPs were collected in Minas Gerais by health surveillance agents as part of the YF surveillance program (mean of 30 carcasses/month). The number of NHP carcasses sampled was 3.8 times lower compared to December 2016 up to December 2018 (mean of 86 carcasses/month), when YF outbreaks were reported in the region. The NHP carcasses were frozen (-20 °C) and forwarded to the Laboratory of Zoonosis of Belo Horizonte/Minas Gerais (LZOON-MG). At LZOON-MG, it was only possible to harvest biological specimens (liver and lungs) from 187 individuals (2019: n=123; 2020: n=41; 2021: n=23), due to the carcasses' preservation status. In 2019, only liver samples were harvested from carcasses. Starting in 2020 lung samples were also harvested from some carcasses, with the parallel purpose of investigating infection by SARS-CoV-2 (35); lung samples were also tested for YFV whenever available. Liver and lung samples were sent to the Virus Laboratory at Universidade Federal de Minas Gerais and fragments of each tissue were preserved in the presence (at -20°C) or absence (-80°C) of RNAlater solution (Ambion/USA) until further use. The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Universidade Federal de Minas Gerais under protocol CEUA: 98/2017 (approval date: June 26<sup>th</sup> 2017).

NHP carcasses were identified to the genus level by the veterinary team at LZOON-MG using morphological criteria. Each carcass was georeferenced by the location of sampling

and geographically classified by land use (urban, rural, urban-rural interface). Land use was classified using satellite imagery (36) as i) urban areas (built-up areas, cities, towns, villages, or isolated areas with intense human occupation and urban development); ii) urban-rural interface (transition between urban and rural areas delimited by 2.0 kilometers on the outskirts of urban areas towards the rural/sylvatic environment); and iii) rural area (sylvatic areas that covered areas located outside the urban and urban-rural transition areas) (11,37).

### **Molecular screening for YFV in NHP samples**

Total RNA was extracted in batches of a maximum of 15 samples at a time (liver for all NHPs and lung samples as described above), plus one negative extraction control (nuclease-free water), using the RNeasy Minikit (Qiagen, USA). To determine the suitability of the RNA, samples were submitted to a one-step real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), using the GoTaq 1-Step RT-qPCR System (Promega, USA) and primers targeting the gene coding for the endogenous control  $\beta$ -actin. All RNA samples were positive for the endogenous control (11,38). RNA samples and the negative extraction controls were screened in duplicate to investigate the presence of YFV RNA by RT-qPCR (GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System -Promega, USA), with primers and probes targeting the 5'-noncoding regions of the YFV genome (39). Non-template, negative extraction, and positive controls (RNA from the YFV 17DD vaccine, provided by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) were used in every assay. Samples were considered positive for YFV when they presented a threshold for cycle amplification ( $C_q \leq 37$  in duplicate (11). Samples with  $C_q > 37$  and  $\leq 40$  were considered indeterminate and retested, and samples with  $C_q > 40$  were considered negative. When YFV RNA was detected, the sample was retested without the presence of reverse transcriptase to exclude amplicon carryover. In the case of an YFV positive sample, the clarified supernatant from the macerated sample preserved at  $-80^\circ\text{C}$  (without RNALater solution) was used to

infect C6/36 and Vero cells, followed by consecutive blind passages attempting viral isolation (38). The supernatant of infected cells was used for RNA extraction (Qiapm Viral RNA Mini Kit, Qiagen) and tested by RTqPCR as described above. In addition, RNA from the positive sample was used as a template to generate amplicons covering part of the envelope gene of YFV using different primer combinations (YFV\_500\_3\_left/right, YFV\_500\_4\_left/right, YFV\_500\_5\_left/right, and YFV\_500\_6\_left/right) as previously described (22) using the GoTaq Probe Master Mix (Promega, USA). The amplicons were purified and sequenced with the ABI3130 platform (Applied Biosystems, USA). The consensus sequences were generated (Chromas software version 2.6.6), aligned with MAFFT ([mafft.cbrc.jp/alignment/server/](http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/)) and used for phylogenetic reconstruction, using the maximum likelihood method, using the nucleotide substitution model that best fitted the data (TN93 +I), with 1000 bootstrap replicates, using PhyML (40). The final tree was edited and visualized using iTOL (41).

### **Generalized additive mixed models**

Generalized additive mixed models (GAMMs) were used to identify the drivers of YFV infection and intensity because these models allow for non-linear trends with time, space, and abiotic drivers. All models were fitted in R version 4.1.1 (42), using the ``mgcv`` package (43). Response variables included binary qualitative liver RTqPCR results, denoting the presence or absence of infection (“infection”), and RTqPCR Cq threshold values (inversely proportional to genomic YFV load in the liver of NHPs) that represent the intensity of YFV in infected individuals (“intensity”).

To conduct the analysis, we initially combined our data from 2019-2020 with previously published data from molecular YFV screening in 781 NHP carcasses from 2017 to 2018 in Minas Gerais (11,38). However, given the extreme low positive rate for YFV in 2019-2021 (see Results), our models only used data from 2017 and 2018 (11,38). Intensity

models (i.e., RTqPCR Cq values) only included samples that were positive for YFV. RTqPCR Cqs threshold values were inverted so that larger values denoted greater intensity, with values then scaled to have a mean of 0 and a standard deviation of 1. Infection and intensity models used a binomial and Gaussian specification for the response, respectively.

GAMMs were used to investigate several key hypotheses about the drivers of YFV infection and intensity in NHPs outlined above. First, the epizootics were divided into two periods pre- and post-day 220 (corresponding to Aug 8<sup>th</sup> 2017, which was the nadir of prevalence through the cold/dry season), and an interaction between the spatial effect and the epizootics (first or second) was fitted to examine whether they differed in their geographic distributions. Finally, temporal patterns and changes in infection and intensity in our sample of NHPs were compared with total confirmed YF cases in human and NHPs in Minas Gerais state, using data from Information System for Notifiable Diseases (SINAN) the Brazilian Ministry of Health's official yellow fever surveillance program. Data regarding confirmed YF cases in human and NHPs were received from SINAN (July 8<sup>th</sup> 2021) and date of epizootic occurrence for NHPs, or date of symptom onset for humans were used.

Explanatory variables in our models included: a smoothed effect of Julian date with an adaptive smooth to examine temporal patterns; a latitude-by-longitude smoothing term to examine spatial patterns; a three-level factor to denote sample land use (urban, urban-rural interface, and rural); a three-level factor to denote carcass preservation quality (good, intermediate, and bad, as previously described (11) based on the visual inspection of carcasses taking into account the brightness; color, consistency of the tissues, the smell and presence or absence of parasites in the carcasses); and a three-level factor to denote the genus of NHP sampled (*Alouatta*, *Callicebus*, and *Callithrix*). We also attempted to fit the effects of local population density and gross domestic product (data from Brazilian Institute for Geography and Statistics – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/IBGE), but neither improved the

model fit or showed significant effects, and both required a substantial reduction in sample size due to missing data, so we opted not to include them in our final models.

For each effect in the GAMMs, contribution to model fit was calculated by examining their effect on the Spearman rank correlation between the models' observed and predicted values (which we call R). This calculation involved removing a variable from the model's predictions and calculating the correlation of the new predictions with the observed data. Removing more important variables has a greater effect on the model's fit than other, less important ones. These are then expressed as a proportion of the model's overall fit to give a representation of each variable's importance in the model. All code associated with this analysis is available at <https://github.com/viralemergence/minas-gerais-yfv>"

## **Results and Discussion**

### **YFV enzootic circulation in NHP from Minas Gerais between 2019-2021**

From January 2019 to July 2021, we screened 187 free-living NHP carcasses collected during the warm/rainy (December to May) and cool/dry periods (June to November) of 2019 - 2021. Both lungs and liver were screened for YFV where available; liver was available for all carcasses, and for 44 carcasses lung specimens were also available. Carcasses were collected from 70 municipalities throughout the state but mostly originated from three regions, the Metropolitan (n=101, 54.0%), Zona da Mata (n= 21, 11.2%), and Triângulo/Alto Paranaíba (n=20, 10,7%). The great majority of these carcasses (93.6%) were *Callithrix* from urban areas (Table 1).

Table 1. Non-human primate carcasses collected from 2019 to 2021 in Minas Gerais and screened for yellow fever virus

Non-Human Primate	year			Total	
	2019	2020	2021		
Period*	warm/rainy	51	20	12	82 (43.8%)
	cool/dry	73	21	11	105 (56.2%)
Area	Urban	95	31	23	148 (78.7%)
	Urban-rural interface	5	2	0	7 (4.2%)
	Rural	24	8	0	32 (17.1%)
Taxon	<i>Callithrix</i> spp.	114	39	22	175 (93.6%)
	<i>Alouatta</i> spp.	0	1	1	2 (1.1%)
	<i>Cebidae</i> spp.	9	1	0	10 (5.3%)
Samples**	liver	124	41	23	187
	lung	0	21	23	44

\* warm/rainy period: from December to May, cool/dry period: June to November.

Samples\*\*: Liver samples were available and analyzed for all non-human primates' carcasses. For all carcasses (n=187) liver samples were analyzed, but in some cases (n=44), besides liver, lung was available and also analyzed.

Between 2019 and 2020, one out of 44 lung samples tested positive for YFV. This positive sample was from a *Callithrix* specimen collected during the cold/dry season in June

2020, in the central area of Minas Gerais (Fig 1a). None of 187 liver samples tested positive during this period. Three independent RNA extraction and RT-PCR experiments were performed using lung and liver samples from the YFV positive carcass with similar results. DNA template carryover during experimental procedures was ruled out by running PCR without previous reverse transcription. Although the liver is one of the major sites for YFV replication in vertebrate hosts, it has higher decay and RNA degradation rates compared to lungs (44,45). In addition, a high Cq (= 38.8) value was observed in RTqPCR of the positive lung sample, indicating a low genomic load in the lungs. Given the higher RNA degradation in the liver, one could expect even lower YFV RNA levels in liver and consequently lower odds of detection by RTqPCR. Attempts at viral isolation from the positive lung sample (not preserved in RNALater solution) were not successful after five blind passages in C6/36 or Vero cells, since no YFV RNA was detected in supernatant from infected cells. The low YFV genomic load observed in lung samples (as indicated by high Cq in RTqPCR) would reflect a low viral load impairing viral isolation.

A nucleotide sequence of partial envelope gene (1113 nt, Genbank accession number OP589291) of YFV confirmed the detection of wild-type YFV RNA in the lung of the *Callithrix* specimen. Phylogenetic analyses demonstrated that this YFV strain clustered within a monophyletic clade of South America genotype I, together with other YFV isolates from the recent outbreaks (2016 to 2019) in Brazil (Fig 1b).

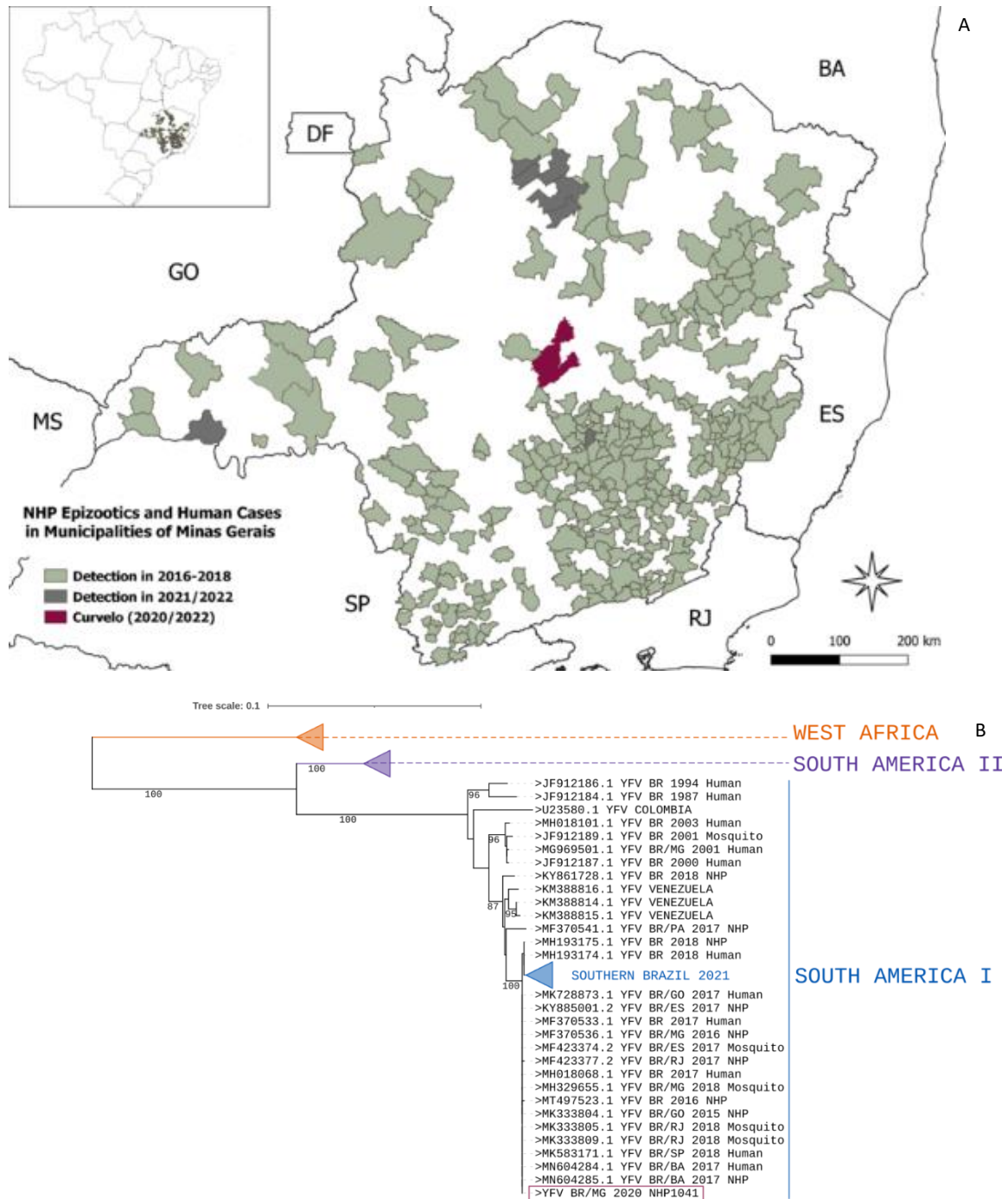


Figure 1: Circulation of yellow fever virus in Minas Gerais, 2016 to 2021. A: Map of Minas Gerais showing the location of Curvelo, where yellow fever virus was detected in a *Callithrix* sp specimen, in 2020 (purple), municipalities that had cases of yellow fever affecting human and or non-human primate, 2016-2018 (green), and municipalities that had yellow fever epizootics confirmed from Jul 2020 to Jun 2022 (grey). The inset map displays the location of Minas Gerais in Southern Brazil. B: Phylogenetic tree reconstructed with

using partial envelope sequence of yellow fever virus (1000nt). The sequence of yellow fever virus detected in a *Callithrix* sp specimen (NHP1041), in 2020, from Curvelo is shown in purple. Some branches were collapsed for clarity. The phylogenetic tree was reconstructed using the maximum likelihood method, nucleotide substitution model TN93 +I, with 1000 bootstrap replicates, using PhyML. The final tree was edited and visualized using iTOL.

The YFV-positive *Callithrix* specimen was collected in the rural area of the municipality of Curvelo, central Minas Gerais state, an area that was heavily affected by YF in 2017 and 2018 and from which NHP epizootics have been reported since (46,47). The molecular and epidemiological data point to the maintenance of YFV lineage related to 2017 and 2018 outbreaks in the enzootic cycle in Minas Gerais state up to 2020. This lineage has been proven to have undergone cryptic circulation prior to the outbreak by the end of 2016 (22,38,48), and to have persisted in Southern Brazil at least until 2021 (6,38,48–50).

Despite the significant decrease in the magnitude of NHP epizootics from the first two YF waves (2016/2017 and 2017/2018) to subsequent warm/rainy seasons, our data and data from official surveillance systems reinforce the conclusion that YFV circulates continuously in an enzootic circulation in Minas Gerais. During the last YF surveillance period (July 2021-June 2022), eight municipalities in the state, located in areas covered by Cerrado biome (Brazilian Savana) confirmed epizootics caused by YFV (46,47,51). The very low prevalence of YFV in NHPs from 2019 to 2021 observed here may reflect a real reduction in YF transmission or the use of a convenience sample provided by the YF surveillance system. After the two YF outbreaks in 2017 and 2018 during the warm/rainy season in Minas Gerais, and an intensification of the vaccination campaign, YF cases were no longer reported in humans from mid-2018 on in the state (30,52–54). Regarding the epizootics, a

significant decrease was observed since the last outbreak in Minas Gerais in 2018, according to bulletins of the surveillance system (55). From January 2019 to July 2021, a total of 543 carcasses of free-living NHPs were forwarded to the Laboratory of Zoonosis – Belo Horizonte/Minas Gerais by health surveillance agents as part of the YF surveillance program (mean of 30 carcasses/month). The number of NHP carcasses sampled was 3.8 times lower compared to December 2016 up to December 2018 (mean of 86 carcasses/month), when YF outbreaks were reported in the region. The decrease in the number of epizootics throughout Minas Gerais state could be related to the decline of naïve NHP populations in the state following the massive YF epizootics of 2017-2018 (due to massive death of NHP or immunity acquired by the survivors), decrease in YFV dissemination in the state (47,55-57) or even to eventual inadequacy on the passive surveillance system of epizootics. One of the arms of the YF surveillance system relies on the information provided by the population (especially some key social or professional groups given their activities and place of living) regarding the occurrence of sick or dead NHP in a region, followed by further epidemiological investigation (58). COVID-19 restrictions on social activities in 2020 and 2021 could have had an impact on this information system. In addition, the majority of NHP carcasses studied here were collected in urban areas (78.73%) and were represented by *Callithrix* specimens (93.6%), likely because marmosets more tolerant of human-impacted habitats, such as rural areas, forest fragments, and forest pockets in urban areas compared to specimens of *Alouatta* or *Callicebus*, (59,60) and therefore their carcasses are more likely to be spotted. Below we demonstrate that odds of YFV infection in NHPs from urban areas are significantly lower than rural-urban interface or rural areas and lower in *Callithrix* compared to *Alouatta* and *Callicebus* specimens. The shift in the distribution of submitted NHP carcasses from a more even spread across

land cover types to an almost exclusive representation of urban areas may be driven by the public concern about the recent circulation of YFV in densely populated areas in southeastern states of Brazil (11-15,30). The predominance of carcasses of *Callithrix* sampled (in urban or rural areas) may explain the fact that the only detection of YFV RNA, from 2019-2021 was in a rural *Callithrix* specimen, despite the lower estimated odds of infection for these genera. Our results coupled surveillance data suggests the establishment and continued circulation of YFV in the enzootic cycle, despite the fade-out of human YF cases in the region. This is an important alert for public health and policy officials regarding the support of continuous surveillance efforts in this region of Brazil.

### **Drivers of YFV infection and intensity during epizootics**

Although the low prevalence of YFV in NHPs observed in 2019-2021 did not allow the inclusion of this data on modeling analysis, the our GAMMs explained 65% and 68% of variation in YFV infection and intensity in NHP, respectively, during 2017-2018 (11,38). The GAMMs allowed the fitting of adaptive nonlinear smooths to the spatial and temporal data to identify continuous patterns across the study period, while accounting for sampling and taxonomic biases as other fixed effects. Moreover, the use of qualitative and quantitative RTqPCR outputs as response variables, allowed us to identify whether prevalence and intensity of infection were responding similarly to ecological factors. Model coefficients and associated p values for infection and intensity models are listed in Table 2 with pseudo- $R^2$  values in Table 3 to illustrate model fit.

Table 2: Effect estimates and P values for each of the terms in our generalized additive mixed models

Response	Variable	Estimate	Lower95% Upper95%		Sig	edf	Chi_or_F	p
			CI	CI				
Infection	Intercept	0.805	-0.337	2.178				0.204
	Rural area <sup>1</sup>	0						
	Urban area <sup>1</sup>	-0.511	-0.948	-0.027	*			0.030
	Urban_rural_interface <sup>1</sup>	-0.499	-1.216	0.235				0.166
	Bad carcass quality <sup>2</sup>	0						
	Good carcass quality <sup>2</sup>	0.304	-0.342	0.952				0.384
	Intermediate carcass							
	quality <sup>2</sup>	0.322	-0.478	0.941				0.387
	<i>Alouatta</i> <sup>3</sup>	0						
	<i>Callicebus</i> <sup>3</sup>	-0.993	-2.265	0.194				0.122
	<i>Callithrix</i> <sup>3</sup>	-2.09	-3.083	-1.083	*			<0.001
	Date				*	6.299	39	<0.001
	Longitude					0.766	9	0.090
	Latitude				*	2.170	9	0.001
Long:Lat				*	4.189	16	0.002	
Intensity	Intercept	0.782	0.363	1.253	*			0.001
	Rural area <sup>1</sup>	0						
	Urban area <sup>1</sup>	-0.636	-0.863	-0.465	*			<0.001
	Urban_rural_interface <sup>1</sup>	-0.396	-0.77	-0.062	*			0.028
	Bad carcass quality <sup>2</sup>	0						

Good carcass quality <sup>2</sup>	0.325	-0.043	0.702				0.079
Intermediate carcass quality <sup>2</sup>	0.195	-0.187	0.565				0.307
<i>Alouatta</i> <sup>3</sup>	0						
<i>Callicebus</i> <sup>3</sup>	-0.285	-0.71	0.157				0.198
<i>Callithrix</i> <sup>3</sup>	-0.813	-1.138	-0.489	*			<0.001
Date				*	4.849	21	<0.001
Longitude					0.576	9	0.15
Latitude				*	1.784	9	0.001
Longitude:Latitude				*	6.015	16	<0.001

For each linear effect, we include the GAMM slope coefficient and the 95% confidence intervals on estimates. For these and all smooth terms, we include p values, effective degrees of freedom (edf), and the Chi square (for infection) or F value (for intensity). An asterisk in the column “Sig” denotes whether the variable was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

Categorical variables are presented as (1) areas of non-human primate sampling (urban, rural or urban-rural interface), (2) the preservation status of non-human primate carcasses (good, bad, intermediate), and (3) non-human primate taxa.

Table 3: R values (correlations between predicted and observed values as a proportion of the model’s overall fit) for each of the fitted terms in our GAMMs.

Response	Variable	R
Infection	Area <sup>1</sup>	0.0116
	NHP carcass quality <sup>2</sup>	0.0015

	Taxon <sup>3</sup>	0.0514
	Date	0.5445
	Spatial effect	0.0398
<b>Intensity</b>	Area <sup>1</sup>	0.1863
	NHP carcass quality <sup>2</sup>	0.0175
	Taxon <sup>3</sup>	0.1511
	Date	0.2178
	Spatial effect	0.1037

---

NHP: non-human primate. Variables are presented as (1) areas of non-human primate sampling, (2) the preservation status of non-human primate carcasses, and (3) non-human primate taxa.

First, we tested the hypothesis that the temporal pattern of the YFV epizootic in NHPs would mirror that of human cases, with peaks in NHPs preceding those of humans. However, the temporal patterns of total epizootics (Fig 2a) and human cases (Fig 2d) (based on data from the Ministry of Health) and the YFV infection in NHP studied here were roughly equivalent (Fig 2b), and the temporal smooth was both highly significant ( $P < 0.001$ ; Table 2) and accounted for a large proportion of the model deviance ( $R = 0.54$  and  $R = 0.22$ ; Table 3). We observed a strong temporal pattern in which YFV infection and intensity were higher during warm/rainy periods (Fig 2, Table 2), consistent with well-known seasonal patterns of YF (5). Broadly, both infection and mean intensity in our NHP samples were high at the start of 2017, and then dropped before increasing rapidly near the start of 2018. In NHP's, both YFV infection and intensity peaked in early 2018, approximately the same time the human cases peaked, and then decreased extremely rapidly (Fig 2b-c). The penultimate positive NHP

carcass was identified on 18<sup>th</sup> March 2018, followed by a final positive carcass on April 13<sup>th</sup> 2018 (Fig 2b). As noted above, one positive sample was identified on June 18<sup>th</sup>, 2020, but excluded from GAMM analyses.

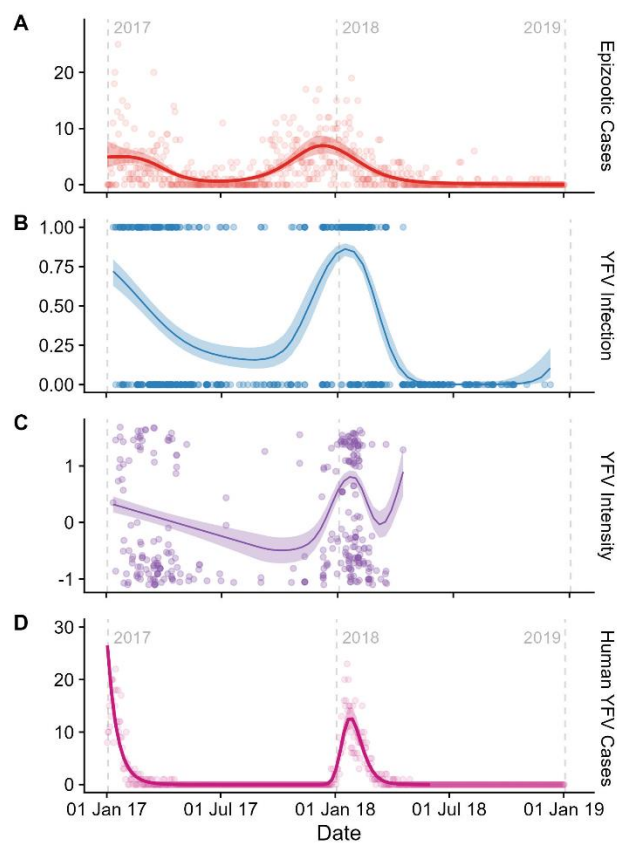


Figure 2: The temporal progression of (from top to bottom): (A) total epizootic cases, taken from the Brazilian Ministry of Health’s official yellow fever surveillance program; (B) predicted YFV infection in sampled primates (points indicating positive and negative samples); (C) intensity of YFV in infected primate samples and labeled in Panel B; and (D) total of human cases taken from Brazilian Ministry of Health’s official yellow fever surveillance program. Date is presented in “days after the start of 2017,” with the start of each

year signposted by grey dotted lines. The fitted line is the mean fit taken from our GAMMs, using an adaptive smooth; the shaded area represents the 95% confidence intervals. YFV intensity was scaled to have a mean of 0 and a standard deviation of 1. Note: the upturn to the right of the intensity curve (Panel C) is likely an artifact of the single high-intensity point that was the final collected sample, and should be disregarded.

Second, we tested the hypothesis that the epizootic would be spatiotemporally structured and associated with particular land cover classes. There were strong, highly significant spatial patterns of YFV infection and intensity ( $p < 0.001$ ; Table 2) that accounted for substantial deviance ( $R = 0.04$  and  $R = 0.1$ ; Table 3). However, patterns for infection and intensity were less correlated in space than they were with time (Fig 3) and our GAMM model fits were not improved when we allowed the spatial patterns to vary between warm/rainy periods ( $\Delta\text{DIC} < 2$ ), implying that spatial patterns were relatively similar in these periods. Spatial patterns of epizootics during the first (2017) and second wave of YFV (2018) were similar, implying that the drivers of these epidemics did not differ notably across epidemics. Although the intensity patterns were patchier and therefore more difficult to generalize, there was a band of low prevalence stretching across the central-west part of the state, with a relatively higher infection closer to the eastern part of Minas Gerais, where most human and NHPs cases had been reported during outbreaks prior to the 2017-2018 outbreak (11,23,30,46). However, in this latest epidemic, human YFV cases were more concentrated in the northeast (2017) or in the central/southeast parts of Minas Gerais (2018), thus diverging somewhat for the foci of NHP infection (23,30).

With respect to land cover, our GAMMs revealed that monkeys collected from the urban-rural interface had lower intensity ( $p = 0.028$ ), but not lower odds of infection ( $p = 0.17$ ), than those taken from rural areas (Fig 4; Table 2); samples from fully urban areas had both

lower intensity ( $P < 0.001$ ) and probability of infection ( $p = 0.03$ ) than those taken from rural areas. The finding of higher YFV prevalence in rural areas is consistent with the sylvatic transmission cycle of the virus and likely reflects the distribution of key YFV vectors in the genera *Haemagogus* and *Sabethes* (3,11).

Lastly, our GAMMs demonstrated that *Callithrix* had lower odds of infection and lower intensity than samples from the genera *Alouatta* and *Callicebus* ( $p < 0.01$ ). This pattern could be due to differential susceptibility to YFV infection (24–26), or to the higher percentage of *Callithrix* collected from urban areas, given that infection was shown to vary by land cover (3,11).

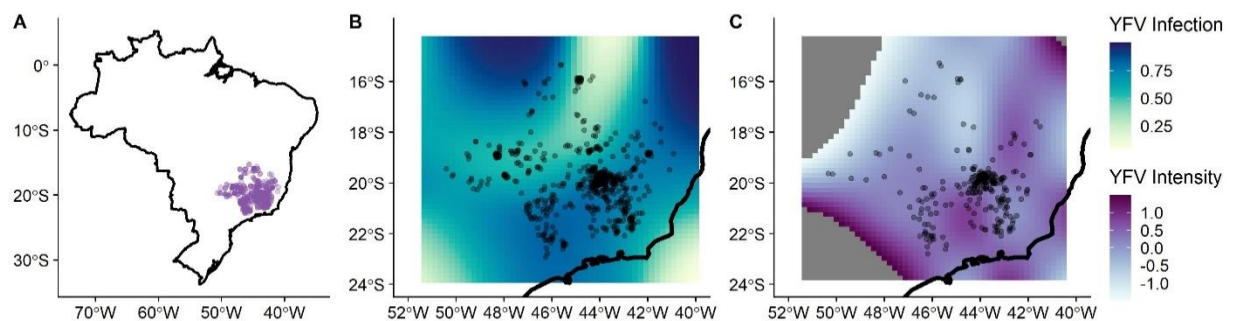


Figure 3: The geographic distribution of non-human primate carcasses. (A); predicted YFV infection (B); and predicted mean YFV intensity (C). Panels B and C were taken from our GAMMs; darker colors represent greater predicted infection and intensity. The dark black line represents the coastline of Brazil. In panels B and C peripheral areas with very low or very high predicted intensity have been removed for plotting clarity (dark grey areas), due to a tendency for extreme estimates when extrapolating outside the limits of the data.

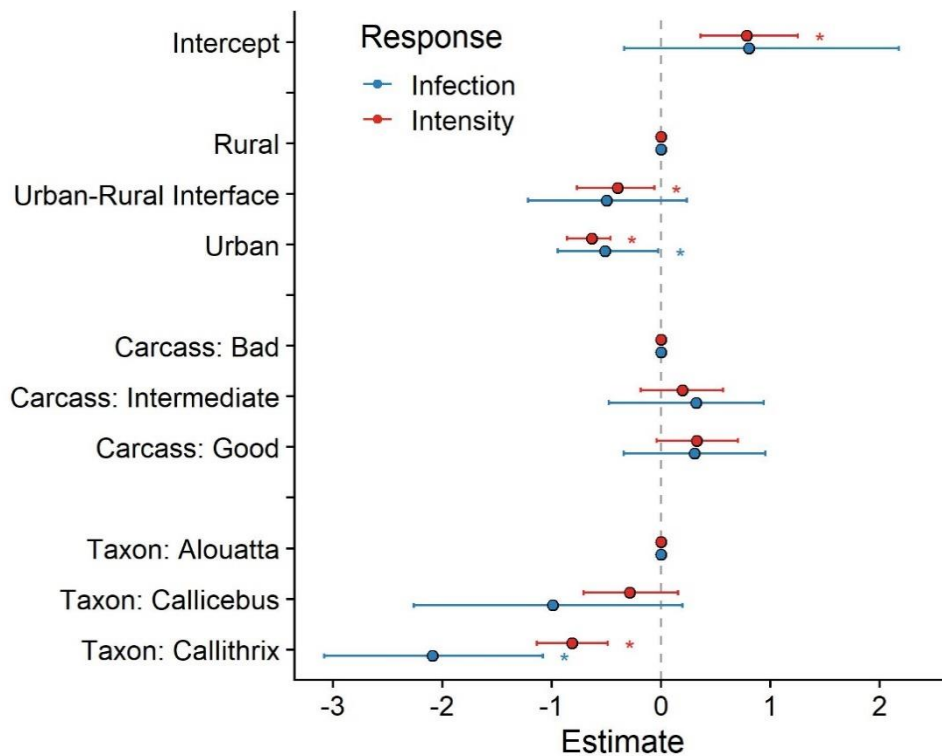


Figure 4: Fixed effect estimates taken from our GAMMs, for YFV infection (red) and intensity (blue), accounting for the nonlinear spatiotemporal variation seen in Fig 2-3. Dots represent the mean estimated effects; error bars are the 95% credibility intervals. Significant effects ( $p < 0.05$ ) are marked with an asterisk (\*). “Rural”, “Carcass: Bad”, and “Taxon: Alouatta” were all the base levels for their factor; we display them as zero to allow comparison between these factor levels and the other factor levels in the effect.

### Concordance of YFV Infection Prevalence and Intensity

We found a strong, positive association between the likelihood of infection (prevalence) and infection intensity (inverse Cq value representing concentration of viral genomes) in NHPs across time and space, with peak infection and intensity occurring in the warm/rainy season in eastern Brazil. While such a relationship might be expected in an ectothermic mosquito vector, where susceptibility and virus replication are both coupled to

temperature (discussed below), it is not expected *a priori* in endothermic hosts. We hypothesize that this relationship may be driven by differences in the viral dose delivered to monkeys in the warm rainy season, either because NHPs receive more infectious bites during this season, or because individual mosquitoes deliver more virus per bite during this season, or both. The rationale for this hypothesis comes from the documented effects of varying virus dose in experimental arbovirus infections. Althouse and colleagues (61,62) as well as Fox and Penna (63) have reported that experimentally increasing the dose of arbovirus delivered to an NHP or other host species leads to a higher peak viremia. Similarly, Hanley and colleagues (64) demonstrated that when mice were infected with different doses of Zika virus via different numbers of infectious mosquito bites, increasing dose resulted in higher peak viremia. Intriguingly, Hill and colleagues (65) observed that during the 2016 -2018 YFV outbreaks in Brazil, the rate of YFV evolution was higher during the warm/rainy season compared to the cold/dry season, a difference that they attributed to differences in virus infection dynamics within mosquitoes but that could also stem from variation in infection dynamics in NHP hosts.

It is known that the warm/rainy season favors the reproduction of the sylvatic vectors of YFV (66,67) which in turn would result in higher vector-biting and therefore greater potential rates of NHP exposure to YFV. Moreover, Chouin-Carneiro and colleagues (68) have shown that Zika virus infection and dissemination efficiency in Brazilian *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* is significantly greater in temperatures mimicking the Brazilian warm/wet season than temperatures mimicking the Brazilian cold/dry season. While the effects of temperature and humidity on vectorial capacity are quite complex (69), viral replication generally rises and extrinsic incubation period shrinks with increasing temperature up to some thermal limit. However, the conclusions above about the effects of temperature on virus infection, replication and dissemination are drawn from studies of *Aedes* mosquitoes, whereas

the YFV outbreak under consideration here was sustained by *Haemagogus* (70) and possibly *Sabethes* mosquitoes. Unfortunately, the lack of colonized *Haemagogus* and the paucity of colonized *Sabethes* make it impossible to evaluate the impacts of temperature and humidity on the within-host dynamics of YFV replication in these genera. In lieu of such experimental studies, longitudinal surveillance of these sylvatic mosquitoes to quantify virus carriage and titer across seasons is needed. Moreover, our discovery of sustained, enzootic YFV transmission in Brazil likewise elevates the urgency of monitoring infection of sylvatic mosquitoes in this region.

### **Acknowledgements**

We do thank the Centers for Research in Emerging Infectious Diseases (CREID) (NIH 1U01AI15378), CREID Pilot Research Program, the Coordinating Research on Emerging Arboviral Threats Encompassing the Neotropics (CREATE-NEO), Laboratório de Zoonoses and Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, colleagues from Laboratório de Vírus/UFMG, and Pró-Reitorias de Graduação, de Pós-graduação e de Pesquisa/Universidade Federal de Minas Gerais/Brazil. This study was developed with the participation of students from the Graduation Program in Microbiology of Universidade Federal de Minas Gerais, which is supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - 88882.348380/2010-1).