

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Nathália Dias Furtado

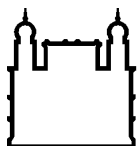
Caracterização funcional dos polimorfismos detectados no vírus da febre amarela durante o surto no Brasil em 2017

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Myrna Cristina Bonaldo

RIO DE JANEIRO

2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: Nathália Dias Furtado

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS POLIMORFISMOS DETECTADOS NO
VÍRUS DA FEBRE AMARELA DURANTE O SURTO NO BRASIL EM 2017**

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Myrna Cristina Bonaldo

Aprovada em: 16 / 11 / 2022

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado (IOC/Fiocruz) – **Presidente**
Prof^ª. Dr^ª. Erna Geessien Kroon (UFMG)
Prof^ª. Dr^ª. Barbara Cristina Euzebio Pereira Dias de Oliveira (IOC/Fiocruz)
Prof^ª. Dr^ª. Leila de Mendonça Lima (IOC/Fiocruz)
Prof. Dr. Marcelo Alves Soares (INCA)

Rio de Janeiro, 16 de novembro de 2022

Furtado, Nathália Dias.

Caracterização funcional dos polimorfismos detectados no vírus da febre amarela durante o surto no Brasil em 2017 / Nathália Dias Furtado. - Rio de Janeiro, 2022.

xi, 174 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2022.

Orientadora: Myrna Cristina Bonaldo.

Bibliografia: f. 138-145

1. Vírus da Febre Amarela. 2. Marcadores Virais. 3. Proteínas não Estruturais Virais. 4. Replicação Viral. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Há quatro anos, decidi aceitar o desafio de desenvolver um projeto que seria defendido como uma tese de doutorado. Como todo desafio, este transformou a minha história em inúmeros aspectos. Nenhuma etapa envolvida na construção de uma tese de doutorado teria sentido sem a intervenção e influência alheia.

Por ter consciência de que o universo é regido por um poder absoluto, agradeço a Deus por ser a paz da minha estrada e por me capacitar constantemente. Durante este período pude perceber o quanto minhas forças foram renovadas a cada momento, como fui capaz de subir “com asas como águias” e como eu corri e sem me cansar. Agradeço por sempre me fazer ir mais além.

Agradeço profundamente aos meus pais, a quem devo absolutamente tudo, por sempre estarem ao meu lado em qualquer situação, me apoiando, orientando, acompanhando ativamente cada um dos meus passos. Agradeço o seu amor incondicional, reflexo do amor divino. Aos demais membros da minha extensa família, agradeço o carinho e o apoio imenso e sempre pronto quando precisei ao longo desses anos. Agradeço ao meu noivo por sempre me incentivar e ressaltar em mim a minha melhor versão.

À Prof^a. Dr^a. Myrna Bonaldo, que me orientou tão brilhantemente durante minha carreira acadêmica. Todas as habilidades que adquiri atuando em pesquisa nos últimos nove anos, desde a graduação, devo à orientação dela. Certamente, eu não teria conduzido este projeto como conduzi, se não a tivesse como orientadora. Também agradeço a confiança que foi depositada em mim, e as oportunidades que me foram ofertadas durante do doutorado, que trouxeram um desenvolvimento imensurável.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus (LABMOF) por compartilharem seu conhecimento e suas experiências, por exercermos o companheirismo, tornando a equipe um verdadeiro núcleo de colaboração. Neste agradecimento, incluo os atuais membros da equipe, e os que já estão trilhando outros rumos, mas que estiveram muito próximos e foram essenciais para o andamento deste projeto. Especialmente, preciso mencionar o time dos clones infecciosos, Déberli, Marta e Iasmim, com quem construí um vasto aprendizado de muito valor. Desse grupo, tive o privilégio de ganhar uma amiga para a vida toda, com quem discuto ciência, religião, gastronomia, esporte, tudo. A Iasmim se tornou minha dupla na bancada e seguimos sendo dupla até na prática de tênis. Agradeço a ela por ter vivido esse doutorado comigo, comemorando vitórias e superando derrotas. Que seja assim para sempre! Mais que conhecimento e desenvolvimento pessoal, o LABMOF me apresentou aquele que se tornou meu companheiro para a vida toda, Alexandre. A ele também sou grata pelo seu

jeitinho resolutivo e prático, pelo seu cuidado diário, por ter se tornado meu melhor amigo, minha família. Não, o LABMOF jamais poderá ser esquecido.

Agradeço aos Dr. Glaucius Oliva e Dr. André Godoy por terem aberto as portas do seu laboratório e me recebido calorosamente na equipe para desenvolvermos parte do projeto em colaboração. Agradeço à toda a equipe pela paciência em transmitir seu conhecimento, pelas discussões críticas, e por me receberem tão bem na cidade de São Carlos.

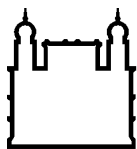
Aos Dr. Bruno Canard e Dr. Etienne Decroly, agradeço igualmente por me receberem como se fosse integrante do laboratório Architecture e Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB) e disponibilizarem de tempo para orientação no estudo funcional da metiltransferase viral. Pelos seminários semanais e discussões enriquecedoras que muito agregaram ao meu conhecimento em biologia estrutural e bioquímica.

Agradeço também aos professores e ao programa da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PG-BCM) do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, RJ), pela organização, por serem acessíveis e fornecerem disciplinas que refletem a qualidade do trabalho desenvolvido na instituição. Tenho muito orgulho de ter feito parte do corpo discente da PG-BCM.

“Dans les champs de l'observation le hasard ne favorise que les esprits préparés” – Louis Pasteur (1854)

Tradução livre:

“Nos campos da observação, o acaso favorece apenas as mentes preparadas” – Louis Pasteur (1854)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS POLIMORFISMOS DETECTADOS NO VÍRUS DA FEBRE AMARELA DURANTE O SURTO NO BRASIL EM 2017

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Nathália Dias Furtado

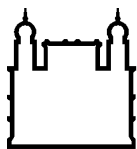
A febre amarela é uma arbovirose com altas taxas de mortalidade, que ocasiona surtos esporádicos na África e na América do Sul. O vírus da febre amarela (*Yellow fever virus* – YFV) responsável pela disseminação da doença no Brasil desde a virada do século, pertence a uma sub-linhagem moderna do genótipo sul-americano I, a sub-linhagem 1E. A partir de 2015, foi detectado um conjunto de nove marcadores genéticos no YFV, que ocasionou em 2017 e 2018 um surto sem precedentes, desde o início da vacinação. Esses marcadores representam uma assinatura molecular inédita, considerando todas as sequências do vírus disponíveis em domínio público. Das nove substituições, oito estão localizadas nas proteínas NS3 e NS5. A localização por modelagem tridimensional de NS3 e NS5 sugeriu que tais alterações poderiam influenciar nas funcionalidades destas proteínas, e talvez, desempenhar algum papel de adaptação aos hospedeiros. Este trabalho propõe estudar o efeito das alterações genéticas nas proteínas NS3 e NS5 em diferentes aspectos biológicos do ciclo replicativo viral: na infecção viral em culturas celulares e em camundongos; na modulação da resposta antiviral por interferon do tipo I (IFN-I); e na atividade enzimática do domínio MTase da proteína NS5.

Em uma primeira análise, avaliou-se o papel na infecção viral de quatro vírus isolados de primatas não humanos, dois carreando a assinatura molecular. Estes vírus foram comparados quanto à capacidade de infectar células de mosquitos e de mamíferos, e quanto à neurovirulência em camundongos. Observamos que os fenótipos apresentados pelos vírus isolados eram resultado de múltiplos fatores genéticos adicionais, e não estavam relacionados à assinatura molecular, permitindo a identificação de potenciais marcadores de virulência.

Em uma segunda abordagem, foram sintetizados cinco YFV a partir do isolado selvagem ES-504 de 2017, com diferentes composições genéticas em relação aos marcadores nas proteínas NS3 e NS5. A administração viral intracerebral em camundongos evidenciou que animais inoculados com os vírus sintéticos não apresentaram diferenças em relação aos indicadores de neurovirulência, enquanto os animais inoculados com os isolados virais divergiram neste parâmetro. Os YFV sintéticos ainda foram avaliados quanto à infectividade em camundongos susceptíveis AG129, e os resultados mostraram que os marcadores na proteína NS3 não ocasionaram diferenças em infectividade, enquanto os marcadores da assinatura molecular na proteína NS5 resultaram em atenuação viral. Portanto, os resultados obtidos indicam que os marcadores presentes na proteína NS5 podem ser os principais envolvidos na modulação de virulência viral.

A caracterização da atividade enzimática da proteína NS5 MTase foi avaliada comparando a proteína NS5 do surto 2017-2019 com uma variante enzimática de YFV circulante nos anos 2000s. A cinética enzimática e os ensaios de inibição sugerem que a proteína do YFV 2017-2019 tem afinidade menor pelo doador de metila que a proteína presente nos vírus do recente surto, indicando que estas alterações podem interferir na conformação do sítio de ligação a este substrato. Porém, o impacto estrutural das substituições não influenciou na replicação viral em modelo celular, nem na neurovirulência em camundongos. Por fim, os resultados em modelo celular de resistência à tratamento com IFN- I mostraram que os marcadores no domínio MTase influenciam no aumento da sensibilidade a resposta imune mediada por esta citocina.

Os resultados obtidos neste projeto sugerem que a assinatura molecular do YFV 2016-2019 nas proteínas NS3 e NS5 representam marcadores do YFV que modulam replicação e virulência em modelo celular e murino. Estes resultados contribuíram para o melhor entendimento das bases biológicas da infecção viral e patogênese do YFV circulante no Brasil desde 2015.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS POLIMORFISMOS DETECTADOS NO VÍRUS DA FEBRE AMARELA DURANTE O SURTO NO BRASIL EM 2017

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Nathália Dias Furtado

Yellow fever is an arbovirus with high mortality rates, which causes sporadic outbreaks in Africa and South America. The yellow fever virus (YFV) that is responsible for the spread of the disease in Brazil since the turn of the century belongs to a modern sublineage of the South American genotype I, sublineage 1E. As of 2015, a set of nine genetic markers was detected in the YFV, which caused an unprecedented outbreak, since the beginning of vaccination, in 2017 and 2018. These markers represent a molecular signature, considering all virus sequences available in the public domain. Of the nine substitutions, eight are located in the NS3 and NS5 proteins. The localization by three-dimensional modeling of NS3 and NS5 suggested that such alterations could influence the functionalities of these proteins, and perhaps, play some role in host adaptation. This work proposes to study the effect of genetic alterations in NS3 and NS5 proteins on different biological aspects of the viral replicative cycle: on viral infection in cell cultures and in mice; in the modulation of the antiviral response by type I interferon (IFN- β); and on the enzymatic activity of the NS5 protein MTase domain.

In a first analysis, the role in viral infection of four viruses isolated from non-human primates was evaluated, two of which carried the molecular signature. These viruses were compared for their ability to infect mosquito and mammalian cells, and for neurovirulence in mice. We observed that the phenotypes presented by the isolated viruses were the result of multiple additional genetic factors, and were not related to the molecular signature, allowing the identification of potential virulence markers.

In a second approach, five YFV were synthesized from the wildtype YFV ES-504 of 2017, with different genetic compositions in relation to the markers in the NS3 and NS5 proteins. Intracerebral viral administration in mice showed that animals inoculated with synthetic viruses did not differ in terms of neurovirulence indicators, while animals inoculated with viral isolates differed in this parameter. The synthetic YFV were further evaluated for infectivity in susceptible AG129 mice, and the results showed that markers in the NS3 protein did not cause differences in infectivity, while molecular signature markers in the NS5 protein resulted in viral attenuation. Therefore, the results obtained indicate that the markers present in the NS5 protein may be the main ones involved in the modulation of viral virulence.

The characterization of the enzymatic activity of the NS5 MTase protein was evaluated by comparing the NS5 protein from the 2017-2019 outbreak with an enzymatic variant of YFV circulating in the 2000s. Enzymatic kinetics and inhibition assays suggest that the YFV 2017-2019 protein has a lower affinity for the methyl donor than the protein present in the recent outbreak viruses, indicating that these changes may interfere with the conformation of the binding site for this substrate. However, the structural impact of substitutions did not influence viral replication in a cell model, nor neurovirulence in mice. Finally, the results in a cellular model of resistance to treatment with IFN- α showed that markers in the MTase domain influence the increase in sensitivity to the immune response mediated by this cytokine.

The results obtained in this project suggest that the YFV 2016-2019 molecular signature in the NS3 and NS5 proteins represent YFV markers that modulate replication and virulence in a cellular and murine model. These results contributed to a better understanding of the biological bases of viral infection and pathogenesis of YFV circulating in Brazil since 2015.

Lista de Abreviações

- C: proteína de capsídeo
E: proteína de envelope
GTase: guanililtransferase
IFN-I: interferon do tipo I
IHS: sequência interna hidrofóbica (do inglês, *internal hydrofobic sequence*)
JEV: vírus da encefalite japonesa (*Japanese encephalitis virus*)
mRNA: RNA mensageiro
MTase: metiltransferase
NS: proteína não estrutural
NS3pro: domínio protease da proteína NS3
NS3hel: domínio helicase da proteína NS3
NTP: nucleosídeo trifosfato
NTPase: nucleosídeo trifosfatase
ORF: quadro aberto de leitura (do inglês, *Open Reading Frame*)
prM: proteína precursora de membrana e proteína de membrana
RdRp: RNA polimerase dependente de RNA (do inglês, *RNA-dependent RNA polymerase*)
RE: retículo endoplasmático
RTPase: RNA trifosfatase
RYF: regiões repetitivas na região não traduzida 3' do vírus da febre amarela
PNH: primata não humano
SA-I: genótipo Sul-americano I
SAH: S-adenosil-L-homocisteína
SAM: S-adenosil-L-metionina
TBEV: vírus da encefalite transmitido por carrapatos (*Tick-borne encephalitis virus*)
UTR: região não traduzida do genoma (do inglês, *untranslated region*)
WNV: vírus do Oeste do Nilo (*West Nile virus*)
YFV: vírus da febre amarela (*Yellow fever virus*)
ZIKV: Zika vírus

Lista de Figuras

<i>Figura 1.1 – Genótipos do vírus da febre amarela.</i>	6
<i>Figura 1.2 – Áreas de endemicidade no Brasil no início do século.</i>	8
<i>Figura 1.3 – Filogenia de isolados do vírus da febre amarela no Brasil.</i>	10
<i>Figura 1.4 – Reconstrução filogenética em escala de tempo com as sequências de amostras do vírus da febre amarela coletadas no Brasil em 2017.</i>	12
<i>Figura 1.5 – Rotas de introdução das sub-linhagens modernas no Brasil.</i>	13
<i>Figura 1.6 – Localização e estrutura da proteína C.</i>	15
<i>Figura 1.7 – Disposição estrutural da proteína C na partícula viral imatura e contribuição da hélice $\alpha 5$.</i>	17
<i>Figura 1.8 – Composição genômica dos flavivírus e processamento da poliproteína viral. No painel A está representada a estrutura genômica dos flavivírus, composta por 2 regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR) e um único ORF codificante para a poliproteína viral. Esta poliproteína é processada por proteases do hospedeiro ou pela protease viral NS2B-NS3, como indicado no painel B. Fonte: adaptado de Barrows et al. Chemical Reviews, 2018 (95).</i>	19
<i>Figura 1.9 – Estrutura do domínio NS3pro ligado ao cofator NS2B.</i>	20
<i>Figura 1.10 – Organização tridimensional da proteína NS3.</i>	21
<i>Figura 1.11 – Domínio MTase da NS5 e reação de capeamento dos flavivírus.</i>	24
<i>Figura 1.12 - Os subdomínios da MTase e a interação com o RNA viral.</i>	25
<i>Figura 1.13 – Modelos de mecanismo para formação de estrutura cap-1 em flavivírus.</i>	26
<i>Figura 1.14 - Estrutura tridimensional da proteína NS5.</i>	30
<i>Figura 1.15 – Localização estrutural das alterações nas proteínas NS3 e NS5.</i>	32
<i>Figura 1.16 – Atuação das proteínas NS3 e NS5 na replicação do RNA viral.</i>	33
<i>Figura 4.1 - Localização dos marcadores moleculares do YFV 2016-2019 no domínio NS5 MTase.</i>	91
<i>Figura 4.2 - Regeneração e avaliação do vírus da febre amarela sintético.</i>	93
<i>Figura 4.3 - Fenótipo de placas de lise dos vírus YFV_2017 e YFV/MTase_2010.</i>	94
<i>Figura 4.4 - Curvas de replicação viral dos vírus YFV_2017 e YFV/MTase_2010</i>	95
<i>Figura 4.5 - Efeito do tratamento de células com interferon do tipo I na proliferação viral.</i>	96
<i>Figura 4.6 - Neurovirulência em camundongos BALB/c inoculados com YFV_2017 e YFV/MTase_2010.</i>	97
<i>Figura 4.7 - Replicação viral na presença de sinefungina.</i>	98
<i>Figura 4.8 - Expressão e atividade de MTase.</i>	99
<i>Figura 4.9 - Ensaio enzimático de competição com as isoformas MTase 2017 e MTase 2010 na presença de análogos de SAM.</i>	100

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 - Reações de RT-PCR.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na metodologia do clone infeccioso e mutagênese sítio-dirigida</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 3 - Avaliação de escores clínicos e determinação do endpoint humanitário.</i>	<i>87</i>

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	A descoberta e a origem da Febre Amarela.....	1
1.2	Dispersão da Febre Amarela no Brasil.....	7
1.3	Alterações genômicas do vírus circulante no Sudeste entre 2016 e 2019.....	14
1.3.1	Proteína do capsídeo.....	14
1.3.2	Proteína NS3.....	18
1.3.3	Proteína NS5.....	23
1.3.4	Considerações sobre as alterações genômicas.....	31
2	Objetivos.....	34
2.1	Objetivo geral.....	34
2.2	Objetivos específicos.....	34
3	Justificativa.....	35
4	Produção científica.....	37
4.1	Artigo 1: Biological characterization of yellow fever viruses isolated from non-human primates in Brazil with distinct genomic landscapes.....	37
4.2	Artigo 2: Amino acid polymorphisms on the Brazilian strain of yellow fever virus methyltransferase are related to the host's immune evasion mediated by type I interferon....	75
4.2.1	Materiais e Métodos.....	77
4.2.2	Resultados.....	90
4.2.3	Discussão e Conclusões.....	100
4.3	Artigo 3: Phenotypic and genetic studies of the viral lineage associated with the recent yellow fever outbreak in Brazil.....	101
5	Discussão.....	125
6	Conclusões.....	136
7	Perspectivas.....	137
	Referências bibliográficas.....	138
	ANEXO I.....	146
	Artigo 1: Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons.....	146
	Artigo 2: Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018.....	148
	Artigo 3: Structural characterization and polymorphism analysis of the NS2B-NS3 protease from the 2017 Brazilian circulating strain of Yellow Fever virus.....	150
	Artigo 4: Recovery of Synthetic Zika Virus Based on Rio-U1 Isolate Using a Genetically Stable Two Plasmid System and cDNA Amplification.....	152
	Artigo 5: Genotype-specific features reduce the susceptibility of South American yellow fever virus strains to vaccine-induced antibodies.....	154
	ANEXO II - Artigo submetido para publicação no periódico Viruses.....	157

1 Introdução

1.1 A descoberta e a origem da Febre Amarela

A origem da febre amarela foi amplamente debatida, e até os anos 1990 não se tinha um conceito unânime sobre o local e data de origem da doença. Três teorias foram difundidas ao longo dos séculos XVI a XX: a) a teoria da origem americana, a mais aceita inicialmente pelo fato de os primeiros relatos terem sido referentes a epidemias nas colônias espanholas do Novo Mundo; b) a teoria da origem africana, introduzida por Sir William Pym em 1815 na suas observações durante um surto em Bula (Guiné-Bissau), onde destaca que a febre amarela era endêmica e sempre existiu no continente africano; e c) teoria da origem asiática, reportada por um escritor desconhecido na antiga cidade de Esmirna da Asia Menor, e reforçada após um surto na ilha Martinica causado na chegada de um navio vindo de Sião (Tailândia) (1, 2). Todas as três teorias foram debatidas com diferentes e convincentes argumentos favoráveis e contrários. Atualmente, as evidências baseadas em epidemiologia molecular demonstram que a doença teve sua origem no continente africano (3).

O primeiro relato nas Américas reconhecido da febre amarela ocorreu na ilha de Guadalupe em 1635, descrita pelo jesuíta Raymond Breton. Houve surtos subsequentes nos anos de 1640, quando a doença era conhecida como *Poulicantina* pelos nativos, e 1648, ano no qual também emergiu em Yucatan, no México. Neste último local, o frei Diego Lopez de Cogolludo descreve a doença tão detalhadamente que é possível distinguir as fases da febre amarela, incluindo a fase de infecção, o período de remissão e a fase de intoxicação (1, 4). Entretanto, a primeira vez que a doença foi descrita e nomeada de **febre amarela** ocorreu em 1694 por Ferreira da Rosa, quando ele publicou o seu tratado sobre as “doenças pestilentas de Pernambuco” (2).

Assim como as teorias da origem da febre amarela, a etiologia da doença foi proposta por diversas outras teorias de acordo com o momento do conhecimento científico no qual era analisada e com o desenvolvimento da medicina contemporânea, variando da possibilidade de ser uma doença respiratória, bacteriana ou fúngica, e até mesmo a teoria de que seria um “agente semiaquático” que se disseminava pelas correntes do Golfo do México (2, 5). A descoberta do agente etiológico em si, o “germe da febre amarela”, ocorreu somente após a mais importante descoberta da virada do século XX, que é o método de transmissão da doença. Em 1881, Carlos Finlay de Cuba trouxe à Academia de Ciências Médicas, Físicas e Naturais de Havana a teoria de que a febre amarela é transmitida pela picada de um mosquito, especificamente da espécie

Culex quinquefasciatus, teoria essa que não foi bem aceita pelos cientistas contemporâneos (6, 7).

Com o Tratado de Paris em 1898, a Espanha renunciou às terras descobertas por Colombo, e o governo militar dos Estados Unidos se estabeleceu em Cuba, tendo como um dos objetivos mais importantes, eliminar a fonte de febre amarela. Naquele momento, Cuba detinha uma produção de açúcar de grande interesse comercial dos Estados Unidos. Portanto, o novo governo instaurou em maio de 1900 uma Comissão de Saúde (*Yellow Fever Commission; the U. S. Army Commission*) chefiada pelo major e cirurgião Walter Reed para a descoberta de métodos de combate às epidemias de febre amarela (6, 8, 9). A partir de então, os estudos de Finlay foram revisitados e a teoria confirmada pelos experimentos subsequentes da comissão de Walter Reed. Finalmente, em fevereiro de 1901 os resultados conclusivos foram divulgados no Congresso Pan-Americano realizado em Havana (8). Esta descoberta promoveu ações de prevenção através do controle de reprodução e disseminação do mosquito vetor, o que eliminou a doença nos Estados Unidos e em diversos países da América Central e do Sul (10). Em 1908, o sucesso da estratégia foi tão reconhecido que o ex-secretário de saúde do estado de Louisiana, nos Estados Unidos, afirmou ser de pouca contribuição que a ciência avançasse no estudo do agente causador da febre amarela. Segundo ele, em termos práticos, todo o conhecimento do modo de transmissão, somado às ações de combate ao mosquito vetor, eliminaria completamente as temidas e devastadoras epidemias de febre amarela (6).

No Brasil, a estratégia foi amplamente desenvolvida durante o governo do presidente Rodrigues Alves, sob a direção de Oswaldo Cruz, eliminando completamente os casos de febre amarela no Rio de Janeiro entre 1903 e 1909, e mais tarde, na cidade Belém, onde as medidas de combate ao mosquito vetor extinguiram a doença em seis meses, em 1910 (10). Essas medidas profiláticas, no entanto, não foram suficientes para eliminar completamente os surtos de febre amarela na América do Sul e no continente africano. Algumas observações sobre a ocorrência de febre amarela em regiões de mata, onde o “mosquito rajado” não era encontrado, foram consideradas, por muito tempo, ocorrências excepcionais. Em 1932, no estado do Espírito Santo, foi registrado um óbito suspeito da doença, na cidade de Santa Teresa, localizada a 600 m de altitude, onde não foram encontrados mosquitos da espécie transmissora. A partir de então, investigações sobre a presença da doença em localidades semelhantes e em populações indígenas habitantes de matas selvagens revelaram que a febre amarela se apresenta em uma forma silvestre também e que pode ser transmitida por mosquitos de outras espécies, cujo habitat não é urbano, e sim, silvestre (11).

Diante disso, novas medidas profiláticas deveriam ser elaboradas. Nesse sentido, as descobertas sobre o agente etiológico iniciadas pela comissão dirigida por Walter Reed no final

de 1901 foram de grande valia. As experiências conduzidas por James Carroll, na época, indicaram que um agente filtrável, ou seja, um vírus, é causador da febre amarela (8). Desses fatos, foram inicialmente desenvolvidas técnicas de estudo sobre imunidade adquirida após restabelecimento do indivíduo acometido pela infecção utilizando macacos, e posteriormente camundongos. Também se abriu uma porta para a vigilância epidemiológica através da “prova de neutralização”, onde se determinava a porcentagem de uma população com imunidade adquirida contra a febre amarela, indicando ocorrências prévias e silenciosas da doença naquela localidade (11, 12).

Nos anos 1930, os esforços foram redirecionados para o desenvolvimento de um imunizante que fosse eficiente e capaz de prevenir a população contra os flagelos da febre amarela, complementar ao controle do mosquito vetor nas cidades, para a erradicação da doença (13). Em 1927, o vírus da febre amarela (*Yellow fever virus*, YFV) foi isolado do sangue de um paciente de Gana com infecção leve, de nome Asibi, por Adrian Stokes, que contraiu posteriormente a forma letal da doença enquanto desenvolvia estudos sobre a febre amarela em macacos Rhesus (14-16). Uma década depois, Max Theiler divulgou o desenvolvimento de uma cepa do YFV que foi atenuada através de diversas passagens em camundongos, seguidas de passagens em embrião de galinha sem sistema nervoso central, sendo denominada cepa 17D, para imunização de humanos (13, 17). A atenuação viral da cepa 17D é caracterizada pela perda de viscerotropismo e neurotropismo. As vacinas utilizadas atualmente são as cepas derivadas da 17D: (i) 17D-204, fabricada na França e no Senegal, (ii) 17D-213 produzida na Rússia, e (iii) 17DD, fabricada no Brasil. Estas cepas diferem minimamente na sequência genômica, mas não na capacidade de indução de resposta imune protetora e ainda controlam surtos de febre amarela na África, onde há maior ocorrência, e na América do Sul (18, 19). Diante de tantos avanços no controle e na prevenção, no final do século XX o status da febre amarela foi alterado de uma grande ameaça para uma doença negligenciada (20).

No final dos anos 1960, já haviam sido feitos diversos avanços com relação à estrutura de ácidos nucleicos, a partir dos quais se desenvolveram técnicas de análise de RNA viral (21, 22). No início dos anos 1970, foi desenvolvida a técnica de *RNA fingerprinting* que viria a ser utilizada como ferramenta de análise de homologia entre cepas do YFV nos anos 1980. Com essa técnica foi possível analisar as características de cepas virais presentes na África, assim como confirmar que o RNA genômico de cepas americanas tem propriedades estruturais similares e são diferentes das cepas africanas (23, 24). Em 1987, o genoma completo do YFV, da cepa Asibi e da cepa vacinal 17D-204, foi sequenciado pelo grupo norte-americano liderado pelo Dr. Charles M. Rice, desvendando os determinantes moleculares que ocasionaram a atenuação viral (25). Dentre os membros do grupo do Dr. Charles Rice estava o Dr. Ricardo

Galler, cuja contribuição foi fundamental na elucidação da composição genômica e variabilidade entre as cepas vacinais do vírus da febre amarela, incluindo a caracterização da cepa 17DD, fabricada e distribuída no Brasil (26-28). O sequenciamento genômico do YFV abriu portas para a comparação de diferentes cepas virais, o que culminaria na confirmação, enfim, do local de origem da doença.

A primeira comparação de genomas do YFV, e agrupamento de acordo com a similaridade genética, foi realizada em 1994, com sequências parciais de vinte e uma cepas virais, das quais vinte eram provenientes da África, e uma da América do Sul (Peru). No dendrograma gerado, foi possível observar que as cepas africanas se dividem em dois clados: um agrupamento de sequências da África ocidental e outro com cepas da República Centro-Africana e da África oriental. A cepa sul-americana apresentou divergência de em torno de 15% em relação ao clado da África ocidental, e de 20% em relação ao clado da África central e oriental. Esse estudo foi importante em estabelecer a distribuição geográfica do vírus e demonstrou pelo menos duas vias de dispersão na África (29).

No ano seguinte, mais um estudo, compreendendo vinte sequências, com mais representantes da América do Sul e do Caribe (oito sequências), foi realizado. Na reconstrução filogenética realizada pelos autores, é possível concluir com certeza que o YFV evoluiu independentemente em diferentes localizações geográficas. Foram observados dois clados distintos: cepas da África central e oriental em um clado, que foi denominado de genótipo I, e cepas da África ocidental, Caribe e América do Sul, constituindo o genótipo II. Ainda, o genótipo II é dividido em dois sub-clados, genótipos IIA e IIB, compreendendo as sequências do ocidente africano e uma sequência do Caribe, e da América do Sul, respectivamente (30). Com esses dois estudos, foi possível concluir duas coisas: a evolução viral na África ocorreu de maneira independente na região ocidental e nas regiões oriental e central, e existe uma clara relação entre as cepas da África ocidental e das Américas. Restou, então, desvendar se ocorreu uma introdução na África ocidental de vírus vindo das Américas, ou o contrário.

Não muito tempo depois, em 1996, outro estudo abrangendo três regiões diferentes do genoma viral de treze sequências do YFV, demonstrou que existem pelo menos quatro genótipos do vírus. Dois genótipos africanos, ratificando os estudos anteriores, divididos em África central/oriental e África ocidental, e dois outros genótipos sul-americanos. Além do mais, foi identificada uma repetição genômica específica do YFV (RYF) na região não codificante 3'UTR, que variava em número de acordo com o local de coleta do vírus (31). Um estudo posterior sobre as mesmas sequências repetitivas sugere que os vírus de genótipos sul-americanos evoluíram a partir dos genótipos da África ocidental (32).

Análises da diversidade do YFV na África por reconstruções filogenéticas revelaram que, na verdade, existem cinco genótipos africanos: africano ocidental I (*West Africa I*) e africano ocidental II (*West Africa II*), africano oriental (*East Africa*), africano oriental/central (*East/Central Africa*) e Angola (33, 34) (Figura 1.1). A divergência de um clado único para cepas angolanas ainda não é uma convenção, e estas cepas podem estar classificadas com as pertencentes à linhagem *East/Central Africa* (35). Essa diversidade genética sugere que o vírus tem circulado no continente africano há mais tempo que os registros históricos foram capazes de revelar. Além disso, existem mais ocorrências de surtos e epidemias na África que na América Central e do Sul. Portanto, a teoria da origem africana, que já estava convencionalmente difundida, adquiriu maior credibilidade.

Em 2007, um estudo sobre a evolução molecular do YFV com cento e trinta e três sequências de amostras provenientes de 22 países na África e na América do Sul, datou a origem deste vírus a cerca de 1.500 anos e mapeou a sua dispersão da África para as Américas nos séculos XV e XVI, durante o comércio de escravos (3). Por fim, pode-se afirmar que é possível que os primeiros casos reportados nos registros históricos, na cidade de Ysabella, San Domingo, em 1493, tenham sido importados com a tropa de Cristóvão Colombo em sua expedição da Espanha para o Novo Mundo, tendo reabastecido nas Ilhas Canárias, na costa oeste da África, onde foram reportados inúmeros casos de febre amarela naquela época (2, 16).

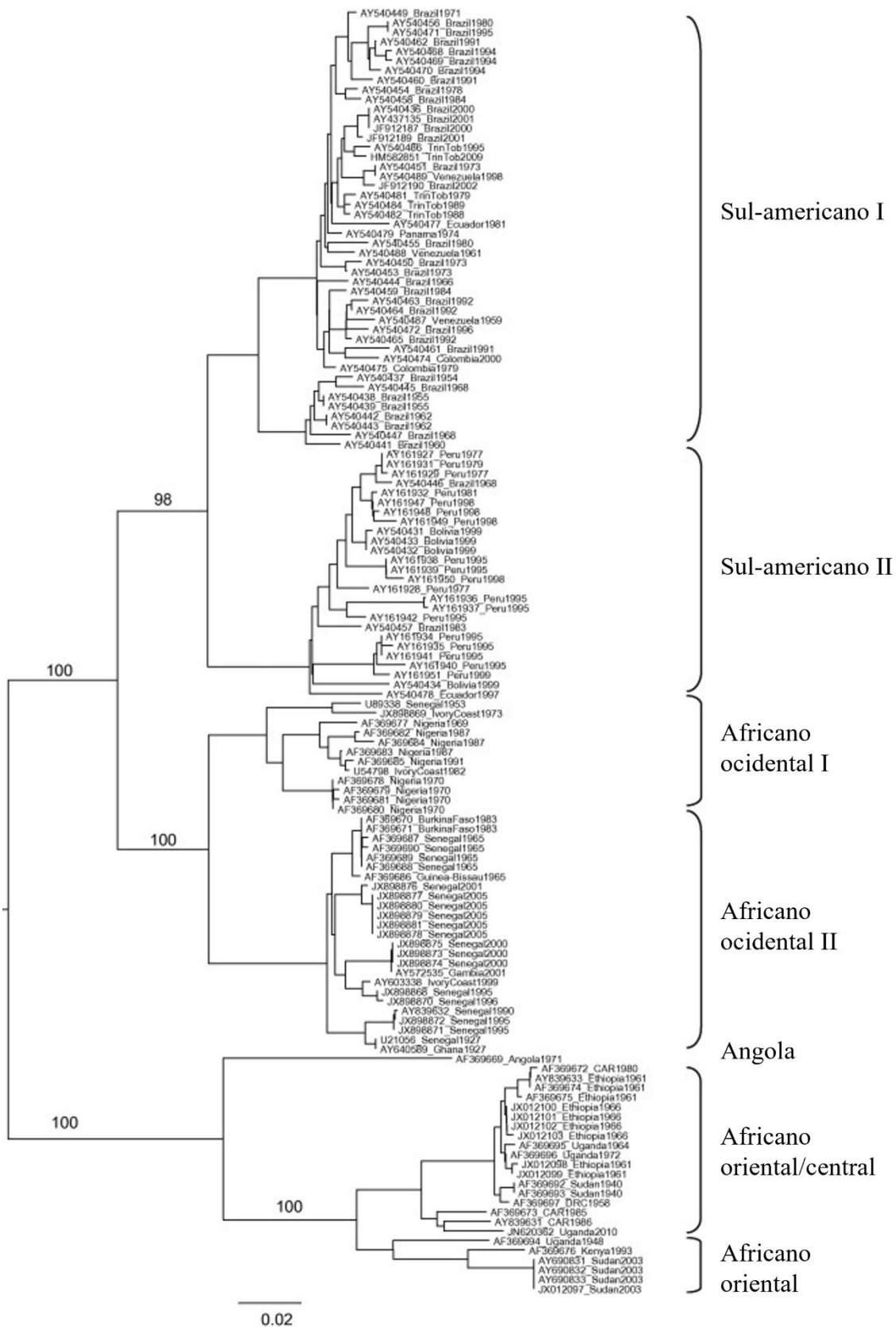


Figura 1.1 – Genótipos do vírus da febre amarela.

Os sete genótipos do YFV identificados até o presente momento, cinco de origem africana e dois de origem sul-americana. Fonte: adaptado de Beasley *et al.* Antiviral Research, 2015 (36).

1.2 Dispersão da Febre Amarela no Brasil

O primeiro registro de epidemia de febre amarela no Brasil está na publicação, já mencionada na seção anterior, de Ferreira da Rosa, “Tratado Único da Constituição Pestilencial de Pernambuco” que dá indícios de que Recife conhecia a doença desde 1685 (37). No ano seguinte, foi reconhecida uma doença com os mesmos sintomas daquela que assolava Recife, no estado da Bahia (38).

No mês de dezembro do ano de 1849, uma embarcação proveniente de Nova Orleans, a “Navarre”, atracou no Rio de Janeiro após realizar escala em Havana, Cuba, e em Salvador, onde estava ocorrendo um surto de febre amarela. A notícia do surto chegou ao Rio de Janeiro após dez dias da chegada da embarcação. Diante da notícia, o consignatário da “Navarre” a vendeu e a tripulação se dispersou pela cidade do Rio de Janeiro. De janeiro a março de 1850, a epidemia atingiu o pico se estendendo por toda a cidade do Rio de Janeiro, acometendo mais de 9.600 pessoas, contabilizando 4.160 óbitos. A partir de abril daquele ano, houve um declínio até que em setembro, foi considerada extinta naquele ano. A partir de então, as epidemias ocorriam durante as temporadas de calor e chuvas (novembro a abril), e a maioria dos casos aconteciam entre janeiro e março. Esse período de epidemias violentas no Rio de Janeiro ocorreu até meados do século XX e foi suficiente para exportar o YFV para outros países da América do Sul por via marítima (39).

As medidas de profilaxia que foram tomadas após 1900, com as descobertas do modo de transmissão e da vacina com vírus atenuado, controlaram o ressurgimento de epidemias avassaladoras durante anos. O mosquito *Aedes aegypti*, vetor da forma urbana da febre amarela, foi completamente erradicado do território brasileiro em 1955 (40). Porém, em 1967, o estado do Pará entrou em alerta após detectar a circulação desses mosquitos, que tinham sido erradicados do estado desde 1948. Naquele ano, ocorreu a notificação do óbito de um agrônomo japonês que contraiu a forma silvestre da febre amarela, demonstrando que o vírus estava circulando pelo Pará, e que a infestação do mosquito urbano poderia causar novamente uma epidemia na cidade de Belém, com 550.000 habitantes na época (41). A reprodução e dispersão de mosquitos *Aedes aegypti* foi contida em 1973, mas três anos depois a espécie do vetor foi reintroduzida na Bahia e sua dispersão não pôde ser mais controlada a ponto de erradicá-la novamente (40). Desde então, a vacinação é a principal medida de prevenção da doença no Brasil. A última ocorrência da forma urbana da febre amarela no país foi em 1942 no estado do Acre, os surtos e as epidemias subsequentes consistiram em infecções adquiridas durante o ciclo silvestre de transmissão (42).

A manutenção de casos silvestres da doença na maior parte do Brasil, gerou uma delimitação do território nacional considerando a endemicidade da febre amarela, a partir de

estudos epidemiológicos anteriores à década de 1970 (40). O Brasil foi dividido em três regiões: região endêmica, região de transição, e região indene. Na região endêmica, o vírus se mantém em um ciclo silvestre onde o homem é infectado acidentalmente, e abrangia os estados do Norte, do Centro-Oeste e uma parte do oeste do Maranhão. A região de transição compreendia uma faixa noroeste dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, e o oeste de Santa Catarina, onde o vírus ainda circula, causando surtos esporádicos. A região indene foi considerada livre de febre amarela, sem evidências de circulação do vírus, nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do país (40).

Houve mais duas grandes epidemias de febre amarela silvestre no Brasil, uma em 1972/73 no estado de Goiás, com 71 casos confirmados e 44 óbitos, e outra 20 anos depois no estado do Maranhão. Esta última vitimou 13 pessoas de um total de 90 infectados, tendo atingido uma população não-imune no leste do Maranhão, área considerada livre de circulação do vírus na época, indicando, portanto, que a área de circulação do vírus estava aumentando (40, 43) (Figura 1.2).

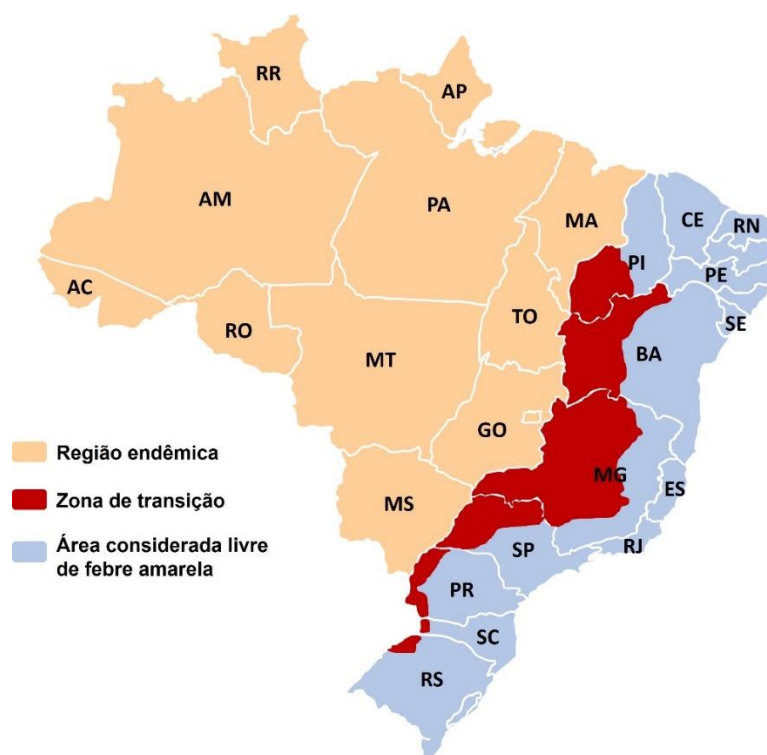


Figura 1.2 – Áreas de endemicidade no Brasil no início do século.

Mapa que delimita as áreas de endemicidade da febre amarela no país no início do século. Estados da região norte: AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO. Estados da região nordeste: AL, BA, CE, MA, PB, PE, PI, RN, SE. Estados da região centro-oeste: DF, GO, MT, MS. Estados da região sudeste: ES, MG, RJ, SP. Estados da região sul: PR, SC, RS. Fonte: adaptado de Vasconcelos *et al.* Emerging Infectious Diseases, 2004 (44).

Na primeira metade do ano 2000, um surto importante ocorreu, tendo como epicentro o estado de Goiás, cujo último surto tinha sido registrado em 1987, com apenas 10 casos confirmados de febre amarela. Nesse ano, foram reportados 53 casos e 23 óbitos somente em Goiás. Além disso, outros estados também reportaram casos de febre amarela como Pará, Amazonas, Distrito Federal, Mato Grosso, Tocantins, Minas Gerais, Bahia, São Paulo, e um caso no Rio de Janeiro. Portanto, nessa ocasião, foram detectados casos em regiões livres de febre amarela, alertando para a re-emergência desta doença e necessidade de ampliar as zonas de recomendação de vacinação (45, 46).

Análise molecular de 79 sequências genômicas de YFV isolados entre 1935 e 2001 no Brasil demonstrou que o vírus que circulou durante esse período pertence a apenas um genótipo, o sul-americano I (SA-I). Uma amostra coletada em Rondônia em 1983 representou uma exceção, agrupando-se com genomas pertencentes ao genótipo sul-americano II, indicando que os dois genótipos sul-americanos circularam concomitantemente no oeste brasileiro. A reconstrução filogenética desse estudo revelou que os isolados se organizaram em cinco sub-clados denominados *Old Pará*, 1A, 1B, 1C e 1D (Figura 1.3). Uma observação curiosa é que o sub-clado *Old Pará* foi assim denominado por não ser detectada a circulação de vírus pertencentes ao agrupamento em datas recentes. Sendo assim, essa sub-linhagem se tornou escassa ou mesmo inexistente (44).

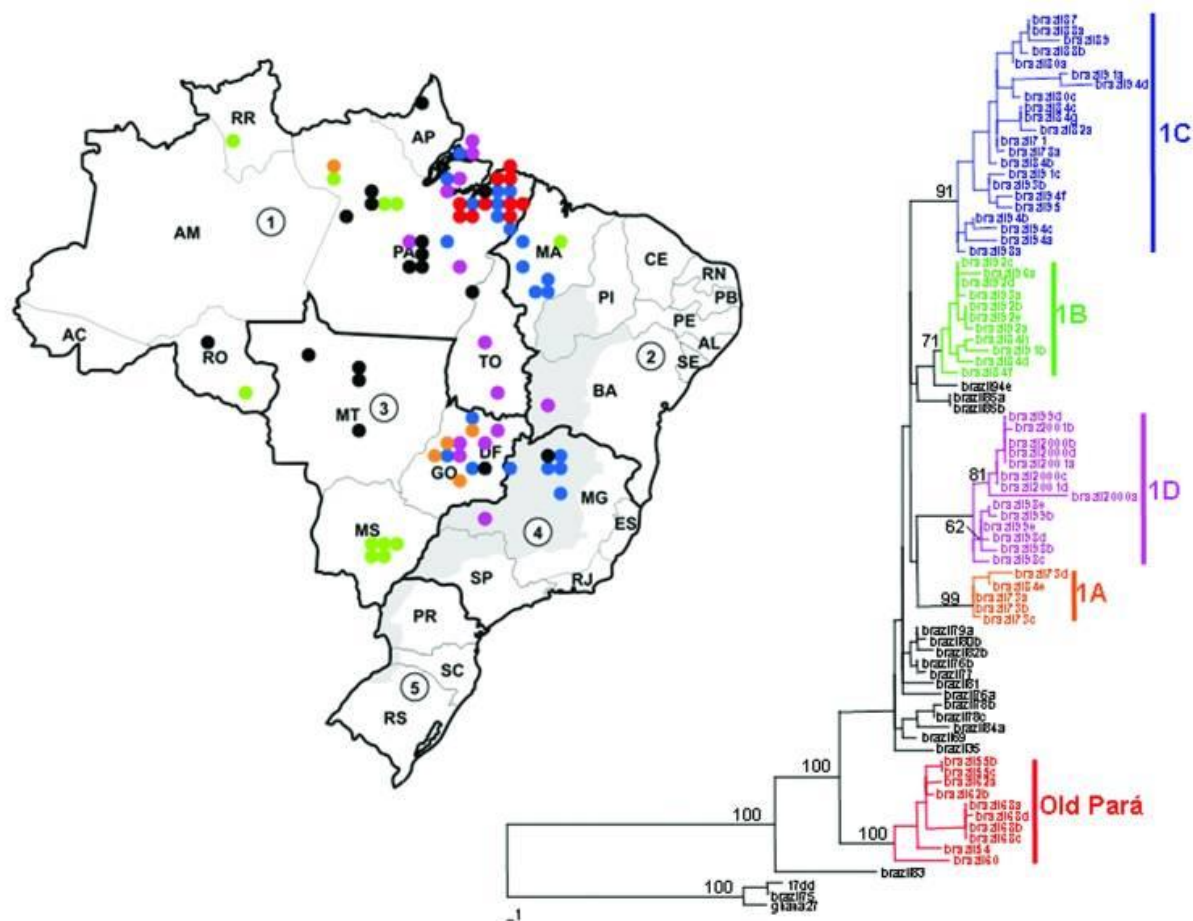


Figura 1.3 – Filogenia de isolados do vírus da febre amarela no Brasil.

Identificação de cinco sub-linhagens do genótipo sul-americano I composta pela diversidade de cepas brasileiras do YFV. A origem geográfica dos isolados está indicada no mapa com as mesmas cores dos clados ao qual correspondem. Fonte: Vasconcelos *et al.* Emerging Infectious Diseases, 2004 (44).

Em 2008/09 houve uma epizootia significativa no sul do Brasil, com 2.013 óbitos de primatas não-humanos (PNH) no estado do Rio Grande do Sul (47, 48). Nesta mesma época, foram reportados casos de febre amarela em macacos no estado de São Paulo, e em humanos nos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (49). A partir da vigilância epidemiológica, foi possível vacinar parte da população nas municipalidades com ocorrência de epizootias no Rio Grande do Sul, sendo uma região sem recomendação de vacinação, logo, de baixa cobertura vacinal (47).

Análise molecular de sequências genômicas desse período revelou um novo sub-clado dentro do genótipo sul-americano I, o sub-clado 1E. Estima-se que essa nova sub-linhagem divergiu em 1975 no norte do Amazonas, sendo detectada pela primeira vez em 2004 no estado. Os autores também concluíram que os isolados desse surto divergiram no final dos anos 1980. Por fim, também foi possível observar que as linhagens virais que causam epidemias históricas tendem a desaparecer, assim como constatado para a sub-linhagem *Old Pará*, sendo assim,

amostras de epidemias recentes constituem novas sub-linhagens, que substituem as anteriores (49). O conhecimento gerado pelos estudos filogenéticos desde 2000 permitiu delinear o padrão evolutivo do YFV, assim como reavaliar a endemicidade da doença no Brasil.

De fato, uma análise dos estudos de filogenia do YFV realizados, demonstrou que a periodicidade de epidemias de febre amarela nas localidades onde o vírus é mantido em ciclo silvestre não seria ocasionada apenas pela renovação da população de PNH em localidades diferentes. O YFV sofre uma evolução *in situ*, onde novas epidemias e surtos são ocasionados, entre outros fatores, pela alteração genética viral. Essa observação foi apoiada pelas análises filogenéticas de vírus coletados na América do Sul, onde os genomas virais se agrupam principalmente pela região onde foram coletados ao invés da data de coleta. Portanto, a evolução molecular do vírus não é majoritariamente desencadeada pelas ondas de disseminação de uma localidade a outra, e sim, pela manutenção enzoótica local do YFV (50).

Neste sentido quando os primeiros casos de epizootias de febre amarela foram identificados na região sudeste do Brasil no final de 2016, no estado de Minas Gerais, um alerta foi acionado quanto à vigilância epidemiológica (51). As epizootias e os casos humanos foram sendo detectados nos demais estados do Sudeste: São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro, até meados de 2017. No final de 2017 até meados de 2018, foi registrado o maior número de casos deste surto, com 1.376 casos humanos e 483 óbitos, tendo atingido toda a região sudeste e se disseminando em direção ao sul do Brasil (52-54). A velocidade da dispersão viral somente no estado de São Paulo entre dezembro de 2016 e janeiro de 2017 foi de 1 km/dia, partindo do norte do estado. A linhagem viral que causou a primeira onda do surto disseminou em direção ao sul do estado, causando as duas ondas subsequentes, em meados de 2017 e no início de 2018 (55, 56). Este foi o maior evento de infecção por febre amarela desde o início da vacinação no Brasil (57).

Diversos fatores contribuíram para esta alta incidência, sendo um dos principais, a baixa cobertura vacinal da população que habita na costa atlântica, uma vez que a febre amarela estava extinta da região e, portanto, não havia recomendação de vacinação. O mais preocupante deste surto foi a proximidade das ocorrências a regiões metropolitanas altamente infestadas pelo vetor antropofágico *Aedes aegypti*, trazendo o risco de re-emergência da forma urbana de transmissão da febre amarela (58). Posteriormente, foram desenvolvidos estudos de identificação dos fatores espaço-temporais que indicam as áreas de risco para surtos de febre amarela no Brasil, levando em consideração as condições ecológicas das localidades (59, 60). Este surto resultou no aumento da cobertura vacinal no país inteiro através de campanhas de vacinação (61, 62). A última amostra de YFV detectada no estado do Rio de Janeiro foi proveniente de um macaco

bugio que veio a óbito decorrente de febre amarela em 2019 (63). Atualmente, o vírus segue disseminando em direção ao Sul e aos países fronteiriços como o Paraguai e a Argentina (64).

Durante esse surto, foram sequenciados os genomas completos de amostras virais coletadas de PNH, humanos e mosquitos vetores. Estes estudos foram determinantes para a caracterização molecular do vírus circulante (65). Além disso, foi possível, através de estudos de filodinâmica, aproximar a origem da dispersão viral nos estados do Sudeste. Os resultados determinaram duas rotas de transmissão que divergiram para (i) os estados de São Paulo e Rio de Janeiro, e (ii) para os estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro, ainda não apresentando um consenso do estado de origem desta divergência (66-71). Ainda, foram detectadas nove alterações de aminoácidos, que ocorrem em conjunto, em relação a amostras anteriores. A reconstrução filogenética mostrou que, apesar dessas alterações, o vírus circulante detectado em 2016 no Sudeste não constituiu uma nova sub-linhagem, e pertence ao sub-clado 1E do genótipo sul-americano I (SA-I) (72, 73) (Figura 1.4).

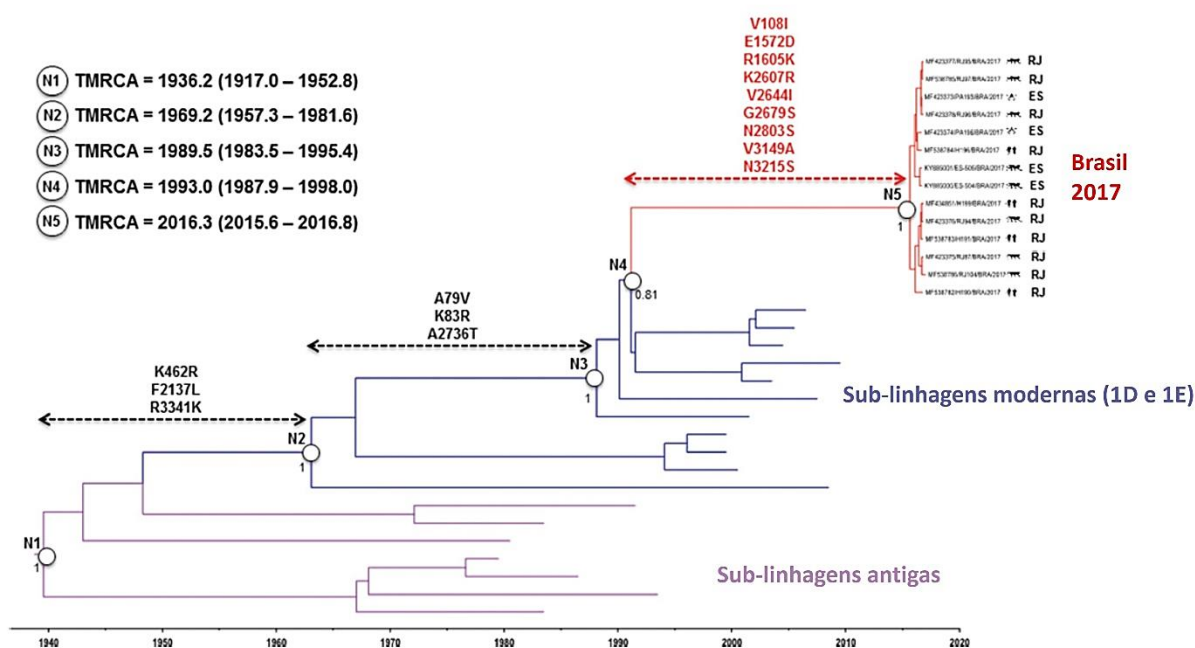


Figura 1.4 – Reconstrução filogenética em escala de tempo com as seqüências de amostras do vírus da febre amarela coletadas no Brasil em 2017.

Um conjunto de 14 genomas do YFV coletados de PNH, humanos e mosquitos em dois estados do Sudeste foram sequenciados e caracterizados filogeneticamente. Todos pertencentes a sub-linhagem 1E, apresentam as 9 substituições de aminoácidos indicadas sobre o ramo em vermelho. A análise representada datou o ancestral comum entre os clados pelos nós N1 a N5 (TMRCA). Fonte: adaptado de Gómez *et al.* Journal of General Virology, 2018 (73).

A partir do sequenciamento genômico de novas amostras e da disponibilidade de seqüências do genoma viral no banco de dados GenBank, foi possível elucidar em grande parte a história natural da febre amarela no Brasil. A reconstrução filogeográfica e temporal das

sequências genômicas permitiu compreender as rotas de disseminação viral nas Américas. As linhagens antigas do vírus que circularam nas Américas tinham origem no Brasil e foram exportadas para países vizinhos, como Colômbia, Venezuela e Trinidad e Tobago (74).

As linhagens modernas, isto é, os sub-clados 1D e 1E, seguiram o caminho oposto. A divergência das sub-linhagens antigas para as sub-linhagens modernas surgiu provavelmente no ano de 1977 em Trinidad e Tobago, substituindo as anteriores. Nos anos 1980, houve a introdução da linhagem moderna do YFV a partir de Trinidad e Tobago na Venezuela e no norte do Brasil. Esta linhagem foi responsável pelos surtos na Bahia, no Sul e no Sudeste no início do século. Entre 1999 e 2005, houve uma reintrodução do vírus no Brasil vindo da Venezuela, que ocasionou o surto em 2008, atingindo novamente o sul do país e alcançando a Argentina. Estima-se que houve uma segunda reintrodução do YFV entre 2000 e 2016, sendo a sub-linhagem 1E, da Venezuela para o Brasil, que resultou no último surto que se estendeu pela costa atlântica do Brasil, do Sudeste ao Sul (74) (Figura 1.5).

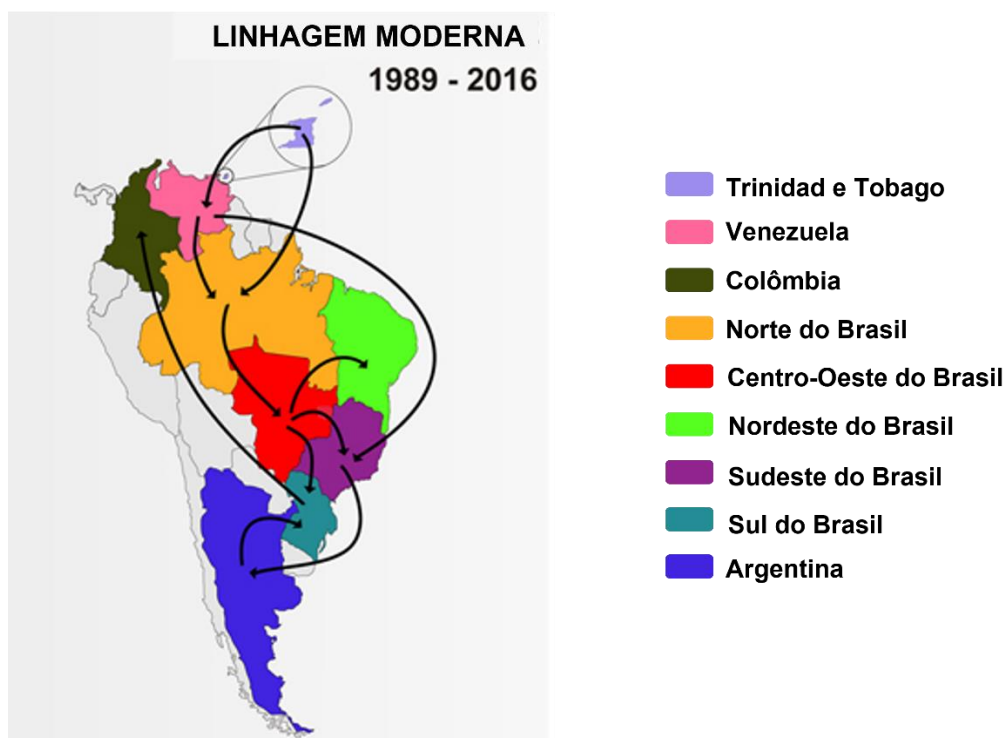


Figura 1.5 – Rotas de introdução das sub-linhagens modernas no Brasil.

As sub-linhagens modernas do YFV do genótipo Sul-Americano I foram introduzidas no Brasil, procedendo de Trinidad e Tobago, mais tarde, da Venezuela, alcançando o centro-oeste do país, por onde tiveram sucessivas passagens, e posteriormente, o Sudeste e o Sul. Fonte: adaptado de Mir *et al.* Scientific Reports, 2017 (74).

1.3 Alterações genômicas do vírus circulante no Sudeste entre 2016 e 2019

O YFV possui um genoma composto por uma fita simples de RNA com polaridade positiva, e um único quadro aberto de leitura (ORF) flanqueado por extremidades não codificantes 5'UTR e 3'UTR. A proteína viral gerada a partir da tradução da ORF é processada co- e pós-traducionalmente por proteases viral e do hospedeiro, resultando em dez proteínas independentes, três estruturais (Capsídeo - C, Membrana - prM/M e Envelope - E), e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas estruturais são responsáveis pela arquitetura da partícula viral e medeiam as interações com a célula hospedeira. As proteínas não estruturais estão principalmente envolvidas com a replicação do genoma viral (75, 76).

O genoma do YFV circulante durante o surto no sudeste brasileiro apresenta uma assinatura molecular composta por nove alterações de aminoácidos nas posições 108 (V → I), 1572 (E → D), 1605 (R → K), 2607 (K → R), 2644 (V → I), 2679 (G → S), 2803 (N/D → S), 3149 (V → A) e 3215 (N → S) da poliproteína viral. Essas posições correspondem às proteínas C (108), NS3 (1572 e 1605) e NS5 (2607, 2644, 2679, 2803, 3149 e 3215) (73). A presença destas alterações pode ter modulado aspectos do *fitness* viral e, conseqüentemente, ter influenciado na magnitude do surto que atingiu o Sudeste em 2016.

1.3.1 Proteína do capsídeo

A proteína C é a primeira porção traduzida da poliproteína viral. Esta proteína é constituída por três α -hélices, no caso do YFV, ou quatro α -hélices, no caso dos demais flavivírus, que estão situadas no citosol e ancoradas por mais uma α -hélice transmembrana, no retículo endoplasmático (RE) (77). Esta última α -hélice sinaliza a translocação da próxima região traduzida da poliproteína, a proteína estrutural prM, para o lúmen do RE. Além disso, essa estrutura é flanqueada por dois sítios de clivagem proteolítica, na extremidade N-terminal existe a região de reconhecimento pela protease viral NS2B-NS3, e na extremidade C-terminal, o sítio de clivagem pela signal peptidase celular (78, 79) (Figura 1.6 A).

A proteína C madura é gerada após a clivagem mediada pela protease viral. A proteína C existe fisiologicamente organizada em dímeros, e não há indícios da presença de monômeros de proteína C madura (77, 80) (Figura 1.6 B). Essa proteína é muito pouco conservada na sua sequência de aminoácidos entre os flavivírus, porém segue um padrão físico-químico na composição de aminoácidos nos seus diferentes domínios estruturais. Assim, os dímeros interagem por ligações hidrofóbicas entre as hélices $\alpha 1$ e $\alpha 1'$, formando uma região hidrofóbica

e sem carga, $\alpha 2$ e $\alpha 2'$, formando o core do dímero, e $\alpha 4$ e $\alpha 4'$ que geram uma região altamente carregada (81). A composição da região que compreende a hélice $\alpha 2$ é reconhecida como sequência interna hidrofóbica (*internal hydrophobic sequence*; IHS) e consiste igualmente em uma propriedade conservada da proteína C dos flavivírus (82). A organização das cargas e propriedades dos aminoácidos do dímero da proteína C indicam que a região hidrofóbica tem a principal função de interagir com a membrana do RE e que a região carregada interage com o RNA genômico viral (83).

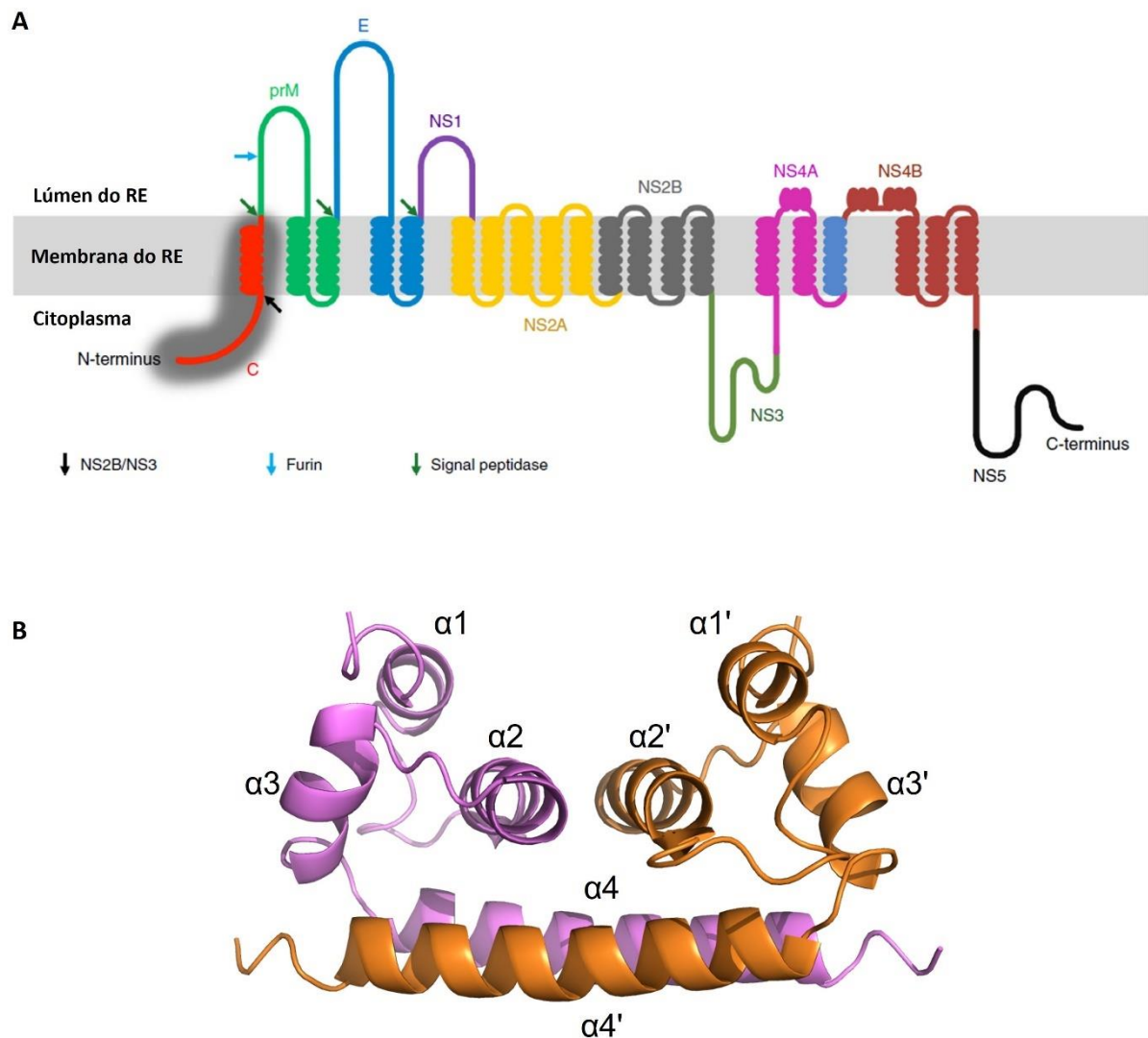


Figura 1.6 – Localização e estrutura da proteína C.

A) Topologia da poliproteína viral na membrana do RE. A proteína C (em vermelho e sombreada em cinza) é a primeira região traduzida e se localiza no citoplasma, com a hélice $\alpha 5$ inserida na membrana do RE, translocando a próxima região traduzida, prM, para o lúmen do RE. A hélice $\alpha 5$ tem dois sítios de clivagem, na extremidade N-terminal, a proteína é clivada pela protease viral NS2B-NS3 (seta preta), gerando a proteína C madura, e na extremidade C-terminal, pela signal peptidase celular (seta verde). Fonte: Adaptado de Tan *et al.*, Nature Communications, 2020 (84). B) Estrutura tridimensional do dímero de proteína C madura, com as quatro α -hélices identificadas, extraída do banco de dados PDB sob identificador 1R6R. Os monômeros se distinguem pelas cores violeta e laranja. Imagem obtida utilizando o software PyMOL Molecular Graphics System, versão 2.0, Schroedinger, LLC.

A proteína C não possui um core catalítico e sua principal função no ciclo replicativo viral é o empacotamento do RNA viral e a formação do núcleo-capsídeo. A interação das hélices $\alpha 4$ com o RNA é de alta afinidade, estimulando o agregamento dos dímeros de proteína C no genoma viral, formando assim, o núcleo-capsídeo (85). Inicialmente, não era possível correlacionar a estrutura icosaédrica da partícula viral com a arquitetura pleomorfa do núcleo-capsídeo. Recentemente, um estudo sobre o processo de montagem da partícula viral do Zika vírus (ZIKV) demonstrou a presença de proteínas C não clivadas pela protease viral. Essas proteínas não clivadas não eram majoritárias e a hélice $\alpha 5$, que era descrita como tendo unicamente o papel de ancoramento no RE e translocação da prM para o lúmen, apresentou relevância para a organização da estrutura quaternária da partícula viral imatura (84).

As hélices $\alpha 5$ vizinhas de dímeros adjacentes interagem entre si por contatos hidrofóbicos e formam trímeros de proteína C não clivada. A estrutura básica da composição da partícula viral consiste em três pares de dímeros de proteína C clivada ou não, que interagem com nove heterodímeros pré-formados de prM e E (Figura 1.7). Os ectodomínios interagem entre si no lúmen do RE montando uma partícula viral icosaédrica. No processo de maturação, onde ocorre mudança de pH no *Trans*-Golgi, a clivagem da prM e a reorganização das transmembranas das proteínas M e E podem induzir ao rompimento das suas interações com a proteína C, causando provavelmente a condensação do complexo RNA-C. Esse processo permitiria que o núcleo-capsídeo seja liberado no citoplasma após a fusão com a membrana do endossomo tardio no próximo ciclo de infecção (84).

A proteína do capsídeo é fundamental para a formação de partículas virais infectivas. A ausência dessa proteína não impede a interação entre as proteínas prM e E, que são capazes de formar partículas subvirais. Entretanto, essas estruturas são vazias, ou seja, não possuem RNA viral, e são em média três vezes menores que a partícula viral completa (86). Além desse papel crucial da proteína C na estruturação e composição da partícula viral infectiva, outras funções relacionadas a interações com o hospedeiro foram propostas.

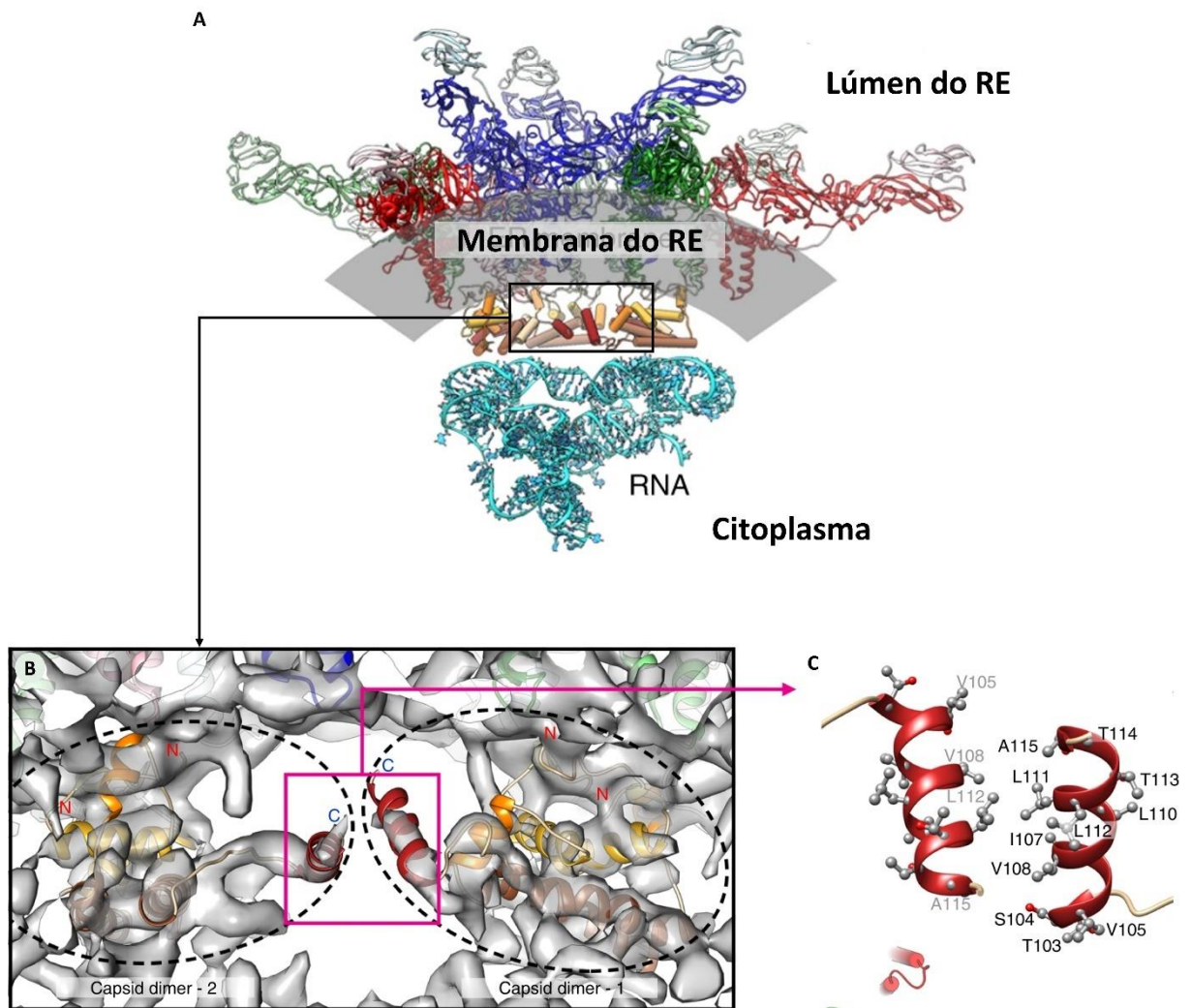


Figura 1.7 – Disposição estrutural da proteína C na partícula viral imatura e contribuição da hélice $\alpha 5$.

A) Montagem de uma unidade formadora da partícula viral na membrana do RE, composta por três dímeros de C, e nove heterodímeros de E-prM. O RNA genômico está representado em azul claro, as unidades da prM estão representadas em cinza claro, e as unidades de proteína E nas cores azul escuro, verde vermelho e rosa. Os dímeros de C estão representados pelos cilindros amarelos e laranjas, e a hélice $\alpha 5$ em vermelho. B) Ampliação da região do complexo de proteínas C que formam a ponte entre membrana do RE e RNA viral. Imagem que retrata a superfície molecular ocupada pelas α -hélices da proteína C. Em vermelho, as hélices $\alpha 5$. C) Ampliação e demarcação das interações entre hélices $\alpha 5$ de dois dímeros adjacentes na montagem da partícula viral imatura. Fonte: Adaptado de Tan *et al.*, Nature Communications, 2020 (84).

As regiões de caráter básico da hélice $\alpha 4$ parecem funcionar como uma sequência de localização nuclear que é reconhecida pela importina- α (87). De fato, a proteína C de flavivírus já foi localizada no nucléolo de células infectadas. É importante ressaltar que apesar da interação entre proteína C e RNA ser de alta afinidade, ela possui uma baixa especificidade, podendo interagir com o *backbone* de diversos tipos de ácidos nucleicos (88). Sendo assim, a presença dessa proteína no nucléolo sugere que possa existir alguma interação com fatores de biogênese ribossomal celular. Efetivamente, a proteína C de flavivírus já foi descrita como

reguladora de genes antivirais tanto em células de mosquitos quanto de mamíferos (85). Inclusive, a proteína C do YFV tem a capacidade de proteger o RNA de dupla fita (dsRNA), que é uma forma intermediária do genoma viral durante o processo de replicação, da degradação via DICER em mosquitos, viabilizando a replicação viral no vetor (88).

As regiões hidrofóbicas na região N-terminal e na hélice $\alpha 2$ foram determinadas como regiões que medeiam o acúmulo observado de proteína C em gotículas lipídicas (89, 90). O mecanismo proposto desta interação consiste na ligação inicial do N-terminal com a gotícula lipídica, que induz uma reorganização conformacional, expondo a superfície hidrofóbica compreendendo a hélice $\alpha 2$ para reforçar a interação. A gotícula lipídica regula a disponibilidade da proteína C para ligação com o genoma viral liberado pelo complexo replicativo dentro das projeções da membrana do RE no citoplasma (91). As gotículas lipídicas são organelas dinâmicas que participam no metabolismo de lipídeos, assim como na geração de prostaglandinas e leucotrienos que são importantes mediadores da resposta inflamatória. De certa forma, pode-se sugerir que a proteína C também participe da patogênese das flaviviroses (83).

1.3.2 Proteína NS3

A proteína não estrutural NS3 possui atividades catalíticas que são essenciais para o ciclo replicativo viral. A primeira função enzimática descrita para a proteína NS3 foi a função de serino-protease viral, consistindo em torno de 180 aminoácidos no N-terminal. Além da similaridade estrutural com serino-proteases da família da tripsina, a proteína possui a tríade catalítica conservada entre flavivírus H53, D77 e S138 (92).

O domínio protease da NS3 (NS3pro) atua no processamento da poliproteína viral (Figura 1.8), clivando-a especificamente nas sequências consenso G(A)RR↓S(G) para gerar as extremidades N-terminal das proteínas NS2B, NS3, NS4A e NS5 (93). Entre as proteínas não estruturais NS4A e NS4B, existe um peptídeo sinal bem descrito composto por 23 aminoácidos e denominado 2K. Entre a proteína NS4A e o peptídeo 2K também foi mapeado um sítio de clivagem pela NS3pro composto pela sequência QR↓S (94). A NS3pro é igualmente responsável pela clivagem entre as hélices $\alpha 4$ e $\alpha 5$ da proteína C, gerando a proteína madura solúvel no citosol.

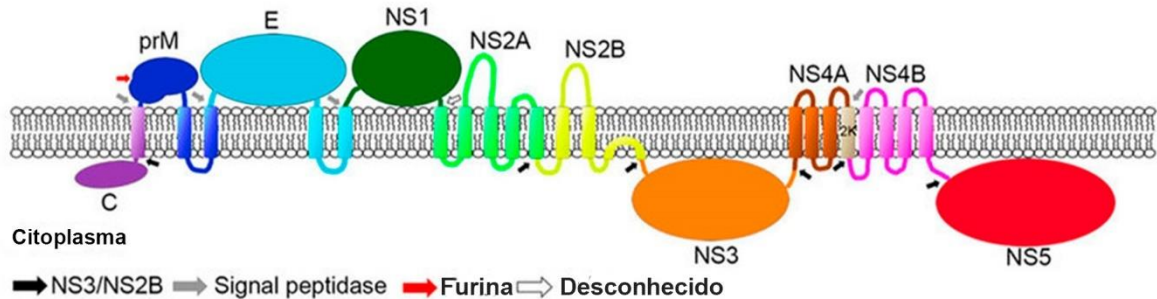
A**B** Lúmen RE

Figura 1.8 - Composição genômica dos flavivírus e processamento da poliproteína viral.

No painel A está representada a estrutura genômica dos flavivírus, composta por 2 regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR) e um único ORF codificante para a poliproteína viral. Esta poliproteína é processada por proteases do hospedeiro ou pela protease viral NS2B-NS3, como indicado no painel B. Fonte: adaptado de Barrows et al. Chemical Reviews, 2018 (95).

Essa atividade de protease é dependente da proteína NS2B que funciona como cofator e demonstrou ser essencial para o correto funcionamento da NS3pro (93, 96) (Figuras 1.8 e 1.9). A auto proteólise entre NS2B e NS3 ocorre em *cis* após a clivagem entre NS2A e NS2B, assim como uma clivagem interna no domínio helicase da NS3 (92, 97).

A região de interação no complexo NS2B-NS3pro ocorre, do lado da NS2B, em um domínio hidrofílico central de aproximadamente 40 aminoácidos carregados e conservados entre os flavivírus (96). A interação foi proposta como dependente de carga dos resíduos na extremidade N-terminal da NS3pro (98, 99). O cofator NS2B interage com a membrana do RE pelas suas regiões de âncora e com a NS3pro pela região hidrofílica contida em estruturas de folha β . Essa interação não tem somente a função de estabilizar o domínio protease da NS3 em seu correto enovelamento, mas também induz um novo enovelamento da região da NS2B formando um componente importante do sítio catalítico da protease. Após ligação com o substrato, a porção da NS2B sofre mudança conformacional, gerando um grampo de folhas β que estabiliza e faz parte da fenda catalítica (100) (Figura 1.9).

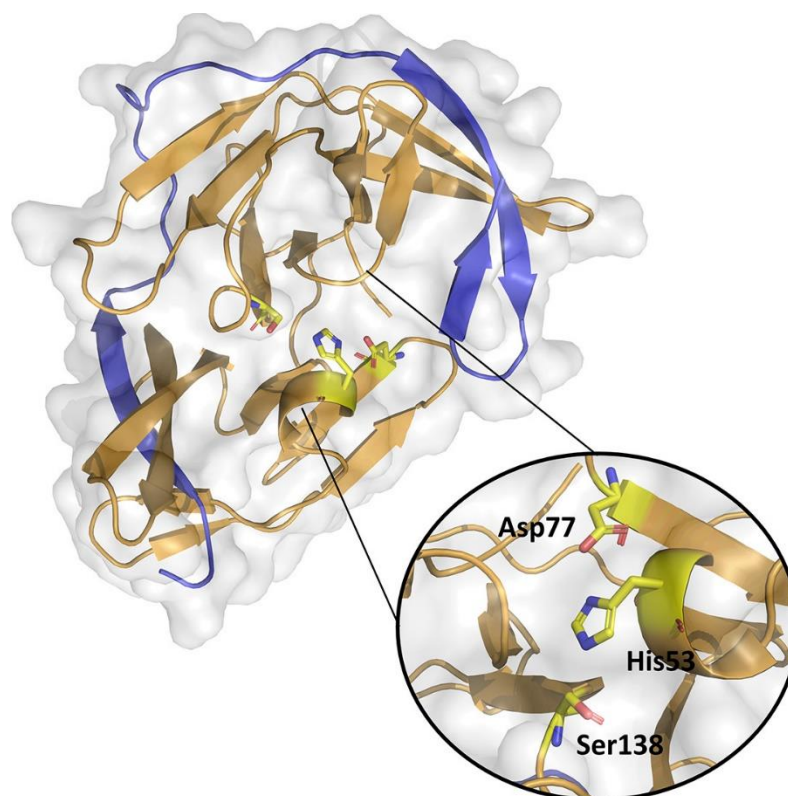


Figura 1.9 – Estrutura do domínio NS3pro ligado ao cofator NS2B.

Superfície molecular da estrutura tridimensional do complexo NS2B-NS3pro, com as estruturas secundárias em dourado, da NS3pro, e em azul, da NS2B. Demarcado em amarelo, a tríade catalítica conservada entre os flavivírus, H 53, D 77 e S 138. Fonte: Noske *et al.*, *Biochimica and Biophysica Acta*, 2020 (101).

Os 440 resíduos da extremidade C-terminal da proteína NS3 compõem uma helicase com atividade enzimática de nucleosídeo trifosfatase (NTPase) estimulada por RNA, atuando na separação entre a fita nascente de RNA e a fita molde, assim como no desenovelamento de estruturas secundárias da região não traduzida 3'UTR durante a replicação do genoma viral (102). Os dois terços C-terminal da proteína NS3 é de fato um domínio helicase (NS3hel), catalisando a separação e remodelagem de fitas de ácidos nucleicos, possuindo identidade com a superfamília de helicases 2, família DEAH. Essa classificação é baseada nos sete motivos conservados associados com atividade de hidrólise de nucleosídeos trifosfato (NTP) (Figura 1.10). Os motivos I e II são respectivamente nomeados motivos *Walker A* e *Walker B*. A helicase dos flavivírus é composta por três domínios (I, II e III), que formam uma fenda entre o domínio III, que é exclusivo dos flavivírus, e os domínios I e II (103, 104). Essa fenda consiste na região de ligação da fita simples de RNA genômico, de maneira que a extremidade 3' se posiciona abaixo do domínio I e a extremidade 5', abaixo do domínio II (104). Os motivos *Walker A* e *B* interagem diretamente com NTPs. O motivo *Walker A* é flexível e deve sofrer alterações conformacionais decorrentes da ligação a NTPs, atuando na translocação do RNA nascente dependente de ATP (105). No domínio II tem um grampo de folhas β que se projeta

em direção ao domínio III e foi descrito como um elemento crítico para a atividade de desenovelamento (103, 106). Além disso, a NS3hel de flavivírus não carrega um resíduo conservado de glutamina (Q) *upstream* do motivo *Walker A* que confere especificidade para ATP (104).

Portanto, a NS3hel tem o papel principal de assistir à iniciação da síntese da fita simples negativa de RNA que serve de molde no processo de replicação, desenovelando as estruturas secundárias de RNA das extremidades 5' e 3'UTR (107, 108). Dessa forma, a atividade de NTPase fornece energia química para gerar uma conformação receptiva do RNA para a amplificação pela RNA polimerase dependente de RNA viral (RdRp) (102, 109).

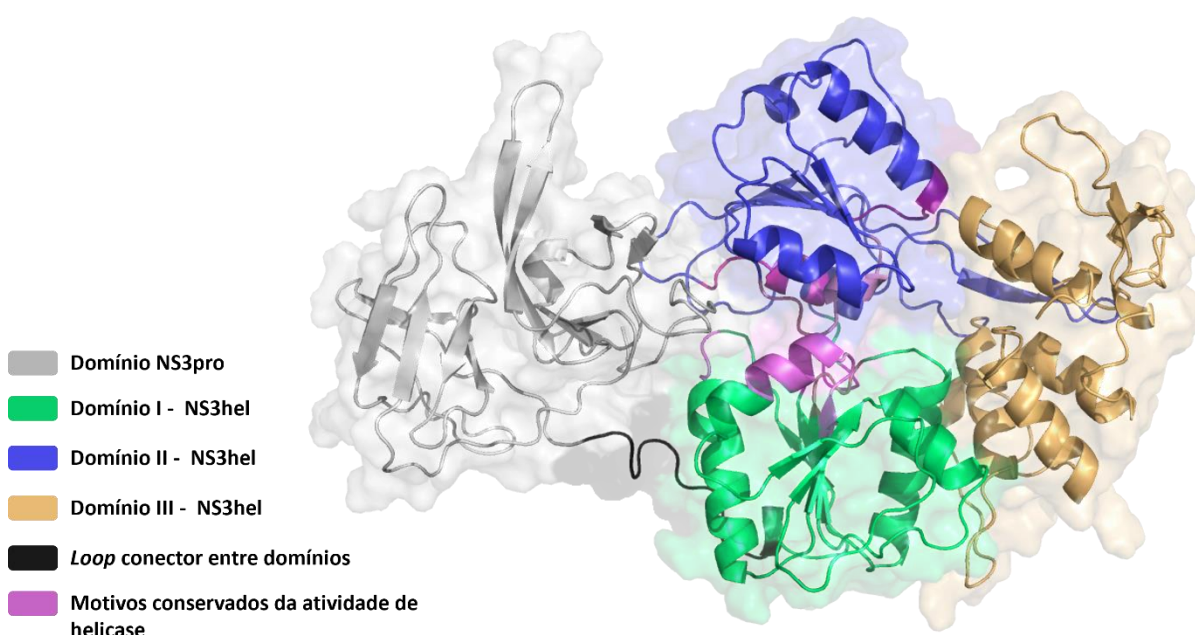


Figura 1.10 – Organização tridimensional da proteína NS3.

Superfície molecular e estruturas secundárias da proteína NS3 completa. Em cinza, o domínio protease, em verde, o subdomínio I da porção helicase, em azul, o subdomínio II e em laranja claro, o subdomínio III. Em preto, o *loop* conector entre domínios e em violeta, os sete motivos que desempenham a função de helicase. Fonte: Imagem obtida utilizando o software PyMOL Molecular Graphics System, versão 2.0, Schrodinger, LLC, e a estrutura coletada do banco de dados PDB, identificador: 5YW1. Informações obtidas de Wu *et al.* Journal of Virology, 2005 (104).

A terceira função catalítica da proteína NS3hel tem a ver com o sítio catalítico para a atividade NTPase que alberga a extremidade 5' trifosfato de RNA, e catalisa igualmente a reação de RNA trifosfatase (RTPase) (110, 111). Um estudo de mutagênese do resíduo de glicina (G) na posição 517 da NS3hel demonstrou que este resíduo é fundamental tanto para a atividade de helicase quanto para a RTPase (112). Portanto, a NS3hel pode alterar a estrutura secundária do RNA genômico nascente na extremidade 5'UTR, tornando o fosfato γ acessível

para sua remoção. Como resultado dessa atividade RTPase, a extremidade 5' do genoma é desfosforilada antes das etapas de capeamento do RNA realizadas pelo domínio metiltransferase (MTase) da proteína NS5 (106, 108).

A proteína NS3 interage com outras proteínas virais, produzindo efeitos em diferentes processos durante a replicação viral. A interação mais evidente e melhor documentada é a que envolve a proteína NS2B, o cofator da atividade proteolítica, que já foi descrita nesta seção. A segunda interação mais estudada é a que envolve a proteína NS5 e o domínio NS3hel. A região de interação envolve em torno de 300 resíduos, compreendendo os domínios II e III da NS3hel e 40 resíduos mapeados entre os domínios N-terminal da MTase e C-terminal da RdRp na proteína NS5 (113). Além disso, as atividades de NTPase e RTPase são estimuladas pela proteína NS5 (104). A interação com as NS4A e NS4B potencializa a atividade de helicase da NS3, reduzindo a quantidade de ATP necessária e facilitando a dissociação do RNA de fita simples, respectivamente (114, 115). Essa proteína também interage com a proteína NS2A, produzindo um efeito crucial na formação de um complexo replicativo capaz de mediar o encapsulamento do RNA viral, e a montagem de partículas virais (116). Nesse sentido, também foi demonstrada a interação entre o domínio II da NS3hel e a proteína Alix da célula hospedeira (117). Como já exposto na subseção anterior, a protease NS2B-NS3 é necessária para o processamento da proteína de capsídeo que é parte fundamental da montagem do vírion e está associada à membrana do RE. A presença da proteína NS3, interagindo com a Alix, na proximidade da membrana e da proteína C, pode auxiliar significativamente o processo de montagem. A Alix recruta os fatores ESCRT-III, Vsp4 e endofilinas, gerando a curvatura da membrana do RE e auxiliando o início da montagem da partícula viral (117-119).

Por fim, é importante ressaltar que a interação entre NS2B e NS3 pode ir além da atividade proteolítica. A NS3pro e o *loop* conector, ou alça conectora, entre domínios podem ter interações significativas com o domínio II da NS3hel, influenciando nas alterações conformacionais necessárias para a atividade de helicase. Construções de NS3hel sem a região do conector não tiveram impedimento no desempenho da função NTPase, porém a função de helicase só foi mantida em construções com maior sequência do *loop* conector (108). Além disso, o complexo NS2B-NS3pro influencia na especificidade do domínio NS3hel para o desenovelamento de RNA de fita simples (120). A interação entre NS3 e NS2B também colabora para ancoramento na membrana do RE e montagem da partícula viral. Surpreendentemente, a NS2B é aparentemente ausente nas vesículas onde se encontra o complexo replicativo, sugerindo que a transição entre processamento da poliproteína e a replicação, a NS3pro se torna inativa (121).

1.3.3 Proteína NS5

A proteína NS5 é a maior e a mais conservada dos flavivírus e desempenha funções centrais no processo de replicação do ciclo viral. Essa proteína, assim como a NS3, possui dois domínios funcionais: um domínio N-terminal com atividade de MTase e um domínio C-terminal com atividade RdRp, ligados por uma alça conectora de nove aminoácidos (122).

O domínio MTase foi inicialmente descrito ao mapear a estrutura secundária predita e a conservação de resíduos e motivos em comum com outras metiltransferases celulares e virais (123). O sítio catalítico foi identificado como uma tétrede composta pelos resíduos K D K E, nas posições 61, 146, 182 e 218, respectivamente (124). Esses resíduos estão próximos do grupo 2'-OH do substrato de RNA e podem contribuir para a desprotonação necessária para o ataque nucleofílico ao átomo de carbono do grupamento metila que será transferido (124). A tétrede catalítica atua na reação de metilação, tendo como resíduos essenciais para a catálise os aminoácidos D 146 e K 182, que necessitam dos resíduos K 61 e E 218 para desempenhar suas funções específicas eficientemente (125). A cadeia lateral do resíduo catalítico D 146 forma uma ligação de hidrogênio com o grupo amino da molécula de SAM, e por isso, pode estar envolvido nas duas reações de metilação catalisadas pela MTase viral (125) (Figura 1.11 A e C).

Além disso, outro motivo conservado entre algumas metiltransferases foi descrito na MTase de flavivírus como sendo um sítio de ligação à S-adenosil-L-metionina (SAM), sendo SAM a molécula doadora da metila que é transferida ao ácido nucleico. Esse sítio consiste em um *loop* rico em G, precedido uma região hidrofóbica (123). Posteriormente também foi identificada a atividade de guanililtransferase (GTase) nesse domínio (126). Essas três atividades da NS5 MTase são essenciais para o processo de capeamento do 5'-terminal do RNA genômico, que ocorre em quatro etapas (Figura 1.11 B).

A primeira etapa da reação de capeamento é desempenhada pela NS3hel, e consiste na atividade RTPase do RNA de fita simples e polaridade positiva nascente, estando na estrutura inicial de RNA-trifosfato, pppAN, gerando ppAN e um fosfato inorgânico (Pi) (Figura 1.11 B). À extremidade 5'-difosfato RNA é transferida um monofosfato de guanosina (GMP) resultante da hidrólise de uma molécula de GTP, pela atividade GTase da NS5 MTase, formando RNA genômico capeado, GpppAN. Após o capeamento, a atividade de MTase procede de maneira sequencial na transferência de grupos metila em duas posições do RNA, utilizando SAM como doador do grupo metila (125) (Figura 1.11 B). A estrutura de cap-0 é gerada após a N-metilação no anel de purina do cap de guanilato, gerando ^{m7}GpppAN. Em seguida, a estrutura cap-1 é resultado de uma O-metilação na ribose do adenilato capeado, o primeiro nucleotídeo no 3' da ponte trifosfato, formando a estrutura ^{m7}GpppA_mN (123-125).

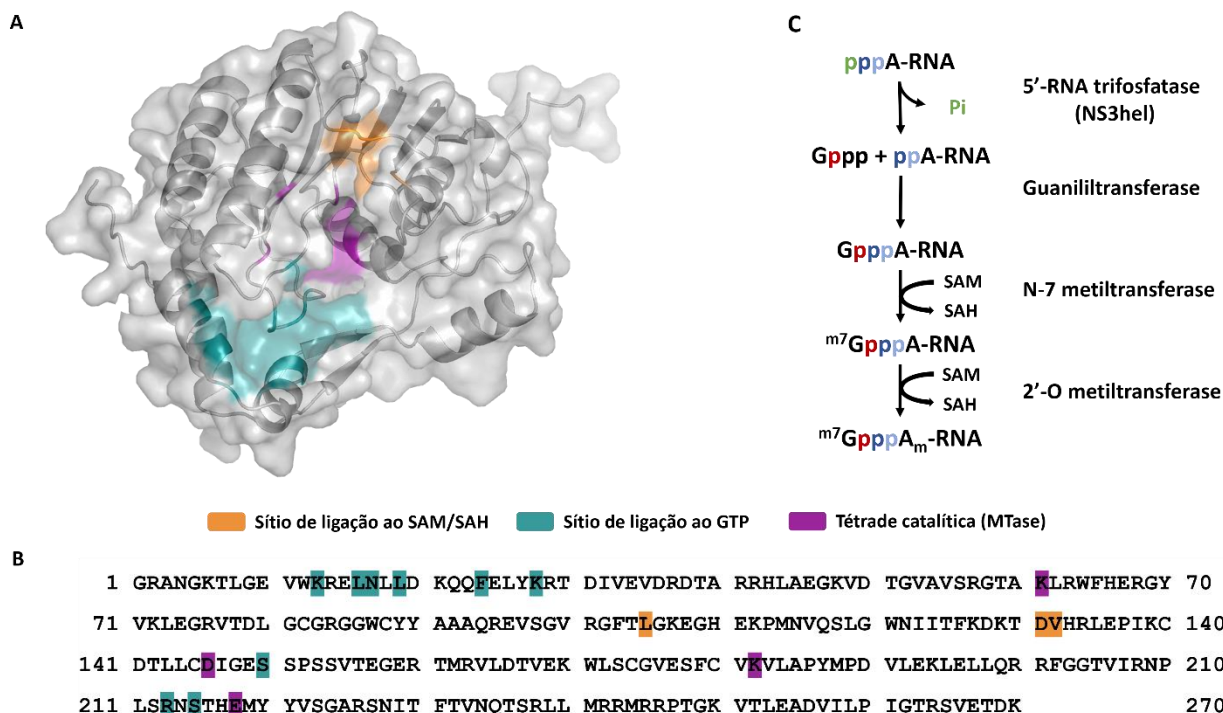


Figura 1.11 – Domínio MTase da NS5 e reação de capeamento dos flavivírus.

A) Estrutura tridimensional e superfície molecular do domínio MTase, com o sítio de ligação ao SAM/SAH em laranja, o sítio de ligação ao GTP em azul, e o sítio catalítico em violeta. Fonte: Imagem obtida utilizando o software PyMOL Molecular Graphics System, versão 2.0, Schrodinger, LLC, e a estrutura coletada do banco de dados PDB, identificador: 3EVC. B) Sequência de aminoácidos do domínio MTase, indicando os resíduos localizados na estrutura tridimensional. C) Reações e produtos intermediários da formação de cap 1 dos flavivírus. Fonte: Adaptado de Dong *et al.*, Antiviral Research, 2008 (127).

O domínio MTase é dividido em três subdomínios: o subdomínio 1 que é a estrutura no N-terminal composta por uma hélice-volta-hélice, uma folha-β e uma α-hélice; o subdomínio 2 que consiste no core catalítico, se enovela em folhas-β de 7 fitas, envolvido por 4 α-hélices; e o subdomínio 3 que é a estrutura C-terminal com uma α-hélice e duas folhas-β, e se localiza os subdomínios 1 e 2 (Figura 1.12 A e B). A especificidade da ligação entre a MTase e o RNA genômico ocorre por duas ligações de hidrogênio envolvendo o grupo amino da cadeia lateral do resíduo K 13 e com o oxigênio da cadeia lateral do N 17 que são conservadas entre flavivírus, com a ribose da guanina do cap. O grupamento hidroxila na extremidade 3' interage por ligação de hidrogênio com o grupo carbonila da cadeia principal da S 150 e com o grupamento amino da cadeia lateral do K 13. A especificidade para guanina é garantida pelas ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila da cadeia principal dos resíduos L 16, N 17 e L 19 e o grupamento amino da nucleobase (128). Além disso, a base de purina do nucleotídeo se apoia contra o anel aromático do resíduo F 24 (124). A especificidade também é demarcada pelo fato de os primeiros nucleotídeos dos flavivírus serem conservados e, principalmente, pelas

estruturas secundárias igualmente conservadas da extremidade 5' do RNA viral (129) (Figura 1.12 C).

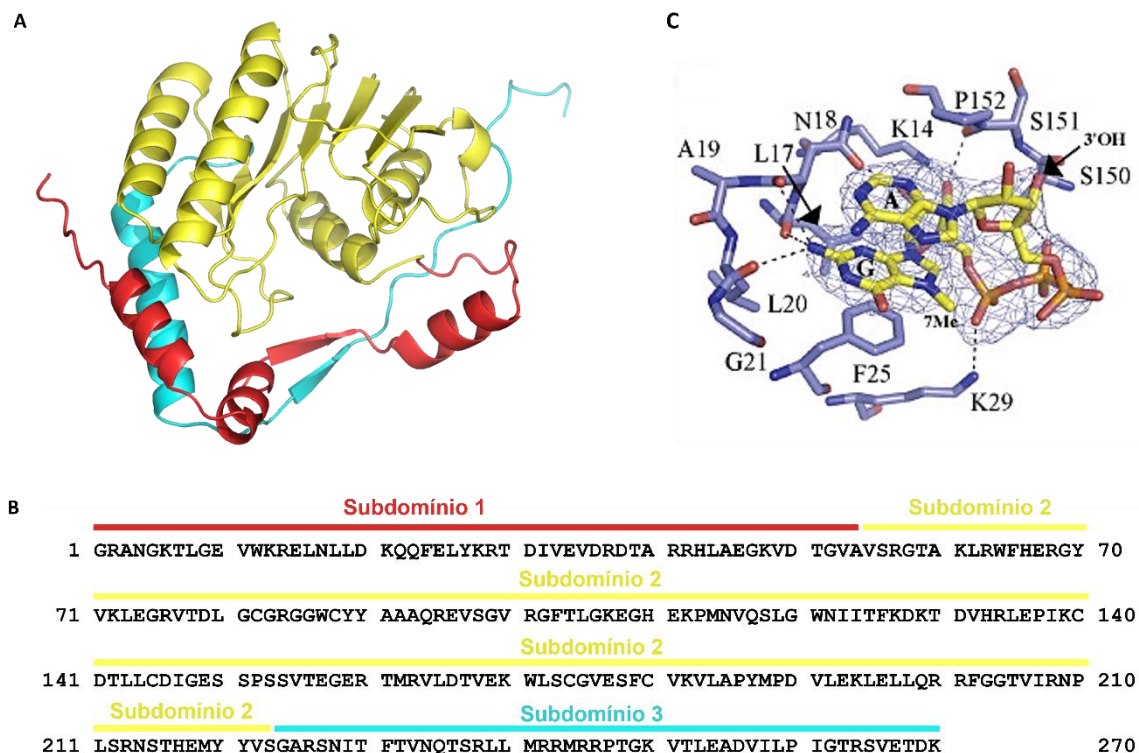


Figura 1.12 - Os subdomínios da MTase e a interação com o RNA viral. A) Demarcação dos subdomínios determinados pela estrutura tridimensional do domínio MTase e B) Sequência de aminoácidos com a mesma delimitação. C) Resíduos de interação com o RNA genômico viral. As nucleobases estão representadas em amarelo e os resíduos em azul. Fonte: adaptado de Egloff *et al.* Journal of Molecular Biology, 2007 (128).

Uma característica peculiar da MTase de flavivírus é que ela medeia duas reações de metilação, mas apresenta apenas um sítio de ligação ao SAM. Foram propostos dois mecanismos de formação de cap-1 no RNA viral, uma vez que os aceptores da metila são diferentes para a metilação N7 e a 2'OH (125) (Figura 1.13). A primeira proposta descreve que o N7 da guanina do cap estaria posicionado perto do grupo metil da molécula de SAM, gerando o cap-0. Depois da metilação em N7, a porção ^{m7}Gppp se move para dentro da cavidade do sítio de ligação ao GTP. Essa ligação move o 2'-OH da ribose da adenina, primeiro nucleosídeo do genoma, para a proximidade do SAM para aceitar o grupo metil 2'OH (128, 129). A segunda proposta é que as duas metilações sejam catalisadas por duas moléculas diferentes de MTase, mantendo a ordem sequencial de primeiro ocorrer a metilação em N7, a dissociação do RNA metilado da primeira molécula e a associação deste à uma nova MTase para ser metilado em 2'OH (130).

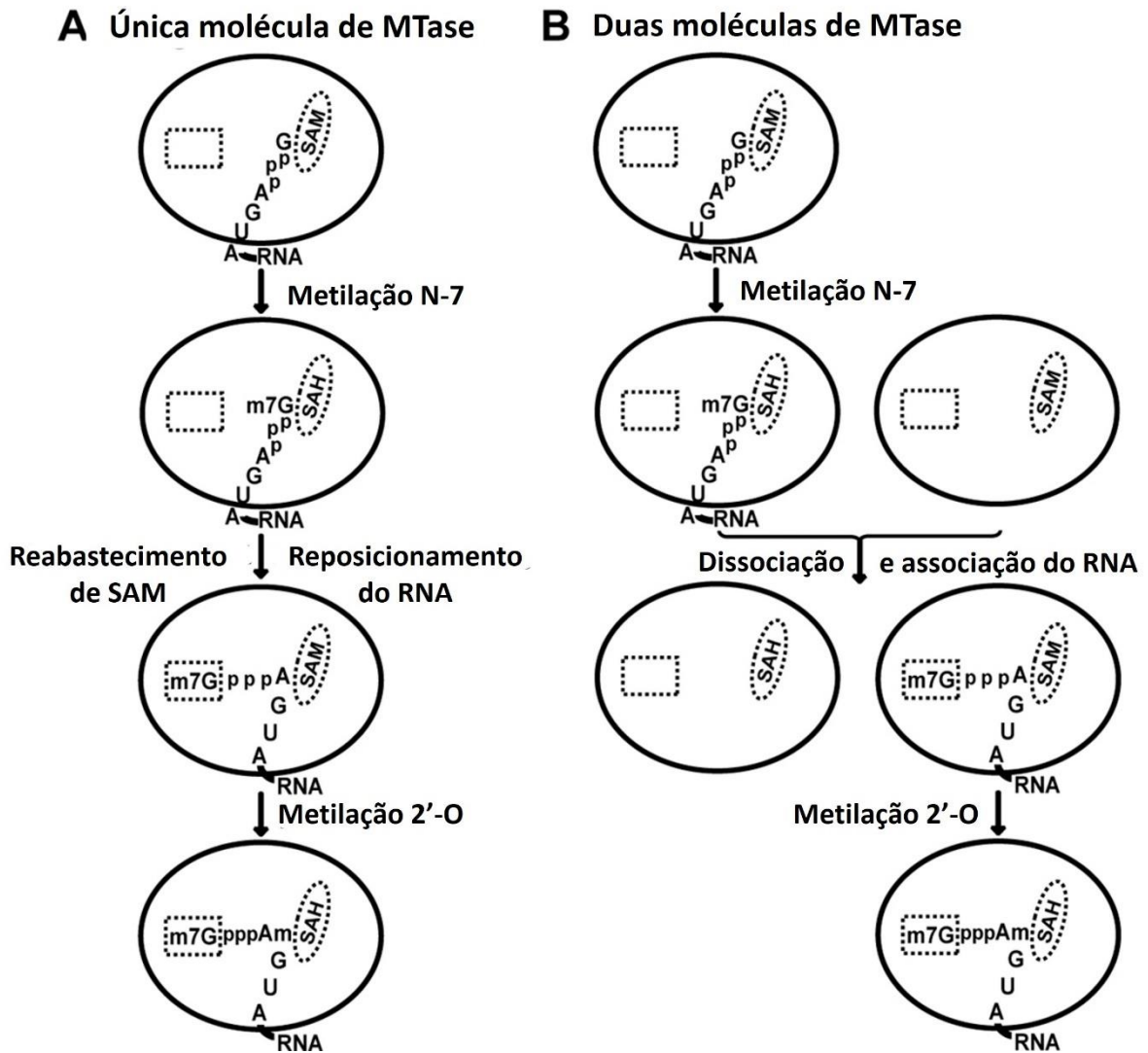


Figura 1.13 – Modelos de mecanismo para formação de estrutura cap-1 em flavivírus.

A) Mecanismo que descreve uma única molécula como responsável pelos dois processos de metilação do RNA cap. B) Modelo de duas moléculas de MTase para obter a estrutura de cap-1. Fonte: Adaptado de Dong *et al.*, Antiviral Research, 2008 (127).

A reação de metilação, como comentado anteriormente, utiliza uma molécula de SAM como doadora da metila. Essa reação gera um produto derivado do SAM que é a S-adenosil-L-homocisteína (SAH). A conversão de SAM em SAH gera alterações conformacionais na MTase, nas quais as cavidades de ligação ao SAM/SAH e ao substrato diminuem consideravelmente (131). O mecanismo preciso de um ponto de vista estrutural ainda não foi completamente descrito, mas sabe-se que são necessárias outras mudanças conformacionais para a formação da estrutura de cap-1 do genoma viral.

Os dois mecanismos propostos para o processo sequencial das metilações N7 e 2'-O, demandam processos de associação e dissociação do substrato e de SAM/SAH. Na hipótese das metilações do RNA cap serem efetuadas por uma única molécula, é necessária a associação de uma primeira molécula de SAM e do GpppAN, a dissociação do produto da metilação SAH, e

uma dissociação parcial e reposicionamento significativo do substrato de RNA metilado m^7 GpppAN, com a base metilada de guanina ocupando o sítio de ligação ao GTP. Em seguida, é necessária a associação de uma nova molécula de SAM para a metilação em 2'O e, por fim, a dissociação do RNA com estrutura de cap 1, m^7 GpppA_mN (128). Na segunda hipótese, os requisitos estruturais são os mesmos, exceto que a dissociação do substrato m^7 GpppAN após o primeiro evento de metilação deve ser total ao invés de parcial, e a associação deste substrato com outra molécula de MTase complexada à SAM (127).

O capeamento do RNA viral é de suma importância, uma vez que o genoma viral é exposto no citoplasma da célula eucariota hospedeira. A estrutura capeada mimetiza a estrutura do RNA mensageiro (mRNA) celular que é translocado do núcleo após a transcrição somente se possuir um cap na extremidade 5' e uma cauda poliadenilada na extremidade 3'. O RNA viral não possui uma cauda poliadenilada, porém a estrutura cap-1 evita o reconhecimento do ácido nucleico como *non self*, evitando a degradação. De fato, a metilação em N7 parece ter maior importância na estabilidade do RNA, protegendo contra a atividade exonucleolítica no sentido 5'-3'. Sem essa metilação, a estrutura de RNA GpppAN fica susceptível a hidrólise para (p)pAN e posterior degradação (132). O capeamento do RNA viral, GpppAN, foi determinado como essencial para iniciar a tradução, e a estrutura cap-0, m^7 GpppAN duplica a eficiência da tradução, enquanto a metilação apenas em GpppA_mN não modula este processo (125). Por outro lado, a inibição da metilação em 2'O do RNA viral atenuou significativamente o vírus West Nile (WNV) (133), demonstrando que a metilação em 2'O não é dispensável e que a estrutura de cap-1 é fundamental para a manutenção da viabilidade do ciclo viral.

A metilação em 2'O do RNA viral exibiu igualmente um papel no escape a resposta imune inata mediada por interferon (IFN) em alguns flavivírus (134). O RNA do WNV e o vírus da encefalite japonesa (JEV) que foram modificados para não carrear a metilação 2'O, exibiram uma ligação com o fator estimulado por IFN, IFIT1 (135-137). Essa interação prejudica o recrutamento de fatores celulares de iniciação da tradução, causando inibição seletiva da tradução do RNA viral (138).

Além da atividade catalítica do domínio MTase, essa proteína está diretamente envolvida no escape da resposta imune do hospedeiro. O vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) foi utilizado para estudar a atividade antagonista da proteína NS5 em relação ao IFN. Essa proteína se liga a um fator celular hScrib pelo domínio MTase formando um complexo que bloqueia a fosforilação de STAT1, que é uma etapa essencial para a continuidade da cascata de sinalização estimulada por IFN (139). Para o vírus da febre amarela, foi demonstrado que a proteína NS5 inibe a sinalização por IFN do tipo I (IFN-I) através de uma ligação com o fator de transcrição STAT2. Essa interação é estimulada pela fosforilação de

STAT1 induzida pela sinalização de IFN-I e uma poliubiquitinação de um resíduo de K do domínio MTase da NS5. A ligação entre NS5 e STAT2 inibe a função do complexo STAT1/STAT2 de estimular o envolvimento do fator ISGF3 com os fatores de transcrições estimulados por IFN, ISREs (140). Mais recentemente, foi demonstrado que a MTase do ZIKV antagoniza a produção de IFN- β (IFN-I), interagindo com o fator RIG-I, e inibindo a cascata de sinalização por esse fator. Além disso, o resíduo da tétrede catalítica D 146 desempenha um papel fundamental nesta função de repressão da via de sinalização por RIG-I (141).

O domínio RdRp consiste nos dois terços N-terminal da proteína NS5 e desempenha a função de síntese de RNA viral (142). Inicialmente, sintetiza *de novo* uma fita de polaridade negativa de RNA a partir do RNA genômico de fita simples e polaridade positiva. A fita negativa de RNA é utilizada como molde para sintetizar uma nova fita simples de RNA de polaridade positiva que serviria seja para a tradução da poliproteína viral ou para empacotamento do nucleocapsídeo e formação de uma partícula viral (143).

A estrutura do domínio RdRp é dividida em três subdomínios denominados *fingers* (do inglês, dedos), *palm* (do inglês, palma) e *thumb* (do inglês, polegar), em um formato que se assemelha a uma mão direita semi-aberta (Figura 1.12). Esses subdomínios carregam sete motivos conservados identificados com as letras do alfabeto de A à G relacionados com ligação ao RNA, à NTP e à íons metálicos, além de catálise (144). A RdRp de flavivírus tem alças que conectam os subdomínios *fingers* e *thumb* e circulam totalmente o subdomínio *palm*, formando uma estrutura fechada, que é característica relacionada à atividade de síntese *de novo* (145). Essas alças incluem os motivos F e G que interagem com NTP (144) e com o molde de RNA (146). Portanto, esses dois motivos são altamente flexíveis, influenciando na conformação entre os subdomínios *fingers* e *thumb*, além de manter a arquitetura da RdRp durante a transição entre as conformações aberta e fechada, nas respectivas fases de iniciação e alongação (147, 148). O sítio ativo se localiza na interseção de duas fendas, a primeira está entre os *fingers* e o *thumb* e permite o acesso da fita simples de RNA molde ao sítio ativo. A segunda fenda é perpendicular à primeira e atravessa a proteína inteira (149).

A síntese *de novo* consiste na polimerização que é iniciada sem a necessidade de uma sequência iniciadora. Esse processo se baseia na circularização do RNA viral, e é iniciado pelo pareamento entre o primeiro e o último nucleotídeo do RNA genômico, o ATP com o UMP, formando um *primer* de um nucleotídeo. Em seguida, o segundo nucleotídeo, GTP, pareia com o penúltimo nucleotídeo de citosina (CMP), formando assim, o *primer* pppAG. Esses pareamentos fornecem um complexo de iniciação estável e a primeira ligação fosfodiéster entre ATP e GTP ocorre após a clivagem dos fosfatos α e β do ATP. O subdomínio *thumb* carrega uma alça projetada na cavidade catalítica que confere a especificidade de um ATP como

primeiro nucleotídeo genômico, denominado alça de *priming* por ter a função justamente de interagir com o ATP e iniciar a síntese *de novo* (150) (Figura 1.14).

Após essa etapa da iniciação, a enzima adota uma conformação mais aberta para acomodar a dupla fita nascente de RNA. A partir disso, a enzima entra em uma fase processiva com incorporação contínua de NTP com complementaridade à base nucleotídica do RNA molde, resultando na fase de alongação da reação de polimerização. A hidrólise de nucleotídeos é dependente da ligação de íons metálicos no sítio ativo (150, 151) e de dois resíduos de D presentes nos motivos A e C que auxiliam na coordenação da transferência de nucleotídeos (143). Os motivos B e D estão envolvidos no controle da especificidade de NTP, e o motivo B ainda tem um papel na ligação e na translocação do RNA molde (152). O motivo E está localizado na saída do túnel de ligação a NTP e pode estar envolvido no posicionamento correto do ATP que compõe o *primer* de iniciação (153). Adicionalmente, a replicação do RNA viral é dependente de elementos estruturais da região que abrange a extremidade 5'UTR até parte do gene do capsídeo, e da região 3'UTR, que influenciam na ligação com o domínio RdRp e na atividade de iniciação *de novo*, atuando na circularização do genoma e na disponibilidade da região de ligação com a polimerase (143, 154). O domínio RdRp pode ter um papel secundário à sua atividade específica que possivelmente modula a produção de proteínas virais. Uma região de 80 resíduos nas posições 368-448 interage com o fator eucariótico de iniciação da tradução, eIF3L, cuja superexpressão potencializa a tradução e pode auxiliar no processo replicativo (155).

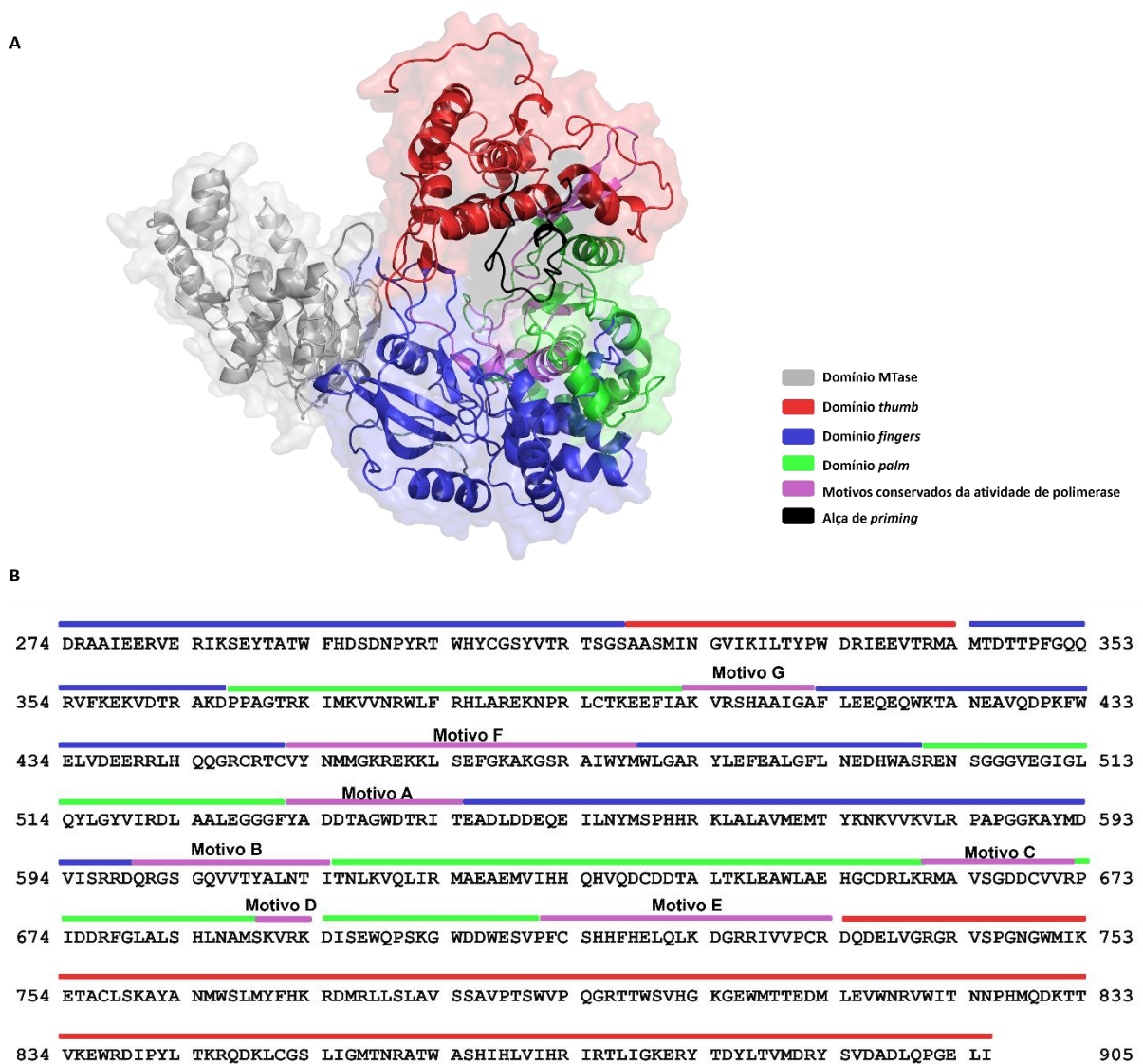


Figura 1.14 - Estrutura tridimensional da proteína NS5. A) Estrutura cristalográfica da proteína NS5, demarcando os domínios MTase e RdRp. O domínio MTase está representado em cinza, e o domínio RdRp está subdividido em *thumb* (vermelho), *fingers* (azul) e *palm* (verde). Em violeta, os seis motivos conservados relacionados à atividade de RdRp, e em preto, a alça de *priming* que participa na iniciação *de novo* da polimerização. Fonte: Imagem obtida utilizando o software PyMOL Molecular Graphics System, versão 2.0, Schroedinger, LLC, e a estrutura coletada do banco de dados PDB, identificador: 6QSN. B) Sequência do domínio RdRp da proteína NS5 com os domínios demarcados, e os motivos conservados de acordo com Duan *et al.* Viruses, 2019 (154).

O domínio MTase exerce influência sobre a eficiência da atividade de RdRp, cujo mecanismo ainda não foi totalmente compreendido. A região MTase estimulou experimentalmente a iniciação da síntese de RNA *de novo*, por aumentar a afinidade entre NS5 e RNA molde por estabilizar a ligação RdRp com o ácido nucleico e promover a formação correta do “túnel”. Assim, a NS5 MTase também promove a afinidade do ATP na composição do primer ppAG, resultando em uma maior eficiência catalítica da polimerase durante a fase de alongação (156). Além disso, uma interface de interação entre os domínios MTase e RdRp foi

descrita como essencial para a replicação de alguns flavivírus (157, 158). O conector entre os domínios atua como um giro para promover as diferentes conformações necessárias para o desempenho das atividades catalíticas e para as interações na interface entre domínios, e a sua flexibilidade revelou ser importante para a replicação (159, 160).

1.3.4 Considerações sobre as alterações genômicas

As alterações de aminoácidos que constituem a assinatura molecular das sequências do vírus da febre amarela detectada em cepas virais obtidas a partir de 2015 estão localizadas em regiões de relevância biológica nas proteínas C, NS3 e NS5. A mutação na proteína C está localizada na hélice $\alpha 5$, descrita como auxiliadora na arquitetura da partícula viral imatura durante a montagem no RE (86). De fato, o resíduo 108 está envolvido nas interações hidrofóbicas entre hélices $\alpha 5$ vizinhas (Figura 1.7 C) (84), e a alteração conservativa pode ter algum papel na distância entre hélices, conseqüentemente na estrutura da partícula viral, devido à diferença de tamanho das cadeias laterais da V e da I. Se essa mudança estrutural, de fato, ocorreria e o quanto ela influenciaria no processamento da partícula viral são questões em aberto.

As duas alterações na proteína NS3 encontram-se no domínio protease, próximas à interação com o cofator da atividade catalítica, NS2B. Modelagem molecular comparativa do complexo NS2B-NS3 sugeriu que o resíduo na posição 1605 potencialmente engaja uma ligação adicional com a proteína NS2B, quando carrega o aminoácido K, da assinatura molecular. Portanto, especulou-se que a assinatura molecular tenha uma função de estabilização do complexo proteolítico (73) (Figura 1.16 A).

As seis mutações restantes estão localizadas na proteína NS5, três no domínio MTase e três no domínio RdRp. As substituições dos resíduos da assinatura na MTase são semiconservativas e estão espacialmente próximas, em face à abertura do túnel por onde se liga o genoma viral. Dois dos resíduos da assinatura molecular na RdRp estão localizados na superfície da proteína e uma, na posição 2803, está mais próxima do conector entre os domínios. A dinâmica molecular demonstrou que as seis substituições combinadas podem modular a eficiência catalítica da NS5, por estabilizar a conformação do *loop* conector (73) (Figura 1.16).

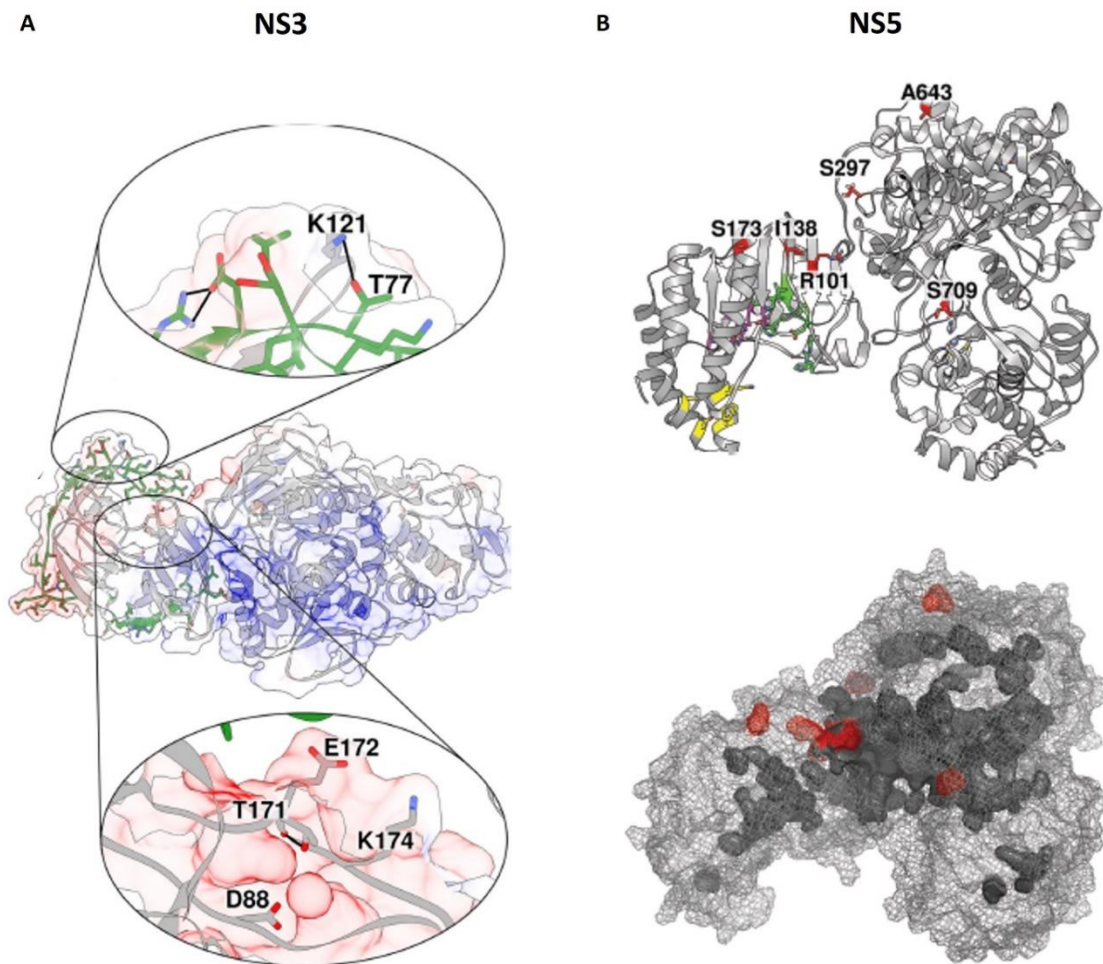


Figura 1.15 – Localização estrutural das alterações nas proteínas NS3 e NS5.

A) Estrutura tridimensional da proteína NS3, evidenciando a localização e as interações dos resíduos D88 e K121. Em cinza, a proteína NS3 e em verde, a proteína NS2B. B) Estrutura tridimensional da proteína NS5. No painel de cima, a representação em *cartoon* da proteína com os domínios e os resíduos identificados. Em amarelo: sítio de ligação ao GTP; em verde: sítio de ligação ao SAM/SAH; em violeta: sítio catalítico; e em vermelho, os resíduos da assinatura molecular do YFV circulante. No painel de baixo, a superfície molecular demarcando em cinza escuro, a cavidade de interação com RNA nascente e, em vermelho, os resíduos de interesse. Fonte: Adaptado de Gómez *et al.*, Journal of General Virology, 2018 (73).

As proteínas NS3 e NS5 tem funções centrais e complementares no ciclo replicativo e interagem entre si durante o desempenho de suas atividades catalíticas, coordenando a replicação do RNA genômico (Figura 1.17). Essas proteínas formam o cerne do complexo replicativo composto por proteínas da célula hospedeira e pela maioria das proteínas virais não estruturais com domínios transmembranares e capacidade de remodelar a membrana do RE e criar uma cavidade vesicular onde ocorre a replicação genômica (161, 162). Além da interação entre essas duas proteínas, elas interagem com diversas proteínas do hospedeiro. Em células humanas, foram identificadas diversas proteínas que interagem com a NS3 e com a NS5, e até

mesmo com ambas. Essas proteínas detêm diferentes funções biológicas no tráfego celular, na ligação a RNA e na modulação de transcrição (163).

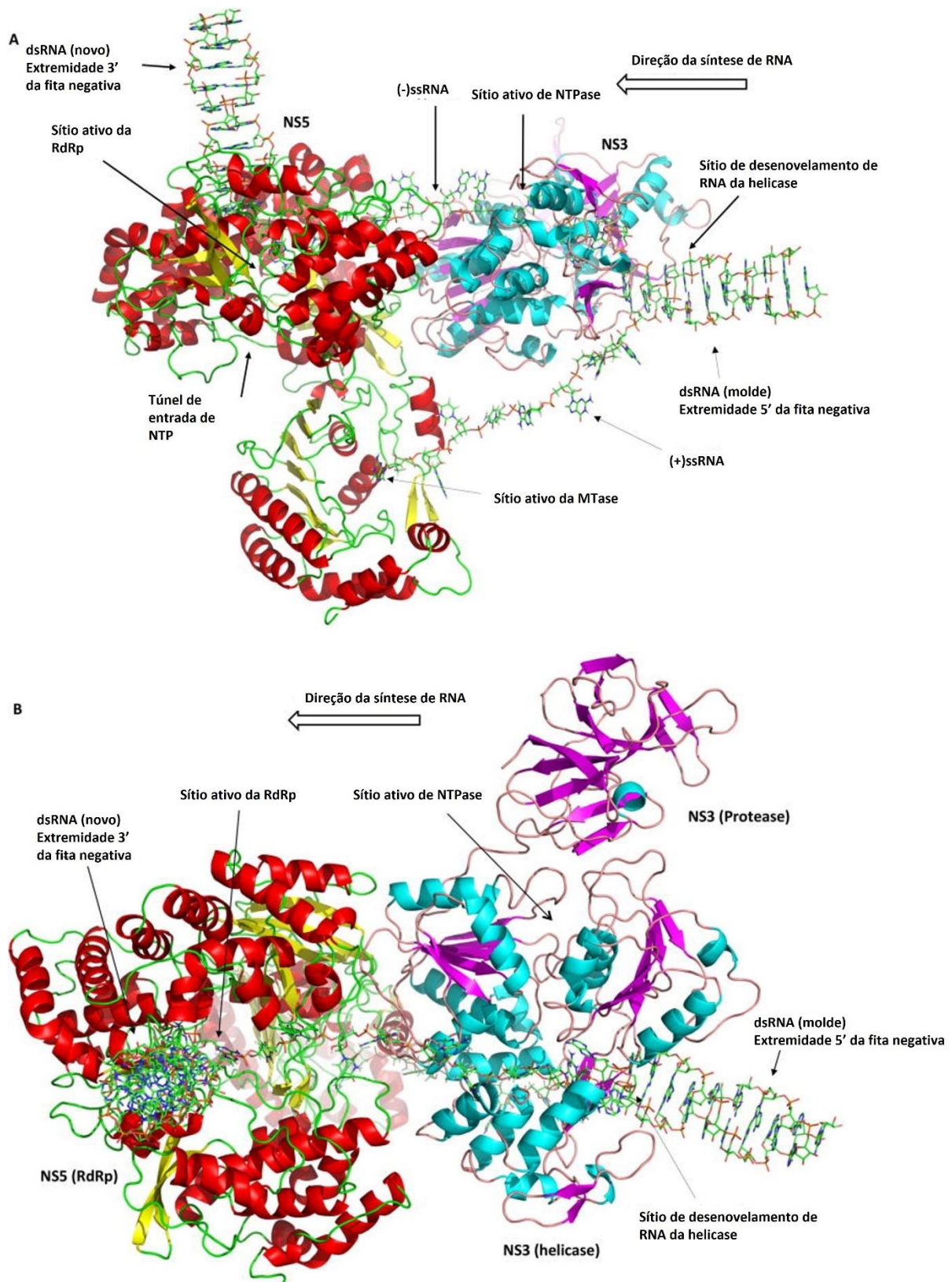


Figura 1.16 – Atuação das proteínas NS3 e NS5 na replicação do RNA viral.

A) Visão lateral e B) frontal do complexo NS3-NS5 durante a replicação genômica. Fonte: Brand *et al.*, Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2017 (161).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Determinar o papel biológico dos polimorfismos de aminoácidos em NS3 e NS5 detectados no YFV causador do surto ocorrido no Sudeste do Brasil iniciado em 2016.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudar as diferenças fenotípicas em quatro isolados do YFV, da sub-linhagem 1E, carreando ou não os resíduos da assinatura molecular 2016-2019 em modelo de infecção celular de mosquitos e de mamíferos, além de avaliar neurovirulência em camundongos.
2. Construir clones virais carreando ou não os resíduos da assinatura molecular 2016-2019 em NS3 e NS5 individualmente e em combinação.
3. Estabelecer a infectividade de YFV sintéticos em modelo de infecção celular e de camundongos.
4. Determinar o efeito na atividade catalítica MTase dos polimorfismos de aminoácidos relacionados ao YFV circulante durante o surto iniciado em 2016.

3 Justificativa

As proteínas não estruturais compõem em torno de dois terços do genoma dos flavivírus. Os vírus de RNA possuem maior susceptibilidade a erros na incorporação de nucleotídeos por não possuírem atividade de exonuclease. Entretanto, o ciclo de transmissão dos flavivírus envolve infecção de células de hospedeiros invertebrados e vertebrados. A heterogeneidade e complexidade de panoramas celulares entre vetores e hospedeiros, exerce pressão seletiva sobre a ocorrência de novas alterações na composição genômica desses vírus (167). Portanto, a taxa de substituição de nucleotídeos do YFV é estimada a $1,4 \times 10^{-4}$ substituições/posição/ano, abaixo do observado para outros vírus de RNA que não tem transmissão vetorial (168, 169). Além disso, a diversidade genética também pode ser regulada pelas funções específicas tanto das proteínas estruturais quanto das não estruturais (170), embora nos estudos realizados com amostras YFV do surto se observe uma maior frequência de polimorfismos genéticos em proteínas não estruturais (66, 67, 73, 74).

O presente trabalho visa estabelecer o papel funcional das variações de aminoácidos observadas nos genes NS3 e NS5 nas sequências que têm sido responsáveis por epizootias e casos humanos de febre amarela no Brasil, causando um surto sem precedentes desde a descoberta da vacinação, com pico de casos no ano de 2018 (57). Em 2016 começou um surto de febre amarela que acabou se tornando o maior no nosso país após a introdução da vacina na década de 1950. No período de 2015 a 2019 o Brasil registrou 2.259 casos da doença e 773 óbitos, principalmente nas regiões Sudeste e Sul (57), atingindo também países vizinhos, como o Paraguai (64), o que resultou na alteração das zonas de recomendação de vacinação para febre amarela (61, 62).

Este surto demonstrou que apesar de termos uma vacina eficiente contra o YFV, ainda existem desafios para podermos combater a doença, demonstrando a importância da vigilância genômica e dos estudos de caracterização de marcadores moleculares. A dispersão do YFV no Brasil desde 2015 tem sido acompanhada de alterações genômicas, em sua maioria, de um conjunto de nove aminoácidos (66, 73). Mutações genéticas podem influenciar em vários aspectos do ciclo viral de um arbovírus, seja na competência vetorial do artrópode, ou no *fitness* viral no hospedeiro, acarretando a dispersão em territórios ainda inexplorados com população de hospedeiros altamente susceptível (164-166).

Diante de todo o conhecimento que se agrega em torno das proteínas e do genoma dos flavivírus, é de extrema importância investigar a assinatura molecular que primeiramente foi detectada em amostra viral de 2015 de Goiás (66) e que provocou o surto de YFV no Sudeste e Sul do Brasil (72, 73), atingindo também países vizinhos, como o Paraguai (64). Neste trabalho buscamos determinar se a composição genômica do vírus da febre amarela que circula

no Brasil tem algum papel no *fitness* viral, que pode contribuir para estudos de evolução molecular e dispersão desse vírus. Empregamos duas abordagens para essa caracterização: estudos de infecção em culturas celulares e camundongos de vírus isolados em diferentes momentos no Brasil, com e sem assinatura molecular, e utilização de genética reversa para melhor correlacionar as substituições genéticas no vírus da febre amarela selvagem com modulação das suas funções biológicas respectivas.

4 Produção científica

A metodologia empregada e os resultados que cumprem os objetivos determinados desta tese serão expostos através das publicações em revistas indexadas decorrentes dos resultados obtidos. Esta tese gerou três artigos científicos, dos quais, dois foram publicados e um está submetido no periódico *Virology Journal* (artigo 2). Portanto, para melhor representar os dados, esta seção compreende duas subseções “Materiais e Métodos” e “Resultados” que se referem apenas aos resultados que ainda não foram publicados do artigo 2. O manuscrito no formato de submissão consta no anexo deste documento.

4.1 Artigo 1: Biological characterization of yellow fever viruses isolated from non-human primates in Brazil with distinct genomic landscapes

Referência Bibliográfica: Nathália Dias Furtado, Lidiane de Menezes Raphael, Ieda Pereira Ribeiro, Iasmim Silva de Mello, Déberli Ruiz Fernandes, Mariela Martínez Gómez, Alexandre Araújo Cunha dos Santos, Mônica da Silva Nogueira, Márcia Gonçalves de Castro, Filipe Vieira Santos de Abreu, Lívia Carício Martins, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, Ricardo Lourenço-de-Oliveira e Myrna Cristina Bonaldo. (2022) **Biological Characterization of Yellow Fever Viruses Isolated From Non-human Primates in Brazil With Distinct Genomic Landscapes.** *Front. Microbiol.* 13:757084. doi: 10.3389/fmicb.2022.757084.

Situação do manuscrito: Publicado.

Sinopse do trabalho:

Neste artigo, nós cumprimos os dois primeiros objetivos específicos da tese. Realizamos o estudo de infectividade dos quatro YFV isolados de amostras de PNH infectados no Brasil, PR4408, GO05, ES-504 e RJ 155, para tentar estabelecer uma relação entre fenótipo e as diferentes composições genéticas destas amostras virais. Os isolados foram separados em dois grupos de acordo com a presença dos componentes da assinatura molecular característica de amostras virais do recente surto do Sudeste. Assim, denominamos de YFV 2000-2010, YFV sem assinatura molecular, e YFV 2016-2019, YFV com assinatura molecular.

O YFV PR4408 foi isolado de um PNH durante o surto de 2008 no estado do Rio Grande do Sul, e o YFV GO05 se originou de um PNH no estado de Goiás em 2017. Esses dois isolados não carregam os marcadores genéticos do vírus circulante, e compuseram o grupo YFV 2000-2010. Os YFV ES-504 e RJ 155 foram isolados de PNH na região sudeste, nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, respectivamente. O primeiro foi isolado em 2017, durante a

ascensão de casos do mais recente surto de febre amarela, e o último foi isolado da última detecção do YFV no Rio de Janeiro, em 2019. Ambos carregam a assinatura formando o grupo YFV 2016-2019.

Desde o início do século XXI, a distribuição do vírus da febre amarela (YFV) tem se estendendo da bacia amazônica para as regiões Sul e Sudeste do Brasil, culminando em um surto sem precedentes que começou em 2016. Neste trabalho, estudamos quatro YFV isolado de primatas não humanos obtidos durante surtos nos estados do Rio Grande do Sul em 2008 (PR4408), Goiás (GO05) e Espírito Santo (ES-504) em 2017, e Rio de Janeiro (RJ 155) em 2019. Esses isolados apresentam diferenças genômicas principalmente distribuídas em proteínas não estruturais. Comparamos as taxas de infecção dos isolados em células de mamíferos e mosquitos e estudamos a neurovirulência em camundongos adultos. Os isolados RJ 155 e PR4408 YFV exibiram maior infectividade em células de mamíferos e neurovirulência em camundongos. Dentre as células de mosquito, Aag2, GO05 e PR4408 apresentaram as menores taxas de proliferação. Esses resultados sugerem que os isolados RJ 155 e PR4408 YFV carregam alguns marcadores genômicos que aumentam a infectividade em hospedeiros mamíferos. A partir dessa caracterização, foi possível contribuir para a descoberta de novos marcadores moleculares para a virulência do YFV.



Biological Characterization of Yellow Fever Viruses Isolated From Non-human Primates in Brazil With Distinct Genomic Landscapes

Nathália Dias Furtado¹, Lidiane de Menezes Raphael¹, Ieda Pereira Ribeiro¹, Iasmim Silva de Mello¹, Déberli Ruiz Fernandes¹, Mariela Martínez Gómez², Alexandre Araújo Cunha dos Santos¹, Mônica da Silva Nogueira³, Márcia Gonçalves de Castro⁴, Filipe Vieira Santos de Abreu⁴, Lívia Carício Martins⁵, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos⁵, Ricardo Lourenço-de-Oliveira⁴ and Myrna Cristina Bonaldo^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Leonard Peruski,
Centers for Disease Control
and Prevention (CDC), United States

Reviewed by:

Diogo Antonio Tschoeke,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

Carlo Fischer,

Charité – Universitätsmedizin Berlin,
Germany

Ana Ribeiro,

Emílio Ribas Institute of Infectology,
Brazil

*Correspondence:

Myrna Cristina Bonaldo
mbonaldo@ioc.fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Agents and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 30 September 2021

Accepted: 06 January 2022

Published: 14 February 2022

Citation:

Furtado ND, Raphael LM,
Ribeiro IP, de Mello IS, Fernandes DR,
Gómez MM, dos Santos AAC,
Nogueira MS, de Castro MG,
de Abreu FVS, Martins LC,
Vasconcelos PFC,
Lourenço-de-Oliveira R and
Bonaldo MC (2022) Biological
Characterization of Yellow Fever
Viruses Isolated From Non-human
Primates in Brazil With Distinct
Genomic Landscapes.
Front. Microbiol. 13:757084.
doi: 10.3389/fmicb.2022.757084

¹ Laboratório de Biologia Molecular de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, ² Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, ³ Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, ⁴ Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, ⁵ Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Instituto Evandro Chagas/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Pará, Brazil

Since the beginning of the XXI Century, the yellow fever virus (YFV) has been cyclically spreading from the Amazon basin to Brazil's South and Southeast regions, culminating in an unprecedented outbreak that started in 2016. In this work, we studied four YFV isolated from non-human primates obtained during outbreaks in the states of Rio Grande do Sul in 2008 (PR4408), Goiás (GO05), and Espírito Santo (ES-504) in 2017, and Rio de Janeiro (RJ 155) in 2019. These isolates have genomic differences mainly distributed in non-structural proteins. We compared the isolates' rates of infection in mammal and mosquito cells and neurovirulence in adult mice. RJ 155 and PR4408 YFV isolates exhibited higher infectivity in mammalian cells and neurovirulence in mice. In mosquito Aag2 cells, GO05 and PR4408 displayed the lowest proliferation rates. These results suggest that RJ 155 and PR4408 YFV isolates carry some genomic markers that increase infectivity in mammal hosts. From this characterization, it is possible to contribute to discovering new molecular markers for the virulence of YFV.

Keywords: yellow fever virus, Brazil outbreaks, genetic markers, virulence, mouse neurovirulence, cell infection, interferon-mediated viral inhibition

INTRODUCTION

Yellow fever virus (YFV) is the prototype member of the genus *Flavivirus* (family *Flaviviridae*), which comprises other arthropod-borne viruses of clinical relevance. It is a small, enveloped virus with a genome consisting of a positive-sense single-stranded RNA of about 11 kb, encoding a single polyprotein flanked by two untranslated regions (UTR) (5'UTR and 3'UTR). This polyprotein is processed co- and post-translationally generating three structural proteins: capsid (C), membrane (prM/M), and envelope (E), that hold the outer structure and mediate the initial host/virus interaction; and seven non-structural (NS) proteins: NS1, NS2A, NS2B, NS3,

NS4A, NS4B, and NS5, which play essential roles on genome replication and immune evasion (Marfin and Monath, 2008).

Infection by YFV causes a febrile disease whose symptoms range from mild to severe, more frequently with liver, spleen, and kidney damages. The fatality rate of individuals presenting severe symptoms ranges between 20 and 50% (Vasconcelos, 2003; Monath, 2008). The transmission of YFV, like other arboviruses, is a cycle of infections involving invertebrate hosts (mosquitoes) and a mammal species (non-human primates-NHP and humans). In South America, two transmission cycles have been recorded: the sylvatic cycle, which takes place essentially in rainforests and trees canopy, where the amplifying hosts are NHP, and the vectors are mainly mosquitoes of the genera *Haemagogus* and *Sabethes*; and the urban cycle, where the virus is transmitted between humans by the domestic mosquito vector *Aedes aegypti* (Dégallier et al., 1992). *Ae. aegypti*-vectored cases have not been recorded in Brazil since 1942 (Possas et al., 2018).

In Brazil, as in Europe, North America, and Africa, yellow fever caused historical epidemics between the 18th and 20th centuries (Douam and Ploss, 2018). After the development of the attenuated virus vaccine and the efforts to eradicate the urban mosquito vector *Ae. aegypti*, epidemics of yellow fever became sparse (Dégallier et al., 1992; Staples and Monath, 2008). Until the turn of the 21st century, the Brazilian endemic area covered the entire northern and central-western regions, with a transition zone comprising areas in bordering states of the northeast, especially Maranhão and Bahia, and southeast regions, particularly Minas Gerais e São Paulo, and extending to the southern states. From northeast to southern Brazil, the Atlantic coastal area was considered free of yellow fever for several decades (Fundação Nacional de Saúde [FUNASA], 2003). Nevertheless, since early 2000 an increasing viral dissemination toward Brazil's southern and southeastern regions occurred. Notably, there were enzootic waves, one reaching Minas Gerais (MG, southeast) in 2000 and 2001 (de Filippis et al., 2002) and Rio Grande do Sul (RS, south) in 2003 (Vasconcelos et al., 2003), causing several human cases in MG, and epizooties in RS, and another crossing the western portions of the states of São Paulo (SP, southeast), Paraná (PR, south) and RS, from 2007 to 2010 (de Souza et al., 2010).

A YFV epizootic wave started in 2014 in the Amazon (north) and has been almost continuously spreading southward after successively crossing the states of Goiás (GO, central west) and MG (Brasil, 2019c, 2021b). Between 2016 and 2019, one of the most significant events of the YFV history in Brazil took place: the viral dispersal reached the Atlantic coast, where the virus was undetected for decades, and the vaccination coverage was insignificant, causing the most extensive outbreak since the vaccination campaigns that began in 1937 (Franco, 1969). There were 2,523 epizootics, and 2,155 confirmed human cases (case fatality rate of 34.4%) from July 2016 to October 2018 in the states of Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo (ES), and Rio de Janeiro (RJ), all four states located in the southeastern region (Brasil, 2017, 2018). In this occasion, the Brazilian Health Ministry recommended the vaccination of the population in states without vaccine coverage in the Southeast, in the South and some localities in the Northeast until 2019 (Mendes, 2018)

and extended the program of vaccination in other localities in the Northeast in 2020 (Monteiro, 2019), this way, the entire country comprises a routine of immunization against YF. In 2018, 8.1 million fractionated doses were distributed to immunize 40.9 million people in SP, RJ and Bahia (Northeast) (Mendes, 2018).

After the winter of 2018, a sharp reduction of epizootic and human cases was observed in the southeast. However, the transmission of YFV has been reported in areas affected by the end of the outbreak, particularly in the states of Paraná and Santa Catarina (south). In these southern states, most cases have been reported from mid-2019 to January 2020 (Brasil, 2019a,b, 2020a). Seasonal monitoring of YFV indicates that YFV circulation persisted in these states until July 2020, with 390 epizootics and 19 human cases. Reports of YFV infections in humans and NHP have been made until May 2021 in RS, the southernmost Brazilian state (Brasil, 2021a). Epidemiological surveillance data advise that after 6 years of YFV spread outside the Amazon region (endemic area), health services should intensify the efforts to detect early and timely the active circulation of the virus in the region. The data suggest that the YFV might continue spreading south-westward and reach other non-endemic areas in South America where yellow fever vaccination is not recommended (Brasil, 2020b).

Since 2004, the spread of yellow fever in Brazil causing outbreaks has been associated with a modern YFV strain belonging to the South America I genotype subclade 1E (de Souza et al., 2010). It was estimated that the last 25 years (the 1990s–2010s) corresponds to a spanning period of the modern sub-clade 1E in Brazil (Mir et al., 2017). Although the YFV circulating since 2016 belongs to the sub-clade 1E, sequences of samples collected from different hosts and vectors during the last outbreak displayed a molecular signature of nine amino acid substitutions (Bonaldo et al., 2017). In this study, we selected four isolates of the sub-clade 1E, two carrying the molecular signature (here referred to as YFV 2016–2019 group), and two without the amino acid substitutions (here referred to as YFV 2000–2010 group), each bearing other distinct genomic variations.

We evaluated and compared the infectivity dynamics of these four YFV strains in cell culture and the neurovirulence in BALB/c mice in order to establish if there were any differences in viral replicative fitness between the YFV 2000–2010 and YFV 2016–2019 groups.

MATERIALS AND METHODS

Viral Isolates

All four viral isolates used in this study originated from blood or liver samples collected from dying or dead howler monkeys, genus *Alouatta* spp., in different states of Brazil. YFV PR4408 was isolated from the serum of an NHP in RS, southern region, in February 2008. YFV GO05 was isolated from an NHP liver sample collected in GO in April 2017 in the central-western region of Brazil (Delatorre et al., 2019). YFV ES-504 was isolated from an NHP found dead in ES in February 2017 (Bonaldo et al., 2017), and RJ 155 was collected in January 2019 in RJ (Abreu et al., 2019), both located in southeastern Brazil. The genomic

sequences of these isolates were previously deposited in GenBank under the accession numbers KY861728 (PR4408), MK333803 (GO05), KY885000 (ES-504), and MK533792 (RJ 155). Detailed information about the isolates is described in **Supplementary Figure 1**. Collection and management of monkey samples were conducted in accordance with the Brazilian environmental authorities (SISBIO-MMA licenses 54707-6 and 52472-2, and INEA licenses 012/2016, 019/2018) and Committee on the Ethics of Animal Experimentation of Oswaldo Cruz Institute (CEUA-IOC; Permit: L037/2016).

Cell Cultures

Vero cells (ATCC-CCL81) were maintained in Earle's 199 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, United States) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, United States), 0.25% sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, United States), and 40 mg/mL gentamicin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, United States). HepG2 cells (JCRB1054, JCRB Cell Bank) were cultivated in DMEM medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, United States) supplemented with 10% FBS, 1% (MEM) non-essential amino acids (NEAA; Gibco, Thermo Fisher Scientific, United States), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Thermo Fisher Scientific, United States) and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, United States). Both cell lines were incubated at 37°C with a wet atmosphere and 5% CO₂. C6/36 cells, provided by Dr. Anna-Bella Failloux (Institut Pasteur, Paris), were grown in Leibovitz's L-15 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, United States), supplemented with 5% FBS, 10% tryptose broth, and 40 mg/mL gentamicin. Aag2 cells, provided by Dr. Rafaela Vieira Bruno (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ), were seeded in Schneider's Insect medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, United States), supplemented with 10% FBS and 100 U/mL penicillin-streptomycin. C6/36 and Aag2 cell lines were maintained in an incubator at 28°C.

Viral Isolation and Obtention of Viral Stocks

C6/36 and Vero cells were seeded at 80,000 and 40,000 cells/cm², respectively, in two T-12.5 flasks. Volumes of 50 and 150 µL of NHP sera or filtered suspension of liver homogenate in Leibovitz's L-15 medium were centrifuged at 14,000 g for 2 min, then transferred to a new 1.5 mL centrifuge tube and diluted in appropriate supplemented medium (with 20% FBS instead of 5%) to a final volume of 0.5 mL. The cell culture medium was removed, and the viral samples were added to the cell monolayers. After 5 min of incubation, cells usually lose from the flask bottom. Hence, fresh cells were added to the flask with more than 5 mL of 20% FBS supplemented medium. Clots were removed with a serological pipette when formed during infection. Vero cells were monitored daily for cytopathic effect, indicating viral infection. For C6/36 cells, 5–8 days post-infection (dpi) infection, aliquots of cell supernatant were collected for RNA extraction followed by RT-PCR for viral detection, confirming the isolation. For both cell lines, RNA was extracted with QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) according to

the manufacturer's instructions, and RT-PCR was performed as described elsewhere (Bonaldo et al., 2017). The cells supernatants were collected, centrifuged at 400 g for 5 min at 4°C, filtered (0.22 µm; Millipore), and stored at –80°C. ES-504, PR4408, and GO05 isolates were isolated in C6/36 cells, and RJ 155 was isolated in Vero cells.

These cell supernatants were then used to obtain the viral stocks, infecting C6/36 cells seeded at 80,000 cells/cm² with supplemented Leibovitz's L-15 medium in two T-75 flasks. In each flask, after medium removal, 2.5 mL of viral sample were directly added to the cells and incubated at 28°C for 1 h, with agitation every 15 min. After incubation, 40 mL of fresh medium were added to the cells. Seven days after infection, cell supernatants were collected, centrifuged at 400 g for 5 min at 4°C, filtered and stored at –80°C. Viral stocks were titrated by plaque assay. The entire genomes were sequenced (Gomez et al., 2018) and compared to the previously determined genome sequences of the four YFV isolates to check the genomic identity (Bonaldo et al., 2017; Abreu et al., 2019; Delatorre et al., 2019). Viral stocks of ES-504 were obtained after two passages and GO05, after one passage in C6/36 cells. RJ 155 was passaged once in Vero cells followed by three additional passages in C6/36, and PR4408 was passaged three times in C6/36, once in Vero, followed by two additional passages in C6/36.

Viral Titration by Plaque Assay

Viral suspensions were serially diluted 1:10 six times, and 100 µL of each dilution were added to Vero cells monolayer, previously seeded at 50,000 cells/cm² in a 24-well plate (24 h before inoculation). After 1 h incubation at 37°C and 5% CO₂, the viral inocula were aspirated and cells were covered with 1 mL of supplemented Earle's 199 medium containing 2.4% carboxymethylcellulose (CMC). Cells were then incubated for 10 days at 37°C, 5% CO₂, followed by fixation with 1 mL 10.0% formaldehyde overnight. The monolayer was washed with water to remove residual formaldehyde and cell culture medium and stained with 0.4% crystal violet.

Plaque Phenotype Assay

Vero cells were seeded in 6-well plates at a density of 40,000 cells/cm², approximately 24 h before infection. For each virus, three inocula were prepared with supplemented Earle's 199 medium containing 10, 20, and 40 PFU in 0.2 mL of viral suspension. Culture supernatant was removed entirely, and 200 µL of viral inoculum were added to the cell monolayer. After 1 h incubation at 37°C and 5% CO₂ with gentle agitation every 10 min, the inocula were discarded, and the cells were overlaid with 3 mL of supplemented Earle's 199 medium containing 0.5% agarose (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, United States). Cells then returned to the incubator at 37°C and 5% CO₂ for 7 days, after which cells were fixed with 5 mL 10.0% formaldehyde overnight and stained with 0.4% violet crystal. Images of the plates were acquired and analyzed using ImageJ software to measure plaque areas. The results were plotted into graphs and statistically analyzed using GraphPad Prism software 8. Statistical tests employed were Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison test.

Cell Viability Assay

Vero cells were cultivated in a 96-well microplate at a density of 20,000 cells/well 24 h before infection. The viral inoculum was prepared in Earle's 199 medium with 5% bicarbonate and no addition of SFB. Cell supernatant was discarded, and 50 μ L of viral suspension were added to the cell monolayer, at MOI 0.1, followed by 2 h incubation at 37°C, 5% CO₂. Then, the viral suspensions were removed, and 90 μ L of supplemented Earle's 199 medium were added to each well. After 24 h of incubation at 37°C and 5% CO₂, 10 μ L of PrestoBlue Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, United States) were added to each well and incubated for 15 min at 37°C. Absorbance measures were acquired with SoftMax Pro 6.5 software using VersaMax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices), at wavelength 570 nm normalized at 600 nm. Data were analyzed in GraphPad Prism software 8 with one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

Viral Infection in Cells Treated With Type I Interferon

Vero cells were grown in 24-well plates at a density of 50,000 cells/cm². The next day, cells were treated with interferon (IFN) alpha (α ; PBL Assay Science, United States) and beta (β ; R&D Systems, United States) at concentrations of 10, 50, 100, and 1,000 UI/mL for 6 h before infection. Cell supernatant was removed, and 100 μ L of viral suspensions were added at MOI of 0.5. After 1 h incubation with gentle agitation every 15 min, viral inocula were discarded, and cells were overlaid with 0.3 mL of supplemented Earle's 199 medium, containing the four different IFN concentrations. After 48 h incubation at 37°C and 5% CO₂, the supernatants were collected for viral titration by plaque assay. The log₁₀ of viral titers under treatment with IFN- α and IFN- β were normalized with the values obtained from non-treated infected cells. This experiment was performed in three independent assays for statistical relevance. Data were analyzed in GraphPad Prism 8 software. IC₅₀ values were calculated from the non-linear regression function provided by the software [(Inhibitor) vs. normalized response - Variable slope]. IC₅₀ values of each replicate were analyzed by one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test.

Viral Growth in Mosquito and Mammal Cells

Cells were seeded at different densities 24 h before infection. Insect cells, Aag2 and C6/36, were seeded at 80,000 cells/cm², Vero cells at 40,000 cells/cm², and HepG2 at 60,000 cells/cm² in T-25 culture flasks. Viral stocks were diluted to infect cell monolayers with an MOI of 0.02. Growth culture media were discarded, and 0.5 mL viral samples were added to the cells. After 1 h incubation with gentle agitation every 15 min, viral inocula were completely removed, and 12 mL of appropriate cell culture medium were added. Cell cultures were observed daily, and aliquots of supernatant were collected every 24 h until 5 days to determine viral titers at each day post-infection. Viral titration was carried out by plaque assay, and the growth curves were analyzed using GraphPad Prism 8 software. Statistical tests

employed were one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test.

Neurovirulence in BALB/c Mice

BALB/c mice were obtained from CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório), of the State University of Campinas, São Paulo (UNICAMP). This experimentation was carried out in strict accordance with the Guide of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocols employed were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experimentation of Oswaldo Cruz Institute (CEUA-IOC; Permit: L-034/2019). Groups of five young adult BALB/c mice (6 weeks old) were inoculated intracerebrally with a dose of 10³ PFU in a final volume of 30 μ L of each isolate virus or the vaccine YFV 17DD (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos) as a positive control. Mock-infected mice were inoculated with a diluent medium in which the viral inocula were prepared (Earle's 199 medium supplemented with 25 mM HEPES and 0.025% sodium bicarbonate). The inoculation occurred under anesthesia with a Ketamine/Xylazine cocktail at a dose of 100 and 10 mg/kg, respectively, administered intraperitoneally. The animals were monitored daily for 21 days with an evaluation of clinical signs of disease and weight measurement. Clinical scores were established to determine the humane endpoint for euthanasia of mice (**Supplementary Table 2**). Evaluated clinical signs included the percentage of body weight loss, ruffled fur, hunched posture, low mobility, paralysis of posterior members, aggressiveness, and respiratory disorders. Euthanasia was performed with intraperitoneal administration of a three times more significant dose of Ketamine/Xylazine cocktail, followed by cervical dislocation. This experimentation was reproduced in triplicate, totalizing 15 animals infected with each viral sample. Average survival time (AST), percentage of mortality, clinical scores, and body weight loss were calculated and analyzed in GraphPad Prism 8 software. Statistical analysis of Kaplan-Meier survival curves was performed by log-rank test (Mantel-Cox).

Sequence Analysis

Yellow fever virus isolates sequences were aligned using ClustalW algorithm available in MEGA Software v. 7.0.26. The variable sites were highlighted in MEGA Software and exported in Excel format for better representation. The amino-acid and nucleotide alignments were analyzed in BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.6.1 to calculate their respective identity matrix.

Phylogenetic Analysis

Yellow fever virus complete genome sequences were retrieved from the GenBank database and aligned using AliView v.1.27 (Larsson, 2014). Phylogenetic reconstruction was conducted using IQ-TREE software multicore version 2.1.2 (Minh et al., 2020); it inferred the Maximum Likelihood tree from the input alignment with the best fit model automatically selected by ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). The ML analysis was carried out with 1,000 bootstrap replicates. The obtained tree was edited using FigTree v.1.4.4.

RESULTS

Genome Analyses of the Yellow Fever Virus Isolates

The four YFV investigated in this study were isolated from infected howler monkeys in the states of RS in 2008, GO and ES in 2017, and RJ 2019. Here, the isolates were grouped according to the presence (YFV 2016–2019) or absence (YFV 2000–2010) of the molecular signature described in 2017 (Bonaldo et al., 2017).

Although GO05 was identified after 2010, this isolate does not carry the molecular signature. Thus, both PR4408 and GO05 (Delatorre et al., 2019) viral isolates belong to the YFV 2000–2010 group. They were sampled in RS in 2008 and GO in 2017, respectively. The isolates ES-504 (Bonaldo et al., 2017) and RJ 155 (Abreu et al., 2019) belong to YFV 2016–2019. They were obtained from samples collected in ES in 2017 and RJ in 2019, respectively (Supplementary Figure 1).

Before we deepen into the cellular and mouse infection characterization, we established the genomic features inherent to each isolate. Initially, to determine the genetic differences between the four isolates, we retrieved their genomic sequences from the GenBank database, aligned them, and calculated nucleotide and amino acid identities. As shown in Table 1, the identity matrix revealed that the four isolates are very similar and shared 99.4–99.8% of amino acid identity, while nucleotide analysis showed lower scores (from 98.2 to 99.8%). This difference is due to the higher rate of synonymous (84.7%) than non-synonymous (10.0%) genomic variations, as detailed in Supplementary Table 1. The two YFV 2016–2019 isolates, ES-504 and RJ 155, display high identity scores between them, both at the amino acid (99.8%) and nucleotide levels (99.8%). The same trend was observed between PR4408 and GO05 isolates exhibiting 99.7 and 98.6% of polyprotein and genome sequence identities, respectively.

The alignment of the four isolates' polyproteins firstly revealed the set of nine amino acid polymorphisms that distinguishes the southeast Brazilian outbreak 2016–2019 YFV lineages (Table 2 and Supplementary Figure 2). The molecular alterations mapped at the C protein (V108I; C residue 108), at NS3pro (E1572D; R1605K; NS3 residues 88 and 121, respectively), at NS5 in MTase domain (K2607R; V2644I; G2679S; NS5 residues 101, 138 and 173, respectively) and NS5 in the RdRp domain (N/D2803S; V3149A; N3215S; NS5 residues 297, 643 and 709, respectively).

TABLE 1 | Identity matrix of the polyprotein and the genome of YFV isolates.*

Isolate	YFV 2000–2010		YFV 2016–2019	
	PR4408 (%)	GO05 (%)	ES-504 (%)	RJ 155 (%)
PR4408		99.7	99.5	99.4
GO05	98.6		99.6	99.4
ES-504	98.7	98.4		99.8
RJ155	98.5	98.2	99.8	

*Values highlighted in light red represent amino acid identity rates and those in gray, the identity in terms of the genome nucleotide sequence.

Each isolate displays specific amino acid variations in comparison to each other. Most amino acid differences are localized at the NS proteins (21 out of 23), with the majority mapping at NS5 protein (14 out of 21). More specifically, the PR4408 and GO05 carry four aminoacidic modifications and the NS proteins, while RJ 155 presents six, with one in the capsid (C) structural protein. The isolate ES-504 carries no unique modification. It is noteworthy that the isolate RJ 155 holds three unique residues clustered in the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) domain of the NS5 protein (Table 2).

Further, the isolates' UTR were aligned and revealed that the YFV 2000–2010 exhibit some variations, especially in the 3'UTR region, compared to the YFV 2016–2019 (Supplementary Table 1). Remarkably, the GO05 isolate cumulates more exclusive changes in the UTRs, one in the 5'UTR and 9 others in the 3'UTR.

Furthermore, phylogenetic analysis showed that ES-504 and RJ 155 cluster inside the same clade, while GO05 and PR4408 are in two different branches with high-supported nodes (>90% of bootstrap value) (Supplementary Figure 3). The phylogenetic tree demonstrates that YFV PR4408 did not cluster with the other three isolates, but in a separate branch with a well-supported bootstrap value of 99%. The GO05 isolate is not clustered with the other two YFV (ES-504 and RJ 155) in 92% of the iterations. Together with the identity matrix analyses, these results support that ES-504 and RJ 155 were more genetically related. In contrast,

TABLE 2 | Amino acid variations observed in the polyprotein of the YFV isolates.

Polyprotein position	Protein	Protein position	YFV 2000–2010		YFV 2016–2019	
			PR4408	GO05	ES-504	RJ 155
103	C	103	Q	Q	Q	R*
108		108	V**	V	I	I
829	NS1	51	E	E	E	D
1062		284	N	S	S	S
1203	NS2A	73	Y	H	Y	Y
1572		NS3	88	E	E	D
1605	121		R	R	K	K
1666	NS5	182	R	Q	Q	Q
1744		260	E	E	E	G
2584		78	T	I	T	T
2601		95	K	R	R	R
2607		101	K	K	R	R
2630		124	I	V	I	I
2644		138	V	V	I	I
2679		173	G	G	S	S
2803		297	N	N	S	S
2897		391	N	N	N	K
3031	525	A	V	A	A	
3128	622	I	I	I	M	
3149	643	V	V	A	A	
3151	645	T	T	T	I	
3215	709	N	N	S	S	
3345	839	N	D	D	D	

*Amino acids in bold red represent the unique amino acid occurrence in a certain isolate YFV.

**Highlighted in gray, the set of nine amino acid variations that characterizes the YFV 2000–2010 and YFV 2016–2019 samples.

the isolate PR4408 was the most genetically distinct genome of all the four YFV studied.

Viral Growth Kinetics in Different Cell Lines

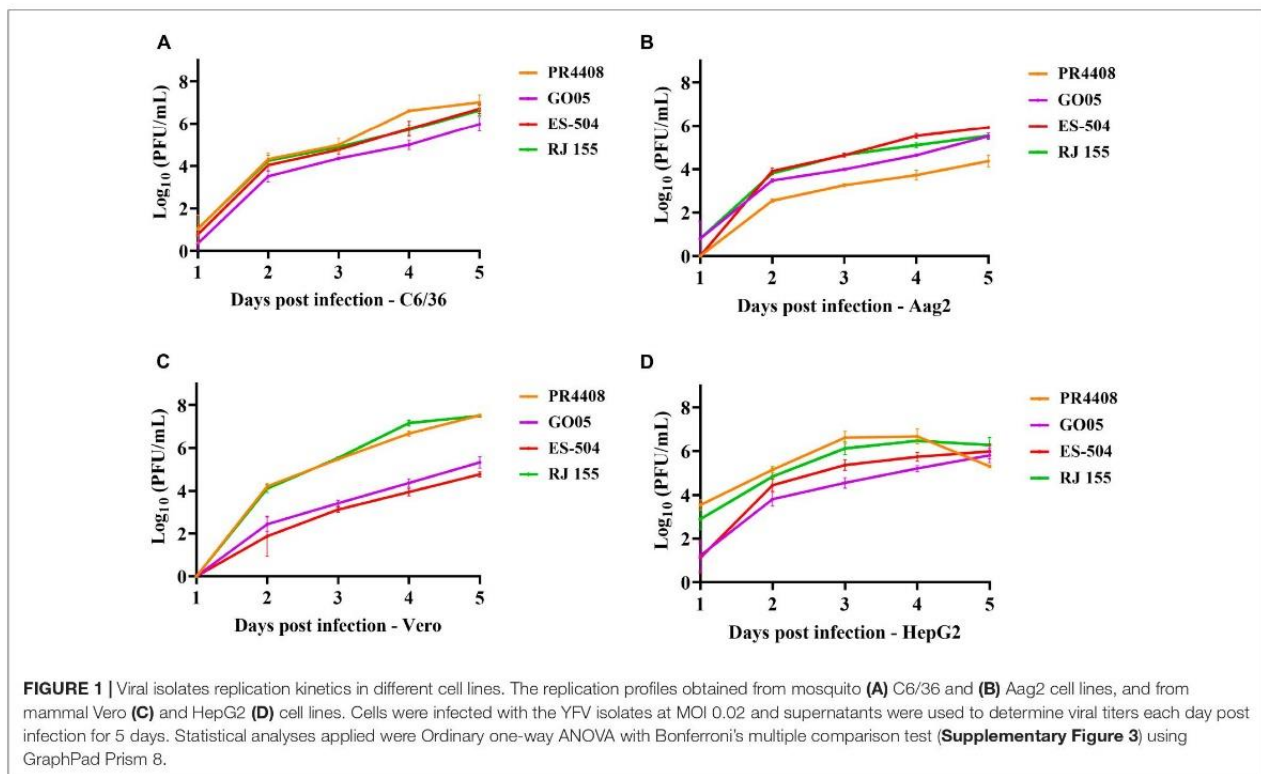
The subsequent experimental procedures were performed with the viral stocks obtained from infection in cells with each isolate. The complete genomes after cell passage were sequenced to verify genomic identity with the data deposited in GenBank Database (data not shown). To evaluate the potential effect of the detected polymorphisms in cell infectivity, we infected two mammal (Vero and HepG2) and two mosquito (C6/36 and Aag2) cell lines with the four YFV isolates at MOI of 0.02. In the *Aedes albopictus* mosquito cells, C6/36, the proliferation rates are highly similar among isolates (Figure 1A). The GO05 virus presented the lowest titers along the 5 dpi, with statistical significance at 4 and 5 dpi (Supplementary Figure 4). The C6/36 growth curves displayed an ascending profile reaching no viral replication peak. On the other hand, the curves in *Ae. aegypti* Aag2 cells reached a viral growth peak at 4 dpi. In Aag2 cells, PR4408 and GO05 replicated less than RJ 155 and ES-504 (Figure 1B). In general, the viral yields at 4 and 5 dpi obtained in both mosquito cells were similar. The exception was PR4408 that exhibited a reduction of 450 (4 dpi) and 780 (5 dpi) times in proliferation rates in Aag2 cells (Supplementary Figure 5). These results point to better

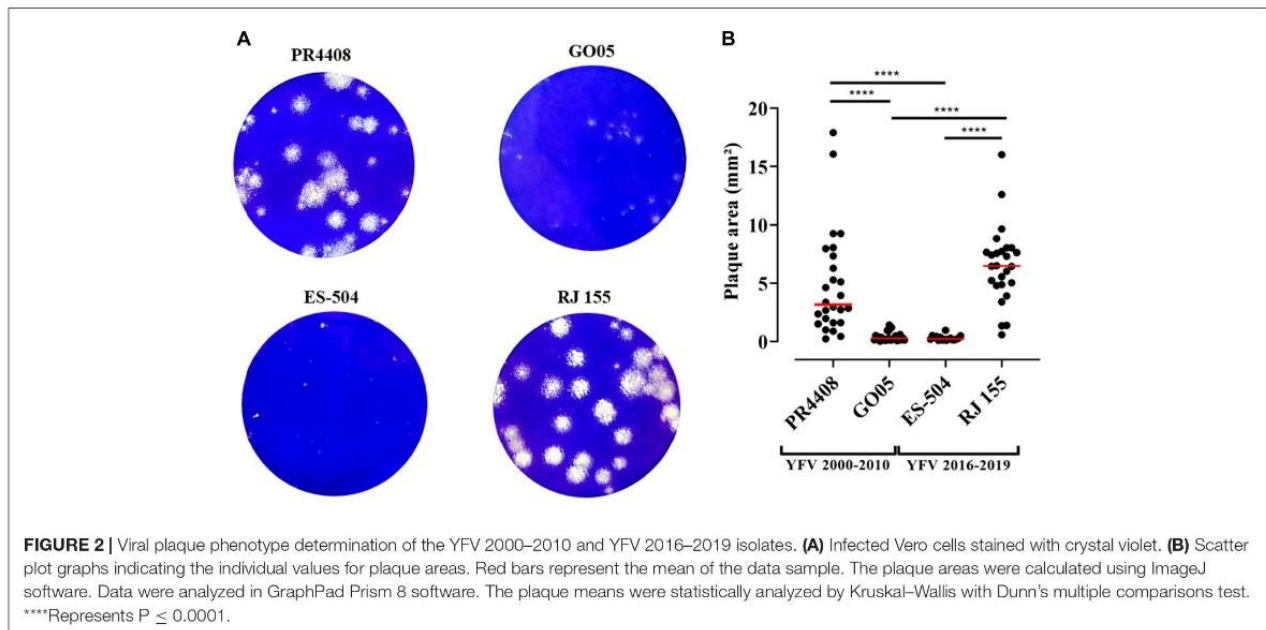
infectivity of the YFV 2016–2019 than the YFV 2000–2010 isolates in mosquito cells.

In mammal Vero and HepG2 cells, we could not establish a pattern associated with the group of isolates. YFV GO05 and ES-504 displayed lower titers than RJ 155 and PR4408 (Figures 1C,D). Replication curves of YFV isolates in Vero and HepG2 reached viral growth peaks at 3 and 4 dpi, respectively. The most notable differences occurred in the viral proliferation in Vero cells (Figure 1C): RJ 155 and PR4408 isolates yielded significantly higher viral titers than GO05 and ES-504. While RJ 155 and PR4408 exhibited nearly identical curves in both mammalian cells, GO05 and ES-504 were slightly different in HepG2 cells. The statistics of the viral replication kinetics are detailed in Supplementary Figures 4, 5.

Plaque Phenotype

To further characterize the YFV isolates, they were defined by their plaque phenotype in Vero cells. As observed in Figure 2, RJ 155 and PR4408 exhibited larger and more diverse plaque sizes (average plaque areas: 6.54 ± 3.28 and 4.90 ± 4.47 mm², respectively). The isolates ES-504 and GO05 had more homogenous plaques in size and smaller areas (mean of areas: 0.31 ± 0.21 and 0.41 ± 0.38 mm², respectively). Although the mean plaque area of RJ 155 was larger than the mean of PR4408 plaques, there was no significant difference between them ($P = 0.1812$). Likewise, ES-504 and GO05 presented a slight difference in mean that was not statistically significant ($P = 0.9995$). Comparison between isolates belonging to the same





group, YFV 2016–2019 (ES-504 and RJ 155) and YFV 2000–2010 (GO05 and PR4408), showed significantly different plaque phenotypes ($P < 0.0001$).

Viral Replication in Vero Cells in the Presence of Type I Interferon

Additionally, we submitted Vero cells to treatment with interferon-alpha and beta (IFN- α and IFN- β) in four different concentrations: 10, 50, 100, and 1,000 UI/mL. Cells were treated before and after viral adsorption with each YFV isolates at MOI 0.5. Viral concentrations in cell supernatants after 48 h of incubation were calculated and analyzed. The IC_{50} values for infection under IFN- α and IFN- β treatment with each YFV were calculated through a non-linear regression curve fitting.

The results obtained were similar for both IFN- α and IFN- β , although all four YFV isolates tended to be less sensitive to IFN- α than to IFN- β (Figures 3A,B, respectively). YFV PR4408 and RJ 155 displayed higher viral titers despite the treatment with IFN, with IC_{50} values of 7,570 and 2,564 UI/mL for IFN- α , and 2,301 and 1,436 UI/mL for IFN- β , respectively. Unlike YFV GO05 and ES-504, which were more strongly inhibited by IFN treatment, presenting IC_{50} of 180.5 and 70 UI/mL for IFN- α , and 28.92 and 18.34 UI/mL for IFN- β , respectively (Figure 3C).

The IC_{50} values were also submitted to the statistical one-way ANOVA test with Bonferroni’s multiple comparison test to evaluate if the differences are statistically relevant (Supplementary Figure 6). The treatment with IFN- α influenced less in the infectivity of the YFV. The only statistical difference was observed between IC_{50} of PR4408 and ES-504 ($P = 0.043$). On the other hand, the IC_{50} values obtained after treatment with IFN- β were significantly different between PR4408 and GO05 ($P = 0.003$), PR4408 and ES-504 ($P = 0.001$), RJ 155 and GO05 ($P = 0.006$), and RJ 155 and ES-504 ($P = 0.002$). In summary,

ES-504 and GO05 did not display differences in IC_{50} values, as well as RJ 155 and PR4408. Altogether, YFV PR4408 and RJ 155 exhibited similar IC_{50} values, at least 15 times higher than the IC_{50} of GO05 and ES-504.

Virus-Induced Cytotoxicity

We also compared the YFV isolates in terms of their ability to promote cytotoxicity in Vero cells. After 24 h of infection with the different YFV isolates at MOI 0.1, the cell viability was determined in infected Vero cells (Figure 4). The isolates RJ 155 and PR4408 induced the highest percentages of cell death (22.72 and 27.93%, respectively). GO05 displayed an intermediary cytotoxic effect with 16.50% of cell death. YFV ES-504 reached the lowest cytotoxicity (5.04%). As observed in mammal cell infection assays, we can establish a pattern associated neither with the YFV 2000–2010 or YFV 2016–2019 groups. Statistical analyses showed significant differences between the isolates, except RJ 155 and GO05, and RJ 155 and PR4408 (Figure 4).

Neurovirulence in BALB/c Mice

The final comparative study between YFV 2000–2010 and 2016–2019 isolates was a neurovirulence test in the mouse model. Intracerebrally inoculated mice were monitored daily for bodyweight loss and clinical signs of disease, such as ruffled fur, hunched posture, difficult breathing, repetitive movements, and lethargy (clinical scores are listed in Supplementary Table 2). All YFV isolates led to a 100% mortality (Figures 5A,B) but presenting different AST. Mice infected with YFV isolates RJ 155 and PR4408 had similar AST (6.8 ± 0.4 and 6.4 ± 0.5 days, respectively). In comparison, ES-504 generated an intermediate AST value of 7.4 ± 0.5 days. The isolate GO05 induced an AST of 8.3 ± 0.8 days, comparable to the AST of mice infected with the vaccine YFV 17DD (AST of 8.1 ± 0.6 days). The

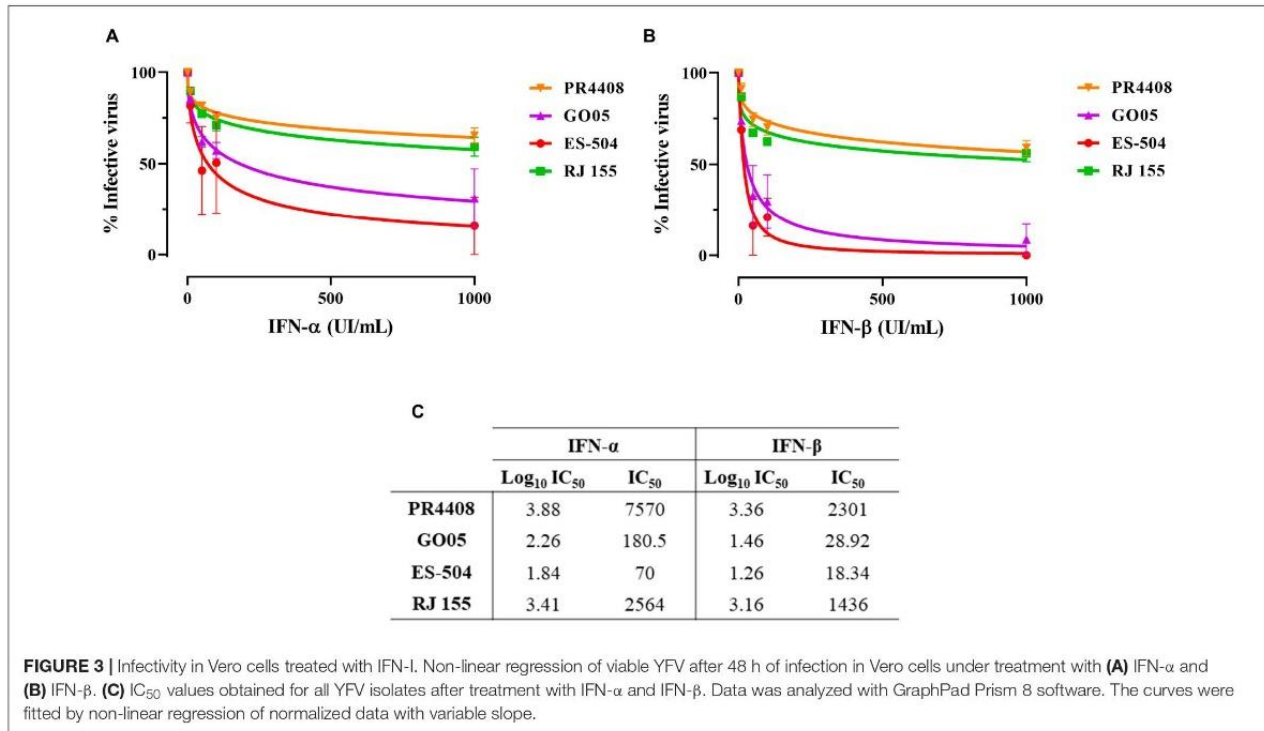


FIGURE 3 | Infectivity in Vero cells treated with IFN-I. Non-linear regression of viable YFV after 48 h of infection in Vero cells under treatment with (A) IFN- α and (B) IFN- β . (C) IC₅₀ values obtained for all YFV isolates after treatment with IFN- α and IFN- β . Data was analyzed with GraphPad Prism 8 software. The curves were fitted by non-linear regression of normalized data with variable slope.

survival curves were statistically analyzed using the Log-rank (Mantel–Cox) test to determine if the differences observed were significant. Between YFV of the same group, ES-504 and RJ 155 were significantly different with $P = 0.006$ and GO05 and PR4408 with $P < 0.0001$. The least significant differences were observed between RJ 155 and PR4408 ($P = 0.0184$) and ES-504 and GO05 ($P = 0.0016$). Compared with the control group YFV 17DD, only GO05 exhibits no statistical differences ($P = 0.2952$).

The four viruses induced the same loss of body weight and disease outcome in all animals (Figures 5C,D). As soon as 3 dpi, mice infected with isolates PR4408 and RJ 155 showed signs of illness, progressing to a constantly increasing body weight loss after day 5. Animals infected with these viruses reached the critical humane endpoint around the sixth day. ES-504 infected mice start becoming affected by YFV after 4 dpi, with an AST of 7 days. The isolate GO05 proved to be less neurovirulent, with a disease progression similar to the vaccine YFV 17DD concerning weight loss, clinical scores, and AST (Figure 5).

DISCUSSION

Yellow fever virus has a specific dispersal: it is established that in regions where YFV is maintained mainly in sylvatic cycles, in West Africa and North/South America, the evolution follows an *in situ* pattern (Carrington and Auguste, 2013; Mir et al., 2017). Particularly in South America, the most dispersed genotype, SA I, is marked by the Brazilian diversity and is subdivided into clades that are temporally and geographically clustered (Vasconcelos et al., 2004). Phylogenetic studies demonstrate that

this subdivision is due to a lineage replacement dynamic where emerging sub-lineages cause outbreaks and ancestor lineages cease to circulate or disappear (Zanotto et al., 1996). Since 1999,

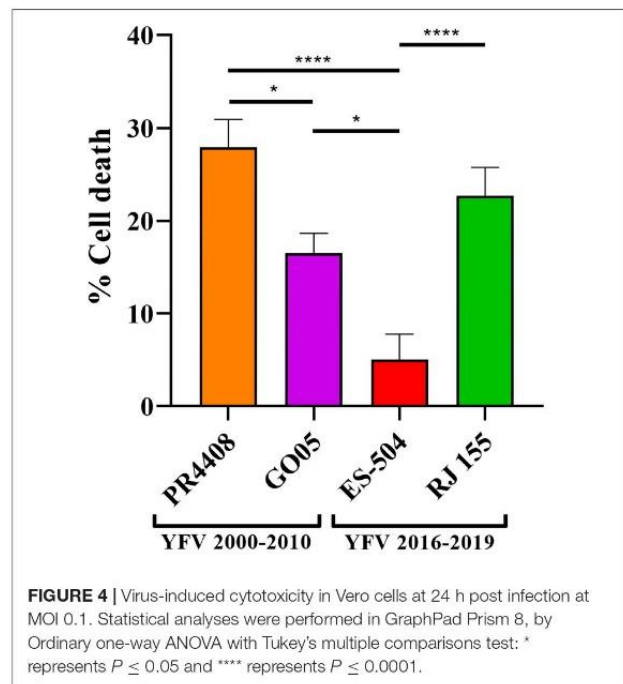
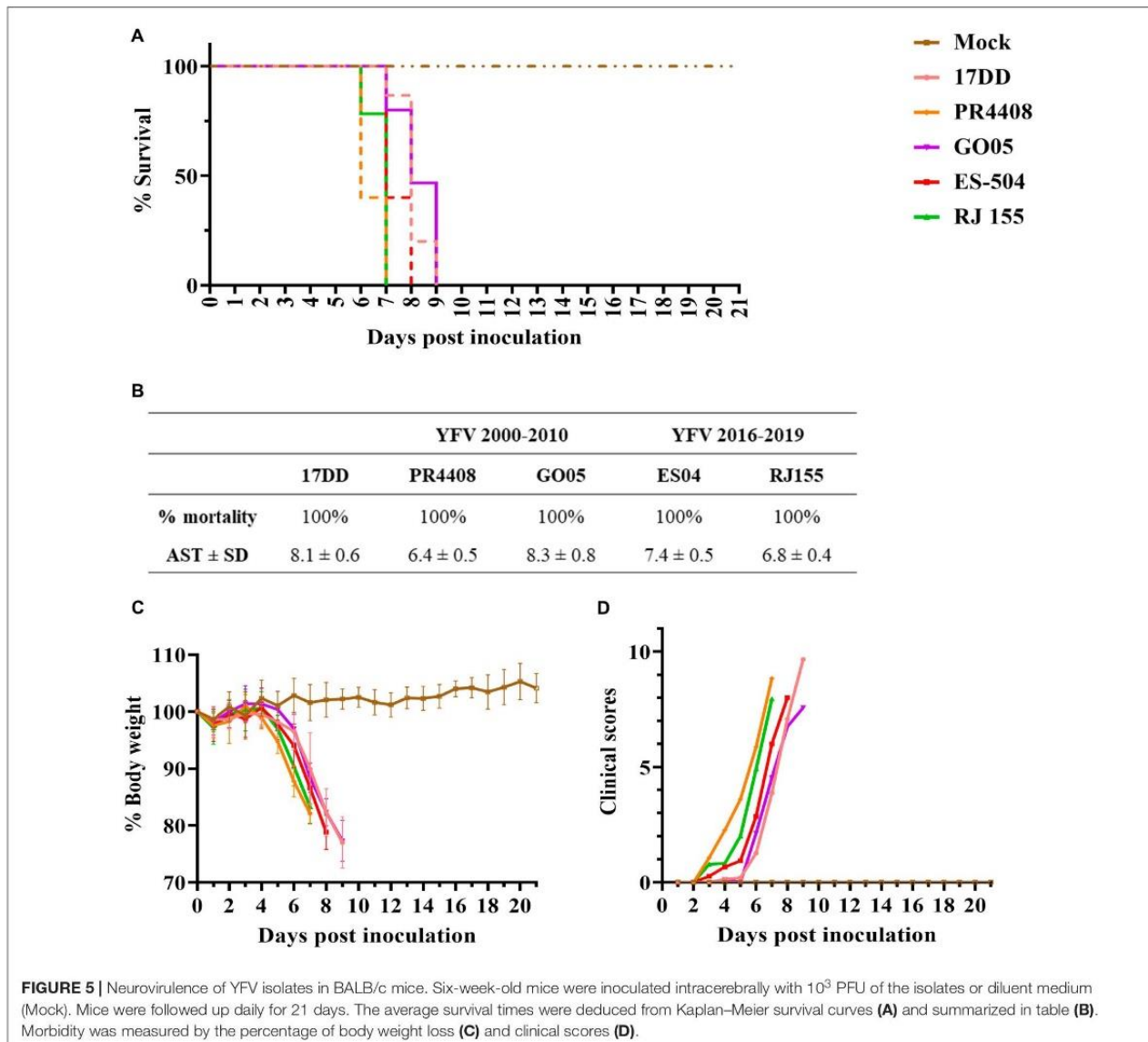


FIGURE 4 | Virus-induced cytotoxicity in Vero cells at 24 h post infection at MOI 0.1. Statistical analyses were performed in GraphPad Prism 8, by Ordinary one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test: * represents $P \leq 0.05$ and **** represents $P \leq 0.0001$.



through the emergence of YFV modern-lineage, yellow fever has come back in regions of Brazil where it had been silent for several decades (de Filippis et al., 2002). Modern sub-lineage 1E has caused Brazilian outbreaks since 2004, prevailing in the country, and successfully replaced modern sub-lineage 1D.

In this study, we performed the biological characterization of four sub-lineage 1E isolates from Brazil. All the viral samples were isolated from YFV infected howler monkeys (*Alouatta* spp.), highly susceptible hosts for YFV (de Azevedo Fernandes et al., 2021), whose infection generally resulted in animal death. Therefore, although obtained at different times, all four isolates are YFV virulent to primates circulating in forested environments. A molecular signature is associated with the YFV 2016–2019 outbreak strains, consisting of nine non-synonymous substitutions, present in most sub-lineage 1E

sequences resolved since 2016 (Bonaldo et al., 2017; Gomez et al., 2018). Therefore, we considered this diversity and selected isolates carrying or not these molecular markers. The four selected YFV isolates emerged in a time-spanning period from 2008 to 2019 and in different Brazilian geographic regions: south (PR4408), central west (GO05), and southeast (ES-504 and RJ 155).

In the YFV 2000–2010 group, isolate PR4408 is related to a large outbreak in 2008 in RS, the southernmost state in Brazil bordering Uruguay and Argentina, and GO05, circulated in GO in 2017 (central west). Both YFV are more phylogenetically related to the Venezuelan YFV genomic sequences, displaying a similar amino acid pattern to previous YFV sub-clade 1E strains sampled in Brazil and Venezuela between 2000 and 2010 (Delatorre et al., 2019).

The spread of YFV during the outbreak in southeastern Brazil occurred along two main routes from the central west toward the southeastern state of MG (Gomez et al., 2018). We chose the second group of isolates (YFV 2016–2019) related to one of the routes belonging to the YFV MG/ES/RJ sub-lineage (Delatorre et al., 2019). YFV ES-504 was isolated at the beginning of the southeastern outbreak in February 2017 in ES (Bonaldo et al., 2017; Gomez et al., 2018). The isolate RJ 155 obtained in early 2019 corresponds to the only and last record of YFV circulation in RJ. Indeed, it consists of the first sign of virus re-emergence in the state since July 2018 (Abreu et al., 2019). More specifically, this sample was detected in an area where the outbreak had occurred two transmission seasons before, indicating that the virus transmission can be resilient in the Atlantic Forest zone, independently of new introductions (Abreu et al., 2019).

These four isolates exhibit a high degree of genetic similarity. Most amino acid variations are localized in the NS proteins (21 out of 23), mainly in NS5 (14 out of 21). In this work, we intended to investigate if these polymorphisms may impact viral fitness leading to phenotypic differences in viral virulence, consisting in a first approach to establish the genotypical basis of this feature. To understand the genetic dynamic of YFV, we must consider that RNA viruses evolve at higher rates than DNA viruses (Drake et al., 1998). However, RNA viruses transmitted by arthropod vectors to mammals, like flaviviruses, seem to display reduced rates of non-synonymous mutations. The viral propagation in multiple hosts implies restrictions in fixing changes in viral proteins, as these might cause a reduction in fitness in one of the hosts and be deleterious. There is a positive selection of the most mutations occurring in flaviviruses that alternately infect insect and mammalian hosts (Woelk and Holmes, 2002). Genetic changes in these viruses should not considerably disturb the viral replication in the other. Thus, amino acid alterations might modulate the infection in one host without disturbing the viral replication in the other.

To evaluate the differences among YFV isolates abilities to infect mosquito and mammal hosts, we initially utilized mosquito cells to assess the influence of genetic variability on infection. Comparing the infection of Aag2 mosquito cells by the isolates, we noticed a possible influence of the YFV 2016–2019 molecular signature in infectivity, with lower viral yields achieved by isolates without this polymorphism. The effect is only observed in Aag2 cells with no apparent differences in viral proliferation in C6/36 cells, and it is more evident in the YFV PR4408 proliferation rates. C6/36 cells promote, in general, a robust growth of arthropod-borne viruses because they are defective in the expression of siRNA production, an important antiviral defense against arboviruses in mosquitoes (Brackney et al., 2010). On the other hand, Aag2 cells efficiently mount an antiviral response inducing the RNAi pathway (Brackney et al., 2010). Consequently, the viral proliferation in these cells is more controlled and restrictive. The potential increased fitness of the YFV 2016–2019 molecular signature in mosquito adaptation needs to be tested by determining vector competence in *Aedes*, *Haemagogus*, and *Sabethes* mosquito populations.

In mammal cells, Vero and HepG2, we did not detect any correlation between isolates carrying the YFV 2016–2019

molecular signature and growth kinetics. PR4408 and RJ 155 display higher rates of proliferation than ES-504 and GO05 isolates. These results match the plaque phenotype and cell viability assays, where RJ 155 and PR4408 exhibit larger plaques and more evidently induce cell death. These properties would reflect an increased viral capacity to replicate in mammal cells (Collette et al., 2020). On the other hand, it might also be related to the more effective modulation of the cellular antiviral response, primarily triggered by IFN-I. It is well established that the ability to antagonize the IFN-I response is an essential determinant of virus virulence (Best, 2017). Here we observed that PR4408 and RJ 155 isolates displayed higher viral yields than GO05 and ES-504 isolates in the presence of IFN-I (α and β), as expected.

The virulence of the four viruses was investigated by intracerebral inoculation in mice. The neurovirulence test in mice has been utilized to compare vaccine YFV, wild-type strains, or mutant variants (Barrett and Gould, 1986; Muylaert et al., 1996; Xie et al., 1998; Chambers and Nickells, 2001; Vlaycheva and Chambers, 2002). In general, vaccines and isolates YFV provoke 100% death of inoculated animals. The main parameter utilized in comparison among YFV strains is the AST reached for every virus. Barrett and Gould (1986) have performed neurovirulence tests with different vaccine strains, including 17DD, produced in Brazil, the same seed vaccine strain used as a positive control in the present study. Our data corroborated a more neurovirulent phenotype of RJ 155 and PR4408, exhibiting AST between 6 and 7 days after intracerebral inoculation, compared to ES-504 and GO05 isolates, with AST between 7 and 8 dpi.

Our study did not observe any apparent influence of the YFV 2016–2019 molecular signature on infection rates in the invertebrate hosts. Here, the most infective viruses in mammal cell models or mouse infection were YFV PR4408, not carrying the molecular signature, and RJ 155, with the nine amino acid modifications observed in the YFV 2016–2019 group. The differences in the infective properties observed in this work could be related to the precursor-polyprotein polymorphisms. Except for the YFV ES-504 isolate, the three other YFV strains carry unique amino acid variations that could modulate the distinct virological properties observed in this study. In the case of YFV 2016–2019, the isolates ES-504 and RJ 155 clustered in a monophyletic group showing high genomic similarity, whereas isolates of the 2000–2010 group clustered in two separate branches (Supplementary Figure 3). Between ES-504 and RJ 155, we observed 21 nucleotide variations, six of them causing amino acid changes. The set of nucleotide variations consists of one in 3'UTR and 13 silent changes in the precursor-polyprotein coding sequence. We can speculate that the silent mutations and the change in 3'UTR might cause an effect in modulating viral infectivity changing RNA secondary structures (Proutski et al., 1997). On the other hand, the six amino acid changes may cause the virological differences observed between the isolates of YFV 2016–2019.

Isolates RJ 155 and PR4408 display a similar infection pattern in mammalian cells and mice. While YFV RJ 155 carries six unique amino acid modifications, one in C protein (C 103) and five in NS proteins (NS1 51; NS3 260; NS5 391, 622, and 645), isolate PR4408 does not present any of these six amino acid

markers, suggesting that other genetic polymorphisms might be responsible for higher infectivity rates observed in these mammal models. In addition, PR4408 bears four specific amino acid variations inside NS proteins (NS1 284; NS3 182; NS5 95 and 839); these amino acid markers might be related to the infection phenotype, that is, a more restrictive proliferation in mosquito Aag2 cells and higher virulence in the mouse model. On the other hand, the other YFV 2000–2010 virus, the isolate GO05, is considerably more attenuated and carries four specific amino acid alterations inside two NS proteins (NS2A 73; NS5 78, 124, and 525). It is not possible yet to determine the role of the eight amino acid polymorphisms in virulence modulation of the YFV 2000–2010 group. Although YFV PR4408 and GO05 are genetically closer, they are more distant evolutionally than the isolates of the YFV 2016–2019 group (**Supplementary Figure 3**), reflecting in the phenotypic perspectives where they are too different both *in vitro* and *in vivo*, as shown in our results. Furthermore, it is noteworthy that YFV 2016–2019 were isolated spatially and temporally close, while in YFV 2000–2010 group, PR4408 was isolated geographically distant and 9 years apart from GO05.

We hypothesize that some of these amino acid variations could be involved in the phenotypic differences observed in this study. However, modulation in viral virulence and attenuation can be mono- or multifactorial, and some of these changes could not significantly affect the processes studied here. The results obtained in this study suggest that the differences in viral replicative fitness among the four Brazilian YFV isolates are mainly related to polymorphisms found in NS proteins. Most amino acid polymorphisms are localized in those NS proteins that form the viral replication complex inside the host cell, which have been described as targets for positive selection in flaviviruses (Sironi et al., 2016). It is not possible to predict if those changes are modulating the viral fitness in nature. Further studies will address this point employing reverse genetics to establish which amino-acid variation or variations are responsible for the modulation of infectivity in cells and mice.

The NS2A and NS1 proteins have been described as cofactors in viral replication. Despite evidence that residue changes in NS2A modulated viral replication (Kummerer and Rice, 2002; Marquez-Jurado et al., 2018), its association with the replication complex is still unclear. However, NS2A plays a vital role in viral assembly through association with the complex C-prM-E and viral RNA (Vossmann et al., 2015; Xie et al., 2019). Meanwhile, the NS1 protein is well described as the main factor for ER membrane remodeling and the formation of the replication organelle through its many hydrophobic surfaces (Ci et al., 2020). This protein is multifunctional and is involved in many interactions and processes within the hosts (Rastogi et al., 2016; Watterson et al., 2016), including immune evasion mechanisms (Akey et al., 2014; Shi et al., 2018).

Finally, both NS3 and NS5 proteins perform key enzymatic activities in viral replication. The NS3 N-terminal domain encodes a serine protease, and the C-terminal an RNA helicase also displaying nucleoside triphosphatase (NTPase) and RNA

triphosphatase (RTPase) enzymatic activities (Assenberg et al., 2009; Li et al., 2014). NS5 also contains two domains with distinct enzymatic functions. Its N-terminal domain encodes methyl- and guanylyltransferase (MTase and GTase) (Geiss et al., 2009; Issur et al., 2009), and the C-terminal domain performs as an RNA dependent RNA polymerase (RdRp) (Selisko et al., 2018). These two non-structural proteins interact widely with each other and with host proteins (Le Breton et al., 2011). Thus, non-synonymous changes in these NS proteins could interfere with the viral replication and assembly.

At last, we observed amino acid variations only in one of the structural proteins, the capsid protein (C), which also plays a primary role in the viral assembly of flaviviruses (Kuhn et al., 2002). Additionally, an RNA secondary structure present in the C coding region is a critical determinant for flavivirus replication (Clyde and Harris, 2006; Clyde et al., 2008). Furthermore, in YFV, C protein suppresses the antiviral RNA silencing process in mosquitoes by protecting viral dsRNA from processing *via* dicer (Samuel et al., 2016). Consequently, it might be possible that these alterations would play a role in the modulation of viral infectivity.

In summary, we cannot conclude if YFV 2016–2019 molecular signature plays a pivotal role in cell infectivity or neurovirulence. Instead, we can analyze whether the location and date of sample collection are influenced by genome composition. The phylogenetic analysis (**Supplementary Figure 3**) demonstrates that YFV PR4408 did not cluster with the other three isolates but in a separate branch with a well-supported bootstrap value of 99%. Hence, the differences between PR4408 and GO05 may be related to a different YFV evolutionary timing in Brazil. Meanwhile, the different aspects highlighted in this work between YFV ES-504 and RJ 155 could be directly associated with their genetic features. This study supports the importance of identifying and studying genetic factors along YFV evolution to better understand the potential of amino acid changes in viral fitness.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The YFV genome sequences are available in the GenBank database under the accession numbers: KY861728 (PR4408), MK333803 (GO05), KY885000 (ES-504), and MK533792 (RJ155).

ETHICS STATEMENT

Collection and management of monkey samples were conducted in accordance with the Brazilian environmental authorities (SISBIO-MMA licenses 54707-6 and 52472-2 and INEA licenses 012/2016 and 019/2018) and Committee on the Ethics of Animal Experimentation of Oswaldo Cruz Institute (CEUA/IOC; Permit: L037/2016). The study involving BALB/c mice was reviewed and approved by the Committee on the Ethics of Animal Experimentation of Oswaldo Cruz Institute (CEUA-IOC; Permit: L-034/2019).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NF and MB: study conception. FA, MC, LM, PV, and RL-D-O: field collection of NHP blood and liver samples, processed samples, and proceeded to viral isolation. NF, IR, and AS: YFV sequencing. NF and LR: viral studies. DF, IM, MN, and NF: mouse neurovirulence assays. MG: phylogenetic analyses. MB and NF: manuscript preparation. All authors critically read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by MCTI/FINEP/FNDCT 01/2016 – ZIKA (Grant No. 04.16.0058.00); Preventing and Combating the Zika Virus, MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC524 CAPES/MS-Decit (Grant No. 440865/2016-6). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e 525 Tecnológico (Grant No. 312446/2018), Preventing and Combating the Zika Virus MCTIC/FNDCT526 CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit (Grant No. 88881130684/2016-00), and, INOVA Geração de Conhecimento (Grant No. VPPIS-004-FIO18), Fiocruz. MB was a recipient of CNPq fellowship

REFERENCES

- Abreu, F. V. S., Delatorre, E., Dos Santos, A. A. C., Ferreira-de-Brito, A., de Castro, M. G., Ribeiro, I. P., et al. (2019). Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 114:e190076. doi: 10.1590/0074-02760190076
- Akey, D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T. J., et al. (2014). Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science* 343, 881–885. doi: 10.1126/science.1247749
- Assenberg, R., Mastrangelo, E., Walter, T. S., Verma, A., Milani, M., Owens, R. J., et al. (2009). Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J. Virol.* 83, 12895–12906. doi: 10.1128/JVI.00942-09
- Barrett, A. D., and Gould, E. A. (1986). Comparison of neurovirulence of different strains of yellow fever virus in mice. *J. Gen. Virol.* 67, 631–637. doi: 10.1099/0022-1317-67-4-631
- Best, S. M. (2017). The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. *J. Virol.* 91, e01970–16. doi: 10.1128/JVI.01970-16
- Bonaldo, M. C., Gomez, M. M., Dos Santos, A. A., Abreu, F. V. S., Ferreira-de-Brito, A., Miranda, R. M., et al. (2017). Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 112, 447–451. doi: 10.1590/0074-02760170134
- Brackney, D. E., Scott, J. C., Sagawa, F., Woodward, J. E., Miller, N. A., Schilkey, F. D., et al. (2010). C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e856. doi: 10.1371/journal.pntd.0000856
- Fundação Nacional de Saúde [FUNASA] (2003). *Distribuição De Casos Confirmados De Febre Amarela Notificados Por Unidade Federativa No Brasil, 1981–2002*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. (2017). *Informe nº 01 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela - Brasil 2017/2018*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. (2018). *Informe nº 27 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela - Brasil 2017/2018*. Brasília: Ministério da Saúde.

for Productivity in Technological Development and Innovative Extension.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dinair Couto-Lima for her valuable contribution in establishing viral stocks of PR4408 and participating in the preliminary experiments of viral growth kinetics. We thank Marie Vazeille and Anna Bella Failloux, who provided the C6/36 cell line in perfect conditions. Likewise, we thank Rafaela Vieira Bruno and Andresa Borges de Araujo Fonseca for the high-quality Aag2 cells they donated. We are grateful to the Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA-RPT01A – Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ for the services provided in the genome sequencing. We also acknowledge Simone Morais da Costa for technical training in intracerebral inoculation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.757084/full#supplementary-material>

- Brasil. (2019c). *“Saúde Brasil 2019 : Uma Análise da Situação De Saúde com Enfoque nas Doenças Imunopreveníveis e Na Imunização*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. (2019a). *Informe nº 11 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela - Brasil 2018/2019*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. (2019b). *Informe nº 18 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela - Brasil 2019*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. (2020a). *Boletim Epidemiológico 01*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. (2020b). *Boletim Epidemiológico 46*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. (2021a). *Informativo Epidemiológico de Arboviroses - Semana Epidemiológica 23*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil. (2021b). *Situação Epidemiológica da Febre Amarela - Monitoramento 2020/2021*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Carrington, C. V., and Auguste, A. J. (2013). Evolutionary and ecological factors underlying the tempo and distribution of yellow fever virus activity. *Infect. Genet. Evol.* 13, 198–210. doi: 10.1016/j.meegid.2012.08.015
- Chambers, T. J., and Nickells, M. (2001). Neuroadapted yellow fever virus 17D: genetic and biological characterization of a highly mouse-neurovirulent virus and its infectious molecular clone. *J. Virol.* 75, 10912–10922. doi: 10.1128/JVI.75.22.10912-10922.2001
- Ci, Y., Liu, Z. Y., Zhang, N. N., Niu, Y., Yang, Y., Xu, C., et al. (2020). Zika NS1-induced ER remodeling is essential for viral replication. *J. Cell. Biol.* 219:e201903062. doi: 10.1083/jcb.201903062
- Clyde, K., Barrera, J., and Harris, E. (2008). The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis. *Virology* 379, 314–323. doi: 10.1016/j.virol.2008.06.034
- Clyde, K., and Harris, E. (2006). RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J. Virol.* 80, 2170–2182. doi: 10.1128/JVI.80.5.2170-2182.2006
- Collette, N. M., Lao, V. H. L., Weilhammer, D. R., Zingg, B., Cohen, S. D., Hwang, M., et al. (2020). Single Amino Acid Mutations Affect Zika Virus Replication In Vitro and Virulence In Vivo. *Viruses* 12:1295. doi: 10.3390/v12111295
- de Azevedo Fernandes, N. C. C., Guerra, J. M., Diaz-Delgado, J., Cunha, M. S., Saad, L. D., Iglezias, S. D., et al. (2021). Differential Yellow Fever Susceptibility in New World Nonhuman Primates, Comparison with Humans, and Implications for Surveillance. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 47–56. doi: 10.3201/eid2701.191220

- de Filippis, A. M., Nogueira, R. M., Schatzmayr, H. G., Tavares, D. S., Jabor, A. V., Diniz, S. C., et al. (2002). Outbreak of jaundice and hemorrhagic fever in the Southeast of Brazil in 2001: detection and molecular characterization of yellow fever virus. *J. Med. Virol.* 68, 620–627. doi: 10.1002/jmv.10226
- de Souza, R. P., Foster, P. G., Sallum, M. A., Coimbra, T. L., Maeda, A. Y., Silveira, V. R., et al. (2010). Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *J. Med. Virol.* 82, 175–185. doi: 10.1002/jmv.21606
- Delatorre, E., de Abreu, F. V. S., Ribeiro, I. P., Gomez, M. M., Dos Santos, A. A. C., Ferreira-de-Brito, A., et al. (2019). Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. *Front. Microbiol.* 10:1079. doi: 10.3389/fmicb.2019.01079
- Douam, F., and Ploss, A. (2018). Yellow Fever Virus: knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol.* 26, 913–928. doi: 10.1016/j.tim.2018.05.012
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J. F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148, 1667–1686.
- Franco, O. (1969). [History of the Yellow fever in Brazil]. *Rev. Bras. Malariol. Doencas Trop.* 21, 315–512.
- Geiss, B. J., Thompson, A. A., Andrews, A. J., Sons, R. L., Gari, H. H., Keenan, S. M., et al. (2009). Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding. *J. Mol. Biol.* 385, 1643–1654. doi: 10.1016/j.jmb.2008.11.058
- Gomez, M. M., Abreu, F. V. S., Santos, A., Mello, I. S., Santos, M. P., Ribeiro, I. P., et al. (2018). Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016–2017 Brazilian outbreak. *J. Gen. Virol.* 99, 536–548. doi: 10.1099/jgv.0.001033
- Issur, M., Geiss, B. J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J., et al. (2009). The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA* 15, 2340–2350. doi: 10.1261/rna.1609709
- Kalyanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., and Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods* 14, 587–589. doi: 10.1038/nmeth.4285
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossman, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., et al. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717–725. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00660-8
- Kummerer, B. M., and Rice, C. M. (2002). Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J. Virol.* 76, 4773–4784. doi: 10.1128/jvi.76.10.4773-4784.2002
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30, 3276–3278. doi: 10.1093/bioinformatics/btu531
- Le Breton, M., Meyniel-Schicklin, L., Deloire, A., Coutard, B., Canard, B., de Lamballerie, X., et al. (2011). Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC Microbiol.* 11:234. doi: 10.1186/1471-2180-11-234
- Li, K., Phoo, W. W., and Luo, D. (2014). Functional interplay among the flavivirus NS3 protease, helicase, and cofactors. *Virol. Sin.* 29, 74–85. doi: 10.1007/s12250-014-3438-6
- Marfin, A. A., and Monath, T. P. (2008). “Yellow fever virus,” in *Encyclopedia of Virology*, 3rd Edn, eds. B. W. J. Mahy and M. H. V. Van Regenmortel (Elsevier Ltd.), 469–476. doi: 10.1016/B978-012374410-4.00535-5
- Marquez-Jurado, S., Nogales, A., Avila-Perez, G., Iborra, F. J., Martinez-Sobrido, L., and Almazan, F. (2018). An Alanine-to-Valine Substitution in the Residue 175 of Zika Virus NS2A Protein Affects Viral RNA Synthesis and Attenuates the Virus In Vivo. *Viruses* 10:547. doi: 10.3390/v10100547
- Mendes, A. (2018). *Vacina de Febre Amarela Será Ampliada Para Todo o Brasil*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., et al. (2020). IQ-TREE 2: new Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol. Biol. Evol.* 37, 1530–1534. doi: 10.1093/molbev/msaa015
- Mir, D., Delatorre, E., Bonaldo, M., Lourenco-de-Oliveira, R., Vicente, A. C., and Bello, G. (2017). Phylogenetics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci. Rep.* 7:7385. doi: 10.1038/s41598-017-07873-7
- Monath, T. P. (2008). Treatment of yellow fever. *Antiviral Res.* 78, 116–124. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.10.009
- Monteiro, N. (2019). *Em 2020, Ministério da Saúde Amplia Público Para Vacinas Contra Febre Amarela e Gripe*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Muyllaert, I. R., Chambers, T. J., Galler, R., and Rice, C. M. (1996). Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology* 222, 159–168. doi: 10.1006/viro.1996.0406
- Dégallier, N., da Rosa, A. T., Hervé, J. -P., da Rosa, J. F. S. T., da Costa Vasconcelos, P. F., da Silva, C. J. M., et al. (1992). A comparative study of yellow fever in Africa and South America. *Ciênc. Cult.* 44, 143–51.
- Possas, C., Lourenco-de-Oliveira, R., Tauil, P. L., Pinheiro, F. P., Pissinatti, A., Cunha, R. V. D., et al. (2018). Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 113:e180278. doi: 10.1590/0074-02760180278
- Proutski, V., Gaunt, M. W., Gould, E. A., and Holmes, E. C. (1997). Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development. *J. Gen. Virol.* 78, 1543–1549. doi: 10.1099/0022-1317-78-7-1543
- Rastogi, M., Sharma, N., and Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol. J.* 13:131. doi: 10.1186/s12985-016-0590-7
- Samuel, G. H., Wiley, M. R., Badawi, A., Adelman, Z. N., and Myles, K. M. (2016). Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 13863–13868. doi: 10.1073/pnas.1600544113
- Selisko, B., Papageorgiou, N., Ferron, F., and Canard, B. (2018). Structural and Functional Basis of the Fidelity of Nucleotide Selection by Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerases. *Viruses* 10:59. doi: 10.3390/v10020059
- Shi, Y., Dai, L., Song, H., and Gao, G. F. (2018). Structures of Zika Virus E & NS1: Relations with Virus Infection and Host Immune Responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1062, 77–87. doi: 10.1007/978-981-10-8727-1_6
- Sironi, M., Forni, D., Clerici, M., and Cagliani, R. (2016). Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004978. doi: 10.1371/journal.pntd.0004978
- Staples, J. E., and Monath, T. P. (2008). Yellow fever: 100 years of discovery. *JAMA* 300, 960–962. doi: 10.1001/jama.300.8.960
- Vasconcelos, P. F. (2003). [Yellow Fever]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 275–293. doi: 10.1590/s0037-86822003000200012
- Vasconcelos, P. F., Bryant, J. E., da Rosa, T. P., Tesh, R. B., Rodrigues, S. G., and Barrett, A. D. (2004). Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus. *Brazil. Emerg. Infect. Dis.* 10, 1578–1584. doi: 10.3201/eid1009.040197
- Vasconcelos, P. F., Sperb, A. F., Monteiro, H. A., Torres, M. A., Sousa, M. R., Vasconcelos, H. B., et al. (2003). Isolations of yellow fever virus from Haemagogus leucocelaenus in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97, 60–62. doi: 10.1016/s0035-9203(03)90023-x
- Vlaycheva, L. A., and Chambers, T. J. (2002). Neuroblastoma cell-adapted yellow fever 17D virus: characterization of a viral variant associated with persistent infection and decreased virus spread. *J. Virol.* 76, 6172–6184. doi: 10.1128/jvi.76.12.6172-6184.2002
- Vossmann, S., Wieseler, J., Kerber, R., and Kummerer, B. M. (2015). A basic cluster in the N terminus of yellow fever virus NS2A contributes to infectious particle production. *J. Virol.* 89, 4951–4965. doi: 10.1128/JVI.03351-14
- Watterson, D., Modhiran, N., and Young, P. R. (2016). The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Res.* 130, 7–18. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.02.014
- Woelk, C. H., and Holmes, E. C. (2002). Reduced positive selection in vector-borne RNA viruses. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2333–2336. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004059
- Xie, H., Ryman, K. D., Campbell, G. A., and Barrett, A. D. (1998). Mutation in NS5 protein attenuates mouse neurovirulence of yellow fever 17D vaccine virus. *J. Gen. Virol.* 79, 1895–1899. doi: 10.1099/0022-1317-79-8-1895
- Xie, X., Zou, J., Zhang, X., Zhou, Y., Routh, A. L., Kang, C., et al. (2019). Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. *Cell Host Microbe* 26, 606–622.e8. doi: 10.1016/j.chom.2019.09.015

Zanotto, P. M., Gould, E. A., Gao, G. F., Harvey, P. H., and Holmes, E. C. (1996). Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 548–553. doi: 10.1073/pnas.93.2.548

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in

this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Furtado, Raphael, Ribeiro, de Mello, Fernandes, Gómez, dos Santos, Nogueira, de Castro, de Abreu, Martins, Vasconcelos, Lourenço-de-Oliveira and Bonaldo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Biological Characterization of Yellow Fever Viruses Isolated From Non-human Primates in Brazil With Distinct Genomic Landscapes

Nathália Dias Furtado¹, Lidiane de Menezes Raphael¹, Ieda Pereira Ribeiro¹, Iasmim Silva de Mello¹, Déberli Ruiz Fernandes¹, Mariela Martínez Gómez², Alexandre Araújo Cunha dos Santos¹, Mônica da Silva Nogueira³, Márcia Gonçalves de Castro⁴, Filipe Vieira Santos de Abreu⁴, Lívia Carício Martins⁵, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos⁵, Ricardo Lourenço-de-Oliveira⁴ and Myrna Cristina Bonaldo^{1*}

¹Laboratório de Biologia Molecular de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, ²Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, ³Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Instituto Evandro Chagas/FIOCRUZ, Pará, Brazil

Supplementary Table 1 - Variable sites between the YFV isolates.

	Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation
		GO05	PR4408	ES-504	RJ 155		
5'UTR	53	A	G	G	G	-	-
CDS	217	A	G	A	A	CAA - CAG	-
	350	T	C	T	T	TTA - CTA	-
	426	A	A	A	G	CAA - CGA	Q - R
	436	A	A	G	G	TTG - TTA	-
	440	G	G	A	A	ATA - GTA	I - V
	451	G	G	A	A	TTA - TTG	-
	499	G	A	A	A	AGA - AGG	-
	553	T	T	C	C	TCC - TCT	-
	598	T	T	C	C	TAC - TAT	-
	784	G	A	A	A	TTA - TTG	-
	841	A	G	A	A	AAA - AAG	-
	973	G	A	G	G	TCG - TCA	-
	982	C	T	T	T	TGT - TGC	-
	997	C	C	C	T	GAC - GAT	-
	1030	T	C	C	C	ACC - ACT	-
1045	C	T	C	C	ACC - ACT	-	
1054	G	G	G	A	CAG - CAA	-	

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	1063	T	C	T	T	TGT - TGC	-
	1168	A	A	G	G	TTG - TTA	-
	1342	A	A	A	G	AAA - AAG	-
	1426	T	T	C	C	AAC - AAT	-
	1468	A	A	G	G	TCG - TCA	-
	1480	G	A	A	A	GAA - GAG	-
	1507	T	C	C	C	GCC - GCT	-
	1525	A	A	G	G	GTG - GTA	-
	1543	T	C	C	C	TTC - TTT	-
	1546	C	Y	T	T	AGT - AGC	-
	1549	T	C	C	C	AAC - AAT	-
	1618	G	A	A	A	CTA - CTG	-
	1621	T	C	T	T	CCT - CCC	-
	1636	C	T	T	T	AGT - AGC	-
	1690	T	T	C	C	GCC - GCT	-
	1696	C	C	T	T	ACT - ACC	-
	1720	C	T	C	C	AAC - AAT	-
	1780	T	T	C	C	AAC - AAT	-

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	1813	C	C	T	T	CAT - CAC	-
	1849	C	T	T	T	CTT - CTC	-
	1864	T	C	C	C	TAC - TAT	-
	1909	T	C	C	C	GAC - GAT	-
	1921	T	C	C	C	GGC - GGT	-
	1924	T	C	T	T	ACT - ACC	-
	2047	T	C	C	C	ACC - ACT	-
	2119	C	T	T	T	GAT - GAC	-
	2128	G	A	G	G	CTG - CTA	-
	2188	G	A	G	G	AAG - AAA	-
	2200	C	C	T	T	CGT - CGC	-
	2215	G	G	A	A	GGA - GGG	-
	2224	T	C	C	C	GCC - GCT	-
	2251	C	T	C	C	TTC - TTT	-
	2306	C	T	C	C	CTG - TTG	-
	2350	G	A	A	A	GTA - GTG	-
	2434	T	G	G	G	CTG - CTT	-
	2500	A	G	G	G	GGG - GGA	-

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	2584	G	A	A	A	TCA - TCG	-
	2605	G	G	G	T	GAG - GAT	E - D
	2611	A	A	G	G	GGG - GGA	-
	2659	G	A	A	A	AGA - AGG	-
	2755	G	A	A	A	ACA - ACG	-
	2827	T	T	C	C	TCC - TCT	-
	2887	T	T	C	C	TTC - TTT	-
	2974	A	A	G	G	GAG - GAA	-
	3007	G	T	T	T	GGT - GGG	-
	3037	C	T	T	T	CAT - CAC	-
	3097	C	C	T	T	ACC - ACT	-
	3134	C	C	T	C	CTG - TTG	-
	3187	A	G	G	G	AGG - AGA	-
	3232	C	T	T	T	TAT - TAC	-
	3303	G	A	G	G	AGT - AAT	S - N
	3446	C	T	C	C	CCT - TCT	P - S
	3502	G	G	A	A	GTG - GTA	-
3568	A	G	A	A	GTA - GTG	-	

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	3607	A	A	G	G	GGG - GGA	-
	3622	G	A	A	A	CTA - CTG	-
	3632	T	T	C	C	CTA - TTA	-
	3686	C	T	C	C	CTG - TTG	-
	3725	C	T	T	T	TAT - CAT	Y - H
	3739	C	C	C	T	ATC - ATT	-
	3764	T	C	C	C	CTG - TTG	-
	3895	A	A	G	G	GTG - GTA	-
	3907	T	C	C	C	ATC - ATT	-
	3910	A	G	G	G	CTG - CTA	-
	3919	T	T	C	C	AAC - AAT	-
	3973	G	G	A	A	TTA - TTG	-
	4030	T	T	C	C	GTC - GTT	-
	4099	A	T	C	C	CTC - CTA/T	-
	4103	T	C	C	C	CTG - TTG	-
	4111	T	T	C	C	TCC - TCT	-
	4198	G	A	A	A	GAA - GAG	-
	4229	T	C	T	T	TTG - CTG	-

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	4243	C	T	T	T	GCT - GCC	-
	4267	G	A	A	A	CTA - CTG	-
	4276	C	C	T	T	GTT - GTC	-
	4330	G	A	A	A	GGA - GGG	-
	4372	G	A	A	A	GAA - GAG	-
	4408	G	G	A	A	GTA - GTG	-
	4504	T	T	C	C	GCC - GCT	-
	4522	C	C	T	T	CTT - CTC	-
	4525	G	A	A	A	TTA - TTG	-
	4591	T	T	C	C	GAC - GAT	-
	4654	T	T	C	C	TTC - TTT	-
	4660	T	A	A	A	TCA - TCT	-
	4669	A	G	A	A	CTA - CTG	-
	4717	C	C	T	T	CAT - CAC	-
	4759	C	C	T	T	AAT - AAC	-
	4769	C	T	C	C	CTG - TTG	-
	4834	G	G	T	T	GAT - GAG	D - E
4858	A	G	G	G	GAG - GAA	-	

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	4882	G	C	C	C	CCC - CCG	-
	4932	G	G	A	A	AAG - AGG	K - R
	4948	C	C	T	T	ATC - ATT	-
	4972	G	G	A	A	CCA - CCG	-
	4993	C	T	C	C	CCC - CCT	-
	5053	T	C	C	C	GAC - GAT	-
	5115	A	G	A	A	CAG - CGG	Q - R
	5152	C	T	C	C	ACC - ACT	-
	5185	A	G	A	A	ACA - ACG	-
	5200	T	C	T	T	CCT - CCC	-
	5239	A	C	A	A	ACA - ACC	-
	5242	C	T	T	T	CTT - CTC	-
	5251	T	A	T	T	GCT - GCA	-
	5254	C	C	T	T	CCT - CCC	-
	5269	C	C	T	T	CTT - CTC	-
	5296	C	C	T	T	GGT - GGC	-
	5335	C	C	C	T	CAC - CAT	-
	5349	A	A	A	G	GAG - GGG	E - G

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	5350	A	A	G	G	GAG - GAA	-
	5362	C	T	C	C	GCC - GCT	-
	5383	A	G	A	A	ACA - ACG	-
	5452	A	A	G	G	TTG - TTA	-
	5473	T	C	C	C	GCC - GCT	-
	5479	C	C	C	T	GGC - GGT	-
	5512	C	T	T	T	AGT - AGC	-
	5521	C	T	C	C	ATC - ATT	-
	5533	C	C	T	T	GCT - GCC	-
	5605	C	T	T	T	CCT - CCC	-
	5614	T	T	T	C	CCT - CCC	-
	5713	C	C	C	T	CGC - CGT	-
	5992	C	C	T	T	GAT - GAC	-
	6031	A	A	G	G	GCG - GCA	-
	6043	T	C	C	C	TGC - TGT	-
	6055	T	C	C	C	GCC - GCT	-
	6109	C	T	T	T	TAT - TAC	-
	6139	T	C	C	C	TCC - TCT	-

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	6148	G	A	A	A	GAA - GAG	-
	6199	C	C	T	T	AAT - AAC	-
	6229	A	G	A	A	CAA - CAG	-
	6325	A	G	G	G	AAG - AAA	-
	6328	T	C	C	C	TGC - TGT	-
	6607	G	A	G	G	CTG - CTA	-
	6652	C	T	C	C	TTC - TTT	-
	6682	C	T	T	T	TCT - TCC	-
	6766	G	G	A	A	CTA - CTG	-
	6835	G	G	A	A	CAA - CAG	-
	6850	C	C	T	T	ATT - ATC	-
	6893	C	T	C	C	CTA - TTA	-
	6934	A	A	A	G	AAA - AAG	-
	6961	C	A	A	A	GCA - GCC	-
	7075	C	T	T	T	GGT - GGC	-
	7144	C	T	T	T	TTT - TTC	-
	7183	C	T	T	T	AGT - AGC	-
7240	T	T	A	A	CTA - CTT	-	

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	7397	C	T	T	T	TTG - CTG	-
	7423	T	C	T	T	CTT - CTC	-
	7453	G	A	A	A	ACA - ACG	-
	7459	T	T	C	C	TTC - TTT	-
	7504	A	G	G	G	CCG - CCA	-
	7597	G	T	T	T	GGT - GGG	-
	7600	C	C	T	T	GTT - GTC	-
	7684	G	A	G	G	CTG - CTA	-
	7688	C	T	C	C	CTG - TTG	-
	7738	A	A	G	G	GAG - GAA	-
	7756	T	C	T	T	GCT - GCC	-
	7837	G	A	A	A	GAA - GAG	-
	7869	T	C	C	C	ACT - ATT	T - I
	7920	G	A	G	G	AGA - AAA	R - K
	7936	T	Y	C	C	GTC - GTT	-
	7938	A	A	G	G	AGG - AAG	R - K
	7972	G	A	G	G	AAG - AAA	-
8006	G	A	A	A	ATC - GTC	I - V	

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	8038	T	C	C	C	CGC - CGT	-
	8047	A	A	G	G	CCG - CCA	-
	8048	G	G	A	A	ATA - GTG	I - V
	8050	G	G	A	A		
	8059	T	C	T	T	GAT - GAC	-
	8152	G	A	G	G	TTG - TTA	-
	8153	G	G	A	A	AGC - GGC	S - G
	8161	C	C	T	T	GGT - GGC	-
	8221	G	A	A	A	TTA - TTG	-
	8386	A	A	G	G	AAG - AAA	-
	8407	T	T	C	C	GTC - GTT	-
	8443	T	C	T	T	GAT - GAC	-
	8494	G	A	A	G	AAA - AAG	-
	8497	T	T	A	A	TCA - TCT	-
	8526	A	A	G	G	AGT - AAT	S - N
	8614	C	C	C	T	ATC - ATT	-
	8623	A	G	G	G	TTG - TTA	-
	8734	T	T	T	C	GAT - GAC	-

Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	8773	C	T	T	T	AAT - AAC	-
	8809	C	C	C	A	AAC - AAA	N - K
	8821	T	T	C	C	TGC - TGT	-
	8851	C	C	C	A	CGC - CGA	-
	9082	C	T	C	C	GCC - GCT	-
	9210	T	C	C	C	GCA - GTA	A - V
	9277	C	T	T	T	GAT - GAC	-
	9322	T	C	T	T	CAT - CAC	-
	9334	G	A	G	G	GCG - GCA	-
	9343	G	A	A	A	GTA - GTG	-
	9418	C	T	C	C	GTC - GTT	-
	9445	T	C	T	T	TCT - TCC	-
	9463	T	C	C	C	TAC - TAT	-
	9502	T	T	T	G	ATG - ATT	I - M
	9517	G	A	A	A	GCA - GCG	-
	9547	G	A	G	G	CAG - CAA	-
	9564	T	T	C	C	GCT - GTT	A - V
	9570	C	C	C	T	ACC - ATC	T - I

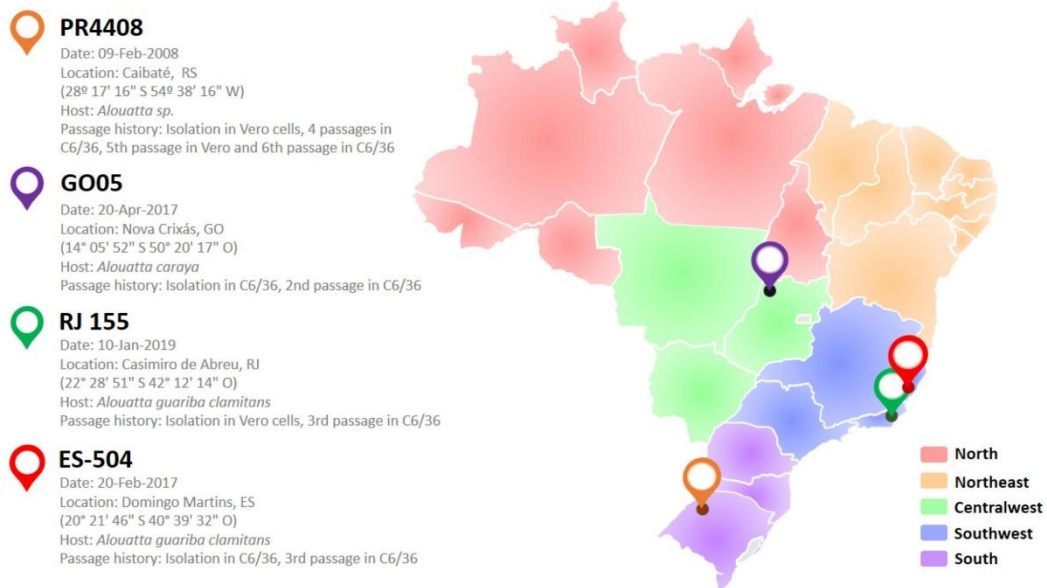
Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation	
	GO05	PR4408	ES-504	RJ 155			
CDS	9592	C	T	T	T	GCT - GCC	-
	9601	C	T	C	C	GGC - GGT	-
	9613	C	C	T	T	CTT - CTC	-
	9685	C	T	C	C	TCC - TCT	-
	9691	T	T	C	C	CTC - CTT	-
	9715	G	A	A	A	AAA - AAG	-
	9727	A	G	A	A	GAA - GAG	-
	9762	A	A	G	G	AGT - AAT	S - N
	9772	C	C	T	T	TTT - TTC	-
	9794	C	T	C	C	CTG - TTG	-
	9800	C	C	T	T	TTG - CTG	-
	9838	C	T	T	T	GAT - GAC	-
	9859	A	A	G	G	AGG - AGA	-
	9877	A	A	G	G	GGG - GGA	-
	9883	T	T	T	C	GGT - GGC	-
	10039	C	T	T	T	GTT - GTC	-
	10151	G	A	G	G	GAC - AAC	D - N
	10171	A	G	G	G	AAG - AAA	-

	Genome position	YFV 2000 - 2010		YFV 2016 - 2019		Codon change	Amino acid variation
		GO05	PR4408	ES-504	RJ 155		
CDS	10210	C	T	C	C	ACC - ACT	-
	10222	T	C	T	T	ACT - ACC	-
	10255	T	C	C	C	CGC - CGT	-
3'UTR	10374	C	T	T	T	-	-
	10488	G	G	A	G	-	-
	10544	T	T	C	C	-	-
	10559	C	T	T	T	-	-
	10612	T	C	C	C	-	-
	10709	C	T	T	T	-	-
	10750	T	C	C	C	-	-
	10751	T	T	C	C	-	-
	10764	G	A	A	A	-	-
	10883	C	C	T	T	-	-
	10990	C	T	C	C	-	-
	10993	A	C	A	A	-	-

	Variable sites	%
UTR	13	5.2%
CDS	Synonymous	211
	Non-synonymous	25
Total:	249	100%

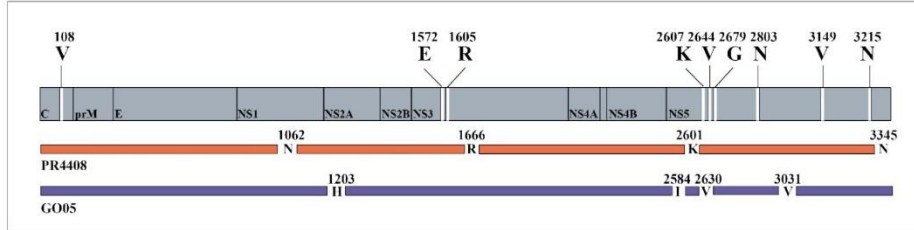
Supplementary Table 2 - Clinical assessment and determination of humane endpoint.

Observation	Score
Body weight	
Loss of 5-10%	1
Loss of 10-15%	2
Loss of 16-20%	3
Loss of 20% or more	EUTHANASIA
Fur	
Slightly ruffled	2
Evidently ruffled	3
Respiration	
Accelerated breathing (tachypnea)	1
Difficult breathing (dyspnea)	3
Clinical complications	
Tension during handling	1
Tremors, breath noises, aggression, vocalizations	3
Repetitive movements indicating neurological impairment	EUTHANASIA
Motility	
Abnormal walking and posture (slightly hunched, reduced activity)	1
Massively abnormal walking and posture (evidently hunched, moderately reduced activity)	2
Motility only after stimulation, isolation, lethargy	3
No activity for more than 24 hours	EUTHANASIA

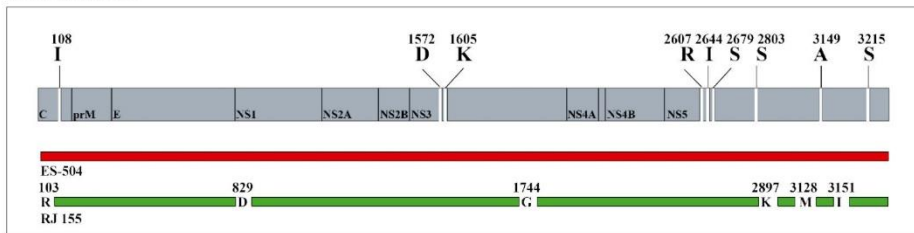


Supplementary Figure 1 - YFV isolates information. Geographic map of Brazil depicted by region. Information about the date of collection, host and cell passage history is described for each YFV isolate, and colored pins indicate their location.

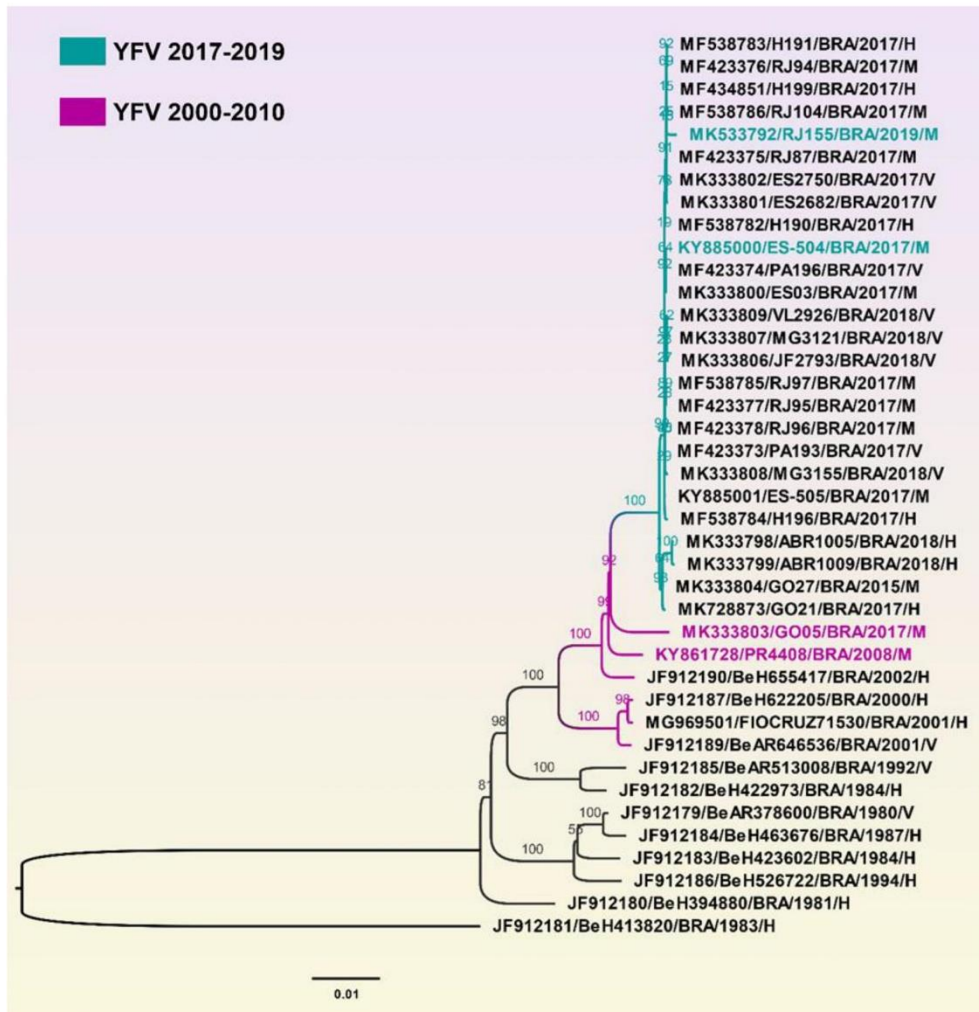
YFV 2000-2010



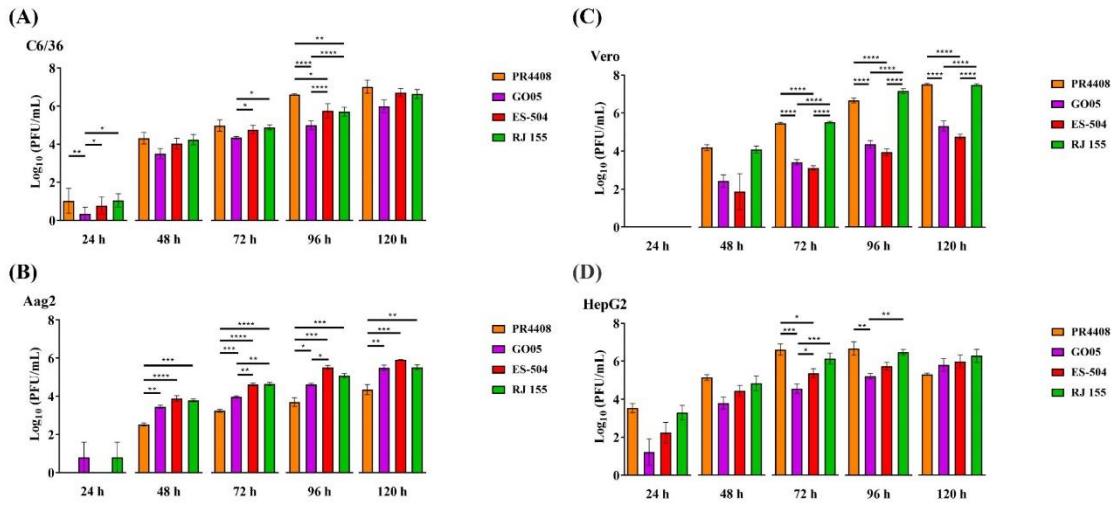
YFV 2016-2019



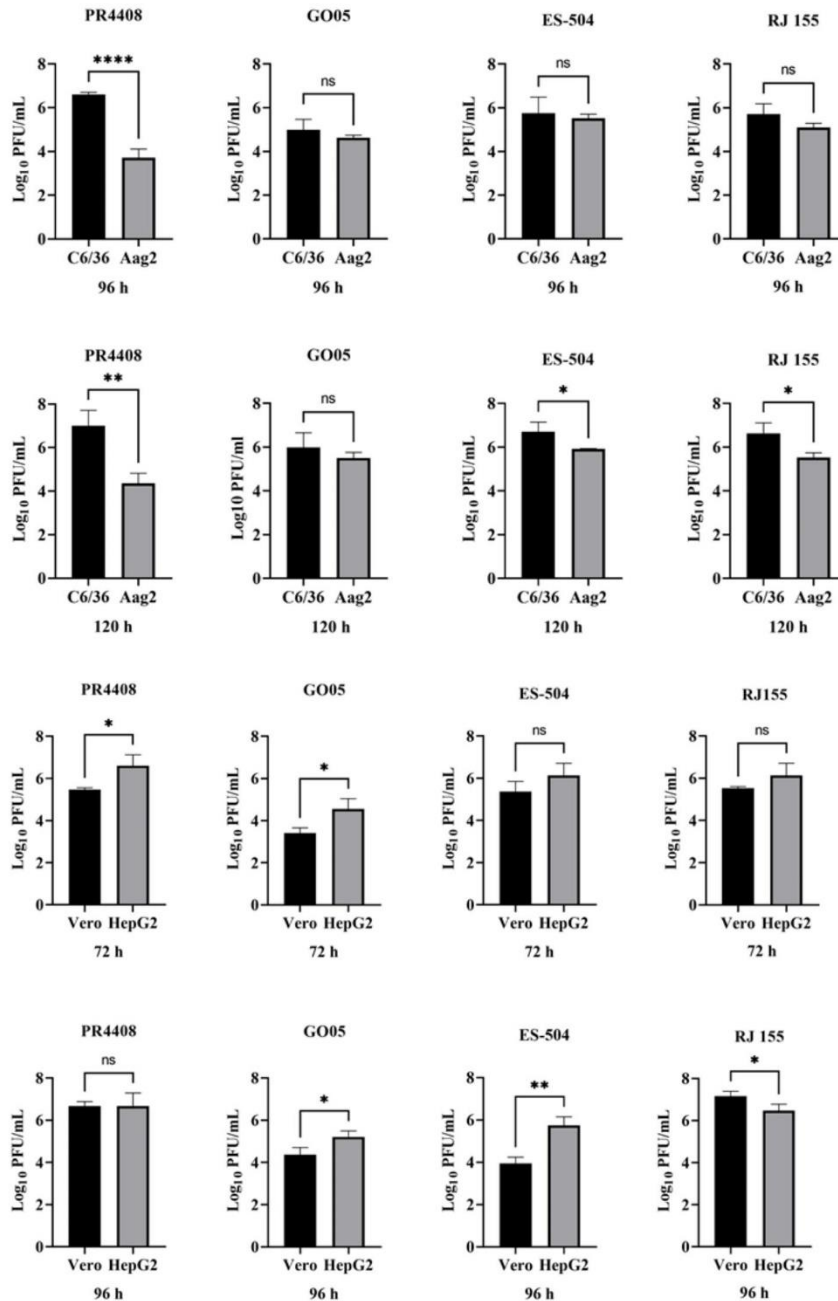
Supplementary Figure 2 - Schematic representation of the four isolates' genomic composition. The viral precursor polyprotein is represented by the rectangles, and the molecular signature that differentiates the groups is described for each group. The unique amino acid changes of each isolate are depicted in the respective representative rectangle.



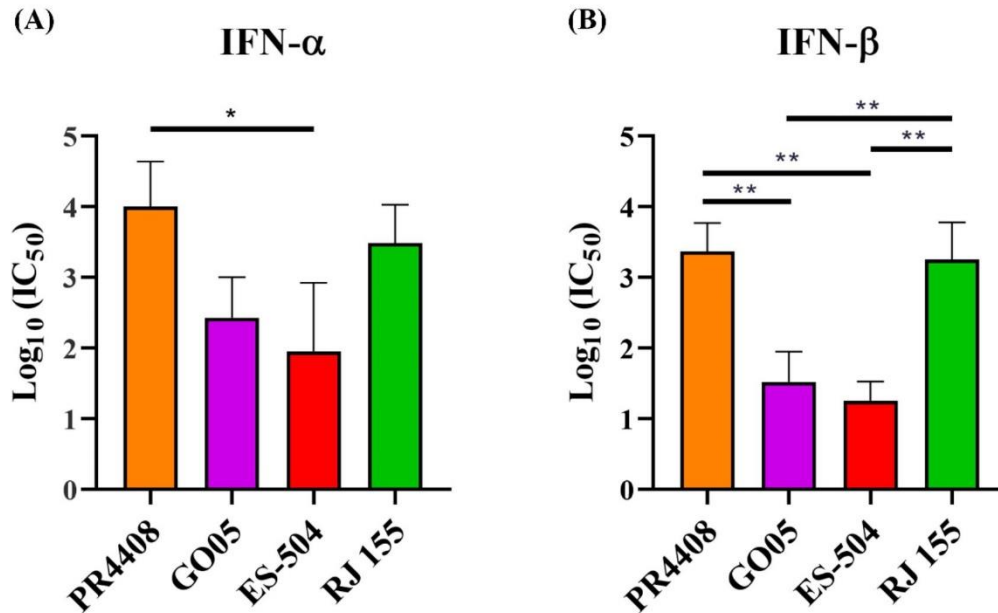
Supplementary Figure 3 - Phylogenetic analysis of Brazilian YFV complete genomes. YFV complete genome records were retrieved from GenBank database and aligned using AliView. The Maximum Likelihood analysis was carried out with 1000 bootstrap replicates. The sequences that carry the molecular signature of YFV 2016-2019 are depicted in green and the other sequences belonging to modern lineage 1E are depicted in purple (YFV 2000-2010).



Supplementary Figure 4 - Statistical analyses of viral growth over time in C6/36 cells (A), Aag2 (B), Vero (C) and HepG2 (D). Viral titers average of each YFV isolate were compared using One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test: * represents $P \leq 0.05$, ** represents $P \leq 0.01$, *** represents $P \leq 0.001$ and **** represents $P \leq 0.0001$.



Supplementary Figure 5 - Comparison of viral growth between the cell lines. Statistical analysis of viral growth peaks for each isolate in mosquito cells and mammal cells. Viral titers averages were compared using Unpaired t test: “ns” means not significant, * represents $P \leq 0.05$, ** represents $P \leq 0.01$ and **** represents $P \leq 0.0001$.



Supplementary Figure 6 - Statistical analysis of IC₅₀ values obtained from viral growth in the presence of type I interferon. The IC₅₀ values of each replicate were plotted in a column table and analyzed for statistical differences. The test applied was One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test: * represents $P \leq 0.05$ and ** represents $P \leq 0.01$.

4.2 **Artigo 2: Amino acid polymorphisms on the Brazilian strain of yellow fever virus methyltransferase are related to the host's immune evasion mediated by type I interferon**

Autores: Nathália Dias Furtado, Marta Pereira Santos, Iasmim Silva de Mello, André Schutzer Godoy, Gabriela Dias Noske, Glaucius Oliva, Bruno Canard, Etienne Décroly, Myrna C. Bonaldo. (2022).

Situação do manuscrito: Artigo submetido a revista *Viruses*.

Sinopse do trabalho:

Esse trabalho apresentou um estudo focado nos resíduos da assinatura molecular do YFV circulante localizados no domínio MTase da proteína NS5. Sintetizamos YFV baseado no genoma do isolado ES-504 por genética reversa, e inserimos mutações sítio-dirigidas nos resíduos I 2607 V, R 2644 K e S 2679 G da MTase, revertendo, dessa maneira, as substituições acumuladas do YFV circulante. Obtivemos, então, dois YFV sintéticos, o YFV_2017, com assinatura molecular, e YFV/MTase_2010, sem os marcadores no domínio MTase.

Portanto, nesse artigo, descrevemos a metodologia desempenhada para a obtenção de YFV sintético e o validamos como modelo de estudo de marcadores genéticos. Em seguida, avaliamos o fenótipo de infecção do vírus YFV/MTase_2010, em comparação ao YFV_2017. Observamos que o vírus sem os marcadores na MTase produz maiores placas de lise que o vírus selvagem. Entretanto, o YFV/MTase_2010 não apresenta cinética de replicação divergente do YFV_2017 em células Aag2 e HepG2. Ainda na caracterização *in vitro*, procedemos ao ensaio de inibição de replicação na presença de IFN-I e constatamos que o vírus YFV/MTase_2010 apresenta menor sensibilidade à resposta antiviral mediada por essa citocina. Por fim, complementamos o fenótipo de infectividade com experimentação animal de neurovirulência, onde não observamos diferença nos parâmetros avaliados entre os vírus. Assim, em termos de *fitness* viral, a única diferença observada foi relacionada a inibição de replicação na presença de IFN-I.

Adicionalmente, investigamos as possíveis diferenças estruturais. Inicialmente, utilizamos o sistema de vírus sintéticos para verificar diferenças na inibição da proliferação viral na presença de um análogo de SAM, Sinefungina, e não foi possível observar diferenças entre os vírus. Avaliamos a atividade enzimática de metilação em 2'O de RNA sintéticos $m^7GpppA(C)_5$. Constatamos que a MTase 2010 é mais fortemente inibida por análogos de SAM. Sendo assim, concluímos que pode existir uma alteração conformacional do sítio de ligação ao

SAM no vírus com assinatura molecular, porém essa não é suficiente para influenciar no *fitness* viral, no contexto do vírus inteiro. Portanto, sugerimos que a assinatura molecular do YFV circulante no domínio MTase está relacionada à um aumento de sensibilidade à resposta imune inata mediada por IFN-I.

4.2.1 Materiais e Métodos

4.2.1.1 Modelagem molecular comparativa

Para entendermos a disposição e o potencial impacto dos marcadores moleculares no domínio MTase da proteína NS5, modelamos o este domínio utilizando como protótipo o YFV isolado em 2017, ES-504 (GenBank: KY885000), usando o software Modeller versão 10.1 (171).

A busca por uma estrutura molde adequada para a modelagem comparativa foi realizada no servidor Swiss-model (172). A estrutura PDB do YFV vacinal complexada com S-adenosil-L-homocisteína (SAH; 3EVB) (173) foi empregada como modelo, compartilhando 94,32 % de identidade com a sequência YFV 2017. A estrutura molde e as sequências alvo foram alinhadas utilizando a função “align2d” do Modeller. Cem modelos foram obtidos usando a rotina “automodel” do Modeller. Cada modelo foi otimizado usando o método de função alvo variável (VTFM) para 300 iterações e dinâmica molecular (MD) em modo lento. Todo o ciclo foi repetido duas vezes para garantir a conformação otimizada do modelo gerado.

As estruturas modeladas resultantes foram classificadas de acordo com sua pontuação de energia proteica otimizada discreta (*DOPE score*), obtida no final do processo de modelagem molecular. A proteína modelada foi ainda avaliada pelo servidor SAVES v.6, utilizando as ferramentas PROCHECK para analisar o gráfico de Ramachandran, e ProSA para verificar a qualidade geral do modelo por meio do z-score (174, 175). O PyMOL Molecular Graphics System, Versão 2.0 Schrödinger, LLC, foi usado para visualização da estrutura.

4.2.1.2 Extração de RNA e RT-PCR

A obtenção do cDNA viral, a confirmação da integridade das sequências trabalhadas e da presença das mutações inseridas no domínio MTase foi realizada pela extração de RNA viral, amplificação por *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) e sequenciamento. A análise das sequências tem o objetivo de correlacionar as mutações com o aparecimento de CPE.

O RNA viral foi extraído a partir de 140 µL de suspensão viral, segundo o protocolo do “QIAamp Viral RNA Mini Kit” (Qiagen). O RNA foi eluído em 60 µL de AVE (Qiagen) e estocado a -80 °C em alíquotas de 20 µL para evitar repetidos ciclos de congelamento-descongelamento e consequente degradação do RNA.

A obtenção de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific) e com os iniciadores randômicos fornecidos no kit da transcriptase reversa. O cDNA foi amplificado segundo as reações na tabela 1. Os fragmentos amplificados

foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados para posterior sequenciamento na Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA-RPT01A – Rede de Plataformas Tecnológicas (FIOCRUZ). Confirmamos a presença das mutações por análise das sequências geradas com o software SeqMan da suíte Lasergene 11 (DNASTAR). A mesma metodologia de RT-PCR foi utilizada para detecção de RNA viral em monocamada de células C6/36 transfectadas com o construto que não induziu efeito citopático.

Tabela 1 - Reações de RT-PCR

A)

Reagentes	Volume (µL)	Condições da reação
RNA	10	65°C por 5 minutos seguidos de 1 minuto de incubação em gelo úmido.
Iniciadores randomicos	1	
dNTP	1	
Água livre de RNase	1	
Volume final	13	

B)

Reagentes	Volume (µL)	Condições da reação	
		Temperatura	Tempo
5X First-Strand Buffer	4		
0.1 DTT	1	25°C	10'
RNase Inhibitor	1	55°C	10'
SuperScript III	1	70°C	10'
Volume Final	7	4°C	∞

C)

Reagentes	Volume (µL)	Condições de ciclagem da reação		
		Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
GoTaq Master Mix Green	12,5			
Iniciador +	0,5	95°C	5'	1
Iniciador -	0,5	95°C	40''	
Água livre de RNase	10,5	TM específica	40''	30
cDNA	1	72°C	1 min/kb	
Volume final	25	72°C	10'	1
		4°C	∞	

4.2.1.3 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico foi realizado com os produtos das reações de PCR previamente analisados por eletroforese, que foram purificados utilizando-se o “QIAquick PCR Purification Kit” (Qiagen). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 poços e a leitura foi realizada pela plataforma multiusuário de sequenciamento de DNA-RPT01A. As sequências obtidas foram analisadas no programa “SeqMan” (DNASar Lasergene 8), e alinhadas com as sequências de referência desenhadas previamente.

4.2.1.4 Cultura de células

As células que foram utilizadas neste estudo são de linhagem epitelial de rim de macaco verde (Vero), de homogenato de larvas de mosquitos *Aedes albopictus* (C6/36) e *Aedes aegypti* (Aag2), e de hepatoma humano (HepG2). As células Vero foram cultivadas em meio de cultura Earle’s 199 suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB; Cutilab), 0,25 % de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich) e 40 mg/mL de gentamicina (Gibco). As células HepG2 foram mantidas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10 % de SFB e 0,1 % de aminoácidos não essenciais (NEAA; Gibco). Ambas as linhagens celulares foram cultivadas em estufa de atmosfera úmida com 5 % de CO₂, a 37 °C.

As células C6/36 foram cultivadas em meio de cultura Leibovitz’s L-15 (Sigma) suplementado com 5% de SFB, 10 % de caldo triptose (Gibco) e 40 mg/mL de gentamicina. As células Aag2 foram mantidas em meio Schneider’s Insect Medium (Gibco) suplementado com 10 % de SFB e 1 % de coquetel Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Essas células foram mantidas em estufa a 28 °C, em frascos totalmente vedados.

4.2.1.5 Titulação por ensaio de placas

A titulação por ensaio de placas é uma técnica utilizada para quantificar partículas virais infecciosas e consiste na quantificação de placas de lise formadas por partículas virais a partir de uma diluição seriada das suspensões virais de interesse.

As células Vero foram semeadas em placas de 24 poços, com densidade de 50.000 células/cm² em meio Earle’s 199 suplementado, e mantidas na estufa de atmosfera úmida com 5 % de CO₂, a 37 °C no dia anterior a infecção com as suspensões virais. A partir de 100 µL da suspensão viral, foram realizadas diluições seriadas com fator de diluição de 10. O meio da cultura de células foi retirado e 100 µL de suspensão de cada diluição foram aplicados ao

respectivo poço com monocamada celular semi-confluyente. As células permaneceram na estufa a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por uma hora, com agitação a cada 15 minutos, para a adsorção viral. Em seguida, os inóculos virais foram retirados e a monocamada foi coberta com 1 mL de meio Earle's 199 suplementado contendo 2,4 % de carboximetilcelulose (CMC). Após 7 dias de incubação, as células foram fixadas com formaldeído 10 % durante 24 horas, e coradas com cristal violeta 0,04 %. O título viral foi determinado pela contagem de placas de lise e ajuste dos fatores de diluição. Os títulos dos estoques virais de segunda passagem (2P) e dos sobrenadantes coletados para a cinética de replicação foram obtidos através desta metodologia.

4.2.1.6 Síntese de clone infeccioso derivado do cDNA do YFV

A metodologia empregada neste estudo foi baseada na estratégia desenvolvida para o clone infeccioso do vírus Zika Rio-U1 (176). O cDNA foi derivado do isolado de YFV ES-504 (GenBank: KY885000). Este YFV foi isolado de um primata não humano pertencente à espécie *Alouatta guariba clamitans* no estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil, em fevereiro de 2017. O cDNA foi previamente obtido por RT-PCR e sequenciado, conforme a metodologia descrita acima (72, 73).

Amplificamos o cDNA do YFV ES-504 para obter quatro fragmentos cobrindo todo o genoma e apresentando regiões sobrepostas. Os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores empregados para a obtenção dos 4 fragmentos de cDNA viral estão listados na Tabela 2. Os oligonucleotídeos para a amplificação dos fragmentos 2, 3 e 4 foram usados para inserir mutações silenciosas criando os sítios de restrição Mlu I, Kpn I e Spe I, permitindo a clonagem direcional em vetores plasmidiais. Na extremidade 5' do fragmento 1, fusionamos a sequência promotora de transcrição do bacteriófago SP6 para a etapa de transcrição *in vitro*, também adicionando um sítio de restrição Not I. O sítio de restrição EcoRI natural delimita a extremidade 3' do fragmento 1 e a extremidade 5' do fragmento 2.

Os vetores plasmidiais usados para clonar todos os quatro fragmentos foram derivados de pBR322 e pCC1-4K. Inicialmente, tentamos clonar os fragmentos em pBR322, um vetor de baixo número de cópias, modificado pela inserção de um sítio de clonagem múltipla personalizado (MCS) carregando os sítios de restrição Not I, Nde I, Cla I, BssHII, EcoRI, Mlu I, Aat II, Kpn I, Nar I, ApaLI, Spe I e Xho I. Os fragmentos 1 e 3 foram clonados em *Escherichia coli* cepa *Sure*. Por outro lado, os fragmentos 2 e 4, contendo a porção do genoma que expressa sequências promotoras crípticas ativas e a extremidade 3' do genoma, respectivamente, foram instáveis neste vetor. Assim, usamos o vetor de cópia única pCC1-4K (GenScript) para clonar esses dois fragmentos, igualmente modificado para conter um MCS com as enzimas Not I, Nde

I, Cla I, BssHIII, EcoRI, Mlu I, Aat II, Kpn I, Nar I, ApaLI, Spe I e Nsi I. As construções de plasmídeo foram propagadas com sucesso em *E. coli* da cepa Epi300 (kit Transformax, Epicentre). As sequências do MCS de ambos os vetores plasmídicos estão listadas na Tabela 1. No final, obtivemos os seguintes plasmídeos: pBR322/1, pBR322/3, pCC1/2 e pCC1/4.

A estratégia de montagem do genoma adotada neste trabalho é baseada no sistema de dois plasmídeos, onde um plasmídeo carrega as extremidades do genoma e outro plasmídeo, a parte central do cDNA. Por causa da instabilidade dos fragmentos 2 e 4, usamos o pCC1-4K para vetorizar estas regiões do genoma. Para isso, excisamos o fragmento 1 digerindo com as enzimas de restrição Not I e EcoRI (Promega) e ligamos no plasmídeo pCC1/4 digerido com os mesmos sítios de restrição, utilizando T4 DNA Ligase (New England Biolabs). Da mesma forma, os plasmídeos pBR322/3 e pCC1/2 foram digeridos com Mlu I e Kpn I (Promega) para excisar o fragmento 3 e cloná-lo no plasmídeo pCC1/2. Ambos os plasmídeos foram propagados em *E. coli* Epi300, recuperando os plasmídeos finais pCC1/1.4 e pCC1/2.3.

O cDNA molde do genoma foi montado por ligação *in vitro* do fragmento 2.3 com o plasmídeo pCC1/1.4. Primeiro, o fragmento 2.3 e todo o plasmídeo pCC1/1.4 foram amplificados usando os conjuntos de oligonucleotídeos 1 e 2, listados na Tabela 2. Ambos os amplicons foram digeridos com EcoRI e Kpn I (Promega) e ligados com T4 DNA Ligase (New England Biolabs). O produto da ligação foi amplificado com o conjunto de oligonucleotídeos 3 (Tabela 2) e posteriormente transcrito *in vitro* com SP6 RNA Polimerase, utilizando o kit de transcrição mMMESSAGE mMACHINE SP6 (Ambion).

Por fim, o RNA transcrito foi eletroporado em células C6/36 em cubetas de 0,2 mm com 2 pulsos de 400 volts, capacitância de 25 μ f e resistência de 800 Ω . As células transfectadas foram recuperadas em meio Leibovitz's L-15 suplementado e foram incubadas a 28 °C por 7 dias. No sétimo dia pós-transfecção, o sobrenadante celular foi coletado e utilizado para detectar o genoma viral por RT-PCR.

Os estoques de suspensão viral utilizados neste estudo foram obtidos a partir da infecção de células C6/36, previamente semeadas a 80.000 células/cm² em frascos T-75, com 3 mL de sobrenadante celular coletado após a transfecção. Após 5 dias de incubação a 28 °C, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 4 °C, 700 x g por 10 minutos, filtrado com filtro de seringa de 0,22 μ m e armazenado a -80°C. O RNA de estoques virais foi extraído usando o kit QIAmp Mini Viral RNA (Qiagen) e sequenciado.

Para obter YFV derivado de clone infeccioso modificado no domínio NS5 MTase, inserimos 3 mutações, uma a uma, no plasmídeo pCC1/1.4 usando o kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). Os oligonucleotídeos utilizados para a reação de mutagênese estão listados na Tabela 2. As mutações consistiram na

substituições dos códons AGG (7944..7946), ATA (8056..8058) e AGC (8161..8163) por AAG, GTG e GGC, gerando as substituições de aminoácidos NS5 R101K, I138V e S173G, respectivamente. O plasmídeo mutante pCC1/1.4/MTase foi transformado em *E. coli* Epi300 e substituiu o pCC1/1.4 na metodologia de clone infeccioso descrita acima para recuperar o YFV mutado, referido como YFV/MTase_2010. Todas as etapas de clonagem de cDNA e recuperação viral foram confirmadas por sequenciamento genômico.

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na metodologia do clone infeccioso e mutagênese sítio-dirigida

	Oligonucleotídeo iniciador senso		Oligonucleotídeo iniciador reverso		Finalidade
	Identificação	Sequência (5' --> 3')	Identificação	Sequência (5' --> 3')	
Etapas de clonagem	1(+)	CGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGT TTCGC	1(-)	CCAAATGTGTTTATTGCCTAGCAACTC GATTTGCAGACC	Fusionar o promotor de transcrição SP6 ao fragmento 1
	ICYFSP6	ATTTAGGTGACACTATAGAGTAAATCCTG TGTGCTAATTGAGGTGCATTGG	2.1(-)	TTGACCTCGGCATGAACATGTCACTCT CTTCOA	Obter o fragmento 1
	3(+)	GAATGGAAGCTTCATCATCGATGGGAAG TCCAGGAAA	3(-)	GAGAAAGGCCCCACGCGTGACGTGC	Obter o fragmento 2
	4(+)	GCACGTCACGCGTGGGGCCTTTCTC	4(-)	TCTCAATTTTGCGGTACCTCTCGAGAC GGCC	Obter o fragmento 3
	5(+)	GGCCGTCTCGAGAGGTACCGCAAATG AGA	5(-)	GAGCCAGACGGACTAGTGGTTTTGTGT TTGTCATCC	Obter o fragmento 4
	MCS2(+) pCC1-4K	GGCCGCCATATGATCGATGCGCGCAATT CACGCGTGACGTCCGTACCGGCGCCGTG CACACTAGTATGCA	MCS2(-) pCC1-4K	TACTAGTGTGCACGGCGCCGGTACCG ACGTCACGCGTGAATTCGCGCGCATC GATCATATGGC	Sítio múltiplo de clonagem inserido no pCC1-4K
	MCS3(+) pBR322	GGCCGCCATATGATCGATGCGCGCAATT CACGCGTGACGTCCGTACCGGCGCCGTG CACACTAGTC	MCS3(-) pBR322	TCGAGACTAGTGTGCACGGCGCCGGT ACCGACGTCACGCGTGAATTCGCGCG CATCGATCATATGGC	Sítio múltiplo de clonagem inserido no pBR322
Regeneração de vírus a partir do cDNA infeccioso	Mlu(+)	TTCACGCGTGACGTCCGTACCGCAAATTT G	Mlu(-)	ACGCGTGAATTCACACTCTGTTTGGAG AAC	Conjunto de iniciadores 1 – amplificação do plasmídeo pCC1+1.4
	2.3(+)	CGCGCGAATTCCTTCCAGATAGAAGAGTT T	2.3(-)	TTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACG ACG	Conjunto de iniciadores 2 – amplificação do fragmento 2.3
	ICYFSP6	ATTTAGGTGACACTATAGAGTAAATCCTG TGTGCTAATTGAGGTGCATTGG	YFmelt65Rnew	AGTGGTTTTGTGTTTTTCGTCCAAAGG TCTGCTTATTCTTGAGC	Conjunto de iniciadores 3 – amplificação do cDNA molde viral
Mutagênese sítio-dirigida	NS5_R101K(+)	GAGAAGTGAGTGGGGTCAAGGGATTCAC CCTT	NS5_R101K(-)	AAGGGTGAATCCCTTGACCCCACTCAC TTCTC	Mutagênese na posição 101 da proteína NS5
	NS5_I138V(+)	CCATCGCCTTGAGCCGGTAAAGTGTGATA CCCT	NS5_I138V(-)	AGGGTATCACACTTTACCGGCTCAAG GCGATGG	Mutagênese na posição 138 da proteína NS5
	NS5_S173G(+)	CTGTTGAGAAATGGTTGGGCTGTGGTGTG TAAAGC	NS5_S173G(-)	GCTTTCAACACCACAGCCCAACCATTT CTCAACAG	Mutagênese na posição 173 da proteína NS5

4.2.1.7 Fenótipo de placas de lise

As células Vero foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 40.000 células/cm², aproximadamente 24 h antes da infecção. Para cada vírus, três inóculos foram preparados com meio Earle's 199 suplementado contendo 10 PFU, 20 PFU e 40 PFU em 0,2 mL de suspensão viral. O sobrenadante da cultura foi completamente removido e 200 µL de inóculo viral foram adicionados à monocamada de células. Após 1 h de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂ com agitação a cada 10 minutos, os inóculos foram descartados e as células foram cobertas com 3 mL de meio Earle's 199 suplementado contendo 0,5 % de agarose (Invitrogen). As células então retornaram à incubadora a 37 °C e 5 % de CO₂ por 7 dias, após os quais, as células foram fixadas com 5 mL de formaldeído a 10 % durante a noite e coradas com cristal violeta a 0,4 %. As imagens das placas foram adquiridas e foram analisadas usando o software ImageJ para medir as áreas da placa. Os resultados foram plotados em gráficos e analisados estatisticamente usando o software GraphPad Prism 8. Os testes estatísticos empregados foram Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn.

4.2.1.8 Cinética de replicação viral

Utilizamos células Vero, HepG2, C6/36 e Aag2 em nosso estudo. As células Vero foram cultivadas a uma densidade celular de 40.000 células/cm² em meio Earle's 199 suplementado e as células HepG2 foram semeadas a 60.000 células/cm² em DMEM suplementado. Ambas as linhagens celulares foram mantidas a 37 °C, com 5 % de CO₂ e atmosfera úmida. As células C6/36 e Aag2 foram cultivadas a 80.000 células/cm² em meio Leibovitz's L-15 e meio Schneider's Insect Medium suplementados e foram incubadas a 28°C.

As células foram semeadas em frascos T-25 com as respectivas densidades, 24 horas antes da infecção. Os vírus foram diluídos em meio apropriado para infectar as células com MOI de 0,02 em um volume final de 0,5 mL. O meio celular foi descartado e os inóculos foram adsorvidos na monocamada de células por 1 hora. Em seguida, a suspensão viral foi descartada, o meio celular apropriado foi adicionado à monocamada e as células foram incubadas por 5 dias. Uma alíquota do sobrenadante celular foi coletada a cada 24 horas e titulada por ensaio de placa. Os títulos virais foram transformados em log₁₀ e plotados em um gráfico de dispersão para análise. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.

4.2.1.9 Replicação viral na presença de interferon do tipo I (IFN-I)

As células Vero foram cultivadas em placas de 24 poços com densidade de 50.000 células/cm². No dia seguinte, as células foram tratadas com interferon (IFN) alfa (α; PBL Assay Science) e beta (β; R&D Systems) nas concentrações de 10 UI/mL, 50 UI/mL, 100 UI/mL e

1000 UI/mL por 6 horas antes da infecção. O sobrenadante celular foi removido e 100 µL de suspensões virais foram adicionados a MOI de 0,5. Após 1 h de incubação com agitação suave a cada 15 minutos, os inóculos virais foram descartados e as células foram cobertas com 0,3 mL de meio de Earle 199 suplementado, também contendo as quatro diferentes concentrações de IFN. Após 48h de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂, os sobrenadantes foram coletados para titulação viral por ensaio de placa.

Os títulos virais sob tratamento com IFN- α e IFN- β foram transformados em log₁₀ e foram normalizados com os valores obtidos de células infectadas não tratadas. Este experimento foi realizado em três ensaios independentes para relevância estatística. Os dados foram analisados no software GraphPad Prism 8. Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir da função de regressão não linear fornecida pelo software (*[Inhibitor] vs. normalized response – Variable slope*). Os valores de IC₅₀ de cada réplica foram analisados por One-Way ANOVA com o teste de comparação múltipla de Bonferroni.

4.2.1.10 Inibição viral por Sinefungina

Antes dos ensaios de inibição viral, as células HepG2 foram testadas quanto à viabilidade celular na presença de concentrações variando de 5 a 0,00032 µM de Sinefungina (Sigma-Aldrich). Portanto, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 10.000 células/poço 24 horas antes do tratamento com Sinefungina. O meio de cultura celular foi descartado e 90 µL de meio DMEM suplementado com concentrações diluídas em série de 5 vezes de Sinefungina foram adicionados às células. O tratamento foi realizado por 42 horas em incubadora apropriada, em seguida foram adicionados 10 µL de PrestoBlue Reagent (Thermo Fisher Scientific) a cada poço com células tratadas e não tratadas. As células foram incubadas por 30 minutos e então os valores de absorvância de cada poço foram obtidos a 570 nm normalizados a 600 nm de comprimento de onda usando VersaMAX Microplate Reader (Molecular Devices).

Um dia antes da infecção viral, células HepG2 foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 60.000 células/poço. Os vírus YFV_2017 e YFV/MTase_2010 foram diluídos para infectar células em MOI 0,1. O sobrenadante celular foi descartado e 50 µL das suspensões virais foram adicionados à monocamada, bem como 50 µL de meio DMEM suplementado com 4, 3, 1, 0,6, 0,12, 0,24 e 0 µM de Sinefungina. A adsorção ocorreu durante 1 hora de incubação a 37°C, com atmosfera úmida e 5 % de CO₂ com agitação a cada 15 minutos. Após esta etapa, 400 µL de meio DMEM suplementado com as concentrações correspondentes de Sinefungina foram adicionados a cada poço. Os sobrenadantes celulares foram coletados após 42 horas de incubação a 37 °C, com atmosfera úmida e 5 % de CO₂. A

quantificação das partículas virais foi realizada por titulação em ensaio de placa e os títulos virais foram usados para calcular os valores de IC₅₀ no software GraphPad Prism 8 com o algoritmo de ajuste de regressão não linear [*Inhibitor*] vs. *normalized response – Variable slope*. Este experimento foi realizado em 4 réplicas, e os valores de IC₅₀ obtidos em cada réplica foram analisados pelo teste T não pareado também no GraphPad Prism 8.

4.2.1.11 Neurovirulência em camundongos da linhagem BALB/c

Camundongos BALB/c foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo (UNICAMP). A experimentação animal foi realizada em estrita conformidade com o Guia do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos empregados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC; licença L-034/2019).

Grupos de 4 camundongos BALB/c jovens adultos (6 semanas de idade) foram inoculados intracerebralmente com 10³ PFU em um volume final de 30 µL de cada vírus. Camundongos não infectados do grupo Mock foram inoculados com o meio diluente em que os inóculos virais foram preparados (meio Earle's 199 suplementado com 25 mM de HEPES e 0,025 % de bicarbonato de sódio). Os camundongos foram anestesiados com Cetamina/Xilazina na dose de 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, administradas por via intraperitoneal antes da inoculação intracerebral.

Os animais foram monitorados diariamente por 16 dias com avaliação dos sinais clínicos e aferição do peso. As pontuações clínicas foram estabelecidas para determinar o *endpoint* humano para a eutanásia de camundongos, conforme descrito na Tabela 3. Os sinais clínicos avaliados incluíram o percentual de perda de peso corporal, pelos eriçados, postura encurvada, baixa mobilidade, paralisia de membros posteriores, agressividade e distúrbios respiratórios. A eutanásia foi realizada com administração intraperitoneal de três vezes a dose previamente utilizada de Cetamina/Xilazina, seguida de deslocamento cervical. Esta experimentação foi reproduzida em quadruplicata, totalizando 16 animais infectados com cada amostra viral. Tempo médio de sobrevivência (TMS), porcentagem de mortalidade, escores clínicos e perda de peso corporal foram calculados e analisados no software GraphPad Prism 8. A análise estatística das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier foi realizada pelo teste log-rank (Mantel-Cox).

Tabela 3 - Avaliação de escores clínicos e determinação do *endpoint* humanitário.

Observação	Escore
Peso corporal	
Perda de 5-10%	1
Perda de 10-15%	2
Perda de 16-20%	3
Perda de 20% ou mais	EUTANÁSIA
Aspecto do pelo	
Levemente eriçado	2
Evidentemente eriçado	3
Respiração	
Respiração acelerada (taquipneia)	1
Respiração com dificuldade (dispneia)	3
Complicações clínicas	
Tensão durante manuseio	1
Tremores, ruídos para respirar, agressão, vocalizações	3
Movimentos repetitivos indicando dano neurológico	EUTANÁSIA
Mobilidade	
Marcha e postura anormais (levemente encurvados, atividade reduzida)	1
Marcha e postura altamente anormais (evidentemente encurvados, atividade moderadamente reduzida)	2
Mobilidade somente após estímulo, isolamento, letargia	3
Nenhuma atividade por mais de 24 horas	EUTANÁSIA

4.2.1.12 Expressão e purificação da proteína MTase

Para os estudos de expressão e funcionais, a sequência correspondente ao domínio metiltransferase de YFV NS5 (aminoácidos 1-270) foi amplificada utilizando oligonucleotídeos específicos com Phusion DNA Polimerase e reagentes (Thermo Fisher Scientific). O amplicon foi obtido a partir do isolado ES-504 (GenBank: KY885000) e depois clonado no vetor plasmídico pETM-11/LIC com uma cauda His6-tag no N-terminal. O plasmídeo vetor foi modificado com a deleção da sequência conectora e do sítio de clivagem de TEV entre a cauda His6-tag e o domínio MTase por PCR com a Phusion DNA Polimerase. A variante que carrega os marcadores moleculares do YFV 2010 (R101K, I138V e S173G) foi obtida por meio de mutagênese sítio-dirigida utilizando o kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange II XL (Agilent). Os primers de amplificação e mutagênese estão listados na Tabela 2.

Os domínios MTase de tipo selvagem e mutante foram expressos em *E. coli* C2566 pRARE2 (NEB). As bactérias foram cultivadas em Terrific Broth a 37°C até a densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) atingir 0,6. A expressão da proteína foi induzida por 1 mM de IPTG

(isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e 2% de etanol a 17°C durante a noite. As células foram então recuperadas por centrifugação de alta velocidade. Os *pellets* bacterianos de uma cultura de 1 litro foram ressuspensos em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM [pH 8], NaCl 300 mM, glicerol 10%, mercaptoetanol 1 mM, lisozima 0,25 mg/mL, DNase 10 μ g/mL, 1 mM PMSF, 1 mL/10 mL BugBuster Protein Extraction Reagent [Novagen]). Após 30 minutos de incubação a 4°C, as células foram sonicadas e clarificadas por centrifugação. O sobrenadante foi passado através de uma resina Sepharose (Chelating Sepharose Fast Flow IMAC [GE]) com níquel imobilizado para purificação por cromatografia de afinidade metálica (IMAC). A eluição foi feita em Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM, imidazol 250 mM e glicerol a 10%.

Após purificação, o tampão foi trocado por diálise para um tampão final composto por 10 mM de HEPES-NaOH (pH 7,5), 500 mM de NaCl, 5% de glicerol e 1 mM de DTT (ditiotreitól). A proteína purificada foi então analisada em gel desnaturante de acrilamida 12,5%. As proteínas foram concentradas e armazenadas a -80°C após adição de glicerol até uma concentração final de 50%.

4.2.1.13 Ensaio de deslocamento térmico

As proteínas MTase purificadas foram diluídas para a concentração de 0,5 mg/mL em 25 μ L de tampão de armazenamento de proteína. SYPRO Orange Fluorescent Dye (Bio-Rad) foi diluído 500 vezes em tampão. Em seguida, a reação foi preparada com 21,5 μ L de proteína diluída e 3,5 μ L de corante diluído. O termociclador (Bio-Rad TFX8016) executou uma reação com as seguintes configurações: uma retenção inicial de 2 minutos a 25 °C, aumentando em incrementos de 1 °C até uma temperatura final de 95 °C, com uma retenção de 2 minutos.

4.2.1.14 Ensaio de atividade da MTase

Os ensaios enzimáticos foram realizados em Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), DTT 1 mM, [3H]SAM 0,1 μ M (PerkinElmer) e 1,9 μ M de SAM na presença de RNA sintético 0,7 μ M com m7GpppAC5. Os domínios MTase purificados foram adicionados a uma concentração final de 0,1 μ M. Para determinar os parâmetros enzimáticos, as concentrações de SAM e RNA variaram em uma faixa de 0 a 3 μ M, conforme indicado na legenda da Figura 8. Os ensaios de competição de MTase ocorreram em condições semelhantes às descritas acima, exceto para a concentração final de YFV MTase nas reações que foi de 0,5 μ M.

As misturas de reação foram incubadas a 30 °C e paradas após 30 min por uma diluição de 10 vezes da mistura de reação em água gelada Milli-Q. As amostras foram então transferidas para filtros de celulose DEAE (PerkinElmer) usando Filtermat Harvester (Packard Instruments). Antes de uma etapa final de secagem, o [3H]SAM não incorporado foi lavado

dos filtros DEAE com fumarato de amônio 10 mM (pH 8,0), com H₂O e com etanol absoluto. Por fim, os filtros foram colocados em sacos plásticos com fluido de cintilação BetaplateScint (Wallac) e selados. Os grupos [3H]metil transferidos para substratos de RNA foram quantificados em contagens por minuto usando um contador de cintilação líquida Wallac 1450 MicroBetaTriLux. Os valores de IC₅₀ de análogos de SAH, sinefungina e cap foram determinados com o software GraphPad Prism 8 usando a equação *log (inhibitor) versus response – Variable slope*.

4.2.2 Resultados

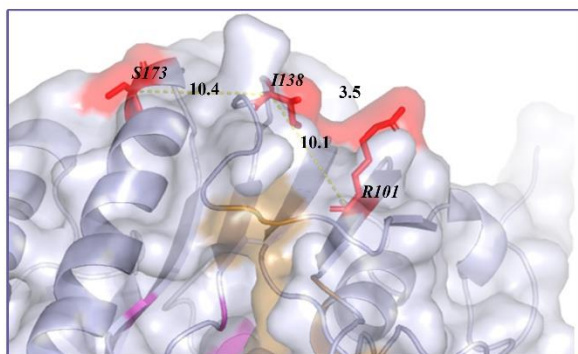
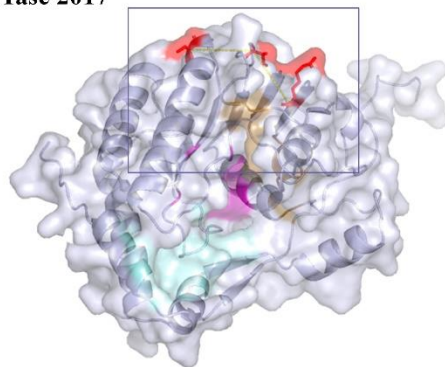
4.2.2.1 Análise tridimensional dos marcadores moleculares na MTase

Um estudo anterior sobre o YFV circulante 2016-2019 explorou pela primeira vez a assinatura molecular em análises computacionais da estrutura tridimensional das proteínas virais NS3 e NS5 (73). Aqui, reproduzimos a metodologia de modelagem comparativa, focando exclusivamente no domínio MTase, para revisar a localização estrutural e potencial influência dos três resíduos característicos do YFV 2016-2019, que causaram o surto no Sudeste do Brasil. Assim, modelamos o domínio MTase da proteína YFV 2016-2017 NS5 por homologia, utilizando a estrutura cristalográfica da YFV 17D MTase (PDB: 3EVB), compartilhando 94,32% de identidade e 100% de cobertura, estrutura molde.

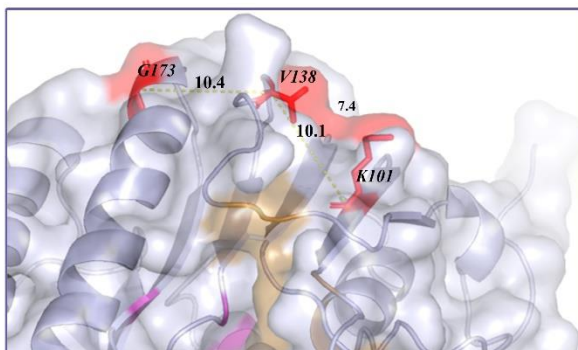
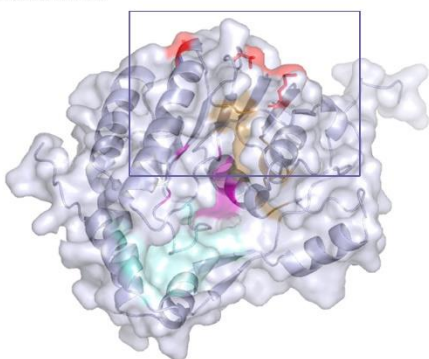
A assinatura molecular YFV 2016-2019 na MTase consiste nos resíduos R, I e S nas posições 101, 138 e 173 da proteína NS5, respectivamente. Esses resíduos são adjacentes com distâncias entre os C α de aproximadamente 10 Å entre os aminoácidos 101 e 138, e 138 e 173. Esses aminoácidos não estão diretamente envolvidos na ligação ou interações catalíticas; no entanto, eles estão mais próximos do sítio de ligação do doador de metila (SAM) (Figura 3.1).

Também utilizamos o software PyMOL para inserir as três alterações de aminoácidos na estrutura, revertendo esses resíduos para os correspondentes no YFV circulante entre 2000-2010, aqui denominada como MTase 2010. As substituições foram de arginina (R) para lisina (K) na posição 101, isoleucina (I) para valina (V) na posição 138, e serina (S) para glicina (G) na posição 173. Todas as mudanças de resíduos são conservadoras e têm pouco impacto na estrutura tridimensional da MTase. Ressalta-se que os resíduos de MTase 2010 foram substituídos por resíduos com cadeias laterais mais longas. Por exemplo, o resíduo de arginina na posição 101 da MTase 2017 possui um grupo amino adicional na cadeia lateral, em relação ao aminoácido de lisina presente na MTase 2010. Além disso, o resíduo de isoleucina na posição 138 da MTase 2017 tem um grupamento metila adicional em relação a cadeia lateral da valina na MTase 2010. As cadeias laterais mais longas podem potencialmente reduzir a distância entre os aminoácidos 101 e 138, perturbando o sítio de ligação ao SAM (Figura 3.1).

MTase 2017



MTase 2010



● Sítio de ligação ao GTP ● Sítio de ligação ao SAM ● Sítio catalítico ● Marcadores moleculares

Figura 4.1 - Localização dos marcadores moleculares do YFV 2016-2019 no domínio NS5 MTase.

O domínio MTase da proteína NS5 foi modelado por homologia com base na sequência do YFV selvagem isolado ES-504 (GenBank: KY885000) e nos dados cristalográficos da MTase do YFV 17D (PDB: 3EVB), gerando o modelo MTase 2017. As mutações foram inseridas utilizando o PyMOL, gerando o modelo MTase 2010. Os modelos são representados no desenho com suas respectivas superfícies moleculares. Os sítios de ligação a GTP (azul) e a SAM (amarelo) estão destacados, assim como o sítio catalítico (roxo) responsável pelas reações de transferência de metila (metiltransferase) e os resíduos que compõem a assinatura molecular do YFV 2016-2019 (vermelho).

4.2.2.2 Regeneração de YFV derivados do clone infeccioso

Obtivemos vírus infecciosos usando a metodologia de clone infeccioso para determinar se a assinatura molecular YFV 2016-2019 no domínio MTase da proteína NS5 influencia na replicação viral. O genoma do isolado selvagem de YFV, ES-504, foi amplificado em quatro fragmentos diferentes por RT-PCR. Todos os fragmentos foram projetados para carrear sítios de restrição únicos em suas extremidades para clonagem direta e posterior montagem do cDNA genômico. O primeiro fragmento também foi fusionado à sequência promotora do bacteriófago SP6 para transcrição *in vitro*. Cada fragmento foi clonado individualmente em vetores plasmidiais, e em seguida, foram fusionados para conter o genoma completo em dois plasmídeos: pCC1/1.4 e pCC1/2.3. Esses plasmídeos foram usados para obter o vírus sintético

derivado do YFV ES-504, YFV_2017, após tratamento de restrição seguido de ligação de DNA, amplificação por PCR do cDNA modelo, transcrição *in vitro* e transfecção em células C6/36 (Figura 3.2A). A recuperação viral foi confirmada pela detecção por qRT-PCR com $1,28 \times 10^8$ cópias de RNA genômico/mL.

A validação do YFV_2017 como um vírus infeccioso comparável à sua cepa parental ES-504 foi realizada em duas etapas. Primeiro, comparamos a morfologia da placa do vírus sintético e do vírus parental. Embora a placa de lise do YFV ES-504 tenha apresentado maior heterogeneidade em medida de área, não houve diferença significativa em relação ao YFV_2017 ($P = 0,213$) (Figura 3.2B). Em seguida, avaliamos a cinética de crescimento viral em quatro linhagens celulares: duas derivadas de hospedeiros mamíferos (Vero e HepG2) e duas derivadas de mosquitos (Aag2 e C6/36). A replicação viral em todas as linhagens celulares foi semelhante sem significância estatística (Figura 3.2C-F). Portanto, concluímos que o vírus derivado de clone infeccioso YFV_2017 é um modelo adequado para estudar o efeito de mutações no YFV.

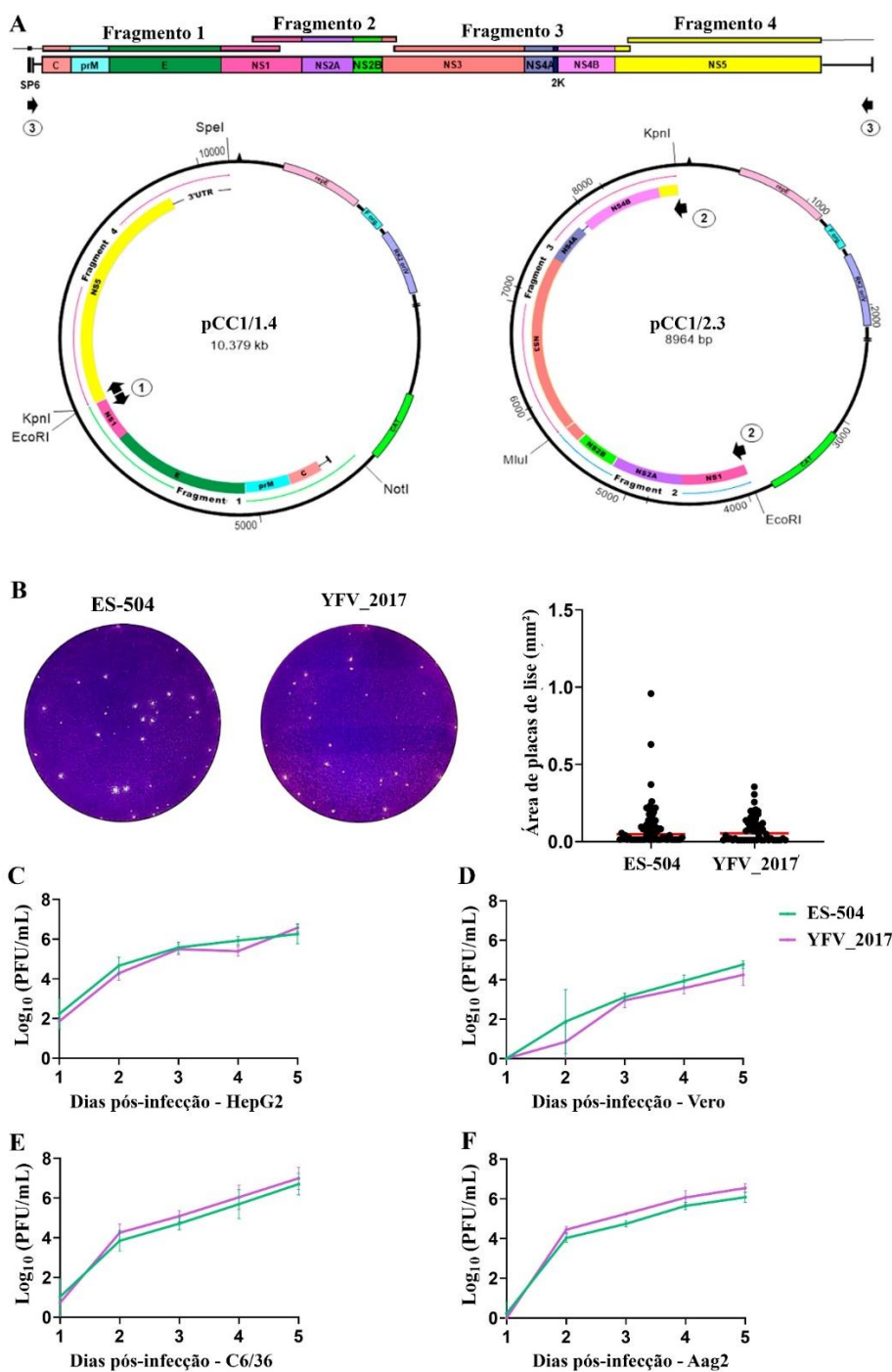


Figura 4.2 - Regeneração e avaliação do vírus da febre amarela sintético.

(A) Estratégia para a montagem do genoma do YFV. O genoma foi dividido em 4 fragmentos e reagrupado em dois plasmídeos principais contendo as extremidades (pCCI/1.4) e a parte central (pCCI/2.3) do cDNA viral. As setas pretas numeradas de 1 a 3 representam os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas rodadas de amplificação antes da transcrição *in vitro* do cDNA molde. (B) Morfologia da placa de lise do YFV ES-504 parental e do vírus derivado de clone YFV_2017. As áreas das placas de lise foram medidas no software ImageJ e os resultados foram plotados e comparados no GraphPad Prism 8, com o teste de Mann-Whitney. (C-F) Curvas de crescimento em diferentes linhagens celulares: HepG2 (C), Vero (D), Aag2 (E) e C6/36 (F). Os títulos virais foram transformados em log₁₀ e plotados no GraphPad Prism 8. As análises estatísticas foram aplicadas a cada ponto coleta do sobrenadante das células infectadas usando o teste T não pareado para comparar os títulos virais de YFV ES-504 e YFV_2017.

4.2.2.3 Caracterização do YFV mutante no domínio MTase

Para estudar os efeitos dos marcadores moleculares do YFV 2016-2019 no domínio NS5 MTase, inserimos mutações no plasmídeo pCC1/1.4, alterando os três resíduos de aminoácidos: R101K, I138V e S173G. Este plasmídeo mutado foi utilizado para montar o cDNA viral completo e regenerar a variante YFV/MTase_2010. A recuperação viral foi confirmada por qRT-PCR com $2,27 \times 10^8$ cópias de RNA genômico/mL. Os efeitos deste conjunto de mutações na virulência foram investigados em culturas de células e camundongos BALB/c.

Primeiro, comparamos a morfologia das placas de lise dos vírus YFV_2017 e YFV/MTase_2010 (Figura 3.3). Embora ambos os vírus apresentassem em geral placas de lise pequenas, observamos tamanhos de placas de lise maiores no YFV/MTase_2010 que no vírus sintético parental YFV_2017, com diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,0001$).

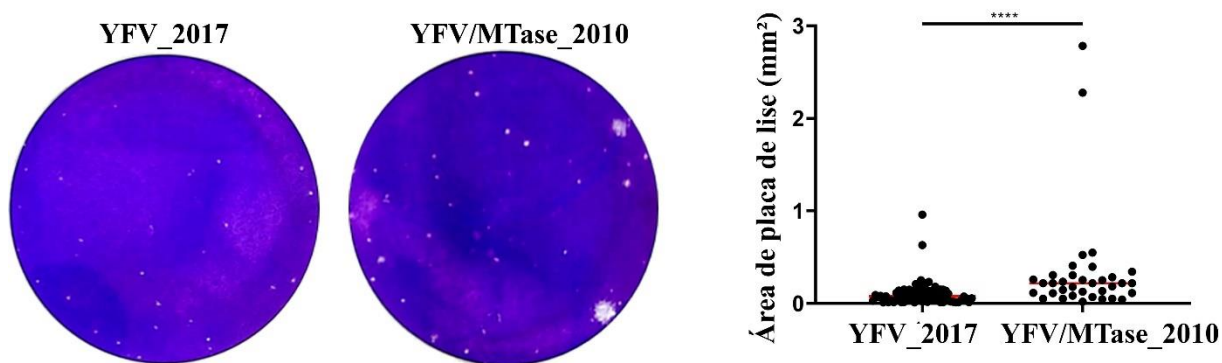


Figura 4.3 - Fenótipo de placas de lise dos vírus YFV_2017 e YFV/MTase_2010.

As áreas das placas de lise foram medidas no software ImageJ, plotadas no GraphPad Prism 8 e comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As linhas vermelhas representam o valor das medianas das áreas das placas de lise. **** representa significância estatística de $P < 0,0001$.

Comparamos ainda a capacidade dos vírus YFV_2017 e YFV/MTase_2010 de replicar em células de hepatoma humano (HepG2) e de mosquitos *Aedes aegypti* (Aag2) (Figura 3.4). Em células HepG2, o YFV/MTase_2010 tendeu a replicar menos que o YFV_2017, até três dias pós-infecção. No entanto, apenas no segundo dia pós-infecção detectamos diferença estatística entre as variantes do YFV ($P = 0,0361$). Após o quarto dia pós-infecção, o crescimento viral de YFV_2017 e YFV/MTase_2010 tornou-se quase indistinguível. Ao contrário, não foram observadas diferenças estatísticas nas células Aag2 durante todo o experimento.

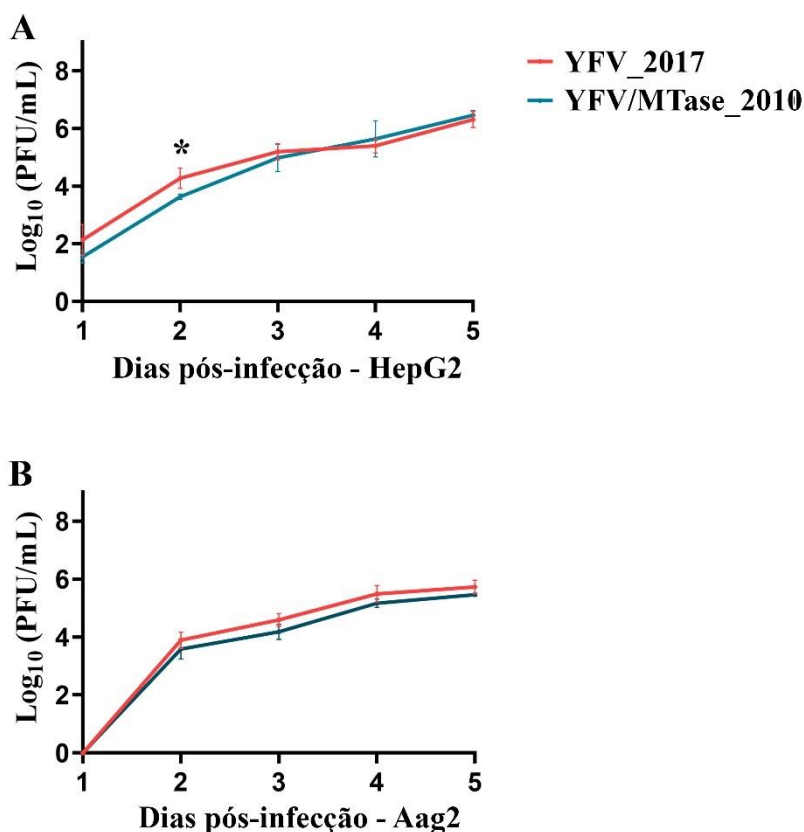


Figura 4.4 - Curvas de replicação viral dos vírus YFV_2017 e YFV/MTase_2010

Em (A) células HepG2 infectadas e (B) células Aag2. Os títulos virais foram transformados em \log_{10} e plotados no GraphPad Prism 8. As análises estatísticas foram aplicadas a cada ponto de tempo usando o teste T não pareado para comparar os títulos virais de YFV_2017 e YFV/MTase_2010. O asterisco em (A) representa a significância estatística com $P = 0,0361$.

Considerando a capacidade dos flavivírus de escapar à resposta imune inata mediada pelo interferon (IFN) e que a proteína NS5 interage direta e indiretamente com essa via, avaliamos se as alterações de aminoácidos poderiam interferir na sensibilidade do YFV ao IFN tipo I. Tratamos células Vero com 1000, 100, 50 e 10 UI/mL de IFN- α e IFN- β por 6 h; em seguida, infectamos essas células com YFV_2017 e YFV/MTase_2010 em MOI 0,5. Após a adsorção viral, as células foram incubadas com as mesmas concentrações de IFN por 48 h. Os títulos virais em cada condição de cultura foram calculados e transformados em \log_{10} foram analisados por regressão não linear para calcular IC_{50} (Figura 3.5).

YFV_2017 foi mais sensível aos tratamentos com IFN- α e IFN- β , apresentando valores de IC_{50} menores que YFV/MTase_2010 (Figura 3.5). O IC_{50} do YFV_2017 foi de 115,4 UI/mL e 26,66 UI/mL para IFN- α e IFN- β , respectivamente, e do YFV/MTase_2010 foi de 693,6 UI/mL e 126,6 UI/mL sob tratamento com IFN- α e IFN- β , respectivamente.

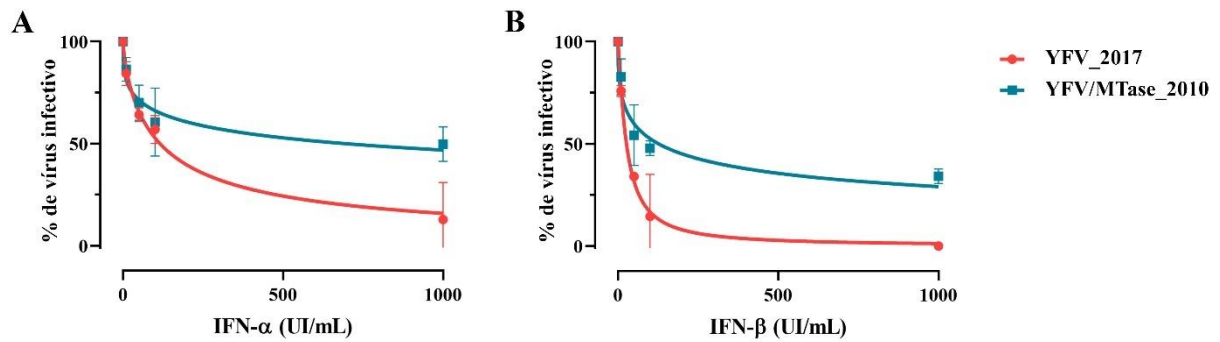


Figura 4.5 - Efeito do tratamento de células com interferon do tipo I na proliferação viral. (A) A regressão não linear da replicação viral na presença de diferentes concentrações de IFN- α e (B) IFN- β para YFV_2017 e YFV/MTase_2010. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 8.

Finalmente, avaliamos a virulência viral por meio de um teste de neurovirulência em um modelo de camundongo. Camundongos BALB/c foram inoculados intracerebralmente com 10^3 PFU de cada vírus e monitorados diariamente quanto à perda de peso corporal e sinais clínicos da doença. Tanto o YFV_2017 quanto o YFV/MTase_2010 provocaram 100% de letalidade no nono dia após a inoculação. O tempo médio de sobrevivência dos camundongos inoculados com YFV_2017 e YFV/MTase_2010 foi de $7,2 \pm 0,7$ e $6,9 \pm 0,9$ dias, respectivamente. As curvas de sobrevivência foram comparadas estatisticamente pelo teste Log-rank (Mantel-cox) e não foram significativamente diferentes ($P = 0,4224$). Da mesma forma, o desfecho da doença e a perda de peso corporal foram semelhantes entre os dois grupos (Figura 3.6).

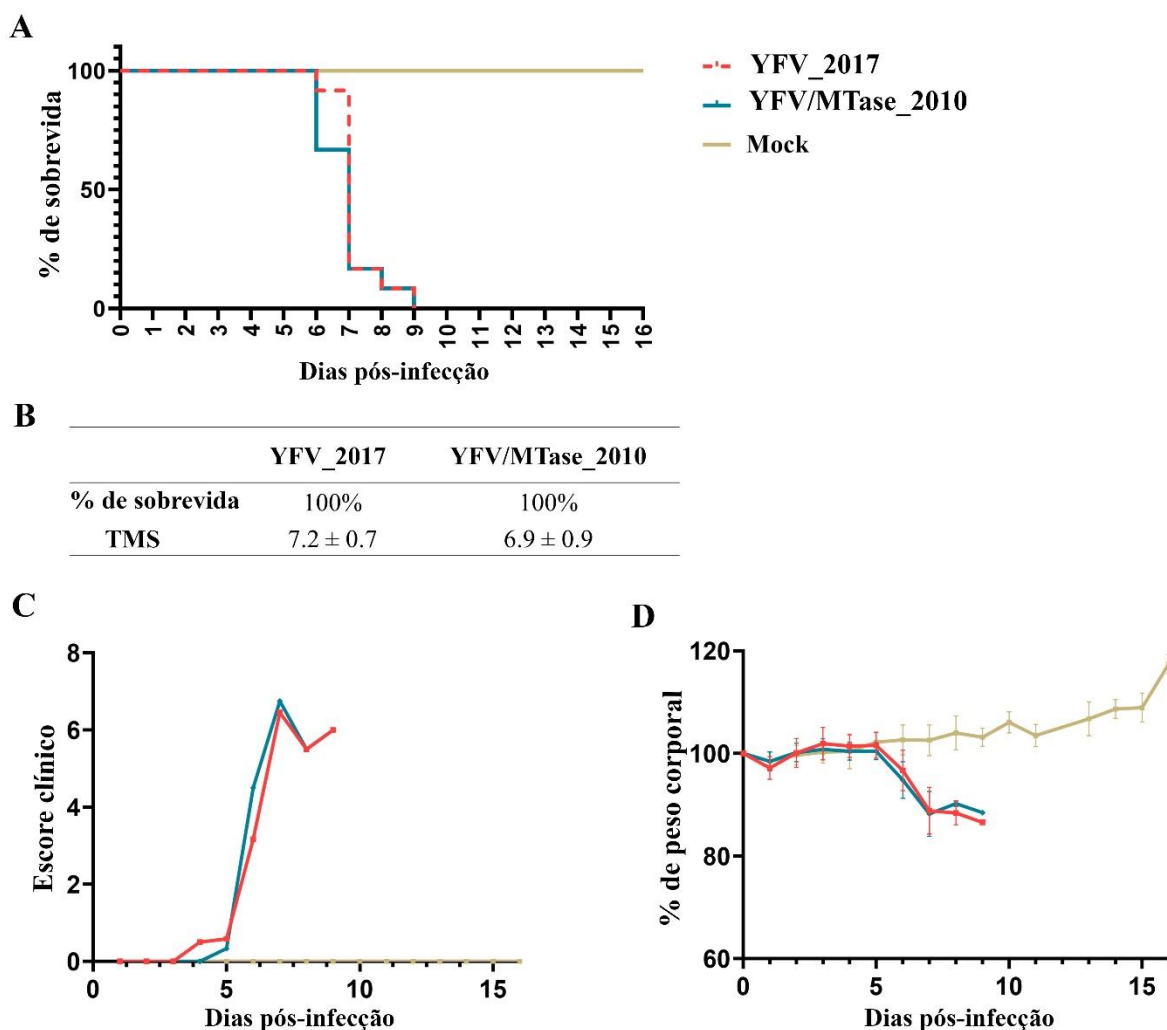


Figura 4.6 - Neurovirulência em camundongos BALB/c inoculados com YFV_2017 e YFV/MTase_2010.

(A) Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos grupos de animais inoculados com cada vírus e meio de cultura (Mock). (B) Tabela resumindo os resultados obtidos das curvas de sobrevivida (TMS = tempo médio de sobrevivida). (C) Medidas de peso corporal ao longo dos 16 dias após a inoculação. (D) Escores clínicos dos animais até a eutanásia.

4.2.2.4 Inibição *in vitro* pela Sinefungina

Para aprofundar o estudo sobre a influência dos marcadores moleculares do YFV 2016-2019, testamos a inibição do crescimento viral por um análogo de nucleosídeo S-adenosil-L-metionina (SAM), a sinefungina. As células HepG2 foram infectadas com YFV_2017 e YFV/MTase_2010 na presença de diferentes concentrações de sinefungina por 42 h, em seguida os sobrenadantes das células infectadas foram coletados e utilizados para quantificação viral por ensaio de placas. Os títulos virais foram transformados em \log_{10} e usados para calcular os valores de IC_{50} . Os resultados mostraram que a sinefungina inibiu igualmente os dois vírus com \log_{10} dos valores de IC_{50} de $4,634 \mu M \pm 0,752$ e $3,787 \mu M \pm 0,498$ para YFV_2017 e YFV/MTase_2010, respectivamente (Figura 3.7). Embora nenhuma diferença significativa

tenha sido observada, YFV/MTase_2010 tende a ser um pouco mais sensível ao análogo de SAM.

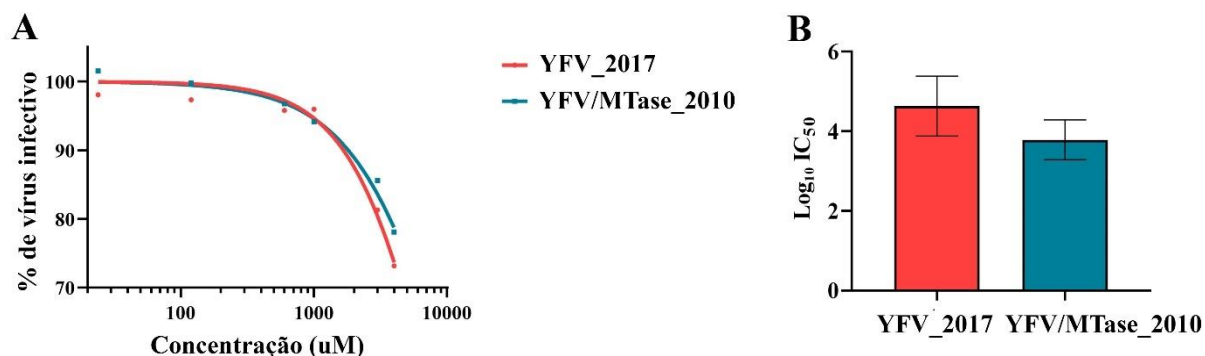


Figura 4.7 - Replicação viral na presença de sinefungina.

(A) Regressão não linear da atividade viral na presença da molécula inibidora. Cada ponto representa o resultado de quatro experimentos de inibição independentes. A regressão não linear foi realizada com o algoritmo *[Inhibitor] vs. normalized response – Variable slope* do GraphPad Prism 8. (B) Médias dos valores de IC₅₀ e comparação por teste T não pareado, indicando a ausência de diferenças significativas entre os vírus ($P = 0,1792$).

4.2.2.5 Expressão de proteínas e atividade enzimática

O domínio MTase da proteína NS5 do YFV 2016-2019 e uma variante carregando as três mutações R101K, I138V e S173G foram expressos em *E. coli* C2566 pRARE2. Ambas as isoformas foram purificadas por IMAC e testadas para identificar as diferenças de estabilidade e função entre MTase 2017 e MTase 2010 (Figura 3.8). Após a purificação da proteína, realizamos um ensaio de deslocamento térmico e determinamos as temperaturas de fusão (T_m) de ambas as MTases. Observamos que as mutações não influenciaram a estabilidade da proteína, e ambas as T_m das proteínas estão em torno de 40 °C (Figura 3.8B).

Para avaliar a influência das mutações na atividade da MTase, comparamos a atividade enzimática de ambas as proteínas usando RNA sintético capeado e curto ($^{m7}GpppAC_5$), para determinação de K_m após ajuste da curva de Michaelis-Menten (Figura 3.8C-D). Enquanto os valores de K_m para o substrato de RNA foram semelhantes para ambas as proteínas, os valores de K_m para o doador de metila (SAM) foram aumentados para MTase 2017, indicando uma menor afinidade para o SAM (Figura 3.8D).

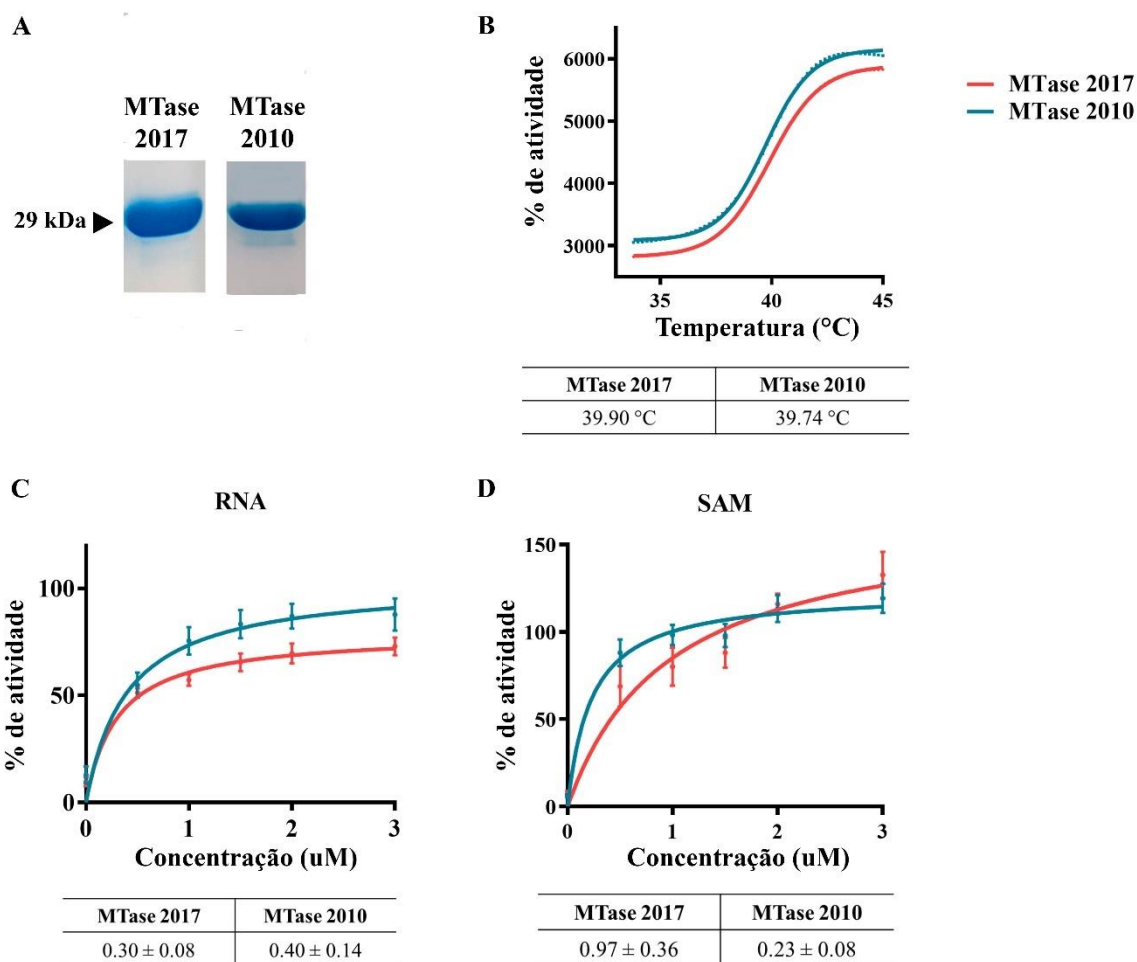


Figura 4.8 - Expressão e atividade de MTase.

(A) SDS-PAGE das proteínas purificadas MTase 2017 e MTase 2010. (B) Ensaio de deslocamento térmico das duas variantes de MTase, com suas respectivas temperaturas de fusão. (C-D) Ajuste da curva de Michaelis-Menten das atividades de MTase e os valores de Km usando concentrações variadas de RNA ou SAM (D).

Investigamos ainda o efeito das mutações determinando a inibição de ambas as variantes de MTase por S-adenosil-L-homocisteína (SAH), o subproduto natural da reação de metiltransferase, e pelo inibidor alostérico sinefungina (Figura 3.9). Os dois inibidores competitivos demonstraram inibir mais eficientemente a MTase 2010 que a MTase 2017. Embora não houvessem diferenças estatísticas, a divergência entre a inibição da MTase 2010 e MTase 2017 foi mais pronunciada após o tratamento com sinefungina ($P = 0,35$, para SAH, e $P = 0,2$, para sinefungina). Esses resultados mostram que as mutações podem interferir na interação entre a MTase e o doador de metila, SAM, o que é importante para o *turnover* da reação.

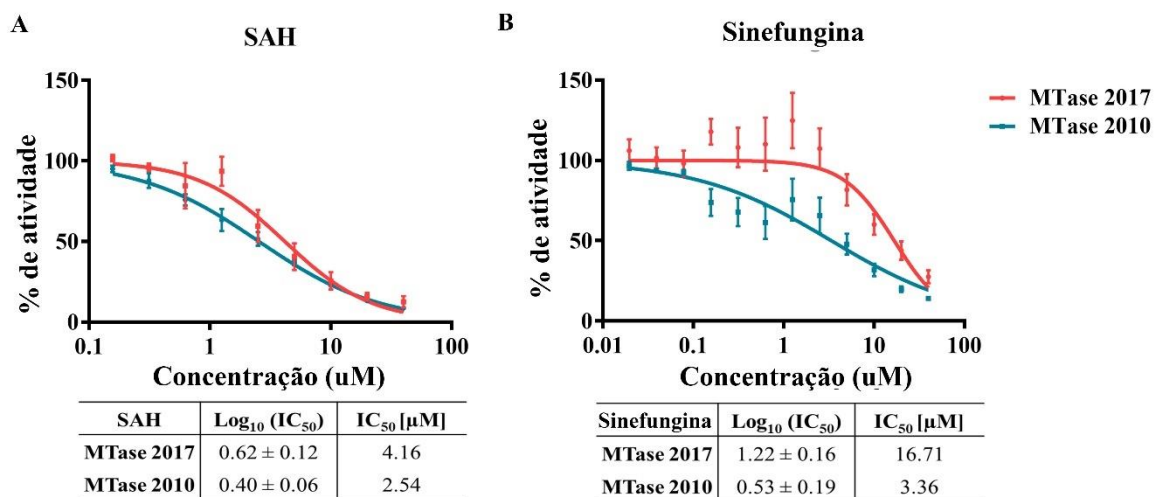


Figura 4.9 - Ensaio enzimático de competição com as isoformas MTase 2017 e MTase 2010 na presença de análogos de SAM.

(A) inibição de MTase por SAH e (B) Sinefungina. Os valores de IC₅₀ estão nas tabelas correspondentes abaixo dos gráficos.

4.2.3 Discussão e Conclusões

A discussão e as conclusões obtidas a partir dos resultados descritos acima estão expostas no anexo II, e foram revisitadas nas seções “Discussão” e “Conclusões” dedicadas à discussão de todos os resultados obtidos nesta tese.

4.3 Artigo 3: Phenotypic and genetic studies of the viral lineage associated with the recent yellow fever outbreak in Brazil

Referência Bibliográfica: Nathália Dias Furtado, Mariela Martínez Gómez, Iasmim Silva de Mello, Déberli Ruiz Fernandes, Myrna Cristina Bonaldo. (2022). **Phenotypic and genetic studies of the viral lineage associated with the recent yellow fever outbreak in Brazil.** *Viruses*. doi: 10.3390/v14081818.

Situação do manuscrito: Publicado.

Sinopse do trabalho:

Nesse artigo, nós concluímos os objetivos restantes da tese, utilizando YFV sintéticos com as seguintes composições: YFV_2017, carreando a assinatura molecular, YFV_NS3_2010, sem os marcadores na NS3pro, YFV_NS5_2010, sem os marcadores na proteína NS5, e YFV_NS3/NS5_2010, sem a assinatura molecular nas proteínas não estruturais.

Definimos os fenótipos de infectividade de cada YFV utilizando as técnicas de tamanho de placas de lise, cinética de replicação em células de mosquito e de mamíferos, sensibilidade a IFN-I e neurovirulência, como empregadas no artigo 1, sobre os YFV isolados. Observamos que, nestes aspectos, a assinatura molecular apenas na proteína NS3 não influenciou substancialmente no fitness viral. Enquanto os marcadores na proteína NS5 modularam a infecção em modelo celular, aumentando a cinética de replicação em células de insetos. Da mesma maneira, os vírus sem a assinatura molecular na proteína NS5, ou seja, YFV_NS5_2010 e YFV_NS3/NS5_2010, apresentaram maior resistência ao tratamento com IFN-I. Entretanto, esses marcadores não modularam a neurovirulência do YFV em camundongos BALB/c inoculados intracerebralmente. Portanto, com esses resultados, concluímos que a assinatura molecular do YFV circulante é mais sensível ao mecanismo de resposta imune inata mediada por IFN-I, e apresenta maior replicação em células de mosquitos *Aedes*.

Diante disso, é interessante investigar o efeito dessas alterações em sistema mais complexo que em modelo celular, infectando tanto mosquitos vetores quanto animais susceptíveis. Nesse trabalho, ainda testamos a infectividade desses YFV em modelo de camundongos imunossuprimidos, com depleção dos receptores de IFN-I, AG129. Observamos que os animais inoculados com o vírus YFV_2017 tem uma taxa de sobrevivência em torno de 80%, enquanto os que receberam a mesma dose com os vírus sem assinatura molecular em NS5 apresentam 100% de mortalidade. Interessante que todos os animais inoculados com o vírus YFV_NS3_2010 sobreviveram até o final do tempo de acompanhamento, com sinais clínicos

mais brandos. Portanto, considerando todos os resultados, podemos sugerir que a assinatura molecular conferiu menor virulência em hospedeiros mamíferos, e que os marcadores em NS3 permitiram a infecção em animais susceptíveis, tendo potencialmente surgido como fator de aumento de virulência nestes hospedeiros, uma vez que os marcadores em NS5 restringiram significativamente a infecção em AG129, assim como em células Vero e HepG2.

Article

Phenotypic and Genetic Studies of the Viral Lineage Associated with the Recent Yellow Fever Outbreak in Brazil

Nathália Dias Furtado, Mariela Martínez Gómez, Iasmim Silva de Mello, Déberli Ruiz Fernandes and Myrna Cristina Bonaldo *

Laboratory of Molecular Biology of Flaviviruses, Oswaldo Cruz Institute, FiocruzRio de Janeiro, Brazil; nathaliafurtado@aluno.fiocruz.br (N.D.F.); marie@ioc.fiocruz.br (M.M.G.); iasmimmello17@gmail.com (I.S.d.M.); deberlifernandes@gmail.com (D.R.F.)
* Correspondence: mbonaldo@ioc.fiocruz.br

Abstract: Yellow fever virus (YFV) caused an outbreak in the Brazilian Southeast from 2016 to 2019, of the most significant magnitude since the 1900s. An investigation of the circulating virus revealed that most of the genomes detected in this period carried nine unique amino acid polymorphisms, with eight located in the non-structural proteins NS3 and NS5, which are pivotal for viral replication. To elucidate the effect of these amino acid changes on viral infection, we constructed viruses carrying amino acid alterations in NS3 and NS5, performed infection in different cells, and assessed their neurovirulence in BALB/c mice and infected AG129 mice. We observed that the residues that compose the YFV 2016–2019 molecular signature in the NS5 protein might have been related to an attenuated phenotype, and that the alterations in the NS3 protein only slightly affected viral infection in AG129 mice, increasing to a low extent the mortality rate of these animals. These results contributed to unveiling the role of specific naturally occurring amino acid changes in the circulating strain of YFV in Brazil.

Keywords: yellow fever virus outbreak; southeastern Brazil; amino acid polymorphisms; NS3; NS5; virulence

Citation: Furtado, N.D.; Gómez, M.M.; de Mello, I. S.; Fernandes, D.R.; Bonaldo, M.C. Phenotypic and Genetic Studies of the Viral Lineage Associated with the Recent Yellow Fever Outbreak in Brazil. *Viruses* **2022**, *14*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s): Chao Shan

Received: 8 July 2022

Accepted: 10 August 2022

Published: 12 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Yellow fever (YF) is an acute febrile disease that has caused hundreds of thousands of deaths worldwide, especially in Africa since the 16th century, and in the Americas in the 18th and 19th centuries [1]. Starting in 1900, studies on the transmission mechanism of YF identified the arthropod vector. Until 1920, campaigns for mosquito control promoted YF eradication in the United States and in several countries of Central and South America, including some regions of Brazil [2]. After developing an effective vaccine against YF, vaccination and vector control eliminated the disease in several continents, restricting the circulation of the yellow fever virus (YFV) to the tropical areas of Africa and South America [1]. Nevertheless, since the 2000s, there has been a reemergence of YF in areas associated with low or no activity of YFV in the endemic countries, and Brazil recently experienced the most critical outbreak in the last 80 years in the southeastern region [3,4]. From 2014 to 2019, YF has been spreading in the country southwards, with the most expressive event in 2017 and 2018. During this period, 2257 confirmed human cases of YF and 1428 epizootics were reported in the southeastern region [5]. From 2019 until 2021, outbreaks of lower magnitude have been detected in South Brazil, with a reemergence in the Central-West, with case reports in Goiás state [6,7].

The dispersal of YFV into southeastern Brazil was more significant than the previous outbreaks in the country since the beginning of the last century. Many factors certainly influenced the outbreak proportions, such as ecological changes that promoted a significant increase in mosquito and non-human primates (NHP) densities, their contact with

humans, and low vaccine coverage [8]. On the other hand, the increased circulation and geographic expansion of YFV since the 2000s in South and Southeastern Brazil might also be associated with the emergence of viral genetic variants. YFV, like other flaviviruses, presents evolutive constraints, because they must replicate in very different host cells, and escape from mosquito and mammal antiviral responses. Despite that, it is not unprecedented that an arbovirus evolved to originate a variant with higher fitness in mosquito vectors, due to a few mutations [9]. Even a single mutation in the viral genome enabled the dispersal of the Chikungunya virus (CHIKV) into other continents, causing significant outbreaks [10]. Another good example of this phenomenon is the West Nile virus (WNV); after its introduction in North America, it generated variants that were more competent for transmission by native mosquitos [11–13].

In a previous study, we described the detection of nine non-synonymous mutations in YFV virus strains over the period of 2016–2017 during the outbreak in southeastern Brazil [14]. Observing this molecular signature in most of the circulating YFV genomes raised questions regarding whether these changes might have influenced the function of viral proteins increasing viral fitness [15]. At that time, we explored the possible impact of the polymorphisms inside NS3 and NS5 on protein functions, using prediction via homology modeling and structural analysis. An analysis of the NS3 protein mapped the amino acid variations (E88D and R121K) inside the protease domain and revealed that the substitution E88D engaged a loss of hydrogen bond with the protein backbone, causing a side-chain displacement. In contrast, the mutation R121K was predicted to favor the formation of a hydrogen bond with the co-factor for proteolytic activity, NS2B, which could modulate the protease efficiency [15]. In addition, experimental studies revealed that when amino acid substitutions E88D and R121K co-occur, the protein displays expressively higher stability, which might have positively selected the current amino acid composition of NS3pro [16]. Amino acid changes inside NS5 mapped inside the MTase domain (K101R, V138I, and G173S) and the RdRp domain (N297S, V643A, and N709S), and some of these amino acid alterations might have an impact on enzymatic efficiency due to their locations [15]. Lastly, we recently published a study comparing YFV isolates detected in different Brazilian states, two carrying the YFV 2016–2019 molecular signature, and two with the genomic composition of previously circulating strains, and we could not conclude whether YFV 2016–2019 molecular signature plays a pivotal role in cell infectivity or neurovirulence [17].

To further clarify the phenotypic effect of the NS3 and NS5 polymorphisms on viral infection and neurovirulence, we synthesized a YFV infectious clone (IC_YFV_2017) based on a strain collected in 2017 in southeastern Brazil. We performed site-directed mutagenesis to revert the residues of the 2017 polymorphisms, generating three YFV infectious clone-derived viruses: (i) without the molecular signature in the NS3 (YFV_NS3_2010), (ii) without the molecular signature in NS5 (YFV_NS5_2010), and (iii) without the molecular signature in both NS3 and NS5 (YFV_NS3/NS5_2010). The virus directly derived from IC_YFV_2017 was named YFV_2017. We analyzed the infectivity of the IC_YFV_2017-derived viruses in mammals' and mosquitos' cells. Additionally, we inferred the neurovirulence of these viruses and their sensitivity to type I interferon (IFN-I) using two mouse models, BALB/c and AG129. Our main findings suggest that the YFV 2016–2019 molecular signature in NS5 reflected an attenuated phenotype in mammals' cells and mice. In comparison, cellular assays and the neurovirulence test in BALB/c mice indicate that the YFV 2016–2019 molecular signature in NS3 might have no impact on viral fitness, despite the slight increase in virulence observed in AG129 mice.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of the YFV Infectious Clone

A full-length YFV infectious clone based on isolate ES-504 (GenBank: KY885000) was obtained, named IC_YFV_2017, adapting the methodology described by de Mello et al.

[18]. Briefly, the viral genomic cDNA was cloned in two plasmids; pCC1/1.4 carries the 3' and 5' ends, and pCC1/2.3 carries the central part. Next, fragment 2.3 and the entire plasmid pCC1/1.4 were PCR amplified using Phusion DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), digested with EcoRI (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and KpnI (Promega, Madison, Wisconsin, USA), and ligated with T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA), assembling the complete genomic viral cDNA. Finally, the template cDNA was further amplified via PCR using GXL PRIMEStar DNA Polymerase (TaKaRa Bio INC, San Jose, California, USA), in vitro transcribed with the mMESAGE mMACHINE SP6 Transcription kit (Ambion, Waltham, Massachusetts, USA), and electroporated into C6/36 cells to regenerate infectious viral particles.

2.2. Insertion of Genetic Markers

Four IC_YFV_2017 clone-derived viruses were obtained, one named YFV_2017, directly obtained from IC_YFV_2017, and three were obtained after site-directed mutagenesis: i) without the molecular signature in the NS3, named as YFV_NS3_2010; (ii) without the molecular signature in NS5, named as YFV_NS5_2010; and (iii) without the molecular signature in both NS3 and NS5, named as YFV_NS3/NS5_2010. The choice of the inserted nucleotides was based on the Venezuelan YFV strain 10A collected in 2010 (GenBank: KM388816) [19]. Clone-derived viruses were obtained via the site-directed mutagenesis of pCC1/2.3 for YFV_NS3_2010 and pCC1/1.4 for YFV_NS5_2010, and both plasmids for YFV_NS3/NS5_2010, using QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, California, USA). The oligonucleotide primers used to insert the mutations engaging the amino acid changes D1572E, K1605K, R2607K, I2644V, S2679G, S2803N, A3149V, and S3215N are listed in Table S1.

2.3. Viral Stocks

The viral stocks of YFV_2017, YFV_NS3_2010, YFV_NS5_2010, and YFV_NS3/NS5_2010 were obtained from the C6/36 cell infection, previously seeded at 80,000 cells/cm² in T-75 flasks, with 3 mL of cell supernatant harvested after transfection. After 5 days of incubation at 28 °C, the supernatant was collected, centrifuged at 4 °C, 700× g for 10 min, filtered with a 0.22 µm syringe filter, and stored at -80 °C. The viral recovery and stock obtention were confirmed via RT-PCR using SuperScript IV and Phusion DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), and sequenced using primer sets and the previously described methodology [14].

2.4. Plaque Phenotype Assay

The plaque sizes of the four YF viruses were determined after infection of Vero cells, as previously described [17]. In summary, Vero cells seeded at 40,000 cells/cm² were infected with 10 PFU, 20 PFU, and 40 PFU of each virus. After infection, cells were overlaid with 0.5% agarose prepared in Earle's 199 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Cutilab, Campinas, São Paulo, Brazil), 0.25% sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha, USA), and 40 mg/mL gentamicin (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA), and further incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 7 days. The cells were fixed in 10.0% formaldehyde and stained with 0.4% crystal violet. Images of the plates were analyzed using ImageJ software version 1.8.0 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) to measure the plaque areas. The results were plotted and statistically analyzed using Prism software, version 8 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical tests employed were Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison test.

2.5. Viral Growth Kinetics in Different Cell Lines

Vero cells were cultivated in Earle's 199 medium supplemented with 5% FBS, 0.25% sodium bicarbonate, and 40 mg/mL gentamicin at a density of 40,000 cells/cm² in T-25 cell culture flasks. HepG2 were cultivated in DMEM medium (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA) supplemented with 10% FBS, 1% (MEM) non-essential amino acids (NEAA; Gibco, Waltham, Massachusetts, USA), 1 mM sodium pyruvate (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA), and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA), also in T-25 culture flasks. These two cell lines were maintained in an incubator at 37 °C with a wet atmosphere and 5% CO₂. C6/36 cells were grown in Leibovitz's L-15 medium supplemented with 5% FBS, 10% tryptose broth (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA), and 40 mg/mL gentamicin. Aag2 cells were cultivated in Schneider's Insect medium (Gibco, USA), supplemented with 10% FBS and 100 U/mL penicillin-streptomycin. Both cells were seeded at a density of 80,000 cells/cm² in T-25 flasks, and were maintained in an incubator at 28 °C. All cells were seeded approximately 24 h before infection with YFV_2017, YFV_NS3_2010, YFV_NS5_2010, and YFV_NS3/NS5_2010 at MOI 0.02. The culture medium was discarded and the inocula were prepared in adequate medium with a final volume of 0.5 mL were added to the cell monolayers for viral adsorption. The cells were incubated in the appropriate conditions for 1 h with gentle agitation every 15 min. The viral suspensions were discarded, and 10 mL of cell medium were added to the culture flasks. For 5 days, the cell supernatants were collected daily for viral quantification via plaque assay. This experiment was performed in 3 to 4 replicates for better statistical validation. The viral titers were plotted using Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, California, USA), and one way ANOVA was used to statistically analyze these data with Dunnett's multiple comparisons test.

2.6. Viral Infection in the Presence of Type I Interferon

Vero cells were grown in 24-well plates at a density of 50,000 cells/cm², the day before infection. First, the cells were treated with human interferon (IFN) alpha (α ; PBL Assay Science, Piscataway, New Jersey, USA) and beta (β ; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) at concentrations of 10 UI/mL, 50 UI/mL, 100 UI/mL, and 1000 UI/mL for 6 h before infection. Next, cell supernatants were removed, and 100 μ L of viral suspensions were added at MOI of 0.5. After 1 h incubation, the viral inocula were discarded, and 0.3 mL of supplemented Earle's 199 medium containing the four different IFN concentrations were added to the cells. After 48 h of incubation, the cell supernatants were collected for viral titration via plaque assay.

The viral titers under treatment with IFN- α and IFN- β were normalized with the values obtained from non-treated and infected cells. This experiment was performed in three independent assays for statistical relevance. Data were analyzed in Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). IC₅₀ values were calculated from the nonlinear regression function provided by the software ([Inhibitor] vs. normalized response—Variable slope). IC₅₀ values of each replicate were analyzed using a one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test.

2.7. Animal Experimentation

All animal experiments were carried out in strict accordance with the Guide of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocols employed were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experimentation of Oswaldo Cruz Institute (CEUA-IOC; Permit: L-034/2019).

2.7.1. BALB/c Mice

The neurovirulence tests were performed in the BALB/c mouse model. These mice were obtained from CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório), of the State University of Campinas, São Paulo (UNICAMP). Three groups of 5 young-adult mice (6 weeks old) were inoculated

intracerebrally with 10^3 PFU each of YFV, or with the diluent medium, in a final inoculum volume of 30 μ L in Earle's 199 medium supplemented with 25 mM HEPES (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA) and 0.025% sodium bicarbonate. The inoculation procedure was conducted under anesthesia with a ketamine/xylazine cocktail at 100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively, administered intraperitoneally. After injection, mice were monitored daily for weight loss and clinical signs of disease until the humane endpoint or the monitoring period (21 days). The humane endpoint was determined as previously described [17]. Euthanasia was performed with intraperitoneal administration of 3 times the standard dose of ketamine/xylazine cocktail, followed by cervical dislocation.

2.7.2. AG129 Mice

The virulence experiments were performed with α/β and γ interferon receptor knocked-out mice, AG129. These animals were produced and provided by Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) of Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) in Rio de Janeiro, Brazil. The animals were bred and maintained under specific pathogen-free conditions. Two groups of 4-to-5 10-weeks-old mice were inoculated subcutaneously with 60 μ L of viral suspension with a 2×10^4 PFU dose or diluent medium (30 μ L in each footpad). These animals were monitored daily until the humane endpoint or the end of the 16-day monitoring period. On days 2, 4, 6, and 8, we withdrew blood from the sub-mandibular vein of 3 animals in each group. At the euthanasia of these animals, their blood was collected via heart puncture. The collected blood was used for RNA extraction using the QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and qRT-PCR to determine viral loads in the specific time points. As previously described, viral detection and quantification via qRT-PCR were performed [20]. The average survival time (AST), percentage of mortality, clinical scores, and percent of body weight were calculated and analyzed in Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical analysis of Kaplan–Meier survival curves was performed using a log-rank test (Mantel–Cox).

3. Results

3.1. Influence of the YFV 2016–2019 Molecular Signature on Infectivity in Cell Cultures

To further investigate the role of the amino acid variations observed in the NS3 and NS5 proteins detected in Brazil in 2017 [14,15], we constructed synthetic YFV via reverse genetics and performed site-directed mutagenesis, as described in the Material and Methods section. Table 1 summarizes the amino acid differences between the YF viruses derived from IC_YFV_2017 infectious clone obtained in this work.

Table 1. Amino acid changes between the yellow fever clone-derived viruses used in the current study.

Synthetic YFV	NS3			NS5				
	Protease		101	MTase		RdRp		
	88	121		138	173	297	643	709
YFV_2017	D	K	R	I	S	S	A	S
YFV_NS3_2010	E	R	R	I	S	S	A	S
YFV_NS5_2010	D	K	K	V	G	N	V	N
YFV_NS3/NS5_2010	E	R	K	V	G	N	V	N

The residues of the previously circulating strain of YFV (Venezuelan strain 10A) are highlighted in blue.

The first phenotypic feature we established was the plaque size formed by each YF clone-derived virus in Vero cells (Figure 1). YFV_2017 displayed a tiny plaque phenotype in Vero cells, similar to those detected with YFV_NS3_2010 ($p = 0.144$). YFV_NS5_2010 showed a larger and more heterogeneous plaque morphology in comparison with YFV_2017 ($p < 0.0001$), while YFV_NS3/NS5_2010, displayed an intermediate plaque size ($p = 0.0004$).

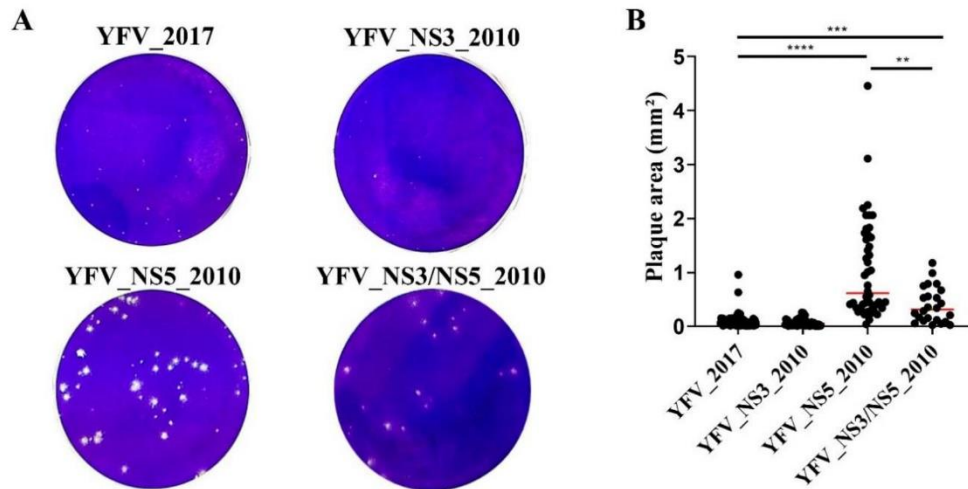


Figure 1. Plaque phenotype of yellow fever clone-derived viruses in Vero cells. (A) Images of the analyzed plaque areas for each virus. (B) Graphical representation of the measured plaque areas. The red bars represent the median of each sample. The plaque areas were measured using ImageJ software, and the statistical analyses were performed in Prism, version 8 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The data set was analyzed using Kruskal–Wallis’s test, and we compared the YFV_2017 with the other three YFVs using Dunn’s multiple comparisons test. ** represents $p < 0.01$, *** represents $p < 0.001$, and **** represents $p < 0.0001$.

We next investigated the infectivity of these viruses in mammalian (Vero and HepG2) and mosquito (C6/36 and Aag2) cell cultures employing an MOI of 0.02, quantifying the viral yield daily until 5 days post-infection. Over time, we observed significantly higher viral titers in Vero cells infected with YFV_NS5_2010 or YFV_NS3/NS5_2010 viruses (Figures 2A and S1). In HepG2 cells, there were smoother differences between the clone-derived viruses, yet YFV_NS5_2010 displayed higher titers than the other three synthetic YF viruses (Figure 2B) until the fourth day post-infection.

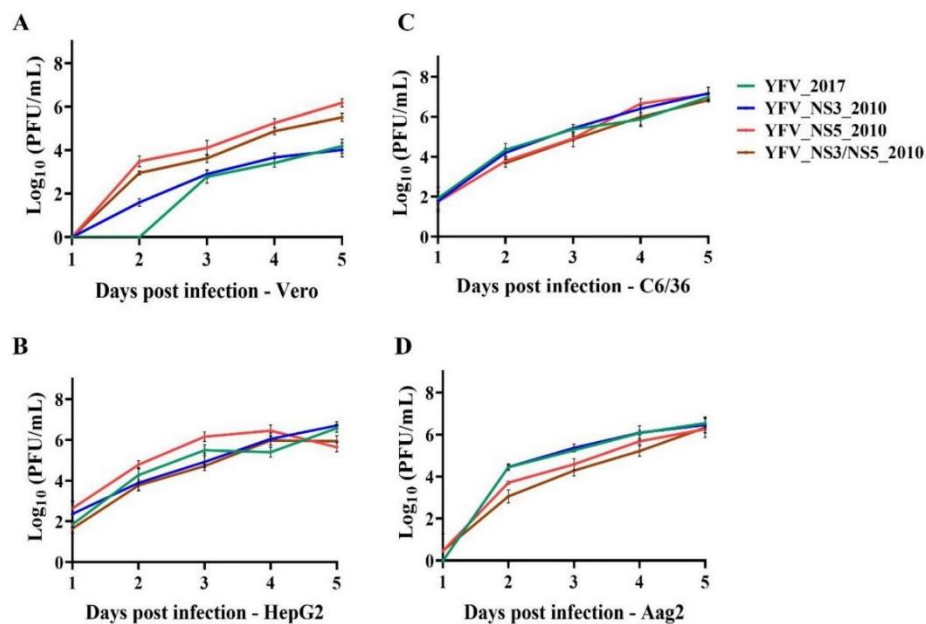


Figure 2. Replication of the yellow fever clone-derived viruses in different cell types. Growth curves were obtained in Vero (A), HepG2 (B), C6/36 (C), and Aag2 (D) cells at MOI 0.02, and aliquots of the supernatants were harvested daily for 5 days to quantify plaque-forming units (PFU) at each time point. Viral titers were transformed in \log_{10} and plotted using Prism, version 8(GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical analyses are available in Figure S1.

In the mosquitoes' cell line C6/36, derived from *Aedes albopictus* larvae and very susceptible to flaviviruses' infection, the viral growth profiles were similar (Figures 2C and S1), with only a few significant differences detected on the second day post-infection, and with YFV_NS5_2010 surpassing the other variants at the fourth day post-infection. In a less susceptible mosquito cell line, the Aag2 cells from *Aedes aegypti* larvae, the differences were more marked than in C6/36 cells, with YFV_2017 and YFV_NS3_2010 displaying significantly higher titers than the viruses carrying the molecular NS5 2010 amino acid variants, the YFV_NS5_2010 and YFV_NS3/NS5_2010 viruses, from the second to the fourth day post-infection. All the viruses reached viral growth peaks after the 4th day post-infection (Figures 2D and S1).

In summary, we observed that the viruses carrying the YFV 2010-amino acid markers in NS5 tend to better proliferate in the two mammal cells employed in this work. In contrast, those carrying the YFV 2017-amino acid markers in NS5 tend to present higher viral yields in mosquito cells.

3.2. Interference of the Molecular Signature on the Innate Immune Response Mediated by Type I Interferon

We investigated whether the polymorphisms in NS3 and NS5 affect the antiviral response mediated by IFN-I. Vero cells were treated with four concentrations of interferon α or β (IFN- α and IFN- β) and were infected with the four YF clone-derived viruses at MOI 0.5. At 48 h post-infection, we quantified infective viruses in the cell supernatant (Figure 3). The IC_{50} values of each experiment replicate were plotted and compared, to establish statistical differences (Figure S2).

The viruses carrying the NS5 2010 variations, YFV_NS5_2010 and YFV_NS3/NS5_2010, displayed a lower sensitivity to both types of IFN-I. There is a tendency for YFV_NS5_2010 (IFN- α IC_{50} = 3900 μ M; IFN- β IC_{50} = 1013 μ M) to be more resistant to IFN-I than YFV_NS3/NS5_2010 (IFN- α IC_{50} = 924.5 μ M; IFN- β IC_{50} = 162.2 μ M), but the differences were not statistically significant. YFV_NS3_2010 showed the highest sensitivity to IFN-I (IFN- α IC_{50} = 35.0 μ M; IFN- β IC_{50} = 16.5 μ M), but this was not significantly different from YFV_2017 (IFN- α IC_{50} = 92.1 μ M; IFN- β IC_{50} = 29.8 μ M) (Figures 3 and S2).

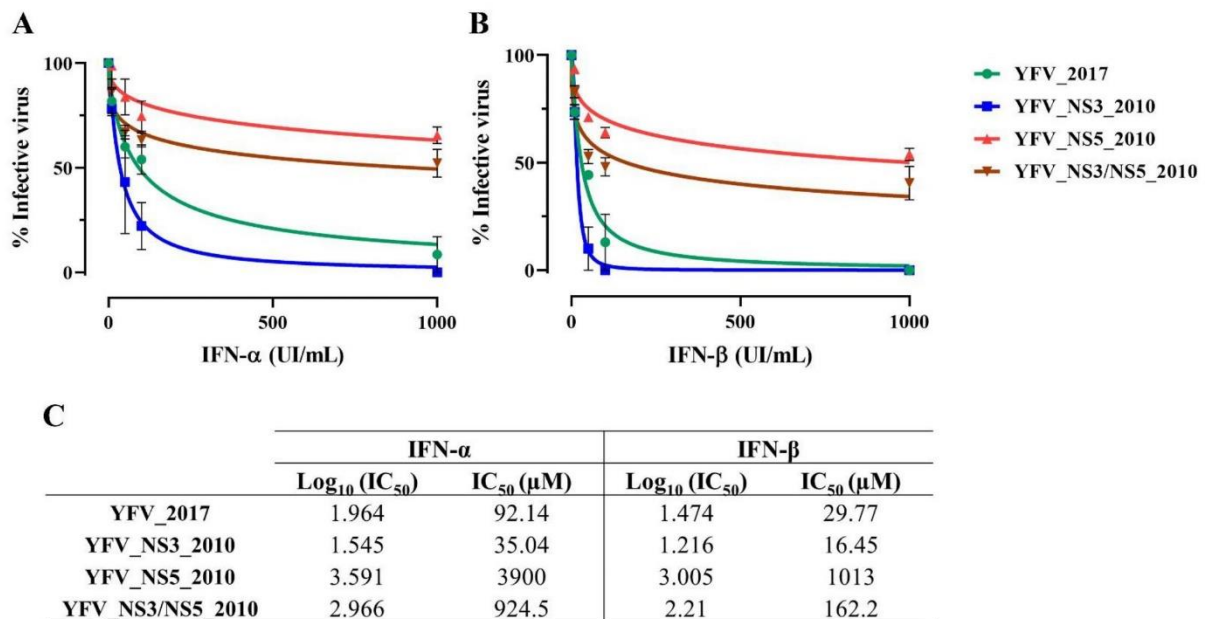


Figure 3. Replication of the yellow fever clone-derived viruses in the presence of type I interferon. Vero cells were treated with 1000, 100, 50, and 10 UI/mL of IFN- α (A) and IFN- β (B), and infected with each YFV variant at MOI 0.5 for 48 h. The cell supernatants were harvested, and the concentration of viral particles was determined for each condition. Each plot represents the percentage value normalized using the supernatants of infected cells not treated with IFN and fitted in a non-linear regression for IC₅₀ calculation. (C) Table with the IC₅₀ values for each virus under treatment with either IFN- α or IFN- β . These data were analyzed using Prism, version 8(GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3.3. Effects of the Molecular Signature Polymorphisms upon Mouse Inoculation

3.3.1. BALB/c Mice

The intracerebral inoculation of YFV is highly lethal in mice. Even the attenuated vaccine 17D YFV induces a 100% mortality rate in Swiss and BALB/c mice [21,22]. To determine if the molecular markers of YFV 2016–2019 could affect the neurovirulence, we intracerebrally inoculated 6-week-old BALB/c mice with 10³ PFU of each of the YF clone-derived viruses. We measured the body weight, clinical signs of disease, and deaths daily for 21 days. All viruses induced 100% mortality within the first 8 days after injection. According to the clinical scores, all of the infected animal groups presented a similar disease intensity and weight loss of almost 20% (Figure 4). In fact, there was no statistical difference between YFV_2017 and YFV_NS3_2010 ($p = 0.197$) or YFV_NS3/NS5_2010 ($p = 0.112$), according to the Log-rank test (Mantel-Cox). Only YFV_NS5_2010 showed a slight difference from YFV_2017, $p = 0.028$. In conclusion, there are no substantial differences in intracerebral inoculation with the four clone-derived viruses.

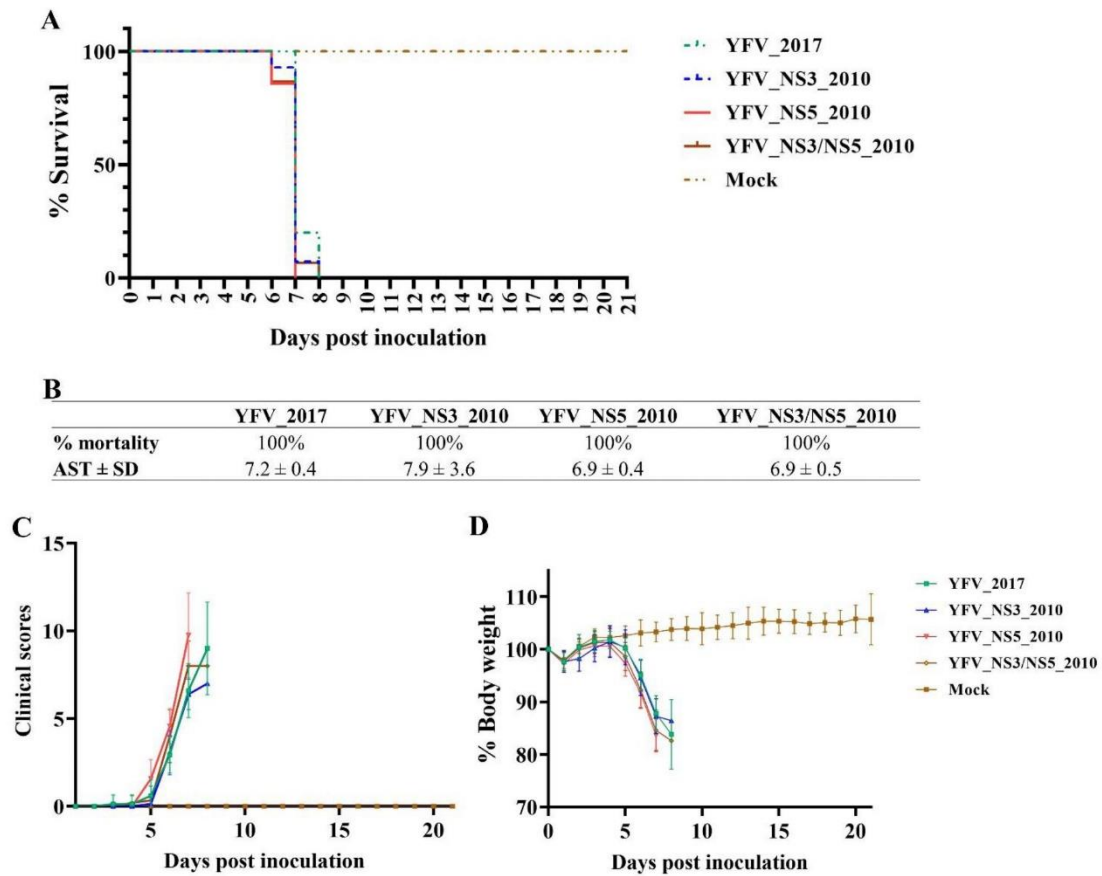


Figure 4. Neurovirulence in BALB/c mice induced by the yellow fever clone-derived viruses. (A) Kaplan–Meier survival curves of each virus. (B) Table summarizing the survival curve results (AST: Average Survival Time; SD: Standard Deviation). (C) Mean of clinical scores and (D) mean of percentage body weight presented by each group of infected mice. All analyses were performed in Prism, version 8(GraphPad Software, San Diego, California, USA). The Kaplan–Meier survival curves were statistically compared using the Log-rank (Mantel–Cox) test.

3.3.2. AG129 Mice

Next, we investigated the differences in the infection pattern of the YF viruses derived from the infectious clone in another mouse model, the highly susceptible AG129 mice, depleted for the receptors of IFN- α/β and IFN- γ [23]. A total of nine animals per virus received a dose of 2×10^4 PFU subcutaneously and were followed up for 16 days.

Contrary to the first animal evaluation, the YF clone-derived viruses displayed substantial differences in virulence in AG129 mice. The infection with YFV_2017 provoked only a lethality of 22.2% on the sixth day post-infection. The remaining 77.8% of infected mice survived until the end of the follow-up period (Figure 5A,B). On the other hand, the replacement in this genetic background with the YFV 2010 markers in the NS3 caused no lethality in the animals upon infection with YFV_NS3_2010 (Figure 5A,B). Conversely, the YF clone-derived viruses carrying the amino acid polymorphisms of YFV 2010 in the NS5 either present in YFV_NS5_2010 or YFV_NS3/NS5_2010 raised the lethality to 100%, with AST values of 6.3 ± 0.5 and 6.4 ± 0.5 days, respectively (Figure 5A,B).

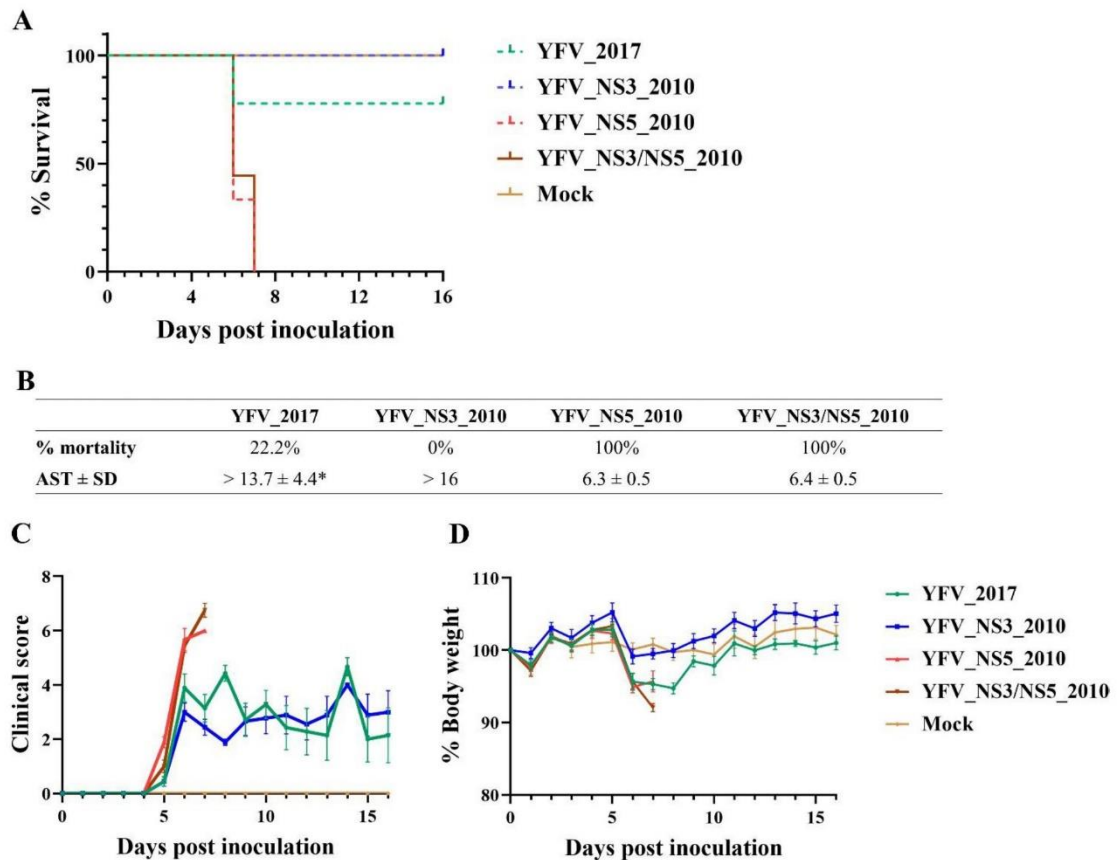


Figure 5. Infection in AG129 mice with yellow fever clone-derived viruses. (A) Kaplan–Meier survival curves of each virus. (B) Table summarizing the survival curves results (AST: Average Survival Time; SD: Standard Deviation). (C) Mean of clinical scores and (D) mean of percentage body weight presented by each group of infected mice. All analyses were performed in Prism, version 8 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

The viral infection in all animals was manifested through significantly swollen footpads (at the inoculation sites) and hunched postures, hampering the animals' mobility, as well as ruffled fur and a modest body weight loss (less than 10%) (Figure 5C,D). Over time, the clinical scores of YFV_2017 and YFV_NS3_2010 were mainly due to swollen footpads and slightly hunched postures, not ruffled fur. Of these two YFVs, only YFV_2017-infected AG129 lost body weight between days 5 and 9 post-inoculation, whereas the YFV_NS3_2010 inoculated animals maintained their body weight to a comparable extent compared to the Mock infected mice (Figure 5D). It is noteworthy that YFV_NS3_2010 infected mice presented more severe swelling at their footpads between the sixth and the ninth days post-infection and recovered almost entirely until the end of the monitoring period.

Further, we measured viremia on days 2, 4, 6, and 8, and at the moment of euthanasia (Figures 6 and S3). The viral loads in the blood of infected AG129 mice reached a peak on the sixth-day post-inoculation. We observed that the viremia peaks of YFV_2017 and YFV_NS3_2010 are significantly lower than the peaks of YFV_NS5_2010 and YFV_NS3/NS5_2010 (Figure S3).

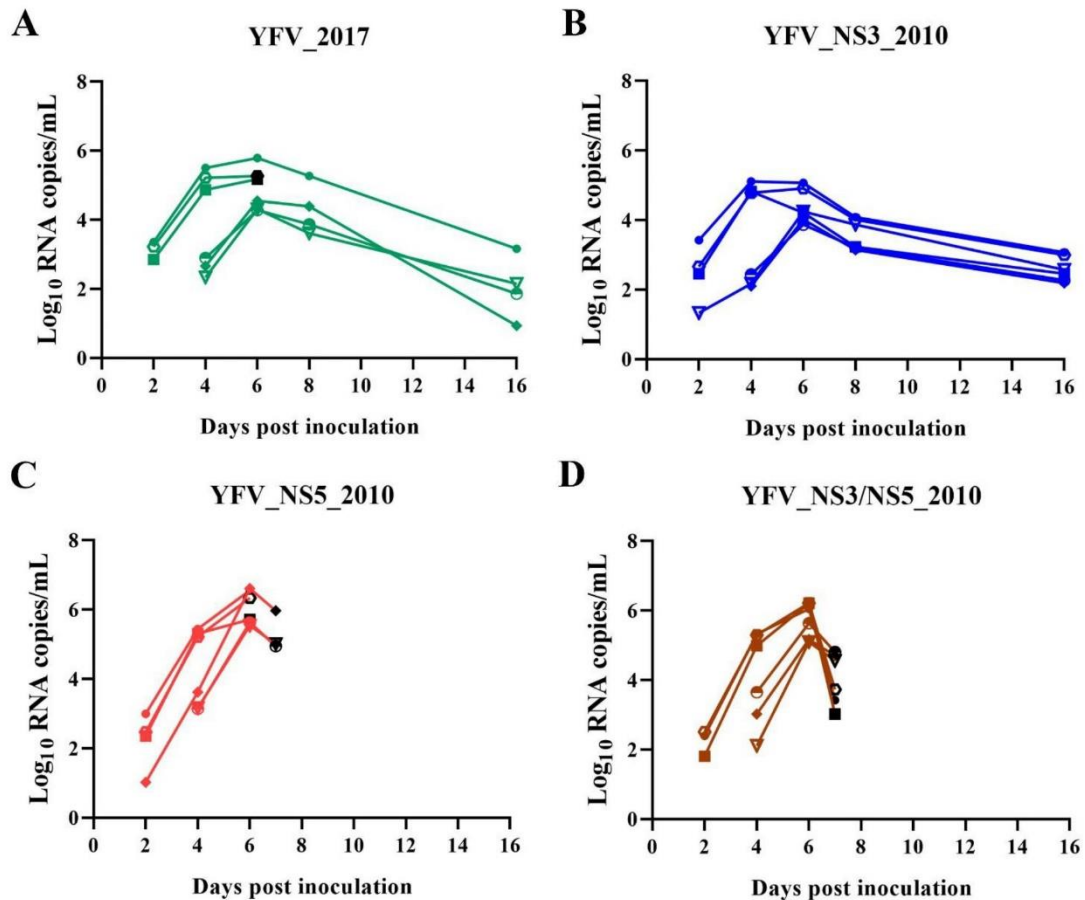


Figure 6. Viremia of infected AG129 over time, determined via qRT-PCR. The concentrations of RNA copies by mL of blood were transformed in log₁₀ and plotted for each time point post-inoculation of animals infected with YFV_2017 (A), YFV_NS3_2010 (B), YFV_NS5_2010 (C), and YFV_NS3/NS5_2010 (D). The black symbols represent the mice that reached the humane endpoint and were euthanized before the sixteenth-day post-inoculation.

We observed that the AG129 mice controlled the infection by YFV_NS3_2010 with a peak of viral loads between the fourth and the sixth-day post-inoculation ($\sim 10^4$ RNA copies/mL), maintaining a restrained viral load of approximately 500 RNA copies/mL of YFV in the blood at the end of the 16-day monitoring period (Table S2). A very similar pattern of viremia was observed in the surviving mice infected with YFV_2017. In contrast, mice inoculated with YFV_NS5_2010 and YFV_NS3/NS5_2010 succumbed before the eighth-day post-inoculation and presented an increasing viral load in blood until the humane endpoint determined the euthanasia.

The viremia of all the animals that reached the humane endpoint before the monitoring period was around 10^4 to 10^6 RNA copies/mL of blood. Interestingly, mice euthanized on the sixth-day post-inoculation with YFV_2017 displayed a similar average viral load to those inoculated with YFV_NS5_2010, euthanized one day later, on the seventh-day post-inoculation (1.69×10^5 and 3.74×10^5 , respectively). Moreover, the animals inoculated with YFV_NS3/NS5_2010 and euthanized on the seventh day exhibited around 10 times fewer RNA copies/mL of blood than the animals euthanized on the same day that were inoculated with YFV_NS5_2010. The highest viral loads were attained by the animals

inoculated with YFV_NS5_2010, euthanized on the sixth day, with an average viremia of 2.11×10^6 RNA copies/mL blood (Table S2).

4. Discussion

The last YFV outbreak in the country was explosive, and raised questions regarding which factors could be involved, such as adaptative mutations. In the history of arboviruses, it has already happened that a few mutations in the viral genome have led to host adaptation, causing alterations involved in virus dispersion [10–13]. In previous studies, we observed nine amino acid changes related to the 2016–2019 Brazilian outbreak, and analyzed its possible impacts on virus replicative fitness, using wild-type strains [14,15,17,24,25]. In the present study, we further explore the impacts of NS3pro and NS5, which are previously described amino acid polymorphisms present in YFV strains from the 2016–2019 outbreak, in the context of viral fitness in cells and murine infection models, using an infectious clone approach.

For this purpose, we first analyzed the plaque phenotype in Vero cells and the replication kinetics of clone-derived viruses in mammalian and mosquito cell cultures. Regarding the NS3 amino acid markers, no impact on the plaque phenotype was observed when Vero cells were infected with YFV_NS3_2010, compared with the YFV_2017 infection. In addition, YFV_NS3_2010 displayed similar growth rates to the YFV_2017 in all cell lines used in this study, and slight differences were observed in sensitivity to IFN-I, where YFV_NS3_2010 tends to exhibit lower IC_{50} values for IFN- α and β . In summary, the NS3 amino acid polymorphisms do not significantly modulate the infection in mammal cells.

Conversely, the molecular signature in the NS5 2010 protein had more marked effects on mammal viral infectivity, exhibiting higher proliferation rates and larger plaque phenotype in mammal cells. Furthermore, the more highly significant ability to infect mammal cells correlates with more extensive resistance to the inhibition of viral growth in Vero cells under treatment with IFN-I. In general, infection with YFV_NS3/NS5_2010 virus in cellular models displayed an intermediate phenotype compared to YFV_NS5_2010 and YFV_2017, suggesting that NS3-2010 variants somehow modulate the NS5-2010 effect in the mammal infection capacity. Nevertheless, we observed the opposite in YFV carrying NS5 2010 amino acid variations in mosquito cells, in which these viruses displayed a less proliferative ability. However, it is essential to mention that such results should be clarified by using infection in *Aedes*, *Haemagogus*, and *Sabethes* mosquitos, rather than cell lines. Altogether, infectivity results in cells indicate that the 2016–2019 molecular signature might impact the susceptibility of hosts' and vectors' cells, promoting an attenuated phenotype in mammals' cells.

To better characterize the effect of the YFV 2016–2019 molecular signature on viral infectivity, we assessed their neurovirulence in BALB/c mice. The YFV is highly neurovirulent and lethal after intracerebral injection in adult mice, including the attenuated vaccine strains [22]. This test has been well established to characterize and distinguish YFV strains [26]. Therefore, we decided to investigate whether the genetic differences in Brazil's recently established YFV circulating could modulate the YFV neurovirulent phenotype. For this, we inoculated intracerebrally BALB/c mice with each of the clone-derived viruses. All viruses cause lethal infection in BALB/c mice; we observed no significant differences in the average survival times. Hence, we concluded that the clone-derived viruses could be further studied regarding infectivity in a different mouse model.

AG129 mice have been shown to be an effective animal model for studying viremia, disease pathogenesis, and mortality in flaviviruses [23,27–31]. The AG129 mice lack IFN- α/β and γ receptors, but they elicit B-cell and T-cell responses to infection [32]. Following mammal-cell model studies, the infection of AG129 mice with viruses carrying the NS5 2010 amino acid residues was more lethal, differing from infection with those viruses bearing NS5 2016–2019 molecular markers. Animals infected with YFV_NS5_2010 and YFV_NS3/NS5_2010 viruses exhibited 100% mortality rates (AST around the sixth day p.i)

and 10–100 fold higher viremia peaks. Inoculation with the YFV_2017 virus caused a reduced mortality rate (22.2%), indicating a decrease in mouse virulence.

On the other hand, the more pronounced effect in attenuation was reached by the YFV_NS3_2010 administration, which did not provoke any animal death. Together with the data obtained in mammal-cell infection, the NS5-2010 amino acid markers contribute to a more virulent phenotype. Our data from mammal cells suggest that the NS5-2010 molecular signature may better antagonize the type I IFN signaling pathway. As previously described elsewhere [33–35], the modulation of the IFN-I signaling pathway by the binding of YFV NS5 to STAT-2 promotes the modulation of the antiviral response. On the other hand, in AG129 mouse infection, deficient of IFN- α/β and γ receptors, perhaps other receptors such as RIG-I and MDA5 could be critical for initiating the IFN response to an infection via the recognition of intracellular viral RNA. NS5 2010 could display a more efficient ability in modulating this antiviral response [35].

In summary, we conclude that the presence of the molecular signature in the YFV genome played an essential role in viral fitness in invertebrate and vertebrate hosts mainly associated with NS5 protein. Interestingly, a genomic study involving the South American and West African lineages revealed that the primary amino acid changes relevant to the adaptive diversification of YFV generally cluster in different structural regions of NS5, suggesting an essential role in YFV dissemination [36]. In previous work, using YFV isolates from the Brazilian 21st century outbreaks, the amino acid factors associated with virulence were mainly mapped to non-structural proteins, most of them at NS5. Here, we use infectious clone technology to better determine the impacts of some of these amino acid alterations, especially regarding the NS3 and NS5 2016–2019 signatures. In this genetically controlled landscape, it was possible to draw more precise conclusions on the effect of the YFV 2016–2019 molecular signature.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Statistical analysis of the viral replication kinetics in Vero (A), HepG2 (B), C6/36 (C), and Aag2 (D); Figure S2: Statistical analysis of IC_{50} values generated after viral infection under treatment with IFN-I; Table S1: Oligonucleotide sequences for site-directed mutagenesis in NS3 and NS5 proteins; Table S2: Follow-up of viral RNA copies/mL in blood samples from infected AG129 mice; Figure S3: Statistical analysis of viremia values of viral RNA copies/mL in blood samples from infected AG129 mice.

Author Contributions: Conceptualization, M.C.B. and N.D.F.; methodology, M.C.B., N.D.F., I.S.d.M., and D.R.F.; formal analysis, N.D.F. and M.C.B.; investigation, N.D.F.; data curation, N.D.F., M.M.G., and M.C.B.; writing—original draft preparation, N.D.F.; writing—review and editing, M.M.G. and M.C.B.; visualization, N.D.F. and M.C.B.; supervision, M.C.B.; project administration, M.C.B.; funding acquisition, M.C.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by MCTI/FINEP/FNDCT 01/2016—ZIKA (Grant No. 04.16.0058.00); Preventing and Combating the Zika Virus, MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC CAPES/MS-Decit (Grant No. 440865/2016-6). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant No. 312446/2018), Preventing and Combating the Zika Virus MCTIC/FNDCT CNPq/MEC-CAPES/MSDecit (Grant No. 88881130684/2016-00), INOVA Geração de Conhecimento (Grant No. VPPIS-004- FIO18), Fiocruz, Brazilian National Institute of Science and Technology for Vaccines (INCTV) granted by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig)/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal: 465293/2014-0; Faperj Programa Cientista do Nosso Estado – 2020: CNE2020. MCB was a recipient of the CNPq fellowship for Productivity in Technological Development and Innovative Extension: 308164/2020-2;

Institutional Review Board Statement: All animal experiments were carried out in strict accordance with the Guide of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocols employed were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experimentation of the Oswaldo Cruz Institute (CEUA-IOC; Permit: L-034/2019).

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Marta Pereira Santos and Alexandre Araujo Cunha dos Santos for their technical assistance. Ieda Pereira Ribeiro and Lidiane Menezes Raphael are thanked for discussing the protocols and results of this work. We are grateful to the Plataforma Genômica—Sequenciamento de DNA-RPT01A—Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ for the services provided in the genome sequencing, and the Institute of Science and Technology in Biomodels (ICTB/Fiocruz) for providing the AG129 mice.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Douam, F.; Ploss, A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 913–928. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.012>.
2. Franco, O. Campanhas de Osvaldo Cruz. In *História da Febre-Amarela no Brasil*; Ministério da Saúde—Departamento Nacional de Endemias Rurais: Rio de Janeiro, Brasil, 1969; pp. 75–94.
3. De la Santé, O.M.; World Health Organization. Yellow Fever in Africa and the Americas, 2018—Fièvre jaune en Afrique et dans les Amériques, 2018. *Wkly Epidemiol. Rec.* **2019**, *94*, 365–378.
4. De Oliveira Figueiredo, P.; Stoffella-Dutra, A.G.; Barbosa Costa, G.; Silva de Oliveira, J.; Dourado Amaral, C.; Duarte Santos, J.; Soares Rocha, K.L.; Araujo Junior, J.P.; Lacerda Nogueira, M.; Zaza Borges, M.A.; et al. Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016–2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives. *Viruses* **2020**, *12*, 1233. <https://doi.org/10.3390/v12111233>.
5. BRASIL. Health Brazil 2019: A health situation analysis focusing on immunopreventable diseases and immunization. Brasília; Ministério da Saúde; **2019**, 305–330. Governmental Document. Online source: http://bvsm.sau.gov.br/bvsm/publicacoes/sau.gov.br/2020-2021_analise_pandemia_covid-19.pdf (Accessed on 22nd December 2021).
6. BRASIL. Boletim Epidemiológico 46. **2020**, *51*. Governmental Document. Online source: https://www.gov.br/sau.gov.br/sau.gov.br/media/pdf/2020/dezembro/09/boletim_epidemiologico_svs_46.pdf (Accessed on 22nd December 2021).
7. BRASIL. Boletim Epidemiológico 31. **2021**, *52*, 20–30. Governmental Document. Online source: https://www.gov.br/sau.gov.br/sau.gov.br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/2021/boletim_epidemiologico_svs_31.pdf (Accessed on 22nd December 2021).
8. Possas, C.; Lourenco-de-Oliveira, R.; Tauil, P.L.; Pinheiro, F.P.; Pissinatti, A.; Cunha, R.V.D.; Freire, M.; Martins, R.M.; Homma, A. Yellow fever outbreak in Brazil: The puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, e180278. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180278>.
9. Maljkovic Berry, I.; Eyase, F.; Pollett, S.; Konongoi, S.L.; Joyce, M.G.; Figueroa, K.; Ofula, V.; Koka, H.; Koskei, E.; Nyunja, A.; et al. Global Outbreaks and Origins of a Chikungunya Virus Variant Carrying Mutations Which May Increase Fitness for Aedes aegypti: Revelations from the 2016 Mandra, Kenya Outbreak. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *100*, 1249–1257. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0980>.
10. Tsetsarkin, K.A.; Vanlandingham, D.L.; McGee, C.E.; Higgs, S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>.
11. Ebel, G.D.; Carricaburu, J.; Young, D.; Bernard, K.A.; Kramer, L.D. Genetic and phenotypic variation of West Nile virus in New York, 2000–2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *71*, 493–500.
12. Snapinn, K.W.; Holmes, E.C.; Young, D.S.; Bernard, K.A.; Kramer, L.D.; Ebel, G.D. Declining growth rate of West Nile virus in North America. *J. Virol.* **2007**, *81*, 2531–2534. <https://doi.org/10.1128/JVI.02169-06>.
13. Moudy, R.M.; Zhang, B.; Shi, P.Y.; Kramer, L.D. West Nile virus envelope protein glycosylation is required for efficient viral transmission by Culex vectors. *Virology* **2009**, *387*, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.038>.
14. Bonaldo, M.C.; Gomez, M.M.; Dos Santos, A.A.; Abreu, F.V.S.; Ferreira-de-Brito, A.; Miranda, R.M.; Castro, M.G.; Lourenco-de-Oliveira, R. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2017**, *112*, 447–451. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170134>.
15. Gomez, M.M.; Abreu, F.V.S.; Santos, A.; Mello, I.S.; Santos, M.P.; Ribeiro, I.P.; Ferreira-de-Brito, A.; Miranda, R.M.; Castro, M.G.; Ribeiro, M.S.; et al. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016–2017 Brazilian outbreak. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 536–548. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001033>.
16. Noske, G.D.; Gawriljuk, V.O.; Fernandes, R.S.; Furtado, N.D.; Bonaldo, M.C.; Oliva, G.; Godoy, A.S. Structural characterization and polymorphism analysis of the NS2B-NS3 protease from the 2017 Brazilian circulating strain of Yellow Fever virus. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2020**, *1864*, 129521. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129521>.
17. Furtado, N.D.; Raphael, L.M.; Ribeiro, I.P.; de Mello, I.S.; Fernandes, D.R.; Gomez, M.M.; Dos Santos, A.A.C.; Nogueira, M.D.S.; de Castro, M.G.; de Abreu, F.V.S.; et al. Biological Characterization of Yellow Fever Viruses Isolated from Non-Human Primates in Brazil with Distinct Genomic Landscapes. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 757084. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.757084>.
18. De Mello, I.S.; Fernandes, D.R.; Furtado, N.D.; Dos Santos, A.A.C.; Dos Santos, M.P.; Ribeiro, I.P.; Raphael, L.M.S.; Nogueira, M.D.S.; da Cruz, S.O.D.; Rocha, A.D.S.; et al. Recovery of Synthetic Zika Virus Based on Rio-U1 Isolate Using a Genetically Stable Two Plasmid System and cDNA Amplification. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 639655. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.639655>.

19. Auguste, A.J.; Lemey, P.; Bergren, N.A.; Giambalvo, D.; Moncada, M.; Moron, D.; Hernandez, R.; Navarro, J.C.; Weaver, S.C. Enzootic transmission of yellow fever virus, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 99–102. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140814>.
20. Abreu, F.V.S.; Ribeiro, I.P.; Ferreira-de-Brito, A.; Santos, A.; Miranda, R.M.; Bonelly, I.S.; Neves, M.; Bersot, M.I.; Santos, T.P.D.; Gomes, M.Q.; et al. Haemagogus leucocelaenus and Haemagogus janthinomys are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 218–231. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>.
21. Bonaldo, M.C.; Garratt, R.C.; Caufour, P.S.; Freire, M.S.; Rodrigues, M.M.; Nussenzweig, R.S.; Galler, R. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 873–885. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5258>.
22. Barrett, A.D.; Gould, E.A. Comparison of neurovirulence of different strains of yellow fever virus in mice. *J. Gen. Virol.* **1986**, *67 Pt 4*, 631–637. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-4-631>.
23. Aliota, M.T.; Caine, E.A.; Walker, E.C.; Larkin, K.E.; Camacho, E.; Osorio, J.E. Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004682. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004682>.
24. Abreu, F.V.S.; Delatorre, E.; Dos Santos, A.A.C.; Ferreira-de-Brito, A.; de Castro, M.G.; Ribeiro, I.P.; Furtado, N.D.; Vargas, W.P.; Ribeiro, M.S.; Meneguete, P.; et al. Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2019**, *114*, e190076. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190076>.
25. Delatorre, E.; de Abreu, F.V.S.; Ribeiro, I.P.; Gomez, M.M.; Dos Santos, A.A.C.; Ferreira-de-Brito, A.; Neves, M.; Bonelly, I.; de Miranda, R.M.; Furtado, N.D.; et al. Distinct YFV Lineages Co-Circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions from 2015 to 2018. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1079. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01079>.
26. Fitzgeorge, R.; Bradish, C.J. The in vivo differentiation of strains of yellow fever virus in mice. *J. Gen. Virol.* **1980**, *46*, 1–13. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-46-1-1>.
27. Fuchs, J.; Chu, H.; O'Day, P.; Pyles, R.; Bourne, N.; Das, S.C.; Milligan, G.N.; Barrett, A.D.; Partidos, C.D.; Osorio, J.E. Investigating the efficacy of monovalent and tetravalent dengue vaccine formulations against DENV-4 challenge in AG129 mice. *Vaccine* **2014**, *32*, 6537–6543. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.087>.
28. Partidos, C.D.; Weger, J.; Brewoo, J.; Seymour, R.; Borland, E.M.; Ledermann, J.P.; Powers, A.M.; Weaver, S.C.; Stinchcomb, D.T.; Osorio, J.E. Probing the attenuation and protective efficacy of a candidate chikungunya virus vaccine in mice with compromised interferon (IFN) signaling. *Vaccine* **2011**, *29*, 3067–3073. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.076>.
29. Sumathy, K.; Kulkarni, B.; Gondu, R.K.; Ponnuru, S.K.; Bonguram, N.; Eligeti, R.; Gadiyaram, S.; Praturi, U.; Chougule, B.; Karunakaran, L.; et al. Protective efficacy of Zika vaccine in AG129 mouse model. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46375. <https://doi.org/10.1038/srep46375>.
30. Meier, K.C.; Gardner, C.L.; Khoretchenko, M.V.; Klimstra, W.B.; Ryman, K.D. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000614. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000614>.
31. Thibodeaux, B.A.; Garbino, N.C.; Liss, N.M.; Piper, J.; Blair, C.D.; Roehrig, J.T. A small animal peripheral challenge model of yellow fever using interferon-receptor deficient mice and the 17D-204 vaccine strain. *Vaccine* **2012**, *30*, 3180–3187. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.003>.
32. Zompi, S.; Santich, B.H.; Beatty, P.R.; Harris, E. Protection from secondary dengue virus infection in a mouse model reveals the role of serotype cross-reactive B and T cells. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 404–416. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102124>.
33. Laurent-Rolle, M.; Morrison, J.; Rajsbaum, R.; Macleod, J.M.L.; Pisanelli, G.; Pham, A.; Ayllon, J.; Miorin, L.; Martinez, C.; ten-Oever, B.R.; et al. The interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by type I interferon. *Cell Host Microbe* **2014**, *16*, 314–327. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.015>.
34. Miorin, L.; Laurent-Rolle, M.; Pisanelli, G.; Co, P.H.; Albrecht, R.A.; Garcia-Sastre, A.; Morrison, J. Host-Specific NS5 Ubiquitination Determines Yellow Fever Virus Tropism. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00151-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00151-19>.
35. Kleinert, R.D.V.; Montoya-Diaz, E.; Khera, T.; Welsch, K.; Tegtmeyer, B.; Hoehl, S.; Ciesek, S.; Brown, R.J.P. Yellow Fever: Integrating Current Knowledge with Technological Innovations to Identify Strategies for Controlling a Re-Emerging Virus. *Viruses* **2019**, *11*, 960. <https://doi.org/10.3390/v11100960>.
36. Li, Y.; Yang, Z. Adaptive Diversification between Yellow Fever Virus West African and South American Lineages: A Genome-Wide Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *96*, 727–734. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0698>.

Supplementary Material

Phenotypic and genetic studies of the viral lineage associated with the recent yellow fever outbreak in Brazil

Authors: Nathália Dias Furtado¹, Mariela Martínez Gómez¹, Iasmim Silva de Mello¹, Déberli Ruiz Fernandes¹, Myrna Cristina Bonaldo^{1*}

¹ Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

* Correspondence author: mbonaldo@ioc.fiocruz.br

Table S 1 - Oligonucleotide sequences for the site-directed mutagenesis in NS3 and NS5 proteins.

Forward Primer		Reverse Primer	
ID	Sequence (5' → 3')	ID	Sequence (5' → 3')
NS3_D88E(+)	GGCGGCTCATGGAAGTTGGAGGGTAGA TGGGAT	NS3_D88E(-)	ATCCCATCTACCCTCCAACCTCCATGAG CCGCC
NS3_K121R(+)	CCAAGCCTATTCAAGTTAGGAATGGA GGAGAAATTGGG	NS3_K121R(-)	CCCAATTTCTCCTCCATTCCCTAACCTTG AATAGGCTTGG
NS5_R101K(+)	GAGAAGTGAGTGGGGTCAAGGGATTCA CCCTT	NS5_R101K(-)	AAGGGTGAATCCCTTGACCCCACTCACT TCTC
NS5_I138V(+)	CCATCGCCTTGAGCCGGTAAAGTGTGAT ACCCT	NS5_I138V(-)	AGGGTATCACACTTTACCGGCTCAAGG CGATGG
NS5_S173G(+)	CTGTTGAGAAATGGTTGGGCTGTGGTGT TGAAAGC	NS5_S173G(-)	GCTTTCAACACCACAGCCCAACCATTT TCAACAG
NS5_S297N(+)	CACCGCCACTTGGTTCCATGATAATGAC AACCCCTA	NS5_S297N(-)	TAAGGGTTGTCATTATCATGGAACCAA GTGGCGGTG
NS5_A634V(+)	GGACTGTGACGACACGGTTTTGACCAAG CTTGAAG	NS5_A634V(-)	CTTCAAGCTTGGTCAAAACCGTGTGTCGTC ACAGTCC
NS5_S709N(+)	AAAAGGATGGGATGACTGGGAGAATGT GCCTTTTT	NS5_S709N(-)	CAAAAGGGCACATTCTCCAGTCATCC CATCCTTTT

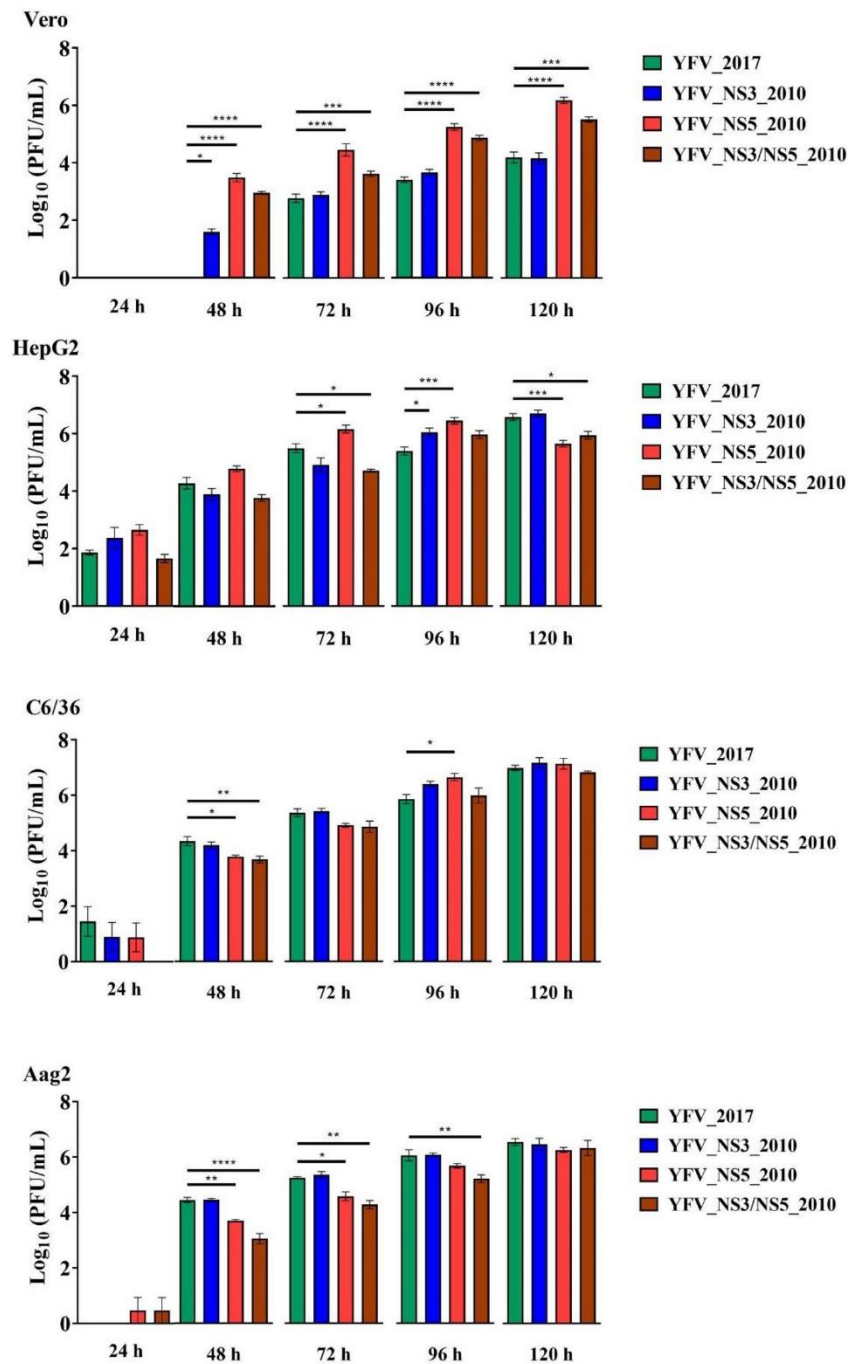


Figure S 1 - Statistical analysis of the viral replication kinetics in Vero (A), HepG2 (B), C6/36 (C) and Aag2 (D). Viral titers average of each YFV isolate were compared using One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test: * represents $p \leq 0.05$, ** represents $p \leq 0.01$, *** represents $p \leq 0.001$ and **** represents $p \leq 0.0001$.

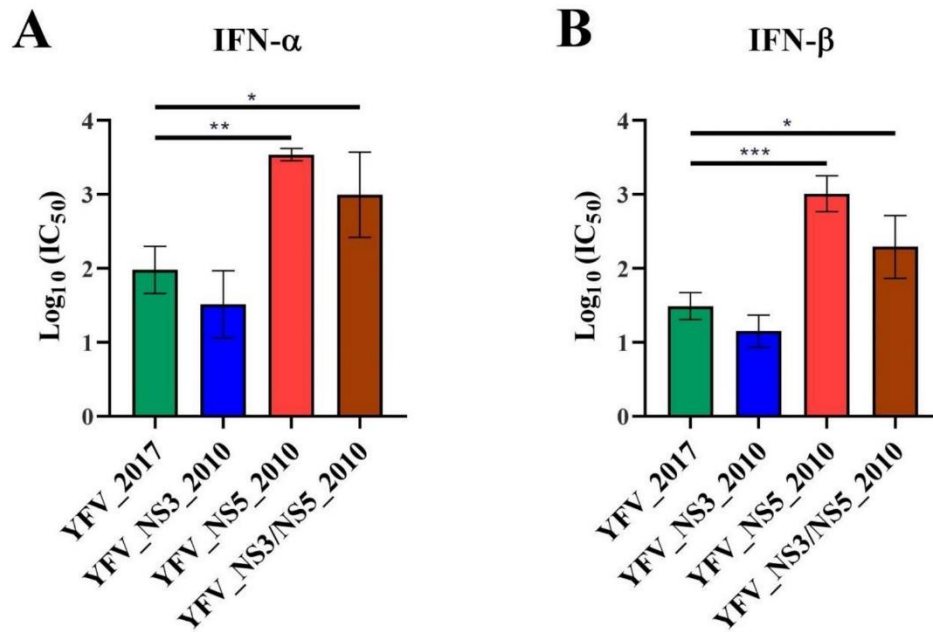


Figure S 2 - Statistical analysis of IC₅₀ values generated after viral infection under treatment with IFN-I. The IC₅₀ values of each replicate were plotted in a column table and analyzed for statistical differences. The test applied was One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test: * represents $P \leq 0.05$, ** represents $P \leq 0.01$, *** represents $P \leq 0.001$ and **** represents $P \leq 0.0001$.

Table S 2 – Follow-up of viral RNA copies/mL in blood samples from infected AG129 mice

Inoculated virus	Mouse	Survival time (days)	Viremia in RNA copies/mL by day post-inoculation (d.p.i.)					
			2	4	6	7	8	16
YFV 2017	1	16	0.00	7.96 x 10 ²	1.91 x 10 ⁴	n.d.	7.35 x 10 ³	7.28 x 10 ¹
	2	16	0.00	2.20 x 10 ²	2.05 x 10 ⁴	n.d.	4.03 x 10 ³	1.42 x 10 ²
	3	16	0.00	4.53 x 10 ²	3.53 x 10 ⁴	n.d.	2.48 x 10 ⁴	8.62 x 10 ⁰
	4	6	7.11 x 10 ²	7.42 x 10 ⁴	1.53 x 10 ⁵	●	●	●
	5	6	1.64 x 10 ³	1.65 x 10 ⁵	1.86 x 10 ⁵	●	●	●
	6	16	2.30 x 10 ³	3.13 x 10 ⁵	6.15 x 10^{5*}	n.d.	1.86 x 10 ⁵	1.45 x 10 ³
YFV NS3 2010	1	16	0.00	2.74 x 10 ²	7.35 x 10 ³	n.d.	1.63 x 10 ³	1.85 x 10 ²
	2	16	2.15 x 10 ¹	1.49 x 10 ²	1.73 x 10 ⁴	n.d.	7.33 x 10 ³	3.72 x 10 ²
	3	16	0.00	1.25 x 10 ²	1.06 x 10 ⁴	n.d.	1.39 x 10 ³	1.54 x 10 ²
	4	16	2.91 x 10 ²	6.56 x 10 ⁴	1.61 x 10 ⁴	n.d.	1.68 x 10 ³	2.90 x 10 ²
	5	16	4.53 x 10 ²	6.04 x 10 ⁴	8.09 x 10 ⁴	n.d.	1.02 x 10 ⁴	1.01 x 10 ³
	6	16	2.65 x 10 ³	1.28 x 10^{5*}	1.18 x 10 ⁵	n.d.	1.21 x 10 ⁴	1.18 x 10 ³
YFV NS5 2010	1	7	0.00	1.37 x 10 ³	4.32 x 10 ⁵	8.94 x 10 ⁴	●	●
	2	7	0.00	1.46 x 10 ³	3.51 x 10 ⁵	1.03 x 10 ⁵	●	●
	3	7	1.04 x 10 ¹	4.19 x 10 ³	4.06 x 10^{6*}	9.31 x 10 ⁵	●	●
	4	6	2.29 x 10 ²	2.02 x 10 ⁵	5.26 x 10 ⁵	●	●	●
	5	6	2.93 x 10 ²	1.64 x 10 ⁵	2.20 x 10 ⁶	●	●	●
	6	6	1.01 x 10 ³	2.78 x 10 ⁵	3.59 x 10 ⁶	●	●	●
YFV NS3/NS5 2010	1	7	0.00	4.44 x 10 ³	4.40 x 10 ⁵	6.38 x 10 ⁴	●	●
	2	7	0.00	1.29 x 10 ²	1.25 x 10 ⁵	3.63 x 10 ⁴	●	●
	3	7	0.00	1.05 x 10 ³	1.48 x 10 ⁵	5.04 x 10 ⁴	●	●
	4	7	6.42 x 10 ¹	9.77 x 10 ⁴	1.64 x 10 ⁶	1.05 x 10 ³	●	●
	5	7	3.24 x 10 ²	1.99 x 10 ⁵	1.66 x 10^{6*}	5.37 x 10 ³	●	●
	6	7	2.49 x 10 ²	2.15 x 10 ⁵	1.13 x 10 ⁶	2.64 x 10 ³	●	●

n.d.= non-determined viremia; ● = post-euthanasia period; * viremia peak

Average viremia at euthanasia for each YFV infected mice (RNA copies/mL):

Virus	Day post-inoculation	Viremia (RNA copies/mL)
YFV_2017	16	4,19 x 10 ²
	6	1,69 x 10 ⁵
YFV_NS3_2010	16	5,32 x 10 ²
YFV_NS5_2010	6	2,11 x 10 ⁶
	7	3,74 x 10 ⁵
YFV_NS3/NS5_2010	7	2,66 x 10 ⁴

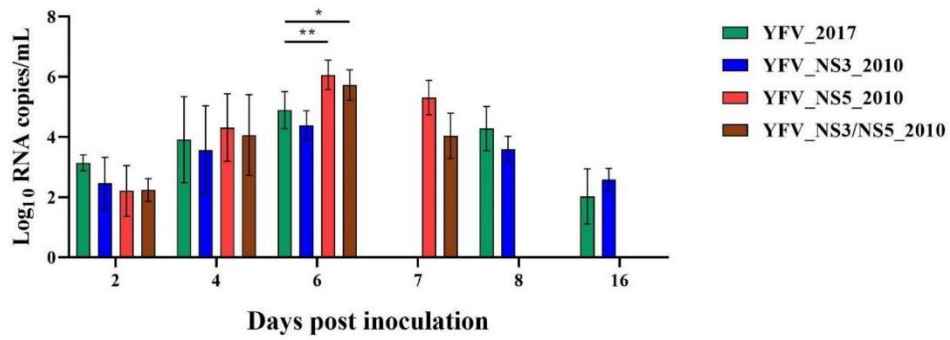


Figure S 3 - Statistical analysis of viremia values of viral RNA copies/mL in blood samples from infected AG129 mice. The \log_{10} values of viral loads in the blood of AG129 mice were compared by One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test: * represents $P \leq 0.05$, ** represents $P \leq 0.01$.

5 Discussão

A diversidade genética da linhagem SA-I do YFV é, notavelmente, regida pela variabilidade das cepas brasileiras, que estão subdivididas em clados agrupados geograficamente e temporalmente (44). Observa-se que o YFV tem apresentado uma migração contínua em direção ao litoral e ao sul do país desde o início do século, sendo essa dispersão protagonizada pela sub-linhagem moderna 1E, da linhagem SA-I (49). A circulação silenciosa e majoritariamente enzoótica, restrita às regiões Norte e Centro-Oeste, do YFV no Brasil do século passado contrasta com o elevado número de PNH e humanos infectados com o vírus, inclusive em regiões consideradas livres da doença. Essa diferença é, certamente, multifatorial, mantendo a sub-linhagem 1E um papel crucial na disseminação e dispersão viral (74).

Estudos de biodiversidade e de condições climáticas e geográficas, apontam um conjunto de fatores que levaram a maior dispersão e desencadeamento do surto de febre amarela no Brasil entre 2016 e 2018. Comprovou-se que as regiões de áreas florestais ou fragmentos florestais cercados de pastagens foram as mais afetadas e consideradas como maior risco, no Brasil (177-180). Além disso, as populações de vetores silvestres tiveram um aumento em densidade durante o período em que ocorreu o surto, contribuindo para a velocidade da dispersão viral em direção ao sudeste brasileiro, ao infectarem PNH susceptíveis da região (58, 177). Outro fator importante são as alterações climáticas ocasionadas pelo próprio aquecimento global, assim como fenômenos naturais como El Niño, La Niña e desastres ecológicos (58). Estudos correlacionaram o início do surto com o aumento de temperatura, ocasionando períodos de seca, seguidos de chuva (181, 182). Entre os principais fatores que ocasionaram a dispersão da febre amarela, a cepa circulante poderia ser determinante para alcançar maior dispersão espaço-temporal (74).

Até o presente momento, o período de maior circulação desta sub-linhagem viral ocorreu a partir do surto iniciado em 2016, tendo o pico de casos entre final de 2017 e meados de 2018. A provável origem deste surto foi a introdução do YFV do Centro-Oeste, seguindo duas rotas em direção aos estados do sudeste, uma que se origina no estado de Minas Gerais, dispersando para os estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro; e outra rota por onde o YFV foi introduzido no estado de São Paulo, disseminando para o Rio de Janeiro (66, 67). Estudos moleculares identificaram que o vírus circulante a partir de 2016 da sub-linhagem 1E apresenta um conjunto de alterações genéticas características (72, 73). Neste trabalho, nosso principal objetivo foi tentar correlacionar variações genéticas, em especial as associadas a polimorfismo de aminoácidos ocorrentes no YFV que provocou os surtos epidêmicos no presente século, com um potencial incremento de virulência viral.

A contribuição destas variações na poliproteína viral para a magnitude do surto e a disseminação do YFV não tinha sido ainda avaliada. Essa tese teve por principal propósito estabelecer a função do conjunto de variações observadas no vírus que protagonizou o surto no sudeste do Brasil em 2016-2018 e segue circulando no país (64).

Nós tentamos responder ao questionamento sobre a possível modulação da infectividade viral por essas alterações genéticas utilizando modelos de infecção celular e animal. Utilizamos células Vero, HepG2, C6/36 e Aag2. Os dois primeiros modelos celulares são derivados de mamíferos, representantes de espécies susceptíveis à infecção pelo YFV. Da mesma maneira, as células C6/36 e Aag2 são derivadas de mosquitos do gênero *Aedes*, gênero este do qual pertence uma espécie de mosquito vetor da forma urbana da febre amarela.

As células Vero, originárias de rim de macaco verde africano, são suscetíveis à infecção por arbovírus e amplamente utilizadas para estudos de isolamento e ensaios de placas (183). Células Vero são hipodiplóides e se proliferam de maneira não tumorigênica, podendo ser cultivadas para produção de massa viral gerando menos contaminantes de *debris* celulares, sendo assim utilizadas para produção de vacinas (183). Além disso, as células dessa linhagem têm em homozigose, uma deleção no cromossomo 12 que as torna incapazes de produzir interferon α e $\beta 1$, do cluster de interferon I (IFN-I) que tem função antiviral (184). Essa deleção as torna suscetíveis a diversos agentes patogênicos, entre eles, os flavivírus.

Assim como as células Vero, as células C6/36 são susceptíveis à infecção por flavivírus. Essa linhagem de células foi estabelecida de homogenato de larvas de mosquito *Aedes albopictus*, um dos potenciais vetores de transmissão do vírus FA (185). Células de invertebrados infectadas com arbovírus apresentam atividade antiviral através de RNAi e das vias de sinalização Toll, JAK/STAT e Imd/Jnk. A permissividade das células C6/36 aos arbovírus deve-se à ausência de siRNA típicos da imunidade mediada por RNAi (186).

Em contraste, as células Aag2 foram derivadas de homogenato de larvas de mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, que possuem resposta imune similar aos mosquitos em si (187, 188). As células HepG2 foram isoladas de hepatoma humano, sendo assim, provenientes de um tecido pelo qual o YFV tem tropismo durante a disseminação em hospedeiros humanos (42). Estas células possuem um número modal de 55 cromossomos, têm morfologia de epitélio e proliferam de maneira não-tumorigênica (189). As células HepG2 produzem citocinas e IFN- α de maneira constitutiva (190, 191), ao contrário das células Vero. Portanto, a atividade antiviral do IFN- α em HepG2, assim como a capacidade de resposta imune presente nas células Aag2, pode restringir a proliferação *in vitro*, acentuando as diferenças na capacidade replicativa dos YFV.

Em se tratando de modelo animal para o estudo da virulência dos YFV estudados, procedemos à inoculação de camundongos das linhagens BALB/c e AG129. Para avaliar a

neurovirulência dos YFV, realizamos a inoculação intracerebral de camundongos BALB/c. Este procedimento é amplamente utilizado para avaliar YFV, sendo um teste clássico de virulência para YFV. Esta via de inoculação de YFV é altamente letal em camundongos, induzindo uma taxa de 100 % de mortalidade após 10 dias da inoculação, em média, em camundongos Swiss e BALB/c (192, 193). Para avaliar a virulência a partir de inoculação subcutânea, utilizamos um modelo susceptível à infecção; os camundongos AG129, deficientes na resposta por IFN- α , β e γ , componentes importantes na resposta antiviral inicial do organismo. Este modelo tem sido empregado em uma série de estudos importantes em ZIKV e YFV, onde se observa alta letalidade (194-196).

Além dos ensaios de virulência, avaliamos a capacidade desses YFV de resistir à resposta mediada por IFN-I. Essas citocinas secretadas por células eucariotas de mamíferos possuem um papel fundamental na defesa contra infecções virais. Moléculas de IFN-I são produzidas pelas células a partir da detecção de padrões *non-self* (197, 198). No caso dos flavivírus, a resposta imune inata é desencadeada pelo reconhecimento do RNA viral pelos fatores citoplasmáticos RIG-I e MDA5, culminando na produção de IFN-I (199). Após a secreção, as citocinas interagem com os receptores celulares IFNAR, desencadeando uma cascata de sinalização mediada pela transdução de sinal via JAK-STAT, induzindo a expressão de diversos genes com funções imunorreguladoras e antivirais (200).

Parte das proteínas não estruturais dos flavivírus desempenham funções de antagonismo à resposta imune desencadeada por IFN-I para estabelecer infecção bem-sucedida em mamíferos. A proteína NS5 de diversos flavivírus foi demonstrada como a antagonista mais ativa e potente da sinalização de IFN-I apresentando, entretanto, mecanismos diferentes para a inibição entre as espécies de flavivírus. Especula-se que, por ser a maior proteína não estrutural e por ser produzida em excesso em células infectadas, esta proteína poderia ter uma maior possibilidade de adquirir funções adicionais (201). Tendo em vista que os marcadores moleculares estudados neste trabalho estão, em sua maioria, localizados em proteínas não estruturais, e especialmente, na proteína NS5, optamos por avaliar o antagonismo da resposta mediada por IFN-I em células Vero. Como mencionado acima, estas células são deficientes na produção de IFN-I, porém possuem os receptores IFNAR e os demais componentes da cascata de sinalização funcionais. Ao tratar as células com IFN-I, a resposta imune inata mediada por estas citocinas foi montada, de maneira controlada, para avaliar o antagonismo desses YFV.

A primeira abordagem que desenvolvemos consistiu na caracterização de quatro vírus isolados de PNH infectados no Brasil. Dois desses isolados não carregavam os marcadores moleculares do vírus associado ao surto do Sudeste em 2016-2018, os vírus PR4408 e GO05. O primeiro foi isolado em 2008 durante um surto anterior de menor magnitude que atingiu PNH

em diferentes regiões do sudeste e sul do Brasil, incluindo Rio Grande do Sul (RS), onde foram coletadas as amostras para isolamento do PR4408. O isolado GO05 foi derivado de amostra coletada de PNH em 2017, ou seja, durante o surto, no estado de Goiás (GO), no centro-oeste do país. A identificação desse vírus sem os marcadores genéticos característicos durante o surto em 2017, na região de transição, por onde o vírus atravessou para atingir os estados do Sudeste, provou que existiu uma co-circulação dessas duas variantes da sub-linhagem 1E (66). Os outros dois isolados possuíam a assinatura molecular característica que surgiu na época do surto no Sudeste, os vírus ES-504 e RJ 155. O isolado ES-504 foi derivado de amostras de um PNH infectado no estado do Espírito Santo (ES), em 2017 (72). Por outro lado, o vírus RJ 155 foi isolado de um PNH que veio a óbito no estado do Rio de Janeiro (RJ), em 2019, quando já não havia um número massivo de notificações de febre amarela no Sudeste. De fato, esta foi a última notificação de circulação do YFV no Sudeste, portanto, após três ciclos de transmissão (63). Esses dois últimos isolados fazem parte da rota de dispersão que iniciou no Centro-Oeste e seguiu pelos estados de Minas Gerais (MG), Espírito Santo e Rio de Janeiro, por onde seguiram a rota da região costeira da cadeia montanhosa Serra do Mar (66).

Os quatro vírus isolados foram comparados quanto à infectividade em células de mosquitos (C6/36 e Aag2) e células de PNH e humanos (Vero e HepG2, respectivamente). Em complementariedade aos ensaios de infectividade para determinar os efeitos dos marcadores genéticos na virulência viral, os isolados também foram avaliados quanto à neurovirulência em camundongos BALB/c inoculados intracerebralmente. Além disso, comparamos a capacidade de escape à resposta imune inata antiviral mediada por IFN-I.

Os resultados indicaram que o vírus RJ 155, que carregava a assinatura molecular, e o vírus PR4408, que não carregava esses marcadores, apresentaram maior infectividade em células de mamíferos, maior neurovirulência e maior resistência aos efeitos estimulados por IFN-I. Comparando as sequências genômicas desses dois isolados, observamos que a maioria dos polimorfismos, além dos evidenciados na assinatura molecular 2016-2019, estão localizados em proteínas não estruturais, mas não encontramos nenhum marcador em comum. Portanto, não foi possível relacionar algum marcador com efeito na virulência viral ou no escape a resposta antiviral. Isto indica que os fenótipos desses dois YFV isolados não refletem uma correlação entre marcadores genéticos e virulência do YFV, nos modelos estudados, pertencentes ao subclado 1E. Mediante esses resultados, procedemos a comparações entre vírus sem assinatura molecular, agrupados como YFV 2000-2010, e entre os vírus que carregavam a assinatura, YFV 2016-2019.

Os isolados do grupo YFV 2000-2010 possuem quatro marcadores distintos cada um, que não ocorrem nos dois representantes do grupo YFV 2016-2019. Os quatro marcadores do

vírus PR4408 poderiam estar relacionados ao fenótipo observado, ou seja, menor infectividade em células Aag2, em contraste com maior infectividade em células de mamífero e maior neurovirulência. Por outro lado, os quatro marcadores do vírus GO05 é que poderiam estar associados ao fenótipo mais atenuado. Desse modo, não foi possível associar quaisquer destes marcadores moleculares com as diferenças observadas nos nossos estudos de infecção. Na reconstrução filogenética, observamos que estes dois isolados são filogeneticamente mais distantes que os outros dois isolados do grupo YFV 2016-2019. Portanto, a comparação de vírus coletados geograficamente (região sul e região centro-oeste) e temporalmente distantes (nove anos de diferença entre as datas de coleta), pode não cumprir o objetivo de determinar relação entre marcador genético e fenótipo. Portanto, dentro do grupo YFV 2000-2010, não foi possível determinar o papel de nenhum dos oito marcadores na modulação da virulência do vírus da febre amarela. Por outro lado, quando comparamos PR4408 e RJ 155, foi possível associar a maior virulência destes vírus, nos modelos de mamíferos estudados nesta tese, com diferentes conjuntos de marcadores de variações de aminoácidos na poliproteína precursora viral. Portanto, a modulação da virulência pode ser potencialmente dada por um ou mais marcadores genéticos variáveis.

Em contraste, os vírus do grupo YFV 2016-2019 foram ambos coletados no Sudeste, com diferença de dois anos entre as datas de coleta. A mesma reconstrução filogenética revelou que os vírus ES-504 e RJ 155 apresentam uma relação filogenética mais próxima que os vírus do grupo YFV 2000-2010. Dessa forma, foi possível tirar conclusões quanto ao efeito de marcadores genéticos no fenótipo viral. Identificamos seis alterações genéticas no isolado RJ 155, inexistentes no isolado ES-504, distribuídos nas proteínas C (1), NS1 (1), NS3 (1) e NS5 (3) que poderiam estar associadas ao aumento na virulência.

Observamos dois fatos notáveis: a) a maioria dos marcadores foram mapeados em proteínas não estruturais e b) metade dessas alterações estão agrupadas na proteína NS5. Além disso, a maioria dessas diferenças genômicas são sinônimas, ou seja, não alteram a composição de aminoácidos. É importante considerar, que dois terços do genoma codificam proteínas não estruturais, e a maior delas é a proteína NS5. Portanto, se o processo de substituição ocorresse completamente ao acaso, haveria maior chance de surgirem mutações nas regiões gênicas de proteínas não estruturais. Por outro lado, sabe-se que as proteínas estruturais estão fisicamente mais expostas a receptores e interações primárias com os hospedeiros e vetores que as proteínas não estruturais. Assim, a pressão seletiva sobre essas proteínas deve ser maior para que o vírus mantenha a capacidade de infectar os tipos celulares de ambos os hospedeiros, artrópodes e primatas. As proteínas não estruturais atuam principalmente no RE durante a replicação e interagem com proteínas intracelulares dos hospedeiros (121, 202).

A única diferença entre o YFV RJ 155 e o YFV ES-504 observada em um gene estrutural está localizada na hélice $\alpha 5$ da proteína do capsídeo, bem próxima à sequência de reconhecimento para a clivagem pela protease viral, NS2B-NS3. A alteração consiste na substituição de um resíduo de glutamina (Q) por um resíduo de arginina (R), acrescentando carga positiva à região. É possível que esta substituição module de alguma forma, a clivagem entre as três α -hélices que formam a proteína C madura e a hélice de ancoragem $\alpha 5$. Essa modulação precisa ser coordenada com a clivagem pela signal peptidase entre as extremidades C-terminal da hélice $\alpha 5$ e N-terminal da proteína estrutural prM, para que esse resíduo, de fato, contribua com o fenótipo virulento apresentado pelo isolado RJ 155 (203).

A substituição na proteína NS1 tem caráter conservativo e se localiza no domínio denominado α/β -wing. Esse domínio está relacionado com a interação da NS1 com proteínas de membrana do RE, direcionando o enovelamento correto da NS1. Essa proteína interage com o complexo replicativo, assim como com fatores localizados no lúmen do RE, controlando a taxa de replicação de RNA (204, 205). A substituição do resíduo de ácido glutâmico (E) para um resíduo de ácido aspártico (D), por si só, pode não exercer o efeito que resulta no fenótipo observado para o vírus RJ 155, mas pode consistir em um efeito sinérgico com as demais alterações. O marcador do isolado RJ 155 na proteína NS3 é o único que consiste em uma substituição não conservativa, de um resíduo E para um resíduo de glicina (G). Esse resíduo está localizado em uma região de *loop* no domínio II da NS3hel. A seleção de um resíduo de G pode ter conferido maior flexibilidade para a região, porém as implicações funcionais são mais difíceis de serem inferidas.

As três alterações do vírus RJ 155 são semi-conservativas e estão localizadas no domínio “palma” da RdRp. Uma está em uma região de estrutura flexível de *loop*, e as duas outras estão em α -hélices. Essas duas últimas estão na região do “fundo da palma” da RdRp, entre os dois motivos mais conservados das RdRp de vírus RNA, que é uma região variável entre vírus transmitidos por diferentes hospedeiros. As variações dessa região podem apresentar pouca influência na função catalítica da RdRp, porém estão envolvidas com a adaptação à hospedeiros, possivelmente por ser uma região exposta a interação com solventes e outras moléculas do hospedeiro (206). Assim, podemos concluir que o vírus RJ 155 adquiriu um repertório de alterações que o tornaram mais virulento em sistema celular e em cérebro de camundongos. Portanto, os seis marcadores moleculares podem ter influência no aumento do *fitness* viral e da virulência do YFV. Este primeiro estudo forneceu um vislumbre da variabilidade fenotípica e potenciais moduladores da virulência de vírus dessa sub-linhagem que circularam em tempos e zonas geográficas diferentes.

Quanto à assinatura molecular, nessa primeira abordagem foi possível correlacionar fenótipo viral com esses marcadores quando comparamos a taxa de replicação em células de mosquito Aag2. Os vírus do grupo YFV 2000-2010 apresentaram menores títulos que os vírus do grupo YFV 2016-2019 nesse sistema. Entretanto, é necessário aferir o quanto que esse efeito seria reproduzido na natureza, em sistemas mais complexos como nos mosquitos vetores. Para isso, seria ideal inocular mosquitos silvestres dos gêneros *Sabethes* e *Haemagogus* e avaliar os fatores de competência vetorial.

Os vírus isolados, além das alterações de aminoácidos que consideramos neste estudo, possuem variações nucleotídicas sinônimas. Este tipo de mutações podem afetar diversos aspectos moleculares que também influenciam o fenótipo, incluindo modificações de transcrição (207), iniciação de tradução (208, 209), alongamento de tradução (210), precisão de tradução (211), estabilidade de RNA (212), estrutura de RNA e enovelamento (208, 213), frequência de uso de códons, influenciando igualmente na eficiência do ciclo replicativo viral (214, 215).

Considerando este cenário de variação inerente do vírus, nós optamos por avaliar o impacto destes marcadores moleculares utilizando uma abordagem mais controlada, a tecnologia de clones infecciosos por genética reversa. Nós sintetizamos YFV a partir da sequência do isolado ES-504, e utilizamos este clone infeccioso, denominado IC YFV 2017, para inserir mutações nas proteínas NS3 e NS5, revertendo os marcadores genéticos de interesse para os códons do vírus circulante entre 2000-2010. Os vírus sintéticos resultantes foram denominados YFV_2017, YFV_NS3_2010, YFV/MTase_2010, YFV_NS5_2010 e YFV_NS3/NS5_2010, e submetidos aos mesmos ensaios utilizados na caracterização de aspectos da virulência dos isolados selvagens do YFV, além de experimentação animal para avaliação de infectividade em camundongos susceptíveis, AG129, e aferição de atividade enzimática do domínio funcional MTase da proteína NS5. Os resultados obtidos permitiram obter conclusões quanto ao papel biológico da assinatura molecular nas proteínas não estruturais.

Os polimorfismos na proteína NS3 do YFV circulante no surto 2016-2019 foram inicialmente relacionados com aumento de estabilidade entre o cofator NS2B e o domínio NS3pro, por modelagem molecular (73). Esse efeito foi experimentalmente confirmado, quando foi realizado um ensaio de estabilidade com o complexo NS2B-NS3pro carreando apenas o resíduo de lisina (K) na posição 121. Entretanto, esse complexo apresentou menor processividade na atividade proteolítica. Por outro lado, o complexo NS2B-NS3pro que possui somente o resíduo D 88 apresenta um aumento de eficiência catalítica em relação ao complexo que carrega os dois marcadores, e diminuição de estabilidade estrutural (101). Assim, postula-

se que esses dois resíduos tenham um efeito sinérgico e que a alteração D 88 possa ter surgido apresentando maior atividade proteolítica, cujo declínio de estabilidade tenha sido compensado pelo marcador K 121, que poderia ter sido selecionada como uma mutação compensatória.

De fato, duas sequências de 1988 e 1989 obtidas de amostras em Trinidad e Tobago (GenBank: MW158345 e MW158346, respectivamente), e três sequências africanas de Uganda 2005 e 2010, e da Etiópia (GenBank: AY968065, JN620362 e DQ235229, respectivamente), apresentam o marcador D 88, tendo como resíduo na posição 121, R, mas nenhuma sequência do YFV disponível no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) apresenta o marcador K 121 sem a presença do resíduo D 88, em um levantamento recente (27/01/2022). Além disso, sequências de amostras provenientes da Angola possuem os dois marcadores D 88 e K 121 (73). Diante dessas informações, podemos sugerir duas conclusões: a) primeiramente, a seleção positiva desses marcadores na linhagem do vírus do leste/centro africano e na linhagem SA-I ocorreu de maneira independente; e b) a identificação de sequências dessas duas linhagens com o marcador D 88, sem o marcador K 121, sugere que o aumento de eficiência proteolítica ocasionado pelo resíduo D 88 tenha contribuído para a seleção deste marcador e da alteração compensatória K 121.

As comparações experimentais dos vírus sintéticos YFV_2017 (D 88; K 121) e YFV_NS3_2010 (E 88; R 121) mostraram que os marcadores em NS3pro não influenciaram substancialmente na infectividade nos quatro tipos celulares ou na resistência ao IFN-I, nem na neurovirulência em camundongos, com letalidade total dos animais. Entretanto, quando infectamos camundongos AG129 por via subcutânea, ambos os vírus apresentaram um alto grau de atenuação com YFV_NS3_2010 não provocando a morte dos animais, enquanto o YFV_2017 causou 80% de mortalidade. Estes resultados indicam que as variações em NS3 não estariam modulando a virulência neste modelo de infecção.

A assinatura molecular do YFV circulante na proteína NS5 consiste em seis substituições, distribuídas nos domínios MTase (3) e RdRp (3). Uma análise prévia desses marcadores por modelagem molecular comparativa da proteína NS5, localizou as alterações no domínio MTase no início da fenda catalítica e as do domínio RdRp na superfície da proteína em torno desta fenda, sendo uma delas mais próxima à alça conectora entre os domínios (73). A localização destas variações, na sua maioria ladeando a fenda catalítica de NS5 poderia estar indicando um papel na modulação da síntese e maturação do RNA viral (73).

As três alterações do domínio MTase estão espacialmente próximas, com uma distância de aproximadamente 10Å entre resíduos adjacentes (73). Os três resíduos também estão na região externa ao sítio de ligação com o doador de metila, SAM, ou seu subproduto, SAH. Os ensaios de atividade enzimática da MTase com e sem esses marcadores (MTase 2017 e MTase

2010, respectivamente) mostraram que os resíduos podem estar influenciando na conformação do sítio de ligação ao SAM/SAH, conseqüentemente, na afinidade da molécula à proteína. Esta variação na afinidade pode alterar a coordenação do processo de formação da estrutura de cap-1. A estrutura cap-1 do RNA viral consiste na metilação em N7 da guanosina, adicionada ao 5' do RNA pela atividade GTase do domínio MTase, seguida da metilação em 2'O da primeira nucleobase do genoma, A (125). Devido à existência de um único sítio de ligação ao SAM no domínio MTase, a coordenação desse processo depende de alterações conformacionais combinadas à associação de SAM ao sítio de ligação, a dissociação do subproduto da catálise SAH, e a reassociação de uma nova molécula de SAM (128, 129). Portanto, a maior afinidade apresentada pelo domínio MTase 2010 em relação ao MTase 2017 poderia representar um atraso na processividade da formação da estrutura de cap-1.

Entretanto, na comparação entre vírus sintéticos YFV_2017 e YFV/MTase_2010, não foi possível estabelecer diferenças na infectividade nos modelos estudados. As taxas de replicação em células de mosquito, Aag2, e em hepatócitos humanos, HepG2, não apresentaram uma divergência notável entre YFV_2017 e YFV/MTase_2010. Entretanto, foi possível determinar diferença estatisticamente significativa no segundo dia pós-infecção de células HepG2, onde o vírus com MTase 2017 apresentou maiores títulos virais que o vírus com MTase 2010. Esse resultado corrobora com as diferenças nas propriedades enzimáticas observadas utilizando as proteínas individuais. Adicionalmente, os marcadores moleculares na MTase não produziram efeito na neurovirulência em animais BALB/c e reduziram levemente a resistência viral a IFN-I. Foi demonstrado que o domínio MTase interage diretamente com proteínas da cascata de sinalização mediada por IFN-I, como a STAT2, facilitando o escape da resposta antiviral do hospedeiro (137, 139, 141, 216). Em conjunto, esses resultados sugerem que a assinatura molecular na MTase não exerce uma influência significativa na atividade catalítica e na infectividade viral.

As três alterações genéticas do domínio RdRp não foram avaliadas quanto ao seu papel na atividade catalítica da proteína, até o presente momento. Nessa tese, estudamos o papel das seis substituições na proteína NS5 utilizando a metodologia de genética reversa e comparamos os vírus sintéticos YFV_2017 e YFV_NS5_2010. Em relação à infectividade em modelo celular, constatamos que nas células de mosquito, Aag2 e C6/36, o vírus YFV_2017 apresentou maior taxa de infecção em relação ao vírus YFV_NS5_2010, o que foi mais evidente nas células Aag2. Em células de mamíferos, o contrário foi observado, sendo mais evidente a divergência de infectividade entre os vírus nas células Vero. Esse primeiro resultado indicou que os resíduos da assinatura molecular do vírus circulante na proteína NS5 podem estar envolvidos em um aumento de infectividade nos mosquitos vetores, representando algum tipo de adaptação. No

entanto, para confirmarmos estes dados iniciais é necessário analisar a infecção destes vírus em mosquitos selvagens transmissores da febre amarela.

Os resultados de sensibilidade a IFN-I corroboram com um possível papel de atenuação desses marcadores no YFV circulante nos hospedeiros primatas, visto que os YFV carreando os marcadores moleculares em NS5 apresentaram maior sensibilidade à resposta induzida por IFN-I que os YFV com esses marcadores representativos do YFV circulante antes do surto mais recente. Ambos os vírus YFV_2017 e YFV_NS5_2010 apresentam equiparável neurovirulência em camundongos BALB/c. Entretanto, no modelo de infecção animal em AG129, o vírus YFV_NS5_2010 produz um efeito contrastante com o vírus YFV_2017, causando sintomas que atingem o ponto de eutanásia em todos os animais até sete dias após a inoculação. Diante desses resultados, podemos afirmar que a assinatura molecular na proteína NS5 produz atenuação em modelos celulares e animais de mamíferos.

É notável que os efeitos produzidos pelas substituições somente no domínio MTase são mais brandos que os efeitos observados mediante as substituições nos dois domínios MTase e RdRp, sugerindo que os marcadores com maior efeito em virulência estão localizados no domínio RdRp. O papel das alterações em RdRp deve ser investigado, tanto no quesito da atividade de polimerase, expressando esse domínio e quantificando a atividade catalítica, quanto no contexto de vírus inteiro, construindo o vírus YFV/RdRp_2010. É possível que o efeito acentuado na infectividade do YFV produzido pelos seis marcadores moleculares seja sinérgico, tendo em vista que a ausência do domínio MTase influencia diretamente na atividade catalítica de RdRp (156). Além disso, a proteína NS5 pode ser encontrada em estado oligomérico em solução, que foi descrito por potencializar a catálise e a coordenação da síntese das fitas negativa e positivas de RNA viral (217, 218). A localização dos marcadores na superfície da proteína sugere que estes possam estar envolvidos nas interações entre monômeros. Adicionalmente, um dos resíduos da assinatura molecular está localizado mais próximo ao *loop* conector entre domínios, com potencial de modular a estabilidade conformacional dessa estrutura, conseqüentemente, influenciar a capacidade catalítica de polimerização (160).

Finalmente, a comparação entre YFV carreando ou não a assinatura molecular nas duas proteínas não estruturais, YFV_2017 e YFV_NS3/NS5_2010, respectivamente, sugere de maneira mais assertiva o efeito biológico desse conjunto de oito marcadores moleculares. Os resultados tanto em células, quanto em modelo murino, revelaram que o vírus YFV_NS3/NS5_2010 apresenta um fenótipo intermediário entre o observado para os vírus YFV_NS3_2010 e YFV_NS5_2010, sendo mais similar ao último. Isto é, YFV_NS5_2010 apresenta as maiores taxas de infectividade e letalidade em camundongos. Assim, constatamos

então, que existe uma redução significativa de infectividade em células de mamíferos que é reproduzido *in vivo* em modelo AG129. Enquanto, em sistema celular, o oposto é observado em células de mosquitos. Esses fatos precisam ser corroborados, avaliando o quanto são reprodutíveis na natureza. Um primeiro passo consistiria em inocular mosquitos silvestres que foram os vetores protagonistas da transmissão do YFV no Brasil, e obter indicativos de modulação de competência vetorial. A etapa mais complexa envolveria análise da patogenia e disseminação viral nos hospedeiros vertebrados, inicialmente em camundongos AG129, e posteriormente, em PNH.

Diante do conjunto de resultados apresentados nessa tese, podemos propor que as alterações que surgiram na proteína NS5 promoveram um aperfeiçoamento da relação entre o YFV e o mosquito vetor, porém induziram a uma atenuação importante nos hospedeiros primatas. Por conseguinte, as substituições na proteína NS3, que possuem precedentes em genoma de YFV, compensaram parcialmente a atenuação em hospedeiros mamíferos. Essa modulação da infectividade do YFV circulante no Brasil em vetores e primatas potencialmente influenciaram a dispersão viral pelo sudeste e sul do país, até os países vizinhos (64).

6 Conclusões

- Através do estudo dos quatro isolados selvagens do YFV, pudemos acessar parcialmente a variabilidade genética da sub-linhagem 1E associada a variabilidade fenotípica. A maioria das variações de aminoácidos estão concentradas na proteína NS5.
- O impacto da assinatura molecular YFV 2016-2019 não foi relacionado ao fitness replicativo nos modelos de infecção analisados. Entretanto, identificamos um conjunto de potenciais fatores de virulência nestes isolados.
- Utilizando a tecnologia do clone infeccioso, no contexto do YFV ES-504, para avaliação dos polimorfismos pertencentes a assinatura molecular encontrada em NS3 e NS5, foi possível observar que os marcadores na proteína NS5 promoveram um fenótipo atenuado em infecção em modelo celular de mamíferos e em camundongos.
- A MTase pré-surto exibiu uma maior afinidade pelo substrato SAM, embora tenha tido tem pouca influência catalítica ou na capacidade replicativa do YFV in vitro. No entanto, YFV sintético carregando estes marcadores foi menos sensível ao tratamento com IFN-I em células Vero. O papel dessas alterações nas vias mediadas por IFN-I necessita ser mais profundamente investigada.
- A comparação entre vírus sintéticos carregando a assinatura molecular, YFV_2017, ou não, YFV_NS3/NS5_2010, sugere um padrão de infectividade divergente nos modelos estudados de células de mosquitos e mamíferos, e em camundongos.
- Os marcadores de aminoácidos da proteína NS5 pré-surto tendem a promover uma maior replicação nas células Vero e HepG2 e promovem uma resistência consideravelmente maior a IFN-I.
- Não houve diferença da neurovirulência em camundongos BALB/c entre os YFV carregando as diferentes combinações de polimorfismos em NS3 e NS5. No modelo de infecção de camundongos AG129, apenas os YFV com a isoforma NS5 2010 foram totalmente letais.
- Os marcadores moleculares das sequências do surto na proteína NS5, no contexto do YFV ES-504 derivado de clone, promoveram maior infectividade em células de mosquitos. É necessário verificar se esse efeito é reproduzido na infecção de mosquitos vetores.

7 Perspectivas

- Realizar inoculação dos vírus RJ 155 e ES-504 em mosquitos vetores dos gêneros *Sabethes* e *Haemagogus* para avaliação de possíveis marcadores de adaptação no isolado RJ 155;
- Da mesma forma, comparar os indicadores de competência vetorial dos vírus sintéticos YFV_2017 e YFV_NS3/NS5_2010 utilizando esses dois gêneros de mosquitos;
- Realizar estudos de viscerotropismo e neurotropismo dessas suas variantes *in vivo*, utilizando camundongos susceptíveis da linhagem AG129;
- Investigar o papel dos marcadores da assinatura molecular no domínio RdRp através de ensaio funcional e construção de vírus sintético YFV/RdRp_2010;
- Estudar o marcador da posição 2803, próximo ao *loop* conector entre domínios para determinar sua contribuição no fenótipo do vírus YFV_NS5_2010;
- Avaliar o possível efeito da substituição na proteína do capsídeo, através da tecnologia de clone infeccioso;
- Estudar os marcadores do isolado RJ 155 para correlacioná-los com o fenótipo altamente virulento apresentado por esse YFV, também utilizando genética reversa.
- Realizar ensaios de co-infecção viral com vírus pré- e pós-surto, ou seja, sem e com a assinatura molecular descrita, para avaliar aspectos do *fitness* viral em modelos celulares e animais.

Referências bibliográficas

1. Franco O. Local de origem da febre-amarela. *História da Febre-Amarela no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 5-8.
2. Augustin G. Preliminary Observations on Yellow Fever: Historical Summary. *History of Yellow Fever*. New Orleans: SEARCY & PFAFF Ltd.; 1909. p. 87-130.
3. Bryant JE, Holmes EC, Barrett AD. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog*. 2007;3(5):e75.
4. Staples JE, Monath TP. Yellow Fever. In: Richard L. Guerrant DHW, Peter F. Weller, editor. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens & Practice*. 3rd Edition ed: Saunders; 2011. p. 492-503.
5. Franco O. As supostas causas da febre-amarela. *História da Febre-Amarela no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 44-51.
6. Paton GF. The Accepted Modern Theories Concerning Yellow Fever: Ethiology of Yellow Fever. In: Augustin G, editor. *History of Yellow Fever*. New Orleans: SEARCY & PFAFF Ltd.; 1909. p. 1107-26.
7. Franco O. Os trabalhos de Finlay. *História da Febre-Amarela no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 56-8.
8. Franco O. Walter Reed e seus colaboradores. *História da Febre-Amarela no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 58-63.
9. Clements AN, Harbach RE. History of the discovery of the mode of transmission of yellow fever virus. *J Vector Ecol*. 2017;42(2):208-22.
10. Franco O. Campanhas de Oswaldo Cruz. *História da Febre-Amarela no Brasil*. Rio de Janeiro - GB - Brasil: Ministério da Saúde - Departamento Nacional de Endemias Rurais; 1969. p. 75 - 94.
11. Franco O. Febre-amarela silvestre. *História da Febre-Amarela no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 120-7.
12. Franco O. Prova de neutralização. *História da Febre-Amarela no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 108-10.
13. Franco O. Vacinação antiamarilica. *História da Febre-Amarela no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 127-35.
14. Hudson NP. Adrian Stokes and yellow fever research: a tribute. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1966;60(2):170-4.
15. Stokes A, Bauer JH, Hudson NP. Experimental Transmission of Yellow Fever to Laboratory Animals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1928;s1-8(2):103-64.
16. Chippaux JP, Chippaux A. Yellow fever in Africa and the Americas: a historical and epidemiological perspective. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2018;24:20.
17. Theiler M, Smith HH. The Use of Yellow Fever Virus Modified by in Vitro Cultivation for Human Immunization. *J Exp Med*. 1937;65(6):787-800.
18. Halstead SB. Flavivirus Vaccines. In: Shi P-Y, editor. *Molecular Virology and Control of Flaviviruses*. Novartis Institute for Tropical Diseases, Singapore: Caister Academic Press; 2012.
19. Collins ND, Barrett AD. Live Attenuated Yellow Fever 17D Vaccine: A Legacy Vaccine Still Controlling Outbreaks In Modern Day. *Current infectious disease reports*. 2017;19(3):14.
20. Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol*. 2018;26(11):913-28.
21. Bishop DH, Claybrook JR, Spiegelman S. Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamide gels. *J Mol Biol*. 1967;26(3):373-87.
22. de Watcher R, Fiers W. Preparative Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis of ³²P-Labeled RNA. *Analytical Biochemistry*. 1972;49:184-97.
23. Deubel V, Digoutte JP, Monath TP, Girard M. Genetic heterogeneity of yellow fever virus strains from Africa and the Americas. *J Gen Virol*. 1986;67 (Pt 1):209-13.
24. Deubel V, Pailliez JP, Cornet M, Schlesinger JJ, Diop M, Diop A, et al. Homogeneity among Senegalese strains of yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg*. 1985;34(5):976-83.
25. Hahn CS, Dalrymple JM, Strauss JH, Rice CM. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(7):2019-23.
26. dos Santos CN, Post PR, Carvalho R, Ferreira, II, Rice CM, Galler R. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res*. 1995;35(1):35-41.
27. Galler R, Post PR, Santos CN, Ferreira, II. Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains. *Vaccine*. 1998;16(9-10):1024-8.
28. Post PR, Santos CN, Carvalho R, Lopes OS, Galler R. Molecular analysis of yellow fever virus 17DD vaccine strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86(2):239-46.
29. Lepiniec L, Dalgarno L, Huang VT, Monath TP, Digoutte JP, Deubel V. Geographic distribution and evolution of yellow fever viruses based on direct sequencing of genomic cDNA fragments. *J Gen Virol*. 1994;75 (Pt 2):417-23.

30. Chang GJ, Cropp BC, Kinney RM, Trent DW, Gubler DJ. Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus. *J Virol.* 1995;69(9):5773-80.
31. Wang E, Weaver SC, Shope RE, Tesh RB, Watts DM, Barrett AD. Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa. *Virology.* 1996;225(2):274-81.
32. Mutebi JP, Rijnbrand RC, Wang H, Ryman KD, Wang E, Fulop LD, et al. Genetic relationships and evolution of genotypes of yellow fever virus and other members of the yellow fever virus group within the *Flavivirus* genus based on the 3' noncoding region. *J Virol.* 2004;78(18):9652-65.
33. Mutebi JP, Wang H, Li L, Bryant JE, Barrett AD. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol.* 2001;75(15):6999-7008.
34. von Lindern JJ, Aroner S, Barrett ND, Wicker JA, Davis CT, Barrett ADT. Genome analysis and phylogenetic relationships between east, central and west African isolates of Yellow fever virus. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 4):895-907.
35. Stock NK, Laraway H, Faye O, Diallo M, Niedrig M, Sall AA. Biological and phylogenetic characteristics of yellow fever virus lineages from West Africa. *J Virol.* 2013;87(5):2895-907.
36. Beasley DW, McAuley AJ, Bente DA. Yellow fever virus: genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral Res.* 2015;115:48-70.
37. Franco O. A primeira epidemia de febre-amarela no Brasil. *História da Febre-Amarela no Brasil.* Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 8-21.
38. Franco O. A febre-amarela na Bahia. *História da Febre-Amarela no Brasil.* Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 21-7.
39. Franco O. A primeira epidemia de febre-amarela no Rio de Janeiro. *História da Febre-Amarela no Brasil.* Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 35-44.
40. Saúde Md. Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 1999.
41. Franco O. A reinfestação do Estado do Pará. *História da Febre-Amarela no Brasil.* Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969. p. 151-6.
42. Vasconcelos PF. [Yellow Fever]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(2):275-93.
43. Vasconcelos PF, Rodrigues SG, Degallier N, Moraes MA, da Rosa JF, da Rosa ES, et al. An epidemic of sylvatic yellow fever in the southeast region of Maranhao State, Brazil, 1993-1994: epidemiologic and entomologic findings. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57(2):132-7.
44. Vasconcelos PF, Bryant JE, da Rosa TP, Tesh RB, Rodrigues SG, Barrett AD. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(9):1578-84.
45. Filippis AM, Schatzmayr HG, Nicolai C, Baran M, Miagostovich MP, Sequeira PC, et al. Jungle yellow fever, Rio de Janeiro. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3):484-5.
46. Vasconcelos PF, Costa ZG, Travassos Da Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VL, et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. *J Med Virol.* 2001;65(3):598-604.
47. de Almeida MA, Dos Santos E, da Cruz Cardoso J, da Fonseca DF, Noll CA, Silveira VR, et al. Yellow fever outbreak affecting Alouatta populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. *Am J Primatol.* 2012;74(1):68-76.
48. Cardoso Jda C, de Almeida MA, dos Santos E, da Fonseca DF, Sallum MA, Noll CA, et al. Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, southern Brazil, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(12):1918-24.
49. de Souza RP, Foster PG, Sallum MA, Coimbra TL, Maeda AY, Silveira VR, et al. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *J Med Virol.* 2010;82(1):175-85.
50. Carrington CV, Auguste AJ. Evolutionary and ecological factors underlying the tempo and distribution of yellow fever virus activity. *Infect Genet Evol.* 2013;13:198-210.
51. BRASIL. Febre Amarela - n°36/2017. COES - Ministério da Saúde 2017.
52. BRASIL. Informe n°01 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela - Brasil 2017/2018. Brasília2017.
53. BRASIL. Informe n°27 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela - Brasil 2017/2018. Brasília2018.
54. Alcântara AMACd, Barros IdAB, Alcântara EACPd, Barros IB, Moura RBd, Maia MDMD, et al. Yellow fever: advances and regressions since the first references of this disease to current epidemics. *Electronic Journal Collection Health.* 2020;Vol.Sup.n°38.
55. Hill SC, de Souza R, Theze J, Claro I, Aguiar RS, Abade L, et al. Genomic Surveillance of Yellow Fever Virus Epizootic in Sao Paulo, Brazil, 2016 - 2018. *PLoS Pathog.* 2020;16(8):e1008699.
56. Lacerda AB, Del Castillo Saad L, Ikefuti PV, Pinter A, Chiaravalloti-Neto F. Diffusion of sylvatic yellow fever in the state of Sao Paulo, Brazil. *Sci Rep.* 2021;11(1):16277.
57. BRASIL. Saúde Brasil 2019 : Uma análise da situação de saúde com enfoque nas doenças imunopreveníveis e na imunização. In: *Epidemiológica SdV*, editor. Brasília2019. p. 305-30.

58. Possas C, Lourenco-de-Oliveira R, Tautil PL, Pinheiro FP, Pissinatti A, Cunha RVD, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(10):e180278.
59. de Thoisy B, Silva NIO, Sacchetto L, de Souza Trindade G, Drumond BP. Spatial epidemiology of yellow fever: Identification of determinants of the 2016-2018 epidemics and at-risk areas in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(10):e0008691.
60. Hamlet A, Gaythorpe KAM, Garske T, Ferguson NM. Seasonal and inter-annual drivers of yellow fever transmission in South America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(1):e0008974.
61. Mendes A. Vacina de febre amarela será ampliada para todo o Brasil: Ministério da Saúde; 2018 [Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2018/marco/vacina-de-febre-amarela-sera-ampliada-para-todo-o-brasil>].
62. Monteiro N. Em 2020, Ministério da Saúde amplia público para vacinas contra febre amarela e gripe: Ministério da Saúde; 2019 [Available from: <https://bvsmms.saude.gov.br/em-2020-ministerio-da-saude-amplia-publico-para-vacinas-contra-febre-amarela-e-gripe/>].
63. Abreu FVS, Delatorre E, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, de Castro MG, Ribeiro IP, et al. Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114:e190076.
64. BRASIL. Situação epidemiológica da febre amarela - Monitoramento 2020/2021. Brasília2021. p. 6-14.
65. Figueiredo PO, Silva ATS, Oliveira JS, Marinho PE, Rocha FT, Domingos GP, et al. Detection and Molecular Characterization of Yellow Fever Virus, 2017, Brazil. *Ecohealth*. 2018;15(4):864-70.
66. Delatorre E, de Abreu FVS, Ribeiro IP, Gomez MM, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, et al. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. *Front Microbiol*. 2019;10:1079.
67. Moreira Salles AP, de Seixas Santos Natri AC, Ho YL, Vilas Boas Casadio L, Emanuel Amgarten D, Justo Arevalo S, et al. Updating the Phylodynamics of Yellow Fever Virus 2016-2019 Brazilian Outbreak With New 2018 and 2019 Sao Paulo Genomes. *Front Microbiol*. 2022;13:811318.
68. Cunha MS, da Costa AC, de Azevedo Fernandes NCC, Guerra JM, Dos Santos FCP, Nogueira JS, et al. Epizootics due to Yellow Fever Virus in Sao Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016-2017). *Sci Rep*. 2019;9(1):5474.
69. Cunha MDP, Duarte-Neto AN, Pour SZ, Ortiz-Baez AS, Cerny J, Pereira BBS, et al. Origin of the Sao Paulo Yellow Fever epidemic of 2017-2018 revealed through molecular epidemiological analysis of fatal cases. *Sci Rep*. 2019;9(1):20418.
70. Rezende IM, Sacchetto L, Munhoz de Mello E, Alves PA, Iani FCM, Adelino TER, et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(6):e0006538.
71. Siqueira PC, Catao RC, Gava C, Maciel ELN, Prado TND. [Spatial-temporal diffusion of yellow fever in a state in Southeast Brazil in 2017]. *Cad Saude Publica*. 2021;37(9):e00127620.
72. Bonaldo MC, Gomez MM, Dos Santos AA, Abreu FVS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM, et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(6):447-51.
73. Gomez MM, Abreu FVS, Santos A, Mello IS, Santos MP, Ribeiro IP, et al. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016-2017 Brazilian outbreak. *J Gen Virol*. 2018;99(4):536-48.
74. Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenco-de-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep*. 2017;7(1):7385.
75. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13-22.
76. Klema VJ, Padmanabhan R, Choi KH. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses*. 2015;7(8):4640-56.
77. Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol*. 2003;77(12):7143-9.
78. Stocks CE, Lobigs M. Posttranslational signal peptidase cleavage at the flavivirus C-prM junction in vitro. *J Virol*. 1995;69(12):8123-6.
79. Yamshchikov VF, Compans RW. Processing of the intracellular form of the west Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: an in vitro study. *J Virol*. 1994;68(9):5765-71.
80. Neves-Martins TC, Mebus-Antunes NC, Caruso IP, Almeida FCL, Da Poian AT. Unique structural features of flaviviruses' capsid proteins: new insights on structure-function relationship. *Curr Opin Virol*. 2021;47:106-12.
81. Shang Z, Song H, Shi Y, Qi J, Gao GF. Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. *J Mol Biol*. 2018;430(7):948-62.
82. Markoff L, Falgout B, Chang A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. *Virology*. 1997;233(1):105-17.
83. Byk LA, Gamarnik AV. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annu Rev Virol*. 2016;3(1):263-81.

84. Tan TY, Fibriansah G, Kostyuchenko VA, Ng TS, Lim XX, Zhang S, et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat Commun.* 2020;11(1):895.
85. Sotcheff S, Routh A. Understanding Flavivirus Capsid Protein Functions: The Tip of the Iceberg. *Pathogens.* 2020;9(1).
86. Tan TY, Fibriansah G, Lok SM. Capsid protein is central to the birth of flavivirus particles. *PLoS Pathog.* 2020;16(5):e1008542.
87. Bhuvanankantham R, Chong MK, Ng ML. Specific interaction of capsid protein and importin-alpha/beta influences West Nile virus production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;389(1):63-9.
88. Samuel GH, Wiley MR, Badawi A, Adelman ZN, Myles KM. Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(48):13863-8.
89. Carvalho FA, Carneiro FA, Martins IC, Assuncao-Miranda I, Faustino AF, Pereira RM, et al. Dengue virus capsid protein binding to hepatic lipid droplets (LD) is potassium ion dependent and is mediated by LD surface proteins. *J Virol.* 2012;86(4):2096-108.
90. Martins IC, Gomes-Neto F, Faustino AF, Carvalho FA, Carneiro FA, Bozza PT, et al. The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif. *Biochem J.* 2012;444(3):405-15.
91. Teoh PG, Huang ZS, Pong WL, Chen PC, Wu HN. Maintenance of dimer conformation by the dengue virus core protein alpha4-alpha4' helix pair is critical for nucleocapsid formation and virus production. *J Virol.* 2014;88(14):7998-8015.
92. Chambers TJ, Weir RC, Grakoui A, McCourt DW, Bazan JF, Fletterick RJ, et al. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(22):8898-902.
93. Chambers TJ, Grakoui A, Rice CM. Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. *J Virol.* 1991;65(11):6042-50.
94. Chambers TJ, Nestorowicz A, Rice CM. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B/3 cleavage site: determinants of cleavage site specificity and effects on polyprotein processing and viral replication. *J Virol.* 1995;69(3):1600-5.
95. Barrows NJ, Campos RK, Liao KC, Prasanth KR, Soto-Acosta R, Yeh SC, et al. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev.* 2018;118(8):4448-82.
96. Chambers TJ, Nestorowicz A, Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J Virol.* 1993;67(11):6797-807.
97. Teo KF, Wright PJ. Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. *J Gen Virol.* 1997;78 (Pt 2):337-41.
98. Droll DA, Krishna Murthy HM, Chambers TJ. Yellow fever virus NS2B-NS3 protease: charged-to-alanine mutagenesis and deletion analysis define regions important for protease complex formation and function. *Virology.* 2000;275(2):335-47.
99. Chambers TJ, Droll DA, Tang Y, Liang Y, Ganesh VK, Murthy KHM, et al. Yellow fever virus NS2B-NS3 protease: characterization of charged-to-alanine mutant and revertant viruses and analysis of polyprotein-cleavage activities. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 5):1403-13.
100. Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, et al. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(4):372-3.
101. Noske GD, Gawriljuk VO, Fernandes RS, Furtado ND, Bonaldo MC, Oliva G, et al. Structural characterization and polymorphism analysis of the NS2B-NS3 protease from the 2017 Brazilian circulating strain of Yellow Fever virus. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2020;1864(4):129521.
102. Warrenner P, Tamura JK, Collett MS. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. *J Virol.* 1993;67(2):989-96.
103. Luo D, Xu T, Hunke C, Gruber G, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol.* 2008;82(1):173-83.
104. Wu J, Bera AK, Kuhn RJ, Smith JL. Structure of the Flavivirus helicase: implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing. *J Virol.* 2005;79(16):10268-77.
105. Mastrangelo E, Milani M, Bollati M, Selisko B, Peyrane F, Pandini V, et al. Crystal structure and activity of Kunjin virus NS3 helicase; protease and helicase domain assembly in the full length NS3 protein. *J Mol Biol.* 2007;372(2):444-55.
106. Luo D, Xu T, Watson RP, Scherer-Becker D, Sampath A, Jahnke W, et al. Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. *EMBO J.* 2008;27(23):3209-19.
107. Takegami T, Sakamuro D, Furukawa T. Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. *Virus Genes.* 1995;9(2):105-12.
108. Wang CC, Huang ZS, Chiang PL, Chen CT, Wu HN. Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. *FEBS Lett.* 2009;583(4):691-6.

109. Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol.* 1999;73(4):3108-16.
110. Bartelma G, Padmanabhan R. Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. *Virology.* 2002;299(1):122-32.
111. Wengler G, Wengler G. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology.* 1993;197(1):265-73.
112. Benarroch D, Selisko B, Locatelli GA, Maga G, Romette JL, Canard B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology.* 2004;328(2):208-18.
113. Johansson M, Brooks AJ, Jans DA, Vasudevan SG. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol.* 2001;82(Pt 4):735-45.
114. Shiryayev SA, Chernov AV, Aleshin AE, Shiryayeva TN, Strongin AY. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 9):2081-5.
115. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 9):2605-14.
116. Patkar CG, Kuhn RJ. Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. *J Virol.* 2008;82(7):3342-52.
117. Carpp LN, Galler R, Bonaldo MC. Interaction between the yellow fever virus nonstructural protein NS3 and the host protein Alix contributes to the release of infectious particles. *Microbes Infect.* 2011;13(1):85-95.
118. Chatellard-Causse C, Blot B, Cristina N, Torch S, Missotten M, Sadoul R. Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem.* 2002;277(32):29108-15.
119. Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature.* 2009;458(7235):172-7.
120. Chernov AV, Shiryayev SA, Aleshin AE, Ratnikov BI, Smith JW, Liddington RC, et al. The two-component NS2B-NS3 proteinase represses DNA unwinding activity of the West Nile virus NS3 helicase. *J Biol Chem.* 2008;283(25):17270-8.
121. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 2010;87(2):125-48.
122. Fernandes PO, Chagas MA, Rocha WR, Moraes AH. Non-structural protein 5 (NS5) as a target for antiviral development against established and emergent flaviviruses. *Curr Opin Virol.* 2021;50:30-9.
123. Koonin EV. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol.* 1993;74 (Pt 4):733-40.
124. Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* 2002;21(11):2757-68.
125. Ray D, Shah A, Tilgner M, Guo Y, Zhao Y, Dong H, et al. West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. *J Virol.* 2006;80(17):8362-70.
126. Issur M, Geiss BJ, Bougie I, Picard-Jean F, Despins S, Mayette J, et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA.* 2009;15(12):2340-50.
127. Dong H, Zhang B, Shi PY. Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target. *Antiviral Res.* 2008;80(1):1-10.
128. Egloff MP, Decroly E, Malet H, Selisko B, Benarroch D, Ferron F, et al. Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. *J Mol Biol.* 2007;372(3):723-36.
129. Dong H, Ray D, Ren S, Zhang B, Puig-Basagoiti F, Takagi Y, et al. Distinct RNA elements confer specificity to flavivirus RNA cap methylation events. *J Virol.* 2007;81(9):4412-21.
130. Dong H, Ren S, Li H, Shi PY. Separate molecules of West Nile virus methyltransferase can independently catalyze the N7 and 2'-O methylations of viral RNA cap. *Virology.* 2008;377(1):1-6.
131. Zhou H, Wang F, Wang H, Chen C, Zhang T, Han X, et al. The conformational changes of Zika virus methyltransferase upon converting SAM to SAH. *Oncotarget.* 2017;8(9):14830-4.
132. Furuichi Y, Shatkin AJ. Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv Virus Res.* 2000;55:135-84.
133. Zhou Y, Ray D, Zhao Y, Dong H, Ren S, Li Z, et al. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J Virol.* 2007;81(8):3891-903.
134. Chang DC, Hoang LT, Mohamed Naim AN, Dong H, Schreiber MJ, Hibberd ML, et al. Evasion of early innate immune response by 2'-O-methylation of dengue genomic RNA. *Virology.* 2016;499:259-66.

135. Szretter KJ, Daniels BP, Cho H, Gainey MD, Yokoyama WM, Gale M, Jr., et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap by West Nile virus evades ifit1-dependent and -independent mechanisms of host restriction in vivo. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):e1002698.
136. Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, et al. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol.* 2013;87(18):9997-10003.
137. Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature.* 2010;468(7322):452-6.
138. Habjan M, Hubel P, Lacerda L, Benda C, Holze C, Eberl CH, et al. Sequestration by IFIT1 impairs translation of 2'O-unmethylated capped RNA. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003663.
139. Werme K, Wigerius M, Johansson M. Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cell Microbiol.* 2008;10(3):696-712.
140. Laurent-Rolle M, Morrison J, Rajsbaum R, Macleod JML, Pisanelli G, Pham A, et al. The interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by type I interferon. *Cell Host Microbe.* 2014;16(3):314-27.
141. Li A, Wang W, Wang Y, Chen K, Xiao F, Hu D, et al. NS5 Conservative Site Is Required for Zika Virus to Restrict the RIG-I Signaling. *Front Immunol.* 2020;11:51.
142. Koonin EV. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol.* 1991;72 (Pt 9):2197-206.
143. Selisko B, Wang C, Harris E, Canard B. Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. *Curr Opin Virol.* 2014;9:74-83.
144. Sousa R. Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases. *Trends Biochem Sci.* 1996;21(5):186-90.
145. Azzi A, Lin SX. Structure function analysis of west nile virus RNA dependent RNA polymerase: molecular model and implications for drug design. *Med Chem.* 2007;3(5):455-9.
146. Iglesias NG, Filomatori CV, Gamarnik AV. The F1 motif of dengue virus polymerase NS5 is involved in promoter-dependent RNA synthesis. *J Virol.* 2011;85(12):5745-56.
147. Malet H, Egloff MP, Selisko B, Butcher RE, Wright PJ, Roberts M, et al. Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J Biol Chem.* 2007;282(14):10678-89.
148. Potapova U, Feranchuk S, Leonova G, Belikov S. The rearrangement of motif F in the flavivirus RNA-directed RNA polymerase. *Int J Biol Macromol.* 2018;108:990-8.
149. Butcher SJ, Grimes JM, Makeyev EV, Bamford DH, Stuart DI. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature.* 2001;410(6825):235-40.
150. Selisko B, Potisopon S, Agred R, Priet S, Varlet I, Thillier Y, et al. Molecular basis for nucleotide conservation at the ends of the dengue virus genome. *PLoS Pathog.* 2012;8(9):e1002912.
151. Godoy AS, Lima GM, Oliveira KI, Torres NU, Maluf FV, Guido RV, et al. Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. *Nat Commun.* 2017;8:14764.
152. Garriga D, Ferrer-Orta C, Querol-Audi J, Oliva B, Verdaguer N. Role of motif B loop in allosteric regulation of RNA-dependent RNA polymerization activity. *J Mol Biol.* 2013;425(13):2279-87.
153. Lang DM, Zemla AT, Zhou CL. Highly similar structural frames link the template tunnel and NTP entry tunnel to the exterior surface in RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(3):1464-82.
154. Duan Y, Zeng M, Jiang B, Zhang W, Wang M, Jia R, et al. Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerase Interacts with Genome UTRs and Viral Proteins to Facilitate Flavivirus RNA Replication. *Viruses.* 2019;11(10).
155. Morais A, Terzian AC, Duarte DV, Bronzoni RV, Madrid MC, Gavioli AF, et al. The eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L protein interacts with Flavivirus NS5 and may modulate yellow fever virus replication. *Virol J.* 2013;10:205.
156. Potisopon S, Priet S, Collet A, Decroly E, Canard B, Selisko B. The methyltransferase domain of dengue virus protein NS5 ensures efficient RNA synthesis initiation and elongation by the polymerase domain. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(18):11642-56.
157. Li XD, Shan C, Deng CL, Ye HQ, Shi PY, Yuan ZM, et al. The interface between methyltransferase and polymerase of NS5 is essential for flavivirus replication. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(5):e2891.
158. Rusanov T, Kent T, Saeed M, Hoang TM, Thomas C, Rice CM, et al. Identification of a Small Interface between the Methyltransferase and RNA Polymerase of NS5 that is Essential for Zika Virus Replication. *Sci Rep.* 2018;8(1):17384.
159. Lim SP, Noble CG, Shi PY. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Res.* 2015;119:57-67.
160. Flory C, Chan KWK, Bifani AM, Choy MMJ, Lescar J, Ooi EE, et al. Optimal flexibility of the linker region of Zika virus NS5 methyltransferase-polymerase is critical for virus replication. *Antiviral Res.* 2021;195:105194.
161. Brand C, Bissaillon M, Geiss BJ. Organization of the Flavivirus RNA replicase complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017;8(6).
162. Barnard TR, Abram QH, Lin QF, Wang AB, Sagan SM. Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly. *Trends Biochem Sci.* 2021;46(5):378-90.

163. Le Breton M, Meyniel-Schicklin L, Deloire A, Coutard B, Canard B, de Lamballerie X, et al. Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC Microbiol.* 2011;11:234.
164. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007;3(12):e201.
165. Maljkovic Berry I, Eyase F, Pollett S, Konongoi SL, Joyce MG, Figueroa K, et al. Global Outbreaks and Origins of a Chikungunya Virus Variant Carrying Mutations Which May Increase Fitness for *Aedes aegypti*: Revelations from the 2016 Mandera, Kenya Outbreak. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;100(5):1249-57.
166. Liu J, Liu Y, Shan C, Nunes BT, Yun R, Haller SL, et al. Role of mutational reversions and fitness restoration in Zika virus spread to the Americas. *Nat Commun.* 2021;12(1):595.
167. Sexton NR, Ebel GD. Effects of Arbovirus Multi-Host Life Cycles on Dinucleotide and Codon Usage Patterns. *Viruses.* 2019;11(7).
168. Sall AA, Faye O, Diallo M, Firth C, Kitchen A, Holmes EC. Yellow fever virus exhibits slower evolutionary dynamics than dengue virus. *J Virol.* 2010;84(2):765-72.
169. Pugachev KV, Guirakhoo F, Ocran SW, Mitchell F, Parsons M, Penal C, et al. High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase. *J Virol.* 2004;78(2):1032-8.
170. Collins ND, Beck AS, Widen SG, Wood TG, Higgs S, Barrett ADT. Structural and Nonstructural Genes Contribute to the Genetic Diversity of RNA Viruses. *mBio.* 2018;9(5).
171. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2014;47:5 6 1-32.
172. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-W303.
173. Geiss BJ, Thompson AA, Andrews AJ, Sons RL, Gari HH, Keenan SM, et al. Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding. *J Mol Biol.* 2009;385(5):1643-54.
174. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W407-10.
175. Sippl MJ. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins.* 1993;17(4):355-62.
176. de Mello IS, Fernandes DR, Furtado ND, Dos Santos AAC, Dos Santos MP, Ribeiro IP, et al. Recovery of Synthetic Zika Virus Based on Rio-U1 Isolate Using a Genetically Stable Two Plasmid System and cDNA Amplification. *Front Microbiol.* 2021;12:639655.
177. Abreu FVS, de Andreazzi CS, Neves M, Meneguete PS, Ribeiro MS, Dias CMG, et al. Ecological and environmental factors affecting transmission of sylvatic yellow fever in the 2017-2019 outbreak in the Atlantic Forest, Brazil. *Parasit Vectors.* 2022;15(1):23.
178. Ilacqua RC, Medeiros-Sousa AR, Ramos DG, Obara MT, Ceretti-Junior W, Mucci LF, et al. Reemergence of Yellow Fever in Brazil: The Role of Distinct Landscape Fragmentation Thresholds. *J Environ Public Health.* 2021;2021:8230789.
179. Wilk-da-Silva R, Medeiros-Sousa AR, Laporta GZ, Mucci LF, Prist PR, Marrelli MT. The influence of landscape structure on the dispersal pattern of yellow fever virus in the state of Sao Paulo. *Acta Trop.* 2022;228:106333.
180. Li SL, Acosta AL, Hill SC, Brady OJ, de Almeida MAB, Cardoso JDC, et al. Mapping environmental suitability of *Haemagogus* and *Sabethes* spp. mosquitoes to understand sylvatic transmission risk of yellow fever virus in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16(1):e0010019.
181. Rosser JI, Nielsen-Saines K, Saad E, Fuller T. Reemergence of yellow fever virus in southeastern Brazil, 2017-2018: What sparked the spread? *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16(2):e0010133.
182. Servadio JL, Munoz-Zanzi C, Convertino M. Environmental determinants predicting population vulnerability to high yellow fever incidence. *R Soc Open Sci.* 2022;9(3):220086.
183. History and Characterization of the Vero Cell Line.: Hearing before the Report for the Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee(May 12, 2000, 2000).
184. Naoki Osada AK, Toshiyuki Yamaji, Noriko Hirayama, Fumio Kasai, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda & Kentaro Hanada. The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. *DNA Research.* 2014;21:673 - 83.
185. Pereira Dos Santos T, Roiz D, Santos de Abreu FV, Luz SLB, Santalucia M, Jiolle D, et al. Potential of *Aedes albopictus* as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):191.
186. Brackney DE, Scott JC, Sagawa F, Woodward JE, Miller NA, Schilkey FD, et al. C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS neglected tropical diseases.* 2010;4(10):e856.
187. Fallon AM, Sun D. Exploration of mosquito immunity using cells in culture. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001;31(3):263-78.
188. Li MJ, Lan CJ, Gao HT, Xing D, Gu ZY, Su D, et al. Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* Aag2 cells in response to dengue virus-2 infection. *Parasit Vectors.* 2020;13(1):421.
189. Donato MT, Tolosa L, Gomez-Lechon MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol.* 2015;1250:77-93.

190. Melen K, Keskinen P, Lehtonen A, Julkunen I. Interferon-induced gene expression and signaling in human hepatoma cell lines. *J Hepatol.* 2000;33(5):764-72.
191. Israelow B, Narbus CM, Sourisseau M, Evans MJ. HepG2 cells mount an effective antiviral interferon-lambda based innate immune response to hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2014;60(4):1170-9.
192. Bonaldo MC, Garratt RC, Caufour PS, Freire MS, Rodrigues MM, Nussenzweig RS, et al. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. *J Mol Biol.* 2002;315(4):873-85.
193. Barrett AD, Gould EA. Comparison of neurovirulence of different strains of yellow fever virus in mice. *J Gen Virol.* 1986;67 (Pt 4):631-7.
194. Thibodeaux BA, Garbino NC, Liss NM, Piper J, Blair CD, Roehrig JT. A small animal peripheral challenge model of yellow fever using interferon-receptor deficient mice and the 17D-204 vaccine strain. *Vaccine.* 2012;30(21):3180-7.
195. Meier KC, Gardner CL, Khoretonenko MV, Klimstra WB, Ryman KD. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000614.
196. Aliota MT, Caine EA, Walker EC, Larkin KE, Camacho E, Osorio JE. Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(4):e0004682.
197. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity.* 2013;38(5):855-69.
198. Garcia-Sastre A, Biron CA. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science.* 2006;312(5775):879-82.
199. Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol.* 2008;82(1):335-45.
200. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:513-45.
201. Miorin L, Maestre AM, Fernandez-Sesma A, Garcia-Sastre A. Antagonism of type I interferon by flaviviruses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;492(4):587-96.
202. Sironi M, Forni D, Clerici M, Cagliani R. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):e0004978.
203. Alzahran N, Wu MJ, Shanmugam S, Yi M. Delayed by Design: Role of Suboptimal Signal Peptidase Processing of Viral Structural Protein Precursors in Flaviviridae Virus Assembly. *Viruses.* 2020;12(10).
204. Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, et al. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science.* 2014;343(6173):881-5.
205. Choy MM, Ng DHL, Siriphanitchakorn T, Ng WC, Sundstrom KB, Tan HC, et al. A Non-structural 1 Protein G53D Substitution Attenuates a Clinically Tested Live Dengue Vaccine. *Cell Rep.* 2020;31(6):107617.
206. Yang J, Jing X, Yi W, Li XD, Yao C, Zhang B, et al. Crystal structure of a tick-borne flavivirus RNA-dependent RNA polymerase suggests a host adaptation hotspot in RNA viruses. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(3):1567-80.
207. Zhou Z, Dang Y, Zhou M, Li L, Yu CH, Fu J, et al. Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(41):E6117-E25.
208. Kudla G, Murray AW, Tollervey D, Plotkin JB. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science.* 2009;324(5924):255-8.
209. Stergachis AB, Haugen E, Shafer A, Fu W, Vernot B, Reynolds A, et al. Exonic transcription factor binding directs codon choice and affects protein evolution. *Science.* 2013;342(6164):1367-72.
210. Boel G, Letso R, Neely H, Price WN, Wong KH, Su M, et al. Codon influence on protein expression in *E. coli* correlates with mRNA levels. *Nature.* 2016;529(7586):358-63.
211. Drummond DA, Wilke CO. Mistranslation-induced protein misfolding as a dominant constraint on coding-sequence evolution. *Cell.* 2008;134(2):341-52.
212. Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, Martin S, Morris N, Kline N, et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell.* 2015;160(6):1111-24.
213. Shabalina SA, Ogurtsov AY, Spiridonov NA. A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(8):2428-37.
214. Lauring AS, Acevedo A, Cooper SB, Andino R. Codon usage determines the mutational robustness, evolutionary capacity, and virulence of an RNA virus. *Cell Host Microbe.* 2012;12(5):623-32.
215. Cuevas JM, Domingo-Calap P, Sanjuan R. The fitness effects of synonymous mutations in DNA and RNA viruses. *Mol Biol Evol.* 2012;29(1):17-20.
216. Wang B, Thurmond S, Zhou K, Sanchez-Aparicio MT, Fang J, Lu J, et al. Structural basis for STAT2 suppression by flavivirus NS5. *Nat Struct Mol Biol.* 2020;27(10):875-85.
217. Ferrero DS, Ruiz-Arroyo VM, Soler N, Uson I, Guarne A, Verdaguer N. Supramolecular arrangement of the full-length Zika virus NS5. *PLoS Pathog.* 2019;15(4):e1007656.
218. Saw WG, Pan A, Subramanian Manimekalai MS, Gruber A, Gruber G. Structure and flexibility of non-structural proteins 3 and -5 of Dengue- and Zika viruses in solution. *Prog Biophys Mol Biol.* 2019;143:67-77.

ANEXO I

Durante o período em que desenvolvi este projeto de doutorado, tive a oportunidade de colaborar em trabalhos científicos relacionados com o assunto da tese. Nesse sentido, constam deste Anexo, a primeira página dos cinco trabalhos que participei, com uma breve contextualização frente à tese.

Artigo 1: Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons.

DOI: 10.1590/0074-02760190076.

Resumo: Neste trabalho realizamos um estudo sobre a dispersão do YFV no estado do Rio de Janeiro e concluímos que o vírus pode permanecer em uma mesma região da floresta atlântica por, pelo menos, três temporadas de transmissão sem necessidade de novas introduções. Aqui, descrevemos a coleta do vírus RJ 155 que utilizamos para o estudo de isolados discutido nessa tese, e o caracterizamos filogeograficamente.

Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons

Filipe Vieira Santos de Abreu^{1,2}, Edson Delatorre³, Alexandre Araújo Cunha dos Santos⁴, Anielly Ferreira-de-Brito¹, Márcia Gonçalves de Castro¹, Ieda Pereira Ribeiro⁴, Nathália Dias Furtado⁴, Waldemir Paixão Vargas⁵, Mário Sérgio Ribeiro⁶, Patrícia Meneguete⁶, Myrna Cristina Bonaldo^{4/+}, Gonzalo Bello^{7/+}, Ricardo Lourenço-de-Oliveira^{1/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, Salinas, MG, Brasil

³Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁶Secretaria de Estado de Saúde, Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Ambiental, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁷Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

BACKGROUND In Brazil, the Yellow Fever virus (YFV) is endemic in the Amazon, from where it eventually expands into epidemic waves. Coastal south-eastern (SE) Brazil, which has been a YFV-free region for eight decades, has reported a severe sylvatic outbreak since 2016. The virus spread from the north toward the south of the Rio de Janeiro (RJ) state, causing 307 human cases with 105 deaths during the 2016-2017 and 2017-2018 transmission seasons. It is unclear, however, whether the YFV would persist in the coastal Atlantic Forest of RJ during subsequent transmission seasons.

OBJECTIVES To conduct a real-time surveillance and assess the potential persistence of YFV in the coastal Atlantic Forest of RJ during the 2018-2019 transmission season.

METHODS We combined epizootic surveillance with fast diagnostic and molecular, phylogenetic, and evolutionary analyses.

FINDINGS Using this integrative strategy, we detected the first evidence of YFV re-emergence in the third transmission season (2018-2019) in a dying howler monkey from the central region of the RJ state. The YFV detected in 2019 has the molecular signature associated with the current SE YFV outbreak and exhibited a close phylogenetic relationship with the YFV lineage that circulated in the same Atlantic Forest fragment during the past seasons. This lineage circulated along the coastal side of the Serra do Mar mountain chain, and its evolution seems to be mainly driven by genetic drift. The potential bridge vector *Aedes albopictus* was found probing on the recently dead howler monkey in the forest edge, very close to urban areas.


MAIN CONCLUSIONS Collectively, our data revealed that YFV transmission persisted at the same Atlantic Forest area for at least three consecutive transmission seasons without the need of new introductions. Our real-time surveillance strategy permitted health authorities to take preventive actions within 48 h after the detection of the sick non-human primate. The local virus persistence and the proximity of the epizootic forest to urban areas reinforces the concern with regards to the risk of re-urbanisation and seasonal re-emergence of YFV, stressing the need for continuous effective surveillance and high vaccination coverage in the SE region, particularly in RJ, an important tourist location.

Key words: Yellow Fever - amino acid changes - phylogeography - *Alouatta* - mosquito vectors

doi: 10.1590/0074-02760190076

Financial support: RLO was funded by CNPq (Grants no. 309577/2013-6 and 312446/2018-7), FAPRJ (Grant F-26/203.064/2016), Institut Pasteur, Transversal Research Program (PTR Grant no. 528), CAPES (Grant no. COFECUB 799-14, AUXPE 1731/2014). MCB is a recipient of the CNPq fellowship for Productivity in Technological Development and Innovative Extension (Grant 309471/2016-8), and is funded by grants from Preventing and Combating the Zika Virus, MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit (Grants 426767/2018-7 and 88881.130684/2016-01), MCTI/FINEP/FNDCT 01/2016 - ZIKA Ref: 0240/16, and INOVA-Fiocruz (Grant VPPCB-007-FIO-18-2-69). IPR received a postdoctoral fellowship from the CAPES - Finance Code 001. ED was financed by a postdoctoral fellowship from the "Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD)" by the CAPES - Finance Code 001.

+ Corresponding authors: mbonaldo@ioc.fiocruz.br | gbellobr@gmail.com | lourenco@ioc.fiocruz.br

✉ <https://orcid.org/0000-0001-9899-3386>  <https://orcid.org/0000-0002-2724-2793>  <http://orcid.org/0000-0003-0423-5694> /

Received 23 February 2019

Accepted 20 March 2019

Except for the rare episodes of urban Yellow Fever (YF) transmission, human infections in the Americas have been acquired from the sylvatic cycle maintained between arboreal mosquitoes and non-human primates (NHPs).⁽¹⁾ Forests of northern South America have been regarded as a key territory for the maintenance and emergence of YF virus (YFV) lineages.^(2,3) In Brazil, the YFV is enzootic/endemic in the Amazon Region, which is in the north from where, it sometimes expands towards the central-west, south (S), and south-eastern (SE) regions, causing isolated epizootic events and human infections to severe epidemics of sylvatic origin.^(1,2) Epidemiological records gathered since the discovery of the YFV sylvatic cycle in Brazil in the early 1930s, as well as recent phylogenetic analyses of South American YFV samples have reinforced this concept.⁽¹⁾ The epidemic character of the sylvatic YF in the extra-Amazon Brazil-



Artigo 2: Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018

DOI: 10.3389/fmicb.2019.01079.

Resumo: Neste artigo descrevemos as rotas de dispersão do YFV do Centro-Oeste para o Sudeste, que ocorreu a partir de 2015. Observamos também presença de sequências com assinatura molecular em 2015, antes do surto, e sem assinatura molecular em 2017, durante o surto. Assim, contribuimos na pesquisa da história natural da dispersão da sub-linhagem 1E no Brasil, que ocasionou um surto entre 2016 e 2018, e segue se disseminando no país. Aqui, nós descrevemos o YFV GO05, que também foi utilizado no estudo do artigo 1 para cumprir os primeiros objetivos dessa tese.



Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018

OPEN ACCESS

Edited by:

Akio Adachi,
Kansai Medical University, Japan

Reviewed by:

Mike Holbrook,
Battelle, United States
Tamas Bakonyi,
Szent István University, Hungary
Nikos Vasilakis,
The University of Texas Medical
Branch at Galveston, United States

*Correspondence:

Edson Delatorre
edsonod@ioc.fiocruz.br;
delatorre.ioc@gmail.com

[†]Joint first authors

[‡]Joint last authors

Specialty section:

This article was submitted to
Virology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 20 February 2019

Accepted: 29 April 2019

Published: 24 May 2019

Citation:

Delatorre E, Abreu FVS, Ribeiro IP,
Gómez MM, dos Santos AAC,
Ferreira-de-Brito A, Neves MSAS,
Bonelly I, de Miranda RM,
Furtado ND, Raphael LMS,
da Silva LdFF, de Castro MG,
Ramos DG, Romano APM, Kallás EG,
Vicente ACP, Bello G,
Lourenço-de-Oliveira R and
Bonaldo MC (2019) Distinct YFV
Lineages Co-circulated
in the Central-Western
and Southeastern Brazilian Regions
From 2015 to 2018.
Front. Microbiol. 10:1079.
doi: 10.3389/fmicb.2019.01079

Edson Delatorre^{1*†}, Filipe Vieira Santos de Abreu^{2,3†}, Ieda Pereira Ribeiro^{4†},
Mariela Martínez Gómez^{4,5}, Alexandre Araújo Cunha dos Santos⁴,
Anielly Ferreira-de-Brito², Maycon Sebastião Alberto Santos Neves², Iule Bonelly²,
Rafaella Moraes de Miranda², Nathália Dias Furtado⁴, Lidiane Menezes Souza Raphael⁴,
Lucileis de Fátima Fernandes da Silva⁶, Márcia Gonçalves de Castro²,
Daniel Garkauskas Ramos⁷, Alessandro Pecego Martins Romano⁷,
Esper Georges Kallás⁸, Ana Carolina Paulo Vicente¹, Gonzalo Bello^{9†},
Ricardo Lourenço-de-Oliveira^{2‡} and Myrna Cristina Bonaldo^{4‡}

¹ Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, ² Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, ³ Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, Salinas, Brazil, ⁴ Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵ División Biología Molecular y Genética, Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, ⁶ Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros, Secretaria de Saúde de Goiás, Goiânia, Brazil, ⁷ Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Brazil, ⁸ Departamento de Moléstias Infecciosas, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁹ Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

The current outbreak of yellow fever virus (YFV) that is afflicting Brazil since the end of 2016 probably originated from a re-introduction of YFV from endemic areas into the non-endemic Southeastern Brazil. However, the lack of genomic sequences from endemic regions hinders the tracking of YFV's dissemination routes. We assessed the origin and spread of the ongoing YFV Brazilian outbreak analyzing a new set of YFV strains infecting humans, non-human primates (NHPs) and mosquitoes sampled across five Brazilian states from endemic and non-endemic regions between 2015 and 2018. We found two YFV sub-clade 1E lineages circulating in NHP from Goiás state (GO), resulting from independent viral introductions into the Araguaia tributary river basin: while one strain from 2017 clustered intermingled with Venezuelan YFV strains from 2000, the other YFV strains sampled in 2015 and 2017 clustered with sequences of the current YFV outbreak in the Brazilian Southeastern region (named YFV_{2015–2018} lineage), displaying the same molecular signature associated to the current YFV outbreak. After its introduction in GO at around mid-2014, the YFV_{2015–2018} lineage followed two paths of dissemination outside GO, originating two major YFV sub-lineages: (1) the YFV_{MG/ES/RJ} sub-lineage spread sequentially from the eastern area of Minas Gerais state to Espírito Santo and then to Rio de Janeiro states, following the Southeast Atlantic basin; (2) the YFV_{MG/SP} sub-lineage spread from the southwestern area of Minas Gerais to the metropolitan

Artigo 3: Structural characterization and polymorphism analysis of the NS2B-NS3 protease from the 2017 Brazilian circulating strain of Yellow Fever virus

DOI: 10.1016/j.bbagen.2020.129521.

Resumo: Este trabalho descreve, pela primeira vez, a estrutura do complexo NS2B-NS3 na sua conformação fechada, sem a presença de inibidores. Aqui foi descrita a estrutura tridimensional do complexo do YFV circulante obtida a partir de cristalografia. Além disso, descrevemos a atividade proteolítica dessa proteína com e sem os marcadores da assinatura molecular. Dessa forma, esses resultados foram complementares aos obtidos através do vírus sintético IC NS3 2010 no artigo 3 que cumpriu os objetivos desta tese.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - General Subjects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen

Structural characterization and polymorphism analysis of the NS2B-NS3 protease from the 2017 Brazilian circulating strain of Yellow Fever virus

Gabriela Dias Noske^a, Victor Oliveira Gawriljuk^a, Rafaela Sachetto Fernandes^a,
Nathalia Dias Furtado^b, Myrna Cristina Bonaldo^b, Glaucius Oliva^a, Andre Schutzer Godoy^{a,*}

^a Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo, Av. Joao Dagnone, 1100 - Jardim Santa Angelina, São Carlos 13563-120, Brazil

^b Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Yellow Fever virus
Flavivirus
Protease
NS3
NS2B

ABSTRACT

Background: The Yellow Fever virus (YFV) is transmitted by mosquitos and causes an infection with symptoms including fever, headaches and nausea. In 20–50% of the cases, the disease may evolve to a visceral stage, reaching high mortality rates. YFV NS2B-NS3 protease has been identified as an important drug target.

Methods: Herein, we describe the crystal structure of the NS2B-NS3 protease from the 2017 YFV Brazilian circulating strain using X-ray crystallography. Furthermore, we used a combination of biochemical and biophysical assays to characterize the enzyme and investigate the impact of the polymorphisms observed in different YFV circulating strains.

Results: Surprisingly, the crystal structure of YFV protease seems to adopt the closed conformation without the presence of a binding partner. Although D88E and K121R mutants exhibited a lower affinity for the substrate, both revealed to be more processive, resulting in a similar catalytic efficiency in relation to the WT protease. Still, both mutants showed an accentuated decrease in stability when compared with the WT.

Conclusions: The crystal structure of YFV NS2B-NS3 in closed conformation might be an important tool for the development of new drugs, as well as understanding the activation mechanism of viral proteases. Biochemical analyses indicate that the NS2B-NS3 protease of the circulating strain of YFV is more stable than previous strains. **General significance:** The YFV NS2B-NS3 protease is the first flaviviral structure described in its closed conformation when in a free form, implying that external factors might induce the activation of the enzyme.

1. Introduction

Yellow fever (YF) is one of the most severe mosquito-borne infections in African and South American countries, responsible for 29,000–60,000 deaths annually [1,2]. The 2016/2019 YF outbreak in Brazil is the most severe one in nearly eight decades, already resulting in more than 2000 cases of infection with 757 confirmed deaths [3]. In South America, the Yellow Fever virus (YFV) is transmitted by *Aedes aegypti* (urban cycle) and *Haemogogus* spp. (sylvatic cycle), causing the disease with a large spectrum of symptoms, ranging from mild to a severe deadly hemorrhagic fever [2,4,5]. The rapid spread of YFV to Southeastern Brazil and the increasing numbers of cases in rural areas

near densely populated cities constitute a potential risk of urban YF re-emergence [6,7]. To date, there is no antiviral treatment for YFV and prevention strategy relies on vaccination of people living or travelling to risk areas [8]. Despite the highly effectiveness and long-lasting immunity provided by a single dose, the use of 17D live-attenuated vaccine in low risk populations is not indicated due to the potential occurrence of severe adverse effects [8,9]. Therefore, the constant resurgence of YF in endemic countries is a major public health concern.

YFV is a member of the genus *Flavivirus* within the family Flaviviridae. The flavivirus genome is a single-stranded positive-sense RNA of ~11 kb in length consisting of a 5' untranslated region (UTR), a single long open reading frame (ORF), and a 3' UTR. The long ORF

Abbreviations: AMC, 4-amine-7-methylcoumarin; AU, asymmetric unit; DENV, Dengue virus; DSF, differential scanning fluorimetry; DTT, dithiothreitol; IMAC, immobilized metal chromatography; IPTG, β -D-1-thiogalactopyranoside; LIC, ligation independent cloning; NS, nonstructural protein; OD₆₀₀, optical density of 600 nm; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; PDB, Protein Data Bank; PNK, T4 Polynucleotide Kinase; RMSD, root mean square deviation; SUMO, Small Ubiquitin-like Modifier; TB, terrific broth; TEV, Tobacco Etch Virus; UTR, untranslated region; WNV, West Nile virus; WT, wild type; YFV, Yellow Fever virus; YF, yellow fever; ZIKV, Zika virus

* Corresponding author.

E-mail address: andregodoy@ifsc.usp.br (A.S. Godoy).

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129521>

Received 8 September 2019; Received in revised form 3 January 2020; Accepted 9 January 2020

Available online 10 January 2020

0304-4165/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Artigo 4: Recovery of Synthetic Zika Virus Based on Rio-U1 Isolate Using a Genetically Stable Two Plasmid System and cDNA Amplification

DOI: 10.3389/fmicb.2021.639655.

Resumo: Esse trabalho descreve a metodologia de obtenção de clone infeccioso a partir de um isolado do vírus Zika. Eu contribuí diretamente com o desenvolvimento da técnica, que foi empregada também como base para o desenho experimental da obtenção dos YFV sintéticos utilizados nesta tese, nos artigos 2 e 3.



Recovery of Synthetic Zika Virus Based on Rio-U1 Isolate Using a Genetically Stable Two Plasmid System and cDNA Amplification

Iasmim Silva de Mello^{1†}, Déberli Ruiz Fernandes^{1†}, Nathália Dias Furtado¹, Alexandre Araújo Cunha dos Santos¹, Marta Pereira dos Santos¹, Ieda Pereira Ribeiro¹, Lidiane Menezes Souza Raphael¹, Mônica da Silva Nogueira², Stephanie Oliveira Díaz da Cruz¹, Adalgiza da Silva Rocha³, Pedro Paulo de Abreu Manso⁴, Marcelo Pelajo-Machado⁴ and Myrna Cristina Bonaldo^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Suh-Chin Wu,
National Tsing Hua University, Taiwan

Reviewed by:

Toru Okamoto,
Osaka University, Japan
Luana de Borba,
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas (CONICET),
Argentina

*Correspondence:

Myrna Cristina Bonaldo
mbonaldo@ioc.fiocruz.br

[†]These authors have contributed
equally to this work and share first
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Virology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 09 December 2020

Accepted: 01 February 2021

Published: 24 February 2021

Citation:

de Mello IS, Fernandes DR,
Furtado ND, dos Santos AAC,
dos Santos MP, Ribeiro IP,
Raphael LMS, Nogueira MdS,
da Cruz SOD, Rocha AdS,
Manso PPa, Pelajo-Machado M and
Bonaldo MC (2021) Recovery
of Synthetic Zika Virus Based on
Rio-U1 Isolate Using a Genetically
Stable Two Plasmid System
and cDNA Amplification.
Front. Microbiol. 12:639655.
doi: 10.3389/fmicb.2021.639655

¹Laboratório de Biologia Molecular de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, ²Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, ³Central Analítica, Unidade de Apoio ao Diagnóstico do COVID-19 - UNADIG-RJ, Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

In 2016, the world experienced the unprecedented Zika epidemic. The ZIKV emerged as a major human pathogen due to its association with the impairment of perinatal development and Guillain-Barré syndrome. The occurrence of these severe cases of Zika points to the significance of studies for understanding the molecular determinants of flavivirus pathogenesis. Reverse genetics is a powerful method for studying the replication and determinants of pathogenesis, virulence, and viral attenuation of flaviviruses, facilitating the design of vaccines and therapeutics. However, the main hurdle in the development of infectious clones is the instability of full-length cDNA in *Escherichia coli*. Here, we described the development of a genetically stable and efficient infectious clone based on the ZIKV Rio-U1 isolated in the 2016 epidemic in Brazil. The employed strategy consisted of cloning the viral cDNA genome into two stable plasmid subclones and obtaining a high-quality cDNA template with increment in DNA mass for *in vitro* transcription by PCR amplification. The strategy for developing a ZIKV infectious cDNA clone designed in this study was successful, yielding a replicative and efficient clone-derived virus with high similarities with its parental virus, Rio-U1, by comparison of the proliferation capacity in mammal and insect cells. The infection of AG129 immunocompromised mice caused identical mortality rates, with similar disease progression and morbidity in the animals infected with the parental and the cDNA-derived virus. Histopathological analyses of mouse brains infected with the parental and the cDNA-derived viruses revealed a similar pathogenesis degree. We observed meningoencephalitis, cellular pyknosis, and neutrophilic invasion adjacent to the choroid plexus and perivascular cuffs with the presence of neutrophils. The developed infectious clone will be a tool for genetic and functional studies *in vitro* and *in vivo* to understand viral infection and pathogenesis better.

Keywords: Zika virus, infectious clone, two-plasmid system, cDNA amplification, cell infection, AG129 mouse infection

Artigo 5: Genotype-specific features reduce the susceptibility of South American yellow fever virus strains to vaccine-induced antibodies

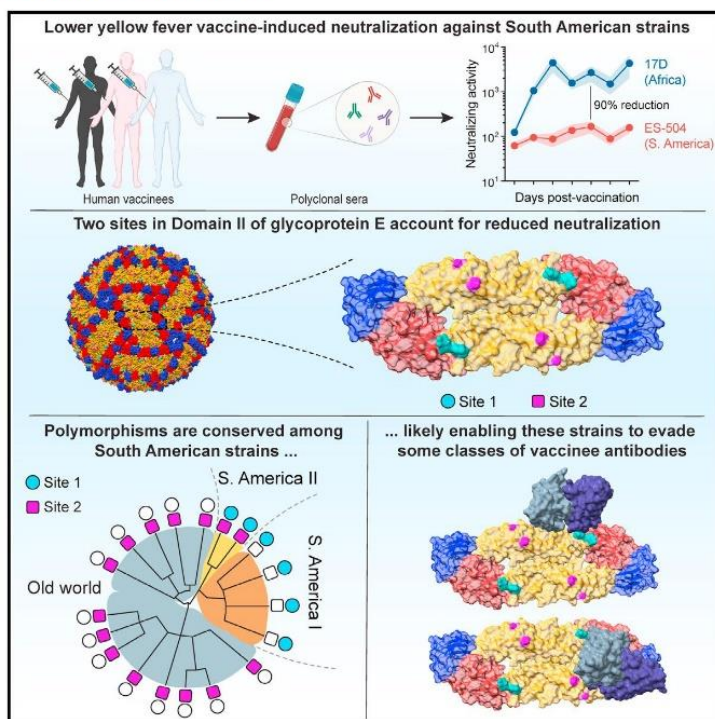
DOI: 10.1016/j.chom.2021.12.009.

Resumo: Esse artigo tinha como objetivo primário, desenvolver anticorpos monoclonais para tratamento contra a febre amarela. Realizamos ensaios de neutralização com soro de doadores vacinados, tanto com o YFV vacinal 17DD quanto com o 17D-204. Observamos que os soros neutralizaram o vírus ES-504 em menor proporção que o vírus 17DD. Assim, iniciamos um estudo molecular de mapeamento da região responsável pelo escape aos anticorpos presentes no soro, assim como à uma gama de anticorpos monoclonais. Em resumo, detectamos duas regiões na proteína E que diferem entre os vírus de linhagem africana e sul-americana. Dentre essas regiões, uma apresenta um sítio de glicosilação que foi detalhadamente descrito neste trabalho. Assim, contribuímos igualmente, para a detecção de marcadores evolutivos na linhagem SA-I.

Cell Host & Microbe

Genotype-specific features reduce the susceptibility of South American yellow fever virus strains to vaccine-induced antibodies

Graphical abstract



Authors

Denise Haslwanter, Gorka Lasso, Anna Z. Wec, ..., Laura M. Walker, Myrna C. Bonaldo, Kartik Chandran

Correspondence

mbonaldo@ioc.fiocruz.br (M.C.B.), kartik.chandran@einsteinmed.edu (K.C.)

In brief

Yellow fever vaccines based on an African strain induce neutralizing antibodies that are associated with protection. Haslwanter et al. show that these antibodies have reduced activity against South American strains because they bear genetically distinct surface proteins, suggesting that changes are needed in how immune protection against YFV is monitored.

Highlights

- YFV vaccine-induced neutralization is attenuated against South American YFV strains
- Reduced neutralization sensitivity genetically maps to domain II of the E protein
- Multiple genetic changes in domain I–domain II hinge affect antibody recognition
- Approach to YFV immunological surveillance in South America should be reevaluated

Article

Genotype-specific features reduce the susceptibility of South American yellow fever virus strains to vaccine-induced antibodies

Denise Haslwanter,¹ Gorka Lasso,^{1,10} Anna Z. Wec,^{2,10,11} Nathália Dias Furtado,³ Lidiane Menezes Souza Raphael,³ Alexandra L. Tse,¹ Yan Sun,⁴ Stephanie Stransky,⁴ Núria Pedreño-Lopez,^{5,12} Carolina Argondizo Correia,⁶ Zachary A. Bornholdt,⁷ Mrunal Sakharkar,² Vivian I. Avelino-Silva,⁸ Crystal L. Moyer,⁷ David I. Watkins,⁵ Esper G. Kallas,⁸ Simone Sidoli,⁴ Laura M. Walker,^{2,9} Myrna C. Bonaldo,^{3,*} and Kartik Chandran^{1,13,*}

¹Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, The Bronx, NY 10461, USA

²Adimab, LLC, Lebanon, NH 03766, USA

³Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil

⁴Department of Biochemistry, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

⁵Department of Pathology, The George Washington University, Washington, DC 20037, USA

⁶Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 01246-903 São Paulo, Brazil

⁷Mapp Biopharmaceutical, Inc., San Diego, CA 92121, USA

⁸Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 01246-903 São Paulo, Brazil

⁹Adagio Therapeutics Inc., Waltham, MA 02451, USA

¹⁰These authors contributed equally

¹¹Present address: Dyno Therapeutics, Cambridge, MA 02139, USA

¹²Present address: IrsiCaixa AIDS Research Institute, 08916 Badalona, Spain

¹³Lead contact

*Correspondence: mbonaldo@ioc.fiocruz.br (M.C.B.), kartik.chandran@einsteinmed.edu (K.C.)

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.12.009>

SUMMARY

The resurgence of yellow fever in South America has prompted vaccination against the etiologic agent, yellow fever virus (YFV). Current vaccines are based on a live-attenuated YF-17D virus derived from a virulent African isolate. The capacity of these vaccines to induce neutralizing antibodies against the vaccine strain is used as a surrogate for protection. However, the sensitivity of genetically distinct South American strains to vaccine-induced antibodies is unknown. We show that antiviral potency of the polyclonal antibody response in vaccinees is attenuated against an emergent Brazilian strain. This reduction was attributable to amino acid changes at two sites in central domain II of the glycoprotein E, including multiple changes at the domain I–domain II hinge, which are unique to and shared among most South American YFV strains. Our findings call for a reevaluation of current approaches to YFV immunological surveillance in South America and suggest approaches for updating vaccines.

INTRODUCTION

Yellow fever virus (YFV), a prototypic flavivirus and the etiologic agent of yellow fever, is endemic to tropical and subtropical regions of Africa, Central America, and South America. Although YFV largely circulates in a sylvatic cycle between mosquitoes and nonhuman primates, mosquito-borne viral transmission from nonhuman primates to humans can occur due to encroachment by the latter into forested areas. Further, high population densities in urban areas can trigger cycles of human-to-human transmission that are maintained by anthropophilic mosquitoes. YFV has periodically resurged in endemic areas in South America since the 1960s, but especially intense reemergence events have been documented in both endemic and non-endemic areas in the past decade (Douam and Ploss, 2018). The 2016–2019

YFV epidemic centered in southeastern Brazil was the largest in over 70 years, with >2,000 cases and >750 deaths (Hill et al., 2020; de Oliveira Figueiredo et al., 2020).

The live-attenuated YF-17D virus was derived from the virulent African strain Asibi and was further passaged to yield closely related variants (e.g., YF-17D-204 and YF-17DD; hereafter, YF-17D) that form the basis of YFV vaccines currently in use. These are among the most effective vaccines ever created and remain the linchpin of global efforts to control yellow fever (Barrett and Teuwen, 2009). Single doses of YF-17D are expected to confer protection for at least 2–3 decades post-immunization (Barrett and Teuwen, 2009; Monath, 2012). The drivers of YFV reemergence in South America and elsewhere in the face of YF-17D vaccination are likely complex and related to multiple factors, including ecological disruptions attendant to human activity

Article

Amino acid polymorphisms on the Brazilian strain of yellow fever virus methyltransferase are related to the host's immune evasion mediated by type I interferon

Nathália Dias Furtado¹, Iasmim Silva de Mello¹, Andre Schutzer Godoy², Gabriela Dias Noske², Glaucius Oliva², Bruno Canard³, Etienne Décroly³, Myrna C. Bonaldo^{1*}

¹ Laboratório de Biologia Molecular de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

² Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos, Instituto de Física de São Carlos-USP, São Paulo, Brazil

³ Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Aix-Marseille Université, CNRS, UMR7257, Marseille, France

* Correspondence: author: mbonaldo@ioc.fiocruz.br

Citation: Furtado, N. D.; de Mello, I.S.; Godoy, A.S.; Noske, G.D.; Oliva, G.; Canard, B.; Décroly, E.; Bonaldo, M.C. Amino acid polymorphisms on the Brazilian strain of yellow fever virus methyltransferase are related to the host's immune evasion mediated by type I interferon. *Viruses* 2022, 14, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Since late 2016, a yellow fever virus (YFV) variant carrying a set of nine amino acid variations has circulated in South America. Three were mapped on the methyltransferase (MTase) domain of viral NS5 protein. To assess whether these changes affected viral infectivity, we synthesized YFV carrying the MTase of circulating lineage as well as its isoform with the residues of the previous strains (NS5 K101R, NS5 V138I, and NS5 G173S). We observed a slight difference in viral growth properties and plaque phenotype between the two synthetic YFVs. However, the MTase polymorphisms associated with the Brazilian strain of YFV (2016-2019) confer more susceptibility to the IFN-I. In addition, in vitro MTase assay revealed that the interaction between the YFV MTase and the methyl donor molecule (SAM) is altered in the Brazilian MTase variant. Altogether, the results reported here describe that the MTase carrying the molecular signature of the Brazilian YFV circulating since 2016 might display a slight decrease in its catalytic activity but virtually no effect on viral fitness in the parameters comprised in this study. The most marked influence of these residues stands in the immune escape against the antiviral response mediated by IFN-I.

Keywords: Yellow fever virus outbreak; Methyltransferase; Virulence; Type I interferon.

1. Introduction

Yellow fever virus (YFV) is the causative agent of an acute febrile disease endemic to Sub-Saharan Africa and South America. Since the beginning of the 21st century, small events of YFV spreading were described in Brazil, which resulted in a significant and unprecedented outbreak in late 2016, peaking in between 2017 and 2018 (1-3). Phylogenetic analyses described the clustering of all the YFV sequences determined since 2004 in a sub-clade 1E of the modern lineage belonging to the South American I clade (4-6). During the latest Brazilian outbreak, complete sequenced genomes of YFV from samples of naturally infected mosquitoes, non-human primates, and humans displayed a molecular signature consisting of polymorphisms associated with the mutation of nine amino acids (2, 6). Three amino acid markers are located in the methyltransferase (MTase) domain of viral protein NS5 at positions R101K, I138V, and S173G (6).

In eukaryotes, the mRNA capping and methylation is a pivotal post-transcriptional modification, promoting the mRNA translocation from the nucleus to the cytoplasm and limiting RNA degradation (7). These post-transcriptional modifications are also essential for viral RNA translation, replication and stability. YFV belongs to the genus *Flavivirus* and family *Flaviviridae*, displaying a positive single-stranded RNA composed of a unique open reading frame flanked by two untranslated regions (5'- and 3'-UTR) (8). The

replication cycle of flaviviruses occurs in the host's cell endoplasmic reticulum derived membrane, without an entry in the nucleus (9). Consequently, these viruses carry their own RNA capping machinery, which involves the N-terminal MTase domain of the NS5 protein (10, 11).

The flavivirus NS5 MTase is a globular domain that catalyzes the cap formation with a still ill-defined guanylyltransferase (GTase) activity and its subsequent methylation by two methyltransferase activities; the guanine-N7-methylation and the 2'-O-nucleoside methylation (11-13). It is believed that the GTase activity transfers a GMP moiety of a GTP molecule to the 5'-diphosphate viral RNA (ppAGN), generating pyrophosphate (PPi) as a by-product, and the capped RNA, GpppAGN. The ppAGN results from the hydrolysis of pppAGN to ppAGN releasing a phosphate (Pi), by the RNA triphosphatase activity of the NS3 protein (14). After viral RNA capping completion, the MTase catalyzes two sequential methylation reactions (13). First, MTase transfers a methyl group from the methyl donor S-adenosyl-L-methionine (SAM) to the N7 position of the guanosine cap. This step generates a cap-0 structure (15) (m7GpppAGN) and the S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) by-product. The MTase binds next another SAM molecule and transfer its methyl group to the 2'-hydroxyl position on the ribose of the first viral genomic RNA nucleotide, the conserved adenine (A) nucleotide, to form the cap-1 structure (7) (m7GpppAmGN) (13, 16, 17).

Crystallographic studies on NS5 MTase domain of flaviviruses as dengue virus (11), West Nile virus (16), Meaban virus (18), Japanese Encephalitis virus (17), Zika virus (19), Wesselsbron virus (20), Murray Valley Encephalitis virus (21) and YFV (22) have allowed locating the binding sites for GTP, SAM/SAH, and viral RNA. Only one binding site for the methyl donor, SAM, was identified in these structures, where the two methylation reactions occur (13). The mechanism proposed for completion of both MTase activities involves repositioning of the nascent viral RNA and the substitution of SAH molecule for a SAM molecule after the N7-methylation, thus engaging conformational rearrangement (16, 23).

Mutational screening studies indicated that mutations impairing the 2'-O-methylation of viral RNA attenuated West Nile virus replication upon cell transfection, whereas mutations blocking the N7-methylation completely abolished viral replication (24). Considering that the RNA methylation is essential to viable viral infection, and the differences between host cell and flaviviral cap formation processes, it is possible to lead antiviral research by targeting this domain of the viral protein NS5 (16). Different strategies for the MTases inhibition have been developed. A targeted region of the MTase is the SAM binding site. Several SAM analogs have been designed and used to inhibit the MTase activity, such as Sinefungin (16, 25-27).

In addition to its role in capping, which is central for viral protein expression and RNA protection against degradation 5' exonucleases, the MTase also plays a role in the host's innate immune response evasion (28, 29). Indeed, it has been recently demonstrated that the 2'-O-methylation of the cap structure is a self marker (30, 31). Thus RNA lacking N1 2'-O methylation are detected by RIG-I leading to the productions of type 1 interferon's (IFN-). Furthermore, these mis-capped RNA are next sequestered by IFIT proteins (32, 33) thereby limiting the viral replication. The MTase domain of the NS5 protein has been shown to interact directly with proteins involved in the interferon pathway, such as STAT2 which is involved in the IFNAR signaling and allows the escape from the antiviral response (32, 34-36).

The relevance of genetic modifications in positive single-stranded RNA viruses has been widely explored using reverse genetic methods (37, 38). Here, we synthesized YFV based on the genomic sequence of a YFV isolated in Brazil in 2017 and we conducted site-directed mutagenesis to revert the molecular signature residues located in the MTase domain of NS5, generating two YFV variants. Using this approach, we addressed the effects of the amino acid polymorphisms in viral fitness *in vitro* and *in vivo*. Next, we investigated the enzymatic activity of two isoforms of YFV NS5 bearing at positions 101,

138 and 173, the residues R, V and G, or K, I and S, respectively, through protein purification. Our results suggest that the mutations of the Brazilian strain might play a role in binding the methyl donor SAM to the MTase and is related to higher sensitivity to IFN-I.

2. Materials and Methods

2.1. Comparative modeling of YF MTase 2017

We modeled the NS5 MTase domain of the prototype YFV isolated in 2017 (GenBank: KY885000) using Modeller software version 10.1. The search for a suitable template was performed on the Swiss-model server (39). The PDB structure from the vaccine YFV complexed with S-adenosyl-L-homocysteine (SAH; 3EVB)(22) was employed as a template, sharing 94.32 % identity with the YFV 2017 sequence. The template and the target sequences were aligned using the “align2d” function of Modeller (40). One hundred models were obtained using the “automodel” routine of Modeller. Each model was optimized using the variable target function method (VTFM) for 300 iterations and molecular dynamics (MD) in slow mode. The entire cycle was repeated twice to ensure the optimized conformation of the generated model. The resulting modeled structures were ranked according to their discrete optimized protein energy (DOPE) score. PROCHECK further assessed the best model (the lowest DOPE score) in SAVES v.6 server for Ramachandran plot and ProSA to verify the overall quality of the model through z-score (41, 42). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, was used for structure visualization.

2.2. Synthesis of YFV cDNA infectious clone

The methodology employed in this study was based on the strategy developed for the infectious clone Zika virus Rio-U1 (43). The cDNA genome was derived from the YFV isolate ES-504 (GenBank: KY885000). This YFV was isolated from a non-human primate belonging to the *Alouatta guariba clamitans* species in the state of Espírito Santo, Southeastern Brazil, in February 2017. The cDNA was previously obtained by RT-PCR and sequenced (2, 6).

We amplified the ES-504 cDNA to obtain four fragments covering the entire genome and presenting overlapping regions. The employed primer sets are listed in Additional Table 1. The amplification primers of fragments 2, 3, and 4 were used to insert silent mutations to create restriction sites Mlu I, Kpn I, and Spe I, allowing directional cloning in plasmid vectors. At the 5' end of fragment 1, we fused the transcription promoter sequence of bacteriophage SP6 for the following in vitro transcription step, adding a Not I restriction site. The natural EcoRI restriction site determines the 3' end of fragment 1 and 5' end of fragment 2.

The plasmid vectors used to clone all four fragments were derived from pBR322 and pCC1-4K. Initially, we tried to clone the fragments in pBR322, a low copy vector, modified by the insertion of a customized multiple cloning site (MCS) carrying the selected restriction sites. Fragments 1 and 3 were successfully cloned and multiplied in *Escherichia coli* strain Sure. On the other hand, fragments 2 and 4, containing the portion of the genome that expresses active cryptic promoter sequences and the 3' end of the genome, respectively, were unstable in this vector. Thus, we used the single-copy vector pCC1-4K (GenScript) to clone these two fragments. The plasmid constructs were successfully propagated in *E. coli* strain Epi300 (Transformax kit, Epicentre). This vector was also modified to carry a customized MCS. The sequences of the MCS of both plasmid vectors are listed in Additional Table 1. In the end, we obtained the following plasmids: pBR322/1, pBR322/3, pCC1/2, and pCC1/4.

The genome assembly strategy adopted in this work is based on the two-plasmid system, where one plasmid bears the genome ends and another plasmid, the central part of the genome's cDNA. Because of fragments 2 and 4's instability, we used the pCC1-4K

to vector the designed genome portions. For this, we excised the fragment 1 with Not I and EcoRI (Promega) restriction enzymes digestion and ligated in plasmid pCC1/4 digested with the same restriction sites, using T4 DNA Ligase (New England Biolabs). Similarly, the plasmids pBR322/3 and pCC1/2 were digested with Mlu I and Kpn I (Promega) to excise fragment 3 and clone it into the plasmid pCC1/2. Both plasmids were successfully propagated in *E. coli* Epi300, recovering final plasmids pCC1/1.4 and pCC1/2.3.

The genome template cDNA was assembled by in vitro ligation of fragment 2.3 and plasmid pCC1/1.4. First, fragment 2.3 and the entire plasmid pCC1/1.4 were amplified using primer sets 1 and 2, listed in Additional Table 1. Both amplicons were digested with EcoRI and Kpn I (Promega) and ligated with T4 DNA Ligase (New England Biolabs). The product of ligation was amplified with primer set 3 (Additional Table 1) and subsequently in vitro transcribed with SP6 RNA Polymerase, using mMESSAGING mMACHINE SP6 Transcription kit (Ambion).

Finally, the transcribed RNA was electroporated in C6/36 cells in 0.2 mm cuvettes with 2 pulses of 400 volts, capacitance of 25 μ f and resistance of 800 Ω . The transfected cells were recovered in Leibovitz's L-15 medium (Gibco) supplemented with 5 % fetal bovine serum (FBS, Cutilab) and were incubated at 28 °C for 7 days. On day 7 post-transfection, cell supernatant was collected and used to detect viral genome by qRT-PCR using TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix as described elsewhere (44).

The viral suspension stocks used in this study were obtained from the infection of C6/36 cells, previously seeded at 80,000 cells/cm² in T-75 flasks, with 3 mL of cell supernatant harvested after transfection. After 5 days of incubation at 28 °C, the supernatant was collected, centrifuged at 4 °C, 700 \times g for 10 minutes, filtered with 0.22 μ m syringe filter, and stored at -80 °C. RNA of viral stocks was extracted using the QIAmp Mini Viral RNA kit (Qiagen) and sequenced as described elsewhere (6).

To obtain the clone-derived YFV bearing modifications at the NS5 MTase domain, we inserted 3 mutations, one by one, in plasmid pCC1/1.4 using QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). The mutagenesis primers are listed in Additional Table 1. The mutations exchanged codons AGG (7944..7946), ATA (8056..8058), and AGC (8161..8163) to AAG, GTG, and GGC, generating the amino acid changes NS5 R101K, I138V, and S173G, respectively. The mutated plasmid pCC1/1.4/MTase was transformed in *E. coli* Epi300 and substituted pCC1/1.4 in the infectious clone methodology described above to recover the mutated YFV, referred to as YFV_MTase_2010. All cDNA cloning and viral recovery steps were confirmed by the whole sequencing using primer sets and methodology described by Gómez et al. (6).

2.3. Plaque phenotype assays

The plaque phenotype assay was conducted as described elsewhere (45). In summary, Vero cells were seeded at a density of 40,000 cells/cm² in a 6-well plate the day before infection. After cell infection, the monolayer was overlaid with 3 mL of supplemented Earle's 199 medium containing 0.5% agarose, and incubated for 7 days at 37°C, 5% CO₂ and wet atmosphere.

2.4. Plaque phenotype assay

The plaque sizes of the four YF viruses were determined after infection of Vero cells as previously described [4]. In summary, Vero cells seeded at 40,000 cells/cm² were infected with 10 PFU, 20 PFU, and 40 PFU of each virus. After infection, cells were overlaid with 0.5% agarose prepared in Earle's 199 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Cutilab, Brazil), 0.25% sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, USA), and 40 mg/mL gentamicin (Gibco, USA) and further incubated at 37°C and 5% CO₂ for 7 days. The cells were fixed in 10.0% formaldehyde and stained with 0.4% violet crystal. Images of the plates were analyzed using ImageJ software to measure plaque areas. The results

were plotted and statistically analyzed using GraphPad Prism software 8. Statistical tests employed were Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test.

2.5. Viral growth kinetics in different cell lines

We utilized Vero, HepG2, C6/36, and Aag2 cells in our study. Vero cells were cultivated at a cell density of 4.0×10^4 cells/cm² in supplemented Earle's medium. HepG2 were seeded at 6.0×10^4 cells/cm² in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FBS and 0.1% nonessential amino acids (NEAA; Gibco). Both cell lines were maintained at 37°C, with 5% CO₂ and a wet atmosphere. C6/36 and Aag2 cells were cultivated at 8.0×10^4 cells/cm² in Leibovitz's L-15 Medium, and Schneider's Insect Medium (Gibco) supplemented with 5% and 10% FBS, respectively, and were incubated at 28 °C.

Cells were seeded in T-25 flasks with predetermined densities 24 hours before infection. Viruses were diluted with an appropriate medium to infect cells at MOI 0.02 in a final volume of 0.5 mL. Cell medium was discarded, and the inocula were adsorbed in the cell monolayer for 1 hour. After that, the viral suspension was discarded, the appropriate cell medium was added to the monolayer, and the cells were incubated for 5 days. An aliquot of cell supernatant was collected every 24 hours and titrated by plaque assay (45). The viral titers were transformed in log₁₀ and plotted in a dispersion graph for analysis. The statistical analyses were conducted in GraphPad Prism 8 software.

2.6. Viral infection in the presence of type I interferon

The viral sensitivity by IFN-I was carried out as previously described (45). Briefly, Vero cells were seeded in a 24-well plate at a density of 50,000 cells/cm², 24 h before IFN treatment. Cells were pre-treated with IFN- α or IFN- β concentrations of 1000, 100, 50, and 10 UI/mL for 6 h before infection. Viral adsorption was carried out for 1 h with an MOI of 0.5. Finally, cells were overlaid with a culture medium containing the same concentrations used in pre-treatment and incubated for 48 h. The infective virus was quantified by plaque assay titration. IC₅₀ values were obtained after nonlinear curve fitting available in GraphPad Prism 8 software ([Inhibitor] vs. normalized response – Variable slope).

2.7. Viral inhibition by Sinefungin

Before the viral inhibition assays, HepG2 cells were tested for cell viability in concentrations ranging from 5 to 0.00032 μ M of Sinefungin (Sigma-Aldrich). Therefore, cells were seeded in 96-well plates at a density of 10,000 cells/well 24 hours before treatment with Sinefungin. Cell medium was discarded, and 90 μ L of supplemented DMEM medium with 5-fold serial diluted concentrations of Sinefungin was added to the cells. Treatment was carried through for 42 hours in an appropriate incubator, after which 10 μ L of PrestoBlue Reagent (Thermo Fisher Scientific) was added to each well with treated and untreated cells. The cells were incubated for 30 minutes before absorbance values from each well were obtained at 570 nm normalized at 600 nm wavelength using VersaMAX Microplate Reader (Molecular Devices).

One day before the viral infection, HepG2 cells were seeded in 24-well plates at a density of 60,000 cells/well. The viruses YFV_2017 and YFV_MTase_2010 were diluted to infect cells at MOI 0.1. Cell supernatant was discarded, and 50 μ L of the viral suspensions were added to the monolayer, as well as 50 μ L of supplemented DMEM medium with 4.0, 3.0, 1.0, 0.6, 0.12, 0.24, and 0.0 μ M of Sinefungin. Adsorption occurred during 1 hour of incubation at 37 °C, with wet atmosphere and 5% CO₂ with agitation every 15 minutes. After this step, 400 μ L of supplemented DMEM medium with the corresponding concentrations of Sinefungin were added to each well. Cell supernatants were harvested after 42 hours of incubation at 37 °C, with a wet atmosphere and 5% CO₂. Viral yields were quantified by plaque assay titration in Vero cells. Viral titers were used to calculate IC₅₀

values in GraphPad Prism 8 software with the nonlinear regression fitting algorithm of [Inhibitor] vs. normalized response – Variable slope. This experiment was performed in 4 replicates, and the IC₅₀ values obtained in every replicate were analyzed by Unpaired t-test also in GraphPad Prism 8.

2.8. Neurovirulence in BALB/c mice

BALB/c mice were purchased from CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório), of the State University of Campinas, São Paulo (UNICAMP). Animal experimentation was carried out in strict accordance with the Guide of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocols employed were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experimentation of Oswaldo Cruz Institute (CEUA-IOC; Permit: L-034/2019). Groups of 4 young adult BALB/c mice (6 weeks old) were inoculated intracerebrally with 10³ PFU in a final volume of 30 µL of each virus. Mock-infected mice were inoculated with the diluent medium in which the viral inocula were prepared (Earle's 199 medium supplemented with 25 mM HEPES and 0.025% sodium bicarbonate). The mice were anesthetized with a Ketamine/Xylazine cocktail at a dose of 100 mg/kg and 10 mg/kg, respectively, administered intraperitoneally. When no righting reflexes were detected, the mice were inoculated. The animals were monitored daily for 16 days with the evaluation of clinical signs of disease and weight measurement. Clinical scores were established to determine the humane endpoint for euthanasia of mice, as previously described (45). Evaluated clinical signs included the percentage of body weight loss, ruffled fur, hunched posture, low mobility, paralysis of posterior members, aggressiveness, and respiratory disorders. Euthanasia was performed with intraperitoneal administration of three times the previously dose used of Ketamine/Xylazine cocktail, followed by cervical dislocation. This experimentation was reproduced in quadruplicate, totalizing 16 animals infected with each viral sample. Average survival time (AST), percentage of mortality, clinical scores, and body weight loss were calculated and analyzed in GraphPad Prism 8 software. Statistical analysis of Kaplan-Meier survival curves was performed by log-rank test (Mantel-Cox).

2.9. Expression and purification of YFV NS5 MTase domain

For the expression and functional studies, the sequence corresponding to the methyltransferase domain of YFV NS5 (aa 1-270) was amplified using specific primers with Phusion DNA Polymerase and reagents (Thermo Fisher Scientific). The amplicon was obtained from ES-504 isolate (GenBank: KY885000) and then cloned into pETM-11/LIC plasmid vector with an N-terminal His6 tag. The vector plasmid was modified with the deletion of the connector sequence and the TEV cleavage site between the His6 tag and the MTase domain by PCR with Phusion DNA Polymerase. The variant carrying the reverted amino acids of the molecular signature (R101K, I138V e S173G) was obtained through site-directed mutagenesis using QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). Amplification, mutagenesis, and deletion primers are listed in Additional Table 1.

2.10. Thermal shift assay

The purified MTase proteins were diluted to the concentration of 0.5 mg/mL in 25 µL of protein storage buffer. SYPRO Orange Fluorescent Dye (Bio-Rad) was diluted 500 times in buffer. Then the reaction was set up with 21.5 µL of diluted protein and 3.5 µL of diluted dye. The thermocycler (Bio-Rad TFX8016) ran a reaction the with the following settings: an initial 2 minutes hold at 25 °C, ramping up in increments of 1 °C to a final temperature of 95 °C, with a 2 minutes hold.

2.11. Radioactive methyltransferase assay 308

The enzymatic assays were carried out in 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1 μ M [3H]SAM (PerkinElmer), and 1.9 of SAM in the presence of 0.7 μ M synthetic RNA with m7GpppAC5. The purified MTase domains were added to a final concentration of 0.1 μ M. To determine the enzymatic parameters, the concentrations of SAM and RNA varied in a range from 0.0 to 3.0 μ M as indicated in the legend of Figure 8. The MTase competition assays occurred in similar conditions as described above, except for the final concentration of YFV MTase in the reactions that was 0.5 μ M. 309
310
311
312
313
314
315

The reaction mixtures were incubated at 30°C and stopped after 30 min by a 10-fold dilution of the reaction mixture in ice-cold Milli-Q water supplemented with SAH 1 μ M. Samples were then transferred to DEAE cellulose filters (PerkinElmer) using Filtermat Harvester (Packard Instruments). Before a final drying step, the unincorporated [3H]SAM was washed from the DEAE filters with 10 mM ammonium formate (pH 8.0), with H₂O, and with absolute ethanol. At last, the filters were placed into plastic bags with BetaplateScint (Wallac) scintillation fluid and sealed. The transferred [3H]methyl groups onto RNA substrates were quantified in counts per minute using a Wallac 1450 MicroBetaTriLux liquid scintillation counter. The IC₅₀ values of SAH, sinefungin, and cap analogs were determined with GraphPad Prism software 8 using the log (inhibitor) versus response variable slope equation. 316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327

3. Results 328

3.1. Structural analysis of the molecular signature in the NS5 MTase domain 329

A previous study on the circulating YFV 2016-2019 first explored the molecular signature in computational tridimensional structure analyses of NS3 and NS5 viral proteins (6). Here, we reproduced the comparative modeling methodology, focusing exclusively on the MTase domain, to review the structural localization and potential influence of the three residues characteristic of YFV 2016-2019, which caused the outbreak in Southeastern Brazil. Thus, we modeled the MTase domain of YFV 2016-2017 NS5 protein by homology, using the crystallographic structure of YFV 17D MTase (PDB: 3EVB), sharing 94.32% of identity and 100% coverage, as a template. 330
331
332
333
334
335
336
337

The YFV 2016-2019 molecular signature in the MTase consists of residues R, I, and S in positions 101, 138, and 173, respectively. These residues are adjacent with distances between C α from 101 to 138, and from 138 to 173, of about 10Å. These amino acids are not directly involved in binding or catalytic interactions; however, they are closer to the methyl donor (SAM) binding site (Figure 1). 338
339
340
341
342

We also utilized the PyMOL software to change the three amino acid alterations, reverting these residues to the corresponding previously circulating YFV 2000-2010, here named as MTase 2010. The substitutions were Arg (R) to Lys (K) in position 101, Ile (I) to Val (V) in position 138, and Ser (S) to Gly (G) in position 173. All three-residue changes are conservative and have little impact on the 3D structure. It is noteworthy that the residues of MTase 2010 were substituted by residues with longer lateral side chains. For instance, the R residue in 101 (MTase 2017) has an additional amino group in the side chain than the K residue (MTase 2010). Additionally, the I residue (MTase 2017) in 138 has an additional methyl group than the V amino acid side chain (MTase 2010). The longer side chains might potentially reduce the distance between amino acids 101 and 138 and might disturb the SAM binding site slightly (Figure 1). 343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354

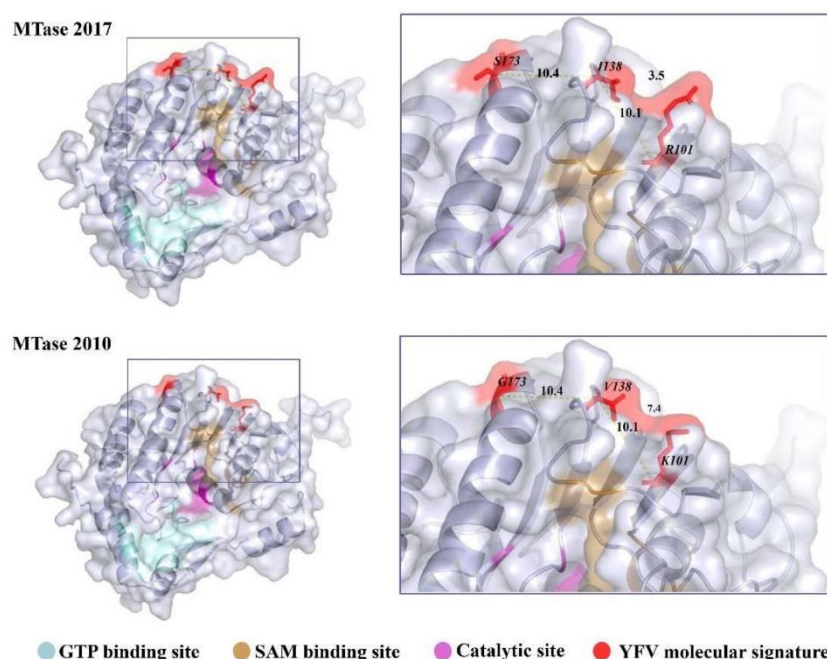


Figure 1. Localization of the YFV 2016-2019 molecular signature in the NS5 MTase domain. The MTase domain of the NS5 was modeled by homology-based on the sequence of YFV isolate ES-504 (GenBank: KY885000) and on the crystallographic data of YFV 17D MTase (PDB: 3EVB), MTase 2017. Mutations were inserted in PyMOL, generating MTase 2010. The models are represented in the cartoon with their respective molecular surfaces. GTP (blue) and SAM (pale yellow) binding sites are highlighted, as well as the catalytic site (purple) responsible for the methyl transfer reactions and the residues that compose the YFV 2016-2019 molecular signature.

3.2. Recovery of clone-derived YFV

We obtained infective viruses using the infectious clone methodology to determine whether the YFV 2016-2019 molecular signature in the MTase domain of NS5 protein influences in viral replication. Here, we adapted the methodology described previously for the Zika virus Rio-U1 infectious clone (43).

The genome of the YFV ES-504 isolate was amplified in four different fragments by RT-PCR. All fragments were engineered to carry unique restriction sites at their ends to direct cloning and subsequent genome assembly. The first fragment was also fused to the bacteriophage SP6 promoter sequence for in vitro transcription. Each fragment was cloned into plasmid vectors, after which two main plasmids were constructed, carrying two fused fragments each: pCC1/1.4 and pCC1/2.3. These plasmids were used to obtain the YFV ES-504 clone-derived virus, YFV_2017, upon restriction treatment followed by DNA ligation, PCR amplification of template cDNA, in vitro transcription, and transfection in C6/36 cells (Figure 2A). Viral recovery was confirmed by qRT-PCR detection with 1.28×10^8 genomic RNA copies/mL.

The validation of YFV_2017 as a comparable infective virus to its parental strain ES-504 was performed in two steps. First, we compared the plaque morphology of both clone-derived and parental viruses. Although ES-504 plaque showed more heterogeneity in area, there was no significant difference compared to YFV_2017 ($P = 0.213$) (Figure 2B). Next, we evaluated the viral growth kinetics in four cell lines: two derived from mammal hosts (Vero and HepG2) and two derived from mosquitoes (Aag2 and C6/36). The viral replication in all cell lines was similar without statistical significance (Figure 2C-F).

Therefore, we concluded that the infectious clone-derived virus YFV_2017 is a suitable model to study the effect of mutations in YFV.

386
387
388

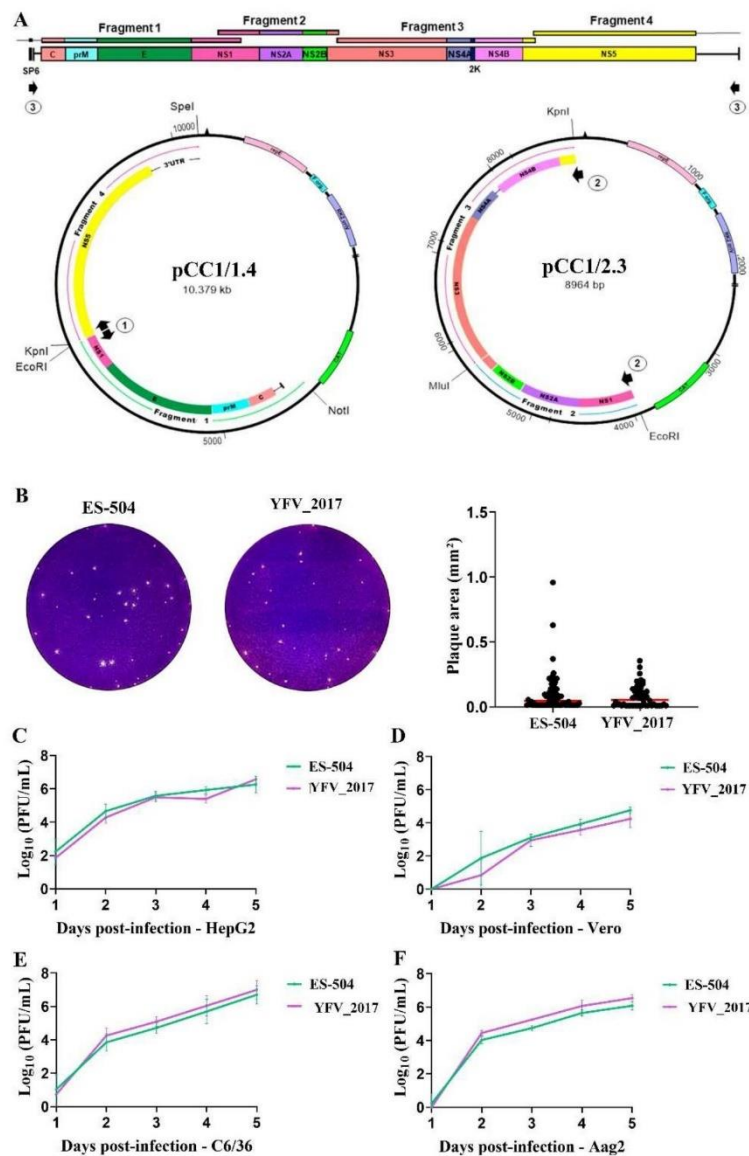


Figure 2 - Recovery and assessment of clone-derived YFV. (A) Strategy for the assembly of YFV genome. The genome was divided into 4 fragments and reassembled into two main plasmids bearing the extremities (pCC1/1.4) and the central part (pCC1/2.3) of the viral cDNA. Black arrows numbered 1 to 3 represent the primer pairs used in the amplification rounds before in vitro transcription of the template cDNA. (B) Plaque morphology of parental YFV ES-504 and clone-derived virus YFV_2017. Plaque areas were measured in ImageJ software, and the results were plotted and compared in GraphPad Prism 8, with the Mann-Whitney test. (C-F) Growth curves in different cell lines: HepG2 (C), Vero (D), Aag2 (E), and C6/36 (F). The viral titers were transformed in log₁₀ and plotted in GraphPad Prism 8. Statistical analyses were applied to each time point using the unpaired t-test to compare viral titers of YFV ES-504 and YFV_2017.

389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399

3.3. Cell infection studies with the mutant YFV/MTase 2010

To study the effects of the YFV 2016–2019 molecular signature in the NS5 MTase domain, we inserted mutations in the pCC1+1.4 plasmid, changing the three amino acid residues that compose the signature in this domain: R101K, I138V, and S173G. This mutated plasmid was used to further assemble the viral cDNA and recover the YFV variant MTase_2010. Viral recovery was confirmed by qRT-PCR with 2.27×10^8 genomic RNA copies/mL. The effects of this set of mutations on viral fitness were next investigated in cell cultures and BALB/c mice.

First, we compared the plaque morphology of both YFV_2017 and YFV_MTase_2010 viruses (Figure 3). Although both viruses presented in general tiny plaques, we observed larger plaque sizes in YFV_MTase_2010 than in its parental clone-derived virus YFV_2017, with statistically significant differences ($P < 0.0001$).

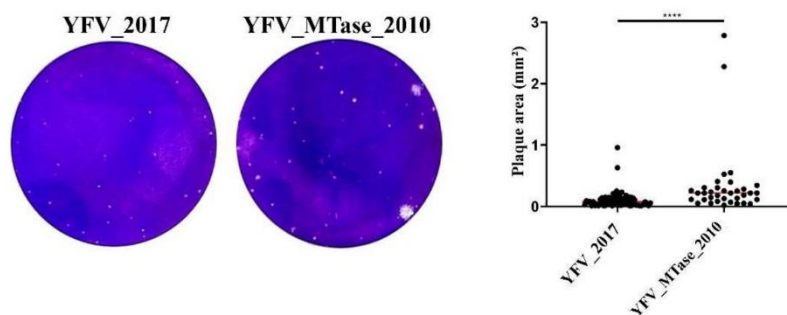


Figure 3 – YFV_2017 and YFV_MTase_2010 plaque phenotype determination by area measurements. Red lines represent the area medians value. Plaque areas were measured in ImageJ software, plotted in GraphPad Prism 8, and compared by Mann-Whitney test. **** represents statistical significance of $P < 0.0001$.

We further compared the ability of the parental IC YFV 2017 and the IC YFV/MTase 2010 viruses to replicate in human (HepG2) and *Aedes aegypti* (Aag2) cells (Figure 4). In HepG2 cells, the IC YFV/MTase 2010 tended to replicate less than the IC YFV 2017, until 3 days post-infection (dpi). However, only at 2 dpi we detected a statistical difference between the YFV variants ($P = 0.0361$). After 4 dpi, the viral growth of IC YFV 2017 and IC YFV/MTase 2010 became almost indistinguishable. On the other hand, no statistical differences were observed in Aag2 cells during the experiment.

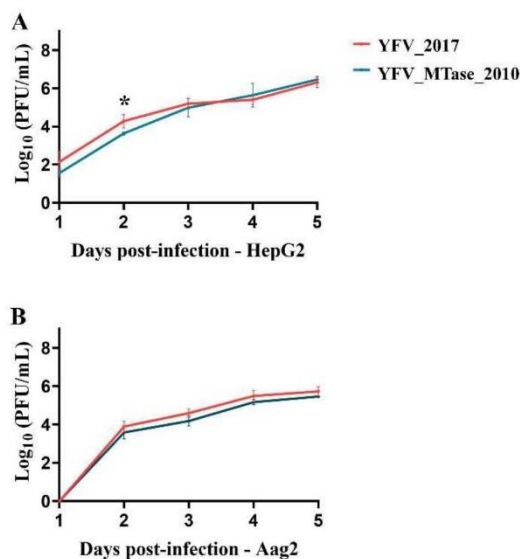


Figure 4 - Viral yields of YFV_2017 and the YFV_MTase_2010 viruses in infected (A) HepG2 cells and (B) Aag2 cells. The viral titers were transformed in log10 and plotted in GraphPad Prism 8. Statistical analyses were applied to each time point using the unpaired t-test to compare viral titers of YFV_2017 and YFV_MTase_2010. The asterisk in (A) represents the statistical significance with P = 0.0361.

Considering the ability of flaviviruses to evade innate immune response mediated by interferon (IFN) and that the NS5 protein interplay directly and indirectly with this pathway, we evaluated if the amino acid alterations could interfere in YFV sensitivity to type-I IFN. We treated Vero cells with 1000, 100, 50, and 10 UI/mL of IFN- α and IFN- β for 6 h; then, we infected those cells with YFV_2017 and YFV_MTase_2010 at MOI 0.5. After viral adsorption, cells were incubated with the same concentrations of IFN for 48 h. The viral titers at each culture condition were determined and transformed in log₁₀ to fit in a nonlinear regression to calculate IC₅₀ (Figure 5).

YFV_2017 was more sensitive to IFN- α and IFN- β treatments, presenting lower IC₅₀ values than YFV_MTase_2010 (Figure 5). The IC₅₀ displayed by YFV_2017 was 115.4 UI/mL and 26.66 UI/mL for IFN- α and IFN- β , respectively. Whereas those values for YFV_MTase_2010 were 693.6 UI/mL and 126.6 UI/mL under treatment with IFN- α and IFN- β , respectively.

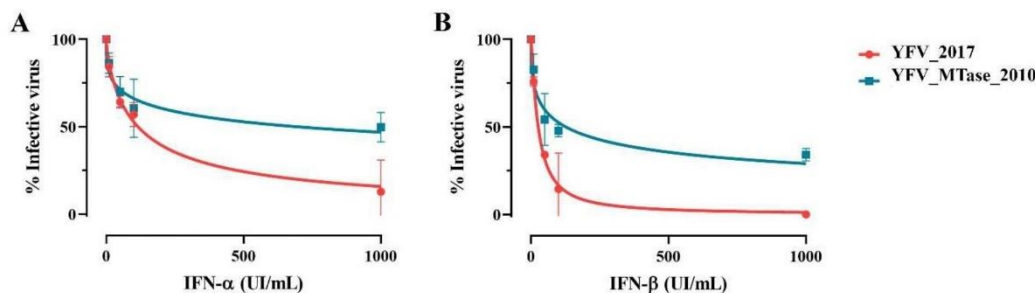


Figure 5 - Effect of IFN-I cell treatment in viral proliferation. (A) The nonlinear fit of viral growth in the presence of distinct concentrations of IFN- α and (B) IFN- β for YFV_2017 and YFV_MTase_2010. Data were analyzed in GraphPad Prism 8 with nonlinear regression [Inhibitor] vs. normalized response – Variable slope.

Finally, we assessed viral fitness through a neurovirulence test in a mouse model. Young-adult BALB/c mice were inoculated intracerebrally with 10^3 PFU of each virus and monitored daily for bodyweight loss and clinical signs of disease. Both YFV_2017 and YFV_MTase_2010 provoked 100% lethality on the 9th day after inoculation. The average survival time of mice inoculated with YFV_2017 and YFV_MTase_2010 was 7.2 ± 0.7 and 6.9 ± 0.9 days, respectively. The survival curves were compared statistically by the Log-rank (Mantel-cox) test and were not significantly different ($P = 0.4224$). Likewise, the disease outcome and body weight loss were similar between the two groups (Figure 6).

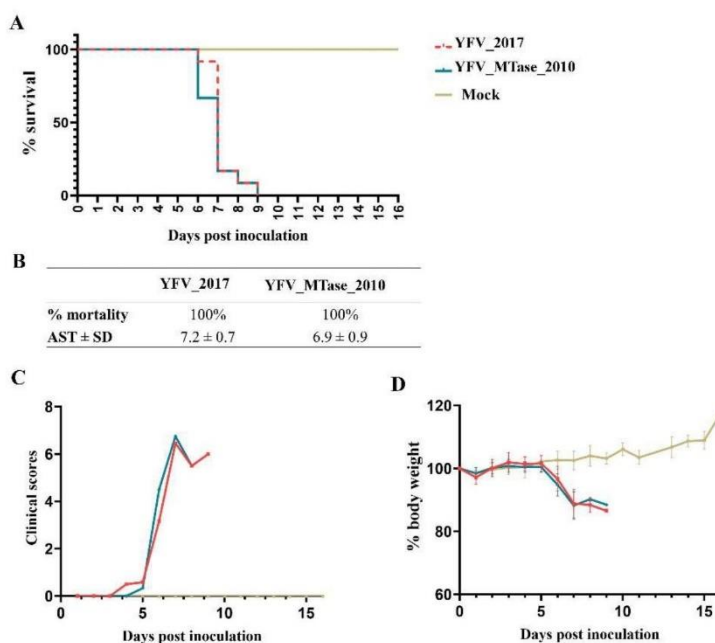


Figure 6 - Neurovirulence in BALB/c mice after inoculation with YFV_2017 and YFV_MTase_2010. (A) Kaplan-Meier survival curves of animal groups inoculated with each virus and culture medium (Mock). (B) Table summarizing the results obtained from the survival curves. (C) Bodyweight measurements along the 16 days after inoculation. (D) Clinical scores of the animals until euthanasia.

3.4. *In vitro* inhibition by SAM analog Sinefungin

To deepen the study on the influence of the YFV 2016-2019 molecular signature, we tested the inhibition of viral growth by a nucleoside S-adenosyl-L-methionine (SAM) analog, Sinefungin. HepG2 cells were infected with YFV_2017 and YFV_MTase_2010 in the presence of different concentrations of Sinefungin for 42 h, after which the cell supernatants were harvested and used for viral quantification by plaque assay. Viral titers were transformed in \log_{10} and used to calculate IC_{50} values. The results show that Sinefungin equally inhibited the two viruses with \log_{10} of the IC_{50} values of $4.634 \mu M \pm 0.752$ and 3.787

$\mu\text{M} \pm 0.498$ for YFV_2017 and YFV_MTase_2010, respectively (Figure 7). Although no significant difference was observed, YFV_MTase_2010 tends to be slightly more sensitive to the SAM analog.

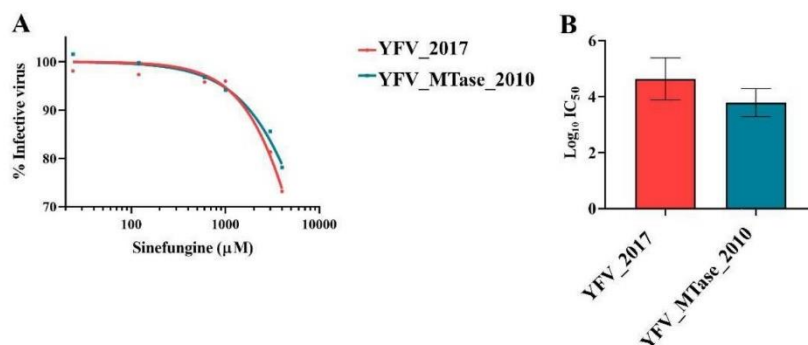


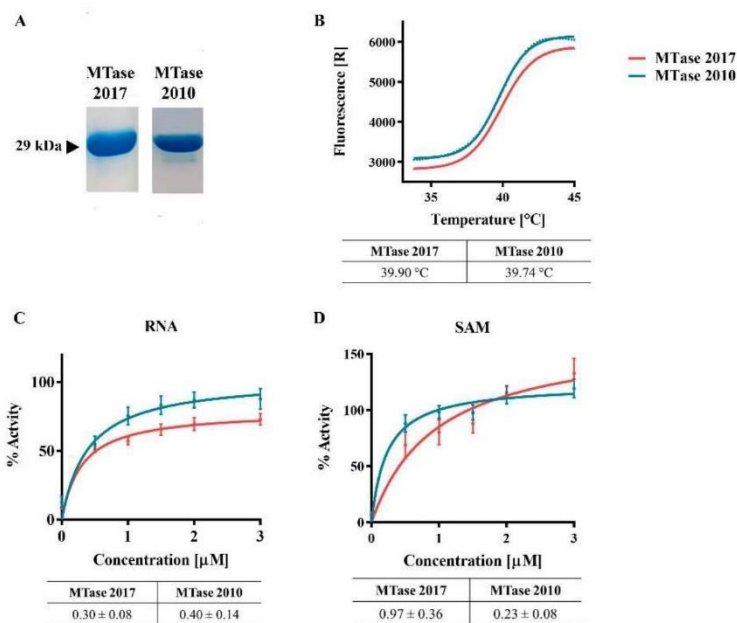
Figure 7 - Viral replication in the presence of Sinefungin. (A) The nonlinear fit of viral activity in the presence of the inhibitor molecule. Each point represents the result of four independent inhibition experiments. The nonlinear regression was conducted with the algorithm [Inhibitor] vs. normalized response – variable slope of GraphPad Prism 8. (B) IC_{50} value means and comparison. The unpaired t-test was employed to verify the absence of significant differences between the groups ($P = 0.1792$).

3.4. Protein expression and enzymatic activity

The MTase domain of the YFV 2016–2019 NS5 and a variant carrying the three mutations R101K, I138V, and S173G were expressed in *E. coli* C2566 pRARE2. Both isoforms were purified by IMAC and tested to identify the differences in stability and function between MTase 2017 and MTase 2010 (Figure 8). After protein purification, we performed a thermal shift assay and determined the melting temperatures (T_m) of both MTase. We observed that the mutations did not influence protein stability, and both proteins T_m s are about 40°C (Figure 8B).

To assess the influence of the mutations on the MTase activity, we compared the enzymatic activity of both proteins using small synthetic capped RNA with ($m^7\text{GpppAC}_3$), for Km determination upon Michaelis-Menten curve fitting (Figure 8C–D). Whereas the Km values for the RNA substrate were similar for both proteins, the Km values for the methyl donor (SAM) were increased for MTase 2017, indicating a lower affinity for the SAM (Figure 8D).

We further investigated the effect of the mutations by determining the inhibition of both MTase variants by S-adenosyl-L-homocysteine (SAH), the natural by-product of the methyltransferase reaction and the allosteric inhibitor Sinefungin (Figure 9). The two competitive inhibitors were shown to inhibit slightly more efficiently the MTase 2010 than the MTase 2017. Although there were no statistical differences, the divergence between inhibition of MTase 2010 and MTase 2017 was more pronounced upon treatment with Sinefungin ($P = 0.35$, for SAH, and $P = 0.2$, for Sinefungin). These results show that the mutations may interfere with the interaction between the MTase and the methyl donor, SAM, which is important for the reaction turnover.



513

514

Figure 8 - MTase expression and activity. (A) SDS-PAGE of purified proteins MTase 2017 and MTase 2010. (B) Thermal shift assay of the two MTase variants, with their respective melting temperature. (C-D) Michaelis-Menten curve fit of MTase activities and the Km values using varying concentrations of RNA or SAM (D).

515

516

517

518

We further investigated the effect of the mutations by determining the inhibition of both MTase variants by S-adenosyl-L-homocysteine (SAH), the natural by-product of the methyltransferase reaction and the allosteric inhibitor Sinefungin (Figure 9). The two competitive inhibitors were shown to inhibit slightly more efficiently the MTase 2010 than the MTase 2017. Although there were no statistical differences, the divergence between inhibition of MTase 2010 and MTase 2017 was more pronounced upon treatment with Sinefungin ($P = 0.35$, for SAH, and $P = 0.2$, for Sinefungin). These results show that the mutations may interfere with the interaction between the MTase and the methyl donor, SAM, which is important for the reaction turnover.

519

520

521

522

523

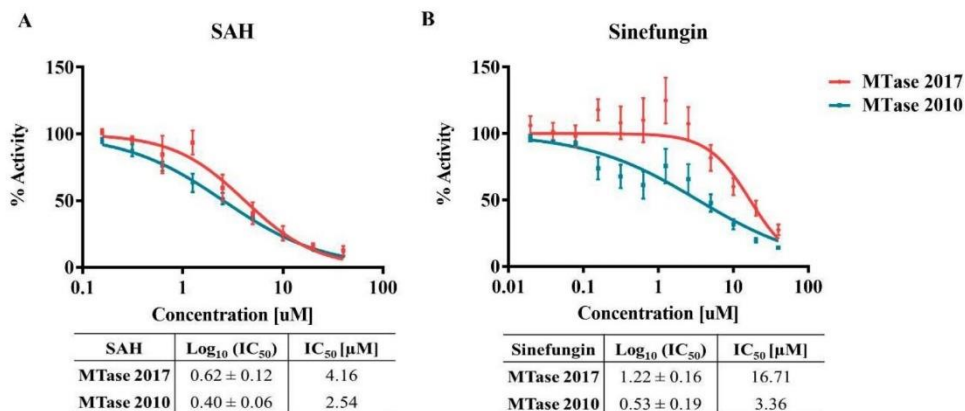
524

525

526

527

528



529

Figure 9 – Competition enzymatic assay with the isoforms MTase 2017 and MTase 2010 in the presence of SAM analogs. (A) MTase inhibition by SAH and (B) Sinefungin. The IC50 values are in the corresponding tables below the graphs.

4. Discussion

The 2016-2019 YFV outbreak in southeastern Brazil is a consequence of complex factors involving ecological and biological landscapes, as well as non stochastic factors. The genomic characteristics of the YFV variant circulating in Southeast Brazil from 2016 to 2019 might also have played a role (46). We determined that viral strains associated with the most severe YF epidemic in South America in the last 80 years displayed a set of nine unique amino acid polymorphisms located in highly conserved positions in non-structural proteins (6). Three of the residue changes occurred at NS5 MTase domain, which is crucial to the viral replication cycle. Indeed, this domain plays key roles in RNA capping and methylation, that protect viral RNA from degradation and sensing by innate immunity. Modifications in this protein can thus interfere directly with its enzymatic activity, exposing the viral RNA to the host's innate immune response suppressing viral replication (15, 24). Additionally, amino acidic changes in the MTase domain of NS5 might also influence the interactions between cellular and viral proteins, modulating the host's anti-viral response. Indeed, the NS5 MTase domain has also been described to interfere with proteins, such as STAT2, in the interferon-induced signaling pathway (30-32, 34-36). Here we characterized the effects of the YFV 2016-2019 molecular signature in the MTase in the context of viral replication and virulence and its specific catalytic function.

We deciphered the effect of MTase variations initially by constructing two synthetic YFV. The first synthetic YFV, called IC YFV 2017, corresponds to the isolate ES-504, belonging to the lineage of YFV variants that caused the 2016-2019 outbreak. The synthetic virus displayed a similar phenotype to its parental wild type isolated YFV ES-504, allowing its use as a reference to study genetic markers. The second synthetic virus consists in the backbone of the IC YFV 2017, in which the amino acid changes (R101 to K, I138 to V and S173 to G) carried by previously circulating YFV (2000-2010) were introduced in the NS5 MTase coding sequence. The MTase 3D model suggested that these amino acids are located at the surface of the protein and are not directly involved in SAM or RNA binding or catalytic interactions; although they are proximal to the methyl donor binding site.

Our results reveal that the effect of the three amino acid changes in the MTase domain is modest and the viruses show similar replication and virulence, with only subtle differences. YFV_MTase_2010 exhibited slightly larger plaque size morphology than the YFV_2017. The viral growth curves in mammals (human hepatocytes: HepG2) and mosquitos (*Aedes aegypti* larvae: Aag2) cells showed no statistical differences, except for the second day post infection in HepG2 cells, with the YFV_MTase_2010 exhibiting lower viral titers. In contrast, the infection of Vero cells in the presence of IFN-I lead to distinguished phenotypes between YFV_MTase_2010 and YFV_2017. Thus it is likely that the three mutations in the MTase modulate the ability to control the IFN-I response. This indicates that the residues 101, 183 and 173 of NS5 play a role in the viral escape of innate immune response mediated by IFN-I. Indeed, the MTase domain of flaviviruses protein NS5 has been described to interact with elements of the IFN-I pathway (36, 47).

The results obtained in Vero cells infected in the presence of IFN-I led us to determine whether this difference would result in a significant phenotype the infection in a mammal model. For this purpose, we performed a neurovirulence assay, which is a classic method used to characterize YFV, as the vaccine YFV 17D is highly neurovirulent (48). This test reveals insights about YFV fitness in complementarity to experiments of virulence in cellular model studies. We inoculated intracerebrally young adult BALB/c mice to compare

the neurovirulence of YFV_2017 with YFV_MTase_2010, but our results showed no significant difference in neurovirulence, suggesting that the mutations did not influence in YFV fitness.

At last, we investigated the influence of residues 101, 138 and 173 on enzymatic activity of MTase. First, we utilized authentic YFV_2017 and YFV_MTase_2010 to infect HepG2 cells under treatment with the MTase inhibitor molecule Sinefungin, a SAM analog. Again, we did not observe any substantial effect of the amino acid variations in the MTase. The dataset obtained from cell and mouse infections, indicate that the three amino acid motif variation does not provoke any effect on viral fitness.

The biochemical approach highlighted one potential role of the three mutations on the function of MTase. We observed that MTase 2010 displays a more pronounced affinity for SAM, reflected by an increased Km. This result suggests that these residues might be involved in SAM/SAH turnover, which is consistent with the localization of the mutated residues (Figure 1). Indeed, the three residues might function as an allosteric pocket, which means that the conformational changes in the surface of MTase could provoke a change in the binding pocket's dynamics (49). We further confirmed the greater affinity of the MTase 2010 with the methyl donor, in a competition assay with SAH and Sinefungin, that mimmetize SAM. In both assays the SAM analogs showed more potent inhibition of the MTase 2010 but the difference in inhibitory effect is more pronounced for Sinefungin. These results suggest that the modification of the affinity for the SAM molecule might play a role in both N7- and 2'O-methylations as the NS5 MTase contain an unique SAM binding mode for both reactions. Two models for the cap methylation of flaviviruses have been proposed. One model postulates that a single MTase molecule performs both methylations, requiring the dissociation of the first by-product after N7-methylation, and re-association of another SAM molecule to perform the 2'O-methylation (16, 23). The other model implies that two molecules of MTase are required to complete both cap methylations of viral RNA (50). In both situations, a higher affinity to the SAM molecule might slow down the methyl transfer reaction. Therefore, we can also speculate that the efficiency of the MTase 2017 is slightly affected. In summary, our results show that the YFV 2016–2019 strains' molecular markers in the MTase domain does not affect YFV virulence. However, it caused small changes in the SAM binding properties, but not enough to be detected using the complete viral particles YFV_2017 and YFV_MTase_2010 in cell infection model. These residues might modulate the antiviral response against YFV mediated by type I interferon. This study contributed to the molecular basis of evolution of genotype South America I YFV in Brazil, by characterizing the effects of amino acid mutations detected in the YFV circulating since the outbreak of 2016–2019. Our results point to further studies on mapping the residues in the NS5 protein that interact with the elements of the IFN signalling pathways.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Oligonucleotide sequences for the infectious clone methodology and site-directed mutagenesis.

Author Contributions: NDF and MCB: study conception. NDF: construction and regeneration of synthetic YFV and viral studies. NDF and ISM: IFN-I inhibition and mouse neurovirulence assays. NDF, ASG, GDN, GO, ED and BC: YFV NS5 MTase domain cloning and expression for purification. NDF, ED and BC: MTase enzymatic assays. MCB and NDF: manuscript preparation. All authors critically read and approved the final version of the manuscript.

Funding: This work was supported by MCTI/FINEP/FNDCT 01/2016 – ZIKA (Grant n° 04.16.0058.04); Preventing and Combating the Zika Virus, MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC524 CAPES/MS-Decit. (Grant n°. 440865/2016–6), Preventing and Combating the Zika Virus MCTIC/FNDCT CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit. (Grant n°. 88881130684/2016–00). MCB is a recipient of the fellowships for Productivity in Technological Development and Innovative Extension (308164/2020–2; CNPq) and Cientistas do Nosso Estado (E-26/201.207/2021; FAPERJ). GO acknowledges Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Project 2013/07600-3). ED and BC were supported by the European project Zikalliance (n° 734548 H2020).

Institutional Review Board Statement: All animal experiments were carried out in strict accordance with the Guide of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocols employed were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experimentation of Oswaldo Cruz Institute (CEUA-IOC; Permit: L-034/2019).

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are thankful to Ieda Pereira Ribeiro, Déberli Ruiz Fernandes, Lidiane de Souza Menezes Raphael, Marta Pereira Santos and Alexandre Araújo Cunha dos Santos for the technical support in the completion of this work. We are also grateful to the Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA-RPT01A – Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ for the services

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Vasconcelos PF, Bryant JE, da Rosa TP, Tesh RB, Rodrigues SG, Barrett AD. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(9):1578-84.
- Bonaldo MC, Gomez MM, Dos Santos AA, Abreu FVS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM, et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(6):447-51.
- Vasconcelos PF. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev Saude Publica.* 2010;44(6):1144-9.
- Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenco-de-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep.* 2017;7(1):7385.
- de Souza RP, Foster PG, Sallum MA, Coimbra TL, Maeda AY, Silveira VR, et al. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *J Med Virol.* 2010;82(1):175-85.
- Gomez MM, Abreu FVS, Santos A, Mello IS, Santos MP, Ribeiro IP, et al. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016-2017 Brazilian outbreak. *J Gen Virol.* 2018;99(4):536-48.
- Furuichi Y, Shatkin AJ. Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv Virus Res.* 2000;55:135-84.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science.* 1985;229(4715):726-33.
- Ishak R, Tovey DG, Howard CR. Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures. *J Gen Virol.* 1988;69 (Pt 2):325-35.
- Koonin EV. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol.* 1993;74 (Pt 4):733-40.
- Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* 2002;21(11):2757-68.
- Issur M, Geiss BJ, Bougie I, Picard-Jean F, Despins S, Mayette J, et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA.* 2009;15(12):2340-50.
- Ray D, Shah A, Tilgner M, Guo Y, Zhao Y, Dong H, et al. West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. *J Virol.* 2006;80(17):8362-70.
- Wengler G, Wengler G. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology.* 1993;197(1):265-73.
- Shuman S. Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;66:1-40.
- Dong H, Ren S, Zhang B, Zhou Y, Puig-Basagoiti F, Li H, et al. West Nile virus methyltransferase catalyzes two methylations of the viral RNA cap through a substrate-repositioning mechanism. *J Virol.* 2008;82(9):4295-307.
- Dong H, Ray D, Ren S, Zhang B, Puig-Basagoiti F, Takagi Y, et al. Distinct RNA elements confer specificity to flavivirus RNA cap methylation events. *J Virol.* 2007;81(9):4412-21.
- Mastrangelo E, Bollati M, Milani M, Selisko B, Peyrane F, Canard B, et al. Structural bases for substrate recognition and activity in Meaban virus nucleoside-2'-O-methyltransferase. *Protein Sci.* 2007;16(6):1133-45.
- Coutard B, Barral K, Lichiere J, Selisko B, Martin B, Aouadi W, et al. Zika Virus Methyltransferase: Structure and Functions for Drug Design Perspectives. *J Virol.* 2017;91(5).
- Bollati M, Milani M, Mastrangelo E, Ricagno S, Tedeschi G, Nonnis S, et al. Recognition of RNA cap in the Wesselsbron virus NS5 methyltransferase domain: implications for RNA-capping mechanisms in Flavivirus. *J Mol Biol.* 2009;385(1):140-52.
- Assenberg R, Ren J, Verma A, Walter TS, Alderton D, Hurrellbrink RJ, et al. Crystal structure of the Murray Valley encephalitis virus NS5 methyltransferase domain in complex with cap analogues. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 8):2228-36.
- Geiss BJ, Thompson AA, Andrews AJ, Sons RL, Gari HH, Keenan SM, et al. Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding. *J Mol Biol.* 2009;385(5):1643-54.
- Egloff MP, Decroly E, Malet H, Selisko B, Benarroch D, Ferron F, et al. Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. *J Mol Biol.* 2007;372(3):723-36.

24. Zhou Y, Ray D, Zhao Y, Dong H, Ren S, Li Z, et al. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J Virol.* 2007;81(8):3891-903. 691
25. Hercik K, Brynda J, Nencka R, Boura E. Structural basis of Zika virus methyltransferase inhibition by sinefungin. *Arch Virol.* 2017;162(7):2091-6. 692
26. Jain R, Butler KV, Coloma J, Jin J, Aggarwal AK. Development of a S-adenosylmethionine analog that intrudes the RNA-cap binding site of Zika methyltransferase. *Sci Rep.* 2017;7(1):1632. 693
27. Tao Z, Cao R, Yan Y, Huang G, Lv K, Li W, et al. Design, synthesis and in vitro anti-Zika virus evaluation of novel Sinefungin derivatives. *Eur J Med Chem.* 2018;157:994-1004. 694
28. Dong H, Fink K, Züst R, Lim SP, Qin CF, Shi PY. Flavivirus RNA methylation. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 4):763-78. 695
29. Chang DC, Hoang LT, Mohamed Naim AN, Dong H, Schreiber MJ, Hibberd ML, et al. Evasion of early innate immune response by 2'-O-methylation of dengue genomic RNA. *Virology.* 2016;499:259-66. 696
30. Schuberth-Wagner C, Ludwig J, Bruder AK, Herzner AM, Zillinger T, Goldeck M, et al. A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'-O-Methylated Self RNA. *Immunity.* 2015;43(1):41-51. 697
31. Devarkar SC, Wang C, Miller MT, Ramanathan A, Jiang F, Khan AG, et al. Structural basis for m7G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(3):596-601. 698
32. Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, et al. 2'-O-methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature.* 2010;468(7322):452-6. 699
33. Kumar P, Sweeney TR, Skabkin MA, Skabkina OV, Hellen CU, Pestova TV. Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(5):3228-45. 700
34. Wang B, Thurmond S, Zhou K, Sanchez-Aparicio MT, Fang J, Lu J, et al. Structural basis for STAT2 suppression by flavivirus NS5. *Nat Struct Mol Biol.* 2020;27(10):875-85. 701
35. Werme K, Wigerius M, Johansson M. Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cell Microbiol.* 2008;10(3):696-712. 702
36. Li A, Wang W, Wang Y, Chen K, Xiao F, Hu D, et al. NS5 Conservative Site Is Required for Zika Virus to Restrict the RIG-I Signaling. *Front Immunol.* 2020;11:51. 703
37. Ruggli N, Rice CM. Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. *Adv Virus Res.* 1999;53:183-207. 704
38. Stobart CC, Moore ML. RNA virus reverse genetics and vaccine design. *Viruses.* 2014;6(7):2531-50. 705
39. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-W303. 706
40. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2014;47:5 6 1-32. 707
41. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W407-10. 708
42. Sippl MJ. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins.* 1993;17(4):355-62. 709
43. de Mello IS, Fernandes DR, Furtado ND, Dos Santos AAC, Dos Santos MP, Ribeiro IP, et al. Recovery of Synthetic Zika Virus Based on Rio-U1 Isolate Using a Genetically Stable Two Plasmid System and cDNA Amplification. *Front Microbiol.* 2021;12:639655. 710
44. Abreu FVS, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, Santos A, Miranda RM, Bonelly IS, et al. Haemagogus leucocelaenus and Haemagogus janthinomys are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016-2018. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):218-31. 711
45. Furtado ND, Raphael LdM, Ribeiro IP, de Mello IS, Fernandes DR, Gómez MM, et al. Biological Characterization of Yellow Fever Viruses Isolated From Non-human Primates in Brazil With Distinct Genomic Landscapes. *Frontiers in Microbiology.* 2022;13. 712
46. Possas C, Lourenco-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro FP, Pissinatti A, Cunha RVD, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(10):e180278. 713
47. Miorin L, Laurent-Rolle M, Pisanelli G, Co PH, Albrecht RA, Garcia-Sastre A, et al. Host-Specific NS5 Ubiquitination Determines Yellow Fever Virus Tropism. *J Virol.* 2019;93(14). 714
48. Barrett AD, Gould EA. Comparison of neurovirulence of different strains of yellow fever virus in mice. *J Gen Virol.* 1986;67 (Pt 4):631-7. 715
49. Stank A, Kokh DB, Fuller JC, Wade RC. Protein Binding Pocket Dynamics. *Acc Chem Res.* 2016;49(5):809-15. 716
50. Dong H, Ren S, Li H, Shi PY. Separate molecules of West Nile virus methyltransferase can independently catalyze the N7 and 2'-O methylations of viral RNA cap. *Virology.* 2008;377(1):1-6. 717