

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

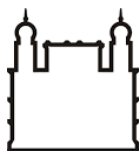
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

NATHALIA AUWERTER FILIPAK

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENOMAS INFECCIOSOS E
SISTEMAS SUBGENÔMICOS DE REPLICONS DE VÍRUS ZIKA CIRCULANTE NO
BRASIL PARA ESTUDOS DE REPLICAÇÃO E PATOGÊNESE VIRAL**

**CURITIBA
2020**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

NATHALIA AUWERTER FILIPAK

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENOMAS INFECCIOSOS E
SISTEMAS SUBGENÔMICOS DE REPLICONS DE VÍRUS ZIKA CIRCULANTE NO
BRASIL PARA ESTUDOS DE REPLICAÇÃO E PATOGÊNESE VIRAL.**

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Daisy Maria Strottmann
Co-orientadora: Dra. Claudia Nunes
Duarte dos Santos

CURITIBA
2020

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Vivian, que sempre estiveram ao meu lado dando todo o apoio, amor e incentivo na realização dos meus objetivos. Tudo que conquisei, só foi possível pela fé e determinação que me ensinaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem Ele não teria chegado onde cheguei. Agradeço a minha família, os quais sempre cuidaram de mim para que eu pudesse realizar meus objetivos, me incentivando e apoiando em todos os momentos. Agradeço em especial meu esposo Daniel que esteve ao meu lado me dando suporte nessa jornada, não poderia ter escolhido um parceiro melhor nesta vida.

Agradeço a todos amigos em especial Gisiane, Isabelle, Thays e Bruna que deixaram meus dias muito mais leves e divertidos! Sempre lembrarei das nossas conversas na convivência durante os intervalos dos experimentos. Agradeço a todos os meus colegas do Laboratório de Virologia Molecular que sempre me ajudaram e estavam sempre dispostos a me ouvir, ao “lab happy” que proporcionou grande aprendizado e ótimos momentos dentro do laboratório.

Agradeço aos pesquisadores Dr. Juliano Bordignon e Dra. Priscilla Wowk pelo crescimento obtido nas nossas reuniões de grupo e também por todas as conversas de incentivo. Agradeço com carinho a Dra. Ana Mossimann que me ajudou e me guiou em muitos momentos, saiba que sou muito grata pela sua paciência e pela forma que me ensinou.

Gostaria de agradecer ao Laboratório de Produção em Virose Emergentes, ao Dr. Guilherme Ferreira Silveira e á todas “meninas da produção” que compreenderam as adversidades e me ajudaram durante a minha formação. Da mesma forma quero agradecer ao Laboratório de Referência em Virose Emergentes (LRV), a Dra Camila Zanluca, Dra. Andréia Suzukawa e Dra. Andrea Koishi, e a todos do LRV que me apoiaram e que também foram flexíveis com a minha jornada acadêmica.

Agradeço as plataformas de Microscopia e Citometria do Instituto Carlos Chagas e ao laboratório de preparo de materiais.

Agradeço imensamente as minhas orientadoras, Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos e Dra. Daisy Maria Strottmann pelos ensinamentos e pela oportunidade, para mim além de serem exemplos de cientistas também são exemplos de força e dedicação.

“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”
Albert Einstein

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) recentemente despontou como uma emergência de saúde pública nacional, causando manifestações clínicas graves e expandindo-se rapidamente para outros países das Américas. Estudos filogenéticos sugerem que ao longo do processo evolutivo, o ZIKV adquiriu mudanças genéticas que podem ter contribuído para a emergência do vírus. No entanto, ainda não existem evidências sobre o real papel dessas modificações genéticas na modulação das funções dos componentes virais e aumento da infectividade no hospedeiro humano. Diversas abordagens estão sendo empregadas para suportar estudos de replicação e patogênese viral. Nesse sentido, a tecnologia de clones infecciosos e replicons subgenômicos apresenta-se como uma importante ferramenta para elucidar o papel de fatores virais no ciclo infectivo/replicativo do ZIKV, permitindo a fácil manipulação do genoma e propagação do material genético viral em composição homogênea. Dessa forma, os objetivos deste estudo foram desenvolver um sistema de replicon subgenômico e clone infeccioso de uma cepa brasileira de ZIKV, utilização da metodologia de amplicons subgenômicos infecciosos (ISA) para geração de ZIKV recombinantes da linhagem africana (cepa MR766^{NIID}) e estudo da mutação pontual glicina(G)/ácido glutâmico(E) no resíduo 121 do domínio protease da proteína NS3 do ZIKV. A fim de alcançar o nosso primeiro objetivo, os fragmentos de DNA sintéticos referentes ao genoma completo da cepa brasileira ZIKV BR 2015/15261 foram clonados em vetor do tipo cromossomo artificial de bactéria (pBAC), contendo o promotor da T7 RNA polimerase. Obtivemos êxito na estratégia de clonagem dos fragmentos de DNA para montagem do replicon subgenômico do ZIKV em vetor pBAC. Todavia, a presença de mutações indesejadas e a funcionalidade do sistema de replicon *in vitro* precisa ainda ser avaliada. No entanto, a obtenção do clone infeccioso de ZIKV está em fase de finalização. Para gerar o clone molecular da cepa MR766^{NIID} do ZIKV, quatro fragmentos de DNA correspondentes ao genoma completo do ZIKV foram utilizados para montagem do genoma viral diretamente em células Vero. A metodologia de ISA possibilitou a geração do vírus parental recombinante (ZIKV MR766_{wt}) e mutante (ZIKV MR766_{121Mut}) sem a presença de mutações expúrias. Os resultados dos ensaios de caracterização biológica *in vitro* dos ZIKV recombinantes (parental e mutante) demonstraram que a mutação pontual NS3_{121E} reduz a infectividade do ZIKV em linhagens celulares de mamíferos. Por fim, os estudos de caracterização de determinantes genéticos do ZIKV, através da utilização de ferramentas de genética reversa, poderá contribuir para melhorar o entendimento dos mecanismos envolvidos na biologia e patogênese do vírus e, eventualmente, possibilitar a identificação de alvos potenciais para o delineamento de estratégias antivirais.

Palavras chaves: Flavivirus, Zika vírus, proteína não-estrutural 3, clone infeccioso, replicon subgenômico e amplicons subgenômicos infecciosos.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) has recently emerged as a national public health emergency, causing severe clinical manifestations and rapidly expanding to other countries in the Americas. Phylogenetic studies suggest that throughout the evolutionary process, the ZIKV has acquired genetic changes that may have contributed to the emergence of the virus. However, there is still no evidence on the real role of these genetic modifications in modulating the functions of the viral components and increasing infectivity in the human host. Several approaches are being employed to support studies of replication and viral pathogenesis. In this sense, the technology of infectious clones and subgenomic replicons presents itself as an important tool to elucidate the role of viral factors in the infective/replicative cycle of the ZIKV, allowing the easy manipulation of the genome and propagation of viral genetic material in homogeneous composition. Thus, the objectives of this study were to develop a subgenomic replicon and infectious clone system of a Brazilian strain of ZIKV, use of the methodology of infectious subgenomic amplicons (ISA) for the generation of recombinant ZIKV of the African lineage (strain MR766NIID) and study of the point mutation glycine(G)/glutamic acid(E) in the residue 121 of the protease domain of the NS3 protein of the ZIKV. In order to achieve our first objective, the synthetic DNA fragments referring to the complete genome of the Brazilian ZIKV BR 2015/15261 strain were cloned in an artificial bacterial chromosome type vector (pBAC), containing the promoter of T7 RNA polymerase. We succeeded in the strategy of cloning the DNA fragments to mount the subgenomic replicon of ZIKV in vector pBAC. However, the presence of unwanted mutations and the functionality of the *in vitro* replicon system still need to be evaluated. However, the procurement of the ZIKV infectious clone is being finalized. To generate the molecular clone of the ZIKV strain MR766NIID, four DNA fragments corresponding to the complete ZIKV genome were used to mount the viral genome directly into Vero cells. ISA's methodology enabled the generation of the recombinant parental virus (ZIKV MR766wt) and mutant (ZIKV MR766121Mut) without the presence of extraneous mutations. The results of *in vitro* biological characterization tests of recombinant (parental and mutant) ZIKV demonstrated that point mutation NS3121E reduces the infectivity of ZIKV in mammalian cell lines. Finally, the characterization of genetic determinants of the ZIKV, through the use of reverse genetics tools, may contribute to improve the understanding of the mechanisms involved in the biology and pathogenesis of the virus and, eventually, enable the identification of potential targets for the design of antiviral strategies.

Keywords: Flavivirus, Zika virus, non-structural protein 3, infectious clone, subgenomic replicon and infection of subgenomic amplicons.

LISTA DE FIGURA

Figura 1.1- Mapa da disseminação de ZIKV	3
Figura 1.2- Ciclos de transmissão vetorial silvestre, suburbano e urbano.....	6
Figura 1.3- Organização genômica do ZIKV.....	11
Figura 1.4- Árvore filogenética construída a partir da análise de máxima verossimilhança de 93 sequências genômicas de ZIKV.....	16
Figura 3.1- Representação esquemática dos fragmentos de DNA sintéticos utilizados para a construção do genoma infeccioso e replicon subgenômico de ZIKV.....	28
Figura 3.2- Esquema representativo do método de ISA para obtenção dos clones recombinantes de ZIKV da cepa africana.....	34
Figura 4.1- Representação esquemática da estratégia de clonagem utilizada para montagem do clone infeccioso de ZIKV (pBACZIKV).....	41
Figura 4.2- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos clones comerciais recombinantes. PUC_E1 com 6.040 pb (linha1), PCC1_E2 com 7.556 pb (linha 2) e PUC_E3 com 7.066 pb (linha 3), correspondentes ao genoma de ZIKV cepa ZV BR 2015/15261.....	42
Figura 4.3- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das etapas de clonagem para obtenção do clone pBAC/E1.....	43
Figura 4.4- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% para obtenção de pBAC E1/2.....	44
Figura 4.5- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de PCR purificados para sequenciamento do gene E2.....	45
Figura 4.6- Representação esquemática da estratégia de clonagem utilizada para montagem do replicon subgenômico de ZIKV (RepBACZIKV).....	46
Figura 4.7- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de DNA para construção do RepBAC E1/E4/E2.....	48
Figura 4.8- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da verificação por PCR do clone recombinante pRepBAC E1/2/4.....	48
Figura 4.9- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do clone recombinante pRepBAC E1/E2/E4.....	48

Figura 4.10- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das etapas de clonagem para obtenção do clone recombinante de pRepBACZIKV.....	49
Figura 4.11- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das ampliações por PCR do genoma completo do ZIKV, cepa ZV BR 2015/15098.....	50
Figura 4.12- Representação do alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos na região de sítio ativo do domínio NS3 protease do ZIKV.....	51
Figura 4.13- Representação estrutural da proteína NS2B-NS3 protease de ZIKV (PDB: 5GXJ)	52
Figura 4.14- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos quatro fragmentos amplificados por PCR correspondente ao genoma completo de ZIKV MR766.....	53
Figura 4.15- Perfil eletroforético em gel de agarose 1% do DNA recombinante Z2mut de ZIKV MR766.....	54
Figura 4.16- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das ampliações por PCR do genoma completo do ZIKV recombinante, cepa UG47 121Mut.....	55
Figura 4.17- Análise comparativa da reação de imunofluorescência em células Vero infectadas com os vírus recombinantes MR766121Mut e MR766WT e Mock (controle não infectado).....	56
Figura 4.18- Análise comparativa da reação de imunofluorescência em células Huh-7.5 infectadas com os vírus recombinantes MR766121Mut e MR766WT com 10MOI e Mock (controle não infectado).....	57
Figura 4.19- Análise comparativa da reação de imunofluorescência em células C6/36 infectadas com os vírus recombinantes MR766 121Mut e MR766 WT e Mock (controle não infectado).....	58
Figura 4.20- Perfil infectivo dos ZIKV recombinantes MR766121 Mut e MR766WT em células de mamífero.....	59
Figura 4.21- Células dendríticas humanas não são permissivas a infecção com os ZIKV recombinantes MR766WT e MR766121Mut.....	52

LISTA DE TABELA

Tabela 3.1- Oligonucleotídeos iniciadores específicos para ZIKV utilizados nas reações de PCR para determinação da sequência genômica da cepa ZIKV BR 2015/15098.....	24
Tabela 3.2- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no sequenciamento do genoma do ZIKV.....	24
Tabela 3.3- Identificação dos fragmentos de PCR para montagem do ZIKV recombinante pela técnica de ISA.....	27
Tabela 3.4- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para obtenção dos fragmentos correspondentes ao genoma de ZIKV pelo método de amplicons subgenômicos (ISA).....	33
Tabela 3.5- Otimização do genoma da cepa ZV BR 2015/15261 para a estratégia de construção do clone infeccioso.....	34
Tabela 4.1- Análise comparativa dos sobrenadantes das linhagens Vero e Huh-7.5 infectados com os vírus recombinantes MR766 _{121Mut} e MR766 _{WT} nos tempos de 24hpi e 48hpi.....	60
Tabela 4.2- Análise comparativa do título viral presente no sobrenadante de diferentes culturas de humdDC infectadas com os vírus ZV BR 2015/15261, MR766 _{121Mut} e MR766 _{WT} no tempo de 24 hpi.....	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Zika vírus.....	1
1.1.1. Histórico.....	1
1.2 Vias de transmissão.....	3
1.2.1 Transmissão vetorial.....	4
1.2.2 Transmissão sexual.....	7
1.2.3 Transmissão materno-fetal.....	8
1.3 Patogênese.....	9
1.4 Agente etiológico.....	11
1.4.1 Estrutura da partícula viral e organização genômica.....	11
1.4.2 Ciclo viral.....	12
1.6 Estratégias moleculares empregadas no estudo da patogênese dos <i>Flavivirus</i>	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
Geração e utilização de genomas infecciosos recombinantes do ZIKV para o estudo de mutações pontuais envolvidas na atenuação/patogênese viral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
- Gerar e caracterizar os vírus recombinantes derivados dos amplicons subgenômicos infecciosos da cepa africana de ZIKV. para determinação do papel da mutação (GNS3 ₁₂₁ E), identificada no genoma viral da cepa ZV BR 2015/15098.	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Caracterização molecular de uma cepa de ZIKV isolada no Brasil.....	23
3.1.1 Determinação do genoma viral.....	23
3.2 Construção de genomas infecciosos e sistema subgenômico de replicon de uma cepa brasileira de ZIKV.....	26
3.2.1 Estratégia de clonagem do genoma infeccioso e sistema de replicons de ZIKV em cromossomo artificial de bactéria (BAC).....	26
3.2.2 Transformação dos fragmentos sintéticos em <i>E. coli</i> TOP 10 químico competentes.....	28
3.7.1 Obtenção e clonagem dos fragmentos sintéticos em vetor pBAC.....	29
3.3 Obtenção de ZIKV recombinantes através do método de infecção de amplicons subgenômicos (ISA).....	32
3.3.1 Mutagênese sítio dirigida para obtenção de ZIKV recombinante mutante	35
3.3.2 Eletroporação dos fragmentos de DNA e obtenção dos ZIKV recombinantes.....	35

3.4	Titulação viral por formação de placa de lise	36
3.5	Ensaio de caracterização <i>in vitro</i> dos ZIKV recombinantes	37
3.5.1	Imunofluorescência indireta (IFI).....	38
3.6	Análise de infecção das cepas recombinantes em células dendríticas.....	38
3.6.1	Obtenção de células mononucleares de sangue periférico	38
3.6.2	Purificação de monócitos CD14+ utilizando microesferas magnéticas.....	39
3.6.3	Derivação de monócitos para células dendríticas.....	39
3.6.4	Imunofenotipagem e avaliação da infecção de células dendríticas por citometria de fluxo.....	40
4.	RESULTADOS	40
4.1.	Montagem do clone infeccioso e sistema subgenômico de replicon de ZIKV ...	40
4.2	Caracterização genética de uma cepa de ZIKV isolada durante a primeira epidemia do vírus no Brasil.....	49
4.3	Obtenção de genomas infecciosos de ZIKV através do método de infecção de amplicons subgenômicos (ISA) para estudo da mutação NS3 ₁₂₁ E	52
4.4	Avaliação e caracterização biológica dos ZIKV recombinantes	55
5.	DISCUSSÃO.....	63
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	69
7.	ANEXOS	70
7.1	Soluções, tampões e meios de cultura	70
7.2	Células	71
7.2.1	Linhagens de células eucarióticas	71
7.2.2	Linhagens de células bacterianas.....	72
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Zika vírus

1.1.1. Histórico

Com as modificações ambientais causadas por ações humanas, diversos insetos vetores, tais como os mosquitos, tornaram-se sinantrópicos, fato que tem favorecido, nos últimos anos a emergência, a reemergência e a disseminação de patógenos de transmissão viral de importância clínica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) indicou que as doenças transmitidas por vetores representam mais de 17% do total das doenças infecciosas no mundo, causando mais de 700 mil mortes por ano (OPAS, 2018). Dentre os arbovírus (grupo de vírus que requer a infecção de artrópodes como parte do seu ciclo de vida), o emergente vírus Zika (ZIKV) chamou atenção da comunidade científica internacional devido à recente epidemia explosiva ocorrida no Brasil e nas Américas nos anos 2015 e 2016. De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o ZIKV é classificado como membro do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Outros vírus de importância médica como o vírus da febre amarela (YFV), dengue (DENV) e Oeste do Nilo (WNV) também pertencem a esta mesma família (Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ, 1952).

O ZIKV foi originalmente identificado em um macaco *Rhesus* sentinela que apresentou um episódio febril durante uma pesquisa epidemiológica sobre febre amarela na floresta de Zika na Uganda em 1947 (Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ, 1952). Após a sua descoberta, estudos de vigilância entomológica na mesma floresta possibilitaram o primeiro isolamento do ZIKV em mosquitos *Aedes africanus* (Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ, 1952), vetor responsável pela transmissão dos vírus do gênero *Flavivirus* em grandes florestas no continente africano. Nos anos seguintes, vários isolados de ZIKV foram obtidos de *pools* de mosquitos do gênero *Aedes spp.* (*A. africanus*, *A. furcifer*, *A. luteocephalus*, *A. vittatus*, *A. dalzieli*, *A. hirsutus*, *A. metallicus*, *A. taylori*, *A. aegypti*, *A. unilineatus*) na África e de outras espécies de mosquitos como *Anopheles coustani*, *Culex perfuscus* e *Mansonia uniformis* na Malásia, demonstrando o potencial papel dessas espécies como prováveis vetores epidêmicos (Weinbren, Williams, 1958). No hospedeiro humano, o primeiro caso de infecção pelo ZIKV ocorreu no leste da Nigéria, em 1952 (Macnamara, 1952). Estudos

soroepidemiológicos subsequentes demonstraram a circulação enzoótica do ZIKV em diversos países da África subsaariana e sudeste asiático. Porém, um baixo número de casos humanos sintomáticos, total de 14 casos, foram reportados desde a identificação do vírus até o ano de 2007 (Simpson DIH, 1964; Moore DL, et al, 1975; Fagbami AH, 1979; Filipe AR, Martins CM, Rocha H., 1973; Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo, 1981). Durante este período, as infecções esporádicas em humanos eram caracterizadas pela ocorrência de sintomas brandos e estavam restritas aos continentes africanos e asiáticos (Macnamara, 1954; Gregory et al., 2017). Adicionalmente, anticorpos contra o ZIKV foram identificados em outras espécies de animais, como morcegos (Andral L, et al 1968), roedores e ovinos (Darwish MA, 1983). Esses achados evidenciam a susceptibilidade de uma vasta gama de mosquitos e animais vertebrados à infecção por ZIKV. Dessa forma, o papel da plasticidade viral na disseminação entre espécies precisa ser avaliado.

Até recentemente, o ZIKV permaneceu com discreta relevância na medicina tropical devido ao baixo impacto clínico e epidemiológico em relação às infecções causadas por outros *Flavivirus*. No entanto, a partir do ano de 2007, após a ocorrência do primeiro surto de Zika nas ilhas Yap, um arquipélago dos Estados Federados da Micronésia, a relevância da infecção pelo ZIKV se tornou evidente na Saúde Pública. Naquela ocasião foram confirmados 49 casos de infecção por ZIKV em humanos, havendo relatos de sintomas leves como febre, erupção cutânea, artralgia e conjuntivite. Posteriormente, a expansão e distribuição geográfica do ZIKV ultrapassou o continente africano e sudeste asiático, com os relatos de infecção humana no Camboja (Duffy et al., 2009; Heang V, et al 2012). A primeira grande epidemia de ZIKV ocorreu na Polinésia Francesa em 2013, onde mais de 30.000 casos suspeitos de infecção pelo vírus (aproximadamente 11 % da população) foram reportados (Roth et al., 2014). Após a identificação da circulação do ZIKV na Polinésia Francesa, o vírus se disseminou rapidamente para outras ilhas do Pacífico: Ilhas Cook, Nova Caledônia, Ilhas Salomão, Vanuatu e Ilha de Páscoa (Musso et al., 2014). No início do ano de 2015, o primeiro caso autóctone de infecção pelo ZIKV foi reportado no estado de Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil, durante um surto de doença exantemática. Após a emergência do ZIKV no Brasil, o panorama epidêmico e o caráter benigno da infecção se modificaram. Desde então, a infecção por ZIKV tem ocasionado casos de síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos (Oehler et al., 2014; Nascimento e Silva, 2017; Brasil et al., 2016), e síndrome congênita em fetos e bebês infectados durante a gestação (Miranda-Filho

et al., 2016; Mlackar et al., 2016). A observação da síndrome de Guillain-Barré (Roth et al., 2014) e o relato de transmissão perinatal da mãe para o recém-nascido (Besnard, et al. 2014) entre os casos de Zika na Polinésia, já indicavam um aumento no potencial de gravidade clínica da doença. Em dezembro de 2015 o Ministério da Saúde estimou a ocorrência de 440.000 a 1.300.000 casos suspeitos da doença por infecção do ZIKV em todos os 18 estados brasileiros, declarando emergência nacional de Saúde Pública. Com o número crescente de casos de infecção autóctone e disseminação por ZIKV nos países da América Central e América do Sul, em fevereiro de 2016 a OMS declarou emergência de Saúde Pública de âmbito internacional, expondo as necessidades urgentes de ampliação do conhecimento sobre a doença.

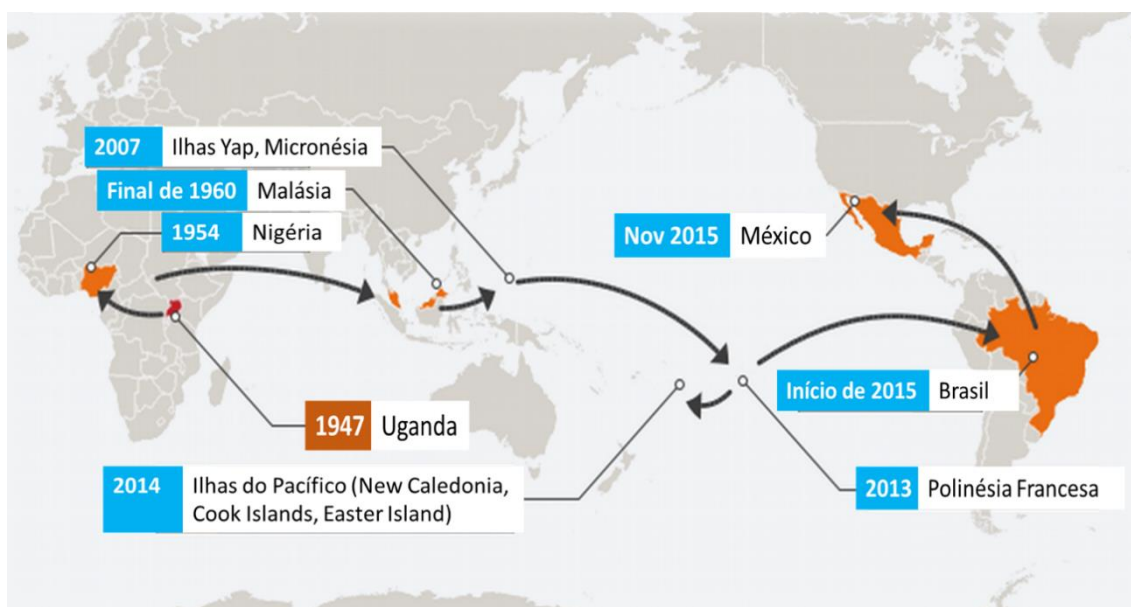


Figura 1.1- Mapa da disseminação de ZIKV. 1947 - Primeiro isolamento do vírus, identificado na floresta de Zika na Uganda e posterior disseminação pelo continente africano, onde foram registrados casos com sintomas leves de infecção. 2007 - Ocorrência do primeiro surto nas ilhas Yap, Micronésia. 2014 - Disseminação do vírus para outras ilhas do Pacífico. 2015 – Ocorrência do primeiro surto no Brasil, com relatos de casos com anomalias congênitas e outras manifestações neurológicas associadas ao ZIKV. 2015 – Primeira identificação da circulação do ZIKV no México. Fonte adaptado de Deutsche Welle.

1.2 Vias de transmissão

O ZIKV pode ser transmitido a seres humanos por diferentes vias, a primeira e mais bem estudada entre os *Flavivirus* é através da picada de mosquitos vetores infectados. Com o aumento do número de casos de infecção pelo ZIKV na população

humana, novas vias de transmissão do vírus foram identificadas, podendo também o ZIKV ser transmitido verticalmente, de mãe para filho durante a gravidez, através de contato sexual ou transfusão sanguínea (Weaver, 2017). Os mecanismos responsáveis pela mudança no perfil da transmissão viral, bem como a mudança na patogenia da doença, ainda não estão completamente elucidados. O fato de ZIKV possuir a habilidade de ser transmitido ao hospedeiro humano por diversas vias, dificulta o desenvolvimento de estratégias de controle do vírus, evidenciando a necessidade de mais estudos para o entendimento de diferentes aspectos da biologia viral.

1.2.1 Transmissão vetorial

O ZIKV assim como outros membros do gênero *Flavivirus*, como os vírus da YFV, DENV e encefalite japonesa (JEV), é transmitido primariamente ao hospedeiro humano através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectado (Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ, 1952). Os mosquitos do gênero *Aedes* são amplamente distribuídos pelo globo e o habitat nativo da maioria das espécies constituem florestas, áreas periurbanas e urbanas de regiões tropicais e subtropicais (Boorman et al, 1956). Os primeiros relatos de transmissão do ZIKV ocorridos na África caracterizam o ciclo de transmissão silvestre que envolve a manutenção do vírus entre primatas não humanos e mosquitos arbóreos nas florestas (Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ, 1952). Muitos dos casos de infecção por ZIKV em humanos relatados na África representam, provavelmente, casos de transmissão acidental derivados do ciclo silvestre, relacionados com a infecção de mosquitos arbóreos das várias espécies de mosquitos, pertencentes principalmente aos subgêneros *stegomyia* e *diceromyia*, incluindo *A. Africanus*, *A. fulcifer taylori* e *A. dalzieli* (Figura 1.2) (Fagbami, 1979; Gregory et al., 2017).

A transposição do ciclo silvático para o ciclo urbano (transmissão mosquito-humano-mosquito, figura 1.2) foi possível devido a ocorrência de infecção de mosquitos antropofílicos das espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* (Boyer et al, 2018). Esses vetores vivem em associação próxima com a habitação humana, sendo mosquitos de alta competência vetorial, isto é, apresentam a habilidade intrínseca de transmitir um agente de doença através da sua picada (Fagbami, 1979; Plourde; Bloch, 2016; Christofferson, 2016; Petersen et al., 2016). O mosquito *A. aegypti* é fortemente associado a ambientes urbanos devido a sua preferência por sangue

humano, dessa forma, se reproduz principalmente em ambientes domésticos, podendo ter múltiplos repastos sanguíneos antes da oviposição, aumentando assim as chances de infecção e transmissão. Por outro lado, *A. albopictus* é um vetor agressivo, oportunista, diurno e externo, possuindo um habitat silvestre ou rural, mas de fácil adaptação ao ambiente urbano (Boyer et al, 2018).

Ambos os ciclos de transmissão vetorial, urbano e silvestre, envolvem o contágio do mosquito vetor durante o repasto sanguíneo, ou seja, momento em que fêmeas adultas do mosquito vetor picam um indivíduo infectado durante o período virêmico (período em que há circulação do vírus no sangue). Assim, uma vez que o vetor tenha ingerido sangue virêmico, o vírus se replica na hemocele disseminando-se por diferentes tecidos até atingir a glândula salivar. Nesse momento, o vírus presente na saliva do mosquito pode ser transmitido a novos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo (Figura 1.2) (Ioos et al., 2014; Plourde; Bloch, 2016). A infecção do vetor pode ocorrer pela transmissão transovariana, que ocorre quando o vírus infecta os tecidos germinais do mosquito feminino, dessa forma, as células germinativas tornam-se permanentemente infectadas, de modo que a maioria da prole estará infectada (Lequime, Lambrechts, 2014).

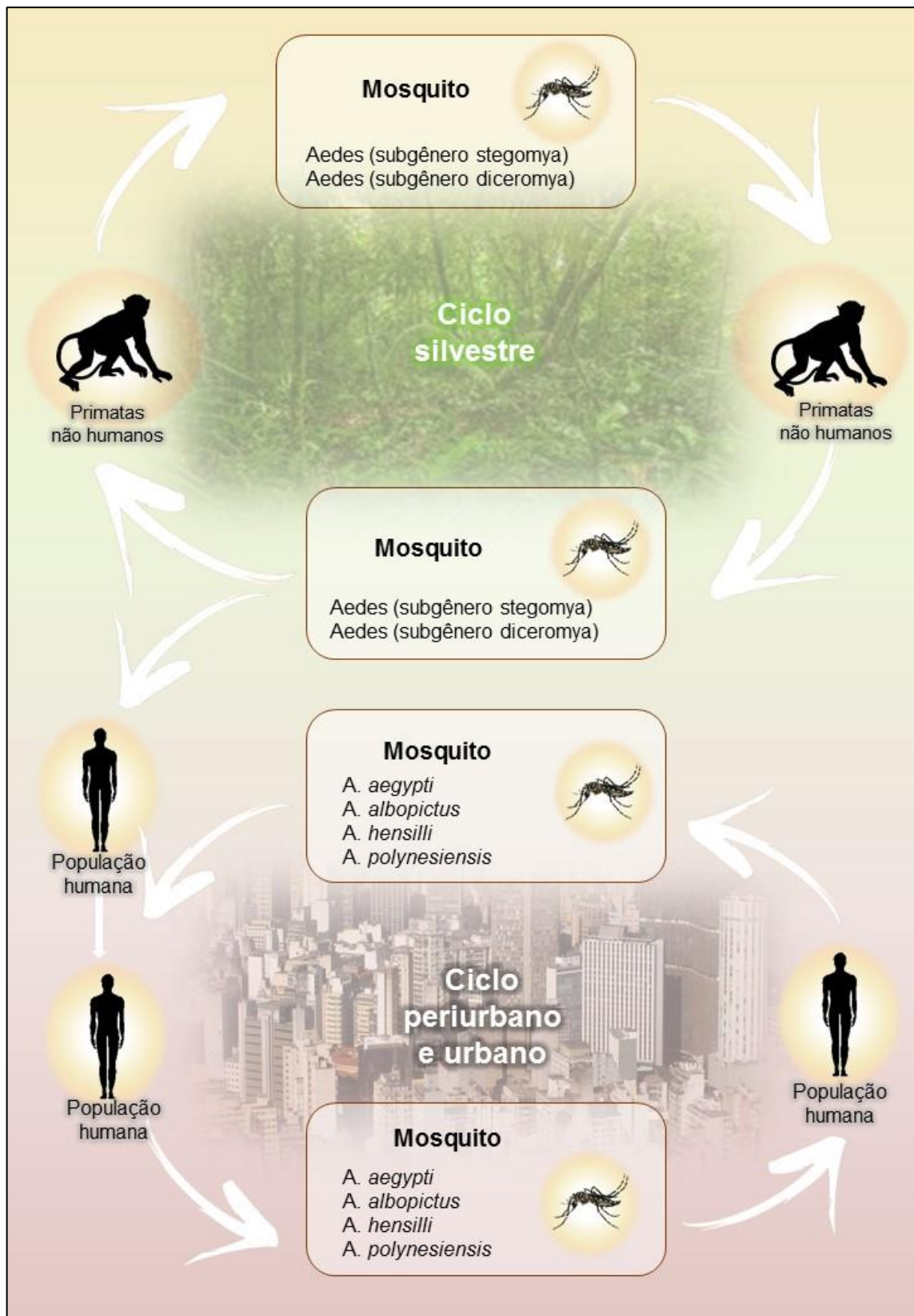


Figura 1.2 - Ciclos de transmissão vetorial silvestre, suburbano e urbano. No ciclo silvestre ou enzoótico a transmissão do ZIKV ocorre entre mosquitos arbóreos do gênero *Aedes* principalmente aos subgêneros *stegomyia* e *diceromyia* (*A. Africanus*, *A. fulcifer taylori* e *A. dalzieli*) e primatas não-humanos. No ciclo urbano, a transmissão ocorre entre insetos antropofílicos (*A. aegypti* e *A. albopictus*) e seres humanos em centros urbanos e periurbanos. Fonte adaptado de Petersen et al, 2016.

1.2.2 Transmissão sexual

A transmissão não vetorial de ZIKV foi reportada pela primeira vez em 2008, antes mesmo do vírus apresentar proporções epidêmicas, quando um cientista norte-americano que trabalhava em Senegal (uma área afetada pelo ZIKV) transmitiu o vírus para sua esposa, que vivia no Colorado/EUA (área livre de circulação de ZIKV no período), durante a fase aguda da doença através de relação sexual desprotegida (Foy, et al., 2011). Após seis dias da chegada em Colorado, o cientista desenvolveu hematospémia além de outros sintomas compatíveis com a infecção por ZIKV. Quatro dias após o coito, sua esposa, que não havia viajado, desenvolveu sintomas semelhantes (Foy, et al., 2011). A análise sorológica do casal, durante a fase aguda da doença evidenciou a infecção por ZIKV. No entanto, não foi possível detectar o RNA viral ou isolar o vírus a partir do soro desses pacientes (Foy, et al., 2011). Em 2013, durante o surto de infecção por ZIKV na Polinésia Francesa, o vírus foi isolado pela primeira vez a partir de amostras de sêmen de um paciente que igualmente exibiu hematospémia (Musso et al., 2015). Estudos posteriores confirmaram o contato sexual como modo de transmissão do ZIKV (Gulland, 2016; Coelho et al., 2016; Davidson et al., 2016; Deckard et al., 2016). Em 2016, 46 casos de infecção sexual por ZIKV foram relatados ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (Gregory et al., 2017). Após o surto que ocorreu em Puerto Rico em 2016, um estudo denominado *Zika virus Persistence* (ZiPer) relatou a persistência do vírus nos fluidos corporais, demonstrando que o tempo máximo da detecção de Zika no sêmen foi de 125 dias após o início dos sintomas (Epelboin et al., 2017). Além do sêmen, a presença do RNA do ZIKV foi identificada pela técnica de RT/qPCR na saliva e na urina de pacientes em fase aguda (Wikan; Smith, 2016) e no muco cervical de uma mulher por até 14 dias após o início dos sintomas (Murray et al., 2017)

Até 2016, os dados da OMS indicaram 12 países com relatos de casos de transmissão de ZIKV de pessoa para pessoa. A maioria desses casos foram transmitidos de indivíduos sintomáticos do sexo masculino para outro de sexo feminino, mas também há registros de transmissão de mulheres para homens e de homens para homens (Lazear; Diamond, 2016). Até o momento, sabe-se que a transmissão sexual de ZIKV, a partir de parceiros sexuais do sexo masculino infectados, pode ocorrer até 64 dias após o início dos sintomas (Turmel et al., 2016); Assim, o ZIKV pode ser transmitido sexualmente a partir de um indivíduo infectado assintomático (Brooks et al., 2016; Fréour et al., 2016). De acordo com essas

evidências, a OMS (2016) passou a recomendar às mulheres grávidas que vivem em área endêmica de transmissão a prática do sexo seguro ou a privação de atividade sexual por pelo menos no período da duração da gravidez. Já nas regiões sem transmissão ativa do vírus, homens e mulheres que retornam de áreas onde ocorre a transmissão do ZIKV, deve adotar práticas sexuais mais seguras ou considerar abstinência por pelo menos três meses para homens e dois meses para mulheres após o retorno, a fim de prevenir a transmissão viral.

1.2.3 Transmissão materno-fetal

Estudos relatam que a infecção no início da gestação pode levar ao aborto, natimorto ou restrição do crescimento intrauterino (Brasil et al., 2016; Mlakar et al., 2016). As infecções no segundo ou terceiro trimestre também estão relacionadas a alterações congênitas (Brasil et al., 2016; Driggers et al., 2016, Regadas et al, 2018). Sabe-se que a placenta atua como uma barreira física de defesa e prevenção de possíveis patógenos, utilizando o sistema imune inata e adaptativa da mãe (Burton, Fowden, 2015), mas as consequências da infecção nas primeiras semanas de gravidez podem ser explicadas pelo fato de que a barreira placentária atua como interface para as trocas materno-fetais e está envolvida em múltiplos estágios de gestação até 12 semanas (Noronha et al, 2017). Entretanto os mecanismos pelos quais o ZIKV atravessa a barreira placentária para infectar o feto ainda não estão totalmente esclarecidos. O ZIKV já foi identificado em vários tipos de células incluindo células de Hofbauer, macrófagos localizados próximo aos capilares fetais e células endoteliais fetais assim como células da glia cerebral e neurônios. O vírus também foi identificado no líquido amniótico de bebês com microcefalia, evidenciando a ocorrência da infecção viral congênita (Mlakar et al., 2016; Rasmussen et al., 2016; Noronha et al., 2016).

Adicionalmente, o RNA do ZIKV foi detectado, pela técnica de RT PCR, no leite materno de mulheres infectadas que apresentaram os sintomas periparto e pós-parto (Besnard et al, 2014). Partículas infecciosas virais também foram identificadas no leite materno no quarto dia após o parto, apontando como uma possível rota de transmissão (Dupont et al. 2016). Além disso, existe a transmissão vertical através do contato das mucosas infantis com ZIKV no sangue e nas secreções durante o processo de nascimento (Gregory et al. 2017).

1.3 Patogênese

A maioria dos casos de infecção por ZIKV em humanos são assintomáticas (loos et al., 2014); enquanto infecções sintomáticas são caracterizadas por febre baixa (entre 37,8 e 38,5 °C) que geralmente dura 4 a 7 dias, associada a erupção maculopapular, artralgia, afetando principalmente as pequenas articulações das mãos e dos pés, conjuntivite, dor nas costas e cefaléia leve (Zanluca et al., 2015, Hayes, 2009). Outras características clínicas menos comuns incluem náusea, diarreia, dor abdominal e ulcerações de mucosas (Shehu et al., 2018). A associação dos dados clínicos com a infecção por ZIKV se tornou aparente durante os surtos mais recentes no Pacífico Sul e nas Américas, em parte pelo aumento do número de casos de infecções que culminou na detecção e relato de desfechos raros. Por outro lado, a ausência de imunidade adquirida da população à infecção por ZIKV e a circulação de novas variantes virais podem ter contribuído para a rápida expansão do ZIKV nas Américas (Lazear; Diamond, 2016).

Por muitos anos, a infecção pelo Zika foi considerada autolimitada, branda e sem sequelas. Porém, durante o surto de ZIKV na Polinésia Francesa, foram notificados 42 casos de pacientes com SGB, uma polineuropatia aguda que pode resultar em fraqueza, paralisia flácida aguda ou subaguda e até evoluir para óbito (Musso et al, 2014; Plourde; Bloch, 2016; Shehu et al., 2018). A SGB já havia sido reportada em casos de infecções por outros arbovírus, como o vírus do Nilo Ocidental (WNV), JEV, Chikungunya (CHIKV) e DENV (Leis, Stokic, 2012; Solomon et al, 2000; Cao - Lormeau et al., 2016), mas somente durante o surto na Polinésia Francesa essa grave complicação neurológica foi associada à infecção pelo ZIKV (Watrín et al, 2016). No Brasil, houve um aumento de 29,8% no número de casos de SGB no ano de 2015, período em que houve a circulação disseminada do ZIKV (Possas et al., 2017). No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de desencadeamento da SGB após infecção pelo ZIKV. Além disso, após a introdução do ZIKV no Brasil, complicações graves do sistema nervoso central (SNC) foram associados com a infecção congênita do vírus. A detecção do RNA de ZIKV no líquido amniótico e no tecido cerebral de fetos com microcefalia comprovou a infecção aguda congênita pelo vírus (Melo et al, 2016; Mlakar et al., 2016). A transmissão vertical de ZIKV foi associada a efeitos adversos devastadores de malformações fetais intrauterina, incluindo microcefalia, anomalias cerebrais e déficits cognitivos, visuais e auditivos (Belfort, Freitas, Oliveira, 2016). Complicações neurológicas como mielite

transversa aguda, meningoencefalite e encefalomielite disseminada aguda também foram associadas com a infecção pós-natal do ZIKV (Carteaux et al., 2016). As principais características da síndrome congênita do ZIKV incluem: microcefalia grave com crânio parcialmente colapsado, padrão específico de lesão cerebral, incluindo calcificações subcorticais e diminuição do tecido cerebral, lesão na parte posterior do olho, incluindo cicatriz macular e manchamento pigmentar focal da retina, contraturas congênitas, como pé torto ou artrogripose e hipotonia, que restringem o movimento do corpo fetal logo após o nascimento (CDC, 2018).

Os casos de microcefalia em 2014, na Polinésia Francesa, e em 2015, no Brasil, indicam que o maior risco de microcefalia ocorre pela transmissão do ZIKV no primeiro trimestre de gravidez. (Petersen et al., 2016). No entanto, os efeitos a longo prazo da infecção perinatal ou congênita ocorrida durante o surto de infecção por ZIKV nos anos de 2015 e 2016 estão ainda sendo avaliados. Acredita-se que novas consequências da infecção ainda serão apresentadas no decorrer da vida dessas crianças (Brasil et al., 2016; Gregory et al., 2017). O estudo de Mulkey e colaboradores (2020) forneceram dados intrigantes sobre deficiências no desenvolvimento neurológico de 77 crianças que foram expostas ao ZIKV no útero na Colômbia. Clinicamente as crianças eram saudáveis ao nascimento. Embora as avaliações iniciais do desenvolvimento tenham sido tranquilizadoras, os escores gerais diminuíram à medida que as crianças envelheciam. A maioria das crianças apresentavam diminuição dentro do âmbito da mobilidade e da cognição social, destacando a importância do acompanhamento a longo prazo e triagens contínuas no desenvolvimento.

Embora tenha havido vários esforços para avançar na compreensão dos mecanismos relacionados à patogênese de ZIKV, ainda há várias lacunas no que diz respeito a replicação, células alvo no ambiente intrauterino, possíveis mecanismos de transmissão e persistência do ZIKV em sítios imuno-privilegiados em humanos. Até o momento não existem drogas antivirais e nenhuma vacina eficaz e segura para prevenir a infecção. Assim, dissecar as propriedades estruturais e funcionais do ZIKV é importante para melhorar o entendimento sobre o ciclo replicativo e patogênese do ZIKV e contribuir para estudos de estratégia de atenuação viral que idealmente poderiam levar ao desenvolvimento de vacinas.

1.4 Agente etiológico

1.4.1 Estrutura da partícula viral e organização genômica

O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus*, o qual agrupa os vírus envelopados com genoma de RNA de cadeia simples e polaridade positiva (ssRNA). Estruturalmente, o ZIKV é semelhante aos demais membros do gênero, possuindo a estrutura do capsídeo com aproximadamente 25-30 nm de diâmetro, circundado por proteínas de envelope (E) e de membrana (M) e uma bicamada lipídica derivada da membrana celular do hospedeiro. As proteínas E estão dispostas em simetria semelhante a um icosaédrico (Lee et al., 2018) (Figura 1.3). O genoma do ZIKV apresenta tamanho de 10.807 kb e contém um único quadro de leitura aberta (ORF), que é flanqueado por duas regiões não codificantes (do inglês, *untranslate region* - UTR) localizadas nas extremidades 5' (107 nucleotídeos) e o 3' (428 nucleotídeos) do genoma (Strotmann et al, 2019; Kuno; Chang, 2007). A região 5'UTR do genoma inclui uma estrutura de Cap, necessária para a tradução eficiente do genoma viral (Wengler; Wengler; Gross., 1978). A porção 3' UTR apresenta estruturas regulatórias em forma de *loop* que desempenham um papel fundamental na tradução, empacotamento de RNA, circularização e estabilização do genoma. Em contraste com os RNAs mensageiros celulares (mRNA), o genoma do ZIKV carece de uma cauda poli-A na extremidade 3' UTR.

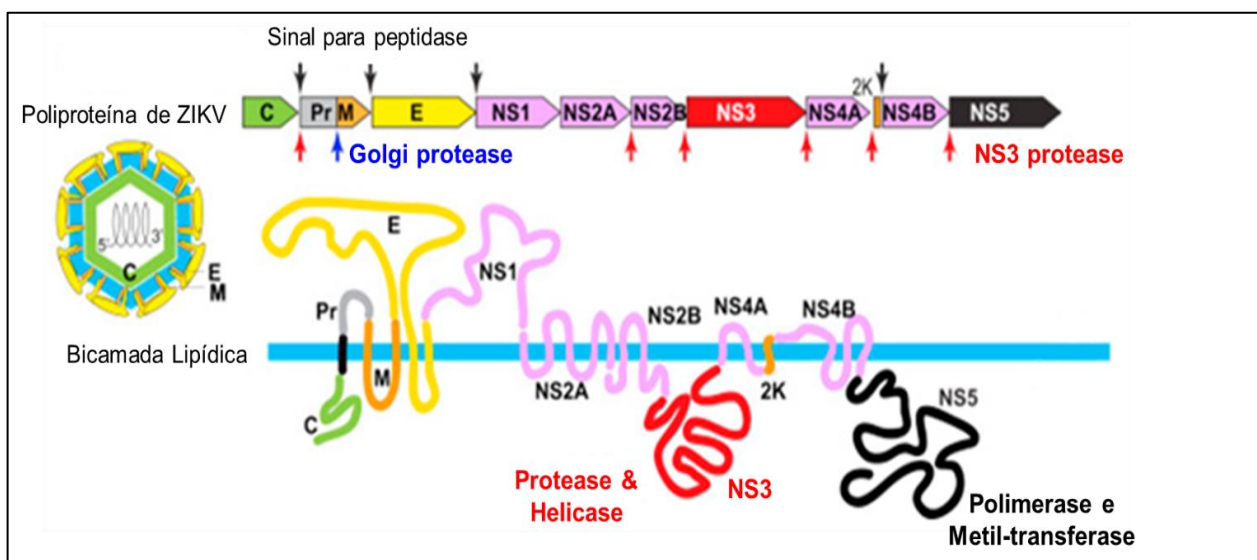


Figura 1.3 - Organização genômica do ZIKV. Ilustração das proteínas estruturais e não estruturais e seu respectivo sítio de clivagem, demonstrando suas características conformacionais associado a membrana do retículo endoplasmático. Fonte adaptada de Ming; Tang; Song, 2016.

A circularização do RNA viral é mediada pela interação de sequências complementares conservadas (CSS) localizadas nas regiões 5' e 3' UTRs, que constituem importantes elementos para a funcionalidade do genoma viral. No entanto, é importante ressaltar que a variabilidade genética destas regiões, observada entre as diferentes espécies de *Flavivirus*, pode ter implicações na habilidade de replicação e conseqüentemente na patogênese viral (Kuno; Chang, 2007). Borba e colaboradores realizaram um estudo em 2019 demonstraram que a presença de determinadas mutações na região 3'UTR do DENV podem modular a circularização do genoma viral e a replicação do RNA viral em células de inseto, em contraste ao baixo ou nenhum impacto nas células humanas. Além dessas estruturas no genoma viral, a replicação dos *Flavivirus* requer a ação de várias proteínas não estruturais (NS) que serão melhor abordadas no próximo tópico.

1.4.2 Ciclo viral

A entrada da partícula viral de ZIKV na célula hospedeira é mediada pela interação entre a proteína E, que compõe a maior parte da superfície da partícula viral madura, e os receptores presentes na superfície da célula alvo (Lindenbach; Thiel; Rice, 2007). Essa interação promove a internalização do vírus via endocitose mediada por clatrina (White et al., 2016). O processo de acidificação do endossomo promove mudanças conformacionais irreversíveis na glicoproteína de envelope, culminando com a exposição do peptídeo de fusão e conseqüente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Após a etapa de desnudamento, o RNA de sentido positivo liberado no citoplasma é reconhecido pelos ribossomos, que iniciam a tradução do genoma viral associado a membranas do retículo endoplasmático rugoso (ER), formando as chamadas fábricas de replicação (Mackenzie, 2005; Neufeldt et al., 2018). Essas fábricas de replicação servem como suporte para ancorar o complexo de replicação viral e aumentar a concentração local de fatores celulares e virais necessários para a replicação do genoma, coordenar as diferentes etapas da replicação viral através de sua compartimentação e proteger o RNA genômico dos sensores imunes celulares inatos (Neufeldt et al., 2018). A tradução do RNA viral dá origem a uma poliproteína com cerca de 3.400 aminoácidos que é processada co e pós-traducionalmente por proteases virais e da célula hospedeira (Bera; Kuhn; Smith, 2007). O genoma dos *Flavivirus* codifica dez proteínas virais, sendo três proteínas estruturais (C, pRM e E)

e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) produzidas após o processamento por proteases virais e da célula hospedeira (Lindenbach; Thiel; Rice, 2007).

As proteínas NS3 e NS5 desempenham papel central na replicação viral, pois juntas abrigam todas as atividades catalíticas necessárias para a ocorrência da replicação do RNA viral. A proteína NS3 é uma proteína de múltiplos domínios, com um domínio protease (NS3Pro) na porção N-terminal, um domínio ATPase, RNA helicase (NS3hel) e RNA trifosfatase (RTPase) na porção C-terminal da proteína. O domínio NS3pro é responsável pelo processamento proteolítico da poliproteína viral, enquanto o cofator NS2B é necessário para aumentar a atividade enzimática e a especificidade do substrato (Ming; Tang; Song, 2016). A protease viral cliva o precursor da poliproteína nas junções NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5, e em sítios internos dentro das proteínas C, NS2A, NS3 e NS4A (Figura 1.3). Em geral, a protease viral tem especificidade para dois resíduos básicos (Lys-Arg, Arg-Arg, Arg-Lys ou ocasionalmente Gln-Arg) (Bera; Kuhn; Smith, 2007). O domínio NS3hel/NTPase dos flavivírus desempenha um papel crítico no desenrolamento e translocação de RNA durante a replicação viral (Chen et al., 1997; Takegami; Sakamuro; Furukawa, 1995; Warren; Tamura; Collett; Ming, 1993; Tang; Song, 2016), sendo necessário para desenrolar a dupla fita de RNA e/ou a estrutura secundária do RNA de fita simples, enquanto a atividade da NTPase fornece energia para essa atividade. O domínio RTPase é responsável pela remoção do γ -fosfato do RNA 5'trifosforilado (Wang et al., 2009), primeiro passo envolvido na adição da estrutura em CAP no RNA viral.

As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas que contêm características hidrofóbicas e estruturais similares. Evidências demonstram que estas proteínas estão envolvidas no ancoramento do complexo replicativo nas membranas do RE, auxiliando na modulação da atividade enzimática, (Chambers et al., 1990; Hilgenfeld; Vasudevan, 2018). Essas proteínas não estruturais cooperativamente desempenham um papel importante na evasão do sistema imune inato humano (Chen et al, 2017). A glicoproteína NS1 de ZIKV é uma proteína não estrutural conservada em ~ 48kDa com dois locais de glicosilação sendo translocado para o ER durante a síntese proteica e pode formar monômeros, dímeros ou hexâmeros após modificações pós-traducionais (Winkler et al., 1989). A forma intracelular de NS1 é localizada nos locais de síntese viral de RNA e desempenha um papel fundamental na replicação do genoma (Lindenbach & Rice, 1999; Mackenzie; Jones & Young, 1996). Especula-se

que o dímero de proteína NS1 associado à membrana ER desempenhe um papel organizacional essencial na formação do complexo de replicação por meio da interação com NS4A e NS4B (Lindenbach & Rice, 1999; Youn et al, 2012). Embora não esteja presente na partícula viral, NS1 é o principal marcador antigênico da infecção viral, além de reconhecimento e evasão do hospedeiro (Young et al., 2000).

A proteína NS5, a maior das dez proteínas, apresenta um domínio N-terminal metiltransferase que metila a estrutura de 5' cap do RNA genômico no domínio RNA polimerase dependente de RNA C-terminal (RdRp), que copia o RNA complementar do RNA genômico, servindo como molde para a síntese do novo RNA viral da cadeia positiva (Ming; Tang; Song, 2016). Durante o processo de replicação, a NS5 RdRp utiliza o genoma viral ssRNA de polaridade positiva como molde para a síntese da cadeia intermediária de RNA de polaridade negativa. Em um novo ciclo, o ssRNA de polaridade negativa serve como molde para a NS5 RdRp sintetizar novas moléculas do ssRNA genômico de polaridade positiva (Bollati et al., 2010).

A montagem da partícula viral ocorre na superfície do RE, onde o RNA viral é complexado com a proteína C, sendo posteriormente empacotado em uma bicamada lipídica derivada de ER, contendo heterodímeros da proteína E e prM (Lorenz et al., 2003, Mackenzie and Westaway, 2001). A proteína prM atua como um arcabouço que evita a fusão prematura do vírus durante o seu transporte intracelular para fora da célula (Li et al., 2008, Yu et al., 2008). A maturação do vírus ocorre na rede trans-Golgi, durante o transporte intracelular da partícula viral, pela clivagem do peptídeo prM via protease celular do tipo furina (Li et al., 2008, Stadler et al., 1997, Yu et al., 2008). Por fim, as partículas virais são liberadas para o meio extracelular por exocitose. A partícula infecciosa do vírus, contendo o ssRNA de polaridade positiva, é composta pelas proteínas C, M e E e por lipídeos derivados da célula hospedeira. Dessa forma, as partículas infecciosas do ZIKV apresentam-se aptas para infectar outras células permissivas, como células de pele, pulmão, placenta, músculo, retina, cérebro, fígado, cólon, próstata, testículos, rim e células de Schwann (Hamel et al., 2015; Salinas et al., 2015; Chan et al 2016; Alcendor, 2017).

1.5 Epidemiologia molecular

Desde a descoberta do ZIKV em 1947, diversas cepas do vírus foram isoladas nos continentes africano, asiático e, recentemente, no continente americano, após a ocorrência do primeiro grande surto de ZIKV nas Américas. O sequenciamento nucleotídico parcial (10,794 nucleotídeos) da primeira cepa de ZIKV isolada do macaco rhesus 766 (MR766, cepa africana do ZIKV) na floresta de Zika na Uganda, foi realizado seis décadas após a sua descoberta (Kuno G, Chang GJJ, 2007). O isolamento viral desta cepa ocorreu a partir da inoculação intracerebral do soro virêmico do macaco *Rhesus 766* em camundongos albinos suíços no início dos anos 50. Ao logo desses anos a cepa foi adaptada em laboratório, através de sucessivas passagens no SNC de camundongo (Dick, 1952) e em cultura de células. Atualmente, a cepa MR766-NIID do ZIKV (número de acesso no GenBank LC002520) foi considerada a cepa referência, usada frequentemente em estudos de pesquisa *in vitro* e *in vivo* para modelar infecções por ZIKV (Beaver et al. 2018). Devido ao impacto epidemiológico que a infecção pelo ZIKV adquiriu e a fim de compreender os fatores envolvidos na mudança do perfil infectivo do ZIKV, vários estudos realizaram a comparação da sequência genômica das diferentes cepas das linhagens africanas e asiáticas.

Estudos filogenéticos recentes demonstram que o ZIKV divergiu em duas linhagens genéticas principais: africana e asiática (Faria et al. 2016; Pettersson et al. 2016; Zhang et al. 2016), sendo esta última responsável pela ocorrência do primeiro surto da doença nas Ilhas Yap em 2007 (Lanciotti et al. 2008), nas ilhas do Pacífico em 2013 (Cao-Lormeau et al. 2014) e pelas recentes epidemias. Alguns autores dividem a linhagem asiática em duas sub-linhagens: subclasse asiática local e subclasse americana contemporânea (Figura 1.4) (Gubler; Vasilakis; Musso. 2017).

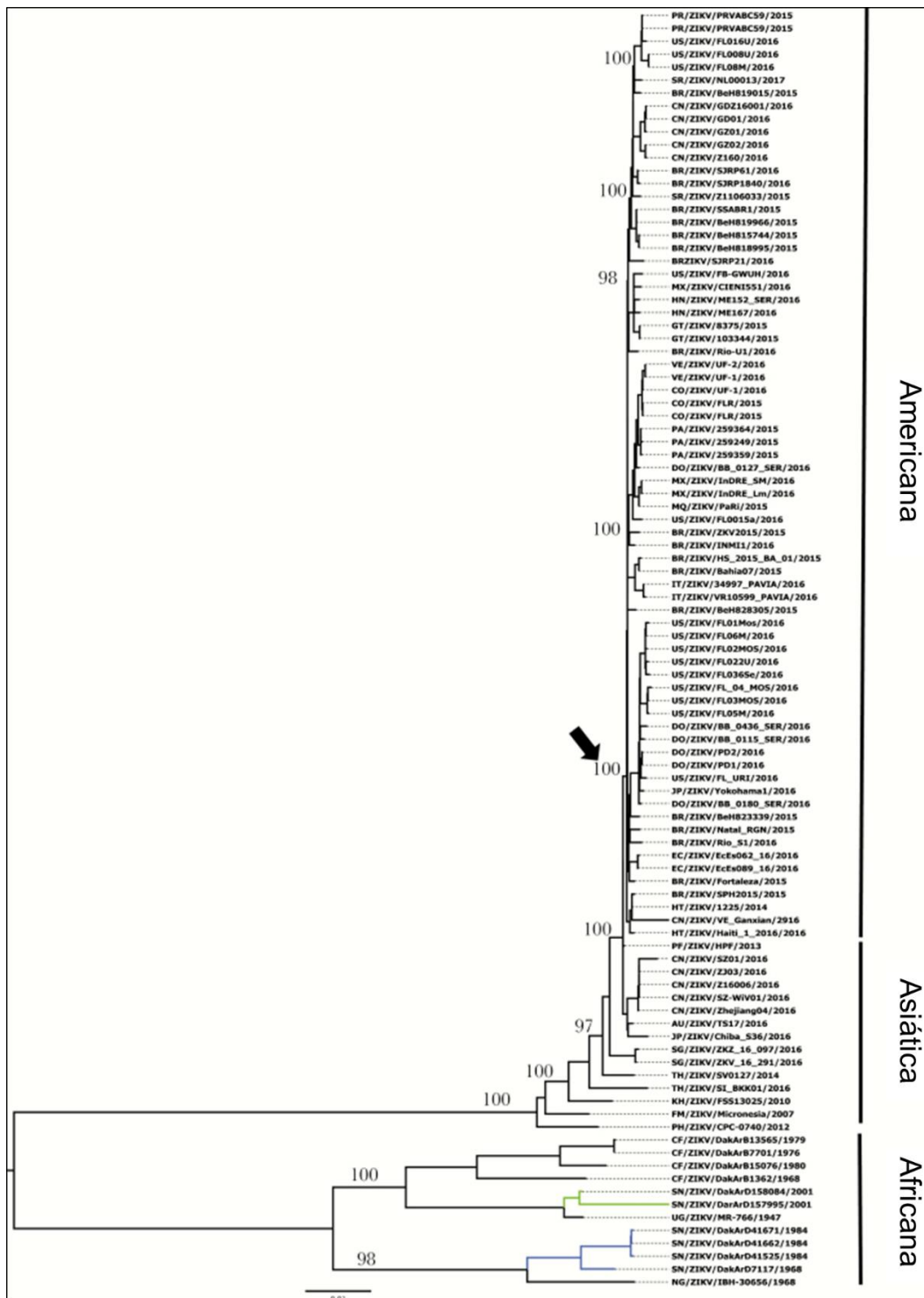


Figura 1.4- Árvore filogenética construída a partir da análise de máxima verossimilhança de 93 sequências genômicas de ZIKV. Divergência em três linhagens principais estão indicadas: asiática, africana e americana. As linhagens africanas se dividem em 2 grupos distintos, o cluster de Uganda, que é ancorado pelo protótipo da linhagem MR766 e o cluster da Nigéria, que inclui cepas isoladas na Nigéria e no Senegal de 1968 a 1997. O cluster asiático é ancorado pela linhagem P6-740 isolada na Malásia em 1966 de *A. aegypti* e inclui linhagens isoladas no Camboja, Tailândia, Micronésia, Polinésia Francesa e as recentes introduções no Japão, China, Austrália e Cingapura. Nesse cluster, contemplam as novas linhagens americanas que inclui linhagens do Brasil, Colômbia, Equador, Panamá, México, Honduras, Venezuela, República Dominicana, Porto Rico, Haiti, Guatemala, Estados Unidos e Suriname, além de Itália e China. Fonte: Adaptado de Gubler; Vasilakis; Musso. 2017.

Uma das modificações nucleotídicas mais importantes observadas entre as cepas de ZIKV está no motivo de N-glicosilação Asn-X-(Ser/Thr) na proteína do envelope. Com base em estudos envolvendo outros flavivírus, como o vírus do Nilo Ocidental (WNV), modificações no aminoácido 154 da proteína do envelope estão associadas à invasão dos vírus (Shi et al., 2017). Um estudo recente de mutagênese na glicosilação ZIKV E N154 mostra diminuição da infecção viral de mosquitos *A. aegypti* por via oral (Fontes-Garfias et al., 2017). A passagem sucessiva do vírus *in vitro* pode estar associada à perda deste sítio de glicosilação e tem pode estar relacionada como causadora de uma diminuição ou aumento da neuro invasão (Haddow et al., 2012; Lee et al., 1997; Shirato et al., 2004)

A análise filogenética das cepas de ZIKV que emergiram no Brasil indicaram identidade com os vírus circulantes na Polinésia Francesa e das Ilhas do Pacífico, cepas pertencentes ao genótipo asiático de ZIKV (Zanluca et al., 2015). Faria et al (2016) ao realizar um estudo filogenético de sete genomas de ZIKV circulantes no Brasil, durante o surto de ZIKV em 2015, indicou que possivelmente houve um único sítio de introdução do vírus nas Américas, estimada como ocorrendo entre maio e dezembro de 2013. O mapeamento de mutações nos modelos estruturais existentes revelou o contexto de alterações de aminoácidos virais presentes na linhagem epidêmica; no entanto o estudo relata que não houve alteração compartilhada de aminoácidos entre os três genomas de vírus atualmente disponíveis em casos de microcefalia (Faria et al, 2016). Porém, outro estudo relata a detecção do ZIKV em três amostras com suspeita de dengue, as quais foram positivas para ZIKV no Rio de Janeiro em abril de 2013, sugerindo que o vírus Zika foi introduzido no Brasil entre outubro de 2012 e maio de 2013 (Metsky et al., 2017). Os estudos de evolução molecular demonstram que o ZIKV adquiriu ao longo dos últimos 50 anos diversas mutações adaptativas (Wang et al. 2016; Pettersson et al. 2016) e que diversos eventos de recombinação podem ter ocorrido na natureza (Faye et al., 2014). Essas alterações podem ter contribuído para a modificação da virulência e infectividade do vírus (Beaver et al. 2018).

Os dados obtidos pelo sequenciamento genômico das diferentes cepas de ZIKV durante a expansão do vírus nas Américas (territórios da América Latina, Caribe, Estados Unidos e Canadá) demonstrou diferenças quando comparada ao genoma das cepas responsáveis pelos surtos ocorridos na Ásia (Shi et al. 2016). Setenta e cinco substituições de aminoácidos ao longo de todo o genoma foram identificadas entre as cepas pré-epidêmicas do vírus da linhagem africana e as cepas de ZIKV durante a

epidemia de 2015/2016 (Zhu et al., 2016). Dentre as substituições genéticas identificadas, as regiões de E, NS3, NS4B e NS5 apresentaram maior taxa de variabilidade, indicando uma forte pressão seletiva na região codificante das proteínas. No entanto, uma importante substituição foi identificada na região da prM no genoma das cepas asiática de ZIKV em 2013 na Polinésia Francesa; o estudo demonstra que a mutação S139N causou um fenótipo microcefálico mais grave e causou aumento de morte celular na placa cortical (Yuan, et al.,2017). A mesma substituição de aminoácido foi identificada como assinatura genética em três cepas brasileiras de ZIKV (ZV BR 2015/15098, ZV BR 2015/15261 e ZV BR 2016/16288), isoladas de pacientes com sintomas brandos da doença em 2015 (Strottmann et al., 2019). As cepas ZV BR 2015/15098, ZV BR 2015/15261 e ZV BR 2016/16288, foram isoladas do soro de dois pacientes residentes em Natal, Rio Grande do Norte, as amostras foram coletadas nos meses de março (ZV BR 2015/15098) e junho (ZV BR 2015/15261) de 2015, período que compreendeu o início da ocorrência do primeiro surto de ZIKV no Brasil. A cepa ZV BR 2016/16288 foi obtida da amostra de um paciente residente em Teutônia, no Rio Grande do Sul (RS) / Sul do Brasil em fevereiro de 2016. As cepas brasileiras ZV BR 2015/15261 e ZV BR 2016/16288 foram isoladas diretamente do soro de pacientes. No entanto, o isolamento da cepa ZV BR 2015/15098 só foi possível após a passagem do soro humano virêmico SNC de camundongos BALB/c neonatos. Os vírus foram amplificados por três passagens em cultura de células de inseto C6/36 e tiveram o seu genoma viral completamente sequenciado. A comparação entre a sequência da poliproteína das cepas ZV BR 2015/15098, ZV BR 2015/15261 e ZV BR 2016/16288, presente no soro de três pacientes infectados durante a epidemia de 2015, evidenciou 6 diferenças de aminoácidos nas proteínas E, NS2A, NS3 e NS4A dos vírus. O estudo comparativo *in vitro* dos três isolados recentes demonstrou que o ZV BR 2015/15098 apresentou maior capacidade infecciosa em células de mamífero do que em células de inseto. No entanto, o ZV BR 2015/15261, que apresentou a menor infectividade nas linhas celulares de mamíferos, foi o isolado que apresentou as maiores taxas de infecção nos mdDCs de doadores saudáveis, que é um modelo de infecção mais próximo ao que ocorre na infecção natural. Por outro lado, o ZV BR 2016/16288, o isolado que circulou no sul do Brasil, um ano após a detecção do primeiro caso de ZIKV no Brasil, é menos infeccioso quando comparado com as cepas de referência do estudo e dos outros isolados, exceto nas células C6/36 (Strottmann et al., 2019). Dadas as diferenças genotípicas e fenotípicas observadas entre os isolados clínicos, as

variações na composição de aminoácidos podem influenciar a maneira pela qual os componentes virais interagem com a célula hospedeira e, portanto, podem modular sua infectividade em diferentes substratos celulares. O efeito das substituições de aminoácidos (isoladas ou em combinação) identificadas entre os isolados ZV BR 2015/15261, ZV BR 2015/15098 e ZV BR 2016/16288 na modulação das taxas de infecção em diferentes substratos celulares merece uma investigação mais aprofundada. Adicionalmente, tendo em vista que o isolamento da cepa ZV BR 2015/15098 só foi possível após a passagem do vírus no SNC de camundongos neonatos (Strottmann et al., 2019), o sequenciamento do genoma completo do ZV BR 2015/15098 a partir do soro do paciente infectado se faz necessário para avaliar a presença de potenciais mutações envolvidas na atenuação da infectividade desta cepa em cultura de células.

1.6 Estratégias moleculares empregadas no estudo da patogênese dos *Flavivirus*

O sistema de genética reversa constitui uma importante ferramenta comumente utilizada na elucidação de mecanismos envolvidos na replicação e patogênese viral. Nesse contexto, a metodologia de clones infecciosos e replicons subgenômicos de vírus RNA possibilita a manipulação de genomas virais, facilitando os estudos da biologia, patogênese e virulência desses vírus. A técnica foi descrita primariamente em 1981, quando Racaniello e colaboradores (1981) mostraram pela primeira vez que o DNA complementar (cDNA) completo de um vírus de RNA de cadeia positiva (poliovírus) pode gerar vírus infeccioso em células de mamíferos diretamente após a sua transfecção (Racaniello; Baltimore, 1981).

Ao longo do tempo, as ferramentas para os estudos da infectividade do material genético viral na forma de DNA foram sendo alcançadas junto com os adventos das técnicas moleculares. Assim os DNAs plasmidiais, contendo o cDNA genômico de um vírus de RNA de polaridade positiva puderam ser engenheirados para a obtenção de genomas infecciosos capazes de gerar vírus idênticos aos encontrados na natureza (Ruggli e Rice, 1999; Aubry et al., 2015). Por outro lado, os replicons subgenômicos de vírus RNA apresentam-se como uma interessante ferramenta para estudos de replicação viral, uma vez que os replicons possuem toda a informação genética necessária para replicação no interior da célula hospedeira, porém são incapazes de gerar partícula viral por não possuírem as sequências codificadoras de proteínas

estruturais. Assim, a metodologia de replicons subgenômicos possibilita o estudo da replicação do genoma isoladamente da morfogênese viral.

As metodologias de obtenção de genomas infecciosos e replicons subgenômicos apresentam-se como uma valiosa ferramenta para o estudo do papel de fatores virais no ciclo infectivo/replicativo dos vírus de RNA, tal como o ZIKV, permitindo a fácil manipulação e propagação homogênea do material genético viral. Uma das estratégias de genética reversas descrita para gerar clones infecciosos de *Flavivirus* consiste na utilização de transcritos de RNA infecciosos a partir de uma cópia de DNA complementar completa do genoma viral. Esse método requer a transcrição *in vitro* do RNA viral, que deve estar sob o controle de um promotor de RNA polimerase procariótica, e a transfecção do genoma de RNA infeccioso em células eucarióticas para obtenção de partículas virais infectivas. Neste caso, o último nucleotídeo do genoma viral deve ser seguido pela sequência da ribozima do vírus da hepatite delta (HDVr), que através da autoclivagem gera RNAs sintéticos contendo a extremidade 3' UTR precisa (Racaniello; Baltimore, 1981; Márquez-Jurado et al., 2018). Outra abordagem utilizada para a construção de clone de cDNA infecciosos, completo contendo o genoma viral flanqueado por um promotor conduzido pela polimerase eucariótica II na extremidade 5', principalmente o promotor do citomegalovírus (CMV) e a sequência HDVr seguida sinal de poliadenilação na extremidade 3' do genoma viral (Mishin; Cominelli; Yamshchikov, 2001). O cDNA completo é geralmente montado em vetor de baixa cópia para sua propagação estável em bactérias como a utilização de cromossomos artificiais de bactérias (pBAC). O vetor BAC de baixa cópia permite a inserção de moléculas de DNA grandes (de aproximadamente 120 a 350 kb), podendo ser propagado em de *E. coli*, resultando em sequências estáveis. Essa metodologia tem sido usada para criar clones infecciosos de cDNA para mais de dez membros de três famílias de vírus de RNA de cadeia positiva como a família *Flaviviridae* (Aubry et al., 2015). O RNA obtido através de transcrição *in vitro*, possui as mesmas propriedades do RNA viral nativo, contendo as informações necessárias para gerar a partícula viral infecciosa na célula eucariótica hospedeira.

Os clones infecciosos e replicons subgenômicos de *Flavivirus* constituem uma ferramenta poderosa para o mapeamento de domínios e proteínas virais que participam do ciclo infectivo viral. No entanto, a sua construção como moléculas únicas de cDNA em vetores bacterianos revela-se trabalhosa e demorada, pois muitas vezes são instáveis, contêm substituições induzidas indesejáveis e pode ser tóxica

para bactérias devido à expressão da proteína virais (Aubrey et al., 2015). Em contrapartida, a utilização recente de um método de genética reversa, denominado amplicons subgenômicos infecciosos (do inglês, *Infectious-Subgenomic-Amplicons* (ISA)), facilita a produção de vírus de RNA infecciosos ou subgenômicos a partir de fragmentos de DNA genômico interpolados (Aubry et al., 2014). Ao contrário da técnica tradicional, ISA não requer necessariamente a clonagem, propagação de DNA plasmidial em bactérias ou transcrição de RNA *in vitro*. Em vez disso, produtos de PCR são engenheirados para conter regiões de sobreposição, a fim de obter a cobertura de todo o genoma. Uma vez obtidos, esses produtos de PCR são então misturados e transfectados em células susceptíveis para a recuperação viral (Aubry et al., 2014). Essa metodologia foi utilizada por Gadea et al. (2016) para a geração de vírus ZIKV recombinante da linhagem africana (cepa MR766). Nesse estudo, o genoma viral foi então reconstituído a partir dos fragmentos de PCR sobrepostos, contendo o promotor CMV a montante a região 5'UTR, a ribozima hepatite delta e o sinal de poliadenilação do vírus símio 40 a jusante a região 3'UTR, resultando na sequência total de RNA genômico. Tal estratégia permitiu a obtenção de um ZIKV recombinante da linhagem africana com estabilidade genética quando desafiado em células de mamífero (Gadea et al., 2016).

Por fim, ZIKV representa uma das maiores emergências de saúde pública, no que se refere a infecções congênitas como microcefalia, desordens e malformações neurológicas durante o desenvolvimento fetal. Embora a transmissão de ZIKV tenha diminuído nos últimos dois anos, casos humanos de infecção são continuamente detectados, o que evidencia a circulação do vírus e a possibilidade da ocorrência de um novo evento epidêmico. Diante o exposto, é de fundamental importância que o desenvolvimento científico sobre os processos de infecção, replicação, adaptação de ZIKV ao hospedeiro humano, além de estudos sobre o desenvolvimento de doenças graves associadas a infecção por ZIKV sejam direcionadas para o enfrentamento permanente, continuado e intenso de novas epidemias, já que não existem drogas antivirais disponíveis e nem uma vacina segura e efetiva contra o ZIKV. Nesse contexto, os sistemas experimentais, tais como as metodologias de clones infecciosos e replicons subgenômicos, são de grande valia para estudos de biologia básica de vírus RNA e de caracterização genética entre linhagens virais. Essas ferramentas moleculares facilitam o estudo das funções de genes e regiões não codificantes do genoma no processo de virulência/atenuação viral e sua relação com a patogênese devido a fácil manipulação do genoma viral.

A utilização dos sistemas de clones infecciosos e replicons subgenômicos do ZIKV pode contribuir para a resolução de questões envolvendo a patogênese, transmissão e *fitness* viral, bem como para a compreensão de marcadores genéticos virais, sendo de grande importância para o desenvolvimento de ações profiláticas ou terapêuticas, como drogas antivirais e vacinas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Geração e utilização de genomas infecciosos recombinantes do ZIKV para o estudo de mutações pontuais envolvidas na atenuação/patogênese viral.

2.2 Objetivos específicos

- Gerar sistemas de clones infecciosos e replicon subgenômicos de um isolado clínico brasileiro de ZIKV (linhagem asiática).
- Determinar a sequência nucleotídica do ZIKV (ZV BR 2015/15098) a partir de amostra clínica e comparar com a sequência genômica da mesma cepa de ZIKV isolada em modelo de infecção murina;
- Gerar e caracterizar os vírus recombinantes derivados dos amplicons subgenômicos infecciosos da cepa africana de ZIKV. para determinação do papel da mutação (GNS3₁₂₁E), identificada no genoma viral da cepa ZV BR 2015/15098.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização molecular de uma cepa de ZIKV isolada no Brasil

3.1.1 Determinação do genoma viral

Para determinação da sequência genômica da cepa ZV BR 2015/15098 a partir de amostra clínica, o RNA viral foi primeiramente extraído das amostras de soro humano, utilizando o kit QIAamp viral RNA Mini kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA viral foi então convertido em cópia complementar de DNA (cDNA), utilizando o kit *Improm II Reverse Transcriptase* (Promega) e o oligonucleotídeo iniciador *Random Primer* (100pmol/μL – Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante. Os cDNAs foram utilizados como molde para amplificação por PCR de oito fragmentos com sequências sobrepostas para cobertura total do genoma do ZV BR 2015/15098, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para ZIKV (Tabela 3.1) e o kit comercial *Long range PCR* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura: 93°C por 3 minutos, 35 ciclos de 93°C por 15 segundos, 52°C ou 55°C por 30 segundos e 68°C por 2 minutos. Alíquotas de 10% das reações de PCR foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose com concentração de 0,8%, contendo 0,5 μg/mL de brometo de etídio. Os amplicons foram excisados de géis de agarose e purificados, utilizando o kit comercial *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante, e sequenciados pela empresa Macrogen (Seoul), utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 3.2).

Tabela 3.1- Oligonucleotídeos iniciadores específicos para ZIKV utilizados nas reações de PCR para determinação da sequência genômica da cepa ZIKV BR 2015/15098.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'→3')	Sequência genômica	Tamanho do amplicon
CNZik 3+	GCAGCGGAGGTCCTAGACG	prM (471-490pb)	567pb
CNZik 4-	CCAAGTCCCACCTGACATACC	E (1017-1037pb)	
CNZik 7+	GGCTCCCAGCACAGTGGG	E (1410-1427pb)	1731pb
CNZik 12-	CAGATGGGCCCTCTTCAGCC	NS1 (3121-3140pb)	
CNZik 11+	GCCGTCTCTGCTGATGTGGGG	E/NS1 (2478-2498pb)	1265pb
CNZik 14-	CGCGAAGGTGGCACCCATC	NS2A (3725-3744pb)	
CNZik 15+	GTGCAGGAAGGGCTGAAG	NS2A (3603-3620pb)	1845pb
CNZik 18-	GTTGGGGACTCTGATTGGCTG	NS3 (5467-5488pb)	
CNZik 19+	GAGGAGGGAGGAAGAGAC	NS3 (5116-5133pb)	1315pb
CNZik 20-	CAGGGCCGCATGATCTGAAC	NS3 (6412-6431pb)	
CNZik 23+	GCCGGAATAACCTACACAG	NS3 (6267-6285pb)	1686pb
CNZik 24-	GCGGATGGTGGCGGCGTAG	NS5 (7934-7952pb)	
CNZik 27+	GACGGTGTGGCAACGGGAGGC	NS5 (7803-7823pb)	1569pb
CNZik 28-	GGCCAATGCCAAGGCCCTGTGCC	NS5 (9348-9371pb)	
CNZik 31+	CCAGGAGGAAGGATGTATGCAG	NS5 (9246-9267pb)	1433pb
CNZik fim-	TCTCCTCTAACCCTAGTCCC		

Tabela 3.2- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no sequenciamento do genoma do ZIKV.

Identificação	Sequência (5'-3')
CNZik 1+	GTTGTTACTGTTGCTGACTCAGAC
CNZik 34-	GCTCACACGGGCTACTCCGCG
CNZik 2-	CACCCCCTCATCCAGCATAGGGC
CNZik 5+	CGCGTTAGCAGCAGCTGCCATC
CNZik 6-	GGTGGCTTCGGCTCTTGGTG
CNZik 9+	CCAGCTCAGATGGCGGTGGAC
CNZik 8-	GGGGTTAGCGGTTATCAACC
CNZik 10-	GACTGCTGCTGCCAATCTACG
CNZik 13+	GGGAAAGGAGGCTGTACACAG
CNZik 17+	GGGAAGCGGAGCTGGCCCCC
CNZik 16-	CGGCCATGGGCCAGCCATCTC
CNZik 21+	GCAGTCAATGTCACCCACTC
CNZik 25+	CCCCTGACCCTAATAGTGGCC
CNZik 22-	GCTGCTGCCTGCAGCCCTGG
CNZik 29+	GCGGCTGAGCCGTGTGACACG
CNZik 26-	GTCTGGCACCCCTAGTGTCAC
CNZik CS +	CCAGGGGCGGGATGGAGCATCCGGGAG
CNZik 30-	GGCATTGGCCATCAGTCGGAGGTC
CNZik3'UTR+	GGGTCTACACCTGGAGTGCTGTAA
CNZik 32 -	GCCATGGCGTTCTCGGCCTG
CNZik 33+	GCTGCCTGTGAGCCCCTCAG
CNZik 35+	AGTTGTTGATCTGTGTGAATC

Adicionalmente, realizamos a ligação das extremidades do RNA viral para determinação da sequência nucleotídica das regiões 5' e 3' UTR. O protocolo consistiu na remoção da estrutura em Cap do RNA viral, utilizando-se o kit comercial *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP) (EPICENTRE), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA 5' monofosforilado foi purificado pelo método de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. A purificação foi realizada através da adição de 24% de NaCl (1 M), 2% de glicogênio de ostra (10 ng/mL), 2% de SDS (0,1 g/mL) e 4% de EDTA (0,5 M) ao RNA monofosforilado, na proporção 1:1. A mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos. A fração aquosa foi transferida para um novo microtubo ao qual se adicionou o mesmo volume de solução de clorofórmio: álcool isoamílico. A mistura foi centrifugada a 14.000rpm por 2 minutos. Novamente, a solução aquosa foi transferida para um novo tubo contendo etanol 100% (3,4 vezes o volume da amostra). A solução foi então incubada a -20°C por 16 h. Após esse período, prosseguiu-se com a centrifugação a 14.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 3 volumes de etanol 70% e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento incubado a 30 °C para completa evaporação da solução aquosa. O pellet foi ressuspensão em 10 µL de água livre de nucleasse. Os RNAs 5' monofosforilados purificados foram ligados em sua região 3' hidroxila, utilizando-se 1 µL da enzima T4 RNA ligase (20 U/µL) (BioLabs), 5 µL do tampão comercial 10x, 1 µL da enzima RNase Out (40 U/µL) (Invitrogen) em volume final de 50 µL. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C e, em seguida, incubada por 5 minutos a 65 °C para inativar a ação da enzima T4 RNA ligase. O RNA viral foi precipitado e purificado novamente pela técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e utilizado para amplificação das extremidades do genoma viral utilizando os primers CN ZIK 35+ e CN ZIK 2- (Tabela 3.2), conforme protocolo de RT-PCR descrito acima. Os fragmentos e os oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 3.1) foram enviados para sequenciamento na empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul). As sequências nucleotídicas obtidas pelo método de sequenciamento por Sanger foram analisadas através do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (www.phrap.org). O software BioEdit 7.2.5 foi utilizado para alinhamento das sequências.

3.2 Construção de genomas infecciosos e sistema subgenômico de replicon de uma cepa brasileira de ZIKV

3.2.1 Estratégia de clonagem do genoma infeccioso e sistema de replicons de ZIKV em cromossomo artificial de bactéria (BAC)

Inicialmente, a sequência genômica da cepa ZV BR 2015/15261, depositada no GenBank sob o número de acesso MF073358.1, foi customizada, utilizando o programa DNASTar (Lasergene), a fim de obter a melhor estratégia para clonagem do genoma viral no cromossomo artificial de bactéria (pBAC). Substituições conservativas foram realizadas para modificação de determinados sítios específicos de endonucleases de restrição ao longo da sequência genômica do ZIKV, conforme indicado na tabela 3.3.

Para viabilizar a construção do clone infeccioso da cepa brasileira de ZIKV, a sequência genômica de ZV BR 2015/15261 foi fragmentada em três segmentos de DNA, denominados E1, E2 e E3. Adicionalmente, as sequências do promotor e terminador da T7 RNA polimerase e da ribozima (RZ) do vírus da hepatite delta (*Hepatitis delta virus*, HDV) foram adicionadas no segmento de DNA E1. Assim, o cassete de DNA E1, composto por 3.330 pb, contém sequencialmente um sítio NotI, o promotor da T7 RNA polimerase acrescido de uma guanina (G), 1.334 nucleotídeos iniciais do genoma do ZIKV (posição 1 a 1.334 do genoma viral), um linker de 21 nucleotídeos entre os sítios das endonucleases de restrição SphI, BamHI e BstBI, seguido por 1.676 nucleotídeos finais do genoma do ZIKV (posição 9.133 a 10.807 do genoma viral), pela sequência da HDV/RZ, do terminador da T7 RNA polimerase e um sítio Swal (Figura 3.1 A). O cassete de DNA E2, composto por 3.447 pb, contém sequencialmente um sítio SphI, 3.435 nucleotídeos do genoma do ZIKV (posição 1.341 a 4.776 do genoma viral) e um sítio BamHI (Figura 3.1 B). O cassete de DNA E3 é constituído por um sítio BamHI, seguido por 4.344 nucleotídeos do genoma do ZIKV (posição 4.782 a 9.126 do genoma viral) e um sítio BstBI, totalizando 4.356 pb (Figura 3.1 C).

Os segmentos de DNA foram sintetizados e clonados em vetor de clonagem pela empresa GenScript. Os fragmentos E1 e E3 foram clonados em vetor pUC57, (pUC E1 e pUC E3), e dada a dificuldade na obtenção de clones viáveis, a sequência E2 foi clonada em vetor pCC1 (pCC1 E2).

Tabela 3.3 - Otimização do genoma da cepa ZV BR 2015/15261 para a estratégia de construção do clone infeccioso.

ALINHAMENTO		OTIMIZAÇÃO
ZIKV 15261	1pb 5'-----AGTTG 3' 5pb	Em vermelho a inserção do sítio NotI e em verde o promotor da T7 RNA polimerase
pBAC cust.	1pb 5' GCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGagttg 3' 31pb	
ZIKV 15261	190pb 5' GGGGCTTGAAGAG 3' 202pb	Inserção do sítio AflIII
pBAC cust.	216pb 5' ggggcCTTaagag 3' 229pb	
ZIKV 15261	684pb 5' ACGACGTCAAC 3' 694pb	Remoção do sítio AatII
pBAC cust.	710pb 5' acgacTtcaac 3' 720pb	
ZIKV 15261	1530pb 5' AGCCTAGGACT 3' 1540pb	Remoção do sítio AvrII
pBAC cust.	1556pb 5' agcctGggact 3' 1566pb	
ZIKV 15261	3711pb 5' AAGCTTGCAAT 3' 3721pb	Remoção do sítio Hind III
pBAC cust.	3737pb 5' aagctGgcaat 3' 3747pb	
ZIKV 15261	3852pb 5' GAAAGCATGCT 3' 3862pb	Remoção do sítio SphI
pBAC cust.	3878pb 5' gaaagTatgct 3' 3888pb	
ZIKV 15261	6138pb 5' CGACCTGAGGC 3' 6148pb	Remoção do sítio Bsu36I
pBAC cust.	6164pb 5' cgaccGgaggc 3' 6174pb	
ZIKV 15261	8055pb 5' GTGGACGTCTT 3' 8065pb	Remoção do sítio AatII
pBAC cust.	8081pb 5' gtggaTgtctt 3' 8091pb	
ZIKV 15261	8514pb 5' GAAAGGATCCG 3' 8524pb	Remoção do sítio BamHI
pBAC cust.	8540pb 5' gaaagAatccg 3' 8550pb	
ZIKV 15261	9543pb 5' GAGGCTGAGGA 3' 9553pb	Remoção do sítio BbvCI
pBAC cust.	9569pb 5' gaggcCgagga 3' 9579pb	
ZIKV 15261	9700pb 5' ATGCCCTCAGGTTC 3' 9713pb	Remoção do sítio Bsu36I
pBAC cust.	9726pb 5' atgccTtGaggttc 3' 9739pb	
pBAC cust.	10834-10918pb	Inserção da sequência de HDV
pBAC cust.	10932-11051pb	Inserção da sequência T7 Terminator

Nota: Identificação da modificação com caracteres em maiúsculo e negrito correspondem a otimização do genoma.

Para a obtenção do sistema subgenômico de replicon do ZIKV, a estratégia consistiu em substituir a sequência que codifica para as proteínas estruturais do ZIKV (posição 1 a 2.525 do genoma viral) pela sequência truncada, composta por um sítio NotI anterior a sequência do promotor T7, seguida pela sequência não traduzida 5'UTR do ZIKV (posição 1 a 188 do genoma viral), 28 nucleotídeos da sequência do capsídeo (posição 189 a 217 do genoma viral), 68 nucleotídeos da sequência do envelope (posição 2.422 a 2.489 do genoma viral) e 36 nucleotídeos de NS1 (posição 2.490 a 2.525 do genoma viral), finalizando com a sequência do sítio MluI (Figura 3.1 D). A sequência truncada de 352 pb, denominada E4, foi sintetizada pela empresa GenScript em vetor pUC57. A estratégia de montagem do replicon de ZIKV consistiu em substituir a região que codifica para as proteínas estruturais do ZIKV, previamente clonadas em vetor pBAC entre os sítios NotI e MluI, pelo segmento de DNA truncado E4.

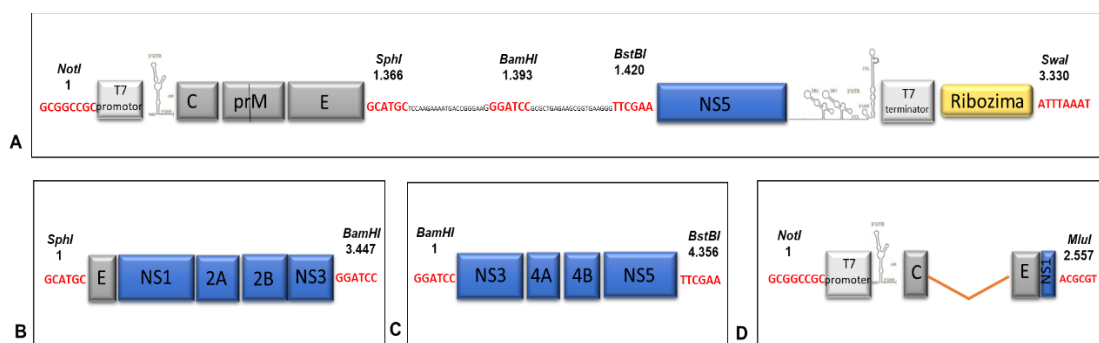


Figura 3.1 - Representação esquemática dos fragmentos de DNA sintéticos utilizados para a construção do genoma infeccioso e replicon subgenômico de ZIKV. **A.** Fragmento de DNA E1. **B.** Fragmento de DNA E2 **C.** Fragmento de DNA E3 **D.** Fragmento de DNA E4 para construção do replicon subgenômico. Na figura estão representados os sítios para as enzimas de restrição (vermelho) utilizadas para a clonagem dos fragmentos de DNA de interesse, as sequências nucleotídicas linkers entre os sítios das enzimas de restrição (preto), as regiões 5'UTR e 3'UTR (estrutura secundária), s proteínas estruturais (cinza), as proteínas não estruturais (azul), o promotor T7 da RNA polimerase (branco), o terminador T7 da RNA polimerase (cinza) e ribozima (amarelo).

3.2.2 Transformação dos fragmentos sintéticos em *E. coli* TOP 10 químico competentes

Para a amplificação dos plasmídeos contendo os seguimentos de DNA sintéticos (pUC E1, pUC E3 e pCC1 E2), bactérias *E. coli* da linhagem TOP 10 químico-competente (CaCl₂) foram transformadas com aproximadamente 100 ng de cada

clone recombinante comercial. As bactérias foram preparadas em nosso laboratório, oriundas de estoques em 50% glicerol segundo protocolo de Mandel e Higa (1970) modificado. As bactérias competentes foram descongeladas em banho de gelo durante 10 minutos e, em seguida, 50 ng do vetor recombinante foi adicionado. A mistura era mantida em gelo por 30 minutos e depois submetida a um choque térmico por 2 minutos a 42°C. Imediatamente após o choque térmico, as células eram mantidas em gelo por no máximo 2 minutos. Posteriormente, eram adicionados 900 µL de meio SOC e a mistura mantida sob agitação (200 rpm) a 37°C por uma hora para recuperação celular. Após esse período, alíquotas ou todo volume das bactérias transformadas eram semeadas em placas de meio LB sólido, contendo o antibiótico apropriado (100 µg/mL de ampicilina ou 20 µg/mL de cloranfenicol). As placas semeadas eram incubadas a 30 °C por 16 h. Após a verificação da presença de possíveis colônias recombinantes, cada clone candidato era transferido da placa de crescimento para pontos numerados de outra placa de meio LB, contendo os mesmos antibióticos.

A triagem das colônias foi realizada através da digestão com as endonucleases respectiva de cada fragmento (Figura 3.2) seguindo as especificações do fabricante. As colônias positivas que apresentavam o tamanho esperado do fragmento foram inoculadas com 3 mL de meio LB, acrescido com o antibiótico apropriado e incubadas a 30°C por 16 horas, sob agitação constante (200 rpm). As culturas de bactérias recombinantes eram utilizadas para extração dos plasmídeos recombinantes e manutenção dos estoques bacterianos em 25% de glicerol estéril. Para a obtenção e purificação do DNA plasmidial foi utilizado o Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

3.7.1 Obtenção e clonagem dos fragmentos sintéticos em vetor pBAC

A sequência linear do vetor pBAC utilizado neste estudo foi obtida a partir da digestão do vetor pBACDV1 (vetor pBAC contendo a sequência completa do genoma do vírus da dengue tipo 1 (DENV-1) clonada entre os sítios NotI e Swal) (Borba et al., 2012) com as endonucleases de restrição NotI (Biolabs) e Swal (Biolabs). Da mesma forma, o vetor pUC E1 foi digerido sequencialmente com as endonucleases de restrição, NotI (Biolabs) e Swal (Biolabs) para clonagem em vetor pBAC e geração do clone recombinante pBAC E1. Após purificação com o *QiaQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), o cassete sintético E1 resultante e o vetor pBAC foram ligados a 16°C por

16 horas, utilizando a enzima T4 DNA ligase (BioLabs), obedecendo as condições determinadas pelo fabricante e a proporção molar de 3:1 (inserto:vetor), a partir de 30 ng do pBAC. Todo o volume da reação de ligação foi utilizado para transformação em *E. coli* da linhagem TOP 10 químico-competente (CaCl₂). As bactérias recombinantes foram plaqueadas em meio TB (terrific broth) sólido, suplementado com 15 ug/mL de cloranfenicol, e incubadas por 16 h a 30°C. Os clones recombinantes obtidos foram triados através da digestão com endonucleases de restrição SwaI e NotI. Para verificar se o segmento de DNA inserido apresentava-se em fase com a sequência do vetor, o sequenciamento nucleotídico do DNA plasmidial recombinante foi realizado pela empresa MacroGen (Seoul, Coréia do Sul), utilizando os oligonucleotídeos T7 promoter e T7 terminator, respectivamente.

Para a inserção do gene sintético E2, o vetor PCC1 E2 foi digerido sequencialmente pelas endonucleases SphI (Biolabs) e BamHI (Biolabs). Da mesma maneira, o vetor pBAC E1, previamente obtido, foi digerido com as enzimas SphI (Biolabs) e BamHI (Biolabs) para a geração do clone recombinante pBAC E1/E2. Os fragmentos específicos foram purificados utilizando o *QiaQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). A ligação do cassete sintético E2 no vetor pBAC E1 foi realizada nas condições de 16°C por 16 horas, utilizando a enzima T4 DNA ligase (BioLabs), obedecendo as condições determinadas pelo fabricante e a proporção molar de 3:1 (inserto:vetor). Todo o volume da reação de ligação foi utilizado para transformação em *E. coli* da linhagem TOP 10 químico-competente (CaCl₂). As bactérias recombinantes foram plaqueadas em meio TB sólido, suplementado com 15 ug/mL de cloranfenicol, e incubadas por 16 h a 30°C. Os clones recombinantes obtidos foram triados através da amplificação por PCR, utilizando os primers ZIK 3+/4- (567 pb). Os clones recombinantes positivos foram triados por digestão com as endonucleases de restrição SwaI (BioLabs) e NotI (BioLabs). Para o clone que apresentou a liberação do fragmento de 6.777 pb, foi realizada a amplificação por PCR utilizando a enzima DNA polimerase *high fidelity* do kit comercial *Long range PCR* (Qiagen), e os oligonucleotídeos específicos ZIK 5+/6- para amplificação de um fragmento de 637 pb, ZIK 7+/8- (657 pb), ZIK 9+/10- (627 pb), ZIK 11+/12- (663 pb), ZIK 13+/14- (687 pb), ZIK 15+/16- (732 pb), ZIK 17+/18- (1.233 pb) e ZIKV 3'UTR+/36- (452 pb). Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados com o *QiaQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) e sequenciados pela empresa MacroGen, utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3.1 e 3.2.

Devido à dificuldade de clonagem do fragmento E3 no vetor pBAC, duas abordagens para a inserção de E3 foram utilizadas. A primeira consistiu na tentativa de inserção do fragmento E3 no vetor pBAC E1/E2 e a segunda na tentativa de inserção no vetor pBAC/E1, ambas utilizando as endonucleases BamHI (Biolabs) e BstBI (Biolabs). A obtenção do gene E3 foi possível pela digestão do vetor PUC E3 com as endonucleases BamHI (Biolabs) e BstBI (Biolabs), de acordo com as instruções do fabricante, liberando o fragmento de interesse com 4.356 pb. Da mesma forma, os vetores pBAC/E1 e pBAC E1/E2 foram digeridos com as endonucleases BamHI (Biolabs) e BstBI (Biolabs) para a linearização da sequência nucleotídica. Os fragmentos digeridos foram purificados com o *QiaQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) e o cassete sintético E3 resultante foi utilizado para a reação de ligação ao vetor pBAC/E1, utilizando a enzima T4 DNA ligase (BioLabs), de acordo com as instruções do fabricante. Alternativamente, o segmento de DNA E3 foi utilizado para ligação em vetor pBAC E1/E2, previamente digerido com as mesmas endonucleases de restrição. Todo o volume da reação de ligação foi utilizado para transformação em cepas bacterianas que diminuem a probabilidade de recombinação de DNA, sendo STBL-2 (Invitrogen) ou EPI300 (Epicentre) químico-competente (CaCl₂). As bactérias recombinantes foram plaqueadas em meio TB sólido, suplementado com 15 ug/mL de cloranfenicol, e incubadas por 16 h a 30°C. Os clones recombinantes obtidos foram triados através da digestão com endonucleases de restrição BamHI (Biolabs) e BstBI (Biolabs).

A estratégia de construção do sistema subgenômico de replicon do ZIKV consistiu na retirada de 2.550 pb da porção inicial do genoma de ZIKV, utilizando as enzimas de restrição NotI (Biolabs) e MluI (Biolabs) do vetor pBAC E1/2. Da mesma forma o vetor PUC E4 foi digerido com as endonucleases NotI (Biolabs) e MluI (Biolabs), liberando o fragmento de interesse com 356 pb. Os fragmentos purificados pela excisão de bandas em gel de agarose, utilizando o *QiaQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), foram ligados utilizando a enzima T4 DNA Ligase (BioLabs) nas condições de 16°C por 16 horas, obedecendo as condições determinadas pelo fabricante e a proporção molar de 3:1 (inserto:vetor). Todo o volume de ligação foi transformado em *E. coli* EPI300 cálcio competente, sendo esta cepa por possuir maior estabilidade. As bactérias recombinantes foram plaqueadas em meio TB sólido, suplementado com 15 ug/mL de cloranfenicol, e incubadas por 16 h a 30°C. Os clones recombinantes obtidos foram triados por PCR utilizando a enzima DNA polimerase do kit NAT HIV/HCV/HBV (IBMP) com o DNA plasmidial e os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 35 e ZIK 10 e o

ZIK 35 e ZIK 12, para a amplificação de um fragmento de 458 pb e 945 pb, respectivamente. Com a confirmação do clone recombinante pela técnica de PCR, o DNA plasmidial do clone foi tratado com as endonucleases de restrição SwaI e NotI, liberando um fragmento de 4.579 pb correspondendo ao inserto total. A inserção do fragmento E3 se deu pela digestão do vetor PUC_E3 com as endonucleases BamHI (BioLabs) e BstBI (BioLabs) liberando um fragmento de 4.356 referente ao fragmento E3. Da mesma forma o vetor pRepBAC E1/E2/E4 foi digerido com as enzimas BamHI (BioLabs) e BstBI (BioLabs) para linearização do vetor. Posteriormente os fragmentos foram purificados pela excisão de bandas em gel de agarose, utilizando o *QiaQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), foram ligados utilizando a enzima T4 DNA Ligase (BioLabs) nas condições de 16°C por 16 horas, obedecendo as condições determinadas pelo fabricante e a proporção molar de 3:1 (inserto:vetor). Todo o volume de ligação foi transformado em *E. coli* EPI300 cálcio competente, e posteriormente, plaqueadas em meio TB sólido, suplementado com 15 ug/mL de cloranfenicol, e incubadas por 16 h a 30°C. O clone recombinante obtidos foi triado por PCR utilizando a enzima DNA polimerase do kit NAT HIV/HCV/HBV (IBMP) com o DNA plasmidial, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 19 e ZIK 20 para amplificação de um fragmento de 1.315pb. Com a confirmação da inserção do fragmento E3 pela amplificação do fragmento específico pela técnica de PCR, o replicon foi tratado com as endonucleases de restrição SwaI (BioLabs) e NotI (BioLabs), ocasionando a liberação de um fragmento de 8.712 pb.

3.3 Obtenção de ZIKV recombinantes através do método de infecção de amplicons subgenômicos (ISA)

A fim de obtermos os ZIKV recombinantes para estudos comparativos de infectividade viral, utilizamos a tecnologia de amplicons subgenômicos infecciosos (ISA), estabelecida por Gadea e colaboradores (2016). A metodologia de ISA foi empregada para a obtenção de ZIKV recombinante da linhagem africana (cepa MR 766 NIID – número de acesso no GenBank LC002520), neste trabalho denominado de MR766_{WT} (WT, do inglês *wild type*) e uma variante contendo uma mutação na posição 4.974 do genoma do ZIKV, denominada MR766_{Mut121}. A estratégia de obtenção do mutante está descrita no tópico subsequente (3.3.1).

Para obtenção do ZIKV recombinante MR766_{WT}, primeiramente o genoma do ZIKV foi amplificado em quatro fragmentos, denominados Z1 a Z4 (Tabela 3.4),

utilizando como molde os genes sintéticos Z1 a Z4 (clonado em PUC57) que compreendem o genoma completo do ZIKV, gentilmente cedidos pelo Dr. Philippe Desprès do laboratório de *Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical* (PIMIT) da Ilha da Reunião.

Tabela 3.4 - Identificação dos fragmentos de PCR para montagem do ZIKV recombinante pela técnica de ISA

Identificação do fragmento	Sequência genômica de ZIKV	Tamanho (nt)
Z1	5'UTR-C-prM/M-E	2.842
Z2	NS1-NS2A-NS2B-NS3	3.407
Z3	NS3-NS4A-NS4B-NS5	2.622
Z4	NS5-3'NTR	2.949

Os genes sintéticos utilizados para amplificação do genoma completo do ZIKV foram desenhados para permitir a correta montagem, replicação e tradução do RNA viral após a transfecção dos amplicons subgenômicos na célula hospedeira. Assim, cada clone (Z1 a Z4) foi delineado para conter em suas extremidades sequências de sobreposição de 34 a 41 nucleotídeos, conforme representado na Figura 3.2. Adicionalmente, no clone Z1 a região promotora do vírus CMV foi adicionada a montante da região 5'UTR e no clone Z4 a sequência sinal de poliadenilação do vírus símio 40 (SV40) foi adicionada a jusante da região 3'UTR. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se o kit de amplificação *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Biolabs), conforme as instruções do fabricante. Para tanto, foram utilizados 10 ng do DNA plasmidial dos clones recombinantes de ZIKV (Gadea et al., 2016), 2,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 3.5) na concentração de 10 µM, 4 µL de dNTP na concentração de 2,5 mM, 10 µL do tampão *Phusion HF* (5x) e 0,5 µL da enzima *Phusion DNA polymerase*, o volume final da reação foi ajustado com água DEPC para 50 µL.

Tabela 3.5- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para obtenção dos fragmentos correspondentes ao genoma de ZIKV pelo método de amplicons subgenômicos (ISA).

Identificação	Sequência 5'-3'
Z1 F	GCGGCCGCTAGTTATTAATAGTAATC
Z1 R	CCCCCAGGACTGCCATTCTCTTG
Z2 F	GAGGCCACTGTGAGAGGCGCCAAGAG
Z2 R	CCATGATTGGTGAGTTAGAGTCAGG
Z3 F	CCCGTGATGCGTTTCCTGACTCTAAC
Z3 R	GAGAGCACTCTGAGTGTTTCGTGTC
Z4 F	CCTGAAGTGGAAGAGACACGAAC
Z4 R	GCGCGCTAAGATACATTGATGAGTTTGG

As reações foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura: 98°C por 30 segundos, 30 ciclos de 98°C por 30 segundos, 65°C por 10 segundos e 72°C por 2 minutos, terminando com 72°C por 5 minutos. A especificidade da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e os produtos de PCR purificados com kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

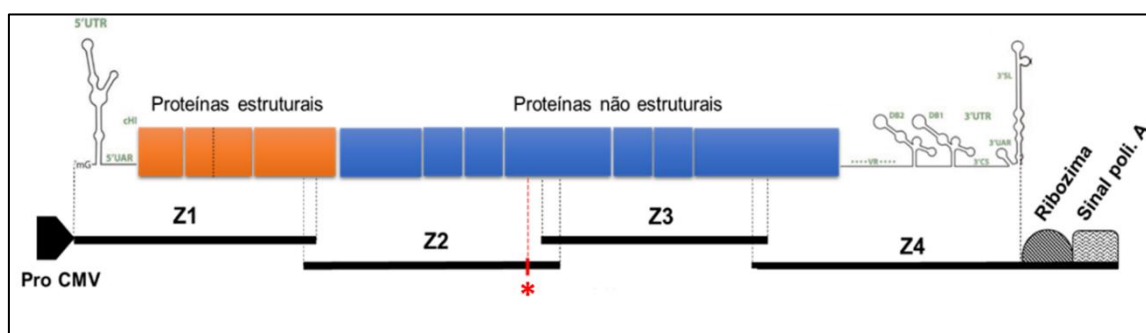


Figura 3.2- Esquema representativo do método de ISA para obtenção dos clones recombinantes de ZIKV da cepa africana. Genoma completo de ZIKV representando as proteínas estruturais (laranja) e não estruturais (azul), flanqueado pelas regiões 5' e 3'UTR (estrutura secundária). Abaixo a ilustração do genoma do ZIKV fragmentado em quatro segmentos (Z1 a Z4) na forma de DNA. O fragmento Z1 contém a sequência do promotor CMV a montante da região 5'UTR. O fragmento Z4 contém a sequência que codifica para a ribozima e uma sequência sinal poli A adjacente a região 3'UTR do genoma do ZIKV. * Indica a posição nucleotídica da mutação sítio dirigida na posição 2.765 do fragmento Z2 (posição genômica 4.974 = alteração do resíduo de aminoácido 121 da proteína NS3).

Após a purificação, os fragmentos foram utilizados para eletroporação em células Vero, conforme descrito no item 3.3.2.

3.3.1 Mutagênese sítio dirigida para obtenção de ZIKV recombinante mutante

Para obtenção do ZIKV recombinante contendo a mutação pontual (glicina(G)/ácido glutâmico(E)) no resíduo 121 do domínio protease da proteína NS3 (ZIKV MR766_{Mut121}), utilizamos a técnica de mutagênese sítio dirigida seguindo as instruções do fabricante do kit QuickChange site-direct mutagenesis (Stratagene). Para tanto, utilizamos 50 ng do DNA plasmidial do clone Z2 da cepa do ZIKV (Gadea et al., 2016) e 125 ng dos primers mutagênicos CNZK766F - 5'CAAGACAAAGGACGAGGACATCGGAGCAG3' e CNZK766R - 5'CTGCTCCGATGTCCTCGTCCTTTGTCTTG3'. Os nucleotídeos sublinhados na sequência dos oligonucleotídeos iniciadores indicam a mutação inserida na posição de interesse. A mutação não conservativa está localizada na posição 2.765 do fragmento Z2 e na posição 4.974 do genoma do ZIKV. Para a PCR mutagênica, o seguinte ciclo de amplificação foi utilizado: 1 ciclo de 95°C por 30 segundos, 16 ciclos de 95°C por 30 segundos. Posteriormente o produto de amplificação foi tratado com 1 µL da enzima de restrição DpnI. O DNA resultante foi transformado e amplificado em bactérias cálcio competentes *E. coli* cepa TOP 10. O DNA plasmidial foi isolado utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante), e sequenciado pela empresa Macrogen para verificação da correta inserção da mutação e exclusão da presença de mutações indesejadas.

Após a confirmação da sequência, o clone Z2 mutante foi utilizado para amplificação do fragmento Z2, utilizando os primers Z2 forward (5' - GAGGCCACTGTGAGAGGCGCCAAGAG-3'), e Z2 reverse (5' - TCCATGATTGGTGAGTTAGAGTCAGG-3') e o kit de amplificação *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific), conforme descrito no item anterior 3.3. O produto amplificado foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1% e purificado com kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.2 Eletroporação dos fragmentos de DNA e obtenção dos ZIKV recombinantes

Para obtenção do ZIKV recombinante MR766_{WT}, o conjunto dos produtos de PCR purificados Z1, Z2, Z3 e Z4 foram misturados na mesma proporção v/v 1:1 (2 µl de cada produto purificado) e eletroporados em células Vero. Da mesma forma, o

conjunto dos produtos de PCR Z1, Z2mut, Z3 e Z4 foram utilizados para a geração do ZIKV recombinante MR766_{Mut121}. Para cada eletroporação, foi utilizado 1.10^6 células Vero ressuspendidas em 400 μ l de PBS gelado. As condições para a eletroporação consistiram em dois pulsos seguidos de 150 V, 50 μ F e 450 V, 150 μ F, usando o eletroporador de células Gene Pulser Xcell™ (BioRad). Imediatamente após a eletroporação, as células foram transferidas para uma garrafa de cultivo (25 cm²), contendo o meio de cultivo DMEM F-12 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 25 μ g/mL de gentamicina, 1% de piruvato e 1% de glutamina, e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 dias após transfecção (5 dpt). Posteriormente, o sobrenadante das células eletroporadas foi utilizado para a infecção de 1.10^6 células Vero em uma nova garrafa de cultivo (25 cm²). O inóculo foi incubado por 4 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi removido e um novo meio adicionado para geração da passagem 1 (P1). A cultura foi acompanhada para visualização do aparecimento de efeito citopático (CPE) por até 5 dpt. Para amplificação viral, 500 μ l do sobrenadante de P1 foram utilizados para a infecção por 1 h de células Vero (1.10^6 células uma garrafa de cultivo (25 cm²)). Após esse período, o sobrenadante foi removido e um novo meio adicionado para geração da P2. O sobrenadante da cultura foi utilizado para determinação do título viral pela técnica de formação de placa de lise.

Os ZIKV recombinantes da P2 foram amplificados em células Vero para a produção de estoque viral (P3) e posterior análise e caracterização do fenótipo viral. Para tanto, as células Vero foram plaqueadas em garrafas de 75 cm², contendo $1,5 \times 10^6$ células, e inoculadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.001 da cepa viral de P2 em meio de cultura DMEM F-12 suplementado sem SFB. O inóculo foi incubado com as células por 2 h a 37 °C em estufa de CO₂, sendo em seguida o inóculo substituído por meio de cultura DMEM F-12 completo e novamente incubado em estufa CO₂ a 37 °C. O sobrenadante foi recolhido imediatamente ao se observar a presença de efeito citopático (CPE). Os sobrenadantes das culturas foram clarificados por centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e estocados a -80°C. Os mesmos procedimentos foram realizados para o controle negativo dos experimentos (MOCK).

3.4 Titulação viral por formação de placa de lise

A quantificação de partículas virais foi avaliada através da técnica de titulação viral por formação de placa de lise em células Vero. As células foram semeadas em placa

de cultivo de 6 poços ($1,5 \cdot 10^5$ células/poço) e infectadas com diluições seriadas (1:10 em meio DMEM F-12 suplementado sem SFB) do sobrenadante de cultura de ZIKV ou do MOCK. O inóculo (400 μ L/poço) foi incubado, em duplicata, com as células por 1 h em estufa a 37 °C com 5% CO₂ e, em seguida, substituído por uma mistura de meio de cultura DMEM F-12 (suplementado com 10% de SFB, 2% penicilina/estreptomicina, 2% L-glutamina, 2% piruvato de sódio) e Carboxi Metil Celulose (CMC) 3,2% na proporção de 1:1 (v/v). As culturas de células foram incubadas em estufa a 37°C com 5% CO₂ por 5 dias.

Para a revelação das placas de lise, as células foram lavadas três vezes com PBS para completa remoção do CMC, fixadas em paraformaldeído 3% por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS para a remoção do paraformaldeído e incubadas com cristal violeta durante 10 minutos a temperatura ambiente. A solução de cristal violeta foi retirada cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e lavada por imersão em água potável para a remoção de qualquer resquício da solução. As placas de lise foram quantificadas por visualização e utilizadas para determinação do título viral, através do cálculo de divisão do valor de média de unidade formadora de placa (PFU) pelo volume em mililitros do inóculo viral. O valor obtido elevado exponencialmente pela diluição de contagem de PFU representa o título viral por mL.

3.5 Ensaios de caracterização *in vitro* dos ZIKV recombinantes

Para avaliar o efeito da mutação não conservativa GNS3₁₂₁E na infectividade do ZIKV, o perfil infectivo dos ZIKV MR766_{wt} e MR766_{121Mut} foi avaliado através de uma cinética de infecção em célula de inseto (C6/36) e duas linhagens de células de mamífero (Vero e Huh7.5). Todos os experimentos de caracterização biológica foram realizados utilizando-se vírus de baixa passagem em cultivo de células Vero (P3). Para tanto, placas de 96 poços foram semeadas com $8 \cdot 10^3$ C6/36/poço, $1,10^4$ Huh7.5/poço e $1 \cdot 10^4$ Vero/poço e infectadas com MOI de 10. As células foram incubadas com inóculo viral em meio de cultivo sem SFB por 2 h, sendo que a linhagem de C6/36 foi incubada em estufa BOD a 28 °C e as células Huh7.5 e Vero incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após o período de incubação, o inóculo foi substituído por meio de cultivo completo específico para cada célula e incubado por 24 e 48 horas pós infecção (hpi). No tempo determinado, o sobrenadante de cada célula foi recolhido para determinação do título viral, pela técnica de titulação viral por

formação de placa e as células fixadas com paraformaldeído (PFA) 3% para avaliação das células infectadas por imunofluorescência indireta (IFI).

3.5.1 Imunoflorescência indireta (IFI)

A determinação da porcentagem de células C6/36, Huh7.5 e Vero infectadas pelos ZIKV recombinantes foi avaliada por IFI nos tempos de 24 e 48 hpi. Imediatamente após o recolhimento do sobrenadante celular nos tempos indicados, as células infectadas foram fixadas com PFA 3% por 20 min a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para a completa remoção do PFA e permeabilizadas com PBS/Triton 0,5% por exatos 4 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo primário 4G2 (diluição 1:400 em tampão PBS/BSA 1%) em estufa a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo anti-mouse conjugado com Alexa Fluor 488 (diluição 1:800 em tampão PBS/BSA 1%) a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e o núcleo das células marcados com DAPI (diluição 1:100 em PBS, BSA 1%) através da incubação durante 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas cinco vezes com PBS e 50 µL de PBS/glicerol foram adicionados sobre as células. As células foram analisadas no equipamento *High-Content Operetta* para determinação da porcentagem de células infectadas e aquisição das imagens.

3.6 Análise de infecção das cepas recombinantes em células dendríticas.

3.6.1 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

As células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram obtidas de três doadores humanos saudáveis (aproximadamente 80 mL) através de punção venosa realizada por um técnico especializado. O sangue foi diluído em PBS comercial (Lonza) na proporção 1:2 e adicionado a um gradiente de densidade, utilizando o kit comercial Lymphocyte Separation Medium (Lonza) na proporção de 1:4. A mistura foi centrifugada a 750 g por 20 minutos em temperatura ambiente, sem uso de aceleração e freio. Após a centrifugação, a interfase contendo PBMCs foi retirada e submetida a lise de hemácias com solução de cloreto de amônio 0,16 M por 5 minutos no gelo. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS suplementado

com solução anticoagulante citrato dextrose (ACD) 0,06%, SFB 5% e ressuspendidas com o tampão PBS/SFB/ACD. A concentração celular foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer.

3.6.2. Purificação de monócitos CD14+ utilizando microesferas magnéticas

Os monócitos presentes nas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de cada doador foram purificados através da utilização de microesferas CD14 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). Para isso, 10 μ L de microesferas CD14 foram misturadas a 1×10^7 PBMC e incubadas em gelo úmido por 20 minutos. Posteriormente, foi adicionado 20 mL do tampão PBS/SFB/ACD e a suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos a 900 rpm a 4°C. As células foram recuperadas em 500 μ L do tampão PBS/SFB/ACD e vertidas na coluna LS (Miltenyi Biotec). Após lavar a coluna três vezes, as células CD14 positivas foram eluídas em 5 mL do tampão PBS/SFB/ACD e centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm. As células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Lonza) suplementado com 10% SFB. Em seguida células foram coradas com azul de triptan para visualização e determinação da viabilidade celular em câmara de Neubauer.

3.6.3. Derivação de monócitos para células dendríticas

Determinada a concentração total dos monócitos purificados, 5.10^5 células/mL de cada doador foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 75cm², contendo meio RPMI suplementado com 10% de SFB, 25ng/mL da proteína recombinante IL-4 humana e 12,5 ng/mL da proteína recombinante GM-CSF humana, por 72 h a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após esse período, meio de cultivo fresco suplementado com as citocinas recombinantes foi adicionado e as células foram mantidas em cultivo por mais 96 h a 37°C com 5% CO₂. No sétimo dia, as células foram recuperadas e centrifugadas por 10 minutos a 400 g em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram coradas com azul de triptan para visualização e determinação da viabilidade celular em câmara de Neubauer. As células de cada doador foram plaqueadas na concentração de 1.10^5 células/poço em placas de 96 poços e incubadas 37°C com 5% CO₂. Após 24h do plaqueamento, as células de cada doador foram submetidas à infecção pelos vírus recombinantes MR766_{WT} e MR766_{121Mut}, e pelo isolado recente da cepa asiática de ZIKV (cepa ZV BR

2015/15261) e MOCK, estes utilizados respectivamente como controle positivo e negativo de infecção. As células foram incubadas com os vírus na MOI de 10 em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ por 1h30 min. Uma cinética de infecção de 6, 48 e 72 hpi foi realizada. Em cada tempo o sobrenadante das culturas foi recuperado e utilizado para determinação do título viral. As células infectadas foram preparadas para marcação da proteína viral e marcadores celulares para posterior análise por citometria de fluxo.

3.6.4 Imunofenotipagem e avaliação da infecção de células dendríticas por citometria de fluxo.

Para a determinação da taxa de infecção e imunofenotipagem, as células infectadas foram transferidas para um microtubo contendo tampão de bloqueio (PBS, 5% de SFB e 1% de soro humano) e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2.000 rpm por 4 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram então fixadas e permeabilizadas com 100 µL de Cytofix/Cytoperm (Becton & Dickinson) por 20 minutos. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 2.000 rpm por 4 minutos e submetidas a marcação com anticorpo 4G2 (1:100 em tampão Permwash) e incubados a 37°C por 30 minutos. Posteriormente para a retirada do excesso do anticorpo primário foi adicionado 100 µL tampão Permwash e centrifugado a 2.000 rpm por 4 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O anticorpo secundário anti- IgG de camundongo Alexa 488 (1:300 em Permwash) (Invitrogen), foi incubado por 30 minutos a 37°C e lavagem com Permwash igualmente realizado anteriormente. Por fim, as células foram recuperadas em PBS filtrado e os dados adquiridos pelo equipamento BD FACS Canto II (Plataforma de Citometria de Fluxo- RPT08L PDTIS/Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná) com análise através do programa FlowJo versão X (Tree Star, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Montagem do clone infeccioso e sistema subgenômico de replicon de ZIKV

A técnica de clone infeccioso e sistema subgenômico de replicon de ZIKV se apresenta como uma ferramenta de fácil manipulação e propagação homogênea do material genético viral, permitindo o estudo de mutações, mapeamento de domínios e

proteínas virais que participam do ciclo infeccioso viral. A estratégia de construção do clone infeccioso de ZIKV utilizada neste estudo foi baseada na sequência genômica do isolado recente BR ZV 2015/15261, previamente sequenciada em nosso laboratório. Para tanto, a sequência do genoma do vírus foi dividida em três fragmentos denominados E1, E2 e E3. Mutações conservativas foram inseridas na sequência dos fragmentos de DNA para criação de sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *Sph*I, *Bam*HI e *Bst*BI, possibilitando a posterior clonagem sequencial dos fragmentos em vetor pBAC, conforme ilustrado na Figura 4.1.

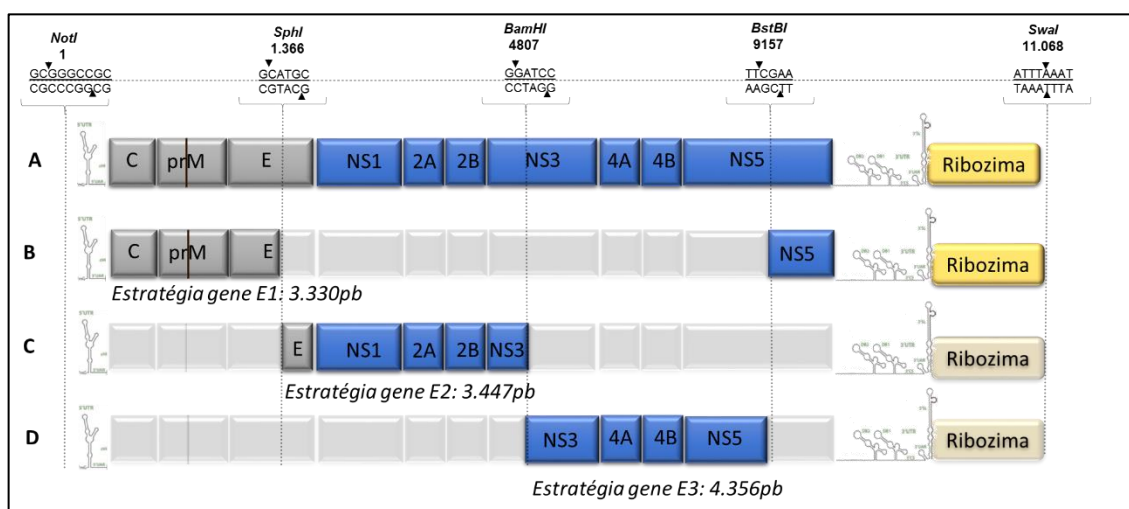


Figura 4.1 - Representação esquemática da estratégia de clonagem utilizada para montagem do clone infeccioso de ZIKV (pBACZIKV). Em A está o diagrama esquemático do genoma de ZIKV evidenciando as proteínas estruturais (cinza), não estruturais (azul), as regiões 3' e 5' UTR (linha preta) e a sequência da Ribozima (amarelo). Acima estão representados os sítios de restrição que foram utilizados nos procedimentos de clonagem. Em B representa a estratégia de gene E1 com tamanho de 3.330 pb. Em C representando a estratégia de gene E2 com tamanho de 3.447 pb. Em C a estratégia de gene E3 com tamanho de 4.356 pb.

Os fragmentos sintéticos de DNA do ZIKV E1 e E3 foram clonadas em vetor PUC57 (PUC_E1 e PUC_E3) e a molécula de DNA sintético E2 foi clonada em vetor PCC1 (PCC1_E2) pela empresa GenScript. O vetor PCC1 foi utilizado para a clonagem do fragmento E2, pelo fato de apresentar maior estabilidade, frente a dificuldade encontrada pela empresa em clonar o fragmento em vetor PUC57. Após a síntese, os clones recombinantes foram transformados em *E. coli* TOP 10 químico-competentes (CaCl₂) para amplificação e obtenção do DNA plasmidial purificado. O tamanho e a integridade dos DNAs recombinantes PUC_E1, PUC_E3 e PCC1_E2 foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Figura 4.2).

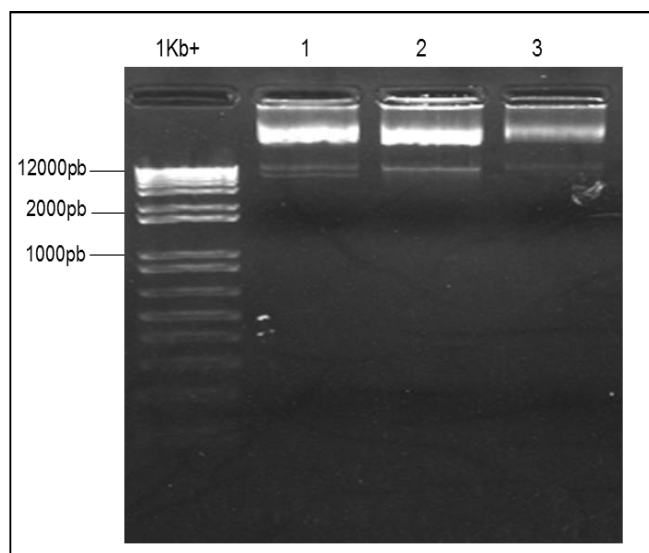


Figura 4.2 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos clones comerciais recombinantes. PUC_E1 com 6.040 pb (linha1), PCC1_E2 com 7.556 pb (linha 2) e PUC_E3 com 7.066 pb (linha 3), correspondentes ao genoma de ZIKV cepa ZV BR 2015/15261.

O primeiro passo para montagem do clone infeccioso consistiu na digestão sequencial do vetor pBACDV1 (Borba et al., 2012) com as endonucleases de restrição NotI e SwaI para retirada do fragmento de 11 kb, correspondente ao genoma completo do DENV-1, (Figura 4.3 A) e posterior inserção do fragmento E1, previamente digerido com as mesmas endonucleases de restrição (Figura 4.2). Assim, os fragmentos purificados de 3.330 pb da sequência E1 e 6.875 pb do pBAC foram clonados, conforme descrito no item 3.2.1, e transformados em linhagem de *E. coli* TOP 10 químico-competente. O clone recombinante pBAC/E1 obtido foi tratado com as endonucleases de restrição NotI e SwaI, a fim de confirmar a correta inserção do fragmento de DNA no vetor pBAC. Após o tratamento com as referidas enzimas de restrição, um fragmento de 3.330 pb, correspondente ao gene E1, e um fragmento de 6.875 pb, correspondente a sequência do vetor pBAC, foram obtidos, confirmando a clonagem do fragmento do genoma do ZIKV em vetor pBAC (Figura 4.3 B e C).

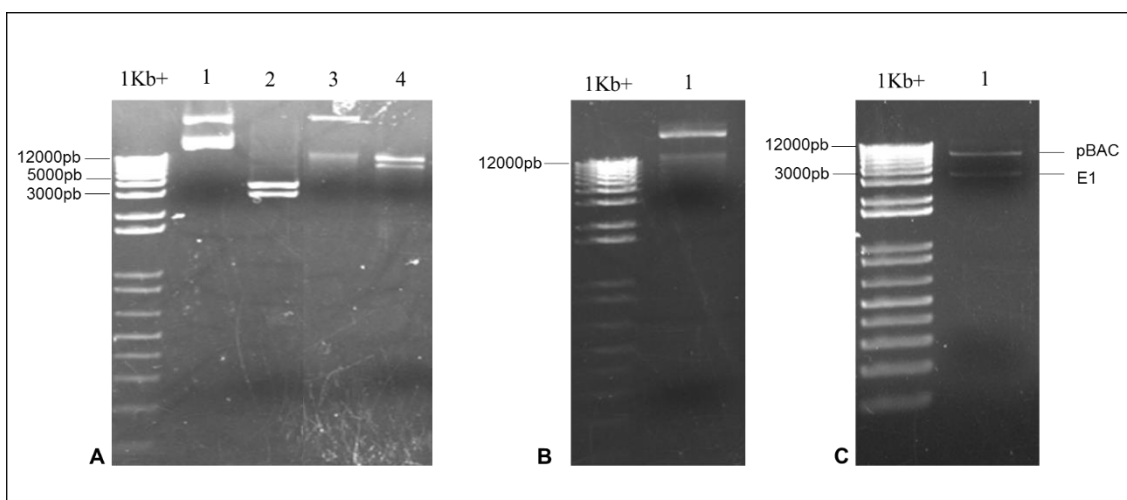


Figura 4.3 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das etapas de clonagem para obtenção do clone pBAC/E1. **A.** clone recombinante PUC_E1 não digerido (linha 1); clone recombinante PUC_E1 digerido com NotI e SwaI (linha 2) observando uma banda correspondendo ao fragmento de E1 com 3.330pb e outro fragmento correspondendo ao vetor pUC57 com 2.710pb; pBACDV1 não digerido (linha 3); pBAC DV1 digerido com NotI e SwaI (linha 4) liberando o genoma de DENV-1 com aproximadamente 11kb e o fragmento do vetor pBAC com 6.875 pb. **B.** Clone recombinante pBAC/E1 purificado (linha 1). **C.** Clone recombinante pBAC/E1 digerido com NotI e SwaI (linha 1) com a liberação do fragmento corresponde a E1 com 3.330 pb e do vetor pBAC com 6.875pb.

Adicionalmente, a verificação da inserção correta do fragmento E1 no clone pBAC/E1 foi avaliada por sequenciamento, utilizando os primers T7 promoter e T7 terminator, presentes no vetor pBAC. Após evidenciar a correta clonagem do fragmento de DNA, prosseguimos com a inserção do gene E2 no clone recombinante pBAC/E1 (Figura 4.4 A e B). Para tanto, os clones recombinantes PCC1_E2 e pBAC/E1 foram digeridos sequencialmente com as enzimas ShpI e BamHI. A digestão resultou na linearização do pBAC/E1 (fragmento de 10.205 pb) e liberação do fragmento E2 (3.447pb) do clone PCC1_E2 (Figura 4.4 A). Posteriormente, ambos os fragmentos de interesse foram purificados pela excisão de bandas em gel de agarose, e o fragmento E2 clonado no vetor pBAC/E1 e posteriormente, utilizados para transformar bactérias *E. coli* TOP 10 cálcio competentes. Os clones recombinantes foram triados pela técnica de PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos ZIK 3 e ZIK 4 para amplificação de um fragmento de 567 pb (Figura 4.4 B). Após a confirmação dos clones recombinantes positivos pela técnica de PCR, os clones e pBAC/E1/E2 cl.16 e cl.19, que apresentaram o mesmo padrão de banda que o controle positivo da reação, foram tratados com as endonucleases de restrição SwaI e NotI para confirmação da correta clonagem do fragmento de interesse. Conforme indicado na figura 4.4 D, o tratamento de ambos os clones com as endonucleases de restrição resultou na liberação de um fragmento específico de 6.777 pb (tamanho

referente a sequência de E1 mais E2). É importante salientar que através da técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8% não foi possível diferenciar a banda de 6.875 pb, referente ao vetor pBAC. Adicionalmente, por ser imprescindível a ausência de mutações aleatórias no clone infeccioso de ZIKV, a sequência do clone 16 foi amplificada por PCR (Figura 4.5), utilizando DNA polimerase de alta fidelidade, e determinada por sequenciamento.

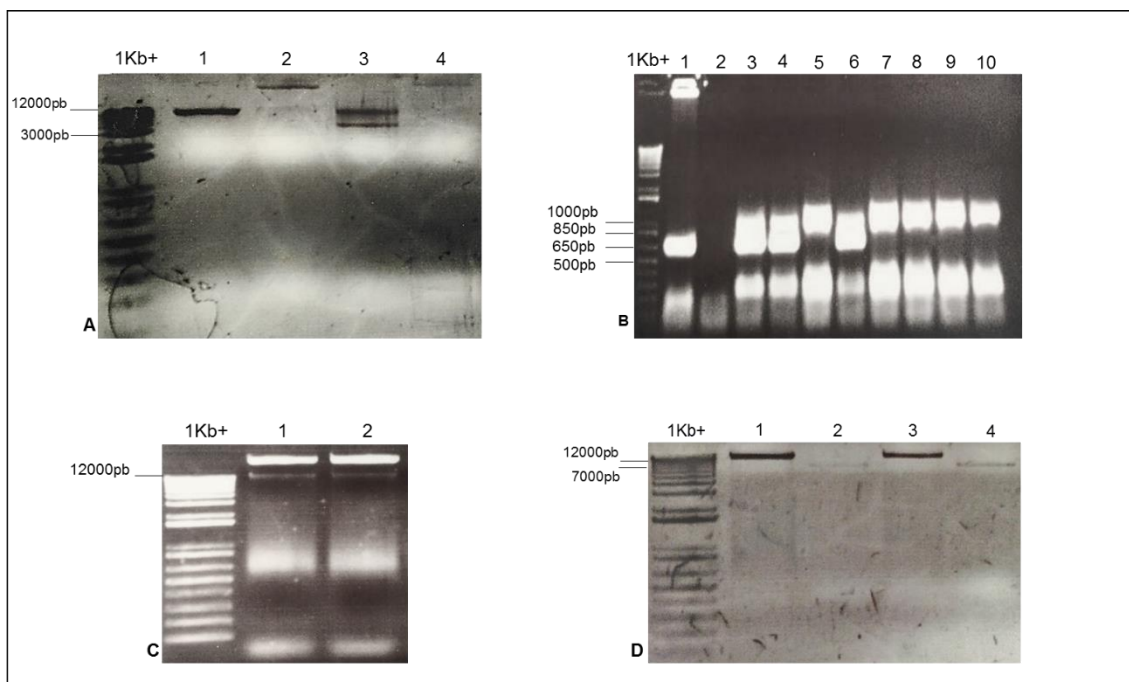


Figura 4.4 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% para obtenção de pBAC E1/2. **A.** Linha 1: Clone recombinante pBAC E1 digerido com as endonucleases SphI e BamHI (BioLabs). Linha 2: Clone recombinante pBAC E1 não digerido. Linha 3: PCCI_E2 digerido com as endonucleases SphI e BamHI (BioLabs). Linha 4: PCCI_E2 não digerido. **B.** Amplicom dos potenciais clones recombinantes pBAC E1/E2 obtidos por PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 3+ e ZIK4-, cujo produto possui tamanho esperado de 567 pb. Amplicom da cepa ZV BR 2015/15261, como controle positivo (linha 1); Controle negativo (linha 2); Clone 19 (linha 3); Clone 18 (linha 4); Clone 17 (linha 5); Clone 16 (linha 6); Clone 15 (linha 7); Clone 14 (linha 8); Clone 13 (linha 9) e Clone 12 (linha 10). De acordo com o padrão do controle positivo, foram selecionados dois clones (16 e 19); **C.** Mini preparação plasmidial utilizando o clone recombinante pBAC E1/E2 cl 16 (linha 1) e clone recombinante 19 (linha 2). **D.** Clone recombinante pBAC E1/E2 16 digerido com Swal (linha 1); clone recombinante pBAC E1/E2 16 digerido com Swal e NotI (linha 2); Clone recombinante pBAC/E1 19 digerido com Swal (linha 3) e clone recombinante pBAC/E1 19 digerido com Swal e NotI (linha 4).

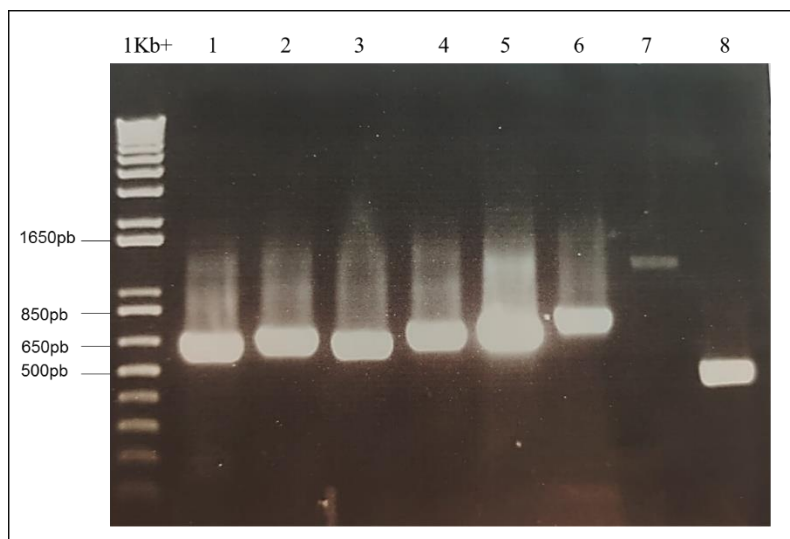


Figura 4.5 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de PCR purificados para sequenciamento do gene E2. Amplicon resultante da reação de PCR do clone pBAC E1/E2, utilizando primers ZIK 5+/6- com 637 pb (linha 2); ZIK 7+/8- com 657 pb (linha 2); ZIK 9+/10- com 627 pb (linha 3); ZIK 11+/12- com 663 pb (linha 4); ZIK 13+/14- com 687 pb (linha 5); ZIK 15+/16- com 732 pb (linha 6); ZIK 17+/18- com 1233 pb (linha 7) e ZIKV 3'UTR+/36- com 452 pb (linha 8).

Após a confirmação da inexistência de qualquer mutação no segmento de DNA clonado, prosseguiu-se com a inserção do segmento E3 no clone pBACE1/E2. No entanto, apesar de diversas tentativas de otimização da clonagem do segmento E3, tais como aumento da concentração e modificação da proporção molar inserto:vetor, utilização de T4 DNA Ligase de outras marcas (Invitrogen) e modificação da temperatura e tempo de incubação, os resultados não foram satisfatórios. Alternativamente, pela dificuldade encontrada em clonar o segmento E3 (fragmento que contém a maior porção do genoma viral) no vetor pBAC contendo os segmentos de DNA E1 e E2, a nova estratégia consistiu em clonar o fragmento E3 diretamente no vetor pBAC/E1. Diversas tentativas para obtenção dos clones recombinantes foram realizadas, inclusive a transformação das reações de ligação em cepas bacterianas de *E. coli* de maior estabilidade gênica, tal como as cepas bacterianas EPI 300 (Epicentre) e STBL-2 (Invitrogen). No entanto, também não obtivemos sucesso na clonagem do fragmento E3 no vetor pBAC/E1.

Diante da dificuldade encontrada, decidimos iniciar a construção do sistema subgenômico de replicon do ZIKV a partir do clone recombinante pBAC E1/E2 cl. 16, previamente clonado e sequenciado. A estratégia de construção do replicon de ZIKV consistiu na substituição de 2.550 nucleotídeos da porção inicial do genoma do ZIKV, clonados no vetor pBAC (clone pBAC E1/E2 cl. 16), pela sequência truncada de 352 pb

das proteínas estruturais, clonadas em vetor PUC (PUC_E4), (Figura 4.6), como descrito no item 3.2.1.

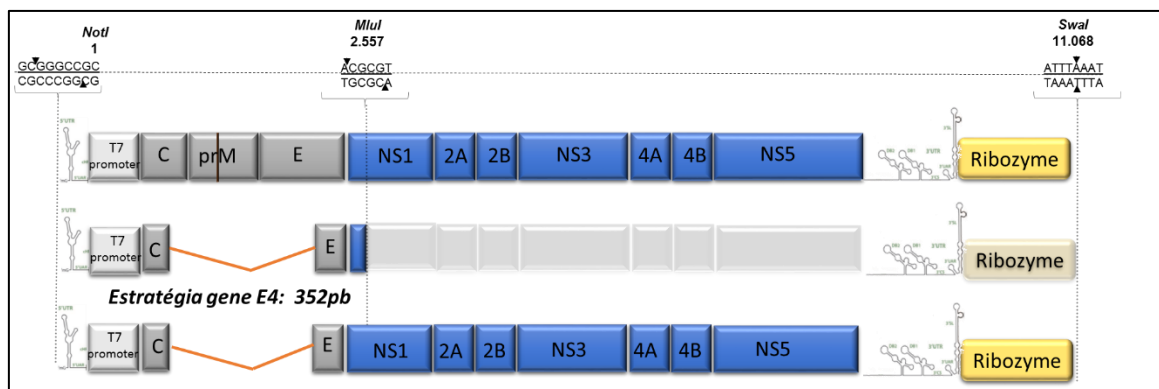


Figura 4.6 - Representação esquemática da estratégia de clonagem utilizada para montagem do replicon subgenômico de ZIKV (RepBACZIKV). A sequência do clone pBACZIKV (A) com a sequência do promotor T7 (branco), as proteínas estruturais (cinza), as proteínas não estruturais (azul), as regiões 3' e 5' UTR (linha preta) e a sequência da Ribozima (amarelo). Acima estão representados os sítios de restrição que foram utilizados nos procedimentos de clonagem. A sequência do gene E4 (B) de 352pb com a sequência do promotor T7, parte da sequência do capsídeo, envelope e NS1. Sendo representando em laranja a remoção da parte estrutural do pBACZIKV. Clonagem do gene E4 pelos sítios de NotI e MluI para montagem e obtenção do replicon (C).

Desse modo, ambos os clones PUC_E4 e pBAC E1/E2 foram digeridos sequencialmente com as endonucleases de restrição NotI e MluI. A reação de digestão do clone PUC_E4 resultou na liberação dos fragmentos de 2.710 pb e 352 pb, como indicado na Figura 4.7 A. A reação de digestão do clone pBAC E1/E2 resultou na liberação dos fragmentos de 11.102 pb e 2.550 pb (figura 4.7 B). Os fragmentos de 11.102 pb e 352 pb foram purificados pela excisão de bandas em gel de agarose e ligados, utilizando a enzima T4 DNA Ligase. A transformação das bactérias *E. coli* EPI300 cálcio competente com a reação de ligação e subsequente plaqueamento celular resultou no crescimento de uma única colônia bacteriana. A confirmação da obtenção do clone recombinante foi realizada por duas reações de PCR: uma utilizando o DNA plasmidial como molde e os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 35 e ZIK 10 para amplificação de um fragmento de 458 pb e outra utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 35 e ZIK 12 para amplificação de um fragmento com 945 pb (Figura 4.8 A e B). Com a confirmação do clone recombinante pela técnica de PCR, o DNA plasmidial do clone foi tratado com as endonucleases de restrição SwaI e NotI, liberando um fragmento de 4.579 pb correspondente ao inserto pRepBAC E1/2/4 (Figura 4.9).

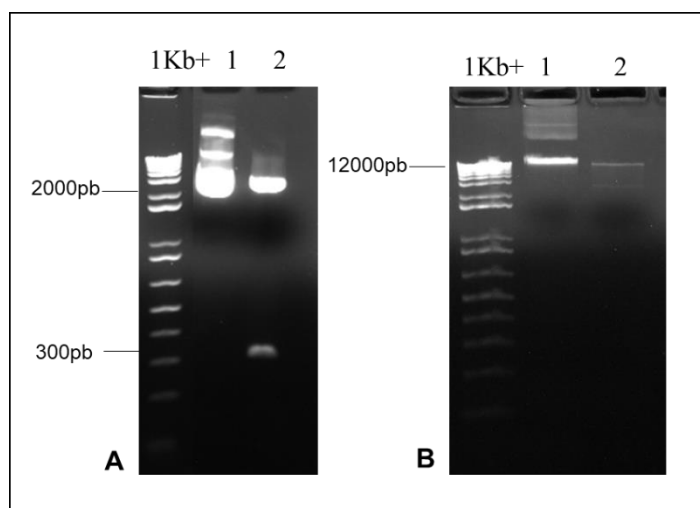


Figura 4.7 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de DNA para construção do RepBAC E1/E4/E2. **A.** Clone recombinante PUC_ E4 não digerido (Linha 1); clone recombinante PUC_ E4 digerido com as enzimas NotI e Mlul (Biolabs) (linha 2). **B.** Clone recombinante pBAC E1/E2 não digerido (linha 1); clone recombinante pBAC E1/E2 digerido com as enzimas NotI e Mlul (Biolabs) (linha2).

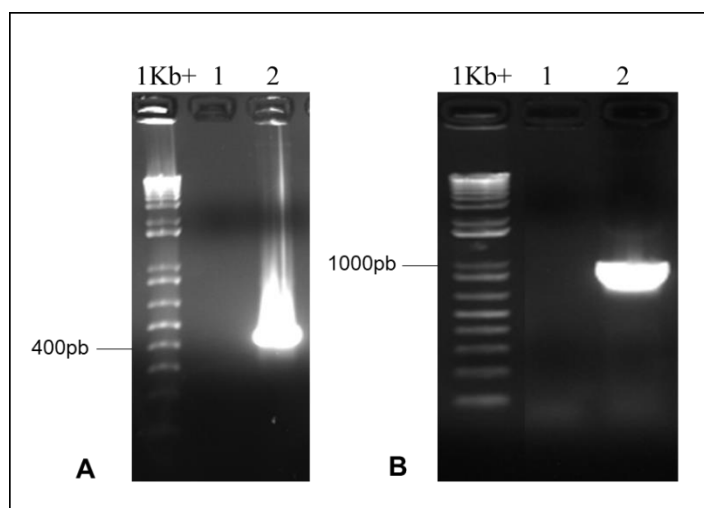


Figura 4.8 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da verificação por PCR do clone recombinante pRepBAC E1/2/4. **A.** Amplicon resultante da reação de PCR do clone pBAC E1/E2/E4, utilizando primers ZIK 35 e ZIK 10 (458pb) (linha 2); controle negativo (linha 1). **B.** Amplicon resultante da reação de PCR do clone pBAC E1/E2/E4 utilizando os primers ZIK 35 e ZIK 12 (945pb) (linha 2); controle negativo (linha 1).

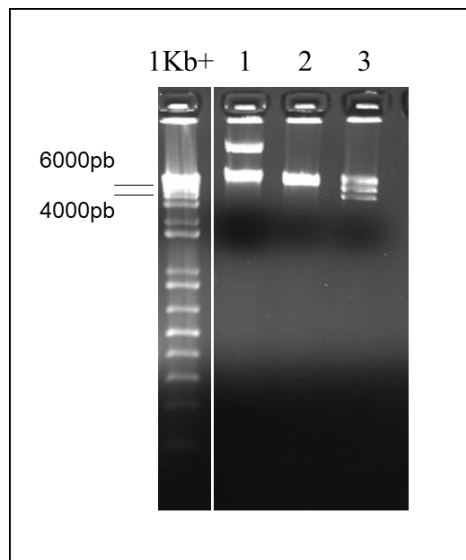


Figura 4.9 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do clone recombinante pRepBAC E1/E2/E4. Clone RepBACE1/E2/E4 não digerido (Linha 1); clone recombinante pRepBAC E1/E2/E4 digerido com SwaI (linha 2); clone recombinante pRepBAC E1/E2/E4 digerido com SwaI e NotI liberando os fragmentos com 4.579 pb e 6.875 pb (linha 3).

Posteriormente, com a confirmação da sequência nucleotídica E4 inserida em pBAC E1/2, pela plataforma de sequenciamento da Fiocruz-RJ, foi constatado que a sequência inserida não apresentou qualquer mutação em relação a sequência original.

Para a inserção da última porção do genoma do ZIKV e montagem final do replicon subgenômico de ZIKV, os clones pRepBAC E1/E2/E4 e PUC_E3 foram digeridos sequencialmente com as enzimas de restrição BamHI e BstBI. Para o vetor PUC_E3, as reações de digestão promoveram a liberação dos fragmentos com 4.356 pb, referente a sequência E3 e 2.710 pb. Para o clone pRepBAC E1/E2/E4 as reações de digestão resultaram na linearização do vetor (fragmento de 11.454 pb) (Figura 4.10 A). Os fragmentos de 4.356 pb e 11.454 pb foram purificados pela excisão de bandas em gel de agarose e o fragmento E3 foi inserido no vetor pRepBAC E1/E2/E4, utilizando a enzima T4 DNA Ligase. Após o plaqueamento das bactérias EPI300 cálcio competentes, transformadas com a reação de ligação, obtivemos apenas uma colônia positiva (pRepBACE1/E2/E4/E3 cl 1). Para a confirmação da inserção do último fragmento no vetor pRepBAC E1/E2/E4, a técnica de PCR foi empregada, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 19 e ZIK 20 para amplificação de um fragmento de 1.315pb (Figura 4.10 B). Após a confirmação da inserção do fragmento E3 pela amplificação do fragmento específico pela técnica de PCR, o replicon foi tratado com as endonucleases de restrição SwaI e NotI, ocasionando a liberação de um fragmento

de 8.712 pb. Dessa forma, foi possível confirmar a inserção do segmento de DNA E3 no clone pRepBACE1/E2/E4 (Figura 4.10 C).

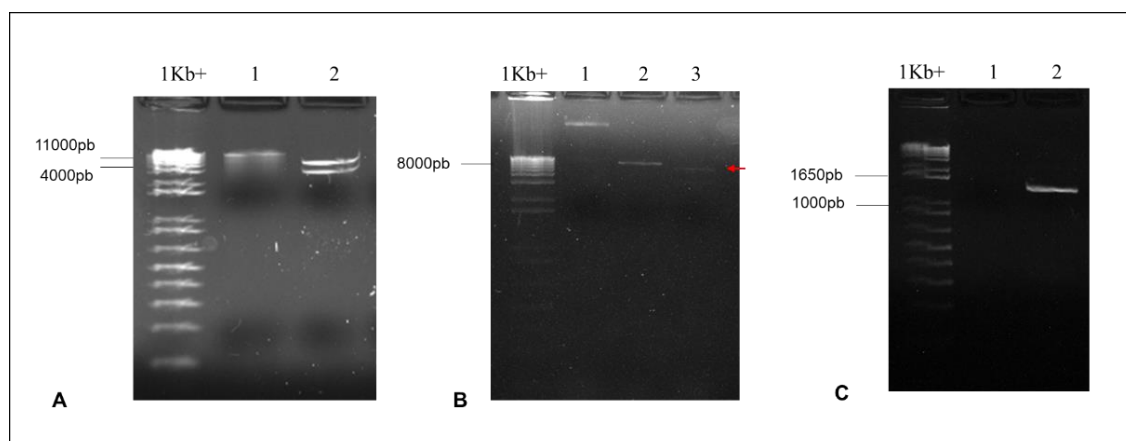


Figura 4.10 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das etapas de clonagem para obtenção do clone recombinante de pRepBACZIKV. **A.** Clone recombinante pRepBAC E1/E2/E4 (11.454pb) (linha1) e clone recombinante PUC_E3 (3.467pb) (linha2) digeridos com BamHI e BstBI **B.** Controle clone recombinante pRepBAC E1/E2/E4/E3 não digerido (Linha 1), pRepBAC E1/E2/E4/E3 digerido com Swal (linha2); clone recombinante pRepBAC E1/E2/E4/E3 digerido com Swal e NotI (8.712 pb) (linha3); **C.** Amplicon resultante da reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 19 e ZIK 20 (1315pb) (linha 2); controle negativo (linha 1).

Por fim, a fim de confirmar a obtenção do sistema subgenômico de replicon do ZIKV, sem a presença de qualquer mutação espúria, o clone RepBACZIKV será completamente sequenciado pelo método de Sanger, utilizando oligonucleotídeos específicos.

4.2 Caracterização genética de uma cepa de ZIKV isolada durante a primeira epidemia do vírus no Brasil

Em nosso estudo anterior, que visou a caracterização dos isolados clínicos recentes de ZIKV, o isolamento da cepa ZV BR 2015/15098 a partir da amostra clínica só foi possível após a inoculação em modelo murino de infecção. O vírus presente na suspensão cerebral dos animais inoculados foi completamente sequenciado (Strottmann et al., 2019). No presente estudo, decidimos determinar a sequência nucleotídica do RNA viral da cepa ZV BR 2015/15098 presente na amostra de soro do paciente infectado, a fim de avaliarmos os fatores genéticos potencialmente envolvidos na restrição da infecção desta cepa viral *in vitro*. Inicialmente, o RNA viral proveniente da amostra clínica foi submetido a técnica de sequenciamento de nova geração (NGS), método que nos permitiria identificar a presença de potenciais

quasispécies. No entanto, devido à baixa concentração de RNA viral presente na amostra, não obtivemos leituras suficientes para a determinação da sequência genômica desta cepa de ZIKV por NGS. Dessa forma, decidimos utilizar o método Sanger de sequenciamento. Assim, o genoma completo da cepa ZK BR 2015/15098 foi convertido em cDNA e amplificado por PCR em oito segmentos de DNA, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 3.1.

A figura 4.11 mostra o perfil eletroforético dos fragmentos de DNA específicos purificados. Os amplicons purificados foram sequenciados pela empresa Macrogen (Seoul/Coréia do Sul). As sequências nucleotídicas resultantes foram analisadas e organizadas em uma sequência consenso (contig), utilizando os programas Phred/Phrap/Consed e BioEdit.

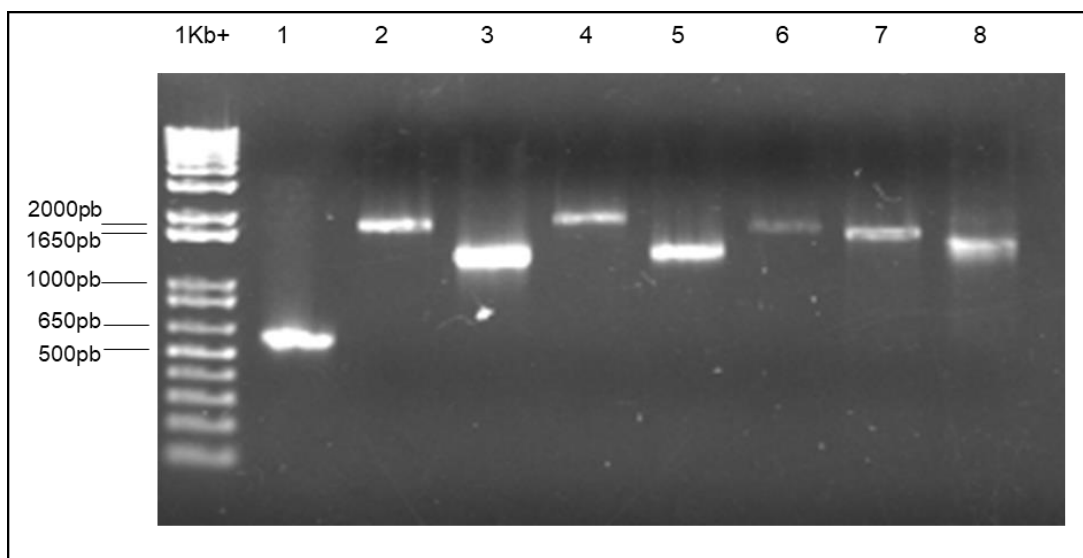


Figura 4.11 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das amplificações por PCR do genoma completo do ZIKV, cepa ZV BR 2015/15098. A amplificação específica dos fragmentos de DNA correspondentes ao genoma viral está indicada nas linhas 1 a 8. Linha 1: Produto de PCR de 578pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK3 e ZIK4. Linha 2: Produto de PCR de 1.732 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK7 e ZIK12. Linha 3: Produto de PCR de 1.846 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK15 e ZIK18. Linha 4: Produto de PCR de 1.315 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK19 e ZIK20. Linha 5: Produto de PCR de 1.266 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK11 e ZIK14. Linha 6: Produto de PCR de 1.686 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK23 e ZIK24. Linha 7: Produto de PCR de 1.433 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK31 e ZIK fim. Linha 8: Produto de PCR de 1.569 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores e ZIK27 e ZIK28.

Assim, através da análise do sequenciamento genômico da cepa ZV BR 2015/15098 presente no soro do paciente evidenciamos a presença de uma única mutação não conservativa (glutamato (E) no resíduo 121 do domínio protease da proteína NS3 (NS3₁₂₁), quando comparada com o genoma da mesma cepa após isolamento em cérebro de camundongo, que possuía um resíduo de aminoácido glicina (G) na mesma posição.

O alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas da região codificadora da proteína NS3 dos ZIKV nos permitiu identificar o alto grau de conservação do resíduo de aminoácido glicina na posição NS3₁₂₁ entre as cepas das linhagens africanas e asiáticas de ZIKV disponíveis no GenBank (Figura 4.12).

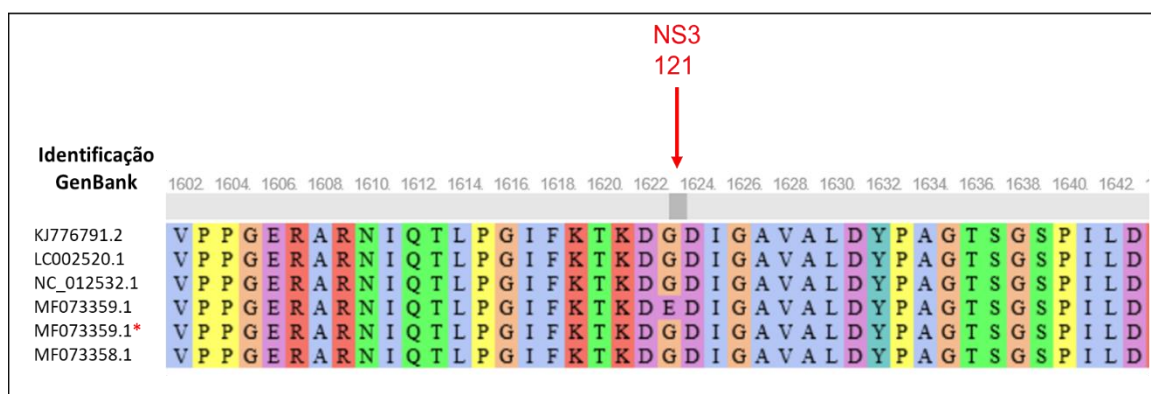


Figura 4.12 - Representação do alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos na região de sítio ativo do domínio NS3 protease do ZIKV. A identificação das sequências do GenBank correspondendo as cepas H/PF/2013 genótipo asiático (KJ776791.2), MR766-NIID genótipo africano (LC002520.1), MR 766 genótipo africano (NC_012532.1), ZV BR 2015/15098 genótipo asiático (MF073359.1), cepa ZV BR 2015/15098 mutada de genótipo asiático (MF073359.1*), cepa ZV BR 2015/15261 genótipo asiático (MF073358.1). Os números indicam a posição do resíduo de aminoácido na poliproteína viral. A substituição glutamato (E) na posição 121 da proteína está identificada pela seta.

A representação estrutural da região de sítio ativo da NS3 protease do ZIKV, baseada na estrutura cristalográfica da proteína quimérica NS2B-NS3 (PDB: 5GXJ), evidencia a proximidade do resíduo de aminoácido NS3₁₂₁G com a tríade catalítica (His₅₁, Asp₇₅ e Ser₁₃₅) do domínio da NS3 protease (Figura 4.13). A substituição do resíduo de aminoácido de caráter polar carregado negativamente (ácido glutâmico) pelo resíduo de aminoácido alifático não polar (glicina) sugere provável alteração de carga na superfície da molécula. Dessa forma, a fim de avaliarmos o papel pontual do resíduo de aminoácido NS3₁₂₁E na modulação do *fitness* viral do ZIKV, decidimos utilizar a tecnologia de genomas infecciosos para caracterizar *in vitro* a habilidade infectiva dos vírus recombinantes obtidos (parental e mutante).

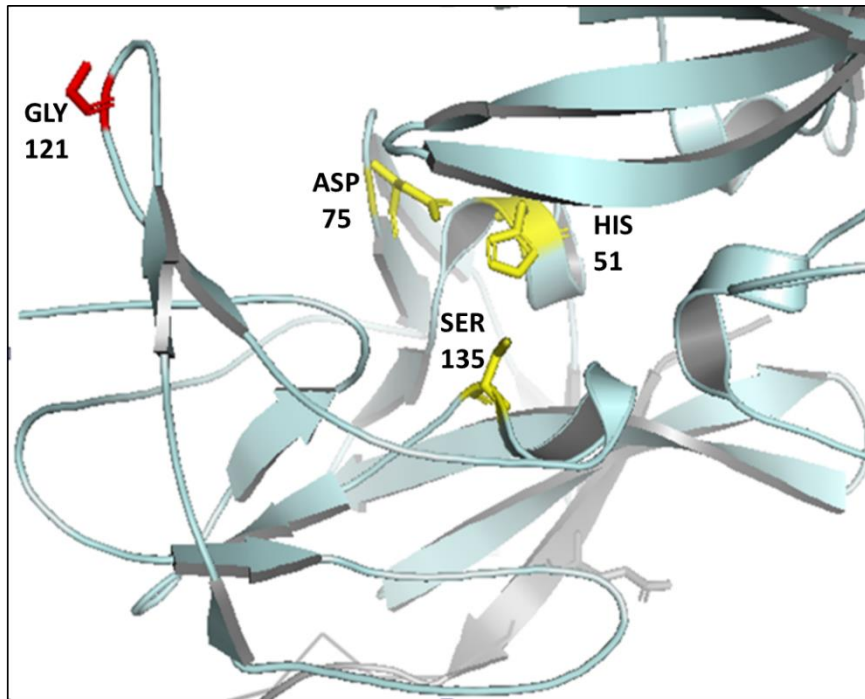


Figura 4.13 - Representação estrutural da proteína NS2B-NS3 protease de ZIKV (PDB: 5GXJ). Imagem evidenciando a região da tríade catalítica caracterizada pelos resíduos de aminoácidos histidina (His) na posição 51, ácido aspártico (Asp) na posição 75 e serina (Ser) na posição 135, todos representados em amarelo. Em vermelho está indicado a posição do resíduo de aminoácido Glicina (Gly) na posição 121 da proteína NS3.

4.3 Obtenção de genomas infecciosos de ZIKV através do método de infecção de amplicons subgenômicos (ISA) para estudo da mutação NS3₁₂₁E

Com o intuito de avaliar o efeito da substituição não-conservativa GNS3₁₂₁E na modulação do *fitness* do ZIKV *in vitro*, utilizamos a tecnologia de ISA, desenvolvida pelo grupo do Dr. Philippe Desprès, para obtenção de ZIKV recombinantes da linhagem africana MR 766 NIID (número de acesso no GenBank LC002520).

Para obtenção do vírus parental recombinante (ZIKV MR766_{wt}), os clones recombinantes denominados pUC57-Z1 a Z4 foram utilizados como molde para a amplificação de 4 fragmentos de DNA que compreendem o genoma completo do ZIKV MR766 (Figura 4.14).

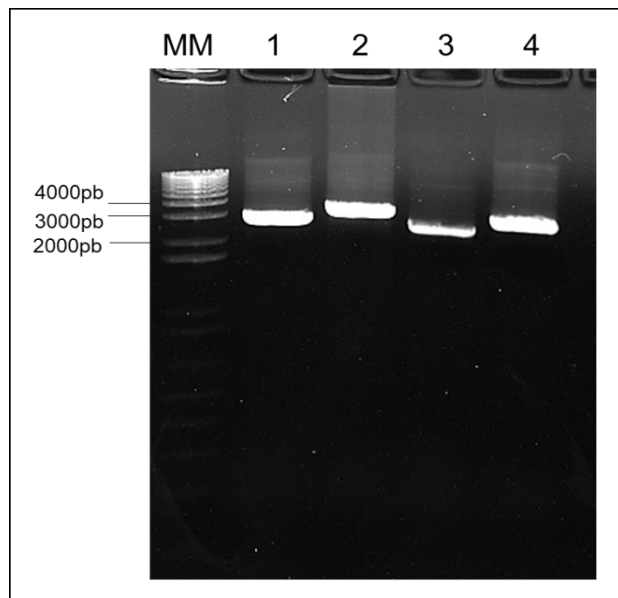


Figura 4.14 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% dos quatro fragmentos amplificados por PCR correspondente ao genoma completo de ZIKV MR766. Linha 1: Produto de PCR de 2.842 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores Z1F e Z1R correspondente ao fragmento Z1. Linha 2: Produto de PCR de 3.407 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores Z2F e Z2R correspondente ao fragmento Z2. Linha 3: Produto de PCR de 2.622 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores Z3F e Z3R correspondente ao fragmento Z3. Linha 4: Produto de PCR de 2.949 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores Z4F e Z4R correspondente ao fragmento Z4.

Para obtenção do ZIKV MR766 mutante (MR766_{121Mut}), primeiramente, o clone Z2 foi utilizado como molde para a reação de PCR mutagênica (Agilent) e geração do clone recombinante Z2mut, contendo a substituição nucleotídica que codifica para o resíduo de aminoácido ácido glutâmico na posição 121 da proteína NS3 (Figura 4.15). Posteriormente, o clone recombinante resultante denominado pUC57-Z2mut foi utilizado como molde para a amplificação por PCR do fragmento de DNA denominado Z2mut (Figura 4.15). A amplificação dos demais fragmentos (Z1, Z3 e Z4) está representada na figura 4.14.

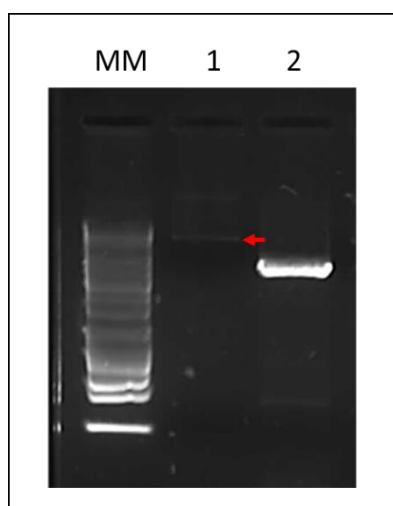


Figura 4.15 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% do DNA recombinante Z2mut de ZIKV MR766. Linha 1. Plasmídeo Z2 MR766 evidenciado com a seta, sendo utilizado como molde de amplificação por PCR. Linha 2. Fragmento Z2mut amplificado por PCR.

A combinação dos fragmentos de DNA amplificados foi utilizada para eletroporação em células Vero e recuperação dos vírus recombinantes MR766_{wt} e MR766_{121Mut}, de acordo com o protocolo descrito por Gadea e colaboradores (2014). Os parâmetros resultantes da eletroporação dos fragmentos Z1, Z2, Z3 e Z4, para geração do vírus MR766_{wt}, no primeiro pulso foram 0.6 ms e 148 V e no segundo pulso foram 1.9 ms e 432 V. Os parâmetros resultantes da eletroporação dos fragmentos Z1, Z2mut, Z3 e Z4, para geração do vírus mutante MR766₁₂₁, no primeiro pulso foram 1.0 ms e 351 V e no segundo pulso foram 2.8 ms e 925 V. Imediatamente após a eletroporação, as células foram transferidas para garrafas de cultivo celular e mantidas sob as condições ideais por 5 dias. No 5º dpi o volume total do sobrenadante das culturas de células foi utilizado para amplificação viral em uma nova cultura de células Vero. As células foram observadas diariamente para monitoramento do aparecimento de CPE, utilizando como parâmetro as células Mock. O aparecimento de CPE nas culturas de células infectadas com o ZIKV MR766_{wt} foi evidenciado 4 dpi. No entanto, a infecção pelo ZIKV MR766₁₂₁ induziu a formação de CPE em células Vero no 5º dpi. O sobrenadante das passagens 1 (P1) dos vírus foi recuperado e utilizado para uma nova infecção em células Vero. As partículas virais infecciosas presentes no sobrenadante das culturas celulares da P2 infectadas com os vírus MR766_{wt} e MR766_{121Mut} foram quantificadas pela técnica de titulação viral por formação de placa em células Vero, apresentando títulos de $1,5 \cdot 10^6$ pfu/mL e $2,25 \cdot 10^3$ pfu/mL, respectivamente. A MOI de 0,01 foi utilizada para infecção dos ZIKV recombinantes em células Vero e geração do estoque viral de trabalho (P3), a fim de produzir

quantidades suficientes de vírus de mesmo lote para realização dos experimentos de caracterização das cepas recombinantes. Assim, o título viral da P3 dos vírus MR766_{wt} e MR766₁₂₁ em células Vero foi de $2,75 \cdot 10^5$ pfu/mL e $8,25 \cdot 10^3$ pfu/mL, respectivamente.

Após a produção dos estoques virais, foi realizada a extração de RNA viral do sobrenadante da cultura infectada com o vírus MR766_{121Mut} e síntese de cDNA para amplificação por PCR do genoma do ZIKV recombinante (Figura 4.16). A sequência genômica do vírus apresentou apenas a mutação em estudo, não apresentando outras mutações aleatórias.

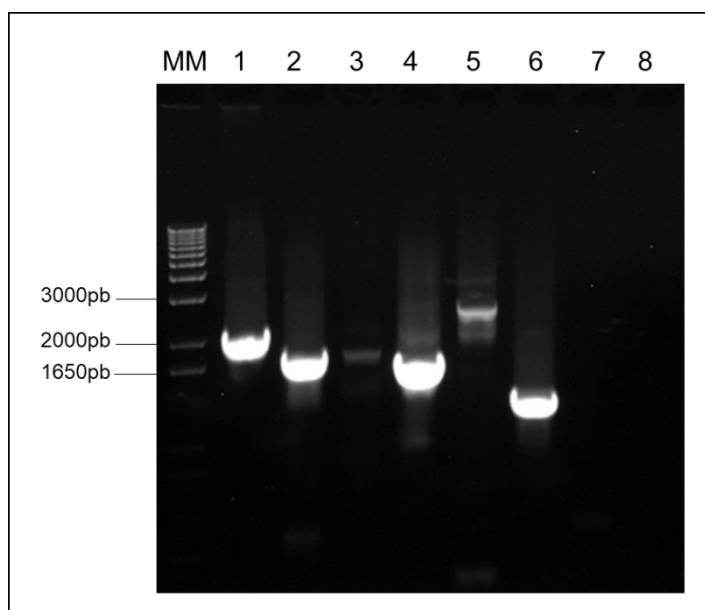


Figura 4.16 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% das amplificações por PCR do genoma completo do ZIKV recombinante, cepa UG47_{121Mut}. Linha 1: Produto de PCR de 2.066 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 35 e ZIK 8. Linha 2: Produto de PCR de 1.736 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 8 e ZIK 14. Linha 3: Produto de PCR de 1.745 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 15 e ZIK 22. Linha 4: Produto de PCR de 1.653 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 21 e ZIK 20. Linha 5: Produto de PCR de 2.500 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 23 e ZIK 26. Linha 6: Produto de PCR de 1.293 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 29 e ZIK 38. Linha 7: Produto de PCR de 1.578 pb amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores ZIK 39 e ZIK 36. Linha 8: Controle negativo de reação (Branco) utilizando os primers ZIK 35 e ZIK 8.

4.4 Avaliação e caracterização biológica dos ZIKV recombinantes

Os vírus recombinantes gerados pela técnica de ISA foram utilizados para infectar as linhagens celulares C6/36, Huh7.5 e Vero com MOI de 10 e, assim, avaliar o papel do resíduo de aminoácido NS3_{121E} na modulação da infectividade do ZIKV, no contexto genômico da cepa africana de ZIKV. A porcentagem de células infectadas

foi determinada 48 hpi e 72 hpi em um microscópio óptico de aquisição automatizada de imagem (Operetta). Dessa forma, foi possível evidenciar que o ZIKV recombinante MR766_{wt} apresenta maior capacidade de infectar as células de mamíferos da linhagem Huh 7.5 e Vero, em comparação com o ZIKV MR766_{121Mut} (Figuras 4.17 e 4.18). É importante ressaltar que a figura 4.17B ilustra um único foco de infecção do vírus mutante MR766_{121Mut} nos poços triados da linhagem de células Vero. Nota-se que a expressão da proteína E dos ZIKV recombinantes é mais produtiva em células Huh7.5 do que em células Vero. Adicionalmente, sob as condições experimentais utilizadas, não identificamos a presença de proteína viral E em células C6/36 submetidas à infecção pelos ZIKV recombinantes (Figura 4.19).

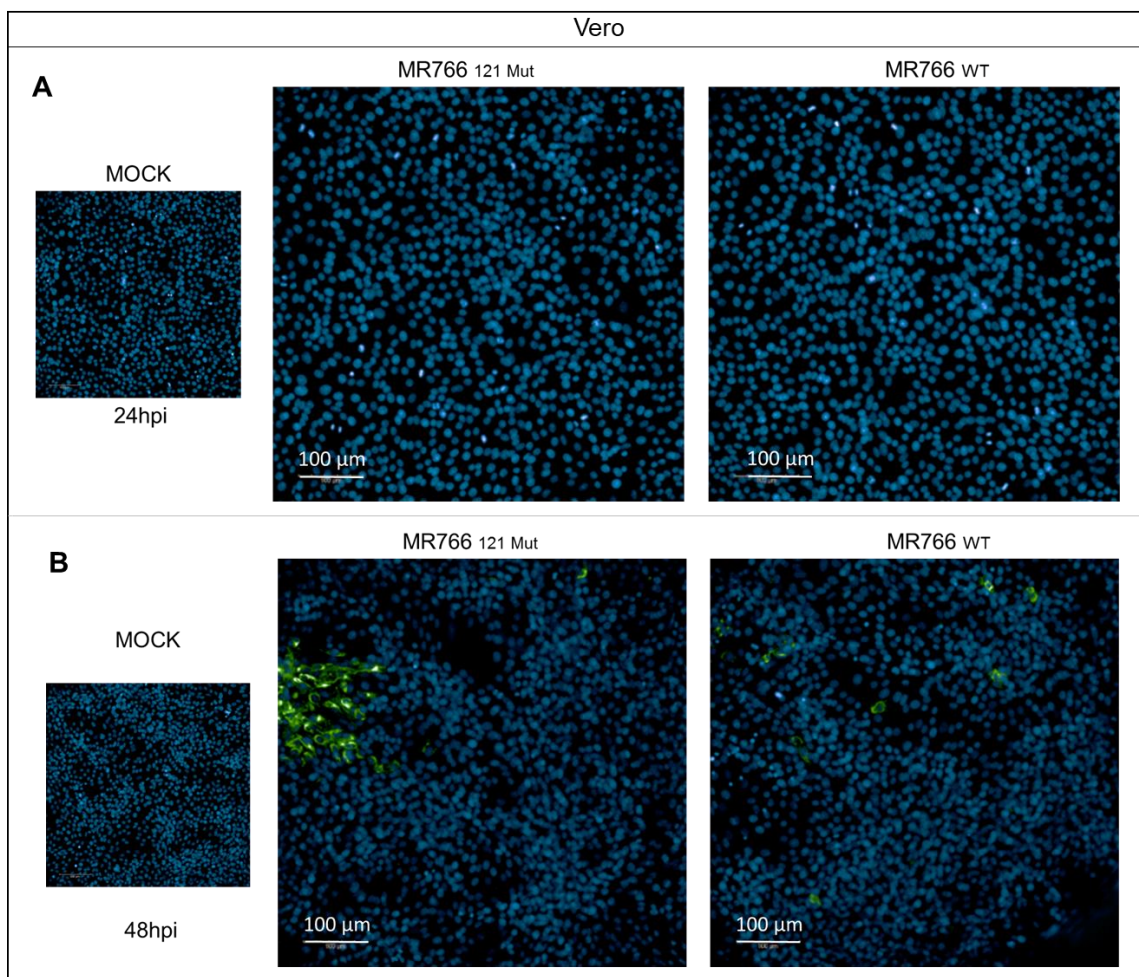


Figura 4.17 - Análise comparativa da reação de imunofluorescência em células Vero infectadas com os vírus recombinantes MR766_{121Mut} e MR766_{WT} e Mock (controle não infectado). Culturas celulares infectadas com MOI de 10 marcadas com anticorpo 4G2, anticorpo anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (em verde) e DAPI (em azul) nos tempos de 24 hpi (A) e 48 hpi (B). Visualização pelo programa Harmony no equipamento High content imaging (Operetta CLS). Aumento de 200x e barra equivalente a 100 μm.

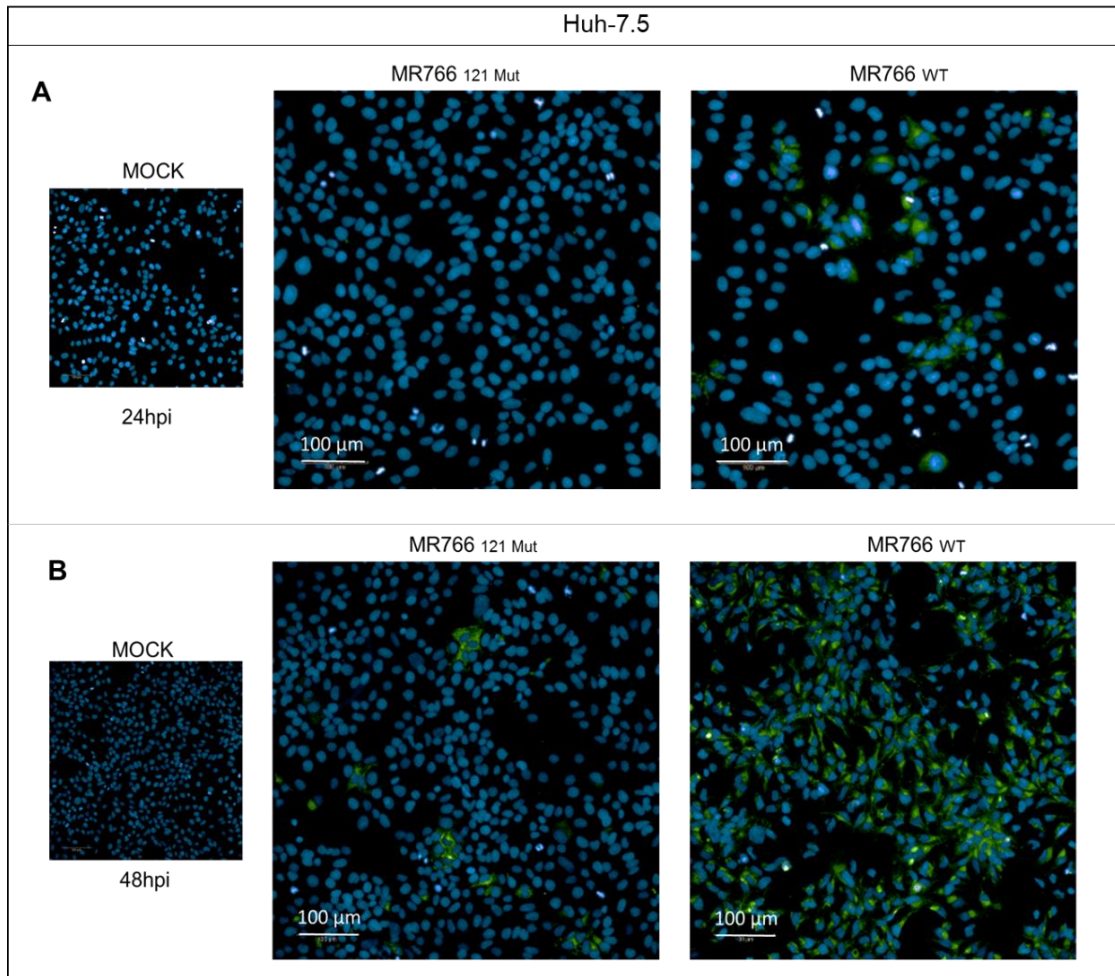


Figura 4.18 - Análise comparativa da reação de imunofluorescência em células Huh-7.5 infectadas com os vírus recombinantes MR766_{121Mut} e MR766_{WT} com 10MOI e Mock (controle não infectado). Culturas celulares infectadas com MOI de 10 marcadas com anticorpo 4G2, seguido de anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (em verde) e DAPI (em azul) nos tempos de 24hpi (**A**) e 48hpi (**B**). Visualização pelo programa Harmony no High content image Operetta CLS. Aumento de 200x e barra equivalente a 100 μm.

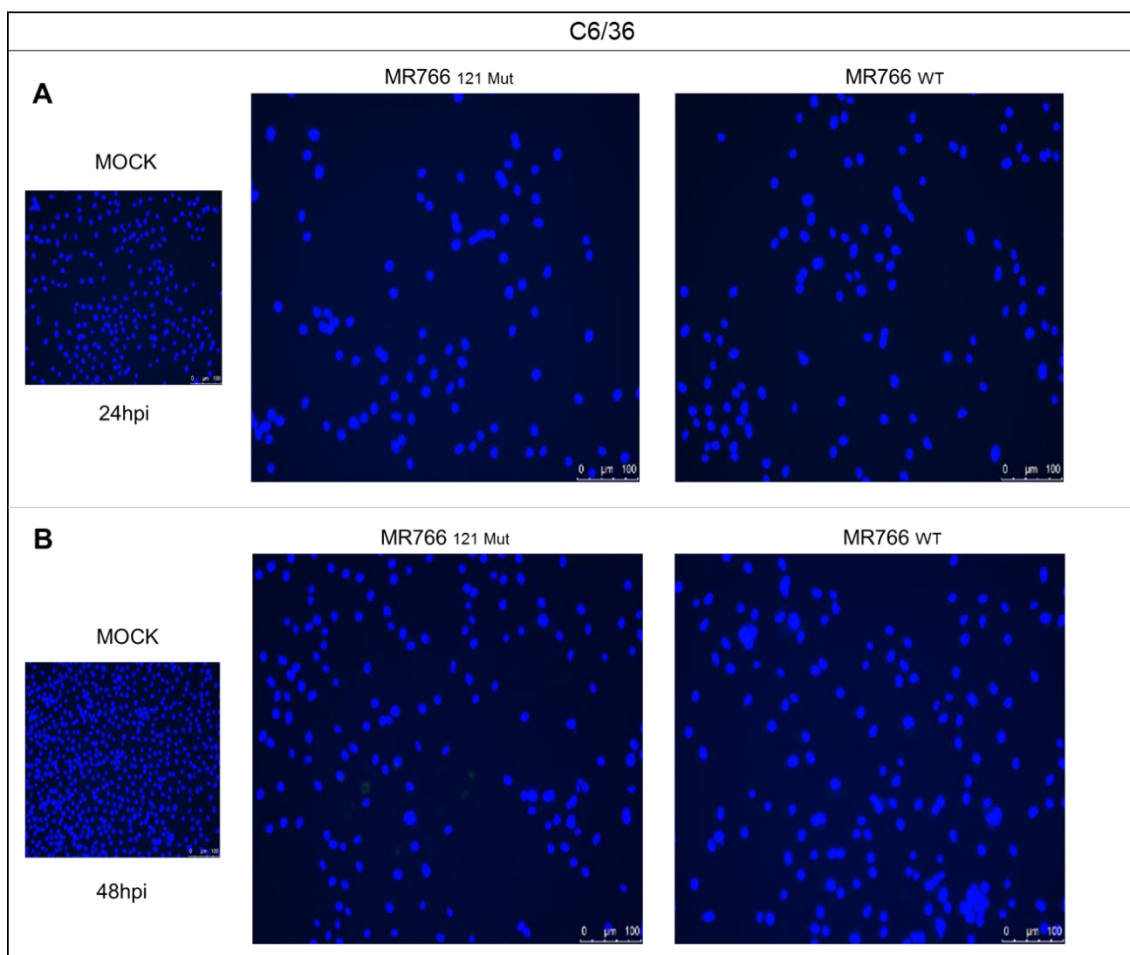


Figura 4.19 - Análise comparativa da reação de imunofluorescência em células C6/36 infectadas com os vírus recombinantes MR766_{121Mut} e MR766_{wt} e Mock (controle não infectado). Culturas celulares infectadas com MOI de 10 marcadas com anticorpo 4G2, seguido de anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (em verde) e DAPI (em azul) nos tempos de 24hpi (A) e 48hpi (B). Visualização pelo programa Leica do microscópio de deconvolução com a objetiva de 20x.

A análise quantitativa das células Huh7.5 positivas para a proteína E do ZIKV demonstrou redução significativa no número de células infectadas pelo ZIKV mutante MR766_{121Mut}, quando comparada com a infecção pelo ZIKV parental MR766_{wt} nos tempos de 48hpi e 72hpi (Figuras 4.18 e Figura 4.20). Em contraste, não se observou diferença significativa na porcentagem de células Vero infectadas pelos vírus MR766_{121Mut} e MR766_{wt} 48 hpi (Figura 4.20 A). No entanto, essa diferença foi evidenciada 72 hpi, quando 4,26% das células Vero estavam infectadas pelo vírus MR766_{wt} e 0,28% das células infectadas pelo vírus mutante (Figura 4.20 A).

Adicionalmente, conforme mostrado nas figuras 4.10 C e D, podemos verificar que a presença da mutação NS3_{121E} induziu modificação no fenótipo de placa em células Vero, indicando potencial modificação na virulência. O tamanho de placa do ZIKV MR766_{121Mut} apresentou-se ligeiramente reduzido em comparação com o ZIKV MR766_{wt}.

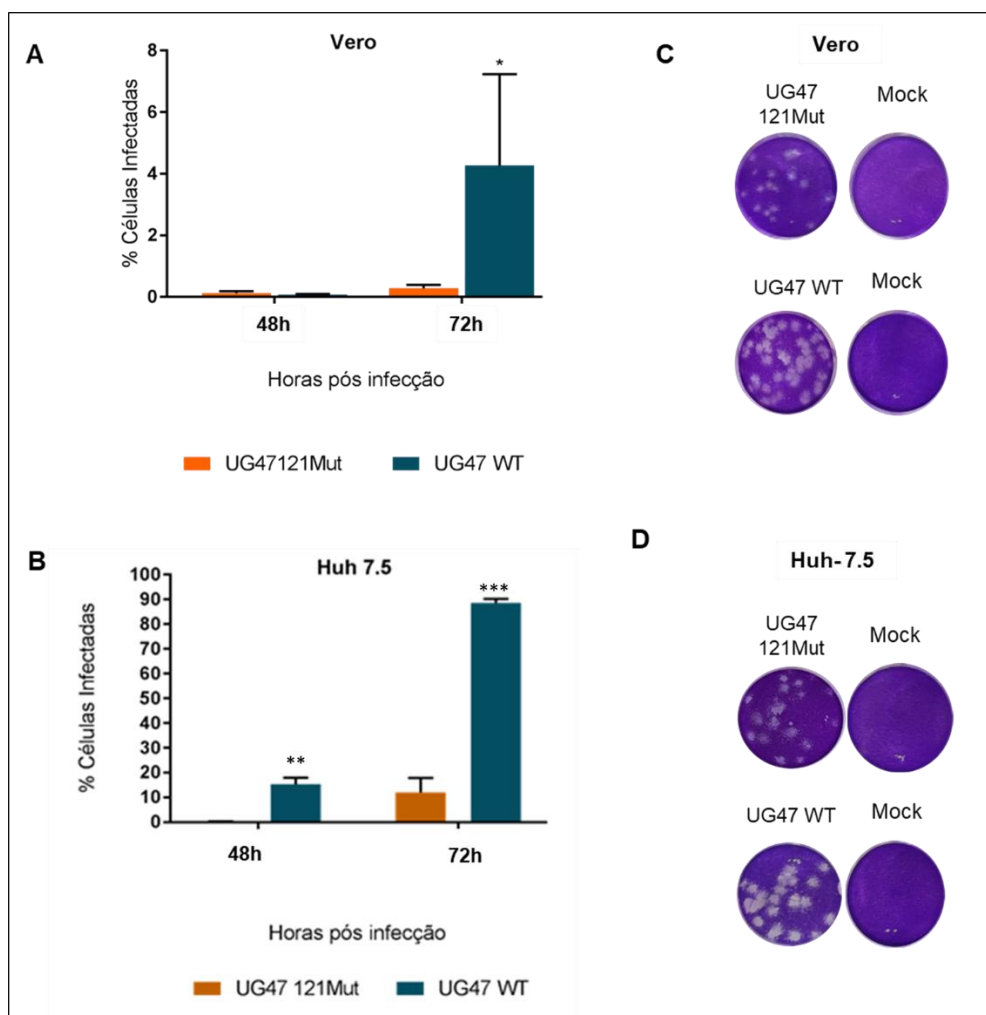


Figura 4.20 - Perfil infectivo dos ZIKV recombinantes MR766_{121Mut} e MR766_{WT} em células de mamífero. **A.** Análise quantitativa da porcentagem de infecção por imunofluorescência (análise pelo programa Harmony - Operetta CLS) em linhagem celular Vero. As células foram infectadas com as cepas MR766_{121Mut} e MR766_{WT} (10 MOI) e avaliadas nos tempos de 48 hpi e 72 hpi. **B.** Análise quantitativa da porcentagem de infecção em linhagem celular Huh7.5 (análise pelo programa Harmony - Operetta CLS) infectada com as cepas MR766_{121Mut} e MR766_{WT} com 10 MOI e avaliadas nos tempos de 48 hpi e 72 hpi. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados analisados usando o teste two-way ANOVA (GraphPad). Em A * $p \leq 0,05$ e em C ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$. **C** e **D.** Morfologia de placa dos vírus recombinantes MR766_{121Mut} e MR766_{WT} em células Vero e o respectivo controle negativo de infecção (MOCK). Os sobrenadantes provenientes das infecções de A e C foram utilizados para determinação do título viral (dados expressos na tabela 4.1) e morfologia de placa pela técnica de titulação viral por placa (PFU).

A determinação do título viral demonstrou que ambos os vírus são capazes de promover infecção produtiva nas linhagens celulares Huh7.5 e Vero. No entanto, o ZIKV MR766_{WT} apresenta capacidade superior na produção de progênie viral em relação a capacidade do vírus MR766_{121Mut} gerar partículas infectivas, em ambas as células de mamífero avaliadas. Conforme mostrado na tabela 4.1, os títulos virais de ambos os ZIKV recombinantes foram consideravelmente menores em células Vero em comparação aos títulos virais obtidos da infecção de células Huh-7.5. Como não

identificamos presença de proteína E viral nas células C6/36 infectadas com os vírus recombinantes, o sobrenadante das culturas de células não foi avaliado pela técnica de titulação viral.

Tabela 4.1 - Análise comparativa dos sobrenadantes das linhagens Vero e Huh-7.5 infectados com os vírus recombinantes MR766_{121Mut} e MR766_{WT} nos tempos de 24hpi e 48hpi. Dados obtidos através da determinação do título viral pela titulação viral por placa de lise.

		MR766 _{121 Mut} (P3)	MR766 _{WT} (P3)
Vero	24hpi	ND	3,4. 10 ² pfu/mL
	48hpi	0,58. 10 ² pfu/mL	2. 10 ⁵ pfu/mL
Huh-7.5	24hpi	1,6. 10 ³ pfu/mL	4. 10 ⁵ pfu/mL
	48hpi	6,8. 10 ⁴ pfu/mL	1,2. 10 ⁸ pfu/mL

ND: Não detectável para o vírus MR766_{121Mut}

Após avaliar a habilidade infectiva dos vírus recombinantes em linhagens de células de mamífero, evidenciando que a mutação NS3_{121E} modula negativamente a infectividade do ZIKV, decidimos verificar o efeito dessa mutação na modulação do *fitness* viral no modelo de infecção de células primárias humanas, utilizando células dendríticas derivadas de monócitos humanos (humdDCs). Dessa forma, realizamos a infecção dos vírus recombinantes MR766_{WT} e MR766_{121Mut} em humdDC derivadas de três doadores saudáveis, tendo como controle positivo de infecção a cepa ZV BR 2015/15261 (Strottmann et al, 2019). A homogeneidade das culturas e a análise da porcentagem de células infectadas foi avaliada por citometria de fluxo (FACS) em uma cinética de infecção nos tempos de 24 hpi, 48 hpi e 72 hpi. As características celulares foram definidas com base nas células não infectadas (Mock) de cada doador, avaliando-se a morfologia, tamanho e granulosidade (FSC/SSC) (Figura 4.21 A). A análise da expressão dos marcadores de superfície das três culturas de humdDCs, demonstrou que mais de 95% das células em cultura eram negativas para CD14 e positivas para o marcador CD11c (dados não mostrados), confirmando a diferenciação dos monócitos em DCs e a pureza das culturas.

Conforme demonstrado na figura 4.21 B, os ZIKV recombinantes da linhagem africana MR766_{WT} e MR766_{121Mut} não foram capazes de infectar humdDC nos tempos de 24 e 48 hpi. Em contraste, o isolado brasileiro da cepa asiática de ZIKV (ZV BR 2015/15261) apresentou porcentagem de infecção média de 6,03% em humdDC no tempo de 48 hpi. Adicionalmente, através da técnica de titulação viral não foi possível

detectar a presença de partículas virais infectivas no sobrenadante das três culturas de humdDCs infectadas com os vírus recombinantes MR766_{wt} e MR766_{121Mut}, diferentemente do isolado viral brasileiro ZV BR 2015/15261 (tabela 4.2) que apresentou título médio de $2,3 \cdot 10^4$ pfu/mL.

Tabela 4.2 - Análise comparativa do título viral presente no sobrenadante de diferentes culturas de humdDC infectadas com os vírus ZV BR 2015/15261, MR766_{121Mut} e MR766_{WT} no tempo de 24 hpi. Dados obtidos através da determinação do título viral pela titulação viral por placa (PFU). ND: Não determinado

	mdDC doador 1	mdDC doador 2	mdDC doador 3
ZK BR 2015/15261	$2 \cdot 10^4$ pfu/mL	$2,6 \cdot 10^4$ pfu/mL	$2,4 \cdot 10^4$ pfu/mL
MR766 121 Mut	ND	ND	ND
MR766 WT	ND	ND	ND

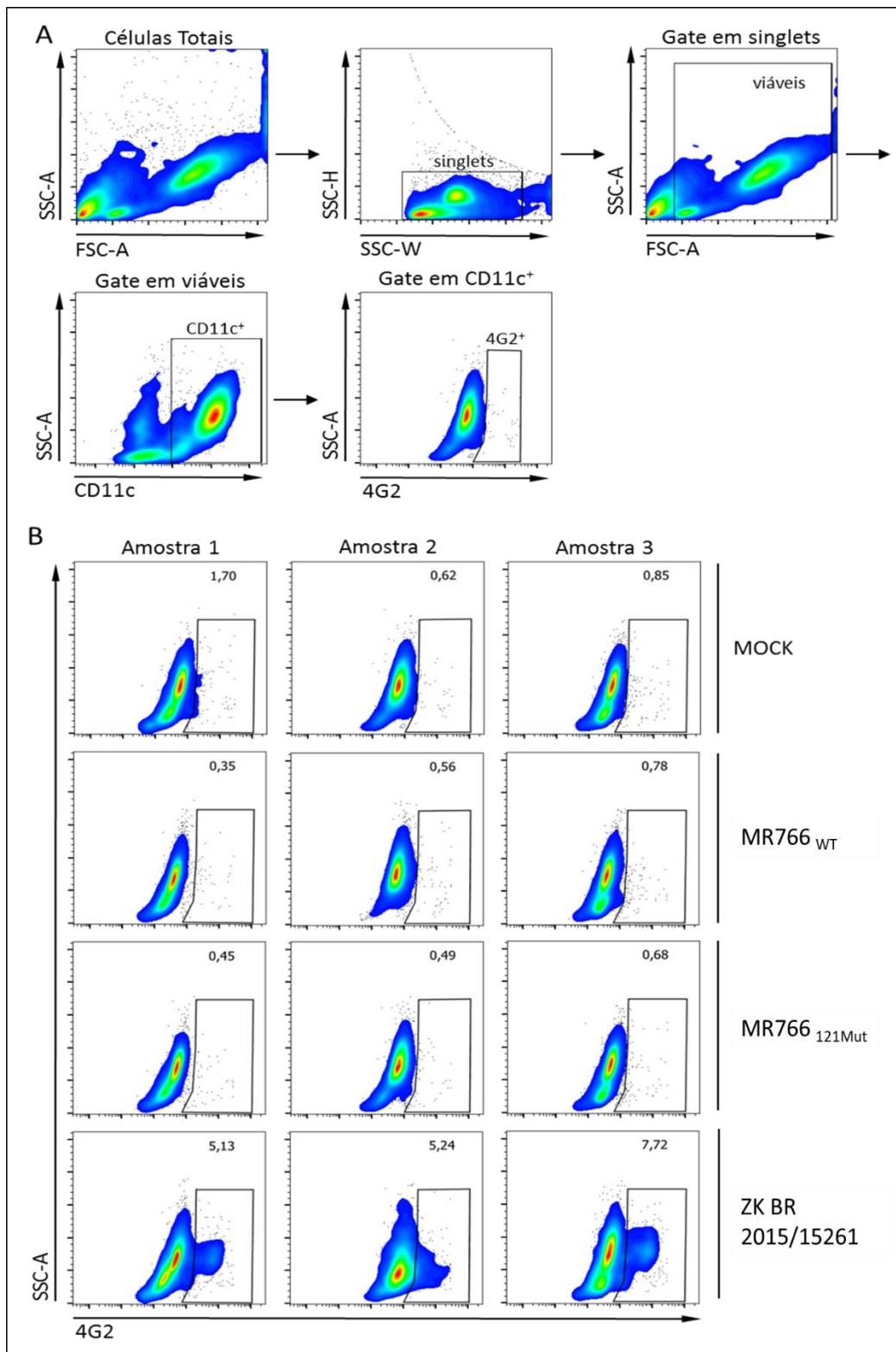


Figura 4.21 - Células dendríticas humanas não são permissivas a infecção com os ZIKV recombinantes MR766_{WT} e MR766_{121Mut}. As células humdDCs (CD14-/CD11c+) foram infectadas com os vírus recombinantes (MOI 1) e a porcentagem de infecção (4G2+) avaliada no tempo de 48 hpi por citometria de fluxo (FACSCanto II). **A.** Gráficos representativos da estratégia de *gate* utilizada para análises. **B.** Gráficos representativos da porcentagem de infecção de três doadores (amostra 1, 2 e 3) com os diferentes ZIKV. O isolado clínico ZV BR 2015/15261 foi utilizado como controle positivo de infecção e o sobrenadante de cultura de células Vero utilizado como controle negativo da infecção (Mock).

5. DISCUSSÃO

Atualmente, as arboviroses representam uma das principais preocupações em saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do globo, acometendo milhares de indivíduos a cada ano (WHO, 2016; Higuera & Ramírez, 2019). Nas últimas décadas, diversos arbovírus emergiram a partir de biomas naturais e adquiriram habilidade de infectar hospedeiros humanos (Weaver et al, 2016). Diversos fatores têm contribuído, por exemplo, para a emergência de novos flavivirus com alto potencial epidêmico; podemos citar especialmente as modificações demográficas, ambientais e ecológicas que facilitam a capacidade de dispersão populacional de vetores e hospedeiros, além dos fatores virais que contribuem para a variabilidade genética e surgimento de cepas mais virulentas. Nesse contexto, podemos exemplificar o ZIKV que após emergir em Uganda (África) permaneceu por muitos anos com discreta relevância na medicina tropical devido ao baixo impacto clínico e epidemiológico. No entanto, após ser introduzido no Brasil no ano de 2015 (Zanluca et al., 2015), tornou-se epidêmico. Os determinantes de virulência intrínsecos aliados a ausência de imunidade adquirida da população brasileira, a ampla ocorrência dos vetores transmissores e a propagação do vírus via sexual são alguns dos fatores que contribuíram para a rápida dispersão do vírus nas Américas. Estudos filogenéticos demonstraram que as duas linhagens do ZIKV (africana e asiática) evoluíram de forma independente e adquiriram alterações genéticas que garantiram vantagem seletiva para a adaptação do vírus a novos hospedeiros (Gubler; Vasilakis; Musso, 2017; Zhu et al., 2016); essas alterações podem estar relacionadas com os diferentes desfechos clínicos observados pela infecção do ZIKV no hospedeiro humano. Tendo em vista que a determinação de marcadores moleculares de virulência/atenuação pode agregar conhecimento a biologia viral, nortear o desenvolvimento de vacinas e permitir que estratégias antivirais sejam desenvolvidas, decidimos investir no desenvolvimento de genomas infecciosos e subgenômicos de ZIKV para o estudo de determinantes genéticos de virulência.

Com base na sequência genômica do isolado clínico da cepa brasileira, ZV BR 2015/15261 (isolada e sequenciada em nosso laboratório), utilizamos o sistema bacteriano para a construção de um clone de cDNA infeccioso e replicon subgenômico do ZIKV; devido a experiência exitosa prévia na obtenção do clone infeccioso de DENV-1 e DENV-3 em um cromossomo artificial de bactéria (pBAC) pela equipe do nosso laboratório (Suzuki et al. 2007, Mosimann et al., 2010). Assim, fragmentos

sintéticos de DNA referentes a sequência genômica do ZIKV foram obtidos para possibilitar a inserção dos segmentos no vetor de única cópia pBAC e montagem do clone infeccioso de ZIKV. O pBACDV1poly (SUZUKI et al., 2007) utilizado neste estudo para a montagem dos genomas infecciosos e subgenômicos de ZIKV está sob controle da sequência promotora T7 RNA polimerase. Inicialmente, obtivemos sucesso na clonagem do primeiro segmento de DNA, denominado E1, que continha a sequência que codifica para as proteínas C, prM e parte de E, seguida de um polilinker contendo sítios para endonucleases de restrição específicas, a sequência codificante da porção final do genoma (final da sequência de NS5 e 3'UTR), seguida pela sequência da ribozima do vírus da hepatite delta. Como mostram os resultados de Márquez-Jurado e colaboradores em 2018, o uso da ribozima apresenta-se satisfatório para a obtenção de clone infecciosos de ZIKV com extremidade 3'UTR autêntica. Posteriormente, realizamos a clonagem do segmento E2, que continha a sequência que codifica para as proteínas E, NS1, NSA/B e a porção inicial de NS3. A verificação por sequenciamento nucleotídico demonstrou a correta clonagem e a ausência de mutações espúrias no clone pBACE1/E2 obtido. No entanto, apesar de diversas tentativas, não conseguimos clonar o fragmento E3, correspondente a sequência codificadora NS4A/B e parte da NS5 de ZIKV, no vetor pBAC contendo as sequências E1/E2. Diante desta dificuldade metodológica, realizamos uma estratégia alternativa visando a inserção do segmento E3 no vetor pBAC/ E1 e, posteriormente, a inserção do segmento de DNA E2. Contudo, o único clone positivo resultante, apresentou um tamanho de fragmento de DNA inferior ao tamanho da sequência do segmento E3 após a digestão com as enzimas BamHI e BstBI (dados não mostrados). Vários trabalhos relataram dificuldade na obtenção de clones infecciosos de flavivirus (Rice et al., 1989; Shi et al., 2002; Blaney Jr. et al., 2004a; Pierro et al., 2006) devido a instabilidade dos fragmentos alvos, ocasionada por mutações ou mesmo deleções nos genes de interesse (Aubry et al., 2015). O trabalho de Pu et al., 2011, avaliou a relação entre a toxicidade e possíveis promotores crípticos de *E. coli*, e observou que certas mutações na porção central do genoma de DENV favorecem a obtenção de clones infecciosos. Uma alternativa para contornar o eventual problema de instabilidade do clone seria a utilização de linhagens de *E. coli* que possuam um sistema com menor taxa de recombinação ou realizar a fragmentação da sequência de DNA correspondente ao segmento E3 para facilitar a clonagem dessa região do genoma do ZIKV no pBACE1/E2. Essa alternativa foi utilizada por Shan e colaboradores (2016), na qual cinco fragmentos de DNA correspondentes do genoma do ZIKV foram

utilizados para a inserção sequencial das sequências que codificam para a região 5' UTR e as proteínas NS4B, NS5 no pACYC177. Por fim, estudos sugerem diversas abordagens que futuramente poderemos utilizar para contornar o problema na montagem do clone infeccioso de ZIKV, tais como a inserção de repetições em tandem a montante de sequências virais (Pu et al., 2014), mutação de sequências promotoras procarióticas putativas (Pu et al., 2011), divisão do genoma viral em vários plasmídeos (Rice et al., 1989) e inserção de íntrons no genoma viral (Johansen, 1996).

Dada a dificuldade na montagem do clone infeccioso de ZIKV, iniciamos a construção do replicon subgenômico de ZIKV, tal ferramenta possibilita o estudo da replicação do genoma isoladamente da morfogênese viral (Kümmerer, 2018). Dessa forma, a estratégia de construção do replicon de ZIKV consistiu na substituição de parte das sequências que codificam para as proteínas estruturais, previamente inserida no clone pBACE1/E2, pelo segmento de DNA E4. O segmento E4 era composto pela porção N-terminal da proteína C, adjacente a porção da proteína E e a proteína NS1, que são os elementos necessários para garantir a eficiência da replicação do RNA e o correto endereçamento e processamento da poliproteína viral (Chambers et al., 1990; Khromykh; Westaway, 1997; Lindenbach; Rice, 2001). Posteriormente, com o sucesso da inserção do gene sintético E4, livre de qualquer mutação espúria, conseguimos inserir o último fragmento E3 no vetor pBACE1/E2/E4. A clonagem dos fragmentos de DNA no vetor pBAC foi obtida através da utilização da cepa bacteriana EPI 300, que diminui a recombinação gênica. O sucesso na clonagem do fragmento E3 no vetor pBACE1/E2/E4 parece estar vinculado ao fato da ausência da sequência que codifica para as proteínas estruturais do ZIKV, sugerindo a diminuição da toxicidade de sequência; tal observação está de acordo com o trabalho de Shi e colaboradores (2002). O trabalho relata a instabilidade e a toxicidade das sequências referentes aos genes de prM-E-NS1 de WNV, resultando na instabilidade durante a propagação em *E. coli*. No entanto, a determinação da sequência completa do replicon de ZIKV obtido necessita ainda ser avaliada para que possamos avançar com os estudos de caracterização e replicação viral.

Outra problemática abordada neste estudo consistiu na avaliação genotípica de ZV BR 2015/15098 a partir do soro virêmico de um paciente que apresentou sintomas brandos de infecção pelo ZIKV, durante a epidemia de 2015. Assim, identificamos a presença de uma única mutação na posição 121 da proteína NS3 ao compararmos a sequência genômica da cepa ZV BR 2015/15098 presente no soro do

paciente (NS3₁₂₁E) e na suspensão viral obtida a partir da inoculação soro virêmico no SNC de camundongo neonatos (NS3₁₂₁G), . A presença do resíduo de aminoácido NS3₁₂₁E parece estar potencialmente envolvida na restrição da infecção desta cepa viral em cultura de células de mamífero e de inseto, uma vez que o isolado contendo o resíduo De aminoácidoNS3₁₂₁G, conferiu ao ZIKV habilidade para infectar linhagens de células C6/36 e Vero E6 (Strottmann et al., 2019). A pressão seletiva em um sítio imunoprivilegiado, como o SNC de camundongos neonatos, pode ter contribuído para a seleção da variante ZV BR 2015/15098 mais virulenta, contendo a mutação NS3₁₂₁G, tal como foi evidenciado anteriormente pelo nosso grupo a seleção de cepas mais virulentas, contendo substituições aminoacídicas nas proteínas de envelope (Phe402Leu) e no domínio helicase da proteína NS3 (Leu480/Ser), durante um estudo de neuroadaptação do DENV-1 em modelo murino (Bordignon et al. 2007). Boheemen e colaboradores em 2017, demonstraram, através da análise de uma amostra clínica de um paciente que se infectou com ZIKV no Suriname, uma frequência de mutações de 1.4×10^{-4} , distribuídas entre as proteínas estruturais e não estruturas do ZIKV. O estudo reportou a alta taxa de variação genética na população de ZIKV presente no plasma de um paciente infectado. Em nosso estudo, não foi possível identificar a presença de quasiespécies na amostra clínica, devido à baixa cobertura analítica do sequenciamento.

O alinhamento das sequências de ZIKV disponíveis no GenBank nos permitiu evidenciar que a presença do resíduo de aminoácido glicina (G) na posição NS3₁₂₁ é altamente conservada entre as cepas de ZIKV e entre os demais membros do gênero *Flavivirus* (Salaemae et al. 2010). Dessa forma, visando caracterizar o impacto da presença de um resíduo de aminoácido ácido glutâmico (E) na posição 121 da proteína NS3 nas propriedades biológicas do ZIKV, utilizamos a ferramenta de amplicons subgenômicos infecciosos (ISA), desenvolvida por Gadea e colaboradores (2016) para avaliar o papel da substituição GNS3₁₂₁E no contexto do genoma viral da linhagem africana de ZIKV (cepa MR766^{NIID}). Apesar de haver 107 diferenças de aminoácidos entre a poliproteína viral do isolado brasileiro (ZV BR 2015/15098) e a cepa MR766^{NIID} (cepa asiática utilizada para a construção do clone infeccioso de ZIKV), a inserção de mutações pontuais de uma cepa viral no contexto genômico de outra cepa distinta possibilita avaliar a função biológica que tais mutações poderiam exercer na modulação da replicação e outras propriedades biológicas de um determinado grupo de vírus. Dessa forma, os ZIKV recombinantes da cepa MR766^{NIID} obtidos a partir da metodologia de ISA (referentes ao vírus parental sem mutação e

ao vírus contendo a mutação no resíduo NS3₁₂₁E) foram avaliados quanto ao seu potencial de infecção e geração de progênie viral em cultura de células. A primeira evidência de alteração no fenótipo viral entre o ZIKV recombinante parental e mutante foi a diferença observada na morfologia das placas de lise em cultura de células infectadas. O ZIKV contendo a mutação NS3₁₂₁E (MR766₁₂₁Mut) apresentou tamanho de placa menor em relação ao vírus parental. Nos ensaios de avaliação de capacidade de infecção em linhagens celulares, as células Huh7.5 e Vero foram permissivas a infecção de ambos os ZIKV recombinantes. No entanto, a expressão da proteína viral de envelope e produção de progênie viral foi mais evidente nas células da linhagem Huh7.5 infectadas com os ZIKV recombinantes, quando comparado com a linhagem de células Vero (células de rim de macaco). Esse resultado pode ser explicado devido ao fato da linhagem Huh7.5 apresentar um defeito na via de sinalização antiviral inata, permitindo o vírus se replicar mais eficientemente. Entretanto, sob as condições experimentais utilizadas, os ZIKV MR766_{wt} e MR766₁₂₁Mut não foram capazes de infectar as linhagens de células de inseto C6/36 e AP61 (dados não mostrados). Os resultados obtidos corroboram os de Vicenti e colaboradores (2018) que descreveram que as linhagens Huh7.5, Vero E6 e A549 apresentaram maior taxa de infecção e produção de partículas virais de ZIKV, em tempos mais precoces pós-infecção, quando comparada com a linhagem de células de mosquito C6/36. Os resultados dos ensaios de infectividade viral em células de mamífero, demonstram que a variante MR766₁₂₁Mut apresentou uma redução de 76% e 4% de células Huh-7.5 e Vero infectadas 48 hpi, respectivamente, quando comparado com a cepa parental (Figura 4.10). Da mesma forma, a presença da mutação NS3₁₂₁E no ZIKV MR766^{NIID} foi capaz de reduzir a produção de progênie viral em células Vero e Huh-7.5, quando comparado com a cepa parental. A localização da mutação no resíduo de aminoácido NS3₁₂₁ na estrutura tridimensional da proteína quimérica NS2B/NS3 protease do ZIKV demonstra proximidade com o sítio catalítico da NS3 protease. Os autores Valle e Falgout (1998) evidenciaram que mutações em resíduos altamente conservados adjacentes aos resíduos catalíticos da NS3 protease promovem diminuição na atividade catalítica do DENV-2. Um estudo conduzido por Salaemae et al. 2010 demonstrou que aminoácidos altamente conservados próximos a posição 121 da proteína NS3 desempenham papel na ligação com o substrato proteico do DENV. Mutações nesses sítios são capazes de modificar a interação da proteína com o substrato polipeptídico, implicando na redução da ação catalítica. Dessa forma, especulamos que a presença do resíduo de aminoácido ácido glutâmico na posição

NS3₁₂₁ poderia impactar na interação da protease com seu substrato, promovendo uma clivagem menos eficiente da poliproteína viral e, assim, reduzir os níveis de expressão das proteínas virais e, conseqüentemente, impactar na replicação e produção de progênie viral.

Visto que a substituição de um único resíduo de aminoácido (G/E) na posição NS3₁₂₁ do ZIKV foi capaz de diminuir significativamente a capacidade infecciosa em linhagens celulares de mamíferos, decidimos avaliar o papel dessa mutação em um modelo de infecção mais próximo ao que ocorre na natureza, utilizando células dendríticas humanas. Michlmayr e colaboradores (2017) ao analisar as células sanguíneas de pacientes naturalmente infectados pelo ZIKV demonstraram que os monócitos e as células dendríticas mielóides são os principais alvos de infecção pelo vírus. No entanto, os ZIKV recombinantes da linhagem africana utilizados neste estudo não foram capazes de infectar células dendríticas derivadas de monócitos de três doadores humanos saudáveis e gerar uma infecção produtiva, como avaliado pelas técnicas de citometria de fluxo e titulação viral. Em contraste, a cepa ZIKV BR 2015/15261, utilizada como controle positivo, apresentou média de 6% de frequência de infecção, corroborando os nossos resultados anteriores (Strottmann et al., 2019). Contudo, nesse mesmo estudo identificamos que a cepa original de ZIKV MR766 foi capaz de gerar infecção produtiva em aproximadamente 40% das células dendríticas de seis doadores saudáveis (Strottmann et al., 2019). A discrepância entre os resultados obtidos com a infecção pelos ZIKV MR766 recombinantes e a cepa referência isolada na natureza pode ser devido ao fato que a obtenção do genoma viral a partir de clones infecciosos gera menor variabilidade de quasiespécies na progênie viral em cultura celular (Ruggli & Rice, 1999), diferentemente das amostras biológicas em que há uma grande heterogeneidade de moléculas de RNA genômico que se acumulam devido a erros da replicase viral (NS5), originando uma miríade de sequências que permitem, por exemplo, aos arbovirus se replicarem em artrópodes e vertebrados. Esta menor heterogeneidade de sequências genômicas poderia também estar relacionada a impossibilidade de infectar células de mosquito com os vírus recombinantes (Villordo; Gamarnik, 2013; HOLMES, 2003; LIN et al., 2004). Adicionalmente, Messias e colaboradores (2019) demonstraram que, apesar do sucesso da infecção de uma cepa asiática de ZIKV em células mononucleares do sangue, análises através da técnica de citometria de fluxo apresentou uma taxa de infecção consideravelmente menor em relação a análise por PCR quantitativo (RT-qPCR), em que a sensibilidade de detecção é maior. Dessa forma, a quantificação do

RNA viral nas células dendríticas infectadas pelos ZIKV recombinantes precisa ser avaliada pela técnica de RT-qPCR em estudos futuros.

Por fim, as ferramentas moleculares de clone infeccioso e replicon subgenômico de ZIKV apresentam-se como estratégias para se estudar etapas de replicação e infecção viral. A geração deste conhecimento poderá contribuir para se determinar diferentes aspectos da biologia viral e patogênese e, eventualmente, subsidiar o desenvolvimento de vacinas e a avaliação de novas drogas e estratégias antivirais.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O presente trabalho objetivou a geração de clones infecciosos e replicons de ZIKV para avaliar o papel de mutações identificadas no genoma de isolados clínicos recentes de ZIKV que apresentavam diferenças em termos de replicação e geração de progênie viral *in vitro*. A fim de alcançar os objetivos, o sistema de replicon subgenômico de ZIKV foi obtido pela estratégia de clonagem inicialmente em pBAC E1/E2, remoção da sequência codificante para proteínas estruturais e inserção do gene E4. A determinação da sequência completa do replicon RepBACE1/E2/E3/E4 obtido será realizada para que possamos seguir com a caracterização biológica do replicon. Contudo a montagem do clone infeccioso de ZIKV ainda está em fase de finalização, restando a inserção do fragmento correspondente as proteínas NS3, NS4A/B e NS5. Uma possibilidade para contornar a dificuldade de clonagem, seria a fragmentação do segmento E3 e subsequente inserção desses fragmentos menores no vetor pBAC. A obtenção do clone infeccioso e replicon de ZIKV nos permitirá avaliar o impacto da mutação NS3₁₂₁E, identificada no isolado clínico recente ZV BR 2015/15098, no contexto genômico da cepa brasileira de ZIKV.

Alternativamente, obtivemos sucesso na geração de ZIKV recombinantes a partir do genoma da cepa africana pela metodologia de ISA, que se apresentou como uma alternativa rápida e menos laboriosa para a obtenção de ZIKV recombinantes. Ambos os ZIKV recombinantes obtidos, MR766_{121Mut} e MR766_{WT}, foram capazes de infectar linhagens celulares de mamífero. Entretanto, a cepa contendo a mutação NS3₁₂₁E apresentou alteração na morfologia de placa, redução da expressão de proteína viral e da síntese de progênie viral, quando comparada a cepa parental.

Visando reproduzir um sistema mais próximo ao de uma infecção natural, realizamos a infecção de células dendríticas primárias humanas (humdDC) de doadores saudáveis com os ZIKV recombinantes MR766_{121Mut} e MR766_{WT}. No entanto, não foi observada a expressão de proteína viral nestas células quando avaliadas por citometria de fluxo. Outras células humanas como monócitos e macrófagos serão também utilizadas para se estudar a susceptibilidade aos ZIKV recombinantes. Adicionalmente, realizaremos ensaios com os ZIKV recombinantes em cultura de células de placenta e neuronais humanas para se avaliar o impacto na modulação da replicação viral.

7. ANEXOS

7.1 Soluções, tampões e meios de cultura

Meio LB (do inglês *Lysogenic broth*, meio de cultura para *E. coli*): 10 g/L bactotripton, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl;

Meio LB sólido: 10 g/L bactotripton, 5 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl, 15 g/L ágar;

Meio TB (do inglês *Terrific broth*, meio de cultura para *E. coli*): 11,8 g/L bactotripton, 23,6 g/L extrato de levedura, 9,4 g/L K₂HPO₄ e 2,2 g/L KH₂PO₄;

Meio TB sólido: 11,8 g/L bactotripton, 23,6 g/L extrato de levedura, 9,4 g/L K₂HPO₄, 2,2 g/L KH₂PO₄ e 15 g/L ágar;

Meio SOC (meio super ótimo com redução de catabólitos para recuperação de *E. coli*): 2% bactotripton, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glicose;

Meio de cultura para linhagem celular C6/36: Meio Leibovitz's (L-15) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 25 µg/mL de gentamicina e 0,26% de triptose;

Meio de cultura para linhagem celular Vero: Meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12* (DMEM/F12) (GIBCO) suplementado com 1% de penicilina/streptomicina, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sódio e 5% de SFB;

Meio de cultura para linhagem de células Huh-7.5: Meio DMEM/F12 (GIBCO) suplementado com 10% de SFB e 25 µg/mL de gentamicina;

TBE (do inglês, tris-borate- EDTA buffer): 89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA (pH 8.0);

PBS (do inglês, phosphate buffered saline): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ .7H₂O, 1,5mM KH₂PO₄;

Solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico: 25 volumes de fenol (pH 7 saturado com 10 mM Tris-base), 24 volumes de clorofórmio, 1 volume de álcool isoamílico;

Solução de clorofórmio:álcool isoamílico: 24 volumes de clorofórmio, 1 volume de álcool isoamílico;

Solução 2,5 mM dNTPs: mistura de 2,5 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP e dTTP);

Tampão da Fosfatase Alcalina (*AP-BUFFER*): 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (pH 9,5).

7.2 Células

7.2.1 Linhagens de células eucarióticas

C6/36: Linhagem celular proveniente da glândula salivar de *Aedes albopictus* clone C6/36 (ATCC).

Vero: Linhagem celular proveniente de rim de macaco verde africano (ATCC, CCL-81).

Huh-7.5: Linhagem celular proveniente de fígado humano (CVCL_7927).

7.2.2 Linhagens de células bacterianas

TOP 10: Linhagem de *E.coli* cálcio competente. Genótipo: F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 nupG recA1 araD139 (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) A1.

EPI 300: Linhagem de *E.coli* cálcio competente. Genótipo: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ ara, leu)7697 galU galK λ -rpsL nupG trfA dhfr.

STBL-2: Derivada da linhagem de *E.coli* JM109 cálcio competente. Genótipo: F- mcrA Δ (mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1lon gyrA96 thi supE44 relA1 λ - Δ (lac-proAB).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCENDOR, DJ. Zika Virus Infection of the Human Glomerular Cells: Implications for Viral Reservoirs and Renal Pathogenesis. **J Infect Dis.** V. 216, p. 162-171, 2017.

ALPUCHE-LAZCANO S, MCCULLOGH C, DEL CORPO O, et al. Higher cytopathic effects of a Zika virus Brazilian isolate from Bahia compared to a Canadian-imported thai strain. **Viruses.** V.10, n 2, p. e53, 2018.

ANDRAL, L; BRÈS, P; SÉRIÉ, C. Studies on yellow fever in Ethiopia. 3. Serological and virological studies of the woodland fauna. **Bull World Health Organ.** V. 38, p. 855–861, 1968.

AUBRY, F; NOUGAIREDE, N ; FABRITUS, L. et al. Single-stranded Positive-Sense RNA Viruses Generated in Days Using Infectious Subgenomic Amplicons. **J Gen Virol.** V. 95, p. 2462-7, 2014.

AUBRY F.; NOUGAIREDE A.; GOULD E. A.; LAMBALLERIE X. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective. **Antiviral Research,** 2015.

BEAVER, JT; LELUTIU, N; HABIB, R. et al. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. **Front Immunol.** V.9, p. 1640, 2018.

BELFORT, R. J.; FREITAS, P.; OLIVEIRA, D.J. Zika Virus, Microcephaly, and Ocular Findings-Reply. **JAMA Ophthalmology.** V. 134, n.8, p.946-7, 2016.

BERA, AK; KUHN, RJ; SMITH, JL. Functional Characterization of Cis and Trans Activity of the Flavivirus NS2B-NS3 Protease. **J Biol Chem.** V. 282, p. 12883-92, 2007.

BESNARD, M.; LASTERE, S.; TEISSIER, A. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill.** V.19, p.20751, 2014.

BOLLATI, M; ALVAREZ, K; ASSENBERG, R. et al. Structure and Functionality in Flavivirus NS-proteins: Perspectives for Drug Design. **Antiviral Res.** V. 87, p. 125-48, 2010.

BURTON G.J.; FOWDEN A.L. The placenta: a multifaceted, transient organ. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological sciences.** V.5, n.370, p.1663, 2015.

BOORMAN J.P., PORTERFIELD J.S. et al. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** V. 50, n. 3, p.238-42, 1956.

BOHEEMEN, SV; TAS, A; ANVAR, SY. et al. Quasispecies Composition and Evolution of a Typical Zika Virus Clinical Isolate From Suriname. **Sci Rep.** V. 7, p. 2368, 2017.

BORDIGNON, J; STROTTMANN, DM; MOSIMANN, ALP. et al. Dengue Neurovirulence in Mice: Identification of Molecular Signatures in the E and NS3 Helicase Domains. **J Med Virol.** V. 79, p. 1506-17, 2007.

BORBA, L; STROTTMANN, DM; NORONHA, L. et al. Synergistic Interactions between the NS3hel and E Proteins Contribute to the Virulence of Dengue Virus Type 1. **PLoS Negl Trop Dis**. V. 6, 2012.

BOYER, S; CALVEZ, E; CARNEIRO, TC. et al. An Overview of Mosquito Vectors of Zika Virus. **Microbes Infect**. V. 20, p. 646-660, 2018.

BRASIL, P.; SEQUEIRA, P.C; FREITAS, A.D.A. et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. **The Lancet**. V.387, n.10026, p. 2–8, 2016.

BLANEY JR., J. E. et al. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 71, n. 6, p. 811-821, 2004a.

BROOKS, RB; CARLOS, MP; MYERS, RA. et al. Likely Sexual Transmission of Zika Virus From a Man With No Symptoms of Infection - Maryland, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, V. 65, p. 915-6, 2016.

CALVET, G; AGUIAR, RS; MELO, ASO. et al. Detection and Sequencing of Zika Virus From Amniotic Fluid of Fetuses With Microcephaly in Brazil: A Case Study. **Lancet Infect Dis**. V. 16, p. 653-660, 2016.

CALVEZ, E; MOUSSON, L; VAZEILLE, M. Zika Virus Outbreak in the Pacific: Vector Competence of Regional Vectors. **PLoS Negl Trop Dis**. V. 12, 2018.

CARTEAUX, G; MAQUART, M; BEDET, A. et al. Zika Virus Associated With Meningoencephalitis. **N Engl J Med**. V. 374, p. 1595-6, 2016.

CAO-LORMEAU, V; ROCHE, C; TEISSIER, A. et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerg Infect Dis**. V. 20, p. 1085-6, 2014.

CHAN, JFW; CHOI, GKY; YIP, CCY. et al. Zika Fever and Congenital Zika Syndrome: An Unexpected Emerging Arboviral Disease. **J Infect**. V. 72, p. 507-24, 2016.

CHAPPELL, KJ; NALL, TA; STOERMER, MJ. et al. Site-directed Mutagenesis and Kinetic Studies of the West Nile Virus NS3 Protease Identify Key Enzyme-Substrate Interactions. **Journal of Biological Chemistry**. V. 280, p. 2896–2903, 2004.

CHEN, CJ; KUO, MD; CHIEN, LJ. RNA-protein Interactions: Involvement of NS3, NS5, and 3' Noncoding Regions of Japanese Encephalitis Virus Genomic RNA. **J Virol**. V. 71, p. 3466-73, 1997.

CHEN S, WU Z, WANG M, et al. Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. **Viruses**. V. 9, n 10, p. 291, 2017.

CDC. Congenital Zika Syndrome and other Birth Defects; February, 2018.

CHRISTOFFERSON R.C. Zika Virus Emergence and Expansion: Lessons Learned from Dengue and Chikungunya May Not Provide All the Answers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 6; n. 95, p.15-8. 2016.

CHAMBERS, TJ; HAHN, CS.; GALLER, R. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review**. V.44, p.649-88, 1990.

CHAMBERS, TJ; WEIR, RC; GRAKOU, A. 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**. V. 87, p. 8898-902, 1990.

CHAMBERS TJ, HALEVY M, NESTOROWICZ A, et al. West Nile virus envelope proteins: nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness. **J Gen Virol**. V. 79, p. 2375–2380, 1998.

COELHO FC, DUROVNI B, SARACENI V, ET AL. Higher incidence of Zika in adult women than adult men in Rio de Janeiro suggests a significant contribution of sexual transmission from men to women. **Int J Infect Dis**. V. 51, p.128–132, 2016.

DARWISH, M. A., HOOGSTRAAL, H., ROBERTS, T. J. et al. A sero-epidemiological survey for Bunyaviridae and certain other arboviruses in Pakistan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 77, p. 446–450, 1983.

DAVIDSON A, SLAVINSKI S, KOMOTO K, et al. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**. V. 65, p. 716–717, 2016.

Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus—Texas, January 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**. V. 65, p. 372–374, 2016.

DESPRÈS, P.; FLAMAND, M.; CECCALDI, PE.; et al., Human Isolates of Dengue Type 1 Virus Induce Apoptosis in Mouse Neuroblastoma Cells. **Journal of virology**. V.70, n.6, p. 4090–4096,1996.

DICK G.W.; KITCHEN S. F.; HADDOW A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**,1952.

DUFFY M.R.; CHEN T. H.; HANCOCK W.T. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**. V.360, p.2536–2543, 2009.

DUGGAL NK, MCDONALD EM, WEGER-LUCARELLI J, et al. Mutations present in a low-passage Zika virus isolate result in attenuated pathogenesis in mice. **Virology**. V. 530, p. 19-26, 2019.

DUPONT, R.M.; BIRON, A., O'CONNOR, O. et al. Infectious Zika viral particles in breastmilk. **Lancet**. V, 387, p.1051, 2016.

DRIGGERS, R.W.; HO, CY.; KORHONEN, E.M. et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **New England Journal of Medicine**. V. 374, p.2142-2151, 2016.

ELAZAR M, LIU P, RICE CM, et al. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. **J Virol**. V. 78, n 20, p. 11393-400, 2004.

EPELBOIN, S; DULIOUST, E; EPELBOIN, L. et al. Zika Virus and Reproduction: Facts, Questions and Current Management. **Hum Reprod Update**. V. 23, p. 629-645, 2017.

FAGBAMI A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **J Hyg (Lond)**. V 83, n. 2, p.213-9, 1979.

FARIA, N. R.; AZEVEDO, R. S. S.; KRAEMER, M. U.G., et al. **Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings**, 2016.

FAYE, O; FREIRE, CCM; IAMARINO, A., et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, V.8, n 1, 2014.

FILIFE, AR; MARTINS, CM; ROCHA, H. Laboratory Infection With Zika Virus After Vaccination Against Yellow Fever. **Arch Gesamte Virusforsch**. V. 43, p. 315-9, 1973.

FRÉOUR, T; MIRALLIÉ, S; HUBERT, B. et al. Sexual Transmission of Zika Virus in an Entirely Asymptomatic Couple Returning From a Zika Epidemic Area, France, April 2016. **Euro Surveill**. V. 21, 2016.

FONTES-GARFIAS CR, SHAN C., LUO H., MURUATO A.E., et al. Functional analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein. **Cell Rep.** V.21, pg 1180 –1190, 2017.

FOY B.D., KOBYLINSKI K.C., CHILSON FOY J.L., et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases.** V.17, p. 880-882, 2011.

GADEA, G.; BOS, S.; KREJBICH-TROTOT, P.; et al. A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. **Virology.** V.4987, p. 157-162, 2016.

GREGORY, C. J.; ODUYEBO, T.; BRAULT, A.C., et al. Modes of Transmission of Zika Virus. **The Journal of Infectious Diseases,** V. 216, n.10, p. S875–S883, 2017.

GUBLER, DJ; VASILAKIS, N; MUSSO, D. et al. History and Emergence of Zika Virus. **J Infect Dis.** V. 15. P. 216, 2017.

GULLAND, A. First case of Zika virus spread through sexual contact is detected in UK. **BMJ.** V. 355, p. i6500, 2016.

HAMEL, R; DEJARNAC, O; WICHIT, S. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J Virol.** V. 89, p. 8880-96, 2015.

HADDOW A.D., SCHUH A.J., YASUDA C.Y., et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis.** V.6:, pg 1477, 2012.

HAYES E.B. Zika virus outside Africa. **Emerging Infectious Diseases.** V.15, p.1347–1350, 2009.

HEANG,V; YASUDA, CY; SOVANN, L. et al. Zika Virus Infection, Cambodia, 2010. **Emerg Infect Dis.** V. 18, p. 349–351, 2012.

HILGENFELD, R.; VASUDEVAN, S. G. Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **Springer Nature Singapore**, cap. 10, p. 978-981, 2018.

HIGUERA, A; RAMÍREZ, JD. Molecular Epidemiology of Dengue, Yellow Fever, Zika and Chikungunya Arboviruses: An Update. **Acta Trop**. V.190, p. 99-111, 2019.

HOLMES, E. C. Patterns of intra- and interhost nonsynonymous variation reveal strong purifying selection in dengue virus. **Journal of Virology**, Baltimore. V. 77, n. 20, p. 11296-11298, 2003.

IOOS S.; MALLET H.P.; LEPARC G.et al.Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med Mal Infect**. V.44, p 302–7, 2014

JOHANSEN, IE. Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**. V. 93, p. 12400-5, 1996.

KUNO, G.; CHANG, G.J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**. V. 152, n.4, p.687-96, 2007.

KÜMMERER, BM. Establishment and Application of Flavivirus Replicons. Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies. **Adv Exp Med Biol**. V. 1062, p. 165–173, 2018.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. **Journal of Virology**. V. 71, n. 2, p. 1497-1505, 1997.

LANCIOTTI R. S.; KOSOY O. L.; LAVEN J. J.; VELEZ J.O.et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**. V.14, p.1232–1239, 2008.

LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **Journal of Virology**. V.90, n. 10, p. 4864–4875, 2016.

LEE, I; BOS, S; LI, G. et al. Probing Molecular Insights Into Zika Virus-Host Interactions. **Viruses**. V. 10, 2018.

LEE E, WEIR R.C, DALGARNO L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the threedimensional structure of the protein. **Virology**. V.232, pg 281–290, 1997.

LEIS, A.A.; STOKIC, D.S. Neuromuscular manifestations of west nile virus infection. **Front Neurol**. V. 3, p.37. 2012.

LEQUIME, S; LAMBRECHTS, L. Vertical Transmission of Arboviruses in Mosquitoes: A Historical Perspective. **Infect Genet Evol**. V. 28, p. 681-90, 2014

LI, L; LOK, S; YU, I. ET AL. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. **Science**. V. 319, p. 1830-4, 2008.

LI, X; LI, X; YE, H. Recovery of a Chemically Synthesized Japanese Encephalitis Virus Reveals Two Critical Adaptive Mutations in NS2B and NS4A. **J Gen Virol**. V. 95, p. 806-15, 2014.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **J Virol**. V. 73, p. 4611–4621, 1999.

LINDENBACH B.D.; THIEL H.J.; RICE C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. **Fields virology**. V.1, 5th ed, p 1101–1152, 2007.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 991-1041, 2001.

LIN, S. et al. Study of sequence variation of dengue type 3 virus in naturally infected mosquitoes and human hosts: implications for transmission and evolution. **Journal of Virology**. V. 78, n. 22, p. 12717-12721, 2004.

LIU, WJ; WANG, XJ; CLARK, DC. et al. A Single Amino Acid Substitution in the West Nile Virus Nonstructural Protein NS2A Disables Its Ability To Inhibit Alpha/Beta Interferon Induction and Attenuates Virus Virulence in Mice. **J Virol**. V. 80, p. 2396–2404, 2006.

LORENZ, I.C.; KARTENBECK, J.; MEZZACASA, A. et al. Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. **Journal of Virology**. V. 77, p. 4370-4382, 2003.

MACNAMARA F.N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. V. 48, p.139-145, 1954.

MACKENZIE, J.M. Wrapping Things up about Virus RNA Replication. **Traffic**. V. 6, n. 11, p. 967-977, 2005.

MACKENZIE, J.M; WESTAWAY E.G. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. **Journal of Virology**. V. 75, p. 10787-10799, 2001.

MACKENZIE, JM; KHROMYKH, AA; JONES, MK. et al. Subcellular Localization and Some Biochemical Properties of the Flavivirus Kunjin Nonstructural Proteins NS2A and NS4A. **Virology**. V. 245, p. 203-15, 1998.

MARCHETTE, NJ; GARCIA, R; RUDNICK, A. Isolation of Zika Virus From Aedes Aegypti Mosquitoes in Malaysia. **Am J Trop Med Hyg.** V. 18, p. 411-5, 1969.

MÁRQUEZ-JURADO, S; NOGALES, A; ÁVILA-PÉREZ, G. et al. 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.** V. 10, p. e547, 2018.

MELO, ASO; AGUIAR, RS; AMORIM, MMR. Et al. Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. **JAMA Neurol.** V. 73, p. 1407-1416, 2016.

MESSIAS, CV; LEMOS, JP; CUNHA, DP. et al. Zika Virus Infects Human Blood Mononuclear Cells. **BMC Infect Dis.** V. 19, V. 986, 2019

METSKY, HC; MATRANGA, CB; WOHL, S. et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. **Nature.** V. 546, p. 411- 415. 2017.

MICHLMAYR, D; ANDRADE, P; GONZALEZ, K. et al. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. **Nature Microbiology.** V. 2, p. 1462–1470, 2017.

MING, G, I; TANG, H.; SONG, H. Advances in Zika Virus Research: Stem Cell Models, Challenges, and Opportunities. **Cell Stem Cell.** V.19, n.6, p.690-702, 2016.

MIRANDA-FILHO D.; MARTELLI C.M.; XIMENES R.A. et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. **America Journal of Public Health.** V.106, n. 4, p. 598-600, 2016.

MISHIN, V. P.; COMINELLI, F. C.; YAMSHCHIKOV, V. F. A 'minimal' approach in design of flavivirus infectious DNA. **Virus Research.** V. 81, p. 113-123, 2001.

MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal Medicine.**V.10, p.951-8, 2016.

MOORE, D L; CAUSEY, O R; CAREY, D E. Arthropod-borne Viral Infections of Man in Nigeria, 1964-1970. **Ann Trop Med Parasitol.** V. 69, p. 49-64, 1975.

MOSIMANN, ALP; BORBA, LB; BORDIGNON, J. et al. Construction and Characterization of a Stable Subgenomic Replicon System of a Brazilian Dengue Virus Type 3 Strain (BR DEN3 290-02). **J Virol Methods**. V. 163, p.147-52, 2010.

MULKEY, SB; WESSEL, MA; PEYTON, C. et al. Neurodevelopmental Abnormalities in Children With In Utero Zika Virus Exposure Without Congenital Zika Syndrome. **JAMA Pediatric**. 2020.

MUÑOZ-JORDAN, JL; LAURENT-ROLLE, M; ASHOUR, J. et al. Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. **J Virol**. V. 79, p. 8004-13, 2003.

MUSSO D, ROCHE C, ROBIN E, NHAN T, TEISSIER A, CAO-LORMEAU VM. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg Infect Dis**. 2015.

MUSSO D.; NHAN T.; ROBIN E, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia. **Euro Surveill**, 2014.

MURRAY, KO; GORCHAKOV, R; CARLSON, AR. et al. Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood. **Emerg Infect Dis**. V. 23, p. 99-101, 2017.

NASCIMENTO O.J.M.; DA SILVA I.R.F. Guillain-Barré syndrome and Zika virus outbreaks. **Current Opinion in Neurology**. V.30, n.5, p.500–507, 2017.

NEUFELDT, CJ; CORTESE, M; ACOSTA, EG. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews**, 2018

NORONHA L.D.; ZANLUCA C.; AZEVEDO M.L.; et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**. V.111, p.287–93, 2016.

OEHLER, E; WATRIN, L; LARRE, P. et al. Zika Virus Infection Complicated by Guillain-Barre Syndrome--Case Report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill**. V. 19, 2014.

OLSON; JG, KSIAZEK, TG; SUHANDIMAN, TRIWIBOWO. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. V. 75, p. 389-93, 1981.

OPAS, 2018 - Ministros da Saúde das Américas fazem acordo para fortalecer ações de prevenção às doenças transmitidas por vetores. Acesso: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5767:ministros-da-saude-das-americas-fazem-acordo-para-fortalecer-aco-es-de-prevencao-as-doencas-transmitidas-por-vetores&Itemid=812>.

PETERSEN, L. R.; JAMIESON, D. J.; POWERS A. M. et al. Zika virus. **The New England Journal of Medicine**. V. 374, p. 1552-1563, 2016.

PETTERSSON, JHO; ELDHOLM, V; SELIGMAN, SJ. et al. How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? **mBio**. V. 7, 2016.

PIERRO, D. J. et al. Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. **Journal of General Virology**. V. 87, p. 2263-2268, 2006.

PLOURDE, A.R; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 22, n 7, p. 1185–1192, 2016.

POSSAS, C; BRASIL, P; MARZOCHI, MC. et al. Zika Puzzle in Brazil: Peculiar Conditions of Viral Introduction and Dissemination - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 112, p. 319-327, 2017.

PU, SY; WU, RH; YANG, CC. et al. Successful propagation of flavivirus infectious cDNAs by a novel method to reduce the cryptic bacterial promoter activity of virus genomes. **J Virol.** V. 85, p. 2927-41, 2011.

PU, SY; WU, RH; TSAI, MH. et al. A novel approach to propagate flavivirus infectious cDNA clones in bacteria by introducing tandem repeat sequences upstream of virus genome. **J Gen Virol.** V. 95, p.1493-1503, 2014.

QUICK, J; GRUBAUGH, ND; PULLAN, ST. Multiplex PCR Method for MinION and Illumina Sequencing of Zika and Other Virus Genomes Directly From Clinical Samples. **Nat Protoc.** V. 12, p. 1261-1276, 2017.

RACANIELLO, V.R.; BALTIMORE, D. Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** V. 78, n.8, p.4887-91, 1981.

RASMUSSEN, S.A.; JAMIESON, D.J.; HONEIN, M.A. et al. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal of Medicine.** V. 374, p.1981-1987, 2016.

REGADAS, V.C.; SILVA, M.C; ABUD, L.G. et al. Microcephaly caused by congenital Zika virus infection and viral detection in maternal urine during pregnancy. **Associação Médica Brasileira.** V.64, n.1, 2018.

RICE, C. M. et al. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. **The New Biologist.** V. 1, n. 3, p. 285-296, 1989.

RUGGLI, N.; RICE, C. M. Functional cDNA Clones of The Flaviviridae: Strategies and Applications. **Advances in Virus Research.** V.53, p. 183-207, 1999.

ROTH, A; MERCIER, A; LEPERS, C. et al. Concurrent Outbreaks of Dengue, Chikungunya and Zika Virus Infections - An Unprecedented Epidemic Wave of Mosquito-Borne Viruses in the Pacific 2012-2014. **Euro Surveill.** V. 19, 2014.

SALAEMAE, W; JUNAID, M; ANGSUTHANASOMBAT, C. et al. Structure-guided Mutagenesis of Active Site Residues in the Dengue Virus Two-Component Protease NS2B-NS3. **J Biomed Sci.** V. 17, p. 68, 2010.

SANTOS, CND; Frenkiel, MP; Courageot, MP. et al. Determinants in the Envelope E Protein and Viral RNA Helicase NS3 That Influence the Induction of Apoptosis in Response to Infection with Dengue Type 1 Virus. **Journal of Virology.** V. 274, n.2, p. 292-308, 2000.

SANTOS, GRB; ARAGÃO, FBA; WALDER, WJ. et al. Relationship Between Microcephaly and Zika Virus During Pregnancy: A Review. **Rev Assoc Med Bras.** V. 64, p. 635-642, 2018.

SHAN, C.; XIE, X.; MURUATO, A.E. et al. An Infectious cDNA Clone of Zika Virus to Study Viral Virulence, Mosquito Transmission, and Antiviral Inhibitors. **Cell Host Microbe.** V.19, n.6, p. 891–900, 2016.

SHEHU, N. Y.; SHWE, D.; ONYEDIBE, K. I. et al. Pathogenesis, diagnostic challenges and treatment of Zika virus disease in resource-limited settings. **Nigerian Postgraduate Medical Journal.** V. 25, n. 2, p. 67-72, 2018.

SHI, P.Y.; TILGNER, M.; LO, M.K. Infectious cDNA clone of the epidemic west Nile virus from New York City. **Journal of Virology.** V.76, n.12, p.5847-56, 2002.

SHI, W; LI, J; ZHOU H. et al. Pathogen Genomic Surveillance Elucidates the Origins, Transmission and Evolution of Emerging Viral Agents in China. **Sci China Life Sci.** V. 60, p. 1317-1330, 2016.

SHIRATO K, MIYOSHI H, GOTO A, et al. Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. **J Gen Virol.** V.85, pg 3637–3645, 2004.

SIMPSON, D.I.H. Zika virus infection in man. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** V. 58, n 4, p. 335–337, 1964.

STADLER, K.; ALLISON, S.L.; SCHALICH, J. et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of Virology**. V. 71, p. 8475-8481, 1997.

STROTTMANN, DM; ZANLUCA, C; MOSIMANN, ALP. et al. Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates from different Brazilian regions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 114. 2019.

SUZUKI, R.; DE BORBA, L.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. ET al. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology**. V. 362, n.2, p.374-83, 2007.

TAKEGAMI, T; SAKAMURO, D; FURUKAWA, T. Japanese Encephalitis Virus Nonstructural Protein NS3 Has RNA Binding and ATPase Activities. **Virus Genes**. V. 9, p. 105-12, 1995.

TURMEL, JM; ABGUEGUEN, P; HUBERT, B. et al. Late Sexual Transmission of Zika Virus Related to Persistence in the Semen. **Lancet**. V. 387, p. 2501, 2016.

VALLE, RP; FALGOUT, B. Mutagenesis of the NS3 Protease of Dengue Virus Type 2. **J Virol**. V. 72, p. 624-32, 1998.

VICENTI, I; BOCCUTO, A; ALESSIA GIANNINI, A. et al. Comparative Analysis of Different Cell Systems for Zika Virus (ZIKV) Propagation and Evaluation of anti-ZIKV Compounds in Vitro. **Virus Res**. V. 244, p. 64-70, 2018.

VILLORDO, SM; CARBALLEDA, JM; FILOMATORI, CV; et al. RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation. **Trends Microbiol**. V. 24, n 4, p. 270-283, 2016.

VILLORDO, SM; GAMARNIK AV. Differential RNA Sequence Requirement for Dengue Virus Replication in Mosquito and Mammalian Cells. **J Virol**. V. 87, p. 9365-72, 2013.

XIE, X; GAYEN, S; KANG, C. et al. Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. **J Virol.** V. 87, p. 4609–4622, 2013.

YAMSHCHIKOV, V.; MISHIN, V.; COMINELLI, F. A new strategy in design of (+)RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in E. coli. **Virology.** V. 281, p. 272-280, 2001.

YU, I.M.; ZHANG, W.; HOLDAWAY, H.A. et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science.** V. 319, p. 1834-1837, 2008.

YOUNG S, LI T, MCCUNE BT, et al. Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. **J Virol.** V. 86, p 7360–7371, 2012.

YOUNG PR, HILDITCH PA, BLETCHLY C. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J Clin Microbiol.** V, 38, p. 1053–1057, 2000.

WANG, CC; HUANG ZS; CHIANG PL, et al. Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. **FEBS.** V. 583, p. 691–696, 2009.

WANG, L; VALDERRAMOS, SG; WU, A. et al. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. **Cell Host Microbe,** V. 19, p. 561-5, 2016.

WARRENE, P; TAMURA, JK; COLLETT, MS. RNA-stimulated NTPase Activity Associated With Yellow Fever Virus NS3 Protein Expressed in Bacteria. **J Virol.** V. 67, p. 989-96, 1993.

WATRIN L, GHAWCHÉ F, LARRE P. et al. Guillain-Barré Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. **Medicine (Baltimore).** V.95, n.14, p.3257, 2016.

WENGLER, G; WENGLER, G; GROSS, HJ. Studies on Virus-Specific Nucleic Acids Synthesized in Vertebrate and Mosquito Cells Infected With Flaviviruses. **Virology**. V. 89, p. 423-37, 1978.

WEINBREN M.P.; WILLIAMS M.C. Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. V.52, p.263–268, 1958.

WEAVER, SC. Emergence of Epidemic Zika Virus Transmission and Congenital Zika Syndrome: Are Recently Evolved Traits to Blame? **mBio**. V. 8, 2017.

WEAVER, SC, COSTA, F; GARCIA-BLANCO, MA. Et al. Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control. **Antiviral Res**. V.130, p. 69–80, 2016.

WHITE, M. K.; WOLLEBO, H.S.; Beckham, D. et al. Zika Virus: An Emergent Neuropathological Agent. **Annals of Neurology**. V. 80, n. 4, p. 479–489, 2016.

WHO. WHO ends Zika as a Public Health Emergency of International Concern. Novembro, 2016. Acesso: < <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/who-ends-zika-public-health-emergency-international-concern>>.

WHO. Epidemic focus. Acesso: <<https://www.who.int/csr/disease/epidemic-focus/flavivirus-epidemics/en/>>.

WIKAN N.; SMITH D.R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **Lancet. Infectious Diseases**. V.16, n. 7, p.119-126, 2016.

WINKLER G, MAXWELL SE, RUEMMLER C, et al. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. **Virology**. V.171, p. 302–305, 1989.

ZANLUCA, C.; MELO V. C.; MOSIMANN A. L.; et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, 2015.

ZHANG, Y; CHEN, W; WONG, G. et al. Highly diversified Zika viruses imported to China, 2016. **Protein Cell**. V. 7, P. 461–464, 2016.

ZHU, Z; CHAN, JFWC; TEE, KM. et al. Comparative Genomic Analysis of Pre-Epidemic and Epidemic Zika Virus Strains for Virological Factors Potentially Associated With the Rapidly Expanding Epidemic. **Emerg Microbes Infect.** V. 5, p. 22, 2016.

ZOU, G.; XU, H.Y.; QING, M. et al. Development and characterization of a stable luciferase dengue virus for high-throughput screening. **Antiviral Res.** V. 91, n.1, p.11-9, 2011.