

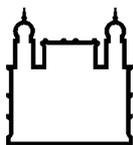
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

OBTENÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS DE ZIKV PARA ESTUDOS
DE ATENUAÇÃO VIRAL

DÉBERLI RUIZ FERNANDES

Rio de Janeiro
Maio de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DÉBERLI RUIZ FERNANDES

**OBTENÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS DE ZIKV PARA ESTUDOS DE
ATENUAÇÃO VIRAL**

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

Orientador (es): Profa. Dra. Myrna C. Bonaldo

RIO DE JANEIRO

Maio de 2022

Fernandes, Déberli Ruiz.

Obtenção de clones infecciosos de ZIKV para estudos de atenuação viral /
Déberli Ruiz Fernandes. - Rio de Janeiro, 2022.
177 f.; il.

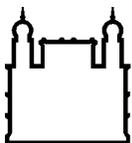
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia
Parasitária, 2022.

Orientadora: Myrna Cristina Bonaldo.

Bibliografia: f. 113-131

1. Zika virus. 2. Flavivirus. 3. Clone infeccioso. 4. Genética reversa. 5.
Atenuação viral. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: DÉBERLI RUIZ FERNANDES

**OBTENÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS DE ZIKV PARA ESTUDOS DE
ATENUAÇÃO VIRAL**

ORIENTADOR (ES): Profa. Dra. Myrna C. Bonaldo

Aprovada em: 06 / 05 / 2022

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Leila de Mendonça Lima (IOC) - Presidente

Prof. Dra. Iranaia Assunção Miranda (UFRJ)

Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula (IOC)

Prof. Dra. Claudia Lamarca Vitral (UFF)

Prof. Dr. Tulio Machado Fumian (IOC)

Rio de Janeiro, 06 de maio de 2022



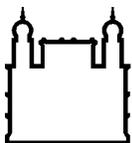
Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de Deberli Ruiz Fernandes, sob orientação da Dr^a. Myrna Cristina Bonaldo. Ao sexto dia do mês de maio de dois mil e vinte e dois, realizou-se às treze horas, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: **"Obtenção de Clones Infecciosos de ZIKV para estudos de atenuação viral"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Patogênese das Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Leila de Mendonça Lima – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Iranáia Assunção Miranda– UFRJ/RJ, Dr^a. Vanessa Salette de Paula – IOC/FIOCRUZ, e como suplentes: Dr^a. Cláudia Lamarca Vítal-UFF/RJ e Dr. Tulio Machado Fumian - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela _____ da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 6 de maio de 2022.

Dr^a. Leila de Mendonça Lima (Presidente da Banca):

Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador do Programa):



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Às memórias de Manoel Fernandes Garcia e João Sanches Ruiz, com muitas saudades, dedico-lhes a minha felicidade pela conclusão dessa tese citando Carlos Drummond de Andrade: “Mas as coisas findas, muito mais do que lindas, essas ficarão”;

Aos meus pais Eliseu Fernandes e Juvenília Ruiz Fernandes. Dedicar-lhes essa tese é a menor das honrarias diante de tudo que me ensinaram

Por fim, e não menos importante, dedico esse trabalho a todas as mães e crianças, vítimas da Síndrome Congênita de Zika, em especial, Karla Barreto Araújo e Cecília Araújo O’dwyer.

AGRADECIMENTOS

A conclusão de um curso de doutorado encerra um importante ciclo acadêmico. Hoje, finalizo minha tese de doutorado não apenas me tornando uma cientista, mas um indivíduo melhor e principalmente mais grato. Descrevo meus agradecimentos, não em ordem de importância, pois não existem menores ajudas, mas de forma a agradecer todos que, junto comigo, percorreram essa trajetória. Assim, agradeço:

À Dra. Leila de Mendonça Lima, por ter respondido meu e-mail prontamente, sem qualquer referência minha. Esse feito foi a oportunidade que tive de conhecer a Fundação Oswaldo Cruz, e isso me encorajou muito a encarar um doutorado a quilômetros de distância das minhas raízes. Obrigada também por ter me apresentado a Dra. Myrna C. Bonaldo e o Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus.

À Dra. Myrna C. Bonaldo, por ter me recebido em seu laboratório e me dado a oportunidade de fazer parte dessa equipe, que foi a minha família em muitos momentos. Sou extremamente grata pela orientação acadêmica e pelos ensinamentos que me prepararam profissionalmente. Em especial, agradeço pela compreensão que teve comigo todos esses anos. Em vários momentos a sua orientação foi além da ciência.

A todos da equipe LABMOF por toda a ajuda e pela convivência diária ao longo desses anos. Cada um de vocês tem um lugar especial na minha história, e todos certamente contribuíram para a conclusão desse trabalho. Peço licença para alguns recados especiais à parte da equipe:

“Ieda, Mariela e Iasmim, vocês foram essenciais para a minha entrada no curso de pós-graduação. Ieda e Marie, agradeço por todas as correções do pré-projeto e orientações para o processo seletivo. Iasmim, obrigada por dividir comigo os anseios que envolviam a entrada ao programa de pós-graduação do IOC. Juntas comemoramos a aprovação do processo seletivo. Foi especial demais”.

“Nathalia, você é uma cientista pronta! Eu admiro muito a sua inteligência e te agradeço por sempre ter estado disponível, sempre pronta a ajudar e a ensinar! Meu carinho e gratidão por você vai além da minha admiração como profissional”.

“Marta, desde sempre você esteve do meu lado. Obrigada por tornar divertido nossas longas horas de bancada. Nossa afinidade e cumplicidade sempre foram os pilares da nossa amizade, mesmo com pensamentos tão diferentes, tudo foi mais leve por estarmos juntas”.

“Lidiane, você foi quem me mostrou os primeiros passos dentro da dinâmica LABMOF, e me ensinou muito! E no decorrer desses anos todos, você compartilhou comigo muito mais do que procedimentos técnicos de cultivo celular. Cultivamos uma amizade honesta e coerente com o que é vida pessoal e trabalho. Te admiro, e sou muito grata a tudo que você me proporcionou, e em especial à nossa amizade, que tenho como um grande presente.

“À equipe LABMOF, fica aqui minha gratidão a todos, sem exceção”.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, pela excelência em pesquisa e ensino, e por terem como missão primária, a promoção da saúde pública.

Ao curso de pós-graduação em Biologia Parasitária, por oferecer uma formação científica com alto nível de pesquisa, ciência e tecnologia. Em especial, agradeço a coordenação acadêmica, a comissão de pós-graduação e a também a secretaria acadêmica por todas as suas competências.

A plataforma de Genômica – Sequenciamento de DNA/RPT01A/FIOCRUZ, por fornecer, com qualidade, os resultados de sequenciamento genômico. E a plataforma de ELISPOT/PDTIS pelo treinamento para aquisição de imagens e análises das amostras, em especial à Rafaela Veiga, pelo suporte técnico.

Agradeço a toda equipe do biotério do Pavilhão Leônidas Deane, que trabalhou para manter a qualidade dos nossos experimentos, em especial a Médica Veterinária Responsável, Dra. Mônica Nogueira.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) pelo fornecimento dos animais utilizados nessa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou a dedicação exclusiva ao programa de pós-graduação e a operacionalização do presente estudo.

Por fim, agradeço imensamente todas aquelas pessoas especiais, que fora do ambiente profissional, me deram muito suporte, me apoiaram em diversos momentos e seguem torcendo pelas minhas conquistas e felicidade:

A minha família – pai, mãe, irmãos. Meus pensamentos e amor estão com vocês em todos os momentos vividos, mesmo a quilômetros de distância. Superar a saudade da presença física é uma luta diária, mas saber que sou parte dessa família me enche de orgulho e alegria. Obrigada por sempre estarem me esperando com amor incondicional, e por me apoiarem na difícil decisão de “voar”.

Ao meu marido e melhor amigo, por ser o meu porto seguro e a minha melhor companhia. Obrigada por tornar meus dias mais leves, pelo seu cuidado com a nossa vida, por caminhar junto comigo de mãos dadas. Sem o seu carinho e seu apoio, talvez eu não tivesse chegado até aqui. Você foi a minha melhor escolha.

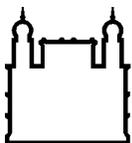
Aos amigos Iuri Figueiredo e Thiago Zanoni, por me receber na casa de vocês, pelo suporte que isso significou pra mim e por terem sido minha companhia em muitos momentos.

Enfim, a todos os meus amigos, que enriquecem a minha vida e me reabastecem de boas energias a cada encontro. Agradeço a cada um citando Voltaire: “Todas as grandezas do mundo, não valem um bom amigo”.

Sem mais, obrigada.

Cada um é responsável por todos. Cada um é o único responsável. Cada um é o único responsável por todos.

Antoine de Saint-Exupéry



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

OBTENÇÃO DE CLONES INFECCIOSOS DE ZIKV PARA ESTUDOS DE ATENUAÇÃO VIRAL

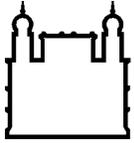
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Déberli Ruiz Fernandes

O vírus Zika (ZIKV) é um importante patógeno humano, associado a complicações graves como a síndrome congênita do ZIKV em neonatos, e a síndrome de Guillain-Barré em adultos. Até o momento, não estão disponíveis vacinas ou drogas antivirais contra a infecção por ZIKV, tornando-se um importante desafio o seu desenvolvimento. Esse trabalho teve como objetivo a construção de variantes de ZIKV atenuadas, obtidas pela tecnologia de genética reversa envolvendo plasmídeos bacterianos. Conhecidamente, o cDNA de ZIKV é instável em *Escherichia coli*, assim, foi estabelecida uma metodologia de construção de ZIKV sintético, baseado no vírus epidêmico Rio-U1, através clonagem do cDNA de ZIKV em um sistema de dois plasmídeos, utilizando o pCC1, um plasmídeo de cópia única. Para mitigar as restrições de rendimento de massa de cDNA, acoplou-se reações de PCR em diferentes etapas do protocolo, favorecendo a montagem do molde completo de cDNA de ZIKV, possibilitando a recuperação viral após transcrição *in vitro*. O clone IC.ZIKV-Rio-U1 demonstrou padrões de proliferação viral em modelos celulares muito similares ao vírus parental. Além disso, se mostrou virulento em camundongos AG129, exibindo os mesmos sinais de acometimento neurológico desenvolvidos pelo vírus parental. A partir da obtenção de IC.ZIKV-Rio-U1, foram desenvolvidas duas abordagens para promoção de atenuação viral, ambas envolvendo os genes NS4B e NS5. A primeira, foi baseada no fato de que, ao comparar ZIKV circulantes nas Américas com a linhagem ancestral Malásia de 1966, foi observado que a maioria das mutações sinônimas e não sinônimas ocorreu nas proteínas NS4B e NS5. Para avaliar se essas mutações influenciaram na virulência de ZIKV, foi construído o vírus quimérico IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal, a partir da substituição dos genes NS4B e NS5 de ZIKV Rio-U1 pelos genes equivalentes, derivados da linhagem ancestral. Não houve diferença significativa na virulência dos vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal e IC.ZIKV-Rio-U1 em diferentes modelos celulares, mas foi observada uma ligeira diminuição na virulência em modelo de camundongos AG129. A segunda abordagem consistiu na desotimização de pares de códons dos genes NS4B e NS5, através de permuta nucleotídica baseada em dois algoritmos distintos, dN231 e N3, criando os vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3, respectivamente. Estudos de infecção celular e em camundongos AG129 demonstraram que apenas IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 exibiu perfil menos proliferativo em modelos celulares e menos virulento em camundongos AG129, demonstrando um padrão atenuado em comparação ao vírus IC.ZIKV-Rio-U1. Além disso, o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 induziu imunidade em camundongos AG129, protegendo esses animais contra desafio letal com o vírus selvagem Rio-U1. Esses resultados demonstram que, a estratégia de desotimização de pares de

códons pode ser uma ferramenta para o desenvolvimento de vírus atenuados e protótipos vacinais.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

OBTAINING ZIKV INFECTIOUS CLONES FOR VIRAL ATTENUATION STUDIES

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Déberli Ruiz Fernandes

Zika virus (ZIKV) is a major human pathogen, associated with serious complications, such as congenital syndrome in neonates and Guillain-Barré syndrome in adults. To date, vaccines or antiviral drugs against ZIKV infection are not available, making their development an important challenge. This work aimed at the construction of attenuated ZIKV variants, obtained by reverse genetics technology involving bacterial plasmids. It is known that the ZIKV cDNA is unstable in *Escherichia coli*, thus, a methodology for the construction of a synthetic ZIKV, based on the Rio-U1 epidemic virus, was established by cloning the ZIKV cDNA in a two-plasmid system, using the pCC1, a single copy plasmid. To mitigate cDNA mass yield restrictions, PCR reactions were coupled at different stages of the protocol, favoring the assembly of the complete ZIKV cDNA template, enabling viral recovery after in vitro transcription. The IC.ZIKV-Rio-U1 clone showed patterns of viral proliferation very similar to the parental virus in cell models. In addition, it was virulent in AG129 mice, exhibiting the same signs of neurological impairment developed by the parental virus. After obtaining IC.ZIKV-Rio-U1, two approaches were developed to promote viral attenuation, both involving the NS4B and NS5 genes. The first one, was based on the fact that, when comparing ZIKV circulating in the Americas with the Malaysian ancestral lineage of 1966, it was observed that most of the synonymous and non-synonymous mutations occurred in the NS4B and NS5 proteins. To assess whether these mutations influenced the virulence of ZIKV, the chimeric virus IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal was constructed by replacing the NS4B and NS5 genes of ZIKV Rio-U1 by equivalent genes derived from the ancestral lineage. There was no significant difference in virulence of IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal and IC.ZIKV-Rio-U1 viruses in different cells models, but a slight virulence decrease was observed in AG129 mice models. The second one consisted in the codon pair deoptimization of the NS4B and NS5 genes, through nucleotide permutation based on two different algorithms, dN231 and N3, creating the IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231 and IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3, respectively. Cellular and mice infection studies showed that only IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 was less proliferative in cellular models and less virulent in AG129 mice, demonstrating an attenuated pattern compared to the IC.ZIKV-Rio-U1 virus. Furthermore, the IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 virus induced immunity in AG129 mice, protecting these animals against a lethal challenge with the Rio-U1 wild-type virus. These results demonstrate that the codon pair deoptimization strategy can be a tool for the development of attenuated viruses and vaccine prototypes.

ÍNDICE

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O vírus Zika: Um breve histórico.	1
1.2 Biologia dos flavivírus.....	4
1.2.1 Estrutura do genoma e da partícula viral	4
1.2.2 Ciclo de replicação viral	6
1.3 Transmissão de ZIKV.....	9
1.4 Aspectos clínicos	10
1.5 Evolução da poliproteína viral	11
1.6 Sistemas de Genética Reversa para estudos de ZIKV	16
1.7 Potenciais candidatos vacinais para ZIKV	18
1.8 Alteração de códon para estudos de atenuação viral.....	22
1.9 Justificativa.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
2.2.1 Parte 1.	27
2.2.2 Parte 2.	27
2.2.3 Parte 3.	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Certificados	29
3.2 Cultura de células	29
3.3 Construção de vírus sintéticos	30
3.3.1 Delineamento estratégico para obtenção dos genes sintéticos.....	30
3.3.2 Genes sintéticos	31
3.3.3 Abordagens para obtenção do sistema de dois plasmídeos.	34
3.3.4 Clonagem molecular.....	36
3.3.5 Amplificação do DNA plasmidial por reação de PCR	38
3.3.6 Obtenção do cDNA molde	39
3.3.7 Transfecção celular e regeneração de vírus recombinante	40

3.3.8	Produção dos estoques virais.....	41
3.4	Ensaio moleculares	41
3.4.1	Extração de RNA viral	41
3.4.2	RT-PCR	41
3.4.3	PCR	42
3.4.4	Eletroforese em gel de agarose.....	42
3.4.5	Sequenciamento nucleotídico.....	43
3.4.6	RT-qPCR	45
3.5	Caracterização geral dos vírus sintéticos.....	45
3.5.1	Titulação por contagem de placas de lise.....	45
3.5.2	Titulação por contagem de unidades de foco de infecção.....	46
3.5.3	Marcação e detecção das unidades formadoras de foco	47
3.5.4	Microscopia de imunofluorescência.....	47
3.6	Ensaio biológicos em modelos celulares.....	48
3.6.1	Análise fenotípica	48
3.6.2	Curvas de proliferação viral	49
3.6.3	Análise de sensibilidade a interferon	49
3.7	Ensaio biológicos em modelo murino	50
3.7.1	Modelo AG-129.....	50
3.7.2	Inoculação animal e validação do inóculo viral.....	50
3.7.3	Acompanhamento e avaliação da morbidade e mortalidade	51
3.7.4	Protocolo de desafio	52
3.7.5	Coletas de sangue e eutanásia	53
3.7.6	Histopatologia de cérebro de camundongos	54
4	RESULTADOS	55
4.1	Estabelecimento de metodologia de obtenção de clone infeccioso por genética reversa.....	55
4.2	Obtenção do vírus quimérico IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal.....	55
4.2.1	Alinhamento P6-740 e Rio-U1	55
4.2.2	Obtenção do vírus quimérico IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal pela tecnologia do clone infeccioso.	58
4.2.3	Caracterização fenotípica do vírus quimérico IC.ZIKV – nsb4-ns5/Mal	

4.2.4	Estudos de proliferação viral em cultura de células.....	65
4.2.5	Replicação viral em cultura de células tratadas com IFN- α ou IFN- β	66
4.2.6	Avaliação da virulência de IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal em modelo AG129 67	
4.3	Obtenção das variantes virais IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3.....	73
4.3.1	Alteração na sequência dos genes NS4B e NS5 através da permuta nucleotídica	73
4.3.2	Obtenção dos vírus quimérico IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 pela tecnologia do clone infeccioso.	75
4.3.3	Recuperação viral.....	77
4.3.4	Estudos de proliferação viral em cultura de células.....	78
4.3.5	Avaliação da virulência de IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 em modelo AG129.....	81
4.3.6	Ensaio de desafio para verificação de imunidade protetora	86
5	DISCUSSÃO.....	90
6	PERSPECTIVAS	108
6.1	Vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal.....	108
6.2	Vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3.....	108
7	CONCLUSÕES.....	110
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
	ANEXO I.....	132
	ANEXO II.....	154

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Regiões geográficas de circulação do vírus Zika.....	2
Figura 1.2 - Partícula viral do ZIKV.....	4
Figura 1.3 - Organização genômica da poliproteína viral de ZIKV.....	5
Figura 1.4 - Ciclo de replicação viral.....	7
Figura 1.5 - Filogenia de ZIKV.....	13
Figura 3.1 - Diagrama: abordagens de permuta de bases.....	31
Figura 3.2 - Esquema estratégico para obtenção dos fragmentos sintéticos e montagem do painel viral.....	33
Figura 3.3 - Construção do clone infeccioso de ZIKV.....	35
Figura 3.4 - Cronograma de infecção e acompanhamento animal.....	52
Figura 3.5 - Cronograma de imunização com vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 e desafio com vírus IC.ZIKV – Rio-U1.....	53
Figura 3.6 - Região de punção sanguínea.....	54
Figura 4.1 -Estratégia de montagem dos plasmídeos.....	60
Figura 4.2 - PCR de amplificação plasmidial	61
Figura 4.3 - Molde final de cDNA do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal.....	62
Figura 4.4 - Comparação fenotípica através da caracterização <i>in vitro</i>	64
Figura 4.5 - Estudos comparativos da cinética de proliferação viral.....	65
Figura 4.6 - Efeito do tratamento por IFN- α e IFN- β após 24 h de infecção de células Vero pelos IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal.....	67
Figura 4.7 - Comparação da infecciosidade dos vírus IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal em modelo de camundongo AG129.....	69
Figura 4.8 - Análise das sequências com mutações sinônimas por permuta nucleotídica.....	74
Figura 4.9 - Representação esquemática das clonagens dos genes sintéticos com as sequências permutadas para os algoritmos dN231 e N3.....	76
Figura 4.10 - RT-PCR de confirmação da recuperação viral.....	77
Figura 4.11 - Estudos comparativos da cinética de proliferação viral.....	79
Figura 4.12 - Avaliação, em modelo de camundongo AG129, da infecciosidade dos vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, em comparação ao vírus IC.ZIKV - Rio-U1.....	82
Figura 4.13 - Ensaio de pré-desafio.....	87
Figura 4.14 - Ensaio de desafio para avaliação da imunidade.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Vacinas contra ZIKV em desenvolvimento.	19
Tabela 3.1 - Fragmentos de cDNA de ZIKV sintetizados pela <i>GenScript</i>	34
Tabela 3.2 - Abordagens utilizadas para triagem das culturas de bactérias contendo o plasmídeo de interesse.	37
Tabela 3.3 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para triagem de culturas positivas para o plasmídeo de interesse.	37
Tabela 3.4 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para aumentar a massa de cDNA.....	38
Tabela 3.5 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-PCR	42
Tabela 3.6 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de regiões sobrepostas do genoma completo de ZIKV sintético para sequenciamento nucleotídico.	44
Tabela 4.1 - Análise do alinhamento das sequências dos vírus P6-740 e Rio-U1	56
Tabela 4.2 - Polimorfismos de aminoácidos presentes entre as proteínas NS4B e NS5 de ZIKV Rio-U1 e ZIKV P6-740.....	57
Tabela 4.3 - Detalhamento dos fragmentos sintéticos de cDNA, desenhados para a construção do vírus sintético IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal.	59
Tabela 4.4 - Resultado do controle de inóculo por experimento.....	68
Tabela 4.5 - Análises dos parâmetros selecionados para cada replicata obtida pela ferramenta <i>CodonShuffle</i>	74
Tabela 4.6 - Resultado do controle de inóculo por experimento.....	81
Tabela 4.7 - Ensaio piloto para determinação da dose do inóculo.	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4G2	Anticorpo monoclonal contra proteína E de flavivírus
AST	Tempo médio de sobrevivência
BIDMC	Centro Médico Diaconisa Beth Israel
BILS	Instituto de Ciências da Vida
BIME	Instituto de Microbiologia e Epidemiologia
pb	Pares de bases
BSA	Albumina sérica bovina
CAI	Índice de adaptação de códon
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA-IOC	Comitê de Ética e Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz
CHIKV	Vírus Chikungunya
CMC	Carboximetilcelulose
CMV	Citomegalovírus
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPB	Tendência de pares de códons
CPE	Efeito citopático
CTNBio-CQB	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança e Controle de Qualidade
DAPI	4,3-Diamidino-2-Fenilindol
DENV	Vírus da Dengue
DMEM	Meio mínimo essencial Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPEC	Dietil-pirocarbonato
EB	Tampão de eluição
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENC	Número efetivo de códons
FFU	Unidade formadora de foco
HDVr	Ribozima do vírus hepatite D
IC.Rio-U1	Clone infeccioso do vírus Zika (isolado Rio-U1)
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ISA	Amplicons subgenômicos infecciosos
KEDV	Vírus <i>Kendougou</i>
KPL	Anticorpo secundário conjugado à peroxidase
LABMOF	Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus
LB	Luria-Bertani
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
MEGA11	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11</i>
MOI	Multiplicidade de Infecção (Relação vírus/célula)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NIAID	Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NPCs	Células progenitoras neuronais
OGM	Organismos geneticamente modificados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAHO	Organização Pan-americana de Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PFU	Unidade formadora de placa
PoIA	Poliadenilação
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da Polimerase quantitativa
RE	Retículo endoplasmático
Rio-U1	Isolado do vírus Zika
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da Polimerase
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SFB	Soro fetal bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SNC	Sistema nervoso central
SOC	Caldo super-ótimo com repressão catabólica
SPOV	Vírus <i>Spondweni</i>
TAE	Tampão acetato Tris-EDTA
tRNA	Ácido ribonucleico transportador

UTMB	Universidade do Texas do Ramo Médico
UTR	Região não traduzida
VLP	Partículas sub-virais não infecciosas
VRC	Centro de Pesquisa em Vacina
WRAIR	Instituto de Pesquisa Walter Reed Army
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus Zika.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus Zika: Um breve histórico.

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* (do latim *Flavus*, amarelo) e ao gênero *Flavivirus*, sendo o causador da Zika ou Febre do Zika. Representantes deste gênero incluem várias outras arboviroses de importância clínica (1), como a dengue, a encefalite japonesa, a doença do Oeste do Nilo e a febre amarela (2,3), as quais afetam a saúde de milhões de indivíduos anualmente (4).

O vírus Zika foi descoberto incidentalmente pelos cientistas Dick e Haddock, em soro de macaco-rhesus (*Macaca mulata*), o qual era utilizado como sentinela em cativeiro para estudos de vigilância de febre amarela. A descoberta ocorreu na floresta Zika, em Uganda, em 1947. Em 1948, o ZIKV foi isolado novamente em mosquito *Aedes (Stegomyia) africanus* na mesma região (5).

Os primeiros casos de infecção em humanos, foram reportados em 1954, por MacNamara, na Nigéria (6). Anos mais tarde, o pesquisador Simpson descreveu seu próprio quadro sintomatológico, enquanto infectado por ZIKV, durante seus estudos em Uganda entre 1962 e 1963 (7). Um inquérito sorológico envolvendo residentes de várias áreas de Uganda revelou uma soroprevalência de 6,1% de anticorpos contra o vírus Zika, o que sugeriu que a infecção humana era frequente (8). Outras pesquisas sorológicas indicaram uma distribuição geográfica muito mais ampla da infecção humana, incluindo Egito, África Oriental, Índia, Tailândia, Vietnã, Filipinas e Malásia (9–14).

Durante aproximadamente 60 anos, apenas 14 casos de infecção por ZIKV foram reportados (15). Assim, foi uma grande surpresa quando um surto, em várias ilhas do Estado de Yap, Estados Federados da Micronésia, resultou em cerca de 5.000 infecções entre a população total de 6.700 habitantes, em 2007 (16).

Posteriormente, outro surto de importância epidemiológica ocorreu na Polinésia Francesa, entre 2013 e 2014, afetando uma população estimada em 28

mil pessoas, o que correspondia a 11% da população local (17). Nesse período, foram observados quadros clínicos com complicações neurológicas, incluindo 42 casos de Síndrome de Guillain-Barré (SGB), que atraiu mais atenção para o ZIKV. Surto subsequentes ocorreram em outras ilhas do Pacífico, incluindo Nova Caledônia, Ilha de Páscoa e Ilhas Cook (18–20). A figura 1.1 mostra os principais surtos que ocorreram a partir de 2007.

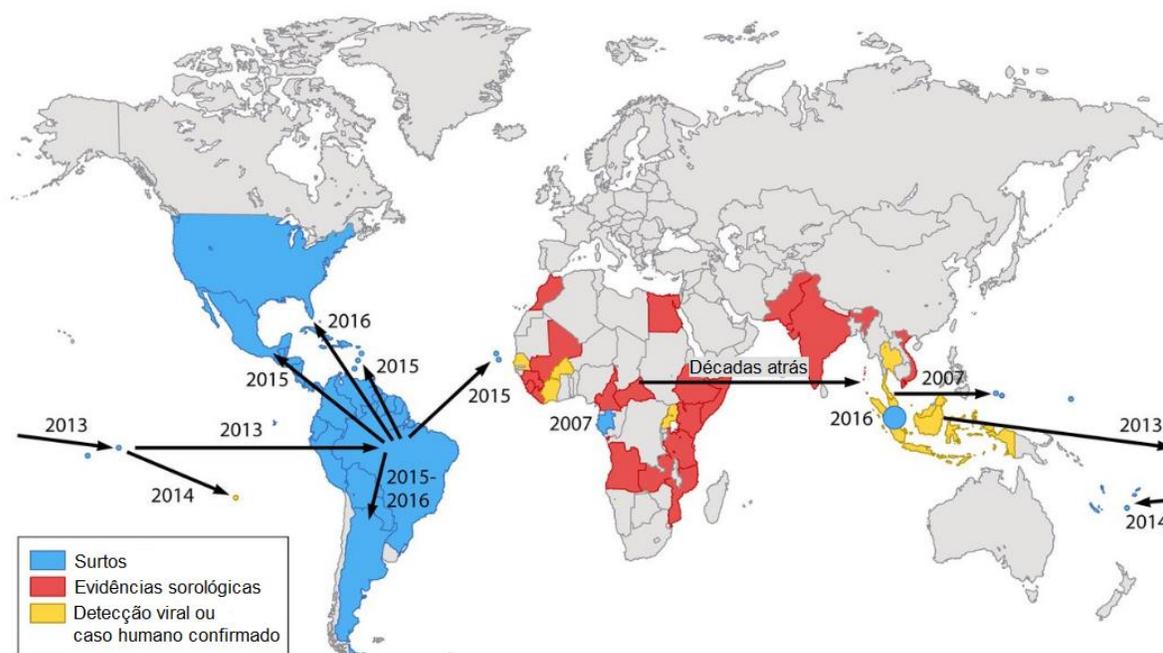


Figura 1.1 - Regiões geográficas de circulação do vírus Zika.

O mapa mostra a evolução do ZIKV na África subsaariana, espalhando-se para a Ásia e sendo introduzido na ilha Yap, no Pacífico Sul e em seguida nas Américas (Adaptado de Weaver, S. C. 2017) (21).

Os primeiros relatos de um surto de uma infecção distinta e exantemática no Brasil, foi em dezembro de 2014 (22). No entanto, estudos indicam que o vírus Zika já circulava no país em fevereiro de 2014 (23). O primeiro caso autóctone de doença pelo ZIKV, no Brasil, foi relatado em abril de 2015, com crescente número de casos atingindo o país, especialmente no Nordeste (24).

O vírus foi identificado por meio de técnica de qRT-PCR em 7 de 24 amostras testadas, provenientes da região de Camaçari, Bahia (25) e em 8 de 21 amostras, provenientes de estado do Rio Grande do Norte (24). A esta época, os casos foram ratificados e outros estados também identificaram a circulação de casos suspeitos de febre do ZIKV (26,27).

Em meados de setembro de 2015, no Brasil, pesquisadores notaram um aumento no número de recém-nascidos apresentando microcefalia nas mesmas áreas onde a circulação do vírus havia sido reportada (28). Em outubro de 2015, duas neuropediatras, trabalhando no estado de Pernambuco, examinaram um grupo de recém-nascidos com microcefalia severa e com fenótipo muito específico, não observado em outras causas de microcefalia congênita (29). Ao mesmo tempo, no estado da Paraíba, outros dois casos de microcefalia severa, de causa desconhecida, foram observados em crianças, cujas mães relataram terem vivenciado sintomas leves de infecção por ZIKV no início da gestação. Nesses dois casos, foram coletadas amostras de líquido amniótico, e tanto RNA de ZIKV quanto IgM específico foram detectadas nessas amostras, demonstrando a transmissão transplacentária (30).

Na ausência de alternativas explicativas para o aumento do número de casos de microcefalia durante a epidemia de Zika, foi sugerido uma associação causal entre o surto de ZIKV e a microcefalia (28,31). Em novembro de 2015, o Ministério da Saúde do Brasil confirmou a relação etiológica entre o vírus Zika e a microcefalia (32). Posteriormente, análises retrospectivas de dados coletados durante o surto que ocorreu na Polinésia Francesa, em 2013, revelaram presença de RNA de ZIKV em fluido amniótico de recém-nascidos que apresentaram malformações cerebrais congênitas (33,34). Essas evidências mostraram que há associação entre ZIKV e defeitos congênitos. Diante disso, e do rápido espalhamento do vírus pelas Américas e Caribe, bem como a entrada do vírus nos Estados Unidos da América (35), a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou Emergência em Saúde Pública de Importância Internacional, em fevereiro de 2016 (36).

1.2 Biologia dos flavivírus

1.2.1 Estrutura do genoma e da partícula viral

A partícula viral do ZIKV possui um tamanho estimado entre 30 e 45 nm (37). Sua estrutura foi melhor decifrada a partir do uso da microscopia crioelétrica (Figura 1.2) que, com uma resolução de 3,8 Å, possibilitou evidenciar alta similaridade com os vírus Spondweni (SPOV), Kendougou (KEDV) e dengue (DENV), os quais são representantes do gênero *Flavivirus* (38,39).

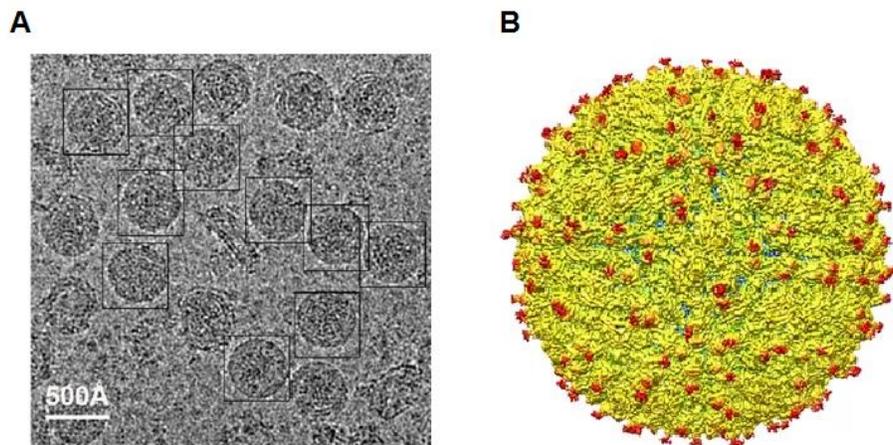


Figura 1.2 - Partícula viral do ZIKV.

A - Imagem crio-EM representativa de ZIKV mostrando a distribuição de fenótipos dos vírions. B - Representação esquemática com orientação de profundidade de superfície do ZIKV mostrando corpo estrutural icosaédrico (Adaptada de Sirohi D. et al., 2016) (38).

O genoma do ZIKV é composto por uma única molécula de RNA fita simples, de polaridade positiva, com 10.807 nucleotídeos que codificam 3.419 aminoácidos (40). Assim como outros *Flavivirus*, o vírus Zika é composto por duas regiões não codificantes (5' e 3', com 106 e 428 nucleotídeos respectivamente) e um quadro de leitura único que codifica uma poliproteína precursora, que é clivada em três proteínas estruturais: proteína de Capsídeo (C), proteína precursora de membrana (prM/M) e proteína de envelope (E); e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1.3) (41,42).

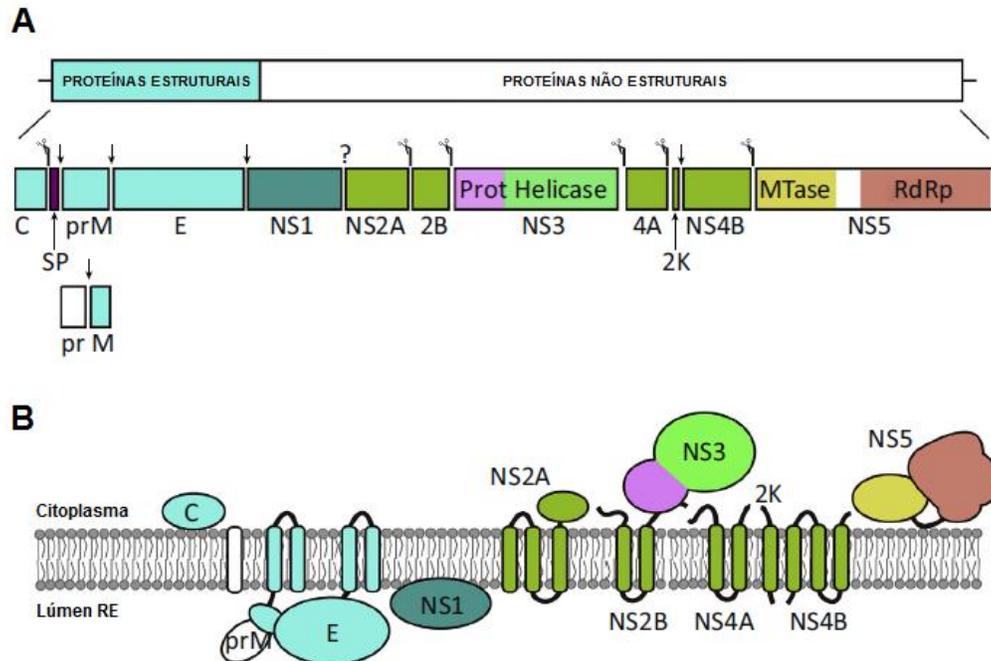


Figura 1.3 - Organização genômica da poliproteína viral de ZIKV.

A - Produtos de clivagem e processamento de poliproteínas. O ZIKV tem um genoma de fita simples de aproximadamente 11Kb. As caixas abaixo do genoma indicam precursores e proteínas maduras geradas pela cascata de processamento proteolítico. B - Topologia da poliproteína. Topologia das proteínas estruturais e não estruturais de flavivírus com relação à membrana do Retículo Endoplasmático (RE) (Adaptado de Shi & Gao, 2017) (43).

As proteínas estruturais são responsáveis pela formação da partícula viral (44). A proteína C (11 kDa) consiste um corpo icosaedro, formado pela complexação da proteína C com o RNA genômico, desempenhando um importante papel na formação do nucleocapsídeo. A proteína E (50 kDa) consiste em um envelope glicoproteico que funciona como uma proteína de fusão e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes. A proteína M (8 kDa) é traduzida como forma imatura – prM (26 kDa). Durante a saída do vírion da célula, essa proteína é clivada por uma protease do tipo furina, gerando a proteína M madura e um segmento “pr”. Esse complexo prM se associa à proteína E, atuando como uma chaperona, auxiliando no dobramento correto da proteína E e protegendo-a da degradação durante a montagem do vírion. Além disso, as proteínas “pr” e M também podem fornecer proteção ao hospedeiro contra infecções (45–47).

As proteínas não estruturais são essenciais para a replicação do RNA viral e montagem do vírion, além de antagonizar o sistema imune do hospedeiro (48,49).

As proteínas NS3 e NS5 (70 kDa e 104 kDa, respectivamente) apresentam as principais funcionalidades, sendo essenciais para a síntese e replicação do RNA viral (50). A proteína NS3, possui várias atividades enzimáticas que são essenciais para a síntese de RNA viral, atuando como protease, helicase-NTPase e RTPase (51–53). E a proteína NS5, também essencial para a replicação, funciona como uma metiltransferase, guanililtransferase e RNA polimerase dependente de RNA (54–56). A interação entre NS5 e NS3 também é essencial para a função de RNA helicase da proteína NS3, que atua desnaturando as estruturas secundárias do RNA permitindo acessibilidade a NS5, polimerizando novas moléculas de RNA (57).

Outras proteínas não estruturais estão associadas à complexos replicativos, como as proteínas NS1, NS2A, NS4A e NS4B (58–60). Também podem apresentar atividades de cofatores enzimáticos, como é o caso das proteínas NS4A e NS2B (61). E além das funções envolvidas na replicação viral, podem apresentar funções associadas à proteção viral, através da inibição da ativação do complemento, como é o caso da proteína NS1 (62), e atuando como antagonista de interferon, no caso da proteína NS2A (63). Além disso, foi demonstrado a indução de apoptose em células infectadas por alguns flavivírus, através da proteína NS3, a qual promove ativação da caspase-8 (64).

As regiões não traduzidas da poliproteína viral, extremidades 5´ e 3´ UTR, também são relevantes na replicação viral. Essas regiões consistem em sequências conservadas que desempenham papel importante na estabilização do genoma e do ciclo genômico, como reconhecimento por fatores celulares ou virais, tradução, empacotamento de RNA, replicação, entre outros (49,65).

1.2.2 Ciclo de replicação viral

O ciclo de multiplicação dos flavivírus, bem como para o ZIKV (Figura 1.4), se inicia pela infecção de células do hospedeiro permissivas ao vírus. As partículas virais se ligam às células através de interações entre a glicoproteína de superfície E do vírus e receptores celulares, penetrando na célula hospedeira por um processo

de endocitose mediada por receptor (66–68). Esses vírus podem utilizar múltiplos receptores, para diferentes tipos celulares e em diferentes espécies de hospedeiro. As moléculas que atuam como receptores primários e co-receptores de baixa afinidade são diversas e vêm sendo descritas por interagirem com as partículas de flavivírus, mas o mecanismo específico da entrada de ZIKV ainda não foi elucidado (69–71).

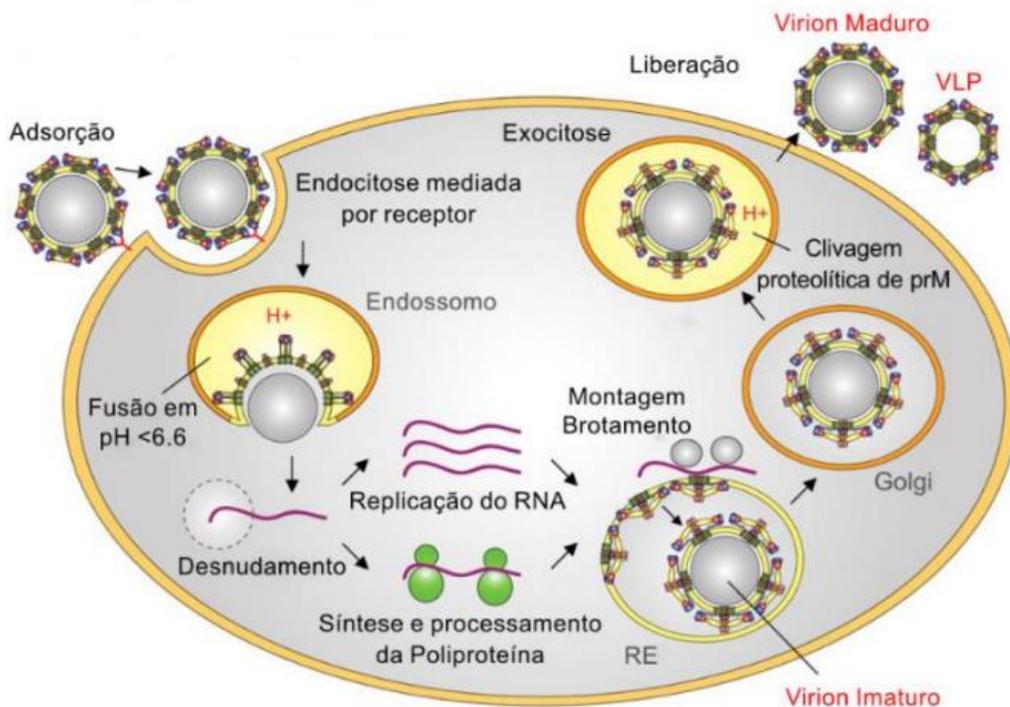


Figura 1.4 - Ciclo de replicação viral.

O vírus entra na célula por endocitose mediada por adsorção viral, via interação entre receptores. O baixo pH endossomal provoca mudanças conformacionais às proteínas virais, promovendo a fusão entre o envelope e a membrana do endossomo. O RNA é liberado no citoplasma com o desnudamento do capsídeo viral e é traduzido em uma poliproteína precursora. Essa é processada dando origem às proteínas estruturais e não estruturais do vírus. A replicação ocorre na superfície do retículo endoplasmático. Os virions imaturos são montados após síntese das proteínas estruturais, e por brotamentos intracelulares. As partículas imaturas seguem nas vias secretórias do aparelho de Golgi, e são clivadas na proteína prM, sendo liberadas na forma madura por exocitose. RE: Retículo endoplasmático. VLP: Virus-like particles (partículas subvirais não infecciosas) [Adaptado de HEINZ & STIASNY, 2006 (72)]

O vírus é internalizado em vesícula revestida por clatrina e então é direcionado para um compartimento endocítico pré-lisossomal, onde a variação do pH no interior da vesícula dispara mudanças conformacionais na proteína E, que

expõem seu peptídeo de fusão, e induz a fusão entre o vírus e a membrana lipídica do endossomo, promovendo a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira (66,72–74). Uma vez no citoplasma, ocorre a liberação do RNA viral, seguida de tradução da fita positiva de RNA para a produção de fitas positivas de cópias do genoma e das proteínas envolvidas na replicação viral, como a NS5 – que tem função de RNA polimerase RNA-dependente (73). A poliproteína precursora é sintetizada a partir de fitas de RNA polaridade positiva traduzidas nos ribossomos, e é clivada por serino-protease viral (NS2B / NS3) e proteases hospedeiras (sinalase e furina) co- e pós-traducionalmente (49,75).

É formado, então, o complexo replicativo viral (76), onde um aumento na biossíntese lipídica e um rearranjo de membranas do RE e do Golgi (77) , formam estruturas vesiculares que compartimentalizam todo o material necessário para a replicação do RNA viral. A montagem do vírion ocorre na superfície do RE, quando proteínas estruturais e novas fitas de RNA se associam à face citoplasmática do RE, seguido de um brotamento para o lúmen reticular, formando partículas imaturas constituídas por heterodímeros de proteínas E e prM (47). Esse processo de replicação é capaz de gerar também partículas subvirais, contendo apenas as glicoproteínas e o envelope lipídico, não possuindo, portanto, nem a proteína capsídica, nem o genoma viral, o que também as tornam não infecciosas (78).

Por conseguinte, as partículas imaturas resultantes, são transportadas através da via secretora celular, pela rede *trans* do Golgi. O pH baixo das vesículas Golgienses promove alteração conformacional expondo o sítio de clivagem por furina na prM. A clivagem da proteína prM pela protease Furina, dá origem às formas maduras do vírus. Com a remoção do peptídeo “pr” durante a maturação, a proteína E assume uma conformação homodimérica na superfície do virion, possibilitando o ciclo de fusão endossomal e secreção pela célula hospedeira, via exocitose (69,79–82).

1.3 Transmissão de ZIKV

A transmissão do ZIKV pode ser classificada como vetorial e não-vetorial. Nas Américas, *Aedes. aegypti* e *Aedes albopictus* são identificados como os principais vetores de transmissão humana (83). No entanto, o ZIKV já foi isolado de *Ae. africanus*, *Ae. apicoargenteus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. vitattus* e *Ae. furcifer* (84). Essa variedade de artrópodes vetores demonstra que o vírus está bem adaptado a diferentes espécies de mosquitos, podendo desempenhar um papel importante durante os ciclos silvestre e urbano (85).

O mosquito adquire o vírus durante o repasto sanguíneo. Após a ingestão de sangue do hospedeiro reservatório, o vírus se replica sem afetar o mosquito, e é transmitido a outro hospedeiro no próximo repasto (86). Após a infecção do hospedeiro, o RNA viral pode ser detectado no plasma, na urina, na saliva, sêmen, e em menor grau, em secreções vaginais (87,88). Essas detecções indicam potenciais fontes de infecção viral e sugerem que possam ocorrer transmissões via transfusão sanguínea e sexual (89,90). Outras evidências, de que possa haver transmissão via sexual, foram a transmissão a partir de viajantes que adquiriram ZIKV em áreas endêmicas, e transmitiram o vírus para suas parceiras (91,92).

O ZIKV também pode ser transmitido verticalmente durante a gestação. Essa transmissão é sustentada pela detecção de RNA de ZIKV, em fluidos amnióticos de mães cujos fetos apresentavam anormalidades cerebrais detectadas por ultrassonografia. Outra evidência de que o vírus é capaz de atravessar a placenta e infectar o sistema nervoso fetal, foi a detecção de antígenos virais de ZIKV em tecidos cerebrais e placentas de bebês recém-nascidos, que apresentaram microcefalia e morreram logo após o nascimento (30,93). No entanto, o mecanismo utilizado pelo ZIKV para atravessar a barreira placentária ainda é desconhecido. Assim, diversos estudos com modelo animal têm sido desenvolvidos para demonstrar essa transmissão, através da inoculação de ZIKV em fêmeas grávidas de camundongos, com posterior detecção de ZIKV na placenta e microcefalia nos fetos (94,95).

1.4 Aspectos clínicos

As infecções pelo ZIKV geralmente são assintomáticas, mas quando sintomáticas, a manifestação clínica é, em geral, branda e autolimitada, com a sintomatologia desaparecendo dentro de uma semana aproximadamente (16). Os sinais clínicos incluem exantema maculopapular, febre, artrite ou artralgia e conjuntivite (96). Outros sinais e sintomas como dor retro-orbital, mialgia, cefaleia, edema das extremidades e vômitos podem aparecer (86,97).

Os aspectos clínicos se assemelham aos de outras arboviroses como a Dengue e Chikungunya. Contudo, algumas diferenças sutis podem existir. Ao contrário do DENV e do vírus Chikungunya (CHIKV), por exemplo, o quadro febril causado pelo ZIKV é frequentemente leve ou ausente. Já as inflamações nas articulações e as dores nessas regiões ocorrem frequentemente, no entanto, não apresentam a mesma intensidade quando comparado ao CHIKV. Mesmo assim, a similaridade dos sintomas provocados pela infecção de ZIKV, DENV e CHIKV dificulta o diagnóstico da doença (98,99).

Apesar da infecção por ZIKV ser classicamente branda, o aparecimento de síndromes neurológicas e autoimunes já foram associadas à infecção por ZIKV. Entre as síndromes neurológicas estão a meningoencefalite (100), meningite, mielite e a síndrome de Guillain-Barré (101). Além disso, a sua capacidade de infectar células progenitoras pode impedir o desenvolvimento do cérebro fetal, quando houver a transmissão vertical, e gerar a síndrome congênita do Zika vírus (102).

Estudos forneceram fortes evidências sobre o impacto da infecção perinatal por ZIKV, mostrando associação consistente com morte fetal, insuficiência placentária, restrição de crescimento fetal e lesão do sistema nervoso central (SNC) (103), e alertando para um grave problema de saúde pública.

A influência teratogênica da infecção por vírus Zika na neurogênese embriológica, resulta em diversas anomalias cranioencefálicas. Algumas dessas anormalidades incluem: calcificações intracranianas, atrofia cerebral, anormalidades cerebelares, ventriculomegalia, hidrocefalia, encefalocele, espinha

bífida, entre outras (104–106). Além das anormalidades cranioencefálicas, diversas alterações oftalmológicas em recém-nascidos foram associadas à infecção por ZIKV, como por exemplo, alterações maculares, alterações do nervo óptico, microftalmia, anoftalmia, catarata congênita e calcificações intraoculares (105,107).

A síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika compreende, então, um conjunto de sinais e sintomas, com gravidade variável, desde o aborto espontâneo, ou morte do recém-nascido logo após o nascimento, até quadros sintomatológicos diversos que incluem as alterações cranioencefálicas e oftalmológicas mencionadas, que podem ainda ter influência direta sobre a propriedade intelectual e retardo no desenvolvimento da criança (108,109).

1.5 Evolução da poliproteína viral

De acordo com um estudo filogenético do genoma completo de ZIKV, o vírus apresenta duas linhagens, a linhagem africana e a linhagem asiática (110). A linhagem africana é ainda agrupada em dois subclados, um do protótipo MR766 da África Oriental (*cluster* de Uganda), o qual inclui isolados do Senegal e República Africana Central, de 1947 a 2001, e outro da África Ocidental (*cluster* da Nigéria) (3), que inclui isolados da Nigéria e do Senegal, de 1968 a 1997. Do mesmo modo, tem sido sugerido que a linhagem asiática também seja classificada em dois subclados: um subclado asiático local e o subclado americano contemporâneo (111).

Evidências filogenéticas, combinadas com detecção de ZIKV em estudos de soroprevalência, indicaram que o vírus teve origem na África, onde se mantém em circulação e foi introduzido na Ásia, décadas atrás, onde evoluiu continuamente (112). Após introdução do vírus Zika na Ásia, um crescente número de surtos foi registrado, incluindo as epidemias que ocorreram na Polinésia Francesa, em 2013 (17,113) e no Brasil, em 2015 (25).

Análises genéticas revelaram que o genótipo asiático de ZIKV foi responsável pelos surtos nas Ilhas do Pacífico, bem como nas Américas (110,114,115). Contudo,

a razão para o rápido espalhamento do vírus para as Américas ainda não foi esclarecida. Uma hipótese para o aumento das infecções por ZIKV está relacionada a habilidade, adquirida através de mutações adaptativas, de ser transmitido eficientemente por mosquitos vetores. Esse é um mecanismo que tem sido demonstrado por outras arboviroses, incluindo os vírus *West Nile* (116) e Chikungunya (117). Outro importante ponto de discussão na comunidade científica, são as razões pelas quais os quadros graves de infecção congênita por Zika não foram identificadas antes de 2015. Nesse contexto, uma outra hipótese pondera que mutações adquiridas pelo vírus, o tornou mais virulento, e contribuiu para o aumento de infecções neurológicas (112). Aliás, no ponto de vista de Musso e Gluber, as alterações genéticas são a explicação mais provável para a importante emergência de ZIKV e sua potencial neurovirulência (118). Em concordância com essa última hipótese, um trabalho realizado por Pettersson *et al.*, investigou a evolução de ZIKV através de análises filogenéticas de uma extensiva gama de sequências genômicas completas, e foram identificadas alterações aminoacídicas que surgiram progressivamente, ao longo do genoma viral, à medida que o vírus emergia da África e gradualmente se dispersou pela Ásia, Pacífico e América (Figura 1.5) (119).

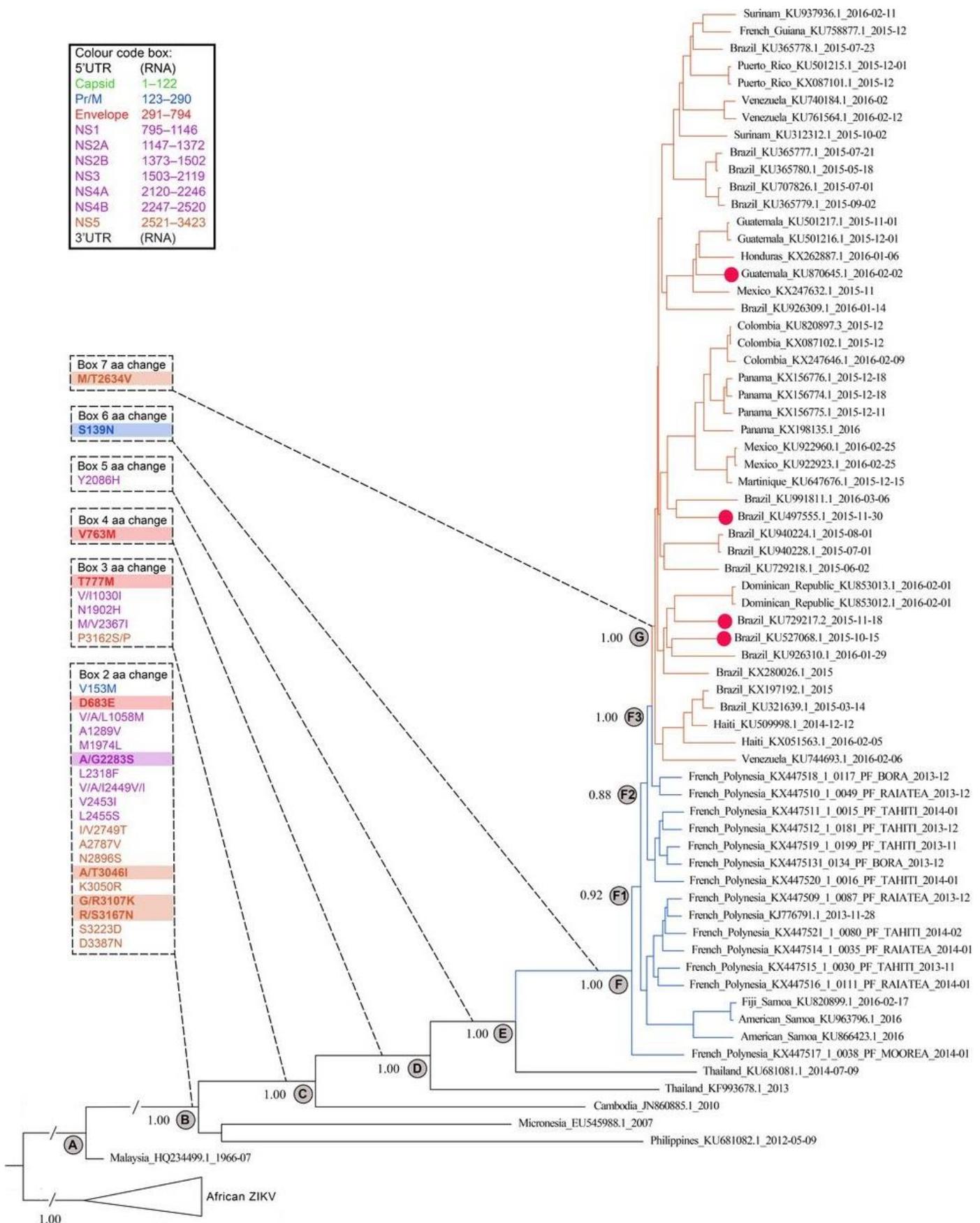


Figura 1.5 - Filogenia de ZIKV.

A caixa superior esquerda exhibe a legenda das cores que representam cada proteína do genoma viral. As caixas pontilhadas exibem as posições das alterações aminoacídica ocorrentes ao longo da evolução de ZIKV. Em vermelho, estão representadas as linhagens americanas. Já em azul, estão representadas as linhagens asiáticas epidêmicas e em preto as linhagens asiáticas ancestrais [Adaptado de Pettersson *et al.*, 2016 (119)]

Para avaliar se as mutações acumuladas durante a evolução de ZIKV, particularmente aquelas adquiridas na diferenciação da linhagem africana para a linhagem asiática, contribuíram para o aumento da síndrome congênita de ZIKV, ou para o aumento da transmissibilidade do vetor, estudos comparativos entre as linhagens africana e asiática foram realizados. O resultado da comparação mostrou o contrário do que era esperado. A linhagem africana demonstrou maiores índices de replicação viral e maiores taxas de apoptose celular em comparação com a linhagem asiática, em diferentes modelos celulares (120,121). Similarmente, a linhagem africana se mostrou mais virulenta em comparação com a linhagem asiática em estudos de modelo *in vivo*. Além disso, estudos mostraram que mosquitos são mais susceptíveis à linhagem africana do que à linhagem asiática (120,122–125). Diante disso, novos estudos buscaram realizar comparações entre linhagens epidêmicas e linhagens ancestrais (126,127).

Visto que as epidemias causadas por ZIKV estão associadas a linhagem asiática, a atenção foi voltada para a evolução da linhagem asiática em si. Análises filogenéticas indicaram um painel de alterações nucleotídicas e de substituições de aminoácidos que surgiram durante a propagação de ZIKV da Ásia para as Américas. De acordo com o estudo filogenético realizado por Pettersson *et al.*, os autores identificaram pelo menos 28 mutações não sinônimas a partir da linhagem ancestral Malásia, 1966. Dentre essas mutações, 2 ocorreram na proteína prM, 3 na proteína E, 2 na NS1, 1 na NS2A, 3 em NS3, 6 em NS4N e 11 mutações na proteína NS5 (Figura 1.5) (119,128).

A proteína NS5 foi reportada como aquela que mais sofreu mutações não sinônimas ao longo da evolução da linhagem ancestral asiática, Malásia 1966. Embora estudos mais específicos ainda sejam necessários, acredita-se que a mutação M/T2634V tenha sido responsável por determinar o subclado americano bem como contribuído para o aumento da incidência de microcefalia na América Latina. Contudo, tanto a microcefalia quanto a síndrome de Guillain-Barré já haviam sido reportadas na Polinésia Francesa, antes do aparecimento dessa mutação (119).

Em um trabalho realizado para comparar a virulência entre uma linhagem de ZIKV contemporânea e uma linhagem asiática ancestral, os autores mostraram que a mutação na proteína prM (prM-S139N) aumentou substancialmente a infectividade de ZIKV em células progenitoras neurais de humano e de camundongos (NPCs – *neural progenitor cells*) e desencadeou microcefalia severa em fetos de camundongo, além de altas taxas de mortalidade em camundongos neonatos. Além disso, análises evolutivas indicaram que a mutação prM-S139N surgiu antes da epidemia que ocorreu na Polinésia Francesa, em 2013, e manteve-se estável durante o espalhamento da epidemia para as Américas (127).

Outro trabalho mostrou que uma mutação na proteína E (E-V763M), intensificou a neurovirulência de ZIKV epidêmico (linhagem PRVABC59, isolada em Porto Rico, 2015) em comparação com uma linhagem asiática ancestral (linhagem FSS13025, isolada em Camboja, 2010), bem como aumentou a transmissão materno-fetal e a viremia, o que facilitou a transmissão urbana (129). Adicionalmente, uma mutação na proteína NS1 (NS1-A982V) aumentou a infectividade de ZIKV em mosquitos *Aedes aegypti* (126). Outrossim, a mutação NS1-A982V aumentou a transmissão cíclica mosquito-camundongo-mosquito, além de ligar a TBK1, promovendo a redução de fosforilação, o que inibe a produção de interferon – β (130). Ademais, não somente mutações únicas estão relacionadas com a virulência de ZIKV, mas algumas mutações presentes na linhagem Asiática contemporânea (C-T106A, prM-V123A, NS1-A982V e NS5-M3392V), atuam sinergicamente, e aumentam a aptidão viral (131).

Por fim, essas descobertas indicam um painel de mutações que têm alterado as características fenotípicas de ZIKV, incluindo a severidade da doença, a transmissibilidade e a aptidão viral ao longo da sua evolução (112). No entanto, essas mutações podem ser melhor investigadas usando métodos de genética reversa, a fim de avaliar o impacto dessas mutações em modelo *in vitro* e *in vivo*.

1.6 Sistemas de Genética Reversa para estudos de ZIKV

A genética reversa consiste em uma importante metodologia utilizada para a obtenção de clones infecciosos de ZIKV e de outros flavivírus (132,133), tendo em vista a limitação da manipulação genômica diretamente na molécula de RNA, como é o caso do genoma de ZIKV (50). Diante disso, a utilização da genética reversa tem contribuído para o entendimento da replicação viral, de fatores genéticos que possam estar relacionados à patogênese ou infectividade, à resposta imune e evolução viral, além da utilização para o desenvolvimento de vacinas a partir da obtenção de vírus sintéticos atenuados (134–139).

Apesar da genética reversa ser um bom método para os estudos envolvendo *Flavivirus*, algumas limitações impactam na eficiência desse método. As sequências genômicas de flavivírus são notoriamente difíceis de propagar em bactérias, devido à presença de promotores crípticos bacterianos, que promovem a expressão de proteínas virais resultando em toxicidade para as bactérias (132,139). Desta maneira, diferentes abordagens para lidar com essa problemática têm sido exploradas, incluindo inativação de promotores crípticos bacterianos usando mutagênese silenciosa (140), divisão do cDNA viral em dois ou mais plasmídeos (141), utilização de vetores com baixo número de cópias (142) e inserção de íntrons no genoma viral (143).

No entanto, considerando as inúmeras mutações identificadas nas linhagens contemporâneas de ZIKV ao longo de sua evolução, vários estudos utilizaram a genética reversa, valendo-se de diferentes abordagens para lidar com as limitações envolvendo o genoma de flavivírus, para a construção de clones infecciosos do vírus Zika, com a finalidade de pesquisar as contribuições dessas mutações na alteração do fenótipo viral (126,127,129).

Diferentes estratégias são utilizadas para a recuperação de ZIKV. A primeira, consiste na geração de RNA transcrito a partir de clones cDNA contendo o genoma completo de ZIKV, com um promotor procariótico (T7 ou SP6) de RNA desenhado na extremidade 5' (144,145). Nesse método ocorre a transcrição *in vitro* e a transfecção dos transcritos para células susceptíveis, e por conseguinte, a

recuperação viral. Alguns autores também mencionam que a adição de HDVr (ribozima do vírus Hepatite D) após o último nucleotídeo do genoma de ZIKV produz a extremidade 3' de RNAs sintéticos com uma melhor acurácia (146).

Outros trabalhos utilizam como abordagem estratégica, o uso de plasmídeos contendo o genoma completo a jusante do promotor CMV (citomegalovírus). Exemplos dessa abordagem estão descritos nos trabalhos de Schwartz *et al.*, de 2016 (147) e de Lu *et al.*, de 2019 (148) que além do promotor CMV, carrega ao final do genoma de ZIKA, uma calda de poliadenilação (polA) que compõe um sítio terminal de transcrição do vírus símio (SV40), além da adição de HDVr. A recuperação viral ocorre após a transfecção dos plasmídeos diretamente em células susceptíveis que produzem as partículas virais. Nesse método, o plasmídeo é necessário apenas para iniciar a transcrição do RNA, o qual é traduzido e replicado, mimetizando uma infecção nas células transfectadas (139).

A utilização de amplicons subgenômicos infecciosos (ISA) também consiste em um método para a obtenção de clones infecciosos de ZIKV. Essa metodologia não requer etapa de clonagem, propagação de cDNA plasmidial ou transcrição do RNA *in vitro*. Nessa abordagem, são gerados fragmentos de cDNA contendo sobreposição de aproximadamente 100pb, que compreendem o genoma completo de ZIKV. O primeiro e o último fragmento são flanqueados respectivamente na extremidade 5' e 3' pelo promotor CMV e HDVr seguido de polA. Os amplicons obtidos são transfectados em células susceptíveis, e ocorre a recombinação homóloga *in vivo*, gerando clones completos de ZIKV (149–151).

O genoma de ZIKV também pode ser obtido através de fragmentos de PCR contendo sequências homólogas para posterior recombinação. No trabalho de Qin *et al.*, o genoma de ZIKV foi dividido em quatro fragmentos de PCR, onde o primeiro fragmento foi obtido por amplificação utilizando iniciadores contendo a sequência do promotor T7. Os fragmentos são, por fim, clonados em plasmídeo de cópia única (pWSK29) usando a fusão por recombinação homóloga, os quais são transfectados em células competentes (152).

Novos métodos têm sido utilizados para a construção de clones infecciosos. O método de montagem de Gibson foi utilizado no trabalho de Pan, *et al.*, em 2018,

para a obtenção de um clone infeccioso de adenovírus humano tipo 14 (153). A montagem de Gibson consiste em um método de reação única e isotérmica, o qual pode montar múltiplas moléculas sobrepostas de DNA através da ação combinada de *Phusion* DNA polimerase, T5 exonuclease e Taq DNA ligase. Neste método, a T5 exonuclease remove nucleotídeos na região terminal 5´ deixando as extremidades 3´ expostas. A enzima *Phusion* DNA polimerase, completa as lacunas após o anelamento dos fragmentos, e a Taq DNA ligase, sela os fragmentos (154–156).

Perante as diferentes metodologias utilizadas para a obtenção de clones infecciosos de ZIKV, os ensaios de genética reversa tendem a ser uma metodologia essencial e eficaz para investigar os determinantes genéticos da infecção e patogênese do ZIKA, a transmissão vetorial além do desenvolvimento de protótipos vacinais (138).

1.7 Potenciais candidatos vacinais para ZIKV

A emergência do vírus Zika e a associação da infecção pelo vírus com a microcefalia e com a Síndrome de Guillain-Barré, levou ao esforço da comunidade científica global no desenvolvimento de vacinas. A viabilidade de desenvolver uma vacina segura e eficaz contra ZIKV é respaldada pela disponibilidade de vacinas licenciadas para outras flavivirose como: febre amarela, encefalite transmitida por carrapatos, encefalite japonesa, e dengue (157).

Com base em projetos anteriores de desenvolvimento de vacinas contra flavivírus, bem como no conhecimento de suas estruturas virais, tal qual o reconhecimento da proteína E como o principal alvo antigênico, e o entendimento dos mecanismos de neutralização, várias estratégias de vacinas já avançaram para o estágio de avaliação clínica com uma velocidade sem precedentes (158).

Os candidatos vacinais que se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento, utilizam tecnologias distintas, tais como: vírus inativados, vírus vivos atenuados, vírus quiméricos atenuados e subunidades de ácido nucleico ou

partículas virais (157,158). A tabela 1.1, exibe um resumo das vacinas para Zika vírus que estão em desenvolvimento.

Tabela 1.1 - Vacinas contra ZIKV em desenvolvimento.
(Adaptado de Shan et al., 2018) (157).

Estratégia	Antígeno	Subsidiário	Referência	
Vírus inativado	Vírus inativado por formalina	WRAIR/BIDMC	Abbink <i>et al.</i> , 2016 (159)	
		TAKEDA	Han <i>et al.</i> , 2021 (160)	
		Bharat Biotech International	Sumathy <i>et al.</i> , 2017 (161)	
Subunidade viral	DNA	GeneOne Life Science, Inc./Inovio Pharmaceuticals	Tebas <i>et al.</i> , 2017 (162)	
		VRC/NIAID	Dowd <i>et al.</i> , 2016 (163)	
	mRNA	Moderna Therapeutics	Richner <i>et al.</i> , 2017 (164)	
		University of Pennsylvania	Pardi <i>et al.</i> , 2017 (165)	
	Vetor viral	Themis Bioscience		
		BIDMC	Abbink <i>et al.</i> , 2016 (159)	
	Proteína E	BILS		Xu <i>et al.</i> , 2018 (166)
			Arizona State University	Yang <i>et al.</i> , 2018 (167)
		University of Hawaii	To <i>et al.</i> , 2018 (168)	
	Peptideo	NIH		
VLP	TechnoVax, Inc	Boigard <i>et al.</i> , 2017 (169)		
Vírus vivo atenuado	Vírus Zika atenuado	UTMB//IEC	Shan <i>et al.</i> , 2017 (170)	
	Quimera de flavivirus	NIAID/NIH BIME Sanofi	Li <i>et al.</i> , 2018 (171)	

Notas: WRAIR – Instituto de Pesquisa Walter Reed Army; BIDMC – Centro Médico Diaconisa Beth Israel; NIAID – Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas; VRC – Centro de Pesquisa em Vacina; NIH – Instituto Nacional de Saúde; UTMB – Universidade do Texas Ramo Médico; PAHO – Organização Pan-americana de Saúde; IEC – Instituto Evandro Chagas; BILS – Instituto de Ciências da Vida de Beijing; BIME – Instituto de Microbiologia e Epidemiologia.

As diversas pesquisas envolvendo vacinas contra ZIKV exibem uma quantidade substancial de dados pré-clínicos, sugerindo que a indução de imunidade efetiva é possível. No entanto, várias questões permanecem em relação ao tipo e nível de imunidade necessária para proteger o feto da viremia e se será necessária a redução ou a prevenção absoluta da viremia. Ademais, prevenir completamente a viremia parece ser uma meta ambiciosa no ponto de vista de Morabito e Graham, 2017 (158).

Sabe-se, no entanto, que células TCD8 podem contribuir tanto para a eliminação viral quanto para a patologia na infecção pelos vírus da Dengue e do Oeste do Nilo (172,173), todavia, o papel dessas células na infecção pelo vírus ZIKV, em humanos, ainda é desconhecido (158). Contudo, estudos utilizando camundongos imunodeficientes sugerem que as células T apresentam um papel importante na proteção contra a infecção por ZIKV (174,175). Portanto, se células T, especialmente TCD8, são importantes para a eficácia de uma vacina, e principalmente para a proteção do feto, as abordagens utilizando vírus atenuado podem ser vantajosas devido à sua capacidade de induzir respostas mediadas por células TCD8, considerando que abordagens utilizando vírus inativados, ou subunidades virais podem ser mais limitadas a esse respeito (158).

As vacinas inativadas ou de subunidades virais não são infecciosas, e usualmente necessitam de mais de uma dose, ou reforço periódico. Por outro lado, vacinas derivadas de vírus vivos atenuados exibem como vantagem a rápida imunidade e a proteção duradoura, que pode configurar uma dose única. Todos esses detalhes contribuem na praticidade de imunizar populações em áreas remotas, ou de assegurar a imunidade da população como um todo por não precisar contar com a adesão da população para a obtenção de reforços periódicos. Porém, essas vacinas podem conferir riscos para a saúde de mulheres grávidas, crianças e idosos, portanto, a escolha da vacina deve ser realizada com cautela (157). Desta forma, é importante combinar a abordagem apropriada da vacina em relação a população alvo. Por exemplo, uma vacina que promove uma imunidade relativamente curta, pode ser vantajosa para uma intervenção durante um surto, para viajantes às áreas endêmicas, para mulheres que estejam planejando

gestação, entre outros grupos. Por outro lado, as abordagens voltadas para o grupo infanto-juvenil, ou adultos em geral, necessitam de imunização de longa duração, para minimizar a necessidade de repetidas doses de reforço (158) .

Um grande exemplo de vacinas de vírus vivos atenuados é a vacina da febre amarela, contra o vírus atenuado da febre amarela 17D (176). Essa vacina tem demonstrado ser uma abordagem promissora para a geração de imunidade duradoura contra esse flavivírus e, além disso, é uma vacina segura, com uma alta taxa de soroconversão e uma baixa frequência de efeitos adversos (176). A segurança e imunogenicidade confiadas ao vírus vacinal 17D, tornou-o um potencial vetor para o desenvolvimento de protótipos vacinais (177).

Embora o vírus 17D tenha sido atenuado por passagens seriadas em embrião de camundongo e de galinha (178), as abordagens para o desenvolvimento de vacinas para ZIKV têm utilizado métodos mais premeditados. Uma abordagem para obtenção de vírus ZIKV atenuado utilizou mutagênese direcionada à região 3'UTR para atenuar uma cepa de ZIKV proveniente de Camboja (FSS13025). Essa mutação conferiu atenuação viral e proteção em camundongos A129 e em primatas não humanos. Além disso, preveniu a transmissão fetal em camundongos C57BL/6, previamente tratados com bloqueadores de receptor de interferon alfa e beta (170,179).

Em outro trabalho, os autores obtiveram um vírus derivado da linhagem contemporânea ZIKV GZ02, através da tecnologia do clone infeccioso, contendo três alterações únicas nas proteínas E, NS1 e NS5. O vírus obtido apresentou importante diminuição da virulência em camundongos em comparação ao vírus selvagem e, além disso, não foram observadas desordens neurológicas nos animais infectados. Ademais, os autores mostraram que o vírus teve potencial imunogênico e conferiu proteção às fêmeas imunizadas, bem como aos seus filhotes, os quais também foram protegidos contra as desordens neurológicas que o vírus pode promover (180).

Um clone infeccioso quimérico dos vírus Dengue e Zika, também foi construído com o intuito de obter uma vacina de vírus atenuado. Nesse trabalho, os autores utilizaram o vírus vacinal DENV2-PDK-53 como ponto de partida, e

substituíram as regiões codificadoras para as proteínas prM e E pelas regiões análogas do vírus Zika, derivado da linhagem PRVABC59. Os resultados demonstraram um potencial vacinal, tendo em vista a atenuação observada através da diminuição da patogenicidade e virulência do vírus construído, bem como a indução de uma resposta imune que conferiu proteção de camundongos AG129 contra ZIKV (181). Em outro trabalho, uma mutação na proteína NS2A (A175V) no clone infeccioso de ZIKV, baseado em uma linhagem do Rio Grande do Norte, causou uma redução na síntese de RNA viral em cultura de células, exibindo um perfil altamente atenuado em modelo *in vivo* e induzindo uma proteção completa em animais desafiados com ZIKV selvagem (182). Ainda nesse contexto, a utilização do vírus vacinal JEV SA14-14-2 (vírus vacinal vivo atenuado contra encefalite japonesa), serviu como base para o desenvolvimento de um vírus vacinal quimérico contra ZIKV. As substituições dos genes E e prM do vírus JEV SA14-14-2 pelos genes equivalentes, derivados do vírus Zika, linhagem FSS13025, também resultaram em atenuação viral (183).

Uma abordagem diferente, para a obtenção de vírus atenuados, é a alteração de códons de uma sequência genômica. A estratégia, chamada pelos autores de *desotimização de pares de códons*, levou ao desenvolvimento de um vírus atenuado com potencial vacinal. Nesse trabalho, os autores alteraram os códons nas sequências das proteínas E e NS1, mantendo 100% da integridade aminoacídica, e obtiveram vírus com importante diminuição da taxa de replicação viral em Células Vero e da virulência em modelo animal. Mais do que isso, o vírus construído conferiu imunidade aos animais, com um título robusto de anticorpos neutralizantes e protegeu contra a transmissão vertical (184).

1.8 Alteração de códons para estudos de atenuação viral

O código genético é redundante, e muitos aminoácidos podem ser traduzidos por mais de um códon. Essa redundância é um fator chave na modulação da eficiência e acurácia de produção da proteína e na manutenção da mesma

sequência de aminoácidos de uma proteína (40). Códonos alternativos dentro de um mesmo grupo que codifica o mesmo aminoácido são chamados de códonos sinônimos, entretanto, códonos sinônimos não são selecionados de maneira randômica dentro e entre genomas, e isso é referido como tendência do uso de códonos (185).

O padrão de uso de códonos dos vírus reflete mudanças evolutivas, que permitem otimizar sua sobrevivência e aptidão ao ambiente externo, bem como aos seus hospedeiros (40). Tendo em vista que as mutações sinônimas não alteram a sequência de aminoácidos de uma dada proteína, elas geralmente são consideradas seletivamente neutras (186). Contudo, muitos organismos e vírus exibem uma tendência de uso de códonos que ainda são inexplicáveis (187,188). Em linhas gerais, a tendência do uso de códon pode ser atribuída à eficiência da tradução, onde genes altamente expressos apresentam códonos que são compatíveis com a abundância dos seus respectivos tRNAs em uma dada célula ou tecido (189).

A tendência do uso de códonos pode ser analisada pelo número efetivo de códonos (ENC). Esse parâmetro é utilizado para quantificar a tendência absoluta do uso de códon, independentemente do número de genes e de aminoácidos. Valores de ENC variam de 20, onde indicam tendência extrema de uso de códon, ou seja, a tendência é de apenas um códon para o aminoácido correspondente, até 61, indicando que não há uma tendência, ou seja, há possibilidade de uso de qualquer códon sinônimo para o aminoácido correspondente (40,186).

O nível de expressão de um determinado gene também pode ser medido quantitativamente através do índice de adaptação de códon (CAI). Esse parâmetro prevê o nível de expressão de um gene com base em sua sequência de codificação. Os valores variam de 0 a 1, onde códonos mais frequentes mostram maior adaptação relativa ao hospedeiro (190).

Experimentos envolvendo vírus de RNA, que em geral apresentam pequenos genomas, seleção natural eficiente e o alto nível de dependência do hospedeiro, revelaram que mutações sinônimas tem impacto significativo na aptidão viral. Os genomas de muitos vírus RNA se dobram em complexos secundários e estruturas

terciárias que são importantes para a replicação, tradução ou evasão da imunidade inata do hospedeiro, e essas estruturas podem ser atravancadas por alterações sinônimas (191,192). Além do mais, o conhecimento do uso de códons dos vírus pode fornecer informações sobre a evolução de suas moléculas, permitindo uma melhor compreensão da regulação da expressão de um gene viral e a otimização do desenho de vacinas vivas, para as quais a eficiência da expressão de proteínas virais deve ser suficiente para gerar imunidade (40).

A recodificação de sequências genômicas, por meio da alteração de códons, consiste em um método recente para o desenvolvimento de vírus atenuado. Por exemplo, a recodificação da proteína NS5 do vírus da encefalite transmitida por carrapatos, através da introdução de um grande número de mutações sinônimas, promoveu a atenuação desse vírus. Os resultados mostraram uma diminuição importante na neurovirulência e na neuroinvasividade do vírus recodificado em relação ao vírus selvagem (193). A alteração de códons de outros vírus como Influenza, Dengue, Chikungunya e vírus da estomatite vesicular, também apresentaram resultados que configuraram a atenuação viral (194–197).

Por outro lado, existe ainda a tendência de pares de códons, que é interpretada com uma frequência desigual no uso de pares de códons sinônimos. Baseado num algoritmo para quantificar essa tendência, todos os códons aos pares configuram uma pontuação (*codon pair bias score* - CPB) (195,198). Quando o CPB de uma sequência tem valor positivo, significa que a sequência é super-representada, o que indica que esses são os códons favoritos pelo organismo, enquanto sequências que apresentam CPB negativo são sub-representadas (195,199). Sabendo disso, também é possível planejar sequências genômicas contendo pares de códons sub-representados, para obtenção de vírus sintéticos atenuados, como protótipos vacinais (198,200).

No trabalho realizado por Li, P. *et al* (2018), vírus sintéticos foram obtidos por genética reversa contendo pares de códons sub representados, nas sequências das proteínas E e NS1. Nesse trabalho os autores demonstraram que o vírus apresentou *in vitro* e *in vivo* um fenótipo atenuado em relação ao vírus selvagem. Além disso, o vírus apresentou uma potente imunogenicidade, a qual conferiu proteção aos

animais vacinados com o vírus atenuado e desafiados com o vírus selvagem (184). A mesma abordagem, ou seja, a utilização de códons aos pares sub representados na codificação do capsídeo de poliovírus, levou a uma diminuição nas taxas de tradução da proteína e acarretou atenuação viral. Do mesmo modo que o trabalho anterior, poliovírus contendo pares de códon sub-representados foram capazes de infectar e conferir imunidade protetora a camundongos (198).

Análises experimentais de uso de códons e evolução genômica têm sido facilitadas pelos avanços da biologia sintética, a qual permite gerar genomas inteiros contendo inúmeras mutações sinônimas (201). Por fim, a utilização dessas abordagens permite a obtenção e a avaliação de um grande número de sequências mutadas de forma sinônima, com similaridade variável e com uma variedade de determinantes de aptidão viral (186).

1.9 Justificativa

O impacto que a epidemia de Zika teve sobre a saúde pública foi além dos milhares de casos de infecção registrados. Famílias cujos bebês foram afetados pela síndrome congênita de Zika continuam lidando com os prejuízos causados à saúde dessas crianças, que convivem com sequelas, até hoje, irreversíveis.

Felizmente, uma gradativa redução na transmissão de ZIKV ocorreu nos últimos anos. No entanto, o vírus continua sendo um patógeno emergente significativo, tendo em vista os fatores associados à transmissibilidade das flaviviruses. Dada a importância do vírus Zika e a falta de uma vacina disponível ou de drogas para o tratamento da infecção, é importante a compreensão dos mecanismos pelos quais o ZIKV se tornou tão significativo, sob o ponto de vista clínico e epidemiológico. Ademais, os aspectos básicos da infecção por esse vírus ainda não estão totalmente esclarecidos.

Previamente a este trabalho, um estudo filogenético, em colaboração com Dr. Gonzalo Bello (IOC, Fiocruz), demonstrou diversas alterações sinônimas e não sinônimos ao longo da evolução de ZIKV, a partir da linhagem ancestral da Malásia

(1966), as quais, em sua maioria, ocorreram nas sequências das proteínas NS4B e NS5. Essa observação foi o pontapé inicial para a escolha desses genes como alvo do estudo desenvolvido nesta tese.

Pretendemos contribuir com a comunidade científica, disponibilizando de uma abordagem eficaz e reprodutível para a obtenção de clones infecciosos de ZIKV. Desta forma, a obtenção de um painel de vírus Zika sintéticos, proverá conhecimento para estudos de virulência e atenuação viral. Nesse cenário, obtivemos, primeiramente, um clone infeccioso de ZIKV derivado da linhagem epidêmica Rio-U1, a partir do qual derivamos variantes virais contendo alterações nas proteínas NS4B e NS5.

Para avaliar o quanto as alterações nucleotídicas, identificadas nas proteínas NS4B e NS5, impactaram na virulência de ZIKV ao longo da evolução da linhagem ancestral, construímos uma variante quimérica, contendo o genoma baseado no clone infeccioso ZIKV – Rio-U1, substituindo as sequências das proteínas NS4B e NS5 pelas sequências equivalentes baseadas na linhagem asiática ancestral (P6-740; Malásia, 1966). Além disso, ao regressar a sequência codificante dessas proteínas para a linhagem asiática ancestral, visamos a obtenção de um vírus atenuado, que pudesse ser um protótipo vacinal.

Almejamos ainda, a obtenção de variantes virais contendo centenas de mutações sinônimas, nas sequências codificantes das proteínas NS4B e NS5, baseadas na tendência do uso de códons. Tendo em vista que essas proteínas possuem um papel importante na replicação viral, pretendemos desotimizar sua expressão, por restringir a tradução desses genes, e desta forma gerar variantes virais atenuadas e com potencial vacinal.

O desenvolvimento de protótipos vacinais demonstra a capacidade da comunidade científica de responder a ameaças epidêmicas. E mais importante do que a aquisição de uma vacina, a conquista do conhecimento serve como um paradigma para a preparação da comunidade científica no combate a futuras doenças emergentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obtenção de um painel viral de ZIKV, construído pela tecnologia de clone infeccioso, para estudos de virulência e atenuação viral.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Parte 1.

Construir, por tecnologia do clone infeccioso, vírus Zika baseado na sequência do Rio-U1 (IC.Rio-U1), isolado durante a epidemia no Brasil em 2016 (GenBank: KU926309);

Caracterizar o vírus sintético IC.Rio-U1 através de estudos de replicação viral em sistemas celulares e em modelo animal.

Comparar a patogenicidade e virulência entre o constructo IC.Rio-U1 e o vírus parental Rio-U1.

2.2.2 Parte 2.

Substituir a sequência dos genes NS4B e NS5 no clone IC.Rio-U1, pelos genes equivalentes da linhagem ancestral P6-740, Malásia 1966 (GenBank: KX377336).

Comparar a patogenicidade e virulência entre o constructo IC.Rio-U1 e o vírus quimérico IC.ZKMal, o qual contém os genes NS4B e NS5 com sequência genômica baseada na linhagem ancestral.

Caracterizar o vírus sintético IC.ZKMal através de estudos de replicação viral em sistemas celulares e em modelo animal.

2.2.3 Parte 3.

Construir variantes de IC.Rio-U1, com alteração na frequência de códons nos genes NS4B e NS5, para estudos de atenuação viral;

Gerar sequências dos genes NS4B e NS5 contendo mutações sinônimas, inseridas na sequência dos genes por permuta de bases nucleotídicas.

Caracterizar a patogenicidade e virulência das variantes de IC.Rio-U1 contendo alteração de códons nos genes NS4B e NS5, através de estudos de replicação viral em sistemas celulares e em modelo animal.

Avaliar o impacto das alterações de códons, nos genes NS4B e NS5, na atenuação viral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Certificados

O Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus (LABMOF), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, detém junto à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, a licença para desenvolvimento de trabalhos com Organismos Geneticamente Modificados (OGM) nível 2 (CTNBio – CQB 0105/99).

Os experimentos utilizando o modelo animal AG129, estão sob a certificação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC) e licença L-034/2019, através do protocolo intitulado “Estudo comparativo da virulência de isolados do vírus Zika e da Febre Amarela”.

3.2 Cultura de células

Os experimentos *in vitro* foram realizados em culturas de células Vero, as quais correspondem a uma linhagem celular derivada do epitélio renal de macacos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*). Essas células foram obtidas da Coleção Americana de Culturas e Depósitos (ATCC-CCL81), e cultivadas em meio de cultura Earle's 199 (Gibco) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 40 µg/ml gentamicina (Gibco). Além das células Vero, outras linhagens celulares também foram utilizadas para ensaios de cinética viral. A Arpe-19, uma linhagem celular derivada de epitélio retinal humano (ATCC CRL - 2502), foi cultivada em meio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; ThermoFisher) suplementado com 10 % de SFB e penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/ml). As células SK-N-AS são uma linhagem celular derivada de neuroblastoma humano (ATCC CRL - 2137) e foram cultivadas em meio de Mínimo Essencial de Eagle Modificado (DMEM, ThermoFisher), suplementado com 10 % de SFB, penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/ml) e 0,1 mM de solução de aminoácido não essencial (Gibco). Essas células foram mantidas em estufa a 37

°C, sob uma atmosfera contendo 5 % de CO₂. As linhagens celulares, derivadas de mosquitos, utilizadas neste trabalho foram C6/36 (*Aedes albopictus*; ATCC CRL-1660) e Aag2 (*Aedes aegypti*; ATCC CCL-125), gentilmente cedidas pelo Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira. As células C6/36 foram cultivadas em meio Leibovitz's L-15 (ThermoFisher), suplementado com 5 % de SFB, 10 % de caldo triptose e 40 µg/ml gentamicina. As células Aag2 foram cultivadas em meio Schneider's (ThermoFisher), suplementado com 10 % de SFB e penicilina (100 UI/mL) estreptomomicina (100 µg/ml). Ambas as células de inseto foram mantidas em estufa a 28 °C.

3.3 Construção de vírus sintéticos

3.3.1 Delineamento estratégico para obtenção dos genes sintéticos

O presente trabalho permeou a construção de variantes virais, através da tecnologia do clone infeccioso, baseadas na sequência do vírus isolado Rio-U1 (GenBank: KU926309). Esse vírus circulou na epidemia de 2016 no Brasil e foi isolado no estado do Rio de Janeiro, pelo laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus (LABMOF), Instituto Oswaldo Cruz, a partir de amostra de urina de paciente humano (87). Foram construídas quatro variantes virais. A primeira variante viral construída, tem seu genoma totalmente baseado na sequência do vírus parental Rio-U1 (ANEXO I), que será reportado a partir de agora como IC.ZIKV - Rio-U1. Este clone infeccioso foi a base para a criação dos outros três clones por substituição dos genes modificados de NS4B e NS5. A segunda variante viral, IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal, corresponde a um vírus quimérico, cujas regiões codificadoras das proteínas NS4B e NS5, do vírus Rio-U1, foram inteiramente substituídas pelas sequências das proteínas equivalentes da linhagem ancestral P6-740, (Malásia, 1966; GenBank: KX377336). As demais variantes virais, denominadas IC.ZIKV - ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV - ns4b-ns5/N3, também correspondem a vírus quiméricos, com alterações nas mesmas proteínas, NS4B e

NS5, mas com alterações na sequência codante dessas proteínas por permutação nucleotídica. Para essas últimas variantes virais, utilizamos a ferramenta *CodonShuffle* para gerar sequências das proteínas NS4B e NS5, contendo grandes números de mutações sinônimas ao longo do gene. Essas mutações são inseridas na sequência nucleotídica, através da permuta de bases existentes, sem alterar a sequência aminoacídica das proteínas.

A sequência nucleotídica das proteínas alvo do estudo, do vírus parental Rio-U1, foi utilizada como sequência originária. Essa foi modificada através de duas estratégias de permuta: dN231 e N3. A primeira estratégia, dN231, realiza a permuta nucleotídica entre pares de códons, de modo que as unidades permutadas sejam a segunda e a terceira base do primeiro códon e a primeira base do códon próximo. Já a segunda estratégia, N3, permuta a terceira posição de cada códon ao longo do gene (Figura 3.1).



Figura 3.1 - Diagrama: abordagens de permuta de bases.

A – Estratégia dN231; permuta as bases nitrogenadas entre pares de códons. B – Estratégia N3; permuta a terceira base nitrogenada de cada códon.

3.3.2 Genes sintéticos

Para a obtenção do painel viral, foram desenhados fragmentos sintéticos de DNA complementar (cDNA) que abrangem todo o genoma do ZIKV. Em cada fragmento foram inseridos em suas extremidades sítios flanqueadores únicos, de modo que a digestão, através das enzimas de restrição correspondentes, permita excisar o fragmento de interesse e direcionar as clonagens para a obtenção do genoma completo.

Para a construção do vírus IC.ZIKV - Rio-U1, foram sintetizados 4 fragmentos, denominados Z1, Z2, Z3 e Z4. Já para construção do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal, foram sintetizados outros dois fragmentos, denominados ZMal-1 e

ZMal-2, que correspondem, respectivamente, aos fragmentos Z4 e Z2, porém, possuem as sequências das proteínas NS4B e NS5 baseadas na linhagem ancestral Malásia 1966 (GenBank: KX377336.1).

Para a construção dos vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, foram sintetizados outros dois pares de fragmentos para cada variante viral. Esses fragmentos seguem a mesma lógica de clonagem por substituição realizada nos fragmentos ZMal-1 e ZMal-2, ou seja, são análogos aos fragmentos Z4 e Z2, os quais apresentam as proteínas alvo desta pesquisa, NS4B e NS5. Os fragmentos sintéticos utilizados na obtenção do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 serão reportados como dN231-A e dN231-B, ao longo da descrição deste trabalho. E os fragmentos sintéticos para a obtenção do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, são reportados como N3-A e N3-B. A parte A desses fragmentos são análogas ao fragmento Z4 e a parte B, ao fragmento Z2. A figura 3.2, exibe, de maneira esquemática, a base estratégica criada para a obtenção dos fragmentos sintéticos, utilizada na construção do painel viral. A tabela 3.1 demonstra maiores detalhes dos fragmentos sintéticos, como por exemplo o tamanho dos fragmentos, a posição genômica a que se referem, a região codante, os principais sítios flanqueadores utilizados para a montagem dos vírus, entre outros. Todos os fragmentos foram sintetizados pela *GenScript*, seguindo as sequências criadas e fornecidas pela equipe do LABMOF.

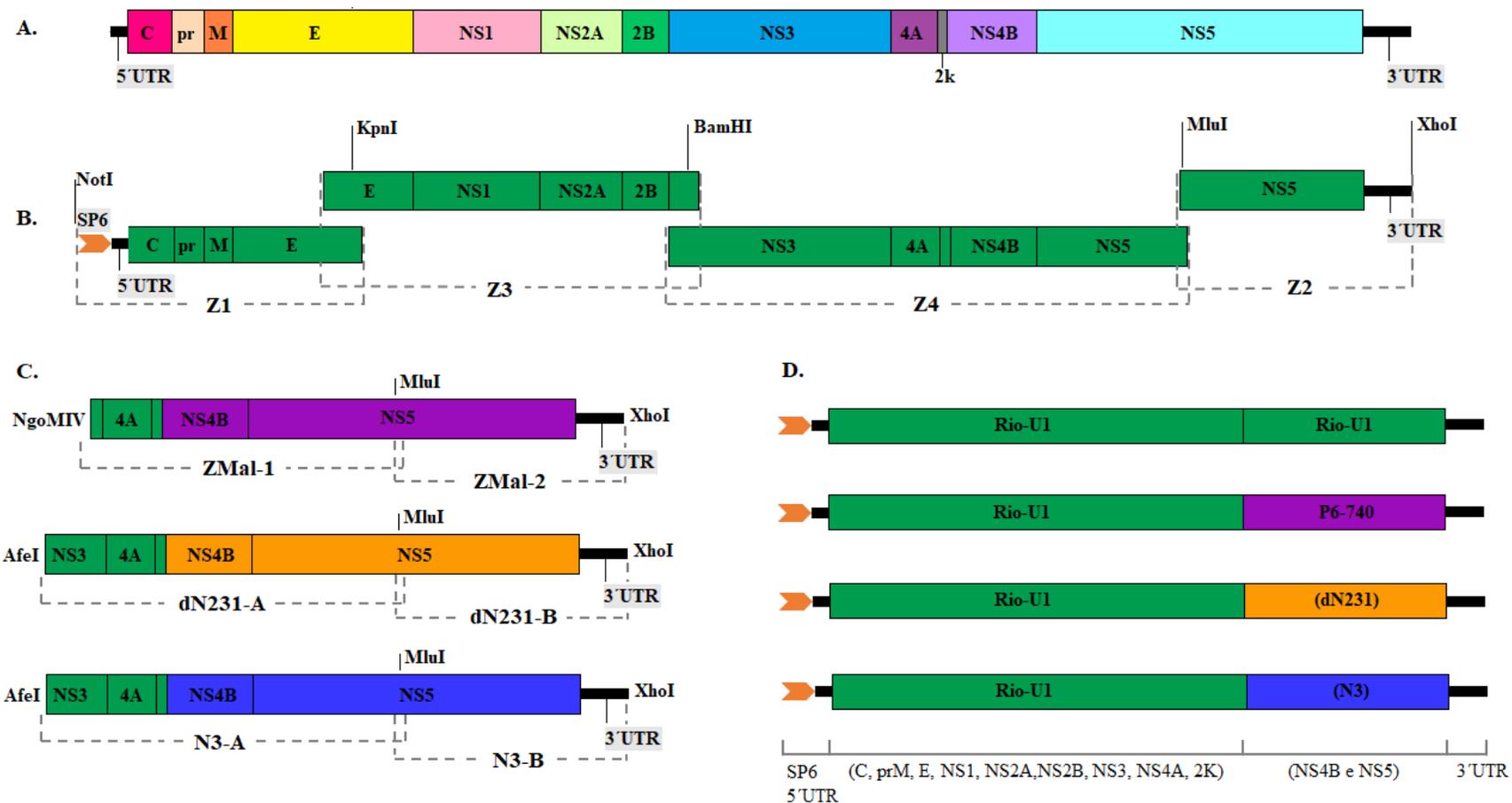


Figura 3.2 - Esquema estratégico para obtenção dos fragmentos sintéticos e montagem do painel viral.

A – Diagrama do genoma completo de ZIKV, exibindo as regiões não traduzidas, as proteínas estruturais e as proteínas não estruturais. B – Diagrama dos fragmentos sintéticos baseados na sequência do vírus Rio-U1. O diagrama exhibe os sítios de restrição desenhados para a estratégia de clonagem, o sítio de transcrição para SP6 RNA polimerase e a composição de cada fragmento sintético. Os fragmentos estão delimitados pelas linhas tracejadas. A cor verde, representa o genoma baseado no vírus parental Rio-U1. C – Diagramas dos fragmentos sintéticos dos vírus quiméricos. Os diagramas mostram os sítios de restrição utilizados nas clonagens, e a composição de cada fragmento (delimitados por linha tracejada). As cores púrpura, laranja e azul representam as regiões das proteínas alvo (NS4B e NS5) com as alterações estratégicas descritas na seção 3.3.2. D – Painel viral. Diagramas exibindo o cDNA molde final dos 4 vírus sintéticos obtidos.

Tabela 3.1 - Fragmentos de cDNA de ZIKV sintetizados pela *GenScript*

Gene sintético	Vetor inicial	Cepa bacteriana	Posição genômica		Sítios de Clonagem
			Fragmento sintético	cDNA molde final	
Z1	pUC57	<i>Sure</i>	1-2047	1-2001	<i>NotI</i> - <i>KpnI</i>
Z3	pCC1-4K	EPI300	1653-4793	2002-4776	<i>KpnI</i> - <i>BamHI</i>
Z4	pUC57	<i>Sure</i>	4581-8855	4777-8843	<i>BamHI</i> - <i>MluI</i>
Z2	pUC57	<i>Sure</i>	8844-10807	8844-10807	<i>MluI</i> - <i>XhoI</i>
ZMal-1	pUC57	<i>Sure</i>	6336-8855	6342-8843	<i>NgoMIV</i> - <i>MluI</i>
ZMal-2	pUC57	<i>Sure</i>	8837-10807	8844-10807	<i>MluI</i> - <i>XhoI</i>
dN231-A	pUC57	<i>Sure</i>	5967-8855	5969-8843	<i>AfeI</i> - <i>MluI</i>
dN231-B	pUC57	<i>Sure</i>	8837-10807	8844-10807	<i>MluI</i> - <i>XhoI</i>
N3-A	pUC57	<i>Sure</i>	5967-8855	5969-8843	<i>AfeI</i> - <i>MluI</i>
N3-B	pUC57	<i>Sure</i>	8837-10807	8844-10807	<i>MluI</i> - <i>XhoI</i>

3.3.3 Abordagens para obtenção do sistema de dois plasmídeos.

Para a construção dos clones infecciosos de ZIKV, foi utilizado o sistema de dois plasmídeos independentes. Antes de dar início a construção em si, os plasmídeos, contendo os fragmentos sintéticos originais, foram transformados em bactérias eletrocompetentes (Tabela 3.1) para amplificação do número de cópias plasmidiais e obtenção de massa plasmidial suficiente para as etapas posteriores, conforme o protocolo descrito na seção 3.3.4. A extração do DNA plasmidial foi realizada através do *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

Após a ampliação da massa plasmidial, os fragmentos sintéticos foram clonados no plasmídeo pCC1, um plasmídeo de cópia única, seguindo a estratégia de dois plasmídeos independentes. A abordagem utilizada para a obtenção dos plasmídeos recombinantes para cDNA ZIKV, foi a clonagem das extremidades do genoma viral em um plasmídeo, e a região central em um segundo plasmídeo. Na figura 3.3, que consiste na Figura 1 do artigo publicado associado a este trabalho (ver anexo 1), estão esquematizadas as etapas envolvidas na construção do cDNA molde final para obtenção do RNA viral sintético. Para a montagem desses plasmídeos, se partiu de fragmentos de cDNA sintéticos adquiridos junto a *GenScript* e fornecidos clonados em pUC57 ou pCC-1-4K (Tabela 3.1; Figura 3.3-A), os quais foram retirados

dos vetores iniciais através de endonucleases específicas e clonados no plasmídeo pCC1 correspondente, também digerido com as mesmas enzimas de restrição (Figura 3.3-B).

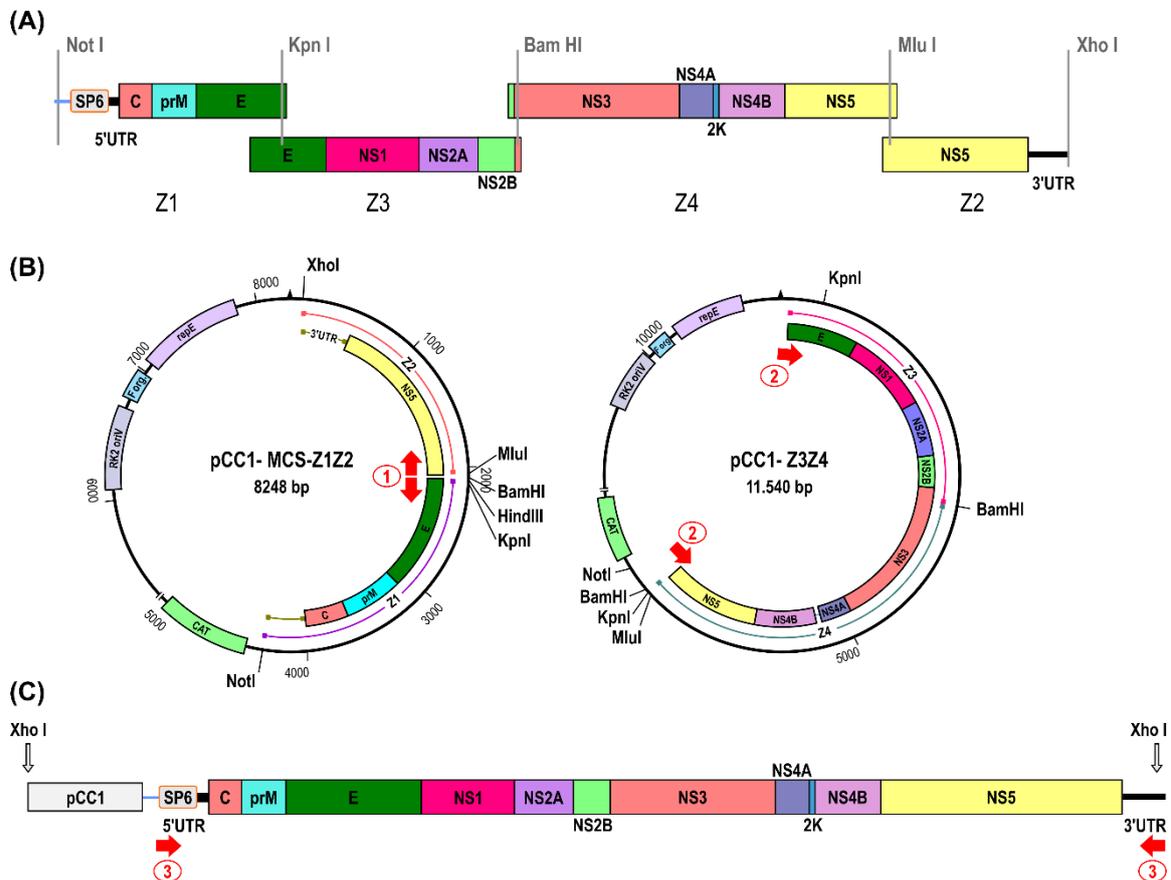


Figura 3.3 - Construção do clone infeccioso de ZIKV.

A – Quatro fragmentos de cDNA foram sintetizados abrangendo todo o genoma de ZIKV conforme representado no diagrama. O fragmento Z1, possui promotor SP6 RNA polimerase fusionado a extremidade 5' do cDNA de ZIKV. Os sítios de restrição usados na montagem dos fragmentos para obtenção do clone infeccioso de zika estão indicados com barra vertical, apontando as posições sobrepostas. B – Sistema de dois plasmídeos, composto pelos plasmídeos pCC1-MCS-Z1Z2 e pCC1-Z3Z4, os quais carregam as extremidades do genoma viral e a região central, respectivamente. C – Representação esquemática do cDNA molde final de ZIKV. As setas em vermelho, e os respectivos números, indicam as posições de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação, para aumento da massa de cDNA.

Tanto os fragmentos sintéticos quanto os plasmídeos foram isolados a partir de gel preparativo após digestão. Para isto, foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% e tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), seguida de purificação do fragmento isolado, usando *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), respeitando o protocolo sugerido pelo fabricante. Em seguida, os plasmídeos digeridos foram submetidos à reação de desfosforilação, com 2 U da enzima SAP (Promega), a 37 °C por 15 minutos, seguida de inativação da enzima, a 65 °C por 15 minutos. Os genes sintéticos

foram ligados aos respectivos plasmídeos, através da ação da *T4 DNA ligase* (Invitrogen), por incubação *overnight* a 4 °C, utilizando-se uma proporção equimolar entre vetor e inserto. Ambas as etapas foram realizadas em condições estabelecidas pelo fabricante. As reações de digestão e ligação foram controladas por eletroforese analítica em gel de agarose.

3.3.4 Clonagem molecular

A obtenção dos plasmídeos pCC1 recombinantes para os diferentes fragmentos de cDNA de ZIKV foi feita por transformação em bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli*, linhagem *TransforMax* EPI300 (Epicentre). As transformações foram controladas com o plasmídeo pUC19 (Invitrogen), utilizado em paralelo, como controle positivo, a todos os ensaios de transformação bacteriana.

Para a eletroporação foi utilizado cubeta de 2mm e o eletroporador *Gene PulserXcell* (Bio-Rad), nas seguintes configurações: voltagem 2500 V; capacitância 25 mf; resistência 200 Ω. Após o pulso elétrico, as bactérias foram incubadas em meio SOC (Invitrogen) por 1 h a 37° C sob agitação constante e então plaqueadas em meio LB sólido contendo 25 µg / mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas *overnight* a 37° C. No dia seguinte, algumas colônias de bactérias isoladas foram cultivadas em 5 mL de meio LB líquido contendo 25 µg / mL de cloranfenicol e novamente incubadas a 37° C, *overnight*, sob agitação constante. Em até 16 horas de incubação, as culturas foram selecionadas pelo critério de turvação, considerando positivas as culturas que se mostraram turvas.

A triagem das culturas foi realizada por PCR de colônia ou por miniprep seguida de digestão analítica. A tabela 3.2 indica a metodologia que foi aplicada para a confirmação das clonagens em cada plasmídeo montado, mencionando as enzimas ou os pares de oligonucleotídeos utilizados, dependendo da abordagem realizada.

Tabela 3.2 - Abordagens utilizadas para triagem das culturas de bactérias contendo o plasmídeo de interesse.

Plasmídeo	Abordagem	Oligonucleotídeos	Enzima	Fragmento
pCC1-Z3Z4	PCR	ZK6F / ZK5R	-	253 pb
pCC1-MCS-Z1Z2		ZK8F / ZK8R	-	645 pb
pCC1-Z3Z4Mal1	PCR	ZK6F / ZK5R	-	253 pb
pCC1-MCS-Z1ZMal2		ZK8F / ZK8R	-	645 pb
pCC1-Z3Z4(dN231-A)	Digestão	-	BssHII	11540 pb
pCC1-MCS-Z1Z2(dN231-B)		-	BstEII	8248 pb
pCC1-Z3Z4(N3-A)	Digestão	-	BstEII	11540 pb
pCC1-MCS-Z1Z2(N3-B)		-	BssHII	8248 pb

Para as reações de PCR de colônia, uma alíquota de 20 µL das culturas selecionadas foi concentrada por centrifugação a 14000 g por 1 min e aplicada diretamente à reação de PCR a fim de triar as culturas que contêm o inserto clonado nos plasmídeos pCC1-Z3Z4 / pCC1-Z3Z4Mal1 e pCC1-MCS-Z1Z2 / pCC1-MCS-Z1ZMal2, através dos pares de oligonucleotídeos ZK6F - ZK5R e ZK8F - ZK8R, respectivamente (Tabela 3.3). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose, e as amostras que apresentaram tamanhos coerentes com o esperado foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico.

Tabela 3.3 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para triagem de culturas positivas para o plasmídeo de interesse.

Oligonucleotídeo	Sequência	Amplicon
ZK6F	5' CAGGACAACCAAATGGCAATC 3'	253 pb
ZK5R	5' CCATCGCCATTAAGGAGTAGTT 3'	
ZK8F	5' GGTTCCAACTGGGAGAACTAC 3'	645 pb
ZK8R	5' TCTCCTCTAACCCTAGTCCC 3'	

A triagem por meio de digestão analítica, ocorreu através da digestão, com 1 U das respectivas enzimas para 1 µg de DNA plasmidial (*QIAprep Spin Miniprep Kit* – Qiagen).

Após a análise das sequências, as culturas que apresentaram o plasmídeo contendo o inserto íntegro, foram inoculadas em 200 mL LB líquido, contendo 25 µg/mL de cloranfenicol, e submetidas a extração de DNA plasmidial, utilizando-se *HiSpeed Plasmid Midi kit* (Qiagen). A extração dos plasmídeos foi controlada por eletroforese em gel de agarose e a concentração dos plasmídeos foi aferida por quantificação fluorimétrica, através do Qubit (Thermo Scientific), seguindo as

recomendações do fabricante. Uma alíquota de cada cultura das bactérias que deram origem ao plasmídeo, foi armazenada a - 30°C em solução de 50 % de glicerol, como estoque de manutenção.

3.3.5 Amplificação do DNA plasmidial por reação de PCR

Conforme será discutido adiante, o vetor de escolha para o desenvolvimento dessa pesquisa, pCC1-4K, um derivativo de pCC1-Fos, consiste em um plasmídeo cópia única, mas que após manipulação bem-sucedida, a presença de uma origem de replicação induzível por arabinose em pCC1 pode aumentar o rendimento de DNA, mediante a suplementação de culturas bacterianas com arabinose. No entanto, o plasmídeo pCC1 fornecido pela *GenScript* tem a região induzível por arabinose deletada. Desta maneira, os plasmídeos foram amplificados por PCR usando a enzima DNA polimerase *Phusion High-Fidelity* (Thermo Fisher Scientific) para otimização da obtenção da massa de cDNA. Os plasmídeos contendo a região central do genoma viral (pCC1-Z3Z4; pCC1-Z3Z4Mal1; pCC1-Z3Z4(dN231) e pCC1-Z3Z4(N3) foram amplificados utilizando o jogo de iniciadores 2F - 2R (Tabela 3.4; Figura 3.3B). Esse par de oligonucleotídeos amplifica o inserto de interesse, e mantém os sítios das endonucleases que são utilizados na etapa de montagem do *cDNA molde* final.

Tabela 3.4 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para aumentar a massa de cDNA.

Oligonucleotídeo	Sequência	<i>Amplicon</i>
1F	5' CCTAAGCTTAGGTACCTTGCAAGGTCCATC 3'	8255 pb
1R	5' GCTTAGGATCCGAGCTCACGCGTCTGTACC 3'	
2F	5' GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG 3'	7456 pb
2R	5' CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC 3'	
M2F	5' CGGATCCTAAGCTTAGGTACCTTG 3'	8255 pb
M2R	5' GATCCGAGCTCACGCGTTTG 3'	
N3F	5' CCTAAGCTTAGGTACCTTGCAAGGTCCATCTGTCC 3'	8255 pb
N3R	5' GCTTAGGATCCGAGCTCACGCGTCTGCACA 3'	
3F	5' CCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACACTA TAGAG 3'	10847 pb
3R	5' AGACCCATGGATTTCCCCACACCGG 3'	

Já os plasmídeos contendo as extremidades do genoma viral (pCC1-MCS-Z1Z2; pCC1-MCS-Z1ZMal2; pCC1-MCS-Z1-dN231-B e pCC1-MCS-Z1-N3-B) foram amplificados integralmente, utilizando os jogos de oligonucleotídeos 1F – 1R para os plasmídeos pCC1-MCS-Z1Z2 e pCC1-MCS-Z1Z2(dn231), M2F – M2R para o plasmídeo pCC1-MCS-Z1Mal-2 e N3F – N3R para plasmídeo pCC1-MCS-Z1Z2(N3) (Tabela 3.4; Figura 3.3B). Esses pares de oligonucleotídeos anelam entre os fragmentos que correspondem às extremidades 5'UTR e 3'UTR, amplificando tanto a região dos insertos quanto a porção plasmidial. Essa amplificação também mantém os sítios de endonucleases utilizados para receber a região central do genoma viral. Outros detalhes da reação de PCR realizada nessa etapa, estão descritos na seção 3.4.3. Após a reação de PCR, os *amplicons* obtidos foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* e *MluI* (Promega), com 2 U de cada enzima para 2 µg de DNA plasmidial, seguindo o recomendado pelo fabricante. A reação da digestão ocorreu sob incubação a 37 °C, por pelo menos 2 horas. Em seguida as enzimas foram inativadas por aquecimento, por 15 minutos a 65 °C. Os *amplicons* digeridos *MluI* e *KpnI* foram submetidos a purificação, através de gel preparativo conforme descrito na seção 3.3.3, para a montagem do cDNA molde final.

3.3.6 Obtenção do cDNA molde

Para a montagem do cDNA molde final, os *amplicons*, digeridos e purificados, tiveram suas concentrações aferidas por quantificação fluorimétrica, utilizando *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (ThermoFisher). Antes de realizar a reação de ligação, o *amplicon* contendo a porção plasmidial, mais as extremidades do genoma viral (pCC1-MCS-Z1Z2 e/ou derivados), foi submetido a reação de desfosforilação, conforme descrito anteriormente na seção 3.3.3.

As reações de ligação entre o *amplicon* pCC1-MCS-Z1Z2 (ou derivados) e do *amplicon* Z3Z4 (ou derivados), foram realizadas em condições equimolares adicionando-se 1 U da enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen) sob as condições estabelecidas pelo fabricante. A reação foi submetida a incubação *overnight* a 4°C, seguida de inativação por aquecimento a 65°C por 15 minutos. Após a ligação, os plasmídeos contendo o DNA molde foram linearizados por digestão, com a enzima *XhoI* (Promega) sob as condições recomendadas pelo fabricante. A digestão ocorreu

sob incubação a 37 °C por 3 h, e em seguida, a enzima foi inativada por aquecimento a 65 °C por 15 minutos.

As amostras contendo os moldes de DNA em fitas lineares, foram submetidas a nova amplificação, através da reação de PCR. Essa reação de PCR foi realizada utilizando a enzima *PrimeStar* GXL DNA Polimerase (Takara) e o par de oligonucleotídeos 3F e 3R (Tabela 3.4; Figura 3.3C). Os *amplicons*, obtidos através dessa última reação de PCR, foram concentrados por precipitação com 10 % de acetato de amônio 3 M e etanol, e eluídos em 8 µL de EB (Qiagen).

O cDNA molde, concentrado pela reação de precipitação, foi utilizado para a reação de transcrição *in vitro*, utilizando-se o SP6 mMACHINE kit (Ambion) seguindo as instruções do fabricante. A presença do RNA transcrito foi verificada por eletroforese em gel de agarose e a concentração foi aferida através do kit de determinação fluorimétrica *Qubit RNA HS Assay Kit* (ThermoFisher).

3.3.7 Transfecção celular e regeneração de vírus recombinante

Células Vero foram recolhidas da monocamada utilizando tripsina, a partir do estoque de manutenção. Essas células foram lavadas com PBS tratado com DEPC. A transfecção celular ocorreu por eletroporação, utilizando 2 µg do RNA total para uma densidade celular de 40.000 células / cm². A eletroporação foi realizada no *Gene PulserXcell* (Bio-Rad), utilizando cubeta de 4 mm sob as seguintes condições: voltagem 200 v, capacitância 850 mf, resistência ∞. Imediatamente após o pulso elétrico, as células foram semeadas em garrafas de 25 cm² com 12 mL de meio Earle's 199 completo. Como controle negativo, a mesma densidade celular foi transfectada apenas com meio Earle's 199 completo. As garrafas contendo as células transfectadas foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ 5%. Diariamente, as células foram observadas sob microscopia óptica, para acompanhar o surgimento de efeito citopático (CPE), por um período de 3 a 5 dias. Após o aparecimento de CPE, o sobrenadante desta cultura celular foi coletado e congelado em alíquotas de aproximadamente 1 ml. A coleta dessa cultura celular, chamada de 1P, foi armazenada em freezer – 80 °C. Antes do preparo do estoque de trabalho, todos os vírus regenerados foram submetidos a extração de RNA, seguida de RT-PCR e sequenciamento nucleotídico para validação da sequência genômica.

3.3.8 Produção dos estoques virais

A obtenção do estoque de segunda passagem (2P) ocorreu a partir da infecção de monocamadas de células Vero. Essas células foram preparadas na véspera da infecção, em garrafas de 150 a 175 cm², com uma densidade celular de 62.500 células/cm² e cultivadas em meio Earle´s 199 completo.

Para a infecção do estoque 2P, 3 mL da cultura 1P foram descongelados e avolumados para 5 mL com meio Earle´s 199 completo. O sobrenadante da garrafa a ser infectada foi totalmente removido, e a monocamada foi infectada com os 5 mL da suspensão viral 1P. Após 1 h de adsorção viral, a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂, a garrafa foi preenchida com meio Earle´s 199 completo para um volume final de 80 mL e novamente foi incubada a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂, por 72h ou até o aparecimento de CPE. O sobrenadante foi então coletado, centrifugado para a remoção de restos celulares, a 700 g por 10 min, e congelado a - 80 °C em alíquotas de 500 µL.

3.4 Ensaios moleculares

3.4.1 Extração de RNA viral

O RNA viral foi extraído a partir do sobrenadante de cultura de células infectadas (ou de amostras de sangue de camundongo AG129). Para a extração de RNA viral, utilizou-se o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen), seguindo as instruções determinadas no manual do fabricante. O RNA eluído foi congelado a - 80 °C em alíquotas, para evitar repetidos ciclos de congelamento-descongelamento.

3.4.2 RT-PCR

Para a detecção do RNA genômico viral e seu sequenciamento, o RNA viral extraído foi submetido à reação de RT-PCR, para amplificação da região de interesse. A síntese da fita de cDNA foi realizada pela transcriptase reversa *Superscript IV First-Strand System* (Invitrogen) e iniciadores randômicos a partir de 10 µL do RNA, sob as condições recomendadas pelo fabricante. Após obtenção do cDNA, utilizou-se os

pares de oligonucleotídeos ZK3F - ZK2R (301 pb) e ZK5F - ZK4R (341 pb) e *GoTaq Green Master Mix* (Promega) para amplificação das regiões de interesse (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-PCR

Oligonucleotídeo	Sequência	Amplicon
ZK3F	5´ GCTACTGGATTGAGAGTGAGAAG 3´	301 pb
ZK2R	5´ CTCAGAGATGGTCCTCTTGTTTC 3´	
ZK5F	5´ CGGACTCCAACCTACCAATTA 3´	341 pb
ZK4R	5´ GACTCTCTCGCCATCAAGTATG 3´	

3.4.3 PCR

A reação de PCR foi realizada tanto para triagem de colônias, após transformação bacteriana, quanto para confirmação da presença de vírus em cultura celulares ou em amostra de sangue animal (AG129). Além disso, também foi realizada a reação de PCR para a amplificação do cDNA viral a partir dos plasmídeos construídos e/ou molde do cDNA viral final. Deste modo, diferentes protocolos foram aplicados de acordo com a finalidade da reação de PCR.

A reação de PCR com finalidade de triagem ou confirmação da transformação bacteriana, foi realizada utilizando-se *GoTaq Green Master Mix* (Promega). Já a reação de PCR para amplificação do DNA plasmidial, foi realizada utilizando-se a enzima *Phusion High-Fidelity* (ThermoScientific). Por fim, para a amplificação do cDNA molde final, a reação de PCR foi realizada utilizando-se a enzima *PrimeStar GXL* DNA polimerase (Takara). Todas as reações foram realizadas sob as condições estabelecidas nos respectivos manuais de cada fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados em cada reação de PCR estão descritos nas seções respectivas às suas finalidades de uso, (Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5). Os programas de termociclagem estão descritos no anexo II.

3.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Para análise dos *amplicons* obtidos, 1 µL de corante azul de bromofenol (Invitrogen) foi adicionado a 5 µL dos produtos da PCR, aplicados em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA, GIBCO-BRL) e submetidos a eletroforese

por aproximadamente 1 h a 85 volts. Para controle, foram aplicados marcadores de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen) ou *Lambda DNA/Hind III* (Promega) paralelamente às amostras. Os géis foram impregnados com solução 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Bio-Rad) e seguido de lavagem com água. As bandas foram visualizadas e fotografadas através do fotodocumentador Gel-Doc XR (Bio-Rad) e sistema de captura de imagem Image Lab.

3.4.5 Sequenciamento nucleotídico

Para o sequenciamento nucleotídico do genoma completo dos vírus construídos, foi realizado primeiramente a extração de RNA viral a partir do sobrenadante das culturas de células Vero, de acordo com a seção 3.4.1. Após aquisição do RNA viral, foram obtidos 8 *amplicons* contendo sobreposição nas extremidades através de RT-PCR, segundo a seção 3.4.2. Contudo, os iniciadores desenhados para a obtenção desses fragmentos estão descritos na tabela 3.6. Os plasmídeos gerados neste trabalho, foram sequenciados da mesma maneira, utilizando o mesmo conjunto de iniciadores. Os *amplicons* obtidos foram analisados por eletroforese, seguido de purificação utilizando-se o *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen).

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o *ABI BigDye terminator V3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Mixture* (Applied Biosystems). Essas reações foram preparadas em placas de 96 poços no LABMOF e a leitura foi realizada pela plataforma multiusuário de sequenciamento de DNA (RPT01A) da FIOCRUZ (PDTIS). As sequências nucleotídicas foram determinadas por eletroforese capilar e analisadas no programa *SeqMan* (DNASTar Lasergene 8), alinhando-se estas com as sequências de referência desenhadas previamente, no delineamento estratégico para obtenção dos genes sintéticos.

Foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos em todos os sequenciamentos, com exceção para as regiões contendo permutas nucleotídicas (nos vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3), pois são regiões cujas sequências são muito diferentes da sequência original, derivada do vírus Rio-U1. No caso do sequenciamento das regiões equivalentes (NS4B e NS5) do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal, não foi necessário o planejamento de novos oligonucleotídeos, pois as

regiões de anelamento desses oligos são compatíveis entre os vírus IC.ZIKV – Rio-U1 e a variante quimérica.

Tabela 3.6 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de regiões sobrepostas do genoma completo de ZIKV sintético para sequenciamento nucleotídico.

Vírus	Oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'
IC.ZIKV-Rio-U1	ZK1F	AGTTGTTGATCTGTGTGAATCAGAC
	ZK1R	GTATGACACGCCCTTCAATCT
	ZK2F	GGCAAACGTGTCGTGGTTCTA
	ZK2R	CTCAGAGATGGTCCTCTTGTTTC
	ZK3F	GCTACTGGATTGAGAGTGAGAAG
	ZK3R	GGGTATGGCTATTGGGTTCAT
	ZK4F	GTTACGTGGTCTCAGGAAAGAG
	ZK4R	GACTCTCTCGCCATCAAGTATG
	ZK5F	CGGACTCCAACCTACCAATTA
	ZK5R	CCATCGCCATTAAGGAGTAGTT
	ZK6F	TCTAATGGGAAGGAGAGAGGAG
	ZK6R	GGTGTCCGGTCATGGCTATTC
	ZK7F	CTTTGACGAGAACCACCCATA
	ZK7R	CTATGAGAGATCCACACCACAAG
	ZK8F	GGTTCCAACCTGGGAGAACTAC
	ZK8R	AGACCCATGGATTTCCCCAC
	ZKGAP3'F	TGGATCTCCAGAAGAGGGACTA
	zkmelt65f	GGTTCCAACCTGGGAGAACTACCTGGTCAAT CCATG
	zkmelt65r	AGACCCATGGATTTCCCCACACCGGC
	zkmelt70f	GGTTCCAACCTGGGAGAACTACCTGGTCAAT CCATGGAAAGGGAGAATGGATGACCAC
zkmelt70r	AGACCCATGGATTTCCCCACACCGGCCGC C	
zkgap5ar	GCTCACACGGGCTACTC	
IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231	dN231-1F	CATAGGCAGGAATCCCAACAA
	dN231-1R	GGAGACAGCCACTGCAATTA
	dN231-2F	CATGAAGAACCCTGTGGTAGAT
	dN231-2R	CGTTTATGTTTGCCCAGTTCTT
	dN231-3F	GAGCTACTATGCCGCTACAATTA
	dN231-3R	CTTCTTCAACTTCAGGGCTAGA
	dN231-4F	GATCTCCCATCTTTGAGGTGTAG
	dN231-4R	CTCAAGAGAATGGCTGTGAGTG
IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3	N3-1F	TCCCAACAAACCTGGAGATG

N3-1R	GAGGTAGCTGCCGTGATAAG
N3-2F	GTACTTGATTCCAGGGCTTCAG
N3-2R	CTCCTTCCATAACCAGGATGAC
N3-3F	CAACCCTACGGGAAGGTTATC
N3-3R	TTGAGGAGGACTCGCCTATATC
N3-4F	CCACTATCGACCTTCCATCTTT
N3-4R	GTGACGATTGTGTGGTGAAAC

Notas: Os oligonucleotídeos destacados em cinza anelam-se a regiões comuns a todos os vírus, e consequentemente foram utilizados em todas as reações de sequenciamento. Os vírus marcados com * possuem as regiões codificantes de NS4B e NS5 muito diferentes, desse modo, o sequenciamento dessas regiões foi realizado com outros oligonucleotídeos, planejados para cada um dos vírus com alteração por permuta nucleotídica.

3.4.6 RT-qPCR

Para a determinação do número de cópias de RNA viral, foi realizada a reação de RT-qPCR em tempo real, utilizando *TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix* e a ferramenta *StepOnePlus* (Applied Biosystems), sob as recomendações do fabricante.

3.5 Caracterização geral dos vírus sintéticos

3.5.1 Titulação por contagem de placas de lise

Monocamadas de células Vero foram preparadas na véspera em placas de 24 poços, com densidade de 50.000 células/cm² cultivadas em meio Earle's 199 completo. Alíquotas do estoque viral 2P foram descongeladas em gelo úmido e submetidas a diluições seriadas, de 10⁻¹ a 10⁻⁶, também em meio Earle's 199 completo. O sobrenadante da cultura celular foi removido de cada poço, e 100 µL das diluições virais foram inoculadas em duplicata na placa de 24 poços. As células contendo os inóculos virais foram incubadas por 1 h a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, com agitação leve a cada 15 minutos. Após o período de adsorção viral, o excesso de inóculo foi removido e a monocamada celular foi incubada com 1 mL / poço de CMC 2,4% (Carboximetilcelulose, Sigma) em meio Earle's 199 completo. Após 7 dias de incubação em estufa de CO₂ 5% e a 37 °C, as placas foram fixadas com solução de formaldeído a 10 %, lavadas em água corrente por submersão e coradas com solução de cristal violeta a 0,4 %.

O título viral foi dado pela média entre três experimentos independentes de titulação. Para validar o título viral, foi determinado que o desvio padrão dos títulos expressos em \log_{10} seja menor do que 1.

3.5.2 Titulação por contagem de unidades de foco de infecção

Monocamadas de células Vero foram preparadas na véspera, em placas de 96 poços com densidade de 100.000 células por cm^2 e cultivadas em meio Earle's 199 completo. Alíquotas do estoque viral 2P foram descongeladas em gelo úmido e submetidas a diluições seriadas, de 10^{-1} a 10^{-6} , também em meio Earle's 199 completo. Para facilitar, a diluição seriada do estoque 2P de cada vírus, foi realizada em placa de 96 poços, de preferência, placas com fundo em U. Para a diluição viral, foi adicionado 180 μL de meio Earle's 199 completo e 20 μL do estoque viral ou da diluição anterior. Com o auxílio de um pipetador multicanal, o sobrenadante da cultura celular foi removido de cada poço, e 50 μL das diluições virais foram inoculadas em duplicata na placa de cultura celular.

As células contendo os inóculos virais foram incubadas por 1 h e 30 min a 37°C , em atmosfera de 5 % de CO_2 . Após o período de adsorção viral, o excesso de inóculo foi removido com auxílio do pipetador multicanal e a monocamada celular foi incubada com 100 μL / poço de CMC 1% em meio Earle's 199 completo, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. O tempo de incubação dos vírus foi de 48 h, exceto para o vírus IC.ZIKV – ns4B-ns5/N3, que ficou incubado por 96h para o aparecimento de foco de infecção. Após o período de incubação, as placas foram fixadas com solução *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences) por 30 minutos, em temperatura ambiente, seguindo as recomendações do fabricante. O detalhamento da marcação das unidades formadoras de foco está descrito na seção 3.5.3.

Para a contagem de unidades formadoras de foco de infecção, primeiramente as placas de 96 poços foram fotodocumentadas em *ImmunoSpot S6* e analisadas com o auxílio do *Software CTL ImmunoSpot Instrument*. Após a aquisição das imagens, a contagem foi realizada da mesma maneira que está descrita na seção 3.5.1. No entanto, como o volume de infecção utilizado neste experimento é menor, o fator de correção é 20. Do mesmo modo, o título viral foi dado pela média entre três experimentos independentes de titulação.

3.5.3 Marcação e detecção das unidades formadoras de foco

Placas de 96 poços, contendo células Vero infectadas e fixadas com *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences), foram submetidas a lavagens com 300 µL de PBS, por poço. Em seguida, 100 µL de tampão de permeabilização (*CytoPerm Wash*, BD Biosciences) foram adicionados em cada poço. Após 5 min de incubação a temperatura ambiente, o tampão foi removido da monocamada de células, e foi adicionado 50 µL de anticorpo 4G2 (anticorpo monoclonal contra proteína E de flavivirus, 3 mg/ml - Biomanguinhos) diluído 1:2000 em *CytoPerm Wash*. As células foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente (ou *overnight* sob refrigeração). Após a marcação com anticorpo 4G2, as células foram submetidas a novas lavagens com tampão PBS + 0,05 Tween-20, seguidas de nova permeabilização com tampão *CytoPerm Wash*. Após remoção do tampão de permeabilização, 50 µL de anticorpo secundário conjugado a peroxidase (KPL), diluídos em uma concentração de 1:1000, foram adicionados e a detecção ocorreu por meio da adição de substrato para peroxidase (*True Blue Peroxidase Substrate*).

3.5.4 Microscopia de imunofluorescência

Células Vero foram semeadas na véspera com uma densidade de 20.000 células / cm² em lâminas de vidro de 8 poços (*Lab-Tec™ Chamber Slide System* – Nunc) e incubadas a 37 °C com 5 % de CO₂. As células foram infectadas com 100 µL de inóculo viral, com um MOI de 0,02. Após 1 h de adsorção viral, o inóculo foi substituído por 300 µL de meio Earle's 199 completo e incubado por 72 h nas mesmas condições.

Após 72 h de infecção, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 300 µL de solução de paraformaldeído 4 %. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com solução de PBS, seguida de permeabilização com solução de 0,05 % de Triton X-100 em PBS por incubação a temperatura ambiente durante 15 min. Após 15 minutos de permeabilização, as células foram incubadas em solução tampão de bloqueio (PBS + 1% BSA), por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram tratadas com anticorpo primário 4G2, diluído 1:1000 em solução de bloqueio, e incubadas por 1 h à temperatura ambiente. Após lavagens com o tampão de bloqueio, as células foram tratadas com o anticorpo secundário (IgG contra

camundongo acoplado a Alexa Fluor 546 – Molecular Probes), diluído 1:500 em tampão de bloqueio.

As lâminas foram montadas com o reagente SlowFade Antifade DAPI (Molecular Probes) e cobertas com lamínulas de vidro. As análises de fluorescência foram realizadas no microscópio invertido IX51 (Olympus) com filtros U-MWG2 (Alexa Fluor 546) (510-550); U-MWU2 (DAPI) (330-385). As imagens foram adquiridas através do programa DP Controller e visualizadas através do programa DPManager (DP-BSW v3.1 - Olympus).

3.6 Ensaios biológicos em modelos celulares

3.6.1 Análise fenotípica

Os vírus sintéticos foram avaliados quanto à morfologia das placas de lise e dos focos de infecção. Para o dimensionamento das placas de lise, células Vero foram cultivadas em placas de seis poços, com densidade de 50.000 células / cm². Após 24 h, a monocamada celular foi infectada com aproximadamente 50 PFU / 200 µL, e incubadas, sob agitação a cada 10 minutos, a 37 °C e 5% CO₂. Após o período de adsorção viral, o inóculo foi removido e 3 mL de meio Earle's 199 completo com 0,5% de agarose ultrapura (Invitrogen) foram adicionados em cada poço. As células foram fixadas com 10% de formaldeído 120 h após a infecção, seguido de lavagem em água e coloração com cristal violeta 0,4%.

Para a avaliação da morfologia dos focos de infecção, células Vero cultivadas na véspera, em placas de 96 poços, com densidade de 30.000 células / cm² foram infectadas com aproximadamente 25 FFU / 50 µL, e incubadas a 37 °C e 5% CO₂, por 1 h e 30 min. Após o período de adsorção viral, o inóculo foi substituído por 150 µL CMC 1% em meio Earle's 199 completo. Após 48 h ou 96 h, a monocamada foi fixada com solução *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences) por 30 minutos, em temperatura ambiente, seguindo as recomendações do fabricante. O detalhamento da marcação das unidades formadoras de foco está descrito na seção 3.5.3. As placas foram fotodocumentadas, e a área das placas de lise e dos focos de infecção foram mensuradas utilizando o *Software ImageJ*.

3.6.2 Curvas de proliferação viral

Os vírus sintéticos foram avaliados quanto a capacidade de proliferação viral, em diferentes linhagens celulares. Células de mamífero e de inseto foram cultivadas na véspera, em frascos T-25, com uma densidade de 40.000 e 80.000 células / cm² respectivamente, em meio de cultura apropriado, conforme descrito na seção 3.2. A monocamada celular foi infectada com 1 mL de suspensão viral, com MOI de 0,02, e incubada por 1 h, ou a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ (Vero, Arpe-19 e SK-N-AS) ou a 28°C (C6/36 e Aag2). Após incubação por 1 h, com agitação leve a cada 15 min, os inóculos virais foram substituídos pelos respectivos meios de cultura, e realocados nas estufas nas mesmas condições anteriores.

Alíquotas de 500 µL foram coletadas diariamente, por 5 dias consecutivos, preferencialmente no mesmo horário e armazenadas em freezer – 80 °C. A proliferação viral foi quantificada por titulação, através da contagem de placas de lise ou de focos de infecção, conforme descrito na seção 3.5.

Para validação estatística, foram realizadas três curvas de proliferação viral independentes. A diferença na cinética de replicação dos vírus sintéticos foi analisada usando 2-way ANOVA (GraphPad Prism 8).

3.6.3 Análise de sensibilidade a interferon

Células Vero foram cultivadas em placas de 24 poços, com uma densidade de 50.000 células / cm². Após 24 h de cultivo, as células foram tratadas com IFN-α (*PBL Assay Science*) ou IFN-β (*R&D Systems*), em concentrações que variaram de 0 a 1000 UI / mL, por um período de 6 horas. Após esse período de tratamento, o sobrenadante contendo interferon foi retirado, e a monocamada foi infectada com 1 ml de suspensão viral, com MOI de 0,02. Após 1h de incubação a 37 °C e 5 % de CO₂, o inóculo viral foi substituído por meio Earle's 199 completo, suplementado com IFN-α ou IFN-β. A taxa de infecção foi quantificada através da titulação por contagem de placas de lise.

3.7 Ensaios biológicos em modelo murino

3.7.1 Modelo AG-129

Camundongos AG129, deficientes para receptores de IFN- α/β e IFN- γ (202), foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB, Fiocruz). Todo o estudo foi conduzido em estrito acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob a licença mencionada na seção 3.1.

Os animais foram mantidos no biotério do Pavilhão Leônidas Deane (FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ) em microisoladores, devidamente alimentados e hidratados. A manipulação dos animais foi realizada nas salas de experimentação deste biotério.

A idade dos animais variou de 8 a 12 semanas, para os experimentos realizados para avaliar a morbidade e a taxa de mortalidade dos vírus sintéticos obtidos. Já para o ensaio de desafio, os animais utilizados estavam com idade entre 18 e 20 semanas. Foram utilizados animais de ambos os gêneros, e os grupos foram organizados da maneira mais homogênea possível.

3.7.2 Inoculação animal e validação do inóculo viral

Os animais foram contidos manualmente e inoculados subcutaneamente, via coxim plantar traseiro, com 1×10^4 PFU (30 μ L / coxim) dos vírus estudados ou com mock (controle negativo). Os inóculos foram preparados em meio diluente Earle's, sem soro e sem gentamicina, suplementado com HEPES 25 mM. Os animais infectados com mock, receberam o mesmo volume, no entanto apenas com meio diluente. Para a inoculação, foi utilizado seringa de insulina com agulhas de dimensões 8 mm x 0,3 mm (comprimento x diâmetro; BD ultra-fine II).

Para validar a concentração do inóculo, parte dele foi utilizado como controle em cultura de células Vero. Para isso, a concentração do inóculo foi calculada e adaptada para 50, 100 e 200 PFU em 200 μ L (quando o controle de inóculo foi realizado em placa de 6 poços) e analisado por contagem de placas de lise, ou adaptada para 10, 20 e 40 FFU em 50 μ L (quando o controle de inóculo precisou ser realizado em placas de 96 poços) e analisado por contagem de focos de infecção

3.7.3 Acompanhamento e avaliação da morbidade e mortalidade

Foram realizados três blocos de experimentação animal. O primeiro e já publicado (ver anexo I), foi realizado com o objetivo de comparar o clone infeccioso de ZIKA (IC.ZIKV - RioU1) e o vírus parental Rio-U1. O segundo bloco, foi realizado para comparar o clone infeccioso IC.ZIKV – Rio-U1, com a primeira variante viral sintética obtida, IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal. Neste bloco de experimentação, foram realizados 3 experimentos independentes, cada experimento contendo 3 grupos de animais (Mock, IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal) e 5 animais por grupo. Esses animais foram acompanhados diariamente por até 14 dias pós-infecção.

O terceiro bloco, foi realizado para comparar o clone infeccioso IC.ZIKV – Rio-U1 com as variantes virais contendo alterações na frequência de pares de códons, IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3. Neste bloco, foram realizados 2 experimentos independentes. Cada experimento contendo 4 grupos de animais (Mock, IC.ZIKV – Rio-U1, IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3) e 5 animais por grupo. O acompanhamento diário desse bloco de experimentação animal, teve uma maior duração: 21 dias pós-infecção.

O monitoramento dos animais ocorreu diariamente, para a determinação da morbidade, *score* clínico e taxa de mortalidade. Para a determinação da morbidade, os animais foram pesados diariamente e a taxa de perda de peso foi calculada, em porcentagem, em relação ao peso inicial de cada animal. Para a determinação do *score* clínico, utilizamos uma tabela pré-definida no trabalho “*Recovery of synthetic Zika Virus based on Rio-U1 isolate using a genetically stable two plasmid system and cDNA amplification*” (203). Esta tabela está disponível no material suplementar do artigo publicado (ver anexo I). Brevemente, os sinais clínicos observados envolvem: dificuldade de movimentação, postura curvada, eriçamento dos pelos, agressividade, tremores, dispneia ou taquipneia, e perda de peso. Foram atribuídos valores numéricos a cada sinal clínico de declínio de saúde e bem-estar animal. Esses valores foram somados para a determinação do *score* clínico diário. Ao atingir o *score* clínico igual ou maior que 6, os animais foram submetidos a eutanásia, visando minimizar o sofrimento animal.

A taxa de mortalidade foi calculada a partir do tempo médio de sobrevivência (AST). Além disso, também foi realizada análise de sobrevivência de Kaplan-Meier (GraphPad Prism 8). A figura 3.4 ilustra o protocolo de inoculação e acompanhamento ao longo do tempo da experimentação animal.

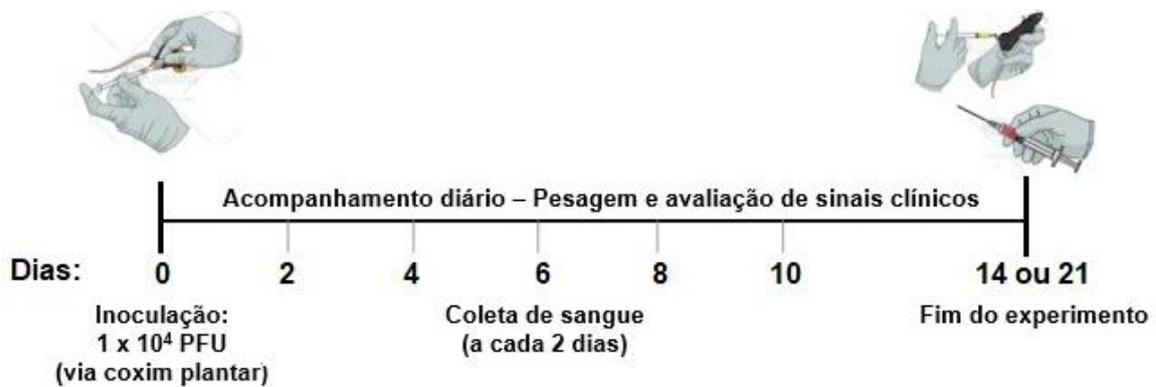


Figura 3.4 - Cronograma de infecção e acompanhamento animal.

Camundongos AG129 foram infectados no dia 0, com doses virais de 1×10^4 PFU. A cada dois dias, foram coletadas amostras de sangue, por punção submandibular, para a determinação da viremia ao longo do tempo. Diariamente, os animais foram pesados e avaliados quanto ao aparecimento de sinais e sintomas. Todos os animais foram eutanasiados ou ao atingir o score clínico ≥ 6 . Os animais infectados com controle negativo, foram acompanhados até a data limite de experimento.

3.7.4 Protocolo de desafio

Um último bloco de experimentação animal foi realizado em duplicata, a partir da imunização de camundongos AG129 com vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3. Os animais foram divididos, primeiramente, em dois grupos: o primeiro, contendo 6 animais, os quais foram inoculados com Mock, e o segundo, contendo 10 animais, os quais foram inoculados com 1×10^3 PFU do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3. O acompanhamento foi realizado diariamente por 28 dias consecutivos (pós-infecção), onde os animais foram avaliados quanto a morbidade, score clínico e mortalidade, conforme descrito na seção 3.7.3. Após esse período, os animais imunizados inoculados com IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, e que sobreviveram, foram desafiados com 1×10^4 PFU do vírus sintético IC.RioU1. Além desses animais, 3 dos 6 animais inoculados com Mock, também foram desafiados com a mesma dose e vírus. Para controle negativo, os demais animais inoculados com Mock na primeira etapa do experimento, foram inoculados com Mock novamente. Os animais desafiados e os animais inoculados com Mock, foram acompanhados por mais 21 dias, e avaliados diariamente quanto aos mesmos parâmetros descritos anteriormente. A figura 3.5 ilustra o protocolo de desafio realizado.

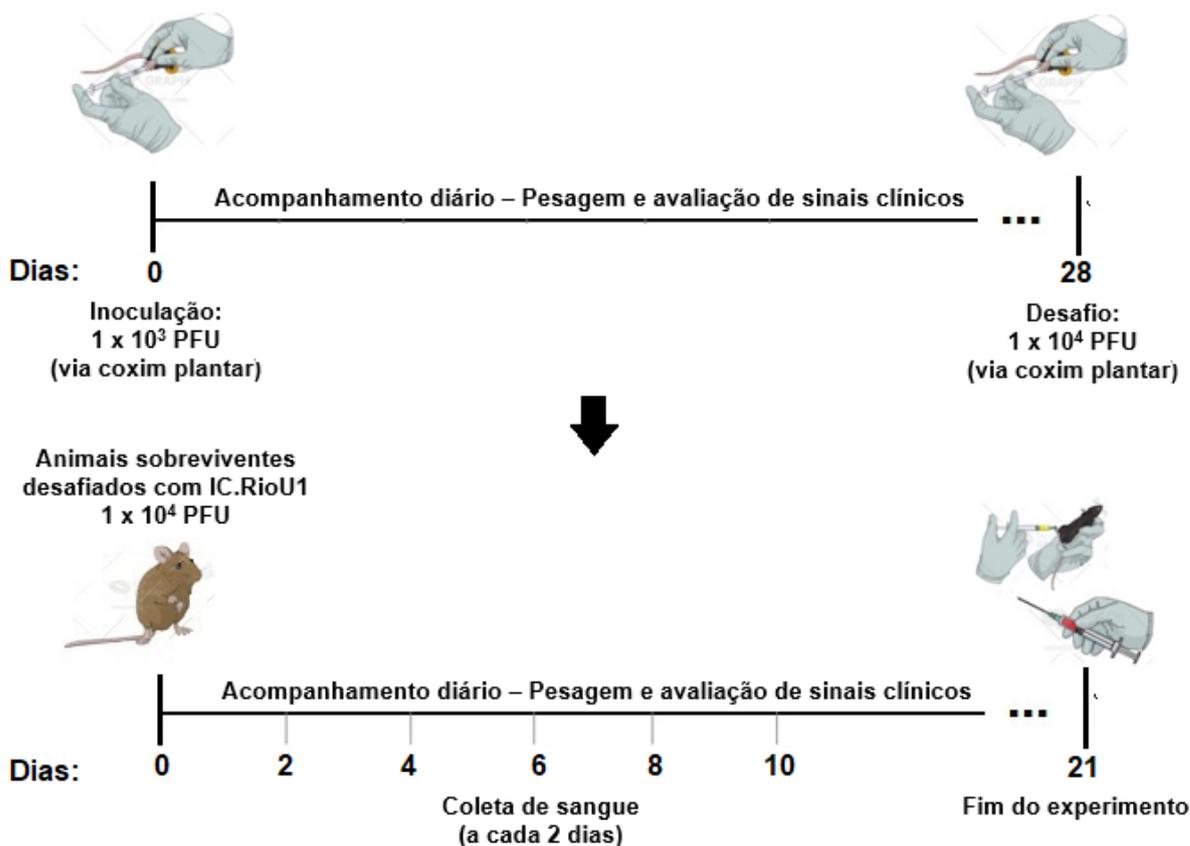


Figura 3.5 - Cronograma de imunização com vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 e desafio com vírus IC.ZIKV – Rio-U1.

Camundongos AG129 foram imunizados com 1 x 10³ PFU do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3. Diariamente, os animais foram pesados e avaliados quanto ao aparecimento de sinais e sintomas. No dia 28 pós imunização, os animais imunizados, foram desafiados com 1 x 10⁴ PFU do vírus IC.ZIKV – Rio-U1 e acompanhados por mais 21 dias, com coleta de sangue, via veia submandibular, a cada 2 dias. Todos os animais foram eutanasiados ou ao atingir o score clínico ≥ 6. Os animais infectados com controle negativo, foram acompanhados até a data limite de experimento.

3.7.5 Coletas de sangue e eutanásia

Para determinação da viremia ao longo do tempo de infecção, foi realizada coleta de sangue da veia submandibular (Figura 3.6), a cada dois dias, por até 10 dias pós – infecção, alternando os lados para minimizar o sofrimento animal. Para a coleta de sangue, a região da veia submandibular é perfurada com agulha de 30 mm x 0,80 mm, posicionada perpendicularmente a região submandibular. A perfuração promove um sangramento, no qual um pequeno volume sanguíneo (10 – 50 µL) é colhido em tubo *ependorf* vazio, e transferido para outro tubo contendo 560 µL de AVL + RNA carrier (*QIAamp Viral RNA Mini Kit*, Qiagen), para extração de RNA viral. Imediatamente após a punção sanguínea, foi realizada uma leve pressão na região, utilizando gaze, para o estancamento sanguíneo.

No dia da realização da eutanásia, foi coletado o sangue final, através de punção cardíaca. Para esse tipo de punção, primeiramente o animal é anestesiado. Após a perda de reflexo dos camundongos, o sangue foi coletado por punção cardíaca com seringa de 50 unidades (500 μ L) e agulha de 8 mm x 0,3 mm (comprimento x diâmetro; BD Ultra-Fine II), dispensado em Eppendorfs de 1,5 mL vazios, e 140 μ L do sangue foram transferidos para solução e AVL + RNA *carrier*. A administração do anestésico é por via intraperitoneal, e consiste em uma formulação composta por cloridrato de quetamina (75,4 mg/mL) e cloridrato de xilazina (3,9 mg/mL). O volume de anestésico aplicado corresponde a 20% do peso do animal. A eutanásia, então, ocorreu sob efeito anestésico, e foi confirmada por deslocamento cervical.

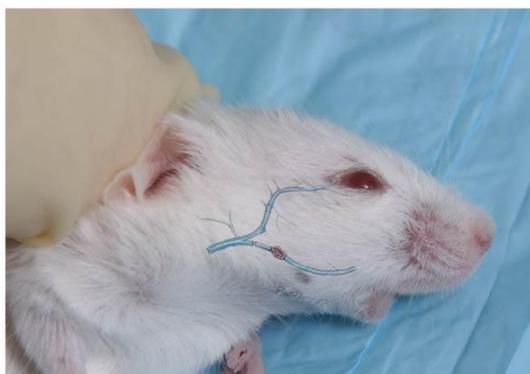


Figura 3.6 - Região de punção sanguínea.

A coleta de sangue para a determinação da viremia ao longo do tempo, ocorre através da perfuração e sangria da veia submandibular [Adaptado de Golde, W.T. 2005 (204)]

3.7.6 Histopatologia de cérebro de camundongos

Nos estudos comparativos entre os vírus IC.Rio-U1 e parental, também foram realizados estudos histopatológicos a fim de avaliar o comprometimento do tecido cerebral e se esse acometimento patológico é similar entre os respectivos vírus. A metodologia utilizada para esta análise esta descrita no artigo publicado e pode ser visualizada através do anexo I.

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento de metodologia de obtenção de clone infeccioso por genética reversa.

Foi desenvolvida uma ferramenta para obtenção de clones infecciosos de ZIKV, utilizando tecnologia de genética reversa envolvendo plasmídeos bacterianos. A partir dessa tecnologia, então, obtivemos o primeiro clone infeccioso de ZIKV (203), que se mostrou fenotipicamente similar ao vírus parental Rio-U1, isolado em 2016 durante a epidemia que ocorreu no Brasil (87). O método utilizado para a obtenção desse vírus sintético mostrou-se geneticamente estável, indicando ser uma boa ferramenta para estudos, *in vitro* e *in vivo*, de virulência, patogenicidade e atenuação viral. Os resultados que comprovam a regeneração viral do clone infeccioso de ZIKV, denominado nessa tese como IC.ZIKV-Rio-U1, estão detalhados na publicação do artigo que compõe essa tese de doutorado, e podem ser observados no anexo I.

Uma vez estabelecida a metodologia para a síntese de vírus Zika sintéticos, procedeu-se com a construção de outros clones de ZIKV, com alterações nos genes NS4B e NS5, que são alvos do estudo, visando atenuação viral para fins de desenvolvimento de protótipos vacinais.

A seguir estão descritos os resultados obtidos nas duas abordagens, desenvolvidas neste trabalho, para a obtenção de vírus sintéticos atenuados. A primeira, estudou o efeito da substituição dos genes NS4B e NS5 do vírus sintético IC.Rio-U1 (de agora em diante reportado como IC.ZIKV – Rio-U1) por genes equivalentes da linhagem pré-epidêmica P6-740, Malásia 1966 (205). Já a segunda, estudou o efeito da alteração da frequência de pares de códon nas sequências das proteínas NS4B e NS5, através da permuta nucleotídica, na atenuação viral (186).

4.2 Obtenção do vírus quimérico IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal

4.2.1 Alinhamento P6-740 e Rio-U1

Conforme justificado anteriormente na seção 1.9, a escolha das proteínas NS4B e NS5 como alvo da pesquisa ocorreu em função de um estudo anterior, em cooperação com Dr. Gonzalo Bello e equipe, onde foi possível determinar mutações

sinônimas e não sinônimas ocorrentes ao longo da evolução da linhagem ancestral P6-740 (Malásia, 1966) (205).

Foi realizado um alinhamento das sequências dos vírus P6-740 e Rio-U1 através das ferramentas *ClustalW* (206) e *MEGA11 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11* (207). A partir desse alinhamento, foi observado um grande número de alterações sinônimas e não sinônimas entre as sequências alinhadas, com uma porcentagem de identidade genômica de 95,61 %. A proteína NS5 apresentou um total de 135 alterações nucleotídicas, tornando-a a proteína que teve o maior número de mutações a partir da linhagem P6-740. Contudo, essa é a maior proteína do genoma de ZIKV, desta forma, a porcentagem de alteração nucleotídica em relação ao seu tamanho foi de 5,0 %. Dentre as 135 alterações nucleotídicas, 16 ocasionaram alteração de aminoácidos, ou seja, 11,8 % das mutações foram não sinônimas (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Análise do alinhamento das sequências dos vírus P6-740 e Rio-U1

Proteína	Número de nucleotídeo por proteína	Diferenças nucleotídicas	Alteração de aminoácido
C	366	10 (2,7%)	-
prM	279	16 (5,8%)	4 (25,0%)
M	225	9 (4,0%)	-
E	1512	64 (4,2%)	4 (6,3%)
NS1	1056	60 (5,7%)	2 (3,3%)
NS2A	678	22 (3,2%)	2 (9,1%)
NS2B	390	20 (5,1%)	1 (5,0%)
NS3	1851	72 (3,9%)	4 (5,6%)
NS4A	381	18 (4,7%)	-
2k	69	3 (4,4%)	-
NS4B	754	39 (5,2%)	7 (17,9%)
NS5	2709	135 (5,0%)	16 (11,8%)

Já a proteína prM, apresentou 16 alterações nucleotídicas, no entanto, devido ao seu tamanho, essa quantidade configura 5,8 % de alteração da sua sequência. Além disso, essa foi a proteína que mais sofreu alteração de aminoácidos, ou seja, das 16 alterações que ocorreram, 4 (ou 25 %) acarretaram mutações não sinônimas. Além da proteína prM, a NS4B também apresentou um importante número de mutações não sinônimas: das 39 alterações nucleotídicas, que configuram 5,2 % de alteração da sequência, 7 (ou 17,9 %) ocasionaram alteração de aminoácidos.

Apesar de todas as proteínas de ZIKV terem apresentado alterações nucleotídicas, nem todas configuraram mutações não sinônimas, como foi o caso das alterações que ocorreram nas proteínas C, M, NS4A e do peptídeo 2K.

Conforme observado, então, as proteínas prM e NS4B foram as que apresentaram as maiores taxas de mutações não sinônimas (25,0 % e 17,9 % respectivamente), e a proteína NS5 teve o maior número de alterações nucleotídicas. Diante desse resultado, as proteínas NS4B e NS5 foram escolhidas para serem alvo do estudo. Para identificar mais detalhes das mutações não sinônimas que ocorreram em NS4B e NS5, uma nova tabela foi montada, indicando as alterações de códon, a posição da alteração nucleotídica no genoma de ZIKV, a posição de alteração de aminoácido na poliproteína, e a substituição de aminoácidos (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Polimorfismos de aminoácidos presentes entre as proteínas NS4B e NS5 de ZIKV Rio-U1 e ZIKV P6-740.

Alteração de códon (P6-740 – Rio-U1)	Posição genômica	Posição na poliproteína	P6-740	Rio-U1
GGC – AGC	6954	NS4B ₂₂₈₃	G	S
ATG – ATA	6992	NS4B ₂₂₉₅	M	I
CTC – TTC	7059	NS4B ₂₃₁₈	L	F
ATG – ATA	7208	NS4B ₂₃₆₇	M	I
ATC – GTC	7452	NS4B ₂₄₄₉	I	V
GTT – ATA	7464 / 7466	NS4B ₂₄₅₃	V	I
CTG – TCG	7470 / 7471	NS4B ₂₄₅₅	L	S
ACG – GTG	8007 / 8008	NS5 ₂₆₃₄	T	V
TCG – CCG	8082	NS5 ₂₆₅₉	S	P
ATC – ACC	8353	NS5 ₂₇₄₉	I	T
GCA – GTA	8467	NS5 ₂₇₈₇	A	V
CTG – ATG	8490	NS5 ₂₇₉₅	L	M
GTT – ATT	8511	NS5 ₂₈₀₂	V	I
AAC – AGC	8794	NS5 ₂₈₉₆	N	S
ACA – ATA	9244	NS5 ₃₀₄₆	T	I
AAG – AGG	9256	NS5 ₃₀₅₀	K	R
AGA – AAA	9427	NS5 ₃₁₀₇	R	K
CCA – TCA	9591	NS5 ₃₁₆₂	P	S

AGC – AAC	9607	NS5 ₃₁₆₇	S	N
AGC – GAC	9774 / 9775	NS5 ₃₂₂₃	S	D
TAT – CAC	9804 / 9806	NS5 ₃₂₃₃	Y	H
TAC – CAT	9822 / 9824	NS5 ₃₂₃₉	Y	H
GAC – AAC	10266	NS5 ₃₃₈₇	D	N

Tendo em vista as diferenças observadas entre as linhagens P6-740 (ancestral) e Rio-U1 (epidêmica), outro clone infeccioso de ZIKV foi construído através da genética reversa, e derivado do primeiro clone de ZIKV obtido (conforme anexo I). Nesta abordagem, buscamos estudar a atenuação viral a partir da substituição das proteínas alvo (NS4B e NS5) no clone IC.ZIKV – Rio-U1 (203) pelos genes homólogos da linhagem ancestral (205).

4.2.2 Obtenção do vírus quimérico IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal pela tecnologia do clone infeccioso.

A variante sintética de ZIKV, nomeada IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal, foi construída a partir do clone infeccioso completo de ZIKV (IC.ZIKV – Rio-U1), utilizando a mesma abordagem de recuperação de ZIKV *in vitro*, conforme descrito no artigo publicado (ANEXO I). O IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal consiste de um vírus quimérico, composto por sequências genômicas de duas linhagens diferentes de ZIKV, com o genes NS4B e NS5 da linhagem P6-740 [GenBank: KX377336.1; Linhagem Asiática, Malásia, 1966;(205)] e o restante do genoma baseado na linhagem Rio-U1 [GenBank: KU926309.2; Linhagem Americana, Brasil, 2016 (87)].

Para a obtenção desse vírus, as regiões codificadoras das proteínas NS4B e NS5 foram sintetizadas em dois fragmentos sintéticos de cDNA, nomeados ZMal-1 e ZMal-2. Esses fragmentos foram desenhados a fim de substituir parcialmente o fragmento Z4 e completamente o fragmento Z2 nos plasmídeos pCC1-Z3Z4 e pCC1-MCS-Z1Z2, respectivamente. O fragmento ZMal-1 é composto pela sequência genômica de parte da proteína NS3, da proteína NS4A e do peptídeo 2K, baseados na linhagem Rio-U1 e pela proteína NS4B e parte da proteína NS5 com sequências genômicas baseadas na linhagem ancestral, P6-740. O fragmento ZMal-2 é composto pela sequência remanescente da proteína NS5, também com a sequência genômica

baseada na linhagem ancestral, e pela região não codificante 3'UTR, do vírus Rio-U1. A tabela 4.3, mostra os detalhes dos fragmentos ZMal-1 e ZMal-2.

Tabela 4.3 - Detalhamento dos fragmentos sintéticos de cDNA, desenhados para a construção do vírus sintético IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal.

Fragmento	Posição genômica		Plasmídeos	Sítios de clonagem
	Rio-U1	P6-740		
ZMal-1	6336-6914	6915–8843	pUC57-Z4-Mal-1	<i>NgoM</i> IV / <i>Mlu</i> I (6341 – 8843)
			pCC1-Z3Z4Mal-1	<i>Afe</i> I / <i>Mlu</i> I (5969 – 8843)
ZMal-2	10377-10807	8844–10376	pCC1-MCS-Z1ZMal-2	<i>Mlu</i> I / <i>Xho</i> I (8843 – 10806)

Os plasmídeos contendo a sequência genômica baseada na linhagem Rio-U1 foram utilizados, então, como ponto de partida para a montagem dos plasmídeos pCC1-Z3Z4Mal-1 e pCC1-MCS-Z1ZMal-2. No entanto, devido a incompatibilidade de sítios de restrição, primeiramente foi necessário construir um plasmídeo intermediário (pUC57-Z4-Mal-1), substituindo parte do fragmento Z4 clonado em pUC57 (original da *GenScript*), pelo fragmento ZMal-1, na mesma posição genômica (entre 6341 a 8843) (Figura 4.1-A; Tabela 4.3).

A incompatibilidade de sítio de restrição, mencionada acima, se refere ao sítio da endonuclease *NgoM*IV. Existem 4 sítios de restrição para *NgoM*IV apenas na porção plasmidial (pCC1), além do sítio *NgoM*IV no fragmento Z4, desta maneira, não foi possível clonar o fragmento ZMal-I diretamente ao plasmídeo pCC1-Z3Z4. A obtenção do plasmídeo intermediário (pUC57-Z4-Mal-1), permitiu que o fragmento ZMal-I fosse inserido no fragmento Z4, substituindo as regiões equivalentes. Assim, o fragmento pode ser retirado do plasmídeo intermediário, com as enzimas de restrição *Afe*-I e *Mlu*-I (posição genômica 5969 – 8843) e clonado no plasmídeo pCC1-Z3Z4, através das mesmas endonucleases. A clonagem foi realizada nas mesmas posições, formando o plasmídeo, agora nomeado pCC1-Z3Z4-Mal-I (Figura 4.1-B; Tabela 4.3).

Já para a obtenção do plasmídeo pCC1-MCS-Z1ZMal-2, o fragmento ZMal-2 foi clonado diretamente no plasmídeo pCC1-MCS-Z1Z2, substituindo o fragmento equivalente (Z2; posição genômica 8843 - 10806), através da digestão com as mesmas enzimas de restrição (Figura 4.1-C; Tabela 4.3).

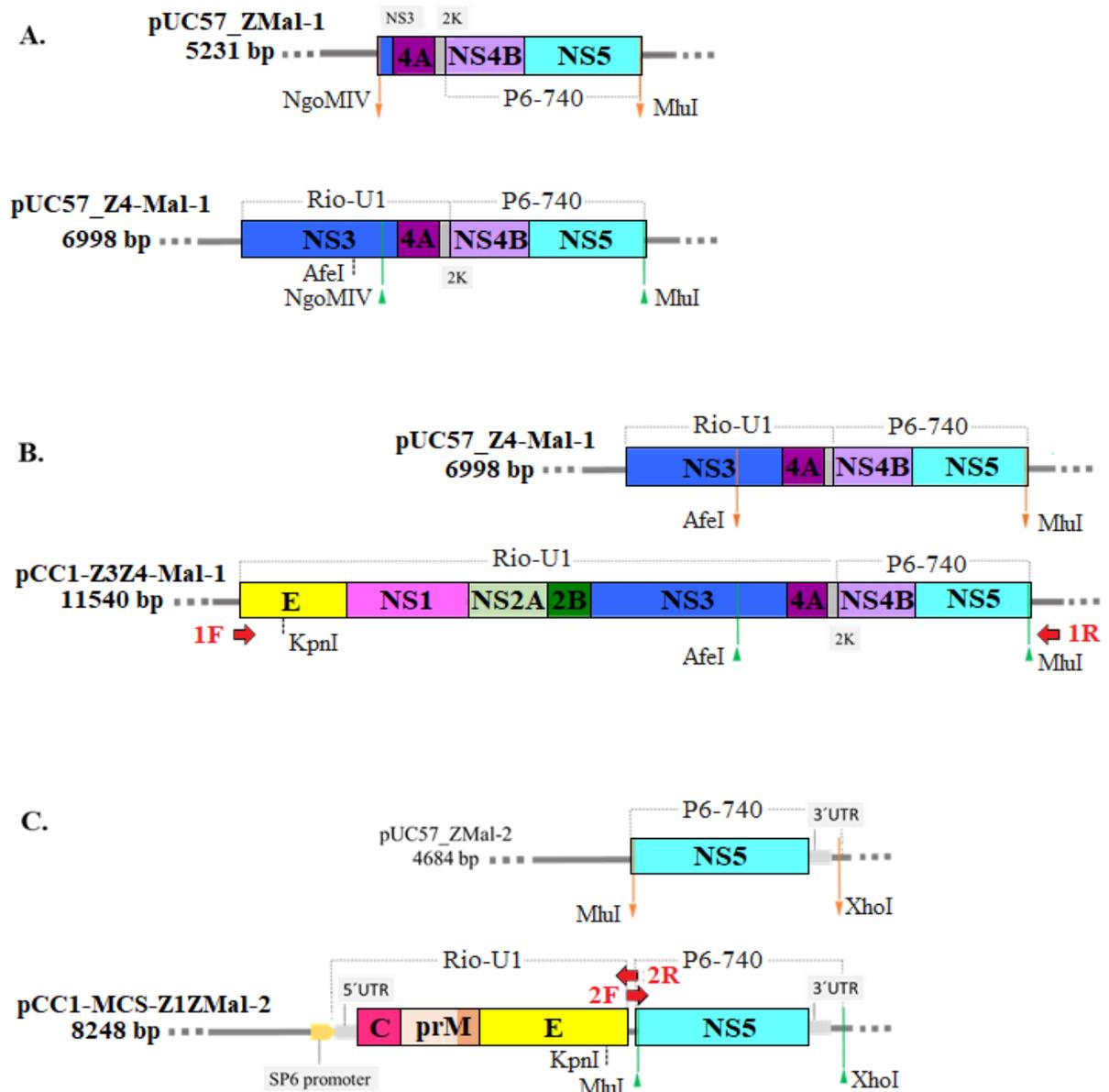


Figura 4.1 -Estratégia de montagem dos plasmídeos.

A – Montagem do plasmídeo intermediário pUC57-Z4-Mal-1. Retirada do fragmento ZMal-1 do plasmídeo original da *GenScript* com as enzimas de restrição indicadas e clonagem no plasmídeo pUC57-Z4 (original da *GenScript*), após retirada do fragmento equivalente pelas mesmas enzimas. B – Montagem do plasmídeo pCC1-Z3Z4-Mal-1. Clonagem do fragmento Z4-Mal1 no plasmídeo pCC1-Z3Z4 através das enzimas de restrição indicadas. C – Montagem do plasmídeo pCC1-MCS-Z1ZMal-2. Clonagem do fragmento ZMal-2 (original da *GenScript*) no plasmídeo pCC2-MCS-Z1Z2 através das enzimas de restrição indicadas. Os triângulos invertidos e alaranjados indicam a retirada do fragmento, e os triângulos verdes indicam a inserção do fragmento. As linhas tracejadas indicam a linhagem ao qual o fragmento se refere. Setas em vermelho, indicam a posição e os oligonucleotídeos utilizados na etapa de amplificação.

Os plasmídeos pCC1-Z3Z4-Mal-1 e pCC1-MCS-Z1ZMal-2 foram submetidos à amplificação por PCR para aumentar a massa plasmidial. Essa etapa foi necessária para otimizar as etapas subsequentes, já que as clonagens foram realizadas em um plasmídeo de cópia única. Os *amplicons* obtidos foram confirmados por eletroforese (Figura 4.2 A) e a massa de cDNA foi quantificada com *Qubit*. A massa obtida após amplificação e purificação foi 513 ng e 804 ng respectivamente para os *amplicons*

Z3Z4-Mal-1 e *pCC1-MCS-Z1ZMal-2*. Em seguida, os *amplicons* foram digeridos com as enzimas *KpnI* e *MluI*. A digestão pode ser confirmada por eletroforese (Figura 4.2 B). Os *amplicons* digeridos, foram isolados por gel preparativo, purificados e quantificados conforme descrito na seção 3.3.3. Em todas essas etapas, houve perda significativa de massa de cDNA, reforçando a importância das etapas de amplificação para a otimização das clonagens. As novas quantificações foram: 158,4 ng e 260,4 ng para *Z3Z4-Mal-1* e *pCC1-MCS-Z1ZMal-2*, respectivamente.

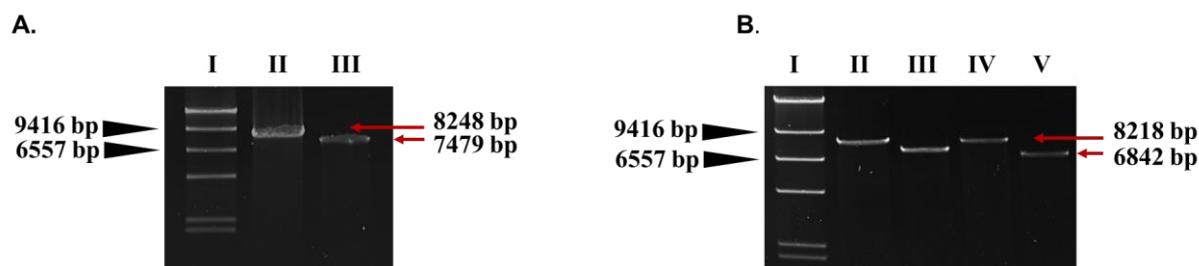


Figura 4.2 - PCR de amplificação plasmidial

A – Produto de amplificação por PCR, dos plasmídeos *pCC1-Z3Z4Mal-1* e *pCC1-MCS-Z1ZMal-2*; I – Marcador de peso molecular *Lambda DNA/HindIII Marker* (Thermo Fisher Scientific); II – *amplicon* *pCC1-MCS-Z1ZMal-2*; III – *amplicon* *Z3Z4Mal-1*. B – *Amplicons* após digestão e purificação por gel preparativo; I – Marcador de peso molecular *Lambda DNA/HindIII Marker* (Thermo Scientific); II – *amplicon* *pCC1-MCS-Z1ZMal-2* + digestão com *Mlu-I*; III – *amplicon* *Z3Z4Mal-1* + digestão com *Mlu-I*. III - II – *amplicon* *pCC1-MCS-Z1ZMal-2* + digestão com *Mlu-I* e *Kpn-I*; IV – *amplicon* *Z3Z4Mal-1* + digestão com *Mlu-I* e *Kpn-I*.

Para a obtenção do cDNA molde final, os *amplicons* obtidos na etapa anterior, foram submetidos à reação de ligação, após desfosforilação do *amplicon* contendo a porção plasmidial. O DNA do plasmídeo contendo todo o genoma de ZIKV foi linearizado com a enzima *XhoI* e então uma nova reação de amplificação por PCR foi realizada para garantir uma quantidade suficiente de cDNA. O cDNA molde final amplificado possui um tamanho de 10847 pb, e contém o sítio promotor SP6, seguido da região não traduzida 5' *UTR*, o genoma completo do vírus quimérico e a região não traduzida 3' *UTR* (Figura 4.3 A). A amplificação do cDNA molde final foi confirmada por eletroforese (Figura 4.3 B).

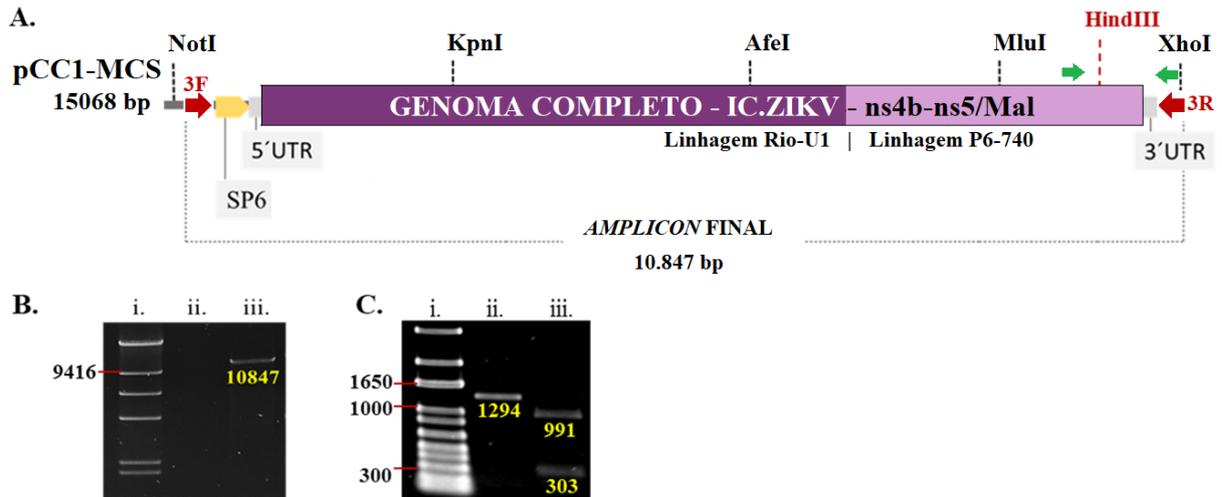


Figura 4.3 - Molde final de cDNA do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal.

A – Representação esquemática do molde final. A barra central de cor púrpura representa o genoma completo do vírus sintético, e a graduação da tonalidade simula as duas linhagens em que o genoma foi baseado. As setas vermelhas indicam a posição e os oligonucleotídeos utilizados na amplificação final. As setas verdes indicam a posição e os oligonucleotídeos utilizados para amplificação de um fragmento de 1294 pb que confirma a obtenção do vírus. B – *Amplicon* final. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, indicando o tamanho correto do fragmento amplificado. C – RT-PCR e digestão analítica. A eletroforese em gel de agarose 0,8%, indica o fragmento amplificado por RT-PCR e resultado da digestão analítica com a enzima *HindIII*.

Após a obtenção do molde completo e amplificado do cDNA viral, foi possível fazer a transcrição e a obtenção do RNA foi confirmada por eletroforese. A partir do RNA transcrito, células Vero foram transfectadas e no dia 4 após a transfecção, foi possível observar células com aspectos refringentes e arredondadas, soltas da monocamada celular, caracterizando o efeito citopático esperado. A confirmação da presença de partículas virais no sobrenadante da cultura de células Vero, foi realizada a partir de RT-PCR. O fragmento amplificado apresentou compatibilidade com o tamanho esperado (1294 pb), conforme pode ser visualizado na figura 4.3-C. Para confirmar que o fragmento amplificado corresponde à região de interesse, o mesmo foi digerido com a enzima *HindIII*. Através da eletroforese, foi possível observar dois fragmentos, com tamanhos compatíveis com o esperado (991 pb e 303 pb). Esse resultado não apenas confirma a presença de partículas virais, como assegura que o vírus detectado corresponde ao vírus quimérico IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal e não ao vírus IC.ZIKV – Rio-U1, pois apenas o primeiro apresenta sítio de restrição para *HindIII* na posição 9816.

Tendo em vista a confirmação da obtenção viral, o sobrenadante da cultura de células, infectadas com os vírus que induziram o efeito citopático, foi coletado e

utilizado para preparo de um estoque viral de segunda passagem. O estoque 2P foi titulado e o título viral obtido foi $1,40 \times 10^7$ PFU/ml.

O sequenciamento do genoma completo do constructo IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal mostrou que a partícula viral recuperada, consiste de um vírus quimérico, apresentando sequências genômicas que correspondem com as linhagens Rio-U1 e P6-740, nas posições previamente planejadas e sem qualquer mutação ou contaminação indesejada, demonstrando que a recuperação viral foi consistente com o esperado.

4.2.3 Caracterização fenotípica do vírus quimérico IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal

Um dos ensaios realizados para caracterizar o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal, foi a microscopia de imunofluorescência, a qual foi utilizada para avaliar o padrão de expressão da proteína E, através da detecção por anticorpo pan-flavivírus 4G2. Após 72 h de infecção, o isolamento viral foi confirmado por detecção de antígeno viral de flavivírus, na região perinuclear de células Vero infectadas com MOI de 0,02. Além disso, o padrão de infecção demonstrou similaridade no perfil de infecção entre os vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal e IC.ZIKV – Rio-U1 (Figura 4.4 A).

Outro método realizado para a caracterização fenotípica do vírus em estudo, foi o dimensionamento de placas de lise e de focos de infecção. Tanto as placas de lise quanto os focos de infecção apresentaram padrões diferentes entre os vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal e IC.ZIKV – Rio-U1.

Através do *Software ImageJ*, as placas de lise foram dimensionadas uma a uma para a determinação da sua área média em monocamada de célula Vero. Foram mensuradas 92 placas de lise na monocamada infectada com o vírus IC.ZIKV – Rio-U1, usado como controle para comparação com fenótipo selvagem. Algumas placas de lise ultrapassaram 1 mm^2 de área, no entanto, a média da área observada nessa infecção foi de $0,179 \pm 0,165 \text{ mm}^2$. Já a infecção com IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal apresentou placas de lise com áreas menores, onde a média entre as 87 placas de lise aferidas foi de $0,031 \pm 0,016 \text{ mm}^2$ (Figura 4.4 B).

Em relação aos focos de infecção, a área média dos focos marcados com anticorpo 4G2, em monocamada de células Vero infectadas com o vírus controle IC.ZIKV – Rio-U1 foi de $0,117 \pm 0,05 \text{ mm}^2$. Essa média foi calculada após o dimensionamento de 18 focos de infecção. Por fim, o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal,

apresentou focos de infecção com uma área média de $0,058 \pm 0,031 \text{ mm}^2$ entre os 26 focos mensurados. (Figura 4.4 C).

As diferenças observadas, tanto no tamanho das placas de lise quanto dos focos de infecção, são significativas no ponto de vista estatístico ($p < 0.0001$; *Unpaired t-Test-Two-Tailed*) e essas diferenças sugerem que as alterações nucleotídicas presentes nas proteínas NS4B e NS5, adquiridas ao longo da evolução da poliproteína viral, podem estar associadas a um aumento no padrão de infectividade viral.

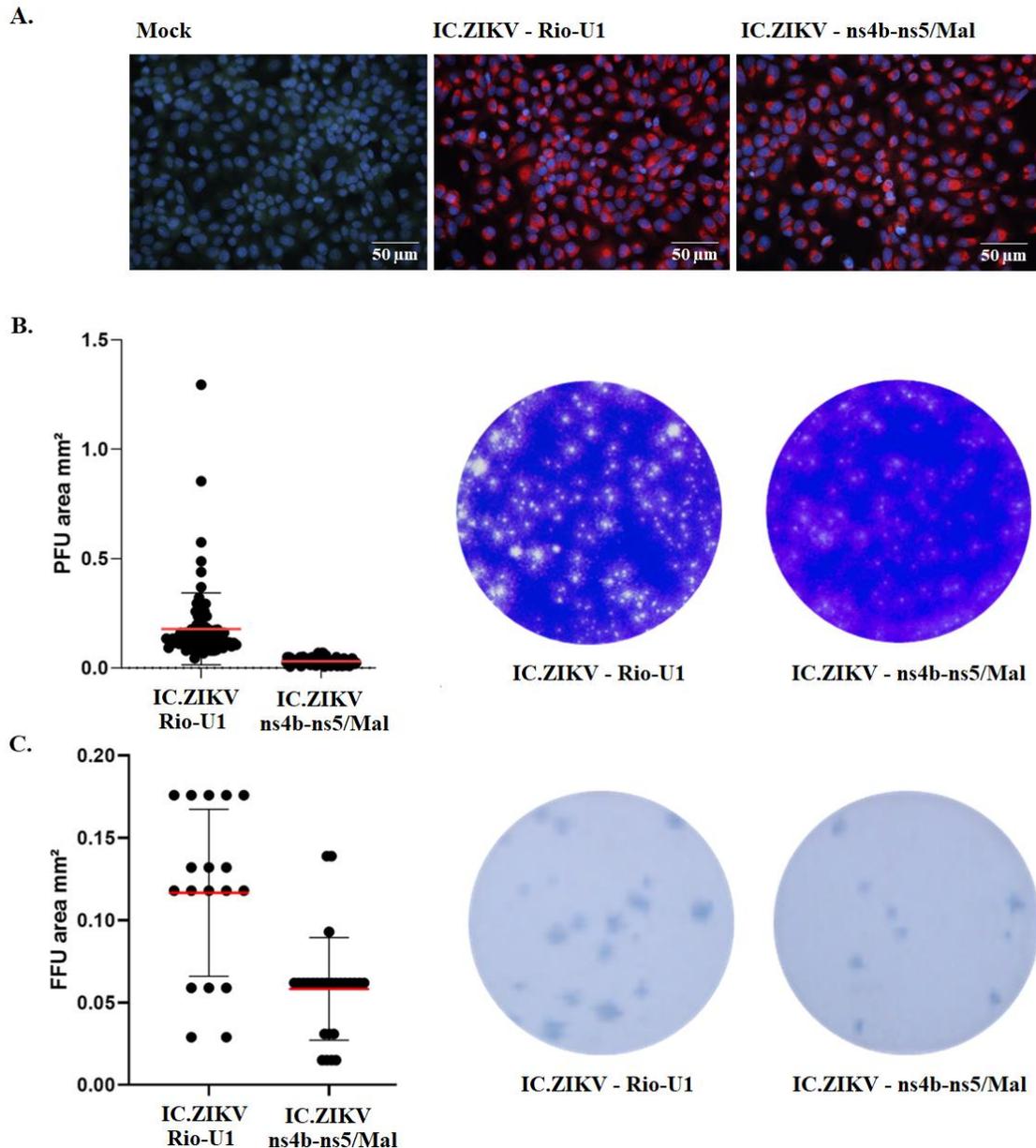


Figura 4.4 - Comparação fenotípica através da caracterização *in vitro*.

A – Detecção da proteína E de flavivírus por imunomarcagem com anticorpo pan-flavivírus 4G2. Em vermelho está a detecção da proteína E em região perinuclear. Em azul, o núcleo celular encontra-se marcado com DAPI. B e C – Morfologia das placas de lise e dos focos de infecção (respectivamente) ocasionados pelos vírus IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal. No lado esquerdo, encontram-se os gráficos que indicam o dimensionamento das placas de lise e dos focos de infecção. As barras vermelhas indicam a média da área dimensionada.

4.2.4 Estudos de proliferação viral em cultura de células

A fim de verificar se as diferenças genômicas, entre o vírus IC.ZIKV - Rio-U1 e IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal, refletem em suas características biológicas, foi realizada análise da taxa de proliferação viral em diferentes linhagens celulares.

A proliferação viral foi acompanhada durante 4 dias (96 hpi), e o perfil de ao longo do tempo foi comparado entre os vírus. As culturas de células foram infectadas com os respectivos vírus (IC.ZIKV - Rio-U1 e IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal), utilizando um MOI de 0,02 e diariamente foi retirada uma alíquota do sobrenadante da cultura de células infectadas. Os títulos obtidos ao longo do tempo de infecção foram mostrados graficamente, gerando as curvas de proliferação viral para cada linhagem celular. Conforme demonstrado na figura 4.5, os vírus não apresentam diferenças substanciais na cinética de replicação em todas as linhagens celulares analisadas.

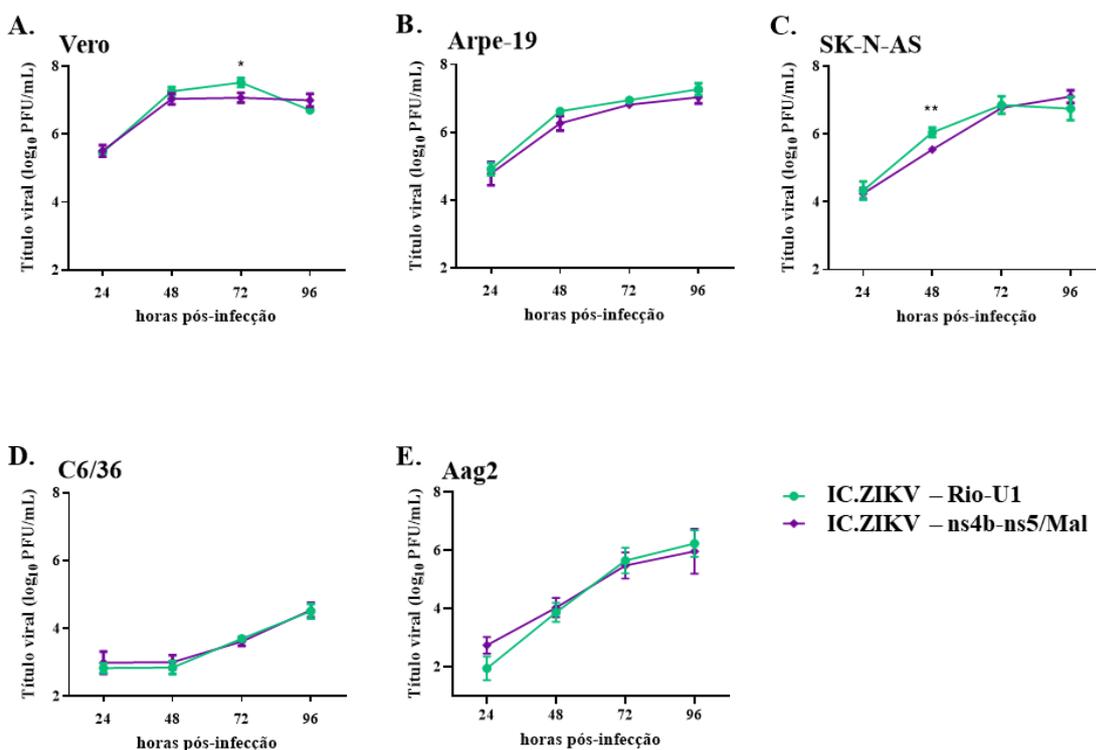


Figura 4.5 - Estudos comparativos da cinética de proliferação viral

Diferentes linhagens celulares foram infectadas com os vírus IC.ZIKV - Rio-U1 e IC.ZIKV - ns4b-ns5, com MOI de 0,02. Os sobrenadantes das culturas celulares infectadas foram coletados diariamente e o título foi determinado por contagem de placas de lise em três experimentos independentes. Cada marcação em círculo ou losango representam a média \pm desvio padrão dos experimentos. Não foram observadas diferenças significativas na comparação da cinética de proliferação viral de ambos os vírus ($p > 0,05$; *Unpaired t-Test-Two-tailed*), exceto nos pontos 72h em Vero e 48h em SK-N-AS (* $p < 0,05$; ** $p = 0,001$ *Unpaired t-Test - Two-tailed*). Os pontos representam a média do título obtido entre três ensaios independentes. As barras representam o desvio padrão.

Em células de mamífero (Figura 4.5 A, B e C), foi observado que o vírus quimérico IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal parece ser ligeiramente menos proliferativo quando comparado ao IC.ZIKV-Rio-U1, apresentando títulos mais baixos na maioria dos tempos analisados. Contudo, esse resultado não apresenta poder estatístico ($p > 0.05$; Vero/SK-N-AS/Arpe-19; *Unpaired t-Test – Two-tailed*). Excepcionalmente, quando realizado o teste estatístico por tempo de coleta, é possível afirmar que o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal foi menos proliferativo em alguns pontos. Em células Vero, foi observada diferença significativa apenas em 72 hpi (Figura 4.5 A), onde os títulos do vírus quimérico, com as sequências de NS4B e NS5 da linhagem ancestral, atingiram $1,24 \times 10^7$ PFU / mL contra $3,46 \times 10^7$ PFU / mL do vírus controle. O mesmo foi observado no ponto de 48 hpi em células SK-N-AS (Figura 4.5 C), onde o vírus quimérico apresentou um título de $3,54 \times 10^5$ PFU / mL, enquanto o vírus controle, nesse mesmo tempo de coleta, apresentou um título de $1,16 \times 10^6$ PFU / mL ($p < 0,05$; $p = 0,001$; *Unpaired t-Test - Two-tailed*).

A proliferação viral em células de mosquito, *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* (C6/36 e Aag2, respectivamente), por sua vez, apresentou um perfil diferente, com uma curva ascendente e com pico de proliferação viral em 96 hpi para ambos os vírus analisados. Em C6/36 o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal apresentou um título de $3,84 \times 10^4$ PFU / mL em 96 hpi, e o vírus controle mostrou um título muito próximo $3,70 \times 10^4$ PFU / mL. Em Aag2 também ocorreu o mesmo cenário, embora tenham atingido títulos maiores em 96 hpi, com $2,24 \times 10^6$ e $2,05 \times 10^6$ PFU / mL para os vírus quimérico e controle, respectivamente. Por fim, assim como em células de mamífero, não foram observadas diferenças na cinética de infecção nas linhagens celulares C6/36 e Aag2, entre os vírus IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal ($p > 0.05$; C6/36 / Aag2; *Unpaired t-Test - Two-tailed*).

4.2.5 Replicação viral em cultura de células tratadas com IFN- α ou IFN- β

Para determinar quão sensíveis à sinalização mediada por IFN-I são os vírus sintéticos de ZIKV, construídos no presente trabalho, a replicação viral em células Vero previamente tratadas com IFN- α e IFN- β foi avaliada. A concentração viral no sobrenadante das células infectadas foi determinada através da titulação por contagem de placas de lise (Figura 4.6).

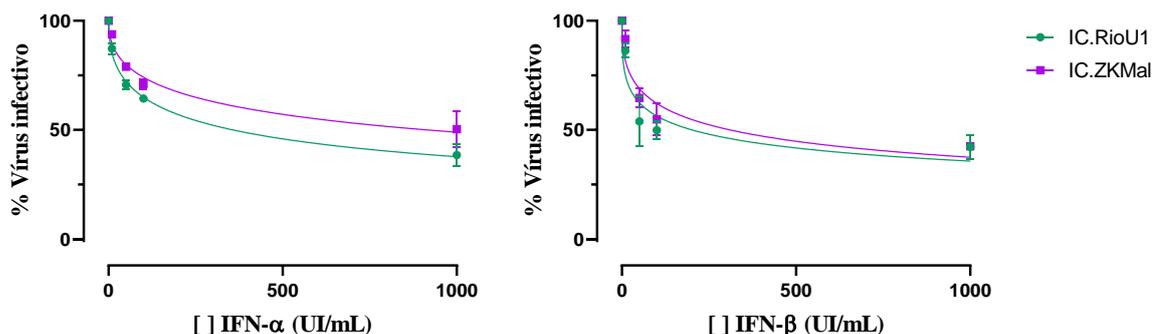


Figura 4.6 - Efeito do tratamento por IFN- α e IFN- β após 24 h de infecção de células Vero pelos IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal.

Os gráficos demonstram uma curva de dose-resposta de tratamento com IFN- α e IFN- β e o impacto na proliferação viral. Os gráficos e análises estatísticas foram realizadas com *GraphPad Prism*.

Ambos os vírus avaliados, quanto à sensibilidade à INF-I, mostraram que a replicação viral é afetada, tanto pela presença de IFN- α quanto IFN- β . Conforme pode ser observado na figura 4.6, a replicação viral é menor quando as concentrações de interferon aumentam. Contudo, a sensibilidade a interferon é similar entre os vírus IC.ZIKV - Rio-U1 e IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal tanto para IFN- α quanto IFN- β , não apresentando diferença significativa entre os vírus avaliados (IFN- α $p = 0,4988$; IFN- β $p = 0,6208$; Unpaired t-Test - Two-tailed).

Para as análises estatísticas, foram utilizados os valores de $\text{Log}_{10}\text{IC}_{50}$, representando a concentração, em unidades de interferon / mL capaz de inibir 50% da replicação viral. No caso do tratamento prévio da monocamada com INF- α , os valores de $\text{Log}_{10}\text{IC}_{50}$ foram de 2,551 e 2,960 para os vírus IC.ZIKV - Rio-U1 e IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal respectivamente. Já o tratamento com IFN- β , os valores de $\text{Log}_{10}\text{IC}_{50}$ foram de 2.301 e 2.490 respectivamente aos vírus acima mencionados.

4.2.6 Avaliação da virulência de IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal em modelo AG129

A virulência dos vírus IC.ZIKV - Rio-U1 e IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal1 foi comparada após infecção em modelo murino AG129 (202,208). A dose utilizada para a infecção dos animais foi de 10^4 PFU e foi controlada por titulação por contagem de placas de lise. O controle de inóculo apresentou resultado coerente com o esperado (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Resultado do controle de inóculo por experimento

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
IC.ZIKV – RioU1 (PFU / mL)	1,19E+04	8,89E+03	1,49E+04
IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal (PFU / mL)	1,10E+04	1,14E+04	1,22E+04

Ambos os vírus causaram perda de peso, que associado ao aparecimento de sintomas, elevaram os valores de escore clínico. Além disso, a mortalidade ocorreu em 100 % dos animais infectados, exceto os grupos infectados com Mock (controle negativo de infecção), os quais sobreviveram sem qualquer sinal aparente de infecção.

A morbidade foi analisada através da porcentagem de peso corporal em relação ao dia zero, ou seja, o dia da infecção. Considerou-se perda significativa, aquela $\geq 5\%$ do peso corporal do animal no dia zero. Em média, o início da perda significativa de peso corporal dos animais ocorreu no sétimo dia após a infecção por ambos os vírus. Dos 15 animais infectados com o vírus IC.ZIKV – Rio-U1, apenas 3 não apresentaram perda de peso $\geq 5\%$ no sétimo dia. Nessa fase de acompanhamento, a média de peso corporal estava em 92,72 % em relação ao dia zero. No entanto, no oitavo dia pós-infecção, todos os animais do grupo superaram a faixa de 10 % de perda de peso corporal, onde a média atingiu 87,67 % em relação ao dia zero. Além disso, no dia 8 pós-infecção, 3 animais já haviam sido submetidos a eutanásia, tendo em vista todo o contexto de morbidade, que envolve não só a perda de peso, mas também o aparecimento de sinais clínicos que configuram sofrimento animal.

Por outro lado, a porcentagem média de peso corporal nos animais infectados com o vírus IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal, em 7 dias pós-infecção, foi de 96,11 %. Nesse período, apenas 5, de 15 animais, apresentaram perda de peso $\geq 5\%$ em relação ao dia zero. Além disso, no oitavo dia pós-infecção, todos os animais do grupo infectado com o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal ainda encontravam-se vivos, embora com alguns sintomas e registros de perda de peso. Nesse período, a porcentagem média do peso corporal estava em 90,41 % (Figura 4.7 - A).

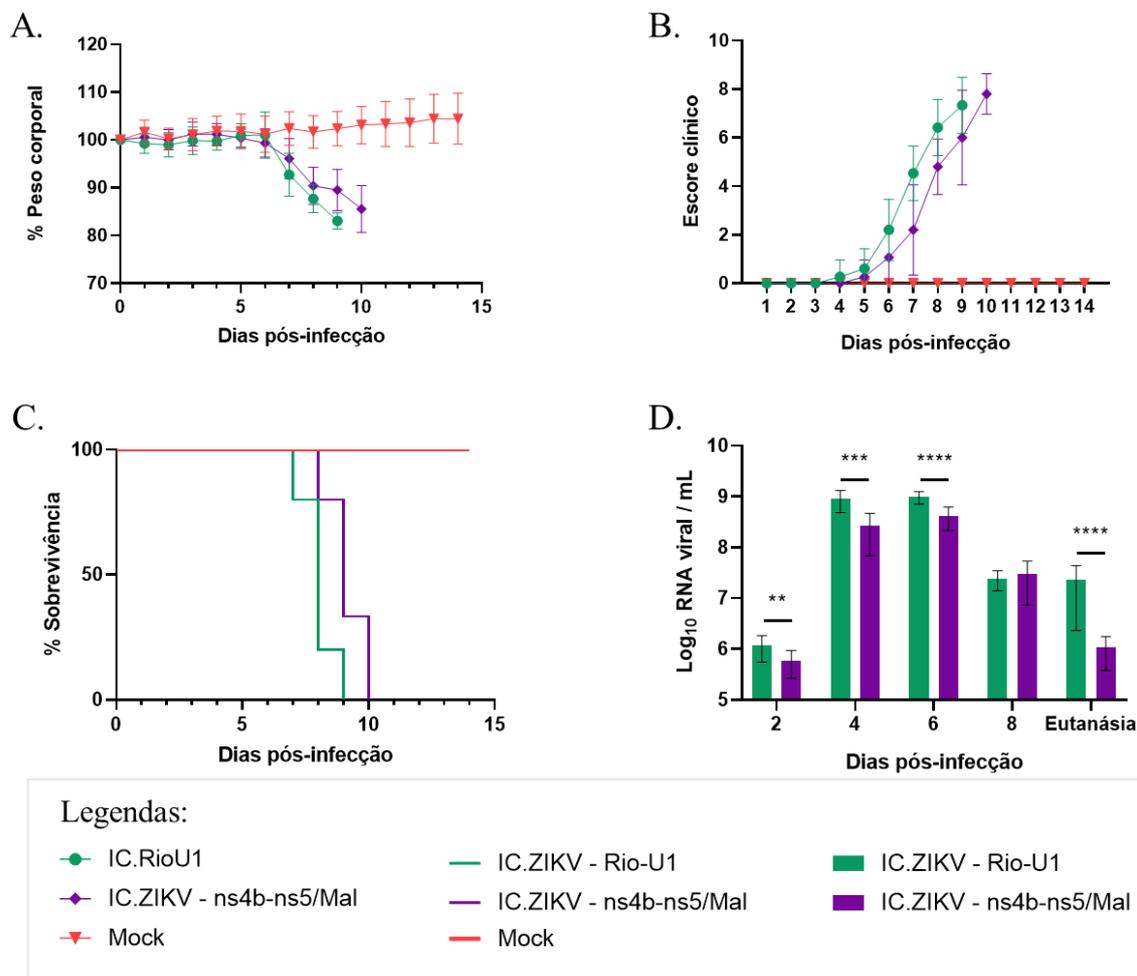


Figura 4.7 - Comparação da infectiosidade dos vírus IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal em modelo de camundongo AG129

Camundongos de 8 a 10 semanas de idade foram infectados com 10^4 PFU em meio diluente, via subcutânea, nos coxins plantares posteriores. O grupo Mock foi inoculado apenas com meio diluente. Os animais foram monitorados diariamente por 14 dias. A morbidade entre os grupos de animais foi determinada pela porcentagem de peso corporal (A) e escore clínico (B). A taxa de mortalidade ao longo do tempo foi expressa em curvas de sobrevivência de Kaplan Meier (C). Em (D) são apresentadas as cargas de RNA viral detectadas em amostras de sangue, coletadas a cada 2 dias e no *end-point*. Os sinais clínicos avaliados para determinação do escore estão descritos no anexo do artigo publicado, em anexo I. As marcações em (A) e (B) representam a média dos resultados obtidos, em três experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão ($n = 5$ animais / grupo). As análises estatísticas foram realizadas com *GraphPad Prism*. As barras na horizontal na parte superior das barras verticais do gráfico (D) indicam as comparações realizadas. Os asteriscos indicam as diferenças estatísticas: ** $p = 0,001$; *** $p = 0,0001$; **** $p < 0,0001$ (*Unpaired t-Test – Two-tailed*).

A determinação do escore clínico foi caracterizada, em geral, por perda de peso, postura curvada e eriçamento dos pelos. Alguns animais apresentaram também dificuldade de locomoção, vocalização, taquipneia e/ou dispneia. Os valores de escore clínico são apenas qualitativos, o que dificulta a validação estatística. No entanto, foi observada uma diferença, mesmo que sutil, nos valores de escore clínico entre os grupos infectados com IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal.

Alguns animais do grupo infectado com o vírus com fenótipo selvagem, IC.ZIKV – RioU1, começaram a apresentar sintomas iniciais, no quarto dia pós-infecção. No entanto isso ocorreu com apenas dois animais, entre 15 que foram infectados e estavam sob acompanhamento. Os sintomas iniciais incluem ligeiro eriçamento de pelos ou leve postura curvada. Com 5 dias pós-infecção, o número de animais com sintomas iniciais subiu para 6. No sexto dia, 12 animais já apresentavam sintomas, com o valor de escore clínico variando entre 2 e 4, já evidenciando sinais importantes de sofrimento. Em sete dias, todos os animais apresentavam sinais e sintomas claros de sofrimento, o que levou a eutanásia de 3 animais. Já no oitavo dia, apenas 3 animais ainda estavam vivos, contudo, apresentando sintomatologia importante, atingindo a pontuação 5 no valor de escore clínico. Esses, foram eutanasiados com 9 dias pós-infecção.

No caso do grupo de animais infectados com IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal, o aparecimento de sinais clínicos ocorreu no quinto dia pós-infecção, e em apenas 2 animais. No sexto dia, 8 animais já apresentavam algum sinal de infecção, mesmo com valor de escore clínico ainda baixo em comparação ao grupo anterior, no mesmo período. Com sete dias pós-infecção, ainda havia 4 animais sem sinal ou sintoma aparente. Contudo, no oitavo dia, todos os animais evidenciaram sinais importantes de sofrimento, com valor de escore clínico que variou de 2 a 7, necessitando eutanasiar 3 animais, os quais atingiram escore clínico ≥ 6 . No dia 9, outros 7 animais foram eutanasiados por atingirem o escore clínico ≥ 6 , com valores que variaram de 6 a 11. Nesse período, os 5 animais restantes também exibiam sintomas importantes, e superaram o valor 6 de escore clínico com 10 dias pós-infecção, e foram eutanasiados.

Diante desses resultados, pode-se observar que os animais infectados com o vírus IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal exibiram valores de escore clínico menores e ligeiramente mais tardios quando comparados com os animais infectados com IC.ZIKV - Rio-U1 (Figura 4.7 - B). Contudo, todos os animais infectados atingiram o escore clínico ≥ 6 , e foram submetidos a eutanásia.

Em relação a mortalidade, foi observado diferença significativa na comparação da curva de sobrevivência, entre os grupos infectados com o vírus IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal e IC.ZIKV - Rio-U1 ($p = 0.0004$; Log-rank test). A mortalidade dos animais infectados com IC.ZIKV - Rio-U1 teve início no dia 7 pós-infecção. Nesse período 3 animais foram submetidos a eutanásia. A maioria dos animais desse grupo, foram eutanasiados com 8 dias pós-infecção, restando apenas 3 animais, que por sua vez,

foram eutanasiados no dia seguinte. Desta forma, a mortalidade desse grupo atingiu 100 % em 9 dias pós-infecção. Já os animais infectados com IC.ZIKV ns4b-ns5/Mal, a mortalidade teve início no dia 8, onde 3 animais foram submetidos a eutanásia. Com 9 dias pós-infecção, outros 7 animais desse grupo foram eutanasiados. A mortalidade dos animais infectados com IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal atingiu 100 % 10 dias pós-infecção. Esse resultado mostrou que, os grupos de animais infectados com o vírus contendo as sequências das proteínas NS4B e NS5 derivadas da linhagem ancestral tiveram uma maior sobrevivência. O tempo médio de sobrevivência (AST) foi de $9,13 \pm 0,74$ e $8,0 \pm 0,65$ para os grupos infectados com IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal vírus e IC.ZIKV - Rio-U1, respectivamente (Figura 4.7-C).

Por fim, através de qRT-PCR, o número de cópias de RNA viral por mL de sangue foi quantificado para a determinação da viremia ao longo do tempo. Conforme pode ser observado na figura 4.7 - D, em dois dias pós-infecção, o grupo infectado com o vírus IC.ZIKV – Rio-U1 apresentava uma carga viral de $1,20 \times 10^6$ cópias de RNA / mL, enquanto o grupo infectado com o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal apresentava $5,99 \times 10^5$. No quarto dia pós-infecção, a carga viral atingiu $9,04 \times 10^8$ e $2,70 \times 10^8$ cópias de RNA / mL nos grupos infectados com o IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal respectivamente. O pico de viremia ocorreu no dia 6 pós-infecção, para ambos os grupos de animais, atingindo uma carga viral de $9,87 \times 10^8$ e $4,20 \times 10^8$ cópias de RNA / mL, respectivamente para IC.ZIKV- Rio-U1 e IC.ZIKV - ns4b-ns5/Mal.

Em todos os pontos de coleta de sangue, a carga viral determinada apresentou diferença significativa entre os grupos de animais analisados, com exceção da coleta do dia 8 pós-infecção. Neste ponto de coleta de sangue, o grupo infectado com IC.ZIKV – Rio-U1 apresentava uma carga viral de $2,45 \times 10^7$, no entanto o grupo possuía apenas 2 animais disponíveis para coleta, os demais já haviam sido eutanasiados por terem atingido o valor de escore clínico ≥ 6 . Desta forma, além da reduzida quantidade de animais disponíveis nesse ponto de coleta, é importante relatar que são animais que se distanciaram do grupo em si, pois estão além do desvio padrão do tempo de sobrevivência deste grupo (AST do grupo IC.ZIKV - Rio-U1 = $8,0 \pm 0,65$). Por outro lado, a maioria dos animais infectados com IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal encontravam-se disponíveis para coleta de sangue no dia 8, com exceção de 3 que foram eutanasiados nesse mesmo dia. Nesse grupo, então, a carga viral com 8 dias pós-infecção atingiu $3,06 \times 10^7$ cópias de RNA / mL. Embora a carga viral se apresentasse ligeiramente mais alta nesse último grupo relatado, a comparação

estava sendo realizada entre um grupo onde a maioria permanecem vivos (infectados com IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal), contra apenas 2 animais remanescentes do grupo infectado com o vírus com fenótipo selvagem.

A carga viral média determinada no dia da eutanásia também sofre interferência pelo tempo de sobrevivência dos animais, pois nesse ponto de coleta de sangue, encontravam-se animais com tempos de infecção diferentes dentro de um mesmo grupo. Por exemplo, no grupo infectado com IC.ZIKV – Rio-U1, houve animais que foram eutanasiados com 7, 8 e 9 dias pós-infecção, enquanto que no grupo infectado com IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal, os animais foram eutanasiados com 8, 9 e 10 dias pós-infecção. Isso ocorreu pois o intuito era avaliar o tempo de sobrevivência dos animais infectados bem como comparar o perfil clínico e de morbidade que cada vírus causaria ao longo do tempo, sendo assim, os animais foram eutanasiados mediante o critério de escore clínico (≥ 6) e isso ocorreu em tempos diferentes entre os vírus analisados. Porém, no geral, houve notória discrepância na carga viral média obtida nos dias de eutanásia, entre os grupos infectados com IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal, que exibiram $2,29 \times 10^7$ e $1,06 \times 10^6$ cópias de RNA viral / mL respectivamente, mostrando que a carga viral, no dia da eutanásia, foi menor nos animais infectados com IC.ZIKV – ns4b/ns5/Mal do que nos animais infectados com o vírus com fenótipo selvagem.

Para comparação estatística, os valores obtidos foram transformados para escala logarítmica em base de 10 e posteriormente a comparação da carga viral foi realizada por tempo de coleta, através da aplicação do teste *Unpaired t-Test-Two-tailed*, utilizando *GraphPad Prism 8*.

Nesse experimento, foi possível observar que a regressão da sequência nucleotídica dos genes NS4B e NS5 para a linhagem ancestral não promoveu atenuação viral suficiente, ao ponto do vírus quimérico IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal tornar-se um candidato vacinal. De acordo com os resultados acima, o vírus quimérico ainda foi capaz de promover a mortalidade em 100 % dos animais, além de terem apresentado os mesmos sinais clínicos que os animais que foram infectados com IC.ZIKV – Rio-U1. No entanto, o vírus quimérico IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal apresentou uma tendência a ser menos virulento em comparação ao vírus com fenótipo selvagem, mostrando que as mutações que ocorreram nas proteínas NS4B e NS5 ao longo da evolução viral podem estar associados a aquisição de uma melhor competência viral, tendo em vista as diferenças significativas observadas tanto na taxa de sobrevivência quanto na carga virêmica ao longo do tempo.

4.3 Obtenção das variantes virais IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3

Nesta etapa do presente trabalho, as sequências dos mesmos genes, NS4B e NS5, derivadas do vírus Rio-U1, foram utilizadas para geração de sequências que diferem quanto a frequência de pares de códons em seu genoma, de modo a se tentar promover atenuação viral, por desotimização da tradução dessas proteínas.

4.3.1 Alteração na sequência dos genes NS4B e NS5 através da permuta nucleotídica

As sequências dos genes NS4B e NS5 do vírus ZIKV Rio-U1, obtidas no GenBank, foram utilizadas como base para a geração de inúmeras sequências com diversas mutações sinônimas ocasionadas por permutas nucleotídicas, a partir do programa *CodonShuffle* (186).

O programa foi executado em duas linhas de comando diferentes, a fim de obter sequências permutadas a partir dos algoritmos dN231 e N3, ou seja, permutas nucleotídicas entre pares de códons, alterando o segundo e o terceiro nucleotídeo do primeiro códon e o primeiro nucleotídeo do códon vizinho, por nucleotídeos em posições equivalentes (algoritmo dN231) ou permutas randômicas do terceiro nucleotídeo de cada códon (N3). Ao final da execução do *script*, o programa gerou, *par default*, 1000 sequências permutadas. Além disso, o próprio programa *CodonShuffle* calculou diferentes parâmetros, dos quais, o Número Efetivo de Códons (ENC), o Índice de Adaptação de Códon (CAI) e a Tendência de Pares de Códons (CPB) foram escolhidos para analisar as sequências e indicar quais delas poderiam apresentar maior probabilidade de atenuação (Figura 4.8).

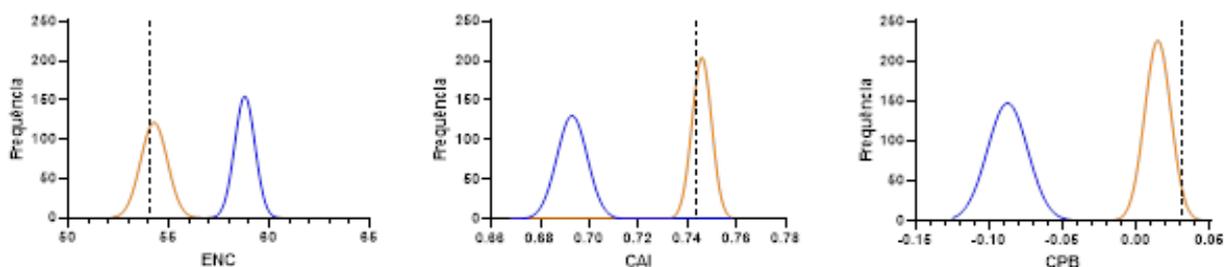


Figura 4.8 - Análise das sequências com mutações sinônimas por permuta nucleotídica.

Os parâmetros escolhidos para analisar todas as sequências permutadas foram número efetivo de códons (ENC), índice de adaptação de códon (CAI) e tendência de pares de códons (CPB). Em laranja estão representadas as 1000 sequências obtidas pelo algoritmo dN231. Em azul estão representadas outras 1000 sequências obtidas a partir do algoritmo N3. A linha tracejada representa a sequência base - genes NS4B e NS5 – ZIKV Rio-U1 (posição genômica 6915 – 10376).

O programa *CodonShuffle* gerou uma tabela contendo os valores de cada parâmetro avaliado, individualizados por sequência permutada. Representamos esses valores no histograma acima (Figura 4.8). Com base nesses valores, foi escolhida a replicata número 750 (de 1000), para o algoritmo dN231, por apresentar o valor de CPB negativo (- 0,01). Valores negativos de CPB, apontam para uma sub-representação de códons, o que indica ser desfavorável para a tradução da proteína. Já para o algoritmo N3, foi escolhida a replicata número 548 (de 1000) por apresentar o menor valor de ENC (56,8) e menor valor de CAI (0,67). Em relação ao ENC, os valores variam de 20 a 61, e quanto mais próximo de 20, refletem um uso de códons mais restrito, que por consequência pode afetar a velocidade com a qual o gene é traduzido. E em relação ao CAI, esses valores variam de 0 a 1, e quanto mais próximo de zero, menor é a adaptação relativa ao hospedeiro, o que também indica uma baixa expressão do gene. A tabela 4.5 demonstra os valores obtidos em cada parâmetro nas replicatas escolhidas.

Tabela 4.5 - Análises dos parâmetros selecionados para cada replicata obtida pela ferramenta *CodonShuffle*

Algoritmo	Replicata	Diferença nucleotídica	ENC	CAI	CPB
original	(Rio-U1)	-	54,07	0,743	0,03122963605
dN231	750	714	53,45	0,755	-0,01090121317
N3	548	643	56,79	0,672	-0,0734774696707106

4.3.2 Obtenção dos vírus quimérico IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 pela tecnologia do clone infeccioso.

As variantes sintéticas, contendo as sequências das proteínas NS4B e NS5 alteradas por permuta nucleotídica, também foram construídas a partir do clone IC.ZIKV – Rio-U1 (203). As abordagens utilizadas para a obtenção desses vírus, foram as mesmas utilizadas tanto para a obtenção do clone infeccioso baseado na linhagem epidêmica (anexo I) quanto do clone IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal contendo as sequências das proteínas NS4B e NS5 baseadas na linhagem ancestral (Seção 4.2).

Os vírus, nomeados IC.ZIKV – ns4b-ns5/dn231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, foram construídos com a finalidade de se obter um vírus atenuado. Desta forma, foram obtidos dois padrões diferentes de sequências das proteínas NS4B e NS5, baseados nos algoritmos mencionados anteriormente, que apresentaram centenas de alterações nucleotídicas, porém, sem alteração na sequência aminoacídica.

A partir da obtenção das sequências, através da ferramenta *CodonShuffle*, fragmentos sintéticos foram desenhados pela equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, e sintetizados pela *GenScript*.

Da mesma forma, os fragmentos foram desenhados a fim de substituir parcialmente o fragmento Z4 e completamente o fragmento Z2 nos plasmídeos pCC1-Z3Z4 e pCC1-MCS-Z1Z2 respectivamente. Os fragmentos dN231 e N3, porção A são compostos pela sequência genômica de parte da proteína NS3, da proteína NS4A e do peptídeo 2K, baseados na linhagem Rio-U1 (posição genômica 5969 – 6915) e pela proteína NS4B e parte da proteína NS5 com sequências genômicas contendo as alterações sinônimas por permuta nucleotídica (posição genômica 6915 – 8843). Os fragmentos dN231 e N3, porção B, são compostos pela sequência remanescente da proteína NS5, com as alterações planejadas (posição genômica 8843 – 10376), e pela região não codificante 3'UTR, do vírus Rio-U1 (posição genômica 10374 – 10807).

Para a obtenção dos constructos virais, foi utilizado o sistema de dois plasmídeos (pCC1-Z3Z4 e pCC1-MCS-Z1Z2), conforme o trabalho publicado, disponível no anexo I. De modo que os fragmentos dN231-A e N3-A são análogos ao fragmento Z4, e os fragmentos dN231-B e N3-B são análogos ao fragmento Z2, apenas foi realizado uma substituição dos fragmentos equivalentes.

O fragmento Z4, do plasmídeo pCC1-Z3Z4, foi retirado através da digestão pelas endonucleases *AfeI* e *MluI* e substituído pelos fragmentos dN231-A ou N3-A, retirados do plasmídeo de origem pUC57 através das mesmas enzimas (posição 5969

– 8843). Essa montagem resultou nos plasmídeos pCC1-Z3Z4(dN231) e pCC1-Z3Z4(N3), os quais contêm a região central do genoma de ZIKV (Figura 4.9-A). Da mesma forma, foram montados os plasmídeos pCC1-MCS-Z1Z2(dN231) e pCC1-MCS-Z1Z2(N3), ou seja, o fragmento Z2 do plasmídeo pCC1-MCS-Z1Z2, foi substituído na mesma posição (8843 – 10806), através das endonucleases *MluI* e *XhoI*, pelos fragmentos dN231-B ou N3-B (Figura 4.9-B).

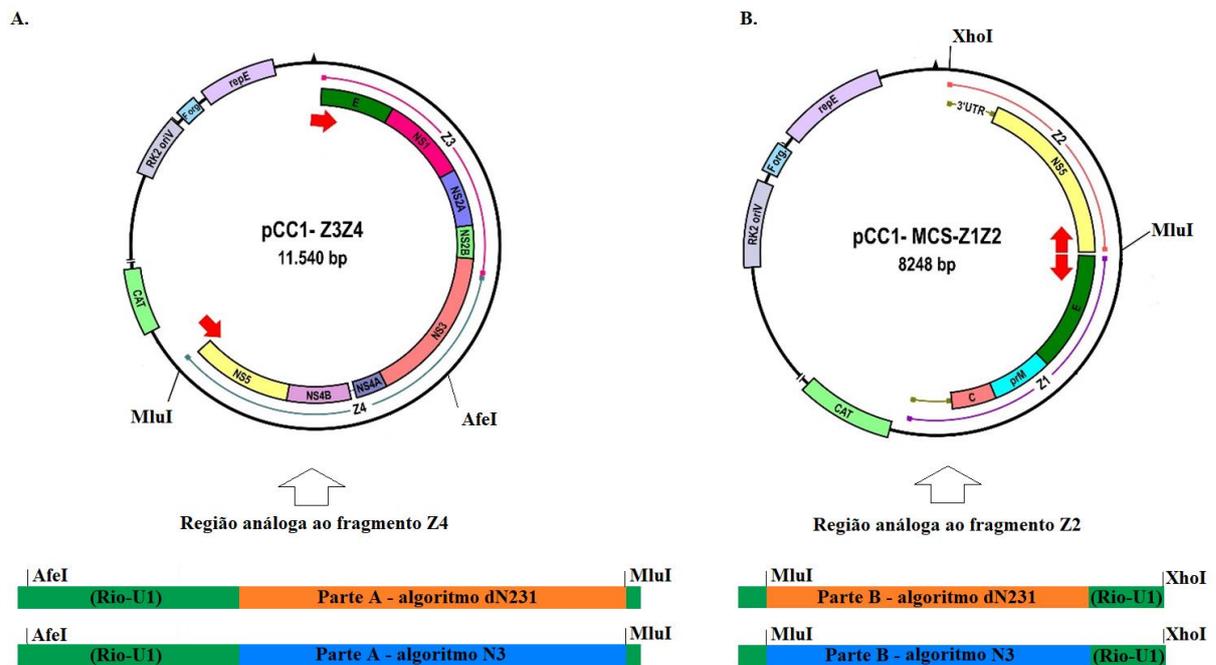


Figura 4.9 - Representação esquemática das clonagens dos genes sintéticos com as sequências permutadas para os algoritmos dN231 e N3.

A – Substituição de parte do fragmento Z4, do plasmídeo pCC1-Z3Z4, pelos fragmentos contendo as sequências dos genes alvo com permutas nucleotídicas. As endonucleases utilizadas para esta clonagem foram *AfeI* e *MluI*. Os sítios para essas enzimas estão indicados tanto no diagrama plasmidial quanto nos diagramas que representam os fragmentos sintéticos. B – Substituição total do fragmento Z2, do plasmídeo pCC1-MCS-Z1Z2 pelos fragmentos contendo as sequências de NS5 com permutas nucleotídicas. Para essa etapa, as endonucleases utilizadas foram *MluI* e *XhoI*. Os respectivos sítios estão indicados no diagrama plasmidial e nos diagramas que representam os fragmentos sintéticos. Setas em vermelho indicam a posição dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da massa plasmidial.

Todas as etapas subsequentes à obtenção do sistema de dois plasmídeos, foram exatamente iguais às descritas na seção 4.2.2, que por sua vez são as mesmas abordagens de obtenção de clone infeccioso de ZIKV - IC.ZIKV-Rio-U1.

4.3.3 Recuperação viral

A partir do RNA transcrito, células Vero foram transfectadas e no dia 5 após a transfecção RNA viral de IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231, foi possível observar células com aspecto refringentes e arredondadas, soltas da monocamada celular, caracterizando o efeito citopático. Por outro lado, nesse mesmo período, não foi observado qualquer alteração, na monocamada das células transfectadas com RNA viral do IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, que fosse características de efeito citopático. No entanto, ambos os sobrenadantes das culturas de células Vero transfectadas, foram positivos para a presença de partículas virais após reação de RT-PCR. Foram escolhidos dois jogos de oligonucleotídeos para amplificar fragmentos nas regiões em que foram realizadas as substituições (Z4 e Z2). Os fragmentos foram amplificados nas regiões 3085 – 3385 e 5593 – 5933 (jogos de oligonucleotídeos ZK3F – ZK2R e ZK5F – ZK4R, respectivamente) e após terem sido submetidos a eletroforese, apresentaram compatibilidade com o tamanho esperado, ou seja, 301 pb e 341 pb, conforme pode ser visualizado na figura 4.10.

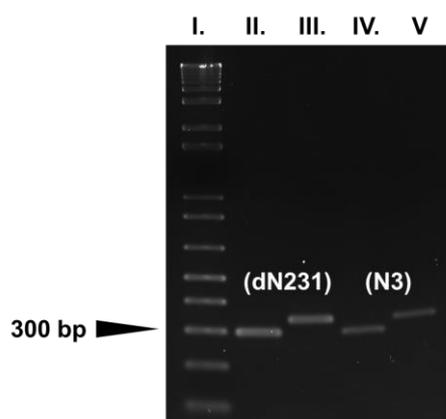


Figura 4.10 - RT-PCR de confirmação da recuperação viral.

Foram realizadas duas reações, com jogos de oligonucleotídeos que anelam nas regiões análogas aos fragmentos Z4 e Z2. (I). Marcador de tamanho molecular 1Kb Plus (*Thermo Fisher Scientific*). (II). Amplicon referente a parte A da replicata viral dN231 – 301 pb. (III). Amplicon referente a parte B da replicata viral dN231 – 341 pb. (IV). Amplicon referente a parte A da replicata viral N3. (V). Amplicon referente a parte B da replicata viral N3. (II e IV – Parte A: refere-se a região análoga ao fragmento Z4; III e V – Parte B: refere-se a região análoga ao fragmento Z2).

A integridade genômica de ambos os vírus foi validada por sequenciamento nucleotídico do genoma completo. Após a obtenção das sequências, as mesmas foram alinhadas com as sequências de referência utilizando o *Software SeqMan* (DNASStar Lasergene 8) e nenhuma alteração indesejada foi detectada.

Tendo em vista a confirmação da obtenção viral, o sobrenadante da cultura de células, infectadas com os vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, foi coletado e utilizado para preparo de um estoque viral de segunda passagem. Durante a titulação do estoque 2P, foi observado que o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 não formava placas de lise após 7 dias de incubação. Com isso, o tempo de incubação foi aumentado para 10 dias, e depois para 12 dias, e mesmo assim, não havia a formação de placas de lise. Com o aumento do tempo de incubação, a monocamada de células já não se apresentava com aspecto normal, era notório a alteração de pH do meio de cultura. Então, o meio de cultura foi substituído para um meio mais recente, a fim de aumentar ainda mais o tempo de incubação, mas não foi possível recuperar o aspecto normal da monocamada de células Vero. Diante dessa dificuldade, o estoque 2P foi titulado por contagem de focos de infecção, uma vez que o vírus IC.ZIVK – ns4b-ns5/N3 não produz efeito citopático visível. Desta forma, como os vírus serão avaliados em paralelo, tanto a titulação do estoque de ambos os vírus construídos, quanto as titulações realizadas em ensaios posteriores, foram realizadas da mesma forma, ou seja, por contagem de foco de infecção.

O título viral obtido, após a média de três experimentos independentes, foi de $9,45 \times 10^6$ e $3,46 \times 10^6$ FFU / mL para os vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 respectivamente.

4.3.4 Estudos de proliferação viral em cultura de células

Foi realizada a análise da proliferação dos vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 em diferentes linhagens celulares, a fim de avaliar se as alterações nucleotídicas inseridas nas sequências das proteínas NS4B e NS5 refletiram na capacidade destes vírus infectarem e se multiplicarem em diferentes tipos celulares.

A proliferação viral das variantes de IC.ZIKV ns4b-ns5/dN231 e ns4b-ns5/N3 foi acompanhada durante 4 dias (96 h), e o perfil replicativo ao longo do tempo foi comparado com o vírus sintético controle, com fenótipo selvagem, IC.ZIKV – Rio-U1. As culturas de células foram infectadas em MOI de 0,02 e diariamente foram retiradas alíquotas do sobrenadante da cultura de células infectadas, as quais foram tituladas, posteriormente, por contagem de focos de infecção. Os títulos obtidos foram plotados

em gráfico, em escala logarítmica em base de 10, gerando curvas de proliferação viral para cada linhagem celular.

Conforme pode ser observado através dos gráficos (Figura 4.11), o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 alcançou títulos similares ao vírus sintético controle IC.ZIKV – RioU1, exceto em dois pontos na curva de proliferação em células de mosquito, *Aedes albopictus* (C6/36). Por outro lado, o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 apresentou um perfil menos proliferativo em todas as linhagens celulares analisadas, alcançando títulos menores e significativamente diferentes em relação ao vírus controle.

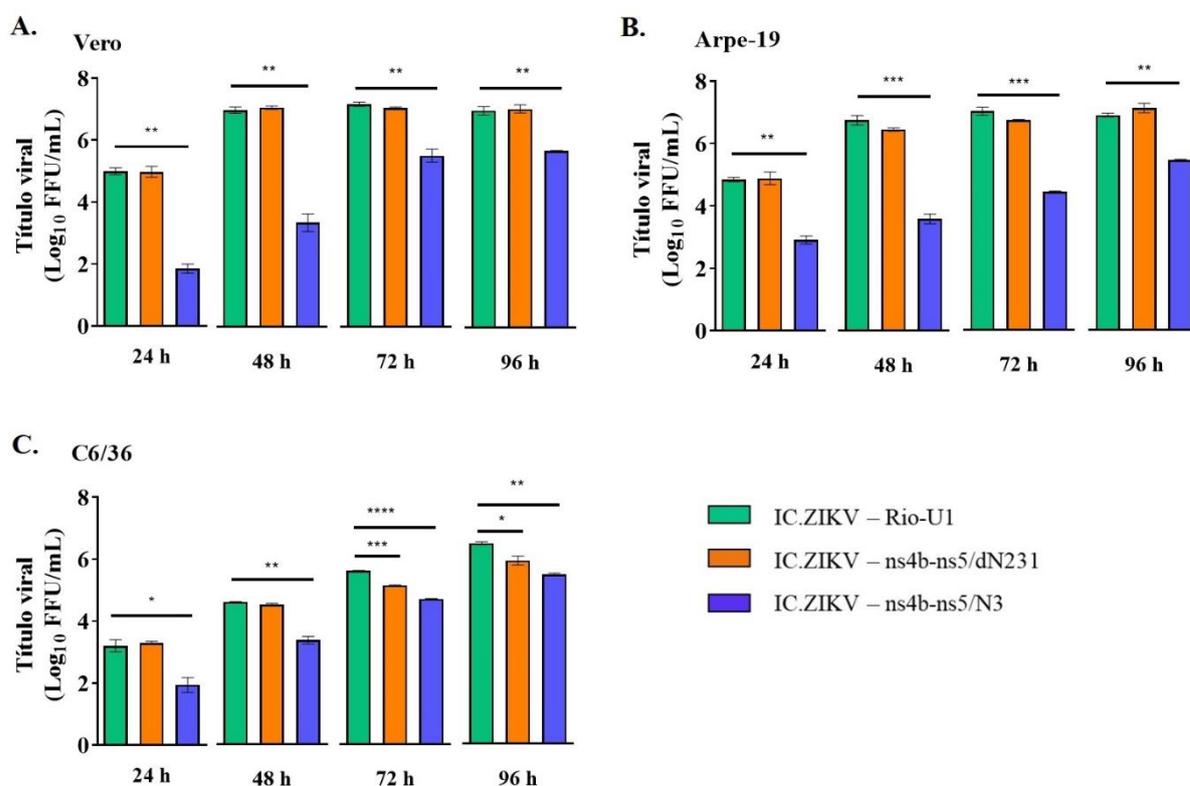


Figura 4.11 - Estudos comparativos da cinética de proliferação viral.

Diferentes linhagens celulares (indicadas na figura) foram infectadas com os vírus IC.ZIKV – Rio-U1 (controle), IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, com MOI de 0,02. Os sobrenadantes das culturas celulares infectadas foram coletados diariamente e o título foi determinado por contagem de focos de infecção em dois experimentos independentes. As barras na horizontal na parte superior dos gráficos, juntamente com os asteriscos, indicam as diferenças estatísticas obtidas a partir de teste de comparações múltiplas *Ordinary one-way ANOVA* (* p < 0,05; ** p = 0,001; *** p = 0,0001; **** p < 0,0001). O quadrante inferior direito da figura encontra-se a legenda para os gráficos.

No caso da proliferação viral em células Vero (Figura 4.11 A), o pico de proliferação para a variante ns4b-ns5/dN231 ocorreu em 48 hpi, com um título de $1,08 \times 10^7$ FFU / mL, mas com uma diferença mínima para o título viral alcançado em 72 hpi ($1,03 \times 10^7$ FFU / mL) e em 96 hpi ($1,01 \times 10^7$ FFU / mL). Aparentemente, o vírus se replica rapidamente em célula Vero e atinge um platô. Já o vírus controle IC.ZIKV

– Rio-U1 apresentou um perfil de proliferação viral em curva, atingindo o pico em 72 hpi, semelhante ao que foi observado na seção 4.2.4, alcançando os títulos $9,2 \times 10^6$, $1,4 \times 10^7$ e $8,8 \times 10^6$ FFU / mL respectivamente em 48, 72 e 96 hpi. Nesses mesmos períodos pós infecção, o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 apresentou títulos $2,7 \times 10^3$, $3,45 \times 10^5$ e $4,48 \times 10^5$ FFU / mL (48, 72 e 96 hpi) mostrando uma diferença significativa no perfil proliferativo dessa variante viral, exibindo títulos menores e também uma replicação viral mais lenta, em relação ao vírus controle.

Um cenário semelhante foi observado em células Arpe-19 (Figura 4.11 B). O vírus controle exibiu um perfil proliferativo em curva, com pico de infecção em 72 hpi, atingindo um título de $1,08 \times 10^7$ FFU / mL. Já o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231, apresentou uma curva ascendente, diferentemente do que foi observado em células Vero. Apesar do perfil diferente, os títulos alcançados em células Arpe-19 infectadas com a variante ns4b-ns5/dN2311, não apresentaram diferenças significativas em relação ao vírus controle em nenhum tempo de coleta. Os títulos alcançados foram $8,53 \times 10^4$, $2,83 \times 10^6$, $5,33 \times 10^6$ e $1,36 \times 10^7$ FFU / mL, em 24, 48, 72 e 96 hpi respectivamente. Por outro lado, a variante ns4b-ns5/N3 novamente apresentou um perfil menos proliferativo, com diferenças ainda maiores, no ponto de vista estatístico, em relação ao vírus controle, principalmente em 48 e 72 hpi, onde os títulos obtidos nesses tempos foram $4,05 \times 10^3$ e $2,70 \times 10^4$ FFU / mL, respectivamente.

Já as curvas de proliferação em células C6/36 (Figura 4.11 C), mostraram diferenças não só entre o vírus controle e a variante ns4b-ns5/N3, mas também entre o vírus controle e a variante ns4b-ns5/dN231. Nesta linhagem celular, os títulos obtidos em 72 e 96 hpi com o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 foram respectivamente $1,22 \times 10^5$ e $7,85 \times 10^5$ FFU / mL contra $3,68 \times 10^5$ e $2,68 \times 10^6$ FFU / mL em 72 e 96 hpi com o vírus controle, evidenciando uma diferença significativa entre esses vírus nesses dois tempos de coleta. Uma diferença ainda maior foi observada entre o vírus controle e a variante ns4b-ns5/N3. Além de ser uma diferença maior entre os títulos, essa diferença também ocorreu em 24 e 48 hpi. Nesses tempos, o título alcançado em células C6/36 infectadas com a variante ns4b-ns5/N3 foram $1,0 \times 10^2$ e $2,25 \times 10^3$ respectivamente. Já em 72 hpi ocorreu a maior diferença estatística entre o vírus controle ($3,68 \times 10^5$ FFU / mL) e a variante ns4b-ns5/N3 ($4,58 \times 10^4$ FFU / mL).

Diante dos resultados obtidos através das curvas de proliferação viral, a diferença na proliferação viral da variante ns4b-ns5/N3 em relação ao vírus controle aponta para uma provável atenuação viral. Em relação a variante ns4b-ns5/dN231, é provável que esse vírus tenha se tornado menos replicativo em células de inseto, por

outro lado em células de mamífero não foi observado nenhum perfil de atenuação viral.

4.3.5 Avaliação da virulência de IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 em modelo AG129

A virulência das variantes virais ns4b-ns5/dN231 e ns4b-ns5/N3 foi comparada ao vírus sintético IC.ZIKV - Rio-U1, com fenótipo selvagem, após infecção em modelo murino AG129 (202,208). A dose utilizada para a infecção dos animais foi de 10^4 PFU e foi controlada por titulação por contagem de placas de lise e focos de infecção. Visto que o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 não forma placas de lise, não foi possível validar o controle de inóculo no primeiro experimento, pois foi realizado controle de inóculo apenas por contagem de placas de lise. No entanto, o controle de inóculo realizado para os demais vírus foi validado, pois a contagem de placas de lise confirmou que a concentração do inóculo estava próxima à $1,0 \times 10^4$ PFU / mL. Já nos experimentos 2 e 3, os inóculos titulados por ambas as metodologias, apresentaram uma concentração viral coerente com o que era esperado. Conforme pode ser observado na tabela abaixo, os títulos dos inóculos obtidos através da contagem por unidade formadora de foco de infecção, tendem para uma concentração menor do que os títulos obtidos por contagem de placas de lise. Porém, essa diferença é observada tanto no experimento 2 quanto no experimento 3. Sendo assim, tendo em vista que o título do inóculo obtido em PFU / mL do primeiro experimento estava em conformidade com os demais experimentos, foi considerado que os animais receberam doses de inóculo viral similares nos três ensaios independentes (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Resultado do controle de inóculo por experimento.

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	PFU	PFU / mL	FFU / mL	PFU / mL	FFU / mL	
IC.ZIKV – Rio-U1	1,16E+04	1,25E+04	8,44E+03	1,03E+04	6,03E+03	
IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231	1,03E+04	7,06E+03	8,91E+03	1,19E+04	4,42E+03	
IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3	-	-	8,17E+03	-	8,51E+03	

Os resultados mostraram que o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 possui um perfil muito similar ao vírus controle IC.ZIKV – Rio-U1, tanto no que se refere ao tempo

médio de sobrevivência, quanto nos demais parâmetros avaliados. Já o vírus IC.ZIKV - ns4b-ns5/N3 mostrou um perfil atenuado em comparação com o controle (Figura 4.12). No entanto, embora a variante ns4b-ns5/N3 tenha apresentado um perfil atenuado, alguns animais infectados com esse vírus exibiram sinais e sintomas que atingiram o valor de escore clínico ≥ 6 , fazendo-se necessária a realização da eutanásia. Por outro lado, parte dos animais desse mesmo grupo, não apresentaram sinais, nem sintomas e mantiveram-se com aspectos saudáveis ao longo do experimento.

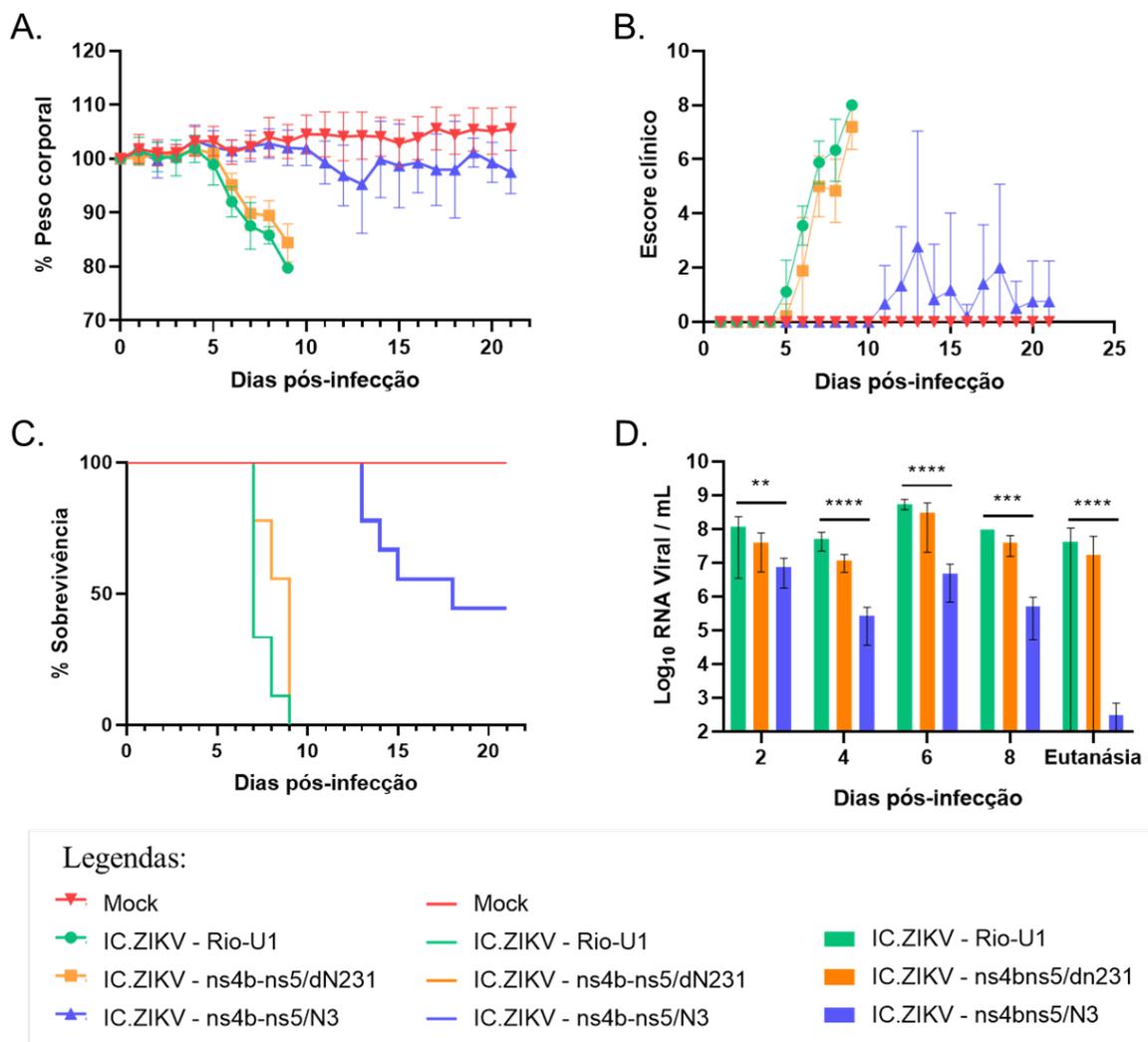


Figura 4.12 - Avaliação, em modelo de camundongo AG129, da infecciosidade dos vírus IC.ZIKV - ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV - ns4b-ns5/N3, em comparação ao vírus IC.ZIKV - Rio-U1. Camundongos de 10 a 12 semanas de idade foram infectados com 10^4 PFU em meio diluente, via subcutânea, nos coxins plantares posteriores. O grupo Mock foi inoculado apenas com meio diluente. Os animais foram monitorados diariamente por 21 dias. A morbidade entre os grupos de animais foi determinada pela porcentagem de peso corporal (A) e escore clínico (B). A taxa de mortalidade ao longo do tempo foi expressa em curvas de sobrevivência de Kaplan Meier (C). Em (D) são apresentadas as cargas de RNA viral detectadas em amostras de sangue, coletadas a cada 2 dias e no *end-point*. Os sinais clínicos avaliados para determinação do escore estão descritos no material suplementar do artigo publicado, no anexo I. a seguir. As barras representam o desvio padrão da média dos valores obtidos. As marcações em (A) e (B) representam a média dos resultados obtidos, em três experimentos

independentes e as barras representam o desvio padrão (n = 5 animais / grupo). As barras na horizontal na parte superior dos gráficos, juntamente com os asteriscos, indicam as diferenças estatísticas: ** p = 0,001; *** p = 0,0001; **** p <0,0001. As análises estatísticas foram realizadas com *GraphPad Prism*, utilizando teste de comparações múltiplas *Ordinary one-way ANOVA*.

Em relação a morbidade, o grupo de animais infectados com IC.ZIKV – Rio-U1 começou a manifestar perda de peso 5 dias após a infecção. No entanto, apenas 1 animal apresentou perda de peso significativa ($\geq 5\%$ do peso corporal) nesse período. Já no dia 6 pós infecção, praticamente todos os animais desse grupo já apresentavam perda de peso significativa, com uma porcentagem de peso corporal, em média, de 92,03 % em relação ao dia zero. Com 7 dias de infecção, a perda de peso foi ainda mais evidente, atingindo uma média de 87,57 % em relação ao peso inicial. Já os animais infectados com IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 apresentaram os primeiros registros de perda de peso no dia 6 pós infecção. Neste dia, a porcentagem média de peso em relação ao dia zero foi de 95,15 %, ligeiramente maior do que foi observado no grupo controle nesse mesmo período. Em 7 dias pós infecção, esses animais exibiram uma porcentagem média de peso corporal de 89,83 %, novamente, um pouco acima da média observada no grupo controle. Todavia, a perda de peso corporal foi diferente no grupo infectado com IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, onde, não apenas ocorreu mais tardiamente (a partir do décimo primeiro dia pós infecção), como ainda alguns animais mantiveram a manutenção do peso inicial ao longo do experimento. Por exemplo, no sétimo dia pós infecção, a porcentagem média de peso corporal, do grupo infectado com a variante atenuada, foi de 102,33 %, ou seja, nesse período, os animais ainda seguiam ganhando peso, diferentemente do que foi observado nos demais grupos (Figura 4.12 A).

A determinação do escore clínico foi caracterizada conforme descrito na seção 4.2.6. Novamente o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 apresentou um padrão muito parecido com o vírus controle. No entanto, o aparecimento de sinais e sintomas, nos animais infectados com o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, foi não só mais tardio como também atingiu valores de escore clínico menores do que o vírus controle (Figura 4.12 B). Os sinais e sintomas observados no grupo controle, tiveram início no dia 5 pós infecção, e seguiram o mesmo padrão observado no experimento descrito na seção 4.2.6. Os sintomas iniciais registrados foram caracterizados como leve eriçamento dos pelos e ligeira postura curvada, gerando valores de escore clínico que variaram de 1 a 3 nesse período. No sexto dia, esses valores já aumentaram para 2 a 4, e todos os animais do grupo controle já apresentavam pelo menos um sinal clínico. Com sete dias pós infecção, a maioria dos animais desse grupo atingiram valores de escore

clínico ≥ 6 , e foram submetidos a eutanásia. No caso dos animais infectados com a variante ns4b-ns5/dN231, apenas dois animais apresentaram ligeiro curvamento de postura no dia 5 pós infecção. No dia 6, o escore clínico teve muita variação entre os animais desse grupo, oscilando entre 0 e 5, o que pareceu configurar uma evolução rápida da infecção. Já no dia 7, assim como ocorreu no grupo infectado com o vírus controle, parte dos animais encontravam-se moribundos, atingindo escore clínico ≥ 6 . No entanto, alguns animais sobreviveram por pelo menos mais um dia, com escore clínico variando de 4 a 5, e evoluindo para ≥ 6 no dia 9 pós infecção. Um padrão diferente foi observado no grupo infectado com a variante ns4b-ns5/N3, onde os sinais clínicos de infecção, quando presentes, tiveram início somente no dia 11 pós infecção e em apenas dois animais. No décimo segundo dia, três animais apresentavam sinais clínicos com escore que variou entre 2 e 5. Curiosamente, no décimo terceiro dia, 2 dos 4 animais que apresentavam sintoma nesse período, foram eutanasiados com os maiores escores clínicos registrados em todo o experimento (pontuação 9 e 11). Em contrapartida, nesse mesmo período ainda havia animais sem qualquer registro de sintoma clínico, os quais seguiram assim até o final do experimento.

A mortalidade dos animais infectados com IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 teve início no dia 7 pós-infecção e atingiu 100 % em 9 dias pós-infecção. O tempo médio de sobrevida dos animais infectados com esses vírus foi de $7,44 \pm 0,73$ e $8,22 \pm 0,97$ dias respectivamente. Por outro lado, o grupo de animais infectados com o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 não só apresentou uma porcentagem de mortalidade menor (55,6%), como os animais que sobreviveram também apresentaram um tempo médio de sobrevida maior ($17,88 \pm 3,68$ dias). Esse resultado mostrou que, os grupos de animais infectados com o vírus contendo as proteínas NS4B e NS5 com as sequências permutadas sob o algoritmo N3 tiveram uma maior sobrevida. Além disso, os animais que sobreviveram, estavam ativos, sem sinal clínico aparente, e com a manutenção do peso corporal normal, assim como os animais infectados com Mock (Figura 4.12 C). A diferença observada na mortalidade do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 em relação vírus controle, teve confirmação estatística ($p < 0,0001$; Log-rank test). Surpreendentemente, embora tenham tido perfis parecidos, o mesmo teste estatístico apontou para diferença significativa também entre os vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV – Rio-U1 ($p = 0,0336$; Log-rank test).

Por fim, a determinação da viremia ao longo do tempo foi realizada através de qRT-PCR. Conforme pode ser observado na figura 4.12 - D, houve diferença significativa na carga viral obtida, entre os grupo infectado com IC.ZIKV – Rio-U1 e

com IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, em todos os pontos de coleta de sangue. As maiores diferenças observadas ocorreram nos dias 4 e 6 pós-infecção. No quarto dia, o vírus controle (IC.ZIKV – Rio-U1) exibiu uma carga viral de $1,40 \times 10^8$ cópias de RNA / mL enquanto o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 exibiu $2,63 \times 10^5$ cópias de RNA / mL. E no dia 6, as cargas virais obtidas foram $1,66 \times 10^9$ e $4,94 \times 10^6$ respectivamente para IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3. Nesse mesmo período, o qual correspondeu ao pico de viremia, os grupos infectados com o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231 apresentaram uma carga viral de $3,11 \times 10^8$ cópias de RNA / mL, não diferindo estatisticamente do que foi observado com o vírus controle. O teste estatístico foi realizado por tempo de coleta. A média da carga viral, em Log_{10} cópias de RNA / mL, obtida nos três experimentos independentes, foi comparada entre os grupos infectados por *Ordinary one-way ANOVA, Multiple comparisons* com *GraphPad Prism 8*.

A comparação da carga viral determinada a partir do dia 8 ficou comprometida, tendo em vista que os animais dos grupos controle, e da variante ns4b-ns5/dN231, foram evoluindo clinicamente, aumentando o escore clínico e tiveram que ser submetidos a eutanásia. Por exemplo, nesse experimento, restou apenas um animal do grupo controle, o qual teve seu sangue coletado com 8 dias pós infecção e sua carga viral determinada em $9,58 \times 10^7$ cópias de RNA / mL. No dia 9, esse animal foi submetido a eutanásia por atingir o escore clínico ≥ 6 . Já o grupo infectado com a variante ns4b-ns5/dN231, embora alguns animais tenham sido eutanasiados, parte do grupo exibiu uma média de $4,01 \times 10^7$ cópias de RNA / mL, Por outro lado, todos os animais do grupo infectado com a variante ns4b-ns5/N3, permaneciam vivos, e exibiam em média, uma carga de $5,09 \times 10^5$ cópias de RNA / mL, ou seja, além de todos os animais ainda estarem vivos, a carga viral ainda era menor do que os demais animais, infectados com os outros vírus.

Visto que apenas os animais infectados com a variante ns4b-ns5/N3 ultrapassaram 10 dias de acompanhamento, considerou-se desnecessária a coleta de sangue, desse grupo, no décimo dia pós-infecção. Isso porque, nesse período, os animais dos outros grupos já haviam sido eutanasiados e dessa maneira, não haveriam animais para comparar com o grupo infectado por ns4b-ns5/N3.

Tal qual ocorreu no experimento da seção 4.2.6, a carga viral média, determinada no dia da eutanásia, apresentou um grande desvio padrão. Isso se deve ao fato de que a eutanásia ocorreu em períodos bem diferentes, principalmente em relação aos grupos infectados com IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, onde

o tempo médio de sobrevida variou muito ($7,44 \pm 0,73$ e $17,88 \pm 3,68$ dias, respectivamente). Além disso, parte do grupo infectado com a variante ns4b-ns5/N3 foi eutanasiada apenas pelo encerramento do experimento. Da mesma forma que no experimento anterior, o intuito era avaliar o tempo de sobrevida dos animais infectados com os vírus contendo as sequências das proteínas NS4B e NS5 alteradas por permuta nucleotídicas, bem como avaliar o perfil clínico. Assim, os animais foram acompanhados ao longo do tempo, até o final do experimento e a carga viral média obtida no dia da eutanásia foi de $3,16 \times 10^2$ cópias de RNA / mL, no grupo infectado com IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, contra $4,33 \times 10^7$ e $1,70 \times 10^7$ cópias de RNA / mL respectivamente determinadas nos grupos IC.ZIKV – Rio-U1 e IC.ZIKV – ns4b-ns5/dN231. Contudo, essa grande diferença pode estar associada não só ao vírus em si, mas também ao tempo transcorrido do experimento.

4.3.6 Ensaio de desafio para verificação de imunidade protetora

O resultado do experimento descrito na seção anterior mostrou que os animais infectados com o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 apresentaram uma taxa de sobrevivência de 44,4%. Desta forma, foi realizado um novo experimento para investigar se esses animais haviam desenvolvido uma resposta imune protetora ao vírus ZIKV.

Inicialmente, foram realizados testes para o estabelecimento de um ensaio de proteção, onde diferentes doses (10^4 , 10^3 , 10^2) do vírus com perfil atenuado, foram testadas em animais AG129 em diferentes idades. O n desse experimento foi pequeno para permitir validação estatística, mas os resultados serviram para nortear o ensaio de desafio.

Nesse experimento piloto, foi observado que não apenas a dose pode estar associada ao tempo de sobrevida dos animais, mas a idade também parece interferir. Em todos os grupos, classificados por dose de infecção, houve animais que sobreviveram os 28 dias de acompanhamento e animais que precisaram ser eutanasiados. Em geral, os animais que sobreviveram à infecção, independente da dose, foram os animais mais velhos (Tabela 4.7). Todos os animais que sobreviveram foram submetidos ao desafio com 10^4 PFU do vírus com fenótipo selvagem. Dentre os animais desafiados, sobreviveram ao desafio, apenas os animais infectados previamente com doses 10^4 e 10^3 PFU do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, enquanto que

os animais infectados com a menor dose, ou com Mock, foram eutanasiados 7 dias pós-desafio. Diante desse resultado, foi determinado que o ensaio de desafio deveria ser realizado com animais com pelo menos 18 semanas e com a dose mínima que conferiu proteção imunológica, ou seja, 10^3 PFU.

Tabela 4.7 - Ensaio piloto para determinação da dose do inóculo.

Dose (PFU)	Idade (semanas)	Tempo de sobrevivência (dias)
10^4	18	28
	18	28
	9	13
10^3	9	28
	9	23
	7	15
10^2	10	24
	9	28
	9	17
	5	14

O ensaio de desafio ocorreu em dois experimentos independentes e em duas etapas. Na primeira etapa, os animais foram divididos em 2 grupos, sendo um grupo Mock e um grupo imunizado (10^3 PFU – IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3). Após a inoculação, os animais foram acompanhados ao longo de 28 dias, sendo pesados diariamente e avaliados para a determinação da morbidade e escore clínico (Figura 4.13).

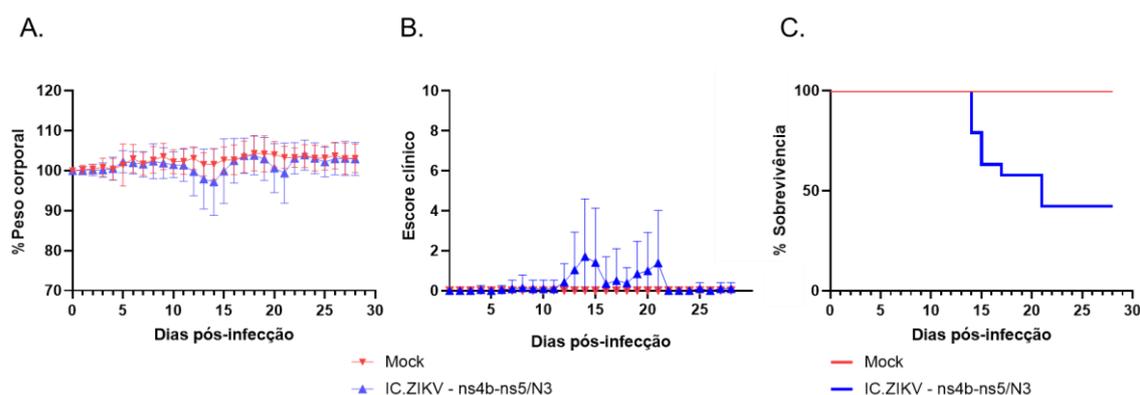


Figura 4.13 - Ensaio de pré-desafio.

Camundongos de 18 a 20 semanas de idade foram infectados com 10^3 PFU do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 em meio diluente, via subcutânea, nos coxins plantares posteriores. O grupo Mock foi inoculado apenas com meio diluente. Os animais foram monitorados diariamente por 28 dias. A morbidade entre os grupos de animais foi determinada pela porcentagem de peso corporal (A) e escore clínico (B). A taxa de mortalidade ao longo do tempo foi expressa em curvas de sobrevivência de Kaplan Meier (C). As marcações em (A) e (B) representam a média dos resultados obtidos em dois experimentos independentes e as barras representam o desvio padrão ($n = 10$ animais / grupo). Os gráficos foram montados utilizando *GraphPad Prism 8*.

Nessa primeira etapa do ensaio, o perfil de infecção do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 foi bastante similar ao Mock. Esse perfil foi observado também no primeiro experimento realizado, descrito na seção 4.3.4. No entanto, com o aumento da idade, o tempo médio de sobrevida dos animais inoculados com o vírus atenuado foi maior, $22 \pm 6,2$ (dias / desvio padrão), porém, exibindo ainda uma taxa de mortalidade de 57,9 %.

Entre os animais que foram submetidos a eutanásia, foram observados os mesmos sinais e sintomas e com início no dia 12 pós infecção, não diferindo muito do observado no experimento anterior. Por outro lado, os animais que sobreviveram não apresentaram nenhum sinal clínico aparente.

Diante disso, os animais infectados com IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 que sobreviveram foram submetidos ao desafio, com 10^4 PFU de IC.ZIKV – Rio-U1, e novamente monitorados por mais 21 dias. Além desses animais, a metade dos animais inoculados com Mock na primeira etapa foi também desafiada.

Todos os animais inoculados com IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 e desafiados com o vírus com fenótipo selvagem sobreviveram os 21 dias de acompanhamento, ou seja, a taxa de sobrevivência dos animais imunizados e desafiados foi de 100 %, com um tempo médio de sobrevida de 21 dias, que corresponde ao tempo total do experimento. Além disso, esses animais mantiveram o peso corporal ao longo do experimento, e por fim, apenas alguns animais apresentaram a mínima pontuação de escore clínico (pontuação 1). Essa pontuação mínima é referente a uma leve postura curvada, mas que foi recuperada, retomando as características normais de bem estar animal (Figura 4.14).

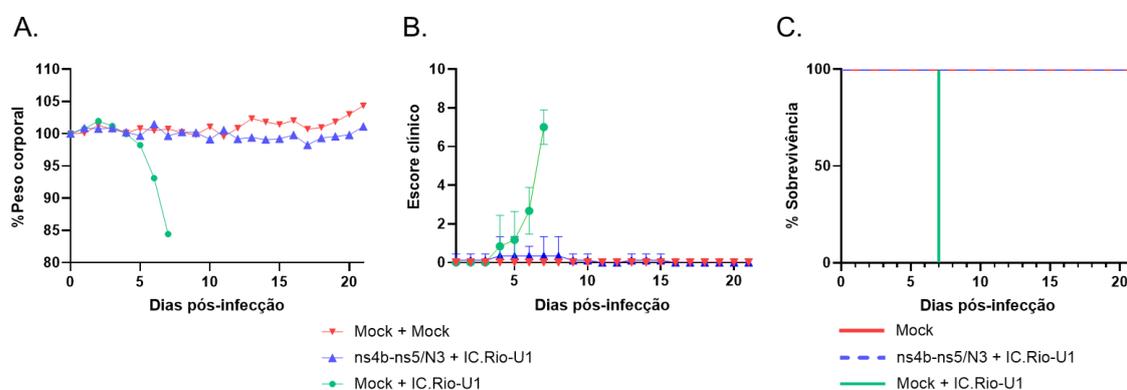


Figura 4.14 - Ensaio de desafio para avaliação da imunidade protetora.

Camundongos de 22 a 24 semanas de idade, previamente imunizados com 10^3 PFU do vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3, foram infectados com 10^4 PFU do vírus IC.ZIKV – Rio-U1 em meio diluente, via subcutânea, nos coxins plantares posteriores. Metade dos animais inoculados previamente com Mock

foi igualmente desafiada, enquanto a outra metade recebeu apenas meio diluente. Os animais foram monitorados diariamente por 21 dias. A morbidade entre os grupos de animais foi determinada pela porcentagem de peso corporal (A) e escore clínico (B). A taxa de mortalidade ao longo do tempo foi expressa em curvas de sobrevivência de Kaplan Meier. Os gráficos foram montados utilizando *GraphPad Prism 8*.

Por outro lado, os animais inoculados com Mock na primeira etapa do experimento, e desafiados com o vírus IC.ZIKV – Rio-U1, foram eutanasiados 7 dias pós – infecção, por terem atingido o escore clínico ≥ 6 . O tempo de sobrevivência desses animais foi de exatamente 7 dias, e a taxa de mortalidade atingiu 100 %. Esse resultado foi importante, pois validou a infecciosidade do vírus com fenótipo selvagem, utilizado para desafiar os animais.

Diante desses resultados, é possível dizer que o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 apresenta um perfil atenuado, porém possui capacidade de induzir resposta imunológica, a qual foi suficiente para conferir proteção contra infecção pelo vírus com fenótipo selvagem.

5 DISCUSSÃO

A emergência do vírus Zika nas Américas, em 2015, tomou grandes proporções, acometendo milhares de pessoas entre 2015 e 2016 (27). Concomitantemente ao exacerbado número de casos da doença, a infecção pelo vírus Zika (ZIKV) foi associada à um aumento dramático de casos de microcefalia em recém-nascidos (30,34) e da Síndrome de Guillain-Barré em adultos (101,106). Assim, a ocorrência dos casos graves de Zika durante a epidemia em 2016, elevou o patamar do vírus ZIKV em relação a sua importância no ponto de vista clínico e epidemiológico.

Felizmente, uma gradativa redução na transmissão de ZIKV ocorreu nos anos seguintes. De acordo com o último boletim epidemiológico divulgado pela PAHO, foram registrados cerca de 18 mil casos de infecção pelo vírus Zika em 2021 (209). No entanto, apesar de um declínio recente nos casos de Zika, o vírus continua sendo um patógeno emergente significativo, tendo em vista os fatores associados à transmissibilidade das flavivirose. Esses fatores não somente referem-se à disponibilidade de vetores competentes, mas também aos elementos que contribuem para a reprodução de mosquitos, como o clima tropical e a precariedade de saneamento básico de países em desenvolvimento (112,210,211), tal qual o Brasil. Além dos fatores que se referem à disponibilidade de mosquitos vetores competentes, a urbanização, a internacionalização, a predisposição genética humana, a imunidade prévia por outras flavivirose, ou a falta de imunidade de rebanho são coeficientes importantes que podem viabilizar novas epidemias (138,212–214). Diante destes fatores, a disponibilidade de uma vacina segura e efetiva seria a melhor maneira de evitar uma recorrência da epidemia de ZIKV, especialmente em países com alta endemicidade de mosquitos vetores competentes (180). O surto de febre amarela, que ocorreu em 2017, representa um bom exemplo para discutir a importância da disponibilidade de vacinas contra as flavivirose. Esse foi o maior surto de febre amarela nos últimos 50 anos, no Brasil, acometendo mais de 600 pessoas não vacinadas e registrando 209 mortes (215).

Segundo a OMS, a vacinação eficaz permite a contenção rápida de surtos, sendo essencial para garantir que não se amplifiquem em epidemias devastadoras (212). Uma variedade de vacinas contra ZIKV está sendo testada, mas nenhuma está disponível (159–162,164–170,183,216). Ademais, o sucesso de vacinas vivas e atenuadas contra flavivirose, como febre amarela e encefalite japonesa, abre

precedentes para a obtenção de um ZIKV vivo e atenuado com potencial vacinal (217,218).

No presente trabalho, foi gerado um painel de clones infecciosos de ZIKV, utilizando sistema de genética reversa. A genética reversa, para a obtenção de vírus sintéticos com genoma de RNA, desempenha um papel importante na biotecnologia e no estudo de genes. A partir dessa tecnologia, inicialmente estabelecida para poliovírus (219), é possível sintetizar vírus e introduzir modificações no genoma viral, tais como inativar genes e mutar regiões de interesse, gerando organismos geneticamente modificados (220). Sendo assim, o sistema de genética reversa é essencial, pois permite a avaliação de fatores genéticos virais relacionados à patogênese, resposta imune, evolução viral, transmissão vetorial e com isso corroboram para o desenvolvimento de vacinas ou de drogas terapêuticas antivirais (138,145). Além disso, a genética reversa permite a obtenção de clones infecciosos - uma abordagem promissora para obtenção de vírus atenuados (133).

O painel viral obtido inclui quatro variantes de ZIKV, todas elas baseadas na linhagem epidêmica Rio-U1 (87), contendo variações nas sequências das proteínas NS4B e NS5. Apesar dos resultados positivos em relação a abordagem utilizada para a obtenção desse painel viral, o processo de construção e clonagem dos genes sintéticos não foi trivial.

Inicialmente, buscamos realizar a clonagem do cDNA viral em um sistema de dois plasmídeos derivados do pBR322, conforme previamente estabelecido pela equipe do LABMOF, em estudos com o vírus vacinal contra febre amarela (221). O genoma de ZIKV foi dividido em 4 fragmentos para facilitar a síntese do cDNA viral. Tentamos realizar as clonagens dos fragmentos Z1 (posição genômica: 1 – 2047) e Z2 (posição genômica: 8844 – 10807) em pG1/2 (contém os extremos 5' e 3' UTR do genoma do YFV) e dos fragmentos Z3 (posição genômica: 1653 – 4793) e Z4 (posição genômica: 4581 – 8855) em pT3 (região central do genoma do YFV) (Ver figura 3.2 da seção 3.3.2). No entanto, a inserção dos fragmentos de cDNA de ZIKV se mostrou instável utilizando o sistema de clonagem em pBR322, gerando deleções importantes, e por esse motivo, não foi possível obter o clone infeccioso ZIKV com esses plasmídeos. Nossa segunda tentativa foi realizar as clonagens em plasmídeos derivados do pACN118037, um plasmídeo de baixo número de cópias, seguindo uma estratégia já utilizada pelo nosso laboratório, porém, também não conseguimos estabilizar o cDNA de ZIKV nesse sistema (221–223).

No entanto, as dificuldades encontradas eram esperadas. Embora os clones infecciosos de flavivírus forneçam uma ferramenta poderosa para estudar muitos aspectos dos vírus, a obtenção do molde completo de cDNA de vírus de eucariotos em vetores bacterianos é considerada problemática, trabalhosa e demorada (224). Especialmente no caso de flavivírus, promotores procarióticos crípticos dentro de seus genomas, facilitam a produção de transcritos espúrios que podem ser tóxicos para bactérias em altas concentrações (132,225).

As dificuldades relacionadas à presença de promotores crípticos procarióticos no genoma de flavivírus, iniciaram a partir da síntese dos fragmentos de ZIKV pela *GenScript*. Todos os fragmentos sintéticos, com exceção de Z3, foram clonados com sucesso em pUC57, mas o fragmento sintético Z3 só pode ser estabilizado quando clonado em plasmídeo de cópia única, no caso o pCC1, um derivado de pCC1-Fos (226). Assim, decidiu-se montar o cDNA genômico de ZIKV neste plasmídeo, a partir do construto inicial pCC1-Z3 fornecido pela *GenScript*.

A instabilidade genética evidenciada na propagação de plasmídeos em *Escherichia coli* está associada às sequências codificadoras das proteínas E e NS1, presente no fragmento Z3, as quais apresentam promotores crípticos procarióticos que promovem toxicidade em sistemas bacterianos (139,140). Para contornar essas dificuldades, diferentes abordagens têm sido exploradas (139), incluindo inativação de promotores crípticos bacterianos usando mutagênese silenciosa (140), inserção de íntrons no genoma viral (143), abordagens baseadas na fusão de fragmentos sobrepostos de cDNA, obtidos por RT-PCR, sem a necessidade de clonagem (227,228), recombinação homóloga em levedura, divisão do cDNA viral em dois ou mais plasmídeos (141) e uso de vetores de clonagem com baixo número de cópias (142).

Diante das abordagens existentes para lidar com os problemas relacionados à genética reversa de flavivírus, optamos por dividir o cDNA genômico de ZIKV em dois plasmídeos pCC1, e isso em muito contribuiu com o estabelecimento do clone infeccioso de ZIKV. Essa estratégia foi utilizada por Rice *et al.*, (1989) que contornou a instabilidade das clonagens do genoma de YFV, dividindo do genoma viral em um sistema contendo dois plasmídeos (229). Outros trabalhos seguiram essa estratégia: Weger-Lucarelli *et al* (2017), separou o genoma de ZIKV em duas partes, as quais foram clonadas no plasmídeo pACYC177 (134); Sumiyoshi *et al.* (1992) também construiu clone infeccioso do vírus da Encefalite Japonesa, dividindo o genoma viral em dois fragmentos (141).

A clonagem em pCC1 também foi extremamente estratégica, por ser um plasmídeo de cópia única. Plasmídeos de baixo número de cópias foram desenvolvidos para que os promotores procarióticos, fortemente regulados, sejam mantidos em um nível baixo de expressão e impeçam a transcrição espúria de sequências de DNA que possam ser tóxicas para o sistema bacteriano (224). Diante disso, a escolha de um plasmídeo de baixo número de cópias corresponde à abordagem mais utilizada, no que se refere às limitações da genética reversa com *Flavivirus* (230). Essas limitações estão relacionadas com o que é reportado no trabalho de Shi *et al*, (2002), onde os autores relatam que o uso de um vetor de alto número de cópias, contendo fragmentos instáveis, levam a deleções e/ou mutações significativas no inserto; assim, o uso de um vetor de cópia única permite clonagens mais coesas e estáveis (231).

Iniciamos a montagem do cDNA de ZIKV buscando minimizar as etapas de manipulação genômica e, conseqüentemente, o risco de deleções. Assim, o fragmento Z3 foi mantido no vetor de origem (pCC1-Z3) e o fragmento Z4 foi clonado diretamente nesse vetor, adjacente ao fragmento Z3, formando o plasmídeo nomeado pCC1-Z3Z4. Contudo, para realizar a clonagem dos fragmentos Z1 e Z2 no plasmídeo de cópia única pCC1, foi necessário incluir um *cassete* contendo motivos flanqueadores de diferentes enzimas de restrição, a fim de manter a estratégia de fusionamento dos fragmentos, respeitando a sequência correta do genoma viral. Desta maneira, um plasmídeo intermediário foi criado através da substituição do fragmento Z3, do plasmídeo original pCC1-Z3, por um sítio múltiplo de clonagem (MCS) (203).

O plasmídeo de cópia única pCC1 auxiliou na estabilização das clonagens, além disso, o plasmídeo intermediário gerado (pCC1-MCS) abriu precedentes para novas estratégias de montagem de clones infecciosos, pois obtivemos um plasmídeo de cópia única contendo um MCS, o qual pode auxiliar no planejamento de clonagens de outros genes sintéticos de interesse. No entanto, por ser um plasmídeo de cópia única, a fase de recuperação de DNA plasmidial foi prejudicada, pois a presença de DNA cromossômico superava a quantidade de DNA plasmidial, e isso tem influência direta na eficiência das clonagens e conseqüentemente na recuperação viral (138).

Para contornar a dificuldade de obter massa de DNA suficiente dos dois plasmídeos, estes foram submetidos a ampliações por PCR. A fim de garantir a amplificação dos genes de interesse, desenhamos oligonucleotídeos que parearam em regiões estratégicas. No caso da amplificação do plasmídeo contendo a região

central do genoma de ZIKV, o par de oligonucleotídeos foi desenhado para hibridar na porção plasmidial, imediatamente a montante e a jusante do gene de interesse. A localização de pareamento desses oligonucleotídeos garante a presença dos sítios de restrição próximos às extremidades do amplicons, de modo que a eficiência da digestão seja mantida. Já para a amplificação do plasmídeo contendo as extremidades do genoma de ZIKV, o par de oligonucleotídeos foi desenhado para parear entre o fragmento Z1 e Z2. Nessa região, ou seja, entre os sítios *MluI* e *KpnI*, existe uma pequena região de 30 pares de bases, para facilitar o pareamento dos iniciadores e posteriormente, a digestão. Os oligonucleotídeos pareiam-se nessa região, e apresentam uma sobreposição de 6 pares de bases. Tanto os fragmentos de interesse quanto todo o plasmídeo foram amplificados, garantindo a presença dos sítios de restrição necessários para receber a região central do genoma viral, bem como o sítio promotor SP6. Esse processo otimizou a obtenção de fragmentos de DNA viral acarretando o aumento da massa de cDNA dos fragmentos de interesse e facilitando enormemente a construção do cDNA molde final (Ver figura 2 do material suplementar do artigo publicado, no anexo I).

Então, para lidar com os desafios relacionados à genética reversa com genomas de *Flavivirus*, este trabalho lançou mão de três abordagens estratégicas: A fragmentação do genoma de ZIKV em um sistema de dois plasmídeos; A utilização de um plasmídeo de cópia única; A amplificação, por PCR, do cDNA de ZIKV. Essas três abordagens, utilizadas em conjunto, auxiliaram na redução dos efeitos deletérios em sistemas bacterianos e aprimoraram o ganho de massa de cDNA viral.

O primeiro clone infeccioso obtido nesta tese, foi o clone IC.ZIKV – Rio-U1, o qual é baseado na sequência do isolado viral Rio-U1. Esse vírus circulou na epidemia de 2016 na cidade do Rio de Janeiro, sendo um isolado de ZIKV obtido a partir de amostra de urina de uma mulher grávida com idade gestacional de 18 semanas (87). Este isolado foi utilizado em uma série de estudos realizados por nosso grupo e pela nossa rede de colaboradores, onde uma série de trabalhos científicos demonstraram que o ZIKV Rio-U1 exibe altas taxas de infecção e disseminação em mosquito *Aedes aegypti* (232), de letalidade em camundongo AG129 e acometimento fatal de fetos de macacos, cujas mães foram infectadas durante a gestação (233). Desta forma, baseado na nossa experiência prévia com genética reversa de flavivírus, decidiu-se por desenvolver o clone infeccioso do isolado de ZIKV Rio-U1, pois poderia ser não somente um bom modelo para estudos de virulência, mas também servir de base na obtenção de vírus atenuados que possam ser candidatos vacinais.

Os resultados mostraram que tanto o vírus parental quanto o clone infeccioso apresentaram perfis biológicos similares. Ambos os vírus apresentaram um perfil de replicação muito próximo em células Vero e C6/36. Em modelo de camundongo AG129, os vírus IC.ZIKV – Rio-U1 e parental acometeram os grupos de animais, com manifestação de sinais e sintomas no mesmo período pós-infecção, provocando as mesmas taxas de mortalidade. Além disso, as análises histopatológicas do tecido cerebral dos camundongos infectados revelaram meningoencefalite, exibindo infiltrado inflamatório na mesma proporção e intensidade em ambos os grupos analisados. As lesões observadas através da histopatologia, causadas pela replicação do ZIKV, foram compatíveis com os sinais neurológicos que os animais apresentaram durante o curso da infecção. Da mesma forma, detectamos uma alta carga de RNA viral no cérebro de camundongos infectados, sem observar diferença significativa entre os vírus parental e o respectivo clone infeccioso. Essa similaridade corrobora com o trabalho de Weger–Lucarelli *et al.* (2017), onde um clone infeccioso de ZIKV da linhagem de Porto Rico (PRVABC59) apresentou um perfil de replicação indistinguível em modelo celular, assim como na transmissibilidade por mosquitos vetores e, também, na virulência em camundongos (134). Resultados semelhantes foram relatados para outros clones de flavivírus. Bredenbeek *et al.* (2003) relataram que o clone infeccioso do vírus vacinal de febre amarela, 17D, exibiu crescimento viral, morfologia de placas de lise e processo proteolítico muito similar ao vírus parental, em culturas celulares (234). Do mesmo modo, Yamshchikov, Mishin e Cominelli (2001), obtiveram um clone infeccioso do vírus da encefalite japonesa que apresentou estabilidade e fenótipo equivalente ao vírus parental (235). Por outro lado, alguns trabalhos demonstraram uma menor capacidade de infecção e proliferação dos clones infecciosos obtidos em relação aos vírus selvagem. Como exemplos citamos: clone infeccioso de ZIKV da linhagem Asiática, FSS13025 – Camboja (138) e da linhagem Americana, Paraiba_01/2015 (139). Essa diferença pode estar relacionada a diversidade genética de uma população viral comumente encontrada na linhagem selvagem, onde a heterogeneidade de uma estrutura populacional (*quasispecies*) acaba contribuindo para uma taxa de replicação viral mais robusta (138,139).

A heterogeneidade genética observada em uma população viral selvagem, encontra-se em concordância com o que foi constatado nos ensaios de avaliação fenotípica, realizados para comparar o vírus parental Rio-U1 e seu respectivo clone infeccioso (IC.ZIKV - Rio-U1). O fenótipo, tanto de placas de lise quanto de focos de infecção, mostrou-se mais diverso nos ensaios com o vírus parental, enquanto o clone

infeccioso apresentou um fenótipo mais homogêneo, o que também era esperado, tendo em vista que a população de um clone infeccioso é derivada da transcrição de um RNA específico.

A abordagem utilizada para a obtenção do clone infeccioso de ZIKV, baseado na linhagem Rio-U1, mostrou-se eficaz (203) e apresentou reprodutibilidade na recuperação viral, pois a partir desse clone infeccioso de ZIKV, obtivemos as variantes virais contendo alterações em NS4B e NS5, (alvo de estudo do presente trabalho). Além disso, a equipe do LABMOF derivou outros vírus sintéticos de ZIKV, partindo do clone IC.ZIKV – Rio-U1, contendo diferentes alvos de estudo, como a proteína E e NS1. A estratégia de dividir o genoma viral em quatro fragmentos, e cloná-los em um sistema estável, forneceu uma ferramenta eficaz nos estudos funcionais de marcadores genéticos de virulência e geração de variantes virais quiméricas atenuadas. No presente estudo, o estabelecimento de uma abordagem estável como uma plataforma de obtenção viral foi coerente com o trabalho de Widman *et al.*, (2017), o qual obteve um painel de clones infecciosos de ZIKV, utilizando também um sistema quadripartido, o qual forneceu um conjunto de ferramentas essenciais para determinar os mecanismos de patogênese do ZIKV e promover o desenvolvimento de novas vacinas e antivirais (236).

A primeira variante sintética obtida a partir do clone IC.ZIKV - Rio-U1, foi o vírus quimérico IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal, o qual possui o genoma baseado no vírus epidêmico Rio-U1, porém, as proteínas NS4B e NS5 são derivadas de uma linhagem ancestral (Malásia, 1966). A escolha dessas proteínas como alvo de pesquisa nesta tese, foi devido a uma análise filogenética realizada previamente a este trabalho, em colaboração com Dr. Gonzalo Bello, onde, ao longo da evolução da linhagem Malásia, 1966, foram observadas várias mutações sinônimas não sinônimas, a maioria nos genes NS4B e NS5. Em concordância com essa análise inicial, um estudo filogenético realizado por Pettersson *et al.* em 2016, também identificou alterações nucleotídicas ao longo da evolução do vírus Zika, e novamente, a maioria delas nos genes NS4B e NS5 (119).

De acordo com Liu *et al.* (2019), as alterações nucleotídicas continuamente acumuladas ao longo da disseminação do ZIKV para diferentes regiões geográficas, resultaram na sua evolução viral (50). Diante disso, a grande questão da comunidade científica foi compreender o quanto essas alterações nucleotídicas contribuíram para a gravidade das infecções causadas pelo ZIKV. Até o momento, sabe-se que os quadros graves, como a Síndrome Congênita de ZIKV e a síndrome de Guillain-Barré,

estão associados com a linhagem asiática (112,237). Desta forma, muitos estudos investigaram as diferenças fenotípicas entre as linhagens africanas e asiáticas, pois acreditava-se que as mutações adquiridas, durante a evolução da linhagem africana para a asiática, contribuiriam para a severidade da doença. Porém, ao passo que a pesquisa foi evoluindo nessa questão, os resultados observados não foram de acordo com a hipótese de que a linhagem asiática seria mais severa do que a africana (112).

Estudos mostraram que a linhagem africana é mais infectiva, mais neurovirulenta (120–122,238) e que os mosquitos vetores são mais susceptíveis a essa linhagem (123–125). No entanto, esse ainda é um tema controverso, pois outros estudos demonstraram evidências contrárias, apontando para uma maior infectividade da linhagem asiática em primatas não humanos, mosquitos e diferentes linhagens celulares (239–242). Esse conflito de resultados pode estar associado a falta de um critério mais uniforme em relação às linhagens estudadas (243). Por exemplo, muitas das linhagens africanas disponíveis, foram isoladas há décadas e foram submetidas à inúmeras passagens celulares, questionando a relevância biológica dessas linhagens em estudos comparativos com linhagens asiáticas, as quais são mais recentes e com número menor de passagens celulares (244). A fim de tentar padronizar as linhagens para avaliá-las com mais rigor, em relação aos seus respectivos potenciais epidêmicos, Aubry *et al.* (2021) compararam a transmissibilidade de ZIKV por mosquitos e a patogenicidade do vírus Zika em camundongos imunocomprometidos, utilizando linhagens africanas e asiáticas de ZIKV, mais recentes e com passagens celulares em número equivalente. Nesse trabalho, os autores demonstraram que as linhagens africanas exibiram maior transmissibilidade por *Aedes aegypti*. Da mesma forma, as linhagens africanas exibiram maior patogenicidade e foram mais letais, causando morte em adultos e em fetos de camundongos imunocomprometidos (245).

Perante o exposto, a comunidade científica segue discutindo diferentes hipóteses que possam explicar o que de fato influenciou no espalhamento do vírus Zika, e, principalmente, na severidade da doença, não relatada antigamente. Diante disso, estudos comparativos entre as linhagens epidêmicas, e as linhagens asiáticas ancestrais, têm sido desenvolvidos para investigar possíveis marcadores de virulência e patogenicidade, o que corrobora com a escolha da linhagem da Malásia no presente trabalho (50,110). Um outro ponto de escolha da linhagem Malásia é que essa é a linhagem asiática mais ancestral, de acordo com Garcia *et al.* (1969) (246). Desta

forma, a escolha da linhagem ancestral asiática da Malásia, bem como dos genes alvos NS4B e NS5, não foi uma determinação empírica.

A grande questão do nosso trabalho foi buscar compreender o quanto a regressão das proteínas NS4B e NS5, para as suas respectivas sequências ancestrais, acarretaria uma atenuação viral, já que essas foram as proteínas que apresentaram o maior número de mutações ao longo da evolução do vírus Zika. Então, após obter a variante viral IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal, fizemos comparações com o clone infeccioso baseado no vírus selvagem em modelos *in vitro* e *in vivo* e observamos uma tendência a um perfil ligeiramente menos virulento.

Os ensaios de fenótipo de placas de lise e de focos de infecção demonstraram que o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal apresenta tamanho reduzido em relação ao IC-ZIKV-Rio-U1, o que poderia sugerir que o vírus quimérico exibiu uma menor capacidade replicativa do que o vírus com fenótipo selvagem. Alguns trabalhos de atenuação com o vírus da dengue e da poliomielite relatam que a velocidade com que o patógeno se replica é uma forma comum de mensurar o *fitness* viral. Assim, o tamanho das placas de lise, as quais são causadas por necrose ou apoptose após a infecção de uma monocamada celular, pode indicar se determinado vírus tem um melhor *fitness* que outro (247–249). Além disso, apesar de ser uma medição empírica do *fitness* viral, o tamanho das placas de lise tem sido utilizado na seleção de cepas vacinais, vivas e atenuadas, onde cepas que produzem plaques menores são selecionadas para seguirem às fases de ensaios clínicos de triagem vacinal (247,250). No entanto, embora essa abordagem tenha sido eficaz na seleção de algumas cepas vacinais, como sarampo, caxumba e febre amarela, nem sempre os ensaios clínicos exibem resultados coerentes com o que é observado nos ensaios de placas de lise. Por exemplo, cepas de dengue (251) e de citomegalovírus (252) assim selecionadas avançaram para ensaios clínicos, entretanto, foi demonstrado que esses candidatos vacinais causaram doenças agudas. Isso sugere que a taxa de replicação *in vitro*, por si só, não é um bom indicador para determinar o *fitness* viral (253).

Nossos resultados, quando avaliados através das curvas de crescimento viral em cultivo celular, demonstraram que a variante quimérica IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal e o clone infeccioso de ZIKV Rio-U1, exibiram um perfil proliferativo muito similar. No entanto, observamos diferenças significativas no título viral obtido em 72 hpi em células Vero e em 48 hpi em células SK-N-AS. Porém, essas diferenças só foram significativas quando o teste estatístico foi aplicado individualmente a cada tempo de coleta. Nesses tempos de coleta, o vírus quimérico, contendo sequências ancestrais

dos genes de NS4B e NS5, apresentou títulos virais menores em comparação com o clone infeccioso Rio-U1. Portanto, esse perfil proliferativo pode indicar, com cautela, que o vírus quimérico apresenta uma replicação ligeiramente mais lenta, contudo, com uma taxa proliferativa importante. Já o cultivo celular tratado com IFN – I, não demonstrou diferença significativa entre a replicação viral de IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal e IC.ZIKV – Rio-U1. Além disso, não apenas a taxa de replicação viral foi muito similar entre os vírus testados, mas também foi igualmente inibida, tanto na presença de IFN- α quanto IFN – β . Ademais, a replicação de ambos os vírus mostrou que quanto maior a dose de IFN utilizada no tratamento da cultura de células, menor foi a taxa de replicação viral. Esse resultado demonstra que os vírus Zika sintéticos avaliados são sensíveis aos efeitos antivirais promovidos por IFN - I (68).

Entretanto, nossos resultados em camundongos da linhagem AG129, *knockout* para receptores de interferon tipo I (α , β ,) e tipo II (γ), demonstraram que o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal difere significativamente do vírus com fenótipo selvagem. O clone viral IC.ZIKV – ns4b-ns5/Mal apresentou-se menos virulento, com animais exibindo maior tempo de sobrevivência, assim como sinais e sintomas clínicos mais tardios em relação ao grupo infectado com IC.ZIKV – Rio-U1. O camundongo AG129 é um modelo altamente susceptível à infecção por ZIKV e outros flavivírus, e tem sido reportado como um importante modelo para estudos de virulência e patogenicidade de ZIKV justamente pela susceptibilidade ao desenvolvimento da doença (254–256). Isso ocorre, pois, esses animais apresentam deficiências genéticas na via de sinalização de interferon tipo I e II, o que compromete sua resposta imune inata (208). Outros modelos animais, como C57BL/6, BALB/c ou CD-1, quando inoculados com ZIKV, não exibem sinais de doença (257). Isso está associado a incapacidade do vírus ZIKV (mais precisamente da proteína NS5) de promover a degradação da STAT2 murina (258), fazendo com o que cepas imunocompetentes de camundongos sejam resistentes a infecção por ZIKV, inviabilizando estudos de patogenicidade (257).

A susceptibilidade de camundongos AG129 é bem constatada no trabalho de Shan *et al* (2016), pois esses animais, quando infectados com o clone infeccioso de ZIKV baseado na linhagem FSS13025, Camboja, foram eutanasiados por apresentarem sinais de infecção neurológica e perda de peso corporal. Nesse mesmo trabalho, no entanto, ao se infectar com o mesmo clone uma outra linhagem de animais, os camundongos A129, que são *knockout* somente para receptores de IFN- I α e β , estes sobreviveram, demonstrando que o camundongo AG129 é mais susceptível à infecção por ZIKV (138). Porém, de acordo com Rossi *et al.* (2016) a

letalidade em camundongos A129 varia de acordo com a idade dos animais. Nesse trabalho, os autores mostraram que quanto mais jovem são os animais, maior é a mortalidade, variando de 100%, em animais com 3 semanas, à 0%, em animais com idade superior a 11 semanas de vida (254).

Diante dos resultados obtidos, observamos que a regressão das proteínas NS4B e NS5 do genoma do ZIKV Rio-U1 para a cepa ancestral (Malásia, 1966), não foi suficiente para atenuar o vírus, de tal modo que ele possa ser utilizado como um candidato vacinal. No entanto, os ensaios em modelo de camundongo AG129 demonstraram que o vírus quimérico pareceu menos virulento do que o vírus com fenótipo selvagem. Porém, embora pareça que as mutações que ocorreram nas proteínas NS4B e NS5 durante a evolução do ZIKV, desde a linhagem ancestral Malásia até a linhagem epidêmica Rio-U1, estejam relacionadas com o aumento da patogenicidade de ZIKV, deve ser ressaltado que a troca de genes da linhagem epidêmica pela ancestral implica na expressão dos genes ancestrais em um genoma que evoluiu ao longo do tempo. Isso pode afetar a associação com outras proteínas do complexo replicativo viral. Assim, os resultados obtidos não permitem afirmar que a variação das proteínas NS4B e NS5 tenha provocado o aumento do potencial de replicação viral. Então, para afirmar essa suposição, o ideal teria sido se nós tivéssemos construído outro clone de ZIKV, contendo a sequência genômica de ZIKV baseada na linhagem ancestral, porém, com as sequências das proteínas NS4B e NS5 baseadas na linhagem epidêmica Rio-U1. Porém, o foco do presente trabalho era obter uma variante viral atenuada, que pudesse ser utilizada como um protótipo vacinal.

Além da variante IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal, outras duas variantes virais quiméricas foram obtidas: IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3. Essas variantes também são derivadas do clone infeccioso IC.ZIKV-Rio-U1 obtido neste trabalho. No entanto, os genes NS4B e NS5 foram substituídos por sequências equivalentes, contendo inúmeras mutações nucleotídicas de modo a alterar o padrão de uso de códons, porém, sem alterar a sequência aminoacídica das proteínas NS4B e NS5.

O padrão de uso de códons sinônimos é desigual entre espécies (40). Genes altamente expressos têm códons que refletem a abundância de seus respectivos tRNAs em uma determinada célula, e essa condição favorece a leitura realizada pelo ribossomo, otimizando a tradução do gene em questão. Por outro lado, códons menos frequentes interferem na velocidade com a qual são reconhecidos pelo ribossomo,

resultando em uma baixa eficiência da tradução do gene (185,259). Assim, espera-se que a relação do uso de códons entre os vírus e seus hospedeiros afete o *fitness* viral (260). Portanto, a regulação da expressão gênica e da síntese de proteínas virais podem auxiliar na produção de vacinas, tanto por otimizar a expressão de genes altamente imunogênicos quanto por *desotimizar* genes essenciais para o ciclo replicativo viral (261)

Diante disso, nosso trabalho permeou a alteração de códons dos genes NS4B e NS5, que codificam as proteínas que fazem parte do complexo replicativo viral (55,262), podendo ser um importante alvo de desotimização. Desse modo, ao alterarmos a eficiência da expressão dessas proteínas, esperávamos diminuir a eficácia da replicação viral e conseqüentemente obter vírus atenuados. Abordagens envolvendo a alteração da frequência do uso de códons têm facilitado os avanços na biologia sintética, que agora tornam viável a geração de genomas virais contendo grande número de mutações sinônimas, com objetivo de atenuar genomas de vírus de RNA para a obtenção de candidatos vacinais (186,201,263). Essas abordagens têm sido aplicadas com sucesso a uma variedade de vírus de RNA, como poliovírus (201), vírus sincicial humano (264), vírus da imunodeficiência humana (265) vírus da síndrome respiratória e reprodutiva em suínos (266), vírus Chikungunya (196), vírus Zika (184), entre outros. Em cada um desses exemplos, a recodificação nucleotídica levou a uma desotimização da frequência de uso de códons, levando a uma redução da eficiência da tradução, gerando, assim, potenciais candidatos vacinais.

Nesse contexto, nós recodificamos as sequências das proteínas NS4B e NS5 através de duas abordagens diferentes de permuta de códons com alterações nucleotídicas sinônimas – a dN231, que permuta as bases nitrogenadas dentro de um par de códons, e a N3, que altera randomicamente a terceira base nitrogenada de um códon (Ver Figura 3.1 da seção 3.3.1). Para isso, utilizamos a sequência das proteínas NS4B e NS5 do vírus ZIKV – Rio-U1, depositada no banco de dados *GenBank* (KU926309) e realizamos as alterações de códons segundo os algoritmos dN231 e N3 do programa *CodonShuffle* (186). Para cada algoritmo, o programa gerou 1000 sequências permutadas e escolhemos uma sequência de cada algoritmo de permuta após avaliar os índices CPB (*Codon pair bias score*), ENC (*Effective number of codons*) e CAI (*Codon adaptive index*). Esses índices são fornecidos pelo próprio programa *CodonShuffle*, e são calculados em cada uma das 1000 sequências geradas através do algoritmo de escolha.

Existe uma tendência de que códons sinônimos sejam utilizados com uma maior frequência que outros, isso configura o “*Codon usage bias*”. Os índices ENC e CAI são utilizados para mensurar o *codon usage bias*, e indicam respectivamente, o número efetivo de códons em uma dada sequência e o índice de adaptação desses códons em relação a um genoma. No caso do índice ENC, os valores variam de 20 a 61, e, quanto menor o valor de ENC de uma dada sequência significa que menos degenerados são os códons, ou seja, reflete um uso de códons mais restrito. Assim, uma baixa disponibilidade de códons para a codificação de determinado aminoácido associado a uma menor frequência de tRNAs cognatos, pode retardar a velocidade de tradução de um gene. Já para o índice CAI, valores mais próximos de zero indicam uma baixa adaptação de determinada sequência em relação ao genoma do hospedeiro, que, no nosso caso, corresponde ao genoma humano.

Similarmente ao *codon usage bias*, pares de códons também exibem uma certa frequência, isto é, existe também o “*Codon pair bias*”. Uma das teorias para que exista uma tendência de pares de códons é que certos tRNAs interagem mal no ribossomo, e assim os pares de códons adjacentes a tais tRNAs são sub-representados (267). Desta forma, a frequência de pares de códons tem efeito nas taxas de tradução de um gene (268). Uma forma de mensurar a super- ou a sub-representação dos pares de códons é através do CPB, que consiste em um índice de frequência de pares de códons, em relação ao uso de códons de um dado organismo. Esse índice exibe valores positivos e negativos que configuram a super- ou sub-representação de pares de códons, indicando a preferência, ou não, desses pares de códons por determinado organismo. Nesse trabalho, o genoma de referência incorporado às análises dos índices ENC, CAI e CPB foi o genoma humano.

Preferencialmente, escolhemos as sequências baseadas nos valores de CPB. Através do algoritmo dN231, foram geradas sequências com valores de CPB (*Codon pair bias score*) que variaram de -0.0109 a 0.0406. Como o intuito é desotimizar a frequência de pares de códons, a sequência escolhida (permutada pelo algoritmo dN231) foi a que apresentou o menor valor de CPB (-0,0109). Conforme mencionado anteriormente, valores baixos de CPB indicam a sub-representação de pares de códons e o aumento de pares de códons sub-representados em um gene importante para a replicação do vírus, pode levar à atenuação viral (198,264). Os índices ENC e CAI da sequência escolhida (algoritmo dN231; CPB = -0,0109) exibiram valores muito próximos ao que foi observado na sequência dos genes NS4B e NS5 do vírus Rio-U1 (ver tabela 4.5 da seção 4.3.1), então, a sequência de escolha derivada do algoritmo

dN231 não teve impacto nos valores de ENC e CAI. Entretanto, algumas sequências geradas pelo algoritmo dN231 até exibiram valores menores nos índices ENC e CAI, porém, quando o valor desses índices estava diminuído, o que até seria interessante para o objetivo de desotimização de códons, o valor de CPB aumentava consideravelmente, e desta forma fugia do nosso objetivo de atenuação por inserção de pares de códons sub-representados nos genes NS4B e NS5. Diante disso, mantivemos nossa escolha, utilizando como critério, o menor valor de CPB.

Já o algoritmo N3 gerou sequências com valores de CPB ainda menores, os quais variaram de -0,1244 a -0,0406. Esses valores nos chamaram a atenção, pois mostrou que a permuta randômica entre códons afetou muito mais o valor de CPB do que a permuta realizada entre pares de códons, isto é, -0,1244 (CPB obtido através da permuta N3) *versus* -0,0109 (CPB obtido através da permuta dN231). No entanto, as sequências derivadas do algoritmo N3 contendo os menores valores de CPB, exibiram valores de ENC e CAI ainda maiores do que a sequência baseada no vírus parental (Rio-U1), ou seja, apresentavam um número efetivo de códons e um índice de adaptação de códons, perante o genoma humano, que poderia favorecer a tradução dos genes NS4B e NS5. Assim, optamos pela sequência que exibia os menores valores possíveis de ENC e CAI (56,79 e 0,672 respectivamente), porém, ainda exibindo valor negativo do índice CPB (-0,0735), priorizando que os pares de códons dessa sequência ainda fossem sub-representados.

Após a escolha das sequências permutadas pelos algoritmos dN231 e N3, essas foram sintetizadas pela *GenScript*, e as clonamos nos plasmídeos (pCC1-Z3Z4 e pCC1-MCS-Z1Z2) que contém o genoma do vírus Rio-U1, substituindo as regiões equivalentes. Assim, obtivemos os outros dois clones infecciosos de ZIKV, o IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231, que contém as sequências dos genes NS4B e NS5 derivadas do algoritmo dN231, e o IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3, o qual contém as sequências dos genes alvo derivadas do algoritmo N3. A partir de então, realizamos os ensaios de infecção celular e em modelo de camundongo AG129, para avaliar o quanto as permutas de códons impactaram na desotimização dos genes NS4B e NS5, de modo a promover atenuação do ZIKV.

O vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5-dN231 exibiu um perfil infectivo muito similar ao vírus com fenótipo selvagem, tanto na replicação em diferentes culturas celulares quanto em modelo de camundongo AG129. Nas infecções celulares, foram observadas diferenças significativas apenas em células C6/36, indicando que, possivelmente, o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231 tenha se tornado menos proliferativo em células de

inseto. No entanto, em células de mamífero, não observamos qualquer diferença significativa no perfil replicativo de IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231 em relação ao IC.ZIKV-Rio-U1. Da mesma forma, o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231 infectou os camundongos AG129 igualmente ao vírus com o fenótipo selvagem, não diferindo em nenhum dos parâmetros analisados e exibindo uma taxa de mortalidade de 100%. Correlacionando esses resultados com os índices CAI e ENC da sequência dN231 observamos que esses índices não se distanciaram muito dos índices exibidos pela análise da sequência original Rio-U1. Além disso, mesmo o CPB exibindo valor negativo, ainda assim não foi baixo o suficiente para desotimizar a expressão de NS4B e NS5, causando a atenuação esperada. Diante desses resultados, observamos que a recodificação nucleotídica realizada através de permuta baseada no algoritmo dN231, não resultou em atenuação viral, pois viu-se que o vírus IC.ZIKV – Rio-U1-ns4-ns5/dN231 exibiu um fenótipo muito similar ao vírus parental Rio-U1.

Em contrapartida, o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 exibiu um perfil proliferativo muito menor em comparação ao vírus sintético com fenótipo selvagem. Essas diferenças foram observadas em todos os modelos celulares avaliados, bem como em modelo de camundongo AG129. Ao correlacionar esse vírus com o índice CPB, que indica a frequência de pares de códons, vimos que nessa condição de permuta (N3), o CPB diminuiu consideravelmente, apontando para a desotimização de pares de códons na sequência dos genes NS4B e NS5, retardando a tradução dessas proteínas, e conseqüentemente, a replicação viral.

Diante desses resultados, observou-se que o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 construído com as proteínas NS4B e NS5 desotimizadas através da inserção de pares de códons sub-representados (algoritmo N3; CPB = -0,0735), teve o *fitness* viral afetado, gerando um vírus atenuado com grande potencial de ser utilizado como um candidato vacinal. Esse potencial foi observado através do perfil replicativo reduzido em culturas de células e da menor virulência em modelo de camundongo AG129, que exibiu uma taxa de mortalidade de 55,6% em contraposição ao vírus selvagem, que apresenta uma taxa de mortalidade de 100%. Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos de atenuação viral. Coleman *et al.*, (2008), demonstraram que ao inserir pares de códons sub-representados (valor de CPB negativo) no genoma de poliovírus, as taxas de tradução do gene alvo diminuíram e acarretaram a atenuação viral (198). O mesmo foi observado no trabalho de Li *et al.*, (2018), onde os autores recodificaram os genes E e NS1 de ZIKV utilizando pares de códons sub-representados e obtiveram clones infecciosos de ZIKV que exibiram um fenótipo

atenuado (184). Nouën *et al.*, (2014), também gerou um candidato vacinal contra vírus sincicial respiratório humano atenuado, a partir da obtenção de clones infecciosos contendo pares de códons sub-representados no genoma viral (200).

Uma vez que o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 demonstrou um padrão mais atenuado, realizamos testes em modelo de camundongo AG129, utilizando doses virais menores, tendo em vista que a dose utilizada ($1,0 \times 10^4$ PFU / mL) resultou na morte de mais da metade dos animais infectados. Nesse momento, o objetivo era determinar a menor dose capaz de promover uma resposta imune protetora. Como tratava-se de um ensaio piloto, utilizamos os camundongos AG129 que estavam disponíveis no momento, os quais formaram grupos heterogêneos, com animais de diferentes idades. No entanto, os resultados observados nesse ensaio piloto, demonstraram que a idade do animal é um fator que deve ser levado em conta. Nesse experimento, observamos que animais mais velhos sobreviviam mais tempo, mesmo tendo recebido doses virais maiores. Por exemplo, animais com 18 semanas de vida, sobreviveram à $1,0 \times 10^4$ PFU / mL, que foi a dose de controle, uma vez que já sabíamos o curso da infecção a partir dessa dose. Por outro lado, animais com 5 semanas de vida, não resistiram à dose de $1,0 \times 10^2$ PFU / mL. Resultados similares foram observados num trabalho de caracterização da letalidade de ZIKV em camundongos AG129, entretanto, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas. Porém, camundongos jovens exibiram uma tendência a serem mais susceptíveis à infecção por ZIKV do que os camundongos adultos (208). A influência da idade dos animais frente à infecção por ZIKV, também foi observada no trabalho de Morrison & Diamond (2017), que demonstrou letalidade de 100%, 50% e 0% em camundongos A129 com 3, 5 e 11 semanas de idade respectivamente (257). Os animais que sobreviveram ao teste de dose de inóculo foram desafiados com dose letal de IC.ZIKV – Rio-U1 ($1,0 \times 10^4$ PFU / mL). Com exceção do animal que foi imunizado com a menor dose ($1,0 \times 10^2$), todos os animais previamente imunizados sobreviveram ao desafio com vírus com fenótipo selvagem.

Diante disso, para avaliar se o vírus IC.ZIKV – ns4b-ns5/N3 exibiria um potencial de desenvolver uma resposta imune protetora, frente a um desafio com vírus selvagem, definimos que a dose de imunização do vírus atenuado seria intermediária ($1,0 \times 10^3$ PFU / mL), e que os animais a serem imunizados deveriam possuir pelo menos 18 semanas de vida. No entanto, nessa dose, a taxa de mortalidade observada foi de 57,9 %, ou seja, ainda foi uma dose que apresentou uma letalidade importante. Nesse contexto, talvez fosse mais assertivo, se tivéssemos optado pela dose menor

de vírus, porém, com a administração de uma dose de reforço, tal qual foi realizado nos trabalhos de Sumathy *et al.* (2017), e Salvo *et al.* (2018). Nesses trabalhos os autores imunizaram animais AG129, em dois momentos diferentes, antes de serem submetidos ao desafio. Outro ponto em contraposição ao nosso experimento, é que esses animais foram imunizados por protótipos vacinais em estado de desenvolvimento mais avançado do que o nosso trabalho (161,269). Além disso, é importante salientar que o modelo animal AG129 não representa perfeitamente o modelo de infecção em humanos, pois são altamente susceptíveis, devido ao seu genoma *knockout* para receptores de interferon tipo I e tipo II, conforme mencionado anteriormente. Porém, é um modelo válido para estudos de virulência e atenuação de ZIKV, e para desenvolver hipóteses a serem futuramente testadas em primatas não humanos (208). Entretanto, apesar de ser um modelo sem uma resposta funcional mediada por interferon, esses animais desenvolvem respostas humorais e celulares, mediadas por células T, normalmente (270,271). Assim, vários estudos envolvendo avaliação de vacinas têm utilizado o camundongo AG129 como modelo de análise *in vivo* (161,272).

Apesar do vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 ter exibido uma taxa de mortalidade importante, os animais que sobreviveram foram desafiados com $1,0 \times 10^4$ PFU / mL do vírus com fenótipo selvagem. Após o desafio com IC.ZIKV-Rio-U1, a taxa de sobrevivência desses animais foi de 100%. Diante disso, é provável que os animais imunizados tenham induzido a produção de anticorpos neutralizantes, pois após o desafio com uma dose letal de vírus com fenótipo selvagem, os animais imunizados previamente, com o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3, sobreviveram. Esse resultado demonstra que esse vírus apresenta um potencial para o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas. No entanto, seria importante determinar os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos. Variantes quiméricas de ZIKV, contendo pares de códons desotimizadas na codificação das proteínas E e NS1, também induziram imunidade protetora a camundongos AG6. Quando desafiados com o vírus selvagem da linhagem asiática SZ-WIV01, os camundongos imunizados exibiram uma taxa de sobrevivência de 100% (184). Outros trabalhos envolvendo a atenuação por inserção de pares de códons desotimizadas no genoma viral, também foram capazes de promover resposta imune protetora (198,273).

Com o intuito de aprimorarmos a investigação no que se refere à imunogenicidade do constructo viral IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3, entendemos a necessidade de adotar outras técnicas e talvez um modelo animal mais permissivo

para avaliar a imunogenicidade do vírus. Em geral, os ensaios de imunogenicidade são realizados utilizando camundongos imunocompetentes, BALB/c e C57BL6, por apresentarem uma resposta imune inata e adaptativa mais efetiva em relação ao AG129 (257). Aliás, uma imunização efetiva induz resposta imune inata e adaptativa, e necessariamente deve induzir resposta imune celular e humoral de longo prazo, com a produção de anticorpos neutralizantes e células T de memória (274).

Por fim, nossos resultados demonstraram que obtivemos um clone infeccioso de ZIKV que apresentou um potencial para o desenvolvimento de um candidato vacinal promissor. A recodificação dos genes NS4B e NS5, por permuta nucleotídica, acarretou um aumento de pares de códons sub-representados na sequência codificante das proteínas NS4B e NS5. Essa abordagem estratégica de desotimização de pares de códons pode ter ampla aplicação no desenvolvimento de vacinas contra flavivírus e outros vírus importantes (186). Uma vantagem importante dessa abordagem é que a sequência de aminoácidos do vírus permanece idêntica, mantendo o repertório de epítomos antigênicos intacto (184). Além disso, como inúmeras mutações são introduzidas, é improvável que esse vírus reverta à sua sequência original e virulenta (196).

6 PERSPECTIVAS

6.1 Vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal

Pretendemos comparar o *fitness* viral entre o vírus com fenótipo selvagem, IC.ZIKV-Rio-U1, e o vírus quimérico IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal em mosquitos vetores, através de ensaios que demonstrem a taxa de infecção e a taxa de replicação do vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal em *Aedes aegypti*. Esse ensaio pode indicar se as alterações nucleotídicas das proteínas NS4B e NS5, que ocorreram ao longo da evolução do ZIKV, podem estar associadas ao aumento da transmissibilidade por mosquitos vetores, levando ao rápido espalhamento do vírus e aumento do número de casos de infecção por ZIKV em humanos.

6.2 Vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3

É necessário uma melhor caracterização do vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3, que apresentou um fenótipo atenuado em relação ao vírus com fenótipo selvagem, para avaliar a possibilidade do vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 ser um candidato vacinal.

Primeiramente, é preciso saber se a imunização dos animais AG129 com o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 é capaz de induzir anticorpos neutralizantes contra o ZIKV selvagem. Para isso, serão titulados os anticorpos neutralizantes, através do teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT), a partir do soro dos animais imunizados. Após identificar se a imunização implica em produção de anticorpos neutralizantes, pretendemos realizar novo experimento de imunização, porém utilizando doses menores do inóculo viral e incluir um *boost* com o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 entre 14 ou 21 dias após a primeira dose. Esperamos que a diminuição da dose viral aumente a taxa de sobrevivência dos animais, e que o *boost* seja capaz de potencializar a resposta imune.

Também seria interessante investigar a imunogenicidade do vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 em modelo de camundongo C57BL/6, a fim de avaliar a resposta imune celular e humoral de longo prazo, através da caracterização da produção de anticorpos neutralizantes e células T de memória. Um outro ponto importante que

deve ser avaliado é em relação à segurança do vírus vacinal em fêmeas grávidas, e a capacidade de proteção contra a infecção por ZIKV durante a gestação.

Após analisar o padrão imunogênico do vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3, é importante avaliar a sua estabilidade genética a fim de garantir que a sequência nucleotídica se mantenha intacta durante as passagens em sistemas vivos, como cultura de células ou animais.

Ainda, se o vírus quimérico IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 não exibir um perfil atenuado e/ou imunogênico suficiente para ser um candidato vacinal, pretendemos inserir, no genoma do vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3, mutações sítio dirigidas que já são estudadas pelo nosso grupo, e apontam para uma atenuação viral.

7 CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido um sistema estável e eficiente, utilizando genética reversa, para a obtenção de clones infecciosos de ZIKV. Esse sistema envolveu abordagens como: a divisão do genoma viral em dois plasmídeos, a utilização de um plasmídeo de cópia única e a amplificação do cDNA viral por PCR. A utilização dessas três estratégias, em conjunto, foi essencial para contornar as limitações da genética reversa em genoma de flavivírus. A utilização de um plasmídeo de baixo número de cópias, estabilizou a expressão de promotores procarióticos presentes no genoma de flavivírus. Contudo, como o plasmídeo utilizado, o pCC1, consiste em um plasmídeo de cópia única, as amplificações por PCR foram essenciais para o aumento da massa de cDNA viral, otimizando a obtenção do cDNA molde completo de ZIKV.

- Esse conjunto de abordagens, então, favoreceu a obtenção do clone infeccioso de ZIKV, baseado no isolado Rio-U1 (Genbank: KU926309), que pôde ser utilizado como uma ferramenta para derivar outros clones infecciosos, tanto para estudos de marcadores de virulência quanto para o desenvolvimento de vírus atenuados.

- A partir da obtenção do primeiro constructo sintético, IC.ZIKV-Rio-U1, foi possível obter outros três vírus, com alterações nos genes alvo NS4B e NS5, demonstrando a reprodutibilidade do sistema desenvolvido.

- Partículas virais viáveis, derivadas dos constructos obtidos por genética reversa, foram recuperadas a partir do sobrenadante de células infectadas. Sabe-se da viabilidade dos vírus devido à capacidade dos mesmos em gerar efeito citopático na monocamada de células infectadas. Além disso, as sequências completas dos genomas dos vírus regenerados foram confirmadas após sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger e alinhamento das sequências geradas com as sequências originais.

- A regeneração viral de IC.ZIKV-Rio-U1 e IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal também pode ser confirmada pela detecção de antígenos virais de *Flavivirus* por imunofluorescência em culturas de células Vero, evidenciando a presença de partículas virais infectivas. Esse ensaio não foi realizado com os vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231 e IC.ZIKV-ns4b-

ns5/N3, no entanto foi possível confirmar a regeneração viral através de RT-PCR e sequenciamento nucleotídico conforme acima mencionado.

- O clone IC.ZIKV-Rio-U1 exibiu propriedades biológicas extremamente similares ao vírus parental. A cinética de replicação viral nos modelos celulares mostrou um perfil de proliferação sem diferenças significativas entre o constructo sintético e o vírus parental. Da mesma forma, foi observado que tanto o vírus parental quanto o clone IC.ZIKV-Rio-U1 exibiram um perfil patogênico muito similar em modelo animal. Os camundongos AG129 infectados com ambos os vírus, exibiram sinais e sintomas muito similares, mesmo padrão de infecção neurológica, bem como uma taxa de mortalidade idêntica, sempre no mesmo período de infecção.

- O clone IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal apresentou um perfil ligeiramente menos virulento quando comparado com o vírus com fenótipo selvagem. Em modelos celulares, não foram observadas diferenças significativas na cinética de replicação viral entre os vírus. No entanto, no ensaio de morfologia de placas de lise e focos de infecção, foi observado que o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal parece ter uma capacidade de infecção um pouco mais lenta do que o vírus IC.ZIKV-Rio-U1. Além disso, em modelo AG129, os animais infectados com o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal apresentaram um tempo de sobrevivência maior e com os sinais de morbidade sendo exibidos um pouco mais tardiamente. Esse resultado pode indicar que ao regressar as sequências das proteínas NS4B e NS5 para a linhagem ancestral, a capacidade infectiva do vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal em modelo *in vivo* pode ter sido afetada. No entanto, o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/Mal, também apresentou uma taxa de mortalidade de 100%, então, a substituição nas proteínas NS4B e NS5 da linhagem epidêmica para a linhagem ancestral, não foi suficiente para a obtenção de um vírus sintético com fenótipo atenuado.

- O *Software CodonShuffle*, foi uma ferramenta eficaz na geração de sequências derivadas do genoma Rio-U1, contendo inúmeras mutações sinônimas inseridas ao longo da sequência dos genes NS4B e NS5, através de permuta nucleotídica. Os dois algoritmos de permuta nucleotídica escolhidos (dN231 e N3), geraram sequências contendo pares de códons sub-representados em relação a sequência original Rio-U1, ou seja, geraram sequências com CPB (*Codon pair bias score*) menores que o CPB da sequência Rio-U1. Por outro lado, os outros índices avaliados, (número

efetivo de códons e índice de adaptação de códons) não variaram muito dos valores obtidos nas análises da sequência original Rio-U1.

- O vírus contendo as sequências NS4B e NS5 geradas pelo algoritmo dN231, não exibiu um perfil atenuado em relação ao vírus com a sequência genômica original Rio-U1. Nesse vírus, apesar do CPB ter sido negativo, a quantidade de pares de códons sub-representados pode não ter sido suficiente para desotimizar a expressão das proteínas do complexo replicativo viral, pois pôde-se observar que o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/dN231 apresentou padrões de infecção muito parecido com o vírus IC.ZIKV-Rio-U1, tanto em modelo celular quanto em modelo animal.

- O valor de CPB das sequências permutadas segundo o algoritmo N3 foi menor do que o CPB das sequências obtidas pela permuta dN231, demonstrando assim que a permuta N3 interferiu mais na desotimização dos genes NS4B e NS5, devido a uma maior frequência de pares de códons sub-representados. Essa quantidade de pares de códons sub-representados, nos genes NS4B e NS5, promoveu a atenuação viral de IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3. O perfil atenuado desse vírus foi observado tanto na cinética de replicação viral em modelos celulares, quanto na patogenicidade observada em modelo AG129.

- Em todos os modelos celulares testados, o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 exibiu uma cinética de replicação viral significativamente menor do que o vírus IC.ZIKV-Rio-U1. Em modelo AG129, os camundongos infectados com o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 apresentaram um tempo de sobrevida maior do que os camundongos infectados com o vírus com fenótipo selvagem, e uma taxa de mortalidade muito menor. Esse resultado demonstrou que, a inserção de pares de códons sub-representados em NS4B e NS5 foi capaz de promover a atenuação viral.

- Embora o vírus tenha exibido uma taxa de mortalidade importante, todos os animais que sobreviveram à imunização com o vírus atenuado, sobreviveram também ao desafio com o vírus com fenótipo selvagem. Esse resultado demonstra que o vírus IC.ZIKV-ns4b-ns5/N3 promoveu imunidade protetora em camundongos AG129.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Plourde AR, Bloch EM. A literature review of zika virus. Vol. 22, Emerging Infectious Diseases. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2016. p. 1185–92.
2. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. Baden LR, editor. New England Journal of Medicine [Internet]. 2016 Apr 21;374(16):1552–63. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1602113>
3. Singh RK, Dhama K, Malik YS, Ramakrishnan MA, Karthik K, Tiwari R, et al. Zika virus – emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives – a comprehensive review. Vol. 36, Veterinary Quarterly. Taylor and Francis Ltd.; 2016. p. 150–75.
4. Yu Y, Si L, Meng Y. Flavivirus Entry Inhibitors. In 2022. p. 171–97.
5. Dick GWA, Kitchen SF. 509 ZIKA VIRUS (I). Isolations and Serological Specificity. Vol. 46, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1952.
6. MacNamara FN. Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1954 Mar;48(2):139–45.
7. Simpson DIH. Zika virus infection in man. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1964 Jul;58(4):335–8.
8. Dick GWA. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda (Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1953 Jan;47(1):13–48.
9. Sather GE, Schrack WD, Hammon WMcD. Serological Survey for Arthropod-Borne Virus Infections in the Philippines 1. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1958 May 1;7(3):323–8.
10. Pond WL. Arthropod-borne virus antibodies in sera from residents of South-East Asia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1963 Sep;57(5):364–71.
11. Smithburn K.C. Neutralizing Antibodies Against Certain Recently Isolated Viruses in the Sera of Human Beings Residing in East Africa. The Journal of Immunology. 1952 Aug 1;69(2):223–34.
12. Smithburn KC. Neutralizing antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of long-time residents of Malaya and Borneo. American Journal of Epidemiology. 1954 Mar;59(2):157–63.
13. Smithburn KC, Kerr JA, Gatne PB. Neutralizing antibodies against certain viruses in the sera of residents of India. Journal of Immunology. 1952 Apr;72(4):248–57.
14. Smithburn KC, Taylor RM, Rizk F, Kader A. Immunity to Certain Arthropod-Borne Viruses Among Indigenous Residents of Egypt. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1954 Jan 1;3(1):9–18.
15. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. The Lancet. 2017 Nov;390(10107):2099–109.

16. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*. 2009 Jun 11;360(24):2536–43.
17. Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging Infectious Diseases*. 2014 Jun;20(6):1084–6.
18. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daurès M, John M, Grangeon J-P, et al. Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014. *Emerging Infectious Diseases*. 2015 Feb;21(2):381–2.
19. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance*. 2014 Oct 16;19(41).
20. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Archives of Virology*. 2016 Mar 26;161(3):665–8.
21. Weaver SC. Emergence of Epidemic Zika Virus Transmission and Congenital Zika Syndrome: Are Recently Evolved Traits to Blame? *mBio*. 2017 Mar 8;8(1).
22. Lowe R, Barcellos C, Brasil P, Cruz O, Honório N, Kuper H, et al. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018 Jan 9;15(1):96.
23. Faria NR, Azevedo R do S da S, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science (1979)*. 2016 Apr 15;352(6283):345–9.
24. Zanluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos CND dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015 Jun 9;110(4):569–72.
25. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2015 Oct;21(10):1885–6.
26. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica de ocorrência de microcefalias no Brasil. . 2016.
27. PAHO, WHO WHO. Zika Epidemiological Update. Washington; 2016 Apr.
28. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IML, Horovitz DDG, Cavalcanti DP, Pessoa A, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2016 Jan 29;65(3):59–62.
29. Aragao M de FV, van der Linden V, Brainer-Lima AM, Coeli RR, Rocha MA, Sobral da Silva P, et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ*. 2016 Apr 13;i1901.
30. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016 Jun;16(6):653–60.

31. Brito C. Zika Virus: A New Chapter in the History of Medicine. *Acta Médica Portuguesa*. 2016 Dec 31;28(6):679.
32. BRASIL. Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia [Internet]. Brasil; 2015 [cited 2022 Jan 7]. Available from: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-11/ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zica-e-microcefalia>
33. Aubry M, Teissier A, Huart M, Merceron S, Vanhomwegen J, Roche C, et al. Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. *Emerging Infectious Diseases*. 2017 Apr;23(4):669–72.
34. Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-Guignot D, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *The Lancet*. 2016 May;387(10033):2125–32.
35. McCarthy M. First US case of Zika virus infection is identified in Texas. *BMJ*. 2016 Jan 13;i212.
36. World Health Organization. Zika virus disease: interim case definitions. [Internet]. Geneva; 2016 [cited 2022 Jan 7]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204381>
37. Dick GWA. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952 Sep;46(5):521–34.
38. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* (1979). 2016 Apr 22;352(6284):467–70.
39. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. Vol. 130, *Antiviral Research*. Elsevier B.V.; 2016. p. 69–80.
40. Butt AM, Nasrullah I, Qamar R, Tong Y. Evolution of codon usage in Zika virus genomes is host and vector specific. *Emerging Microbes and Infections*. 2016 Oct 12;5(10).
41. Blitvich BJ, Firth AE. Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. Vol. 7, *Viruses*. MDPI AG; 2015. p. 1927–59.
42. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide Sequence of Yellow Fever Virus: Implications for Flavivirus Gene Expression and Evolution. *Science* (1979). 1985 Aug 23;229(4715):726–33.
43. Shi Y, Gao GF. Structural Biology of the Zika Virus. *Trends in Biochemical Sciences*. 2017 Jun;42(6):443–56.
44. van Hemert F, Berkhout B. Nucleotide composition of the Zika virus RNA genome and its codon usage. *Virology Journal*. 2016 Jun 8;13(1).
45. Konishil E, Mason2' PW. Proper Maturation of the Japanese Encephalitis Virus Envelope Glycoprotein Requires Cosynthesis with the Premembrane Protein. Vol. 67, *JOURNAL OF VIROLOGY*. 1993.
46. Ryan MD, Monaghan S, Flint M. Printed in Great Britain Virus-encoded proteinases of the Flaviviridae. Vol. 79, *Journal of General Virology*. 1998.

47. Zhang Y. Structures of immature flavivirus particles. *The EMBO Journal*. 2003 Jun 1;22(11):2604–13.
48. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*. 2010 Aug;87(2):125–48.
49. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. In 2003. p. 23–61.
50. Liu Z-Y, Shi W-F, Qin C-F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nature Reviews Microbiology*. 2019 Mar 7;17(3):131–9.
51. Benarroch D, Selisko B, Locatelli GA, Maga G, Romette J-L, Canard B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology*. 2004 Oct;328(2):208–18.
52. Jain R, Coloma J, García-Sastre A, Aggarwal AK. Structure of the NS3 helicase from Zika virus. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2016 Aug 1;23(8):752–4.
53. Phoo WW, Li Y, Zhang Z, Lee MY, Loh YR, Tan YB, et al. Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nature Communications*. 2016 Dec 15;7(1):13410.
54. Egloff M-P. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO Journal*. 2002 Jun 3;21(11):2757–68.
55. Godoy AS, Lima GMA, Oliveira KIZ, Torres NU, Maluf F v., Guido RVC, et al. Crystal structure of Zika virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. *Nature Communications*. 2017 Apr 27;8(1):14764.
56. Issur M, Geiss BJ, Bougie I, Picard-Jean F, Despins S, Mayette J, et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA*. 2009 Dec;15(12):2340–50.
57. Yon C, Teramoto T, Mueller N, Phelan J, Ganesh VK, Murthy KHM, et al. Modulation of the Nucleoside Triphosphatase/RNA Helicase and 5'-RNA Triphosphatase Activities of Dengue Virus Type 2 Nonstructural Protein 3 (NS3) by Interaction with NS5, the RNA-dependent RNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Jul;280(29):27412–9.
58. Kümmerer BM, Rice CM. Mutations in the Yellow Fever Virus Nonstructural Protein NS2A Selectively Block Production of Infectious Particles. *Journal of Virology*. 2002 May 15;76(10):4773–84.
59. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. *Journal of Virology*. 1999 Jun;73(6):4611–21.
60. Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nature Reviews Microbiology*. 2008 Sep 30;6(9):699–708.

61. Chambers TJ, Nestorowicz A, Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *Journal of Virology*. 1993 Nov;67(11):6797–807.
62. Chung KM, Nybakken GE, Thompson BS, Engle MJ, Marri A, Fremont DH, et al. Antibodies against West Nile Virus Nonstructural Protein NS1 Prevent Lethal Infection through Fc γ Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms. *Journal of Virology*. 2006 Feb;80(3):1340–51.
63. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Nov 25;100(24):14333–8.
64. Ramanathan MP, Chambers JA, Pankhong P, Chattergoon M, Attatippaholkun W, Dang K, et al. Host cell killing by the West Nile Virus NS2B–NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology*. 2006 Feb;345(1):56–72.
65. Kuno G, Chang G-JJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*. 2007 Apr 3;152(4):687–96.
66. Gollins SW, Porterfield JS. Flavivirus Infection Enhancement in Macrophages: an Electron Microscopic Study of Viral Cellular Entry. *Journal of General Virology*. 1985 Sep 1;66(9):1969–82.
67. Ishak R, Tovey DG, Howard CR. Morphogenesis of Yellow Fever Virus 17D in Infected Cell Cultures. *Journal of General Virology*. 1988 Feb 1;69(2):325–35.
68. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology*. 2015 Sep 1;89(17):8880–96.
69. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 Jan;3(1):13–22.
70. Kimura T, Kimura-Kuroda J, Nagashima K, Yasui K. Analysis of virus-cell binding characteristics on the determination of Japanese encephalitis virus susceptibility. *Archives of Virology*. 1994 Sep;139(3–4):239–51.
71. Kopecký J, Grubhoffer L, Kovář V, Jindrák L, Vokurková D. A Putative Host Cell Receptor for Tick-Borne Encephalitis Virus Identified by Anti-Idiotypic Antibodies and Virus Affinoblotting. *Intervirology*. 1999;42(1):9–16.
72. Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology*. 2006 Oct 1;87(10):2755–66.
73. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*. 2006 Dec;80(23):11418–31.
74. Yu I-M, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science (1979)*. 2008 Mar 28;319(5871):1834–7.
75. Rice CM. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. Fields Virology. 3rd ed. Lippincott–Raven, editor. Philadelphia; 1996. 931–959 p.

76. Mackenzie JM, Jones MK, Westaway EG. Markers for *trans*-Golgi Membranes and the Intermediate Compartment Localize to Induced Membranes with Distinct Replication Functions in Flavivirus-Infected Cells. *Journal of Virology*. 1999 Nov;73(11):9555–67.
77. Paul D. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World Journal of Virology*. 2013;2(2):32.
78. Schalich J, Allison SL, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *Journal of Virology*. 1996 Jul;70(7):4549–57.
79. Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*. 1997 Nov;71(11):8475–81.
80. Elshuber S, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus FN1. *Journal of General Virology*. 2003 Jan 1;84(1):183–91.
81. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev S v., Corver J, Lenches E, et al. Structure of Dengue Virus. *Cell*. 2002 Mar;108(5):717–25.
82. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports*. 2017 Feb;18(9):2113–23.
83. Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016 Mar 3;10(3):e0004543.
84. Hayes EB. Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*. 2009 Sep;15(9):1347–50.
85. Althouse BM, Vasilakis N, Sall AA, Diallo M, Weaver SC, Hanley KA. Potential for Zika Virus to Establish a Sylvatic Transmission Cycle in the Americas. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016 Dec 15;10(12):e0005055.
86. Iosifidis S, Mallet H-P, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2014 Jul;44(7):302–7.
87. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, dos Santos AAC, Menezes LSR, da Cruz SOD, et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016 Jun 24;10(6):e0004816.
88. van Kerkhove MD, Reveiz L, Souza JP, Jaenisch T, Carson G, Broutet N. Harmonisation of Zika virus research protocols to address key public health concerns. *The Lancet Global Health*. 2016 Dec;4(12):e911–2.
89. Grischott F, Puhon M, Hatz C, Schlagenhaut P. Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2016 Jul 1;14(4):313–30.
90. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance*. 2014 Apr 10;19(14).

91. Armstrong P, Hennessey M, Adams M, Cherry C, Chiu S, Harrist A, et al. Travel-Associated Zika Virus Disease Cases Among U.S. Residents — United States, January 2015–February 2016. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2016 Mar 25;65(11):286–9.
92. McCarthy M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. *BMJ*. 2016 Feb 4;i720.
93. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine*. 2016 Mar 10;374(10):951–8.
94. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 2016 Jun 9;534(7606):267–71.
95. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*. 2016 May;165(5):1081–91.
96. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981 Jan;75(3):389–93.
97. Benzekri R, Belfort R, Ventura CV, de Paula Freitas B, Maia M, Leite M, et al. Manifestations oculaires du virus Zika : où en sommes-nous ? *Journal Français d’Ophtalmologie*. 2017 Feb;40(2):138–45.
98. Flamand C, Fritzell C, Matheus S, Dueymes M, Carles G, Favre A, et al. The proportion of asymptomatic infections and spectrum of disease among pregnant women infected by Zika virus: systematic monitoring in French Guiana, 2016. *Eurosurveillance*. 2017 Nov 2;22(44).
99. Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gómez WE, Franco-Paredes C. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2016 May;14(3):177–9.
100. Carteaux G, Maquart M, Bedet A, Contou D, Brugières P, Fourati S, et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *New England Journal of Medicine*. 2016 Apr 21;374(16):1595–6.
101. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastère S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*. 2014 Mar 6;19(9).
102. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*. 2016 May;18(5):587–90.
103. Possas C, Brasil P, Marzochi MC, Tanuri A, Martins RM, Marques ET, et al. Zika puzzle in Brazil: peculiar conditions of viral introduction and dissemination - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017 Apr 6;112(5):319–27.
104. del Campo M, Feitosa IML, Ribeiro EM, Horovitz DDG, Pessoa ALS, França GVA, et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2017 Apr;173(4):841–57.

105. Honein MA, Dawson AL, Petersen EE, Jones AM, Lee EH, Yazdy MM, et al. Birth Defects Among Fetuses and Infants of US Women With Evidence of Possible Zika Virus Infection During Pregnancy. *JAMA*. 2017 Jan 3;317(1):59.
106. Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martínez-Vega R, Porgo T v., et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. *PLOS Medicine*. 2017 Jan 3;14(1):e1002203.
107. Ventura C v., Maia M, Ventura B v., Linden V van der, Araújo EB, Ramos RC, et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2016;79(1).
108. Costello A, Dua T, Duran P, Gülmezoglu M, Oladapo OT, Perea W, et al. Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. *Bull World Health Organ*. 2016 Jun 1;94(6):406-406A.
109. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2016 Jan;47(1):6–7.
110. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012 Feb 28;6(2):e1477.
111. Gubler DJ, Vasilakis N, Musso D. History and Emergence of Zika Virus. *The Journal of Infectious Diseases*. 2017 Dec 16;216(suppl_10):S860–7.
112. Hung SJ, Huang SW. Contributions of Genetic Evolution to Zika Virus Emergence. Vol. 12, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
113. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau V-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Oct;20(10):O595–6.
114. Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, Signor L del CC. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerging Infectious Diseases*. 2016 May;22(5):933–5.
115. Zhu Z, Chan JFW, Tee KM, Choi GKY, Lau SKP, Woo PCY, et al. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerging Microbes and Infections*. 2016 Mar 16;5(3).
116. Moudy RM, Meola MA, Morin L-LL, Ebel GD, Kramer LD. A newly emergent genotype of West Nile virus is transmitted earlier and more efficiently by *Culex* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Aug;77(2):365–70.
117. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annual Review of Medicine*. 2018 Jan 29;69(1):395–408.
118. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016 Jul;29(3):487–524.
119. Pettersson JHO, Eldholm V, Seligman SJ, Lundkvist Å, Falconar AK, Gaunt MW, et al. How did Zika virus emerge in the Pacific Islands and Latin America? *mBio*. 2016 Sep 1;7(5).

120. Shao Q, Herrlinger S, Zhu Y-N, Yang M, Goodfellow F, Stice SL, et al. The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and Dengue virus. *Development*. 2017 Jan 1;
121. Kulesh DA, Smith DR, Bellanca SA, Haddow AD, Sprague TR, Buathong R, et al. African and Asian Zika Virus Isolates Display Phenotypic Differences Both In Vitro and In Vivo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018 Feb 7;98(2):432–44.
122. Dowall SD, Graham VA, Rayner E, Hunter L, Atkinson B, Pearson G, et al. Lineage-dependent differences in the disease progression of Zika virus infection in type-I interferon receptor knockout (A129) mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017 Jul 3;11(7):e0005704.
123. Weger-Lucarelli J, Rückert C, Chotiwan N, Nguyen C, Garcia Luna SM, Fauver JR, et al. Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016 Oct 26;10(10):e0005101.
124. Stark PM, Azar SR, Debboun M, Vela J, Roundy CM, Rossi SL, et al. Differential Vector Competency of *Aedes albopictus* Populations from the Americas for Zika Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017 Aug 2;97(2):330–9.
125. Roundy CM, Azar SR, Brault AC, Ebel GD, Failloux A-B, Fernandez-Salas I, et al. Lack of evidence for Zika virus transmission by *Culex* mosquitoes. *Emerging Microbes & Infections*. 2017 Jan 1;6(1):1–2.
126. Liu Y, Liu J, Du S, Shan C, Nie K, Zhang R, et al. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature*. 2017 May 17;545(7655):482–6.
127. Yuan L, Huang X-Y, Liu Z-Y, Zhang F, Zhu X-L, Yu J-Y, et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* (1979). 2017 Nov 17;358(6365):933–6.
128. Wang L, Valderramos SG, Wu A, Ouyang S, Li C, Brasil P, et al. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell Host & Microbe*. 2016 May;19(5):561–5.
129. Shan C, Xia H, Haller SL, Azar SR, Liu Y, Liu J, et al. A Zika virus envelope mutation preceding the 2015 epidemic enhances virulence and fitness for transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020 Aug 18;117(33):20190–7.
130. Xia H, Luo H, Shan C, Muruato AE, Nunes BT, Medeiros DBA, et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nature Communications*. 2018 Dec 1;9(1).
131. Liu J, Liu Y, Shan C, Nunes BT, Yun R, Haller SL, et al. Role of mutational reversions and fitness restoration in Zika virus spread to the Americas. *Nature Communications*. 2021 Dec 26;12(1):595.
132. Ruggli N, Rice CM, Louis S, 63 M. FUNCTIONAL cDNA CLONES OF THE FLAVIVIRIDAE: STRATEGIES AND APPLICATIONS. Vol. 53, *ADVANCES IN VIRUS RESEARCH*. 1999.
133. Stobart C, Moore M. RNA Virus Reverse Genetics and Vaccine Design. *Viruses*. 2014 Jun 25;6(7):2531–50.
134. Weger-Lucarelli J, Duggal NK, Bullard-Feibelman K, Veselinovic M, Romo H, Nguyen C, et al. Development and Characterization of Recombinant Virus Generated from a New World Zika Virus Infectious Clone. *Journal of Virology*. 2017 Jan;91(1).

135. Ávila-Pérez G, Nogales A, Park J-G, Vasquez DM, Dean DA, Barravecchia M, et al. In vivo rescue of recombinant Zika virus from an infectious cDNA clone and its implications in vaccine development. *Scientific Reports*. 2020 Dec 16;10(1):512.
136. Yang Y, Shan C, Zou J, Muruato AE, Bruno DN, de Almeida Medeiros Daniele B, et al. A cDNA Clone-Launched Platform for High-Yield Production of Inactivated Zika Vaccine. *EBioMedicine*. 2017 Mar 1;17:145–56.
137. Xie X, Muruato A, Lokugamage KG, Narayanan K, Zhang X, Zou J, et al. An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2. *Cell Host and Microbe*. 2020 May 13;27(5):841-848.e3.
138. Shan C, Xie X, Muruato AE, Rossi SL, Roundy CM, Azar SR, et al. An Infectious cDNA Clone of Zika Virus to Study Viral Virulence, Mosquito Transmission, and Antiviral Inhibitors. *Cell Host and Microbe*. 2016 Jun 8;19(6):891–900.
139. Tsetsarkin KA, Kenney H, Chen R, Liu G, Manukyan H, Whitehead SS, et al. A full-length infectious cDNA clone of Zika virus from the 2015 epidemic in Brazil as a genetic platform for studies of virus-host interactions and vaccine development. *mBio*. 2016 Jul 1;7(4).
140. Pu S-Y, Wu R-H, Yang C-C, Jao T-M, Tsai M-H, Wang J-C, et al. Successful Propagation of Flavivirus Infectious cDNAs by a Novel Method To Reduce the Cryptic Bacterial Promoter Activity of Virus Genomes. *Journal of Virology*. 2011 Mar 15;85(6):2927–41.
141. Sumiyoshi H, Hoke CH, Trent DW. Infectious Japanese Encephalitis Virus RNA Can Be Synthesized from In Vitro-Ligated cDNA Templates. *JOURNAL OF VIROLOGY*. 1992.
142. Yun S-I, Kim S-Y, Rice CM, Lee Y-M. Development and Application of a Reverse Genetics System for Japanese Encephalitis Virus. *Journal of Virology*. 2003 Jun;77(11):6450–65.
143. Johansen IE. Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 Oct 29;93(22):12400–5.
144. Shan C, Xie X, Shi P-Y. Reverse Genetics of Zika Virus. In 2017. p. 47–58.
145. Weger-Lucarelli J, Duggal NK, Brault AC, Geiss BJ, Ebel GD. Rescue and characterization of recombinant virus from a new world zika virus infectious clone. *Journal of Visualized Experiments*. 2017 Jun 7;2017(124).
146. Xu M, Wang B, Deng F, Wang H, Wang M, Hu Z, et al. Establishment of a Reverse Genetic System of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Based on a C4 Strain. *Virology*. 2021 Oct 15;36(5):958–67.
147. Schwarz MC, Sourisseau M, Espino MM, Gray ES, Chambers MT, Tortorella D, et al. Rescue of the 1947 Zika Virus Prototype Strain with a Cytomegalovirus Promoter-Driven cDNA Clone. *mSphere*. 2016 Oct 26;1(5).
148. Lu C-Y, Lin C-S, Lai H-C, Yu Y-W, Liao C-Y, Su W-C, et al. The Rescue and Characterization of Recombinant, Microcephaly-Associated Zika Viruses as Single-Round Infectious Particles. *Viruses*. 2019 Oct 31;11(11):1005.
149. Atieh T, Nougairède A, Klitting R, Aubry F, Failloux A-B, de Lamballerie X, et al. New reverse genetics and transfection methods to rescue arboviruses in mosquito cells. *Scientific Reports*. 2017 Dec 25;7(1):13983.

150. Touret F, Gilles M, Klitting R, Aubry F, de Lamballerie X, Nougairède A. Live Zika virus chimeric vaccine candidate based on a yellow fever 17-D attenuated backbone. *Emerging Microbes & Infections*. 2018 Dec 1;7(1):1–12.
151. Aubry F, Nougairède A, de Fabritus L, Querat G, Gould EA, de Lamballerie X. Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons. *Journal of General Virology*. 2014 Nov 1;95(11):2462–7.
152. Qin Z, Chen Y, Yu J, He X, Liu X, Zhu L, et al. Rapid Construction of an Infectious Clone of the Zika Virus, Strain ZKC2. *Frontiers in Microbiology*. 2021 Oct 21;12.
153. Pan H, Yan Y, Zhang J, Zhao S, Feng L, Ou J, et al. Rapid Construction of a Replication-Competent Infectious Clone of Human Adenovirus Type 14 by Gibson Assembly. *Viruses*. 2018 Oct 18;10(10):568.
154. Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*. 2009 May 12;6(5):343–5.
155. Gibson DG. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. 2009 Nov;37(20):6984–90.
156. Merryman C, Gibson DG. Methods and applications for assembling large DNA constructs. *Metabolic Engineering*. 2012 May;14(3):196–204.
157. Shan C, Xie X, Shi P-Y. Zika Virus Vaccine: Progress and Challenges. *Cell Host & Microbe*. 2018 Jul;24(1):12–7.
158. Morabito KM, Graham BS. Zika Virus Vaccine Development. *The Journal of Infectious Diseases*. 2017 Dec 16;216(suppl_10):S957–63.
159. Abbink P, Larocca RA, de La Barrera RA, Bricault CA, Moseley ET, Boyd M, et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science (1979)*. 2016 Sep 9;353(6304):1129–32.
160. Han H-H, Diaz C, Acosta CJ, Liu M, Borkowski A. Safety and immunogenicity of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate in healthy adults: an observer-blind, randomised, phase 1 trial. *The Lancet Infectious Diseases*. 2021 Sep;21(9):1282–92.
161. Sumathy K, Kulkarni B, Gondu RK, Ponnuru SK, Bonguram N, Eligeti R, et al. Protective efficacy of Zika vaccine in AG129 mouse model. *Scientific Reports*. 2017 Apr 12;7.
162. Tebas P, Roberts CC, Muthumani K, Reuschel EL, Kudchodkar SB, Zaidi FI, et al. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2021 Sep 16;385(12):e35.
163. Dowd KA, Ko S-Y, Morabito KM, Yang ES, Pelc RS, DeMaso CR, et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science (1979)*. 2016 Oct 14;354(6309):237–40.
164. Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, Fox JM, et al. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell*. 2017 Mar;168(6):1114–1125.e10.
165. Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, Muramatsu H, Andersen H, DeMaso CR, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*. 2017 Mar 2;543(7644):248–51.

166. Xu K, Song Y, Dai L, Zhang Y, Lu X, Xie Y, et al. Recombinant Chimpanzee Adenovirus Vaccine AdC7-M/E Protects against Zika Virus Infection and Testis Damage. *Journal of Virology*. 2018 Mar 15;92(6).
167. Yang M, Sun H, Lai H, Hurtado J, Chen Q. Plant-produced Zika virus envelope protein elicits neutralizing immune responses that correlate with protective immunity against Zika virus in mice. *Plant Biotechnology Journal*. 2018 Feb;16(2):572–80.
168. To A, Medina LO, Mfuh KO, Lieberman MM, Wong TAS, Namekar M, et al. Recombinant Zika Virus Subunits Are Immunogenic and Efficacious in Mice. *mSphere*. 2018 Feb 28;3(1).
169. Boigard H, Alimova A, Martin GR, Katz A, Gottlieb P, Galarza JM. Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017 May 8;11(5):e0005608.
170. Shan C, Muruato AE, Nunes BTD, Luo H, Xie X, Medeiros DBA, et al. A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nature Medicine*. 2017 Jun 10;23(6):763–7.
171. Li X-F, Dong H-L, Wang H-J, Huang X-Y, Qiu Y-F, Ji X, et al. Development of a chimeric Zika vaccine using a licensed live-attenuated flavivirus vaccine as backbone. *Nature Communications*. 2018 Dec 14;9(1):673.
172. Rivino L, Lim MQ. CD4⁺ and CD8⁺ T-cell immunity to Dengue - lessons for the study of Zika virus. *Immunology*. 2017 Feb;150(2):146–54.
173. Netland J, Bevan M. CD8 and CD4 T Cells in West Nile Virus Immunity and Pathogenesis. *Viruses*. 2013 Oct 22;5(10):2573–84.
174. Winkler CW, Myers LM, Woods TA, Messer RJ, Carmody AB, McNally KL, et al. Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. *The Journal of Immunology*. 2017 May 1;198(9):3526–35.
175. Elong Ngono A, Vizcarra EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y, Kim K, et al. Mapping and Role of the CD8⁺ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host & Microbe*. 2017 Jan;21(1):35–46.
176. Theiler M, Smith HH. THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION. *Journal of Experimental Medicine*. 1937 Jun 1;65(6):787–800.
177. Bonaldo MC, Sequeira PC, Galler R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014 May 8;10(5):1256–65.
178. Barrett ADT. Yellow fever live attenuated vaccine: A very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. *Vaccine*. 2017 Oct;35(44):5951–5.
179. Shan C, Muruato AE, Jagger BW, Richner J, Nunes BTD, Medeiros DBA, et al. A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. *Nature Communications*. 2017 Dec 22;8(1):676.

180. Ye X, Liu X, Shu T, Deng W, Liao M, Zheng Y, et al. A Live-Attenuated Zika Virus Vaccine with High Production Capacity Confers Effective Protection in Neonatal Mice. *Journal of Virology*. 2021 Jun 24;95(14).
181. Chin W-X, Lee RCH, Kaur P, Lew TS, Yogarajah T, Kong HY, et al. A single-dose live attenuated chimeric vaccine candidate against Zika virus. *npj Vaccines*. 2021 Dec 29;6(1):20.
182. Márquez-Jurado S, Nogales A, Ávila-Pérez G, Iborra F, Martínez-Sobrido L, Almazán F. 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*. 2018 Oct 7;10(10):547.
183. Li X-F, Dong H-L, Wang H-J, Huang X-Y, Qiu Y-F, Ji X, et al. Development of a chimeric Zika vaccine using a licensed live-attenuated flavivirus vaccine as backbone. *Nature Communications*. 2018 Dec 14;9(1):673.
184. Li P, Ke X, Wang T, Tan Z, Luo D, Miao Y, et al. Zika Virus Attenuation by Codon Pair Deoptimization Induces Sterilizing Immunity in Mouse Models. *Journal of Virology*. 2018 Sep;92(17).
185. Grantham R, Gautier C, Gouy M, Mercier R, Pavé A. Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Research*. 1980;8(1):197–197.
186. de Melo Jorge DM, Mills RE, Lauring AS. CodonShuffle: A tool for generating and analyzing synonymously mutated sequences. *Virus Evolution*. 2015;1(1).
187. Belalov IS, Lukashev AN. Causes and Implications of Codon Usage Bias in RNA Viruses. *PLoS ONE*. 2013 Feb 25;8(2):e56642.
188. Jenkins GM, Holmes EC. The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. *Virus Research*. 2003 Mar;92(1):1–7.
189. Plotkin JB, Kudla G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics*. 2011 Jan 23;12(1):32–42.
190. Sharp PM, Li W-H. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*. 1987;15(3):1281–95.
191. Shackelton LA, Parrish CR, Holmes EC. Evolutionary Basis of Codon Usage and Nucleotide Composition Bias in Vertebrate DNA Viruses. *Journal of Molecular Evolution*. 2006 May 22;62(5):551–63.
192. Moratorio G, Iriarte A, Moreno P, Musto H, Cristina J. A detailed comparative analysis on the overall codon usage patterns in West Nile virus. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013 Mar;14:396–400.
193. de Fabritus L, Nougairède A, Aubry F, Gould EA, de Lamballerie X. Attenuation of Tick-Borne Encephalitis Virus Using Large-Scale Random Codon Re-encoding. *PLoS Pathogens*. 2015 Mar 1;11(3):1–19.
194. Nogales A, Baker SF, Ortiz-Riano E, Dewhurst S, Topham DJ, Martinez-Sobrido L. Influenza A Virus Attenuation by Codon Deoptimization of the NS Gene for Vaccine Development. *Journal of Virology*. 2014 Sep 15;88(18):10525–40.

195. Shen SH, Stauff CB, Gorbatshevych O, Song Y, Ward CB, Yurovsky A, et al. Large-scale recoding of an arbovirus genome to rebalance its insect versus mammalian preference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 14;112(15):4749–54.
196. Nougairede A, de Fabritus L, Aubry F, Gould EA, Holmes EC, de Lamballerie X. Random Codon Re-encoding Induces Stable Reduction of Replicative Fitness of Chikungunya Virus in Primate and Mosquito Cells. *PLoS Pathogens*. 2013 Feb;9(2).
197. Wang B, Yang C, Tekes G, Mueller S, Paul A, Whelan SPJ, et al. Recoding of the Vesicular Stomatitis Virus L Gene by Computer-Aided Design Provides a Live, Attenuated Vaccine Candidate. *mBio*. 2015 May;6(2).
198. Coleman JR, Papamichail D, Skiena S, Fitcher B, Wimmer E, Mueller S. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science (1979)*. 2008 Jun 27;320(5884):1784–7.
199. Wang B, Yang C, Tekes G, Mueller S, Paul A, Whelan SPJ, et al. Recoding of the Vesicular Stomatitis Virus L Gene by Computer-Aided Design Provides a Live, Attenuated Vaccine Candidate. *mBio*. 2015 May;6(2).
200. Nouën C le, Brock LG, Luongo C, McCarty T, Yang L, Mehedi M, et al. Attenuation of human respiratory syncytial virus by genome-scale codon-pair deoptimization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(36):13169–74.
201. Wimmer E, Paul A v. Synthetic Poliovirus and Other Designer Viruses: What Have We Learned from Them? *Annual Review of Microbiology*. 2011 Oct 13;65(1):583–609.
202. Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nature Genetics*. 1997 May;16(1):19–27.
203. de Mello IS, Fernandes DR, Furtado ND, dos Santos AAC, dos Santos MP, Ribeiro IP, et al. Recovery of Synthetic Zika Virus Based on Rio-U1 Isolate Using a Genetically Stable Two Plasmid System and cDNA Amplification. *Frontiers in Microbiology*. 2021 Feb 24;12.
204. Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Animal*. 2005 Oct;34(9):39–43.
205. Yun S-I, Song B-H, Frank JC, Julander JG, Polejaeva IA, Davies CJ, et al. Complete Genome Sequences of Three Historically Important, Spatiotemporally Distinct, and Genetically Divergent Strains of Zika Virus: MR-766, P6-740, and PRVABC-59. *Genome Announcements*. 2016 Aug 25;4(4).
206. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994;22(22):4673–80.
207. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021 Jun 25;38(7):3022–7.
208. Aliota MT, Caine EA, Walker EC, Larkin KE, Camacho E, Osorio JE. Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016 Apr 19;10(4).

209. Pan American Health Organization, World Health Organization. Zika Epidemiological Update: Dengue, chikungunya and Zika in the context of COVID-19 [Internet]. Washington, D.C.; 2021 Dec [cited 2022 Jan 4]. Available from: https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/2021-DEC-Epi%20Update_Dengue%2C%20chikungunya%20and%20Zika_COVID_EN.pdf
210. Morin CW, Comrie AC, Ernst K. Climate and Dengue Transmission: Evidence and Implications. *Environmental Health Perspectives*. 2013 Nov;121(11–12):1264–72.
211. Paz S, Semenza JC. El Niño and climate change—contributing factors in the dispersal of Zika virus in the Americas? *The Lancet*. 2016 Feb;387(10020):745.
212. World Health Organization. Global Strategy to Eliminate Yellow Fever Epidemics (EYE) [Internet]. 2016 Sep [cited 2022 Jan 8]. Available from: https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2016/october/2_EYE_Strategy.pdf
213. Caires-Júnior LC, Goulart E, Melo US, Araujo BHS, Alvizi L, Soares-Schanoski A, et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nature Communications*. 2018 Dec 2;9(1):475.
214. Rodriguez-Barraquer I, Costa F, Nascimento EJM, Nery N, Castanha PMS, Sacramento GA, et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. *Science (1979)*. 2019 Feb 8;363(6427):607–10.
215. Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenço-de-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Scientific Reports*. 2017 Dec 7;7(1):7385.
216. Jagger BW, Dowd KA, Chen RE, Desai P, Foreman B, Burgomaster KE, et al. Protective Efficacy of Nucleic Acid Vaccines Against Transmission of Zika Virus during Pregnancy in Mice. *Journal of Infectious Diseases*. 2019 Oct 8;220(10):1577–88.
217. Hegde NR, Gore MM. Japanese encephalitis vaccines: Immunogenicity, protective efficacy, effectiveness, and impact on the burden of disease. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2017 Jun 3;13(6):1320–37.
218. Beck AS, Barrett AD. Current status and future prospects of yellow fever vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2015 Nov 2;14(11):1479–92.
219. Racaniello VR, Baltimore D. Cloned Poliovirus Complementary DNA Is Infectious in Mammalian Cells. *Science (1979)*. 1981 Nov 20;214(4523):916–9.
220. Tierney MB, Lamour KH. An Introduction to Reverse Genetic Tools for Investigating Gene Function. *The Plant Health Instructor*. 2005;
221. Bonaldo MC, Garratt RC, Caufour PS, Freire MS, Rodrigues MM, Nussenzweig RS, et al. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus 17D. Edited by J. Karn. *Journal of Molecular Biology*. 2002 Jan;315(4):873–85.
222. Bonaldo MC, Garratt RC, Marchevsky RS, Coutinho ESF, Jabor AV, Almeida LFC, et al. Attenuation of Recombinant Yellow Fever 17D Viruses Expressing Foreign Protein Epitopes at the Surface. *Journal of Virology*. 2005 Jul;79(13):8602–13.
223. Caufour PS, Motta MCA, Yamamura AMY, Vazquez S, Ferreira II, Jabor AV, et al. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Research*. 2001 Nov;79(1–2):1–14.

224. Aubry F, Nougairède A, Gould EA, de Lamballerie X. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective. *Antiviral Research*. 2015 Feb;114:67–85.
225. Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. Development of a Live Attenuated Dengue Virus Vaccine Using Reverse Genetics. *Viral Immunology*. 2006 Mar;19(1):10–32.
226. EPICENTRE. CopyControl™ Fosmid Library Production Kit with pCC1FOS™ Vector CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS™ Vector [Internet]. Lucigen. [cited 2022 Feb 1]. Available from: <https://www.lucigen.com/docs/manuals/MA171E-CopyControl-Fosmid-library-production-kits.pdf>
227. Gritsun TS, Gould EA. Infectious Transcripts of Tick-Borne Encephalitis Virus, Generated in Days by RT-PCR. Vol. 214, *VIROLOGY*. 1995.
228. Edmonds J, van Grinsven E, Prow N, Bosco-Lauth A, Brault AC, Bowen RA, et al. A Novel Bacterium-Free Method for Generation of Flavivirus Infectious DNA by Circular Polymerase Extension Reaction Allows Accurate Recapitulation of Viral Heterogeneity. *Journal of Virology*. 2013 Feb 15;87(4):2367–72.
229. Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol*. 1989 Dec;1(3):285–96.
230. Zhao Z, Date T, Li Y, Kato T, Miyamoto M, Yasui K, et al. Characterization of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus by using a stable, full-length, infectious cDNA clone. *Journal of General Virology*. 2005 Aug 1;86(8):2209–20.
231. Shi P-Y, Tilgner M, Lo MK, Kent KA, Bernard KA. Infectious cDNA Clone of the Epidemic West Nile Virus from New York City. *Journal of Virology*. 2002 Jun 15;76(12):5847–56.
232. Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM de, Barbosa da Silva KA, Castro MG de, et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016 Sep 6;10(9):e0004993.
233. Magnani DM, Rogers TF, Maness NJ, Grubaugh ND, Beutler N, Bailey VK, et al. Fetal demise and failed antibody therapy during Zika virus infection of pregnant macaques. *Nature Communications*. 2018 Dec 24;9(1):1624.
234. Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijkman N, Rice CM, Spaan WJM. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *Journal of General Virology*. 2003 May 1;84(5):1261–8.
235. Yamshchikov V, Mishin V, Cominelli F. A new strategy in design of (+)RNA virus infectious clones enabling their stable propagation in *E. coli*. *Virology*. 2001 Mar 15;281(2):272–80.
236. Widman DG, Young E, Yount BL, Plante KS, Gallichotte EN, Carbaugh DL, et al. A reverse genetics platform that spans the Zika virus family tree. *mBio*. 2017 Mar 1;8(2).
237. D’Ortenzio E, Matheron S, de Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G, Maquart M, et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *New England Journal of Medicine*. 2016 Jun 2;374(22):2195–8.

238. Sheridan MA, Yunusov D, Balaraman V, Alexenko AP, Yabe S, Verjovski-Almeida S, et al. Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 Feb 28;114(9):E1587–96.
239. Aliota MT, Dudley DM, Newman CM, Mohr EL, Gellerup DD, Breitbach ME, et al. Heterologous Protection against Asian Zika Virus Challenge in Rhesus Macaques. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016 Dec 2;10(12):e0005168.
240. Rayner J, Kalkeri R, Goebel S, Cai Z, Green B, Lin S, et al. Comparative Pathogenesis of Asian and African-Lineage Zika Virus in Indian Rhesus Macaque's and Development of a Non-Human Primate Model Suitable for the Evaluation of New Drugs and Vaccines. *Viruses*. 2018 May 1;10(5):229.
241. Liu S, DeLalio LJ, Isakson BE, Wang TT. AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. *Circulation Research*. 2016 Nov 11;119(11):1183–9.
242. Willard K, Demakovskiy L, Tesla B, Goodfellow F, Stice S, Murdock C, et al. Zika Virus Exhibits Lineage-Specific Phenotypes in Cell Culture, in *Aedes aegypti* Mosquitoes, and in an Embryo Model. *Viruses*. 2017 Dec 16;9(12):383.
243. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, Diallo M, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014 Jan 9;8(1):e2636.
244. Simonin Y, van Riel D, van de Perre P, Rockx B, Salinas S. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017 Sep 21;11(9):e0005821.
245. Aubry F, Jacobs S, Darmuzey M, Lequime S, Delang L, Fontaine A, et al. Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. *Nature Communications*. 2021 Dec 10;12(1):916.
246. Garcia R, Marchette NJ, Rudnick A. Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia *. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1969 May 1;18(3):411–5.
247. Halstead SB, Marchette NJ. Biologic properties of Dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: Studies at the University of Hawaii. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003 Dec 1;69(6_suppl):5–11.
248. Dubes GR. Differences among strains of poliomyelitis viruses in plaque size on monkey kidney cells. *Virology*. 1956 Apr;2(2):284–8.
249. Kanda Y, Melnick JL. In vitro differentiation of virulent and attenuated polioviruses by their growth characteristics on MS Cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1959 Jan 1;109(1):9–24.
250. Bhamarapravati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. 2000 Mar;18:44–7.
251. Kanesa-thasan N, Sun W, Kim-Ahn G, van Albert S, Putnak JR, King A, et al. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine*. 2001 Apr;19(23–24):3179–88.
252. Plotkin SA, Furukawa T, Zygraich N, Huygelen C. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infection and Immunity*. 1975 Sep;12(3):521–7.

253. Goh KCM, Tang CK, Norton DC, Gan ES, Tan HC, Sun B, et al. Molecular determinants of plaque size as an indicator of dengue virus attenuation. *Scientific Reports*. 2016 Sep 17;6(1):26100.
254. Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, Muruato AE, Hanley KA, Auguste AJ, et al. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016 Jun 1;94(6):1362–9.
255. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-Dependent Immunity Is Essential for Resistance to Primary Dengue Virus Infection in Mice, Whereas T- and B-Cell-Dependent Immunity Are Less Critical. *Journal of Virology*. 2004 Mar 15;78(6):2701–10.
256. Thibodeaux BA, Garbino NC, Liss NM, Piper J, Blair CD, Roehrig JT. A small animal peripheral challenge model of yellow fever using interferon-receptor deficient mice and the 17D-204 vaccine strain. *Vaccine*. 2012 May;30(21):3180–7.
257. Morrison TE, Diamond MS. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. *Journal of Virology*. 2017 Apr 15;91(8).
258. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host & Microbe*. 2016 Jun;19(6):882–90.
259. Martín A, Bertranpetit J, Oliver JL, Medina JR. Variation in G+C-content and codon choice: differences among synonymous codon groups in vertebrate genes. *Nucleic Acids Research*. 1989;17(15):6181–9.
260. Burns CC, Shaw J, Campagnoli R, Jorba J, Vincent A, Quay J, et al. Modulation of Poliovirus Replicative Fitness in HeLa Cells by Deoptimization of Synonymous Codon Usage in the Capsid Region. *Journal of Virology*. 2006 Apr;80(7):3259–72.
261. Butt AM, Nasrullah I, Tong Y. Genome-Wide Analysis of Codon Usage and Influencing Factors in Chikungunya Viruses. *PLoS ONE*. 2014 Mar 4;9(3):e90905.
262. Xie X, Zou J, Wang Q-Y, Shi P-Y. Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral Research*. 2015 Jun;118:39–45.
263. Nogales A, Baker SF, Ortiz-Riaño E, Dewhurst S, Topham DJ, Martínez-Sobrido L. Influenza A Virus Attenuation by Codon Deoptimization of the NS Gene for Vaccine Development. *Journal of Virology*. 2014 Sep 15;88(18):10525–40.
264. le Nouën C, Brock LG, Luongo C, McCarty T, Yang L, Mehedi M, et al. Attenuation of human respiratory syncytial virus by genome-scale codon-pair deoptimization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Sep 9;111(36):13169–74.
265. Martrus G, Nevot M, Andres C, Clotet B, Martinez MA. Changes in codon-pair bias of human immunodeficiency virus type 1 have profound effects on virus replication in cell culture. *Retrovirology*. 2013 Dec 25;10(1):78.
266. Ni Y-Y, Zhao Z, Opriessnig T, Subramaniam S, Zhou L, Cao D, et al. Computer-aided codon-pairs deoptimization of the major envelope GP5 gene attenuates porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*. 2014 Feb;450–451:132–9.
267. Buchan JR. tRNA properties help shape codon pair preferences in open reading frames. *Nucleic Acids Research*. 2006 Feb 6;34(3):1015–27.

268. Irwin B, Heck JD, Hatfield GW. Codon Pair Utilization Biases Influence Translational Elongation Step Times. *Journal of Biological Chemistry*. 1995 Sep;270(39):22801–6.
269. Salvo MA, Kingstad-Bakke B, Salas-Quinchucua C, Camacho E, Osorio JE. Zika virus like particles elicit protective antibodies in mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018 Feb 5;12(2):e0006210.
270. Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, et al. A Protective Role for Dengue Virus-Specific CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*. 2009 Apr 15;182(8):4865–73.
271. Yauch LE, Prestwood TR, May MM, Morar MM, Zellweger RM, Peters B, et al. CD4⁺ T Cells Are Not Required for the Induction of Dengue Virus-Specific CD8⁺ T Cell or Antibody Responses but Contribute to Protection after Vaccination. *The Journal of Immunology*. 2010 Nov 1;185(9):5405–16.
272. Fuchs J, Chu H, O'Day P, Pyles R, Bourne N, Das SC, et al. Investigating the efficacy of monovalent and tetravalent dengue vaccine formulations against DENV-4 challenge in AG129 mice. *Vaccine*. 2014 Nov;32(48):6537–43.
273. Mueller S, Coleman JR, Papamichail D, Ward CB, Nimnual A, Futcher B, et al. Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design. *Nature Biotechnology*. 2010;28(7):723–6.
274. Clem A. Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2011;3(1):73.

ANEXO I

Artigo publicado:

Recovery of synthetic Zika virus based on Rio-U1 isolate using a genetically stable two plasmid system and cDNA amplification

Esse artigo está relacionado à parte 1 dos objetivos desta tese.



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

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

OPEN ACCESS

Edited by:

Suh-Chin Wu,
National Tsing Hua University, Taiwan

Reviewed by:

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

*Correspondence:

Myrna Cristina Bonaldo
mbonaldo@ioc.fiocruz.br

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

Specialty section:

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

Received: 09 December 2020

Accepted: 01 February 2021

Published: 24 February 2021

Citation:

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

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

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

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

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

INTRODUCTION

Flaviviruses are the most critical arthropod-borne viruses and are of worldwide clinical concern (Chong et al., 2019; Pierson and Diamond, 2020). Zika virus (ZIKV, family Flaviviridae, genus *Flavivirus*) was associated with a massive outbreak of a febrile illness spread throughout the Americas (Kindhauser et al., 2016). It became a global public concern due to the correlation of the ZIKV epidemic with severe diseases, such as congenital syndrome in neonates and Guillain-Barré syndrome in adults (Sips et al., 2012; Costello et al., 2016; Rasmussen et al., 2016; Pierson and Diamond, 2018).

The ZIKV is mainly transmitted by *Aedes* sp. mosquitoes (Musso and Gubler, 2016). Furthermore, non-vector transmission through sexual contact or vertical routes from infected mothers have also been reported (Musso et al., 2015; Cao et al., 2017), posing new challenges for controlling outbreaks caused by this virus. To date, there is no effective licensed vaccine or antiviral treatment against ZIKV infection (Shan et al., 2018; Bernatchez et al., 2019).

The viral genome is a positive single-stranded RNA approximately 11 kb in length, encoding 3,423 amino acids. There are two untranslated regions at each genome end (5' and 3' UTRs) and a single open reading frame. The viral RNA is translated into a precursor polyprotein, which is cleaved co- and post-translationally into three structural proteins (C, prM/M, and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) (Kuno and Chang, 2007; Musso and Gubler, 2016).

The availability of genetic tools for studying viruses, such as infectious cDNA clones, allows for assessing genetic factors related to viral pathogenesis, immune response, and viral evolution. The use of infectious clones allows the development of effective vaccines and antiviral therapeutics (Weger-Lucarelli et al., 2017b; Avila-Perez et al., 2020).

Reverse genetics is a powerful method for studying the viral replication of RNA viruses and has been widely used for positive-stranded RNA viruses, such as Flaviviruses (Ruggli and Rice, 1999; Stobart and Moore, 2014). However, the instability of full-length flavivirus cDNA in *Escherichia coli* has been a significant hurdle in attempting to construct infectious clones due to active prokaryotic cryptic promoters present in their genomes (Pu et al., 2011). Several strategies have been developed to overcome this problem, including splitting the genome into different plasmids (Rice et al., 1989) and using low-copy number vectors (Shan et al., 2016; Shan et al., 2017a).

Based on our previous experience with the vaccine YFV-17D infectious clone (Bonaldo et al., 2002, 2007; Nogueira et al., 2011; de Santana et al., 2014), we designed a similar strategy splitting the genome into two stable plasmid subclones, with subsequent assembly and viral regeneration in Vero cells. However, to mitigate toxicity and reach recombinant plasmid genetic stability, we constructed them utilizing a low-copy number vector (pCC1). In a further step, we performed the polymerase chain reaction (PCR) to increase the amount of viral cDNA and recover a high-quality template for *in vitro* transcription. The strategy for developing a ZIKV infectious cDNA clone designed in this study

was successful, yielding a replicative and efficient clone-derived virus with high similarities with its parental virus, Rio-U1. These results expand the potential use of reverse genetic systems and open the possibility of employing similar approaches for other flaviviruses, which could be a suitable platform for studying viral determinants of pathogenesis, virulence, and viral attenuation, facilitating the design of vaccines and therapeutics.

MATERIALS AND METHODS

Cells

The African green monkey kidney (Vero) cell line (ATCC-CCL81) was grown at 37 °C, under an atmosphere containing 5% CO₂, in Earle's 199 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and 40 µg/ml of gentamicin. *Aedes albopictus* cell line (C6/36) was generously provided by Anna-Bella Failloux (Institut Pasteur, France) and was grown at 28 °C, in Leibovitz's L-15 medium (Gibco), supplemented with 5% FBS and 10% Tryptose broth.

ZIKV Isolate and Synthetic cDNA Fragments

The ZIKV strain Rio-U1 (GenBank accession number: KU926309) was isolated in Rio de Janeiro, Brazil, in 2016 from a human patient's urine sample (Bonaldo et al., 2016). The ZIKV cDNA was synthesized in four fragments (GenScript). Fragments Z1, Z2, and Z4 were cloned into a high-copy plasmid pUC57 while fragment Z3 was cloned into a derivative of the low-copy plasmid pCC1-Fos (Epicenter). pCC1 is based on a previously developed technology (Carson et al., 1973). It is a single copy plasmid usually under control of the *E. coli* F factor single-copy origin of replication. But in the presence of an inductor (L-arabinose) the initiation of replication from high-copy oriV origin occurs, which requires the *trfA* gene product supplied by the *E. coli* cells. All fragments encompassed the entire genome of the ZIKV Rio-U1, with overlapping regions at their ends. To ensure a seamless assembly of the full-length cDNA, we engineered silent mutations to introduce restriction cleavage sites at both ends of each synthetic fragment.

Infectious Clone Construction

To construct the ZIKV infectious clone utilizing the two-plasmid system approach, the fused fragments bearing either the extremities or the center of the viral genome were cloned into pCC1 plasmid by modification of pCC1-Z3. *E. coli* strain TransformMax EPI300 (Epicenter) was used to propagate the plasmids. The two plasmids constructed were the pCC1-Z3Z4 encoding the central part of the ZIKV genome (genome regions: Z3, from 2,002 to 4,776 and, Z4, from 4,777 to 8,843), and pCC1-MCS-Z1Z2 (genome regions: Z1, from 1 to 2,001 and, Z2, from 8,844 to 10,807) carrying the 5' and 3' ends of the viral genome (Table 1). To assemble these plasmids, we digested individual cDNA plasmids with specific restriction endonucleases, excised DNA fragment from 0.8% agarose gel/TAE after electrophoresis, followed by purification using QIAquick Gel Extraction Kit

TABLE 1 | ZIKV cDNA fragments spanning the whole viral genome used in viral template assembly.

cDNA fragment (genomic position)	Initial cloning vector	pCC1-MCS-Z1Z2 (genomic position)	pCC1-Z3Z4 (genomic position)	Template (genomic position)	Cloning sites
Z1 (1–2,047)	pUC57	1–2,001	–	1–2,001	<i>NotI</i> – <i>KpnI</i>
Z3 (1,653–4,793)	pCC1-4K	–	2,002–4,776	2,002–4,776	<i>KpnI</i> – <i>BamHI</i>
Z4 (4,581–8,855)	pUC57	–	4,777–8,843	4,777–8,843	<i>BamHI</i> – <i>MluI</i>
Z2 (8,844–10,807)	pUC57	8,844–10,807	–	8,844–10,807	<i>MluI</i> – <i>XhoI</i>

(Qiagen). Fragment Z4 was excised from pUC57 plasmid by cleaving with the restriction enzymes *KpnI* and *BamHI*, cloned into the likewise *KpnI/BamHI* digested pCC1-Z3 plasmid, generating the pCC1-Z3Z4 plasmid. To assemble the pCC1-MCS-Z1Z2 plasmid, pCC1-Z3 plasmid was treated with the restriction enzymes *NotI* and *NsiI* to replace the fragment Z3 with a polylinker sequence (Supplementary Figure 1), which has the complementary restriction sites at the ends. This replacement originated a new vector named pCC1-MCS (pCC1+ multiple cloning site). Then, Z1 and Z2 were excised from pUC57 plasmid with *NotI/KpnI* and *MluI/XhoI* cleavages, respectively, cloned into pCC1-MCS, and also digested with *NotI/KpnI* and *MluI/XhoI* one after the other (Figure 1). The sequence of each constructed plasmid was validated by DNA sequencing before it was used in subsequent steps. The Z3Z4 fragment and the entire pCC1-MCS-Z1Z2 were amplified by PCR using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) and primer pairs 1 and 2 (Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 2). Both amplicons obtained by PCR were digested with *KpnI* and *MluI* restriction enzymes. After cleavage, the fragments were gel purified, as described above. The isolated fragments were ligated, yielding the full-length ZIKV cDNA in pCC1 plasmid, followed by linearization using restriction enzyme *XhoI*, generating the 3' end of the ZIKV intermediate template (Supplementary Figure 2). The complete ZIKV cDNA template was amplified using PrimeStar GXL DNA polymerase (Takara) and primer pair 3, allowing to increase the template mass for the transcription to obtain the viral RNA, and also adding the nucleotide T at the 3' end (previously removed by the *XhoI* cleavage) (Supplementary Figure 2).

In vitro Transcription and Cell Transfection

The final amplicon containing the full-length ZIKV cDNA was purified by precipitation with ethanol and 10% ammonium acetate (3M) and resuspended in 8 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 8.5. The mMMESSAGE mMACHINE SP6 transcription kit (Ambion) was used to transcribe the viral cDNA template in a 20 μ l reaction. The reaction mixture was incubated at 37°C for 2 h, followed by the addition of 2 U TURBO DNase (Ambion). The synthetic RNA was quantified using Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Subsequently, 2 μ g of transcribed RNA was electroporated into 1 x 10⁶ Vero cells in 4 mm cuvettes with the GenePulserXcell (Bio-Rad) at settings of 200 V and 850 μ F, pulsing one time. After electroporation, the transfected cells were seeded in a T-25 flask with 12 ml of Earle's 199 medium (Gibco) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS)

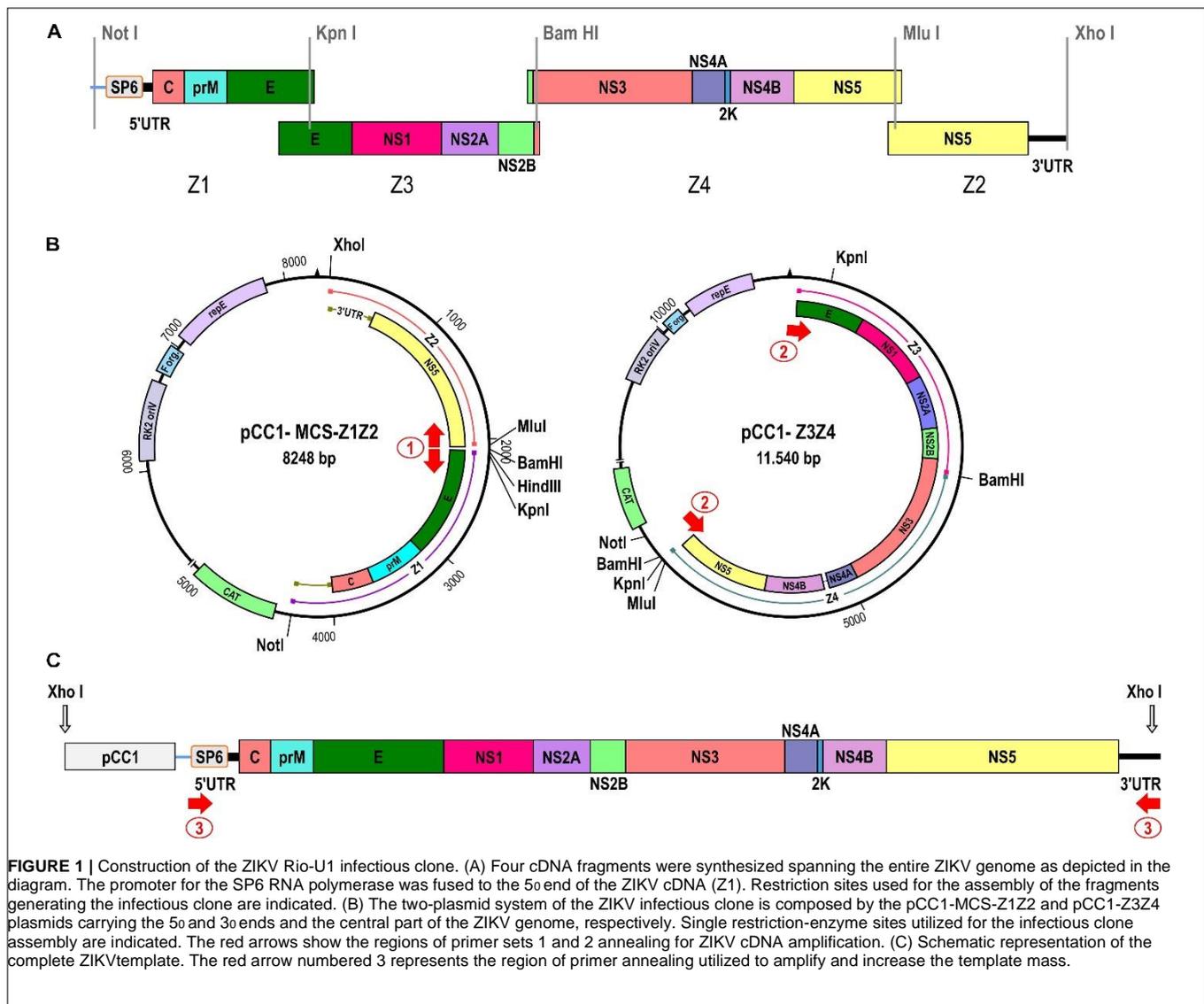
(Gibco), 5% sodium bicarbonate and 40 mg/ml gentamicin, followed by incubation at 37°C and 5% CO₂. The cells were daily monitored for cytopathic effect (CPE). The viral recovery was confirmed by RT-PCR utilizing the primer set ZK2F-ZK2R (genomic region from 1,732 to 3,385; Supplementary Table 2). The distinction between Rio-U1 and the infectious clone was performed by treatment with restriction enzyme *KpnI*. The supernatant was harvested at 5 days post-transfection, clarified by centrifugation at 700 g, and stored in aliquots at -80°C. The integrity of the genome of the ZIKV IC.RioU1 was confirmed by nucleotide sequencing.

Nucleotide Sequencing Analysis

Viral RNA was extracted from culture supernatants with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations and stored at -80°C until use. The nucleotide sequencing of the full-length ZIKV genome was performed from a set of 8 overlapping amplicons obtained by RT-PCR. The primers designed for the RT-PCR and viral genome sequencing are listed in Supplementary Table 2. The cDNA was obtained by reverse transcription using the Superscript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen), followed by the amplification with GoTaq Green Master Mix (Promega) according to the manufacturer's instructions. The plasmids generated in this work were also sequenced using the same primer set. The nucleotide sequencing reactions were performed by ABI BigDye terminator V3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Mixture (Applied Biosystems). The nucleotide sequences were determined by capillary electrophoresis at the sequencing facility of Fiocruz-RJ (RPT01A -Sequenciamento de DNA- RJ). The sequences were assembled using the SeqMan Pro version 8.1.5 (DNASTAR, Inc.).

Indirect Immunofluorescence Assay

The expression of the ZIKV envelope (E) protein was analyzed by indirect immunofluorescence assay (IFA). Vero cells were seeded at a density of 30,000 cells/cm² in 8-well glass slides (Lab-Tek Chamber Slide System -Nunc) and incubated at 37°C with 5% CO₂ overnight. Cells were infected with 100 μ l of the recombinant or parental virus at MOI of 0.02. After 1 h at 37°C with 5% CO₂, the inoculum was removed, and 300 μ l of supplemented Earle's 199 medium was added to the cells. After 72 h of incubation, cells were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde solution for 10 min at room temperature. After three washing steps with PBS, the cells were permeabilized with 0.5% Triton-X100 in PBS for 15 min and then incubated for 10 min with blocking buffer (1% BSA in



PBS) at room temperature. The cells were incubated with the primary antibody 4G2 (3 mg/ml- Biomanguinhos) diluted 1: 1000 in blocking solution for 1 h at room temperature. After washing with PBS, the secondary antibody (IgG against mouse coupled to Alexa Fluor 546 - Molecular Probes) was added at the 1: 500 dilution in blocking buffer. Finally, the slides were mounted in a medium with SlowFade Antifade DAPI (Molecular Probes). Fluorescence analyses were performed initially on the IX51 inverted microscope (Olympus), and images were acquired through the DP Controller program and viewed through the DPManager program (DP-BSW v3.1 - Olympus).

Plaque Morphology Assays

The plaque phenotypes of infectious clone and parental ZIKV were compared by plaque size and immunofocus assays. In the plaque size assay, Vero cells were seeded at a density of 50,000 cells/cm² in six-well plates. After 24 h, the medium was replaced with 200 μ l of 10-fold serial dilutions of each virus for 1 h at 3°C with 5% CO₂. Viral inocula were removed and

replaced with 3 ml of fresh supplemented Earle's 199 medium containing 0.5% of agarose (Invitrogen). After 5 days of incubation at 37°C with 5% CO₂, cells were fixed with 10% formaldehyde, washed, and stained with 0.4% violet crystal to visualize plaques. Images of the plates were acquired, and plaque sizes were measured using ImageJ software. The plaque areas' means and standard errors were calculated. Differences in plaque areas' means were analyzed using the unpaired *t*-test (Two-tailed).

We performed the immunofocus assay as described elsewhere (Magnani *et al.*, 2017). Vero cells seeded at a density of 30,000 cells/well in 96-well plates were infected with 10-fold serial dilutions of the viruses in supplemented Earle's 199 medium. Inocula were removed after viral adsorption. Then, cell monolayers were overlaid with 150 μ l of the same viral growth medium containing 1% CMC (carboxymethyl cellulose; Gibco). After 2 days, cells were fixed with BD Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) at room temperature for 30 min, washed twice

with PBS, and treated with CytoPerm Wash (BD Biosciences) for 5 min, followed by 1 h incubation with the primary antibody 4G2. Plates were washed three times, followed by an hour-long incubation with a secondary antibody goat anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (KPL). Detection proceeded with the addition of True Blue Peroxidase Substrate (KPL), following the manufacturer's instructions. The number of foci was analyzed with a CTL Immunospot instrument. The areas of foci were measured, and the mean and standard error of the focus areas were calculated.

Viral Titration by Plaque Assay

Virus titers were determined by plaque assay. Vero cells were seeded at a density of 50,000 cells/cm² in 24-well plates 24 h before inoculation. In brief, 100 μ l of 10-fold serial dilutions of the virus samples were added to the monolayer of Vero cells. After incubation for 1 h at 37 °C with 5% CO₂, the inoculum was removed and replaced by 1 ml of 2.4% CMC in supplemented Earle's 199 medium. After 7 days of incubation, cells were fixed with 10% formaldehyde, washed, and stained with 0.4% violet crystal for plaque visualization.

Viral Proliferation Studies

Vero and C6/36 cells were seeded at a density of 40,000 cells/cm² and 80,000 cells/cm² in T-25 flasks, respectively, 24 h before infection. Parental and synthetic viral stocks were diluted in supplemented Earle's 199 medium for Vero cells or supplemented Leibovitz's L-15 medium for C6/36 cells. 1 ml of virus inoculum at MOI 0.02 was added to each flask incubated for 1 h at 37 °C with 5% CO₂ for Vero cells, and 28°C for C6/36 cells. After that, the inoculum was removed, and the appropriate culture medium was added to the cell monolayer. Culture supernatant was harvested every 24 h until 5 days post-infection, and the virus was titrated on Vero cells by plaque assay.

Mouse Infection

AG129 mice (deficient in IFN- α/β and IFN- γ receptors) were obtained from the Institute of Science and Technology in Biomodels (ICTB, Fiocruz). The animals were bred and maintained under specific pathogen-free conditions. The study was carried out in strict accordance with the Guide of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments (CEUA) of the Oswaldo Cruz Foundation (Permit Number: L-034/19). Groups of 6- to 8-week-old mixed-sex mice were infected by the ZIKV Rio-U1 isolate and the infectious clone IC.RioU1. Animals were infected in both footpads with 1 x 10⁴ plaque-forming units (PFU) in 60 μ l (30 μ l/footpad). Mock-infected mice received diluent medium (Earle's 199 medium supplemented with 25 mM HEPES). The animals were monitored twice daily for 2 weeks. Submandibular blood withdrawals were performed every 2 days to monitor viremia. For both groups, mice were euthanized when severe clinical evidence of disease were observed accordingly to the signs of morbidity described in the **Supplementary Table 3**. The evaluated symptoms included difficulty in locomotion, hunched stance, ruffled fur, aggressiveness, tremors, dyspnea or tachypnea,

and weight loss. The final blood collection was obtained by cardiac puncture while the mouse was under deep anesthesia followed by cervical dislocation. Surviving mice were euthanized 14 days after infection. Average survival time (AST), percent of mortality, clinical scores, and weight variations were calculated.

Mouse Brain Histopathology

Brains of Mock, Rio-U1, and IC.RioU1 infected animals were collected at the time of necropsy, fixed in Carson's formalin-Millonig for 48 h (Carson *et al.*, 1973), and processed according to standard paraffin-embedded protocol. Sections of 5 μ m were stained with hematoxylin and eosin and examined microscopically under an AxioHome microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a HRC5 Axiocam digital camera (Carl Zeiss, Germany).

Viral Load of Animal Samples

For viral load determination, brain specimens and whole blood were collected in RNA (Ambion) and further extracted with RNAqueous-4PCR Total RNA Isolation Kit (Ambion) and QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), respectively. Real-time RT-qPCR was performed using TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems) in an Applied Biosystems StepOnePlus Instrument as previously described (Bonaldo *et al.*, 2016).

Statistical Analyses

All data were analyzed with GraphPad Prism 8.02 software. An unpaired Student's *t*-test (two-tailed) was used to determine significant differences in virus titers in growth kinetics, viremia, plaque size, and viral focus area. The differences were only considered significant when *p* < 0.05. For survival analysis, Kaplan–Meier survival curves were analyzed by the log-rank test (Mantel–Cox).

RESULTS

Cloning Strategy of Genomic cDNA

In this work, we describe an alternative approach to *in vitro* synthesize ZIKV. The constructed virus was based on the genome sequence of ZIKV strain Rio-U1, which was previously isolated from a urine sample of a pregnant woman (Bonaldo *et al.*, 2016). Initially, four ZIKV cDNA fragments were obtained, covering the full-length genome of the Rio-U1 strain and presenting overlapping regions at either ends (**Figure 1**). The first synthetic fragment (Z1) was designed to carry the SP6 RNA polymerase promoter directly fused to the viral 5' UTR (untranslated region) end, followed by the genomic sequences corresponding to the 5' UTR and most of the structural proteins (ZIKV genome position from 1 to 2,018). The three other synthetic fragments carry the portions of the genome encoding the remaining E protein and all the non-structural proteins that are fragment Z3 (genome position from 1,653 to 4,793), Z4 (from 4,581 to 8,855), and Z2 (from 8,832 to 10,807). Also, the fragment Z2 contains the complete 3'UTR sequence of ZIKV Rio-U1 strain. All cDNA fragments cloned into plasmid vectors (**Table 1**) include unique restriction endonuclease sites at each terminal

cDNA fragments, allowing the direct assembly of genome-length cDNA (**Figure 1A**).

We utilized the plasmid pCC1-Z3, a low-copy number plasmid, to be a start point for approaching the ZIKV Rio-U1 infectious clone. The stable infectious clone was only possible when developed in a two-plasmid system. Firstly, the plasmid encompassing the central part of the ZIKV genome (pCC1-Z3Z4) was assembled by cloning the Z4 into pCC1-Z3. This construct carries the ZIKV cDNA corresponding to the genome position from 1,653 to 8,855. The second construct brings the fragments Z1 and Z2 representing the 5' (from 1 to 2,001) and 3' (from 8,846 to 10,807) ends of the viral genome, respectively. To obtain it, we replaced the fragment Z3 with a polylinker cassette in the pCC1-Z3 plasmid, allowing the cloning of fragments Z1 and Z2, forming the plasmid pCC1-MCS-Z1Z2.

Genome Assembly and Viral Recovery

The construction of a ZIKV-infectious clone in a genetically stable two-plasmid system was reached. However, since the vector is a single copy plasmid, the mass yield is reduced after DNA extraction. The plasmidial DNA preparations carried bacterial DNA contamination associated with this limitation, hampering the subsequent genome assembly (**Supplementary Figure 2**). To improve the viral cDNA template production, we associated PCR amplifications with the sequential steps for assembling ZIKV cDNA template. It was initially afforded by PCR amplification of the entire pCC1-Z1Z2 (8,255 pb) and Z3Z4 (7,456 pb) fragments (**Figure 1B**, **Supplementary Table 2**, and **Supplementary Figure 2**). The complete viral cDNA template assembly was performed after cleavage of both amplicons with *KpnI* and *MluI*, followed by DNA ligation. After linearization with *XhoI* and amplification of the synthetic viral cDNA using the primer pair 3, the 3' cDNA end was generated (**Figure 1C** and **Supplementary Table 2**). The forward primer anneals at the SP6 promoter sequence, and the reverse primer anneals at the 3' UTR end comprising the *XhoI* restriction site and reconstituting the last genomic nucleotide T, which was excised after enzymatic digestion. The size of the template is 10,847 pb containing the ZIKV genomic cDNA of 10,807 pb (**Supplementary Table 2**).

The full-length ZIKV cDNA was transcribed *in vitro*, and 120 h after transfection in Vero cells, CPE was detected, indicating viral infection. Small round foci and many refractive cells dropping from the monolayer were visualized (**Figure 2A**). To exclude the possibility that the recovered recombinant ZIKV would consist of a contamination with the parental virus, we treated amplicons (genomic region from 1,732 to 3,385) with the restriction enzyme *KpnI*. Only IC.RioU1 virus carries the *KpnI* restriction site, which was one of the single restriction sites created in the development of the ZIKV infectious clone strategy (**Figure 1**). Digestion of IC.RioU1 amplicon generated two expected fragments of 1,385 pb and 269 pb, while in the parental amplicon we noticed only one band of 1,654 pb (**Figure 2B**). In conjunction, these results demonstrate that the described methodology is feasible to obtain viable and infectious synthetic ZIKV. Full-genome sequencing of the recovered ZIKV revealed no change other than the expected synonymous mutations

at regions that were genetically manipulated in the parental genome of ZIKV Rio-U1.

Characterization of ZIKV RioU1 Virus Infectious Clone

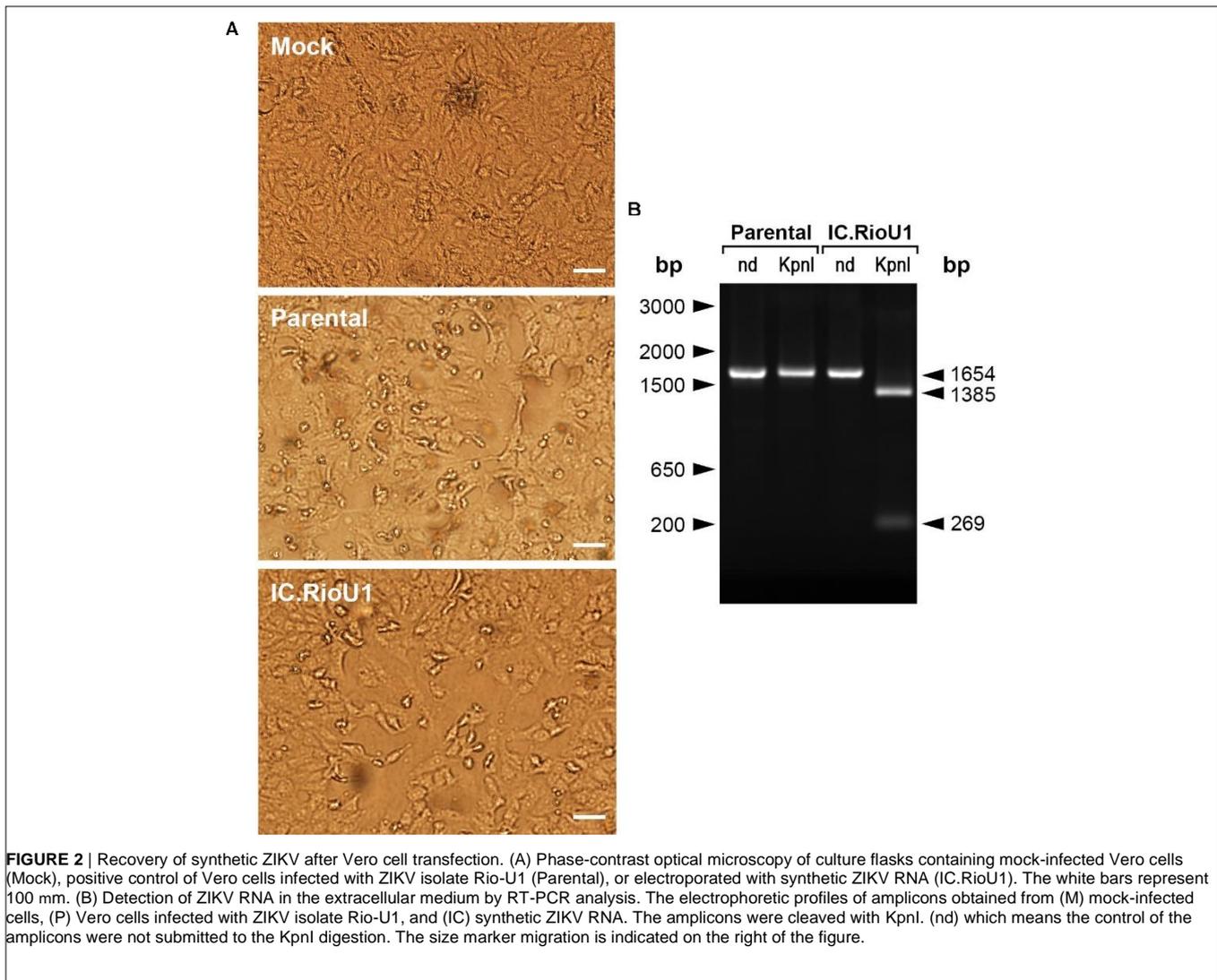
We studied how similar the recovered virus is to its parental virus since the synthetic ZIKV is a genetic clone and could not contain the genetic diversity (quasispecies) expected to be present in ZIKV isolate Rio-U1. We characterized the Vero cell infection pattern of the synthetic ZIKV compared to the parental ZIKV isolate Rio-U1. Firstly, the parental virus and the infectious clone infectivities were determined using standard plaque-forming assay on Vero cells (**Figure 3A**). Both viruses present a similar plaque size phenotype, the recovered ZIKV displaying a plaque size average of 0.34 ± 0.26 mm² and the parental counterpart of 0.51 ± 0.93 mm². There is no significant difference between the areas of both ($p = 0.097$; Unpaired *t*-Test- Two-Tailed). However, the observed standard deviation around the parental virus plaques is about three and a half times greater than in the clone, suggesting the occurrence of a more significant variation in the plaque size of the parental virus.

In addition, the formation of infectious foci in Vero cells was also compared by immunofocus assay using the pan-flavivirus 4G2 antibody against the envelope protein (**Figure 3A**). Both viruses have the same infection pattern, with a similar viral focus size average, 0.067 ± 0.024 mm², in the recovered ZIKV and 0.061 ± 0.027 mm² in parental virus (**Figure 3A**). There is no significant difference between the plaque sizes of both viruses ($p = 0.383$; Unpaired *t*-Test- Two-Tailed). The standard deviation is similar, showing that the viral infection pattern is remarkably similar between viruses.

The observed infection pattern of each virus infection was quite similar when Vero cells were infected and immunostained with the antibody 4G2 at 72 h post-infection (**Figure 3B**). Both parental and synthetic virus-infected Vero cells displayed the same pattern of perinuclear labeling. Finally, we examined the proliferation capacity in the mammalian Vero cells and the *Aedes albopictus* mosquito C6/36 cells (**Figure 3C**). The replication profile of the parental virus and its infectious clone was highly similar in both cells. In Vero cells, the viral growth peaks were reached at 72 h post-infection, with the parental virus displaying a titer of 7.37 ± 0.31 log₁₀ PFU/ml and the infectious clone, 7.09 ± 0.37 log₁₀ PFU/ml, followed by a plateau at 96 h of infection (**Figure 3C**). There is no significant difference between the viral peaks ($p = 0.367$; Unpaired *t*-Test- Two-Tailed). The proliferation in C6/36 has a different profile, with an ascending curve and peak proliferation in 120 h after infection, with parental virus presenting a titer of 6.11 ± 0.39 log₁₀ PFU/mL and the infectious clone, 5.57 ± 0.46 log₁₀ PFU/ml. Peak-viral titers in this cell did not show any significant difference ($p = 0.195$; Unpaired *t*-Test- Two-Tailed).

Virulence in AG129 Mice

We compared the virulence of the parental and recombinant ZIKV in the AG129 mouse model. Subcutaneous infection with



both viruses (10^4 PFU) led to weight loss at 6 days post-infection (dpi) (**Figure 4A**). Both groups exhibited a progressive increase in clinical score from day 5 (**Figure 4B**), with disease characterized by difficulty in locomotion, a hunched stance, aggressiveness, tremors, dyspnea/tachypnea, and weight loss. At 7 dpi, 100% mortality occurred in both groups (Parental: 7.6 ± 0.5 days and IC.RioU1 7.3 ± 0.5 days) (**Figure 4C**). There was no statistical difference in the average survival time (AST) between mice inoculated with both viruses ($p = 0.273$, Log-rank test). Weight loss data were consistent with survival data. As expected, uninfected controls did not exhibit weight loss and clinical signs of disease and survived until the end of the experimentation time.

To further explore ZIKV-induced disease, we determined viremia at days 2, 4, and 6 post-infection and at the time of death (euthanasia). The animals were euthanized when their clinical scores reached 6 as described in **Supplementary Table 3**. Both mouse groups inoculated with the parental and infectious clone viruses displayed a critical endpoint at days 7 (Parental, $n = 4$ deaths; IC.RioU1, $n = 7$ deaths) and 8 (Parental, $n = 5$ deaths;

IC.RioU1, $n = 3$ deaths). As observed in **Figure 4D**, viral load ranged from $6.8 \log_{10}$ to $9.8 \log_{10}$ viral RNA copies/ml reaching the peak of viremia at day 4 for both viruses, with no significant difference in viral titers ($p = 0.398$, Unpaired *t*-Test- Two-Tailed). Since in the AG129 mouse model of ZIKV infection, the main target organ is the brain, we measured the viral load in this tissue on the day of death, as shown in **Figure 5B**. The viral load of animals infected with the parental or infectious clone is exceptionally high, reaching a load of $14 \log_{10}$ viral copies/mg with no significant difference between the viruses ($p = 0.253$, Unpaired *t*-Test- Two-Tailed).

To better characterize the lesions provoked by the ZIKV acute infection in the brain, we proceeded with a histopathological analysis of animals infected with the parental and infectious clone. Under microscopy analysis, both viruses led to the same histopathological findings. Brains of all infected animals revealed meningoencephalitis (**Figure 5A**), exhibiting neutrophilic inflammatory infiltrate. Pycnotic and karyorrhexis nuclei were observed in extensive areas of the cortex (**Figures 6A,B**),

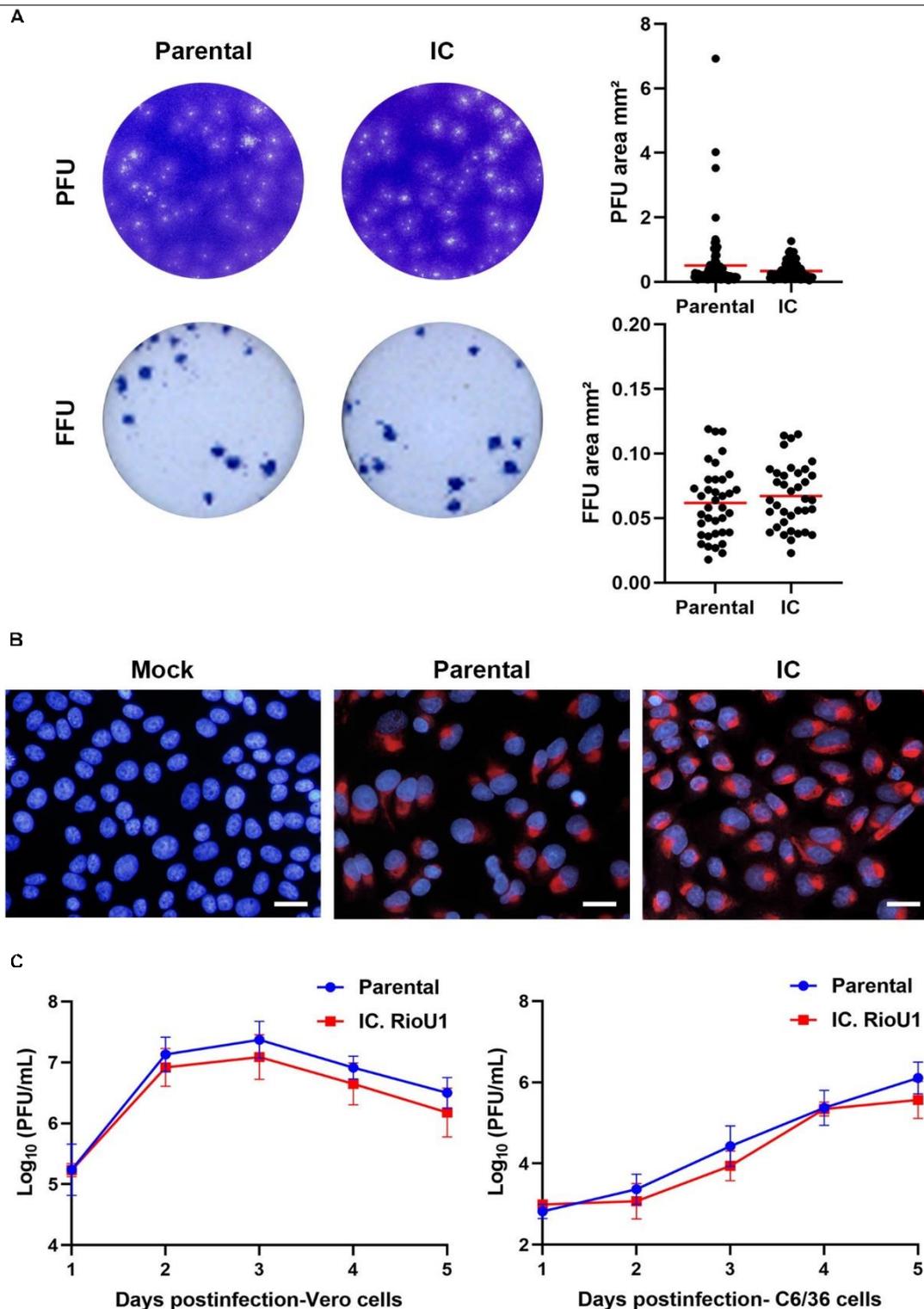


FIGURE 3 | *In vitro* characterization of IC.RioU1 virus. **(A)** Viral plaque and focus morphology of the original isolate Rio-U1 (Parental) and the recovered infectious clone (IC. RioU1). On the right, the scatter plot graphs indicating the individual values for plaque and focus size. Red bars represent the mean of the data sample. **(B)** ZIKV E protein detection after 72 h of Vero cell infection with the parental and IC.RioU1. Infected cells were fixed and processed for immunolabeling with the pan flavivirus antibody 4G2 (red) and staining cell nuclei with DAPI (blue) White bars indicate 100 μ m. **(C)** Comparative studies of replication kinetics of the ZIKV isolate Rio-U1 and the infectious clone counterpart. Mammal Vero cells and mosquito C6/36 cells were infected with the parental and IC.RioU1 ZIKV at MOI of 0.02. Supernatants from infected cells were collected at indicated times post-infection and titers were determined by plaque assay. Each time point represents the mean \pm SD of three independent experiments. No significant statistical difference was observed between both viruses (Unpaired *T*-test, Two tailed, $p > 0.05$).

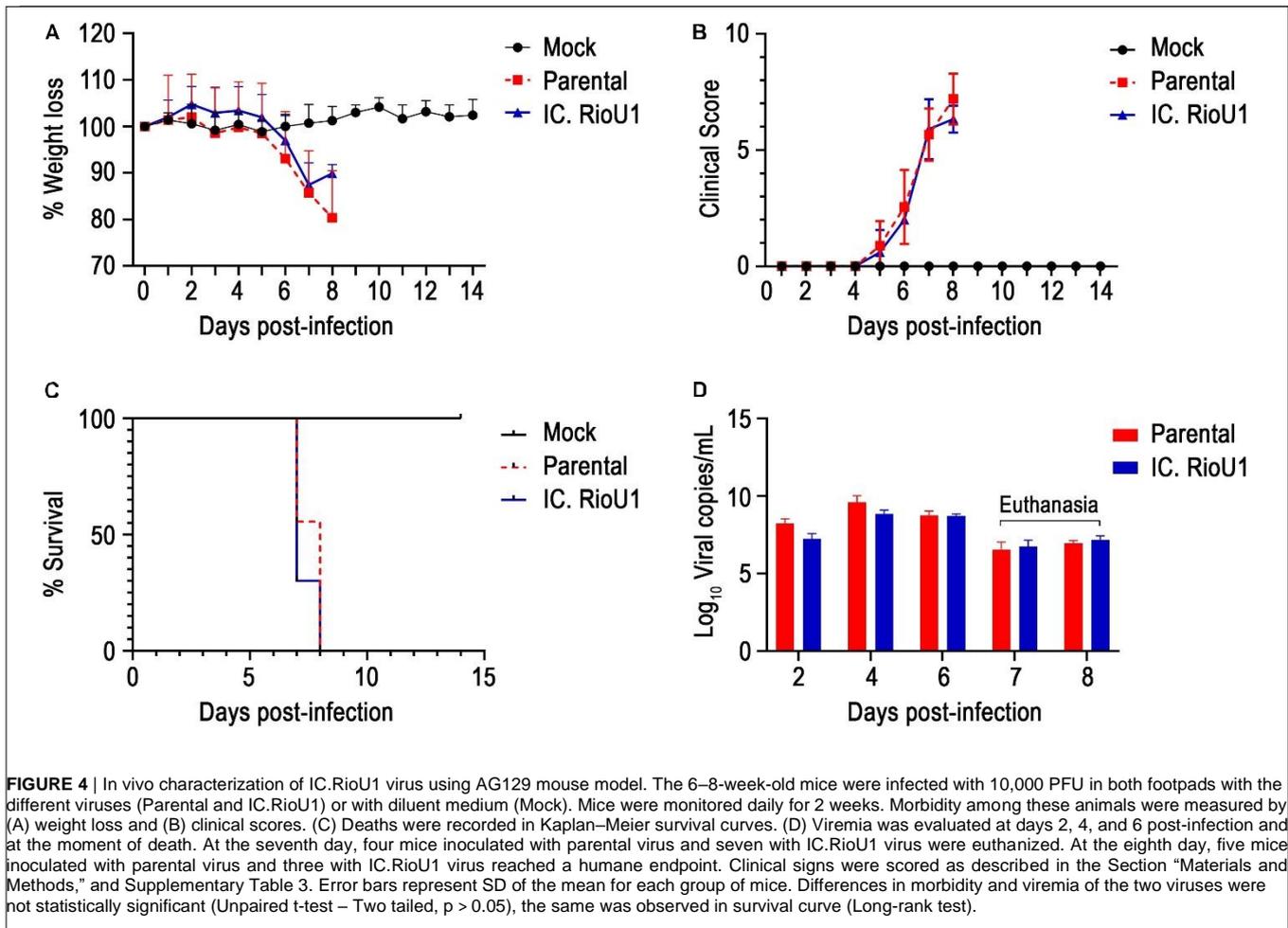


FIGURE 4 | In vivo characterization of IC.RioU1 virus using AG129 mouse model. The 6–8-week-old mice were infected with 10,000 PFU in both footpads with the different viruses (Parental and IC.RioU1) or with diluent medium (Mock). Mice were monitored daily for 2 weeks. Morbidity among these animals were measured by (A) weight loss and (B) clinical scores. (C) Deaths were recorded in Kaplan–Meier survival curves. (D) Viremia was evaluated at days 2, 4, and 6 post-infection and at the moment of death. At the seventh day, four mice inoculated with parental virus and seven with IC.RioU1 virus were euthanized. At the eighth day, five mice inoculated with parental virus and three with IC.RioU1 virus reached a humane endpoint. Clinical signs were scored as described in the Section “Materials and Methods,” and Supplementary Table 3. Error bars represent SD of the mean for each group of mice. Differences in morbidity and viremia of the two viruses were not statistically significant (Unpaired t-test – Two tailed, $p > 0.05$), the same was observed in survival curve (Long-rank test).

hippocampus (**Figure 6C**) and also bordering the choroid plexus (**Figure 6D**). Small hemorrhagic foci (**Figure 6E**) and the formation of perivascular cuffs with the presence of neutrophils were also observed (**Figure 6F**). Both viruses led to the same histopathology, and the lesions caused by ZIKV replication in the brain are compatible with the mouse neurological signs observed during disease.

DISCUSSION

In 2016, Latin America and the Caribbean experienced an unprecedented Zika epidemic. The ZIKV emerged as a main human pathogen due to its association with the impairment of perinatal development and Guillain–Barré syndrome. The occurrence of these severe cases of Zika points to the significance of studies for understanding the molecular determinants of flavivirus pathogenesis. Therefore, the establishment of molecular tools and experimental models have been developed by many groups to study aspects related to reemergence, replication, and transmission of this virus. Here, we report an infectious clone construction through reverse genetics based on the ZIKV Rio-U1 isolated from the urine of a pregnant woman during

the ZIKV epidemic in Rio de Janeiro, Brazil, in 2016, who lived in a region with a high incidence of congenital Zika syndrome (Bonaldo *et al.*, 2016). Previous studies support the importance of investigating the ZIKV Rio-U1 through infectious clone technology (Fernandes *et al.*, 2016; Campos *et al.*, 2017; Magnani *et al.*, 2018; Messias *et al.*, 2019, 2020; Panganiban *et al.*, 2020). ZIKV Rio-U1 displayed high infection and dissemination rates in *Aedes aegypti*, leading to the very high viral transmission after day 14 of virus exposure (Fernandes *et al.*, 2016). Besides, orally-infected mosquito females by Rio-U1 strain can also venereally transmit the virus to males (Campos *et al.*, 2017). In another study, the ZIKV Rio-U1 virus caused lethality in AG129 mice at lower doses than other common American ZIKV isolates (Magnani *et al.*, 2018). The infection of pregnant macaques with this isolate resulted in maternal viremia, the virus crossing into the amniotic fluid, and in uterus fetal deaths (Magnani *et al.*, 2018).

Reverse genetics has been extensively used to answer several questions regarding the consequences of ZIKV infection in developmental biology. However, unlike other single-stranded RNA viruses, this tool’s development for the members of the *Flavivirus* genus has been a significant problem (Tsetsarkin *et al.*, 2016). It has been reported that structural protein E and NS1

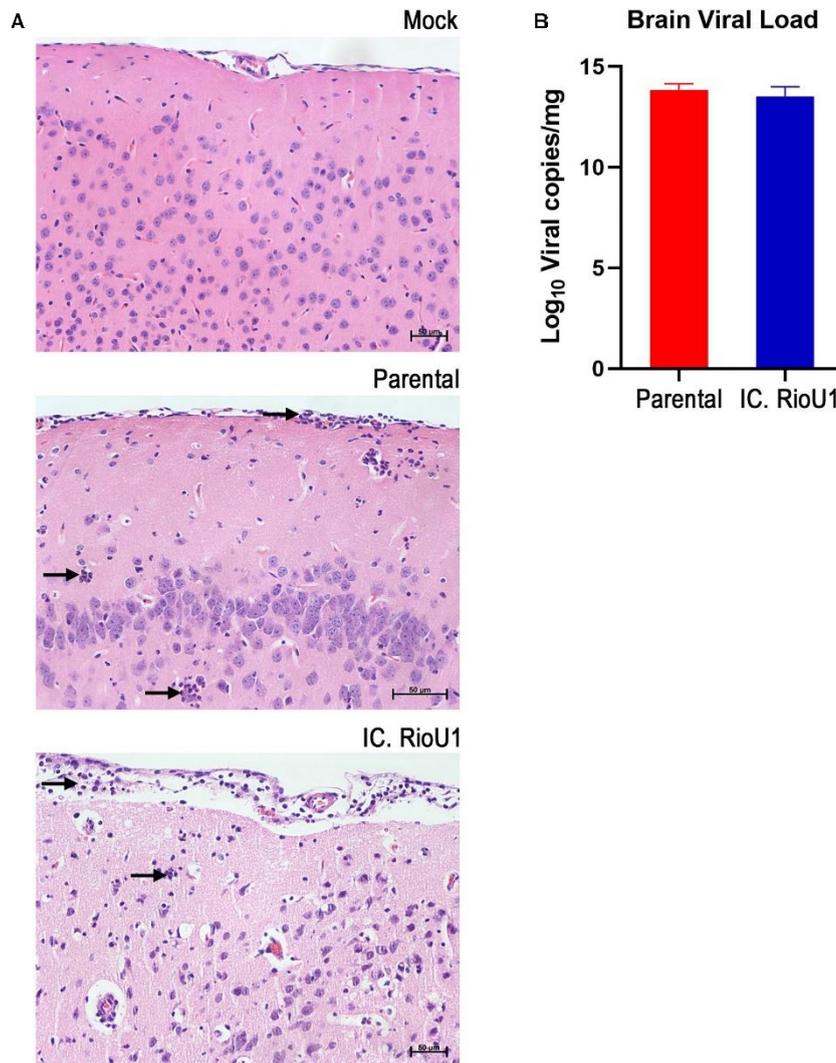


FIGURE 5 | Neurotropism of the ZIKV Rio-U1 (Parental) and the Infectious cDNA Clone (IC.RioU1) in AG129 mice. (A) Brain histopathological analysis after mock, ZIKV Rio-U1 (Parental), and IC.RioU1 infection. The brains of the Parental and IC.RioU1 infected animals exhibited inflammatory infiltrate in the cortex and meninges. Neutrophilic infiltration is indicated by black arrows. Data are representative of two independent experiments ($n = 4$ and 5). The brain sections were stained with hematoxylin and eosin. Scale bar, 50 μ m. (B) Viral load observed in the brains, of both groups, at time of death.

regions of flavivirus cDNA may contain *E. coli* promoters and produce proteins that cause toxicity to the recipient bacteria (Pu *et al.*, 2011). Several approaches have been taken to reduce this toxicity, including (i) inactivation of cryptic promoters for bacterial RNA polymerase in the flavivirus genome using silent mutagenesis (Münster *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018; Pallares *et al.*, 2020); (ii) insertion of intron sequences to disrupt the viral ORF (Schwarz *et al.*, 2016; Tsetsarkin *et al.*, 2016); (iii) *in vitro* binding (Widman *et al.*, 2017; Gorman *et al.*, 2018) or Gibson assembly that allows cloning genome fragments with later assembly (Setoh *et al.*, 2017; Weger-Lucarelli *et al.*, 2017a,b); and finally (iv) cloning a full-length cDNA into a low-copy vector (Shan *et al.*, 2016; Annamalai *et al.*, 2017; Mutso *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2017b), such as the use of artificial bacterial chromosome plasmids (Mutso *et al.*, 2017; Márquez-Jurado *et al.*, 2018). More

recently, the ISA method (Infectious Subgenomic Amplicons) was developed (Aubry *et al.*, 2014), which is performed with transfection of fragments of double-stranded cDNA that covers the entire genome of the RNA virus, bypassing cloning steps in bacteria (Atieh *et al.*, 2016; Gadea *et al.*, 2016). Unfortunately, this method could be associated with low efficiency of recombination of the cDNA fragments into transfected cells. Therefore, the amount of virus produced after the transfection using the ISA approach could be low (Ávila-Pérez *et al.*, 2018).

Initially, we attempted to build the infectious clone based on the strategy developed previously in our laboratory for the vaccine yellow fever 17D virus. The genome was cloned in derivatives of either pBR322 or pACN118 plasmids (Rice *et al.*, 1989; Bonaldo *et al.*, 2002, 2005). The ZIKV cDNA was split into two fragments, one containing the central part of the genomic

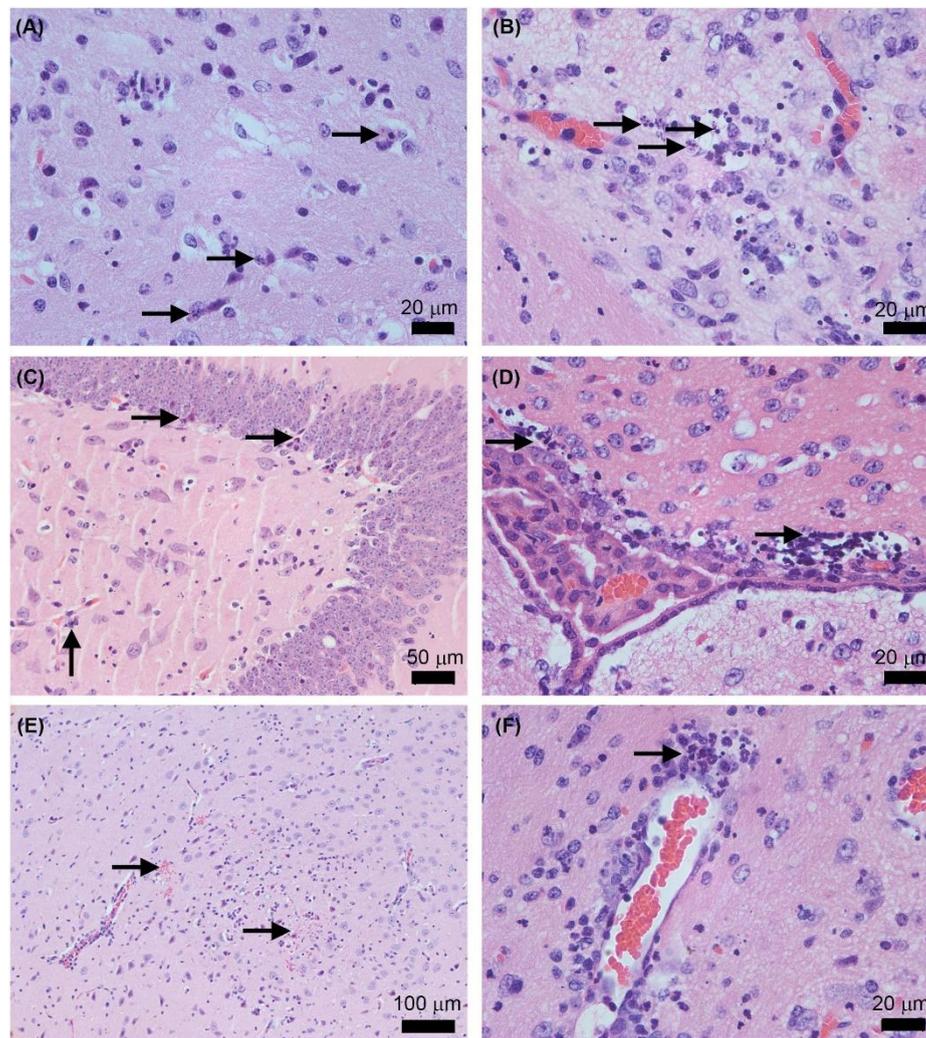


FIGURE 6 | Histopathological features in AG129 mouse brain after the infection with the ZIKV Rio-U1 (Parental) and the Infectious cDNA Clone (IC.RioU1). Karyorrhexis in the cortex of IC.RioU1 (A) and Parental (B) infected animal. Nuclear pyknosis and karyorrhexis in the hippocampus (C) and bordering the choroid plexus (D). Brain hemorrhage foci (E). Perivascular cuffs with a neutrophilic predominance (F). The images are representative of IC.RioU1 (A,C) and Rio-U1 (B,D–F) infection. Black arrows indicate the histopathological features observed in each panel (A–F). The brain sections were stained with hematoxylin and eosin. Data are representative of two independent experiments.

cDNA and the other the 5t and 3t regions. However, cloning the ZIKV genome in this format was not feasible because they were genetically unstable. Therefore, following the same rationale, the genomic cDNA was assembled into two plasmids but employing a low copy plasmid, a derivative of pCC1-Fos. The major constraint in working with this kind of vector is the low amount of viral cDNA, thus influencing the yield of viral cDNA template and, subsequently, the recovery of viral particles after transfection (Shan *et al.*, 2016). To overcome this hurdle, we associated PCR-amplifications in different viral cDNA generation steps to increase the genomic cDNA mass. The intermediate plasmids pCC1-MCS-Z1Z2 and pCC1-Z3Z4 were amplified by PCR with highly processing and proofreading enzymes. After the complete template assembly, followed by further PCR amplification, it was possible to generate large amounts of cDNA and subsequent viral

RNA. The amplification steps facilitated the viral recovery after 5 days of Vero cell transfection, totally in agreement with what has been described elsewhere (Shan *et al.*, 2016; Mutso *et al.*, 2017). The clone-derived virus presented no genetic alterations compared to the genome of the parental virus, except for those corresponding to the restriction sites used in the cloning steps. This methodology allowed the generation of cDNA-derived ZIKV with remarkably close genetic and biological properties to the parental strain from which it was constructed. The synthetic virus displayed quite similar infection patterns in mammalian and insect cells. We did not observe any significant differences either in viral proliferation profiles or E protein-labeling patterns, according to other studies describing alternative strategies to obtain ZIKV infectious clones (Schwarz *et al.*, 2016; Annamalai *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Mutso *et al.*, 2017;

Weger-Lucarelli *et al.*, 2017b; Chen *et al.*, 2018). However, some studies showed that cDNA-derived Zika viruses exhibited more attenuated replication kinetics than parental viruses (Shan *et al.*, 2016; Tsetsarkin *et al.*, 2016; Widman *et al.*, 2017). It might be due to the limited genetic heterogeneity of the recombinant virus population and the more genetically diverse quasispecies of the parental virus (Shan *et al.*, 2016). In the present work, these features were evaluated by plaque phenotype assays. We observed that the parental virus displayed a more heterogeneous plaque morphology than the ZIKV-infectious clone. This difference in plaque sizes was not surprising because the recombinant virus was derived from a homogenous RNA transcript population, whereas the parental virus is presumably also composed of quasispecies. This result follows what was previously described (Shan *et al.*, 2016).

We assessed the infectivity and virulence of the infectious clone in comparison with the parental ZIKV Rio-U1 in the AG129 mouse model. Several immunocompromised adult mouse models have been reported to support the replication of ZIKV; among those, AG129 showed greater susceptibility and more severe disease upon ZIKV infection (Aliota *et al.*, 2016; Rossi and Vasilakis, 2016). We observed practically identical mortalities, with similar disease progression and morbidity in the animals infected with the parental and the cDNA-derived virus. Also, viremia over the days was similar, but with a slight decay in mice infected with the ZIKV clone, reflecting the cell models' results without any statistical significance. Our results are in line with Weger-Lucarelli *et al.* (2017a), who compared the PRVABC59 ZIKV isolate with its infectious clone in model AG129 (deficient in IFN- α/β and IFN- γ receptors) and observed similar pathogenesis between them. However, in some cases, mouse infection with the cDNA-derived viruses appears to be less severe, exhibiting a slower mortality curve and later clinical signs of disease than the respective viral isolate (Shan *et al.*, 2016; Widman *et al.*, 2017; Ávila-Pérez *et al.*, 2018). It could be due to the limited genetic heterogeneity of the recombinant virus population and the more genetically diverse quasispecies composition of the parental virus, a known virulence determinant (Vignuzzi *et al.*, 2006).

ZIKV targets proliferative cells in neurogenesis sites, causing injury, as previously determined in studies with immunocompromised mice (Shaily and Upadhy, 2019). When myelinating cultures from Ifnar1 KO mice, all central nervous system cells were vulnerable to ZIKV infection, especially oligodendrocytes (Cumberworth *et al.*, 2017). On the other hand, the infection of non-neuronal cells, like primary human astrocytes and microglia, resulted in high viral replication and the induction of elevated levels of proinflammatory immune cytokines. It may contribute to the neurodevelopmental impact on the brain (Hamel *et al.*, 2017; Lum *et al.*, 2017). In the present work, we demonstrated that both viruses were highly replicative in AG129 mouse brain, as observed in Dowall *et al.* (2016), leading to a rapid disease progression. It is described that ZIKV infection in the AG129 mice leads to findings that display similarities with the disease in humans, such as the development of meningoencephalitis, fetal brain malformations (Miner and Diamond, 2017), neuronal apoptosis (Dowall *et al.*, 2016), and

scattered neutrophils in the nervous system, with perivascular infiltration and focus adjacent to the choroid plexus (Aliota *et al.*, 2016). Our study is in line with all these described findings. Therefore, we can conclude that both the parental virus and its clone led to similar pathogenesis in an animal model, presenting characteristic findings of ZIKV infection.

Here, we developed a genetically stable and efficient infectious clone of ZIKV based on the ZIKV Rio-U1 isolated in the 2016 epidemic in Brazil. This clone could be a tool for genetic and functional studies *in vitro* and *in vivo* to better understand viral infection and pathogenesis. The tools used in the development of this infectious clone may inspire the construction of reverse genetics systems for other flaviviruses.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, KU926309.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Ethics Committee of Animal Use at Instituto Oswaldo Cruz (CEUA license L034/2019).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IM, DF, and MB: conceive the study. IM, DF, NF, AS, MS, and MB: establishment of the cloning strategy. IR: real-time PCR and analysis. LR, MN, SC, and AR: technical support of the study. PM and MP-M: histopathological analysis and board preparation. IM: statistical analysis. IM, DF, NF, and MB: prepared figures, tables, and/or **Supplementary Material**. IM, DF, and MB: prepared the manuscript. All authors critically read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

The European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under ZIKAlliance Grant Agreement no. 734548; Preventing and Combating the Zika Virus MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MSDecit (Grant no. 440865/2016-6), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Grant no. 312446/2018), and Preventing and Combating the Zika Virus MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit (Grant no. 8881130684/2016-00). MP-M is a affiliate of the National Institute of Science and Technology Neuroimmunomodulation and recipient of the CNPq fellowship for Productivity level 2 (Grant no. 313520-2018-6). MB is a affiliate of the National Institute of Science and Technology vaccine development and recipient of the CNPq fellowship for Productivity in Technological Development and Innovative

Extension (Grant no. 309471/2016-8). This study was also financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES) – Finance Code 001.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Aline dos Santos Moreira, Renata Almeida de Sá, and Beatriz de Lima Alessio Müller from Plataforma Genômica-Sequenciamento de DNA/RPT01A/FIOCRUZ and thank Josué

da Costa Lima Junior and Rafaela Veiga from Plataforma de ELISPOT/PDTIS for technical support. We also thank Heloísa Diniz from Serviço de Produção e Tratamento de Imagens, IOC, Fiocruz for the design of photographs and figures.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.639655/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Aliota, M. T., Caine, E. A., Walker, E. C., Larkin, K. E., Camacho, E., and Osorio, J. E. (2016). Characterization of lethal zika virus infection in AG129 mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004682. doi: [10.1371/journal.pntd.004682](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.004682)
- Annamalai, A. S., Pattnaik, A., Sahoo, B. R., Muthukrishnan, E., Natarajan, S. K., Steffen, D., et al. (2017). Zika virus encoding nonglycosylated envelope protein is attenuated and defective in neuroinvasion. *J. Virol.* 91:e1348-17.
- Atieh, T., Baronti, C., de Lamballerie, X., and Nougairède, A. (2016). Simple reverse genetics systems for Asian and African Zika viruses. *Sci. Rep.* 6:39384.
- Aubry, F., Nougairède, A., de Fabritus, L., Querat, G., Gould, E. A., and de Lamballerie, X. (2014). Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons. *J. Gen. Virol.* 95(Pt 11), 2462–2467. doi: [10.1099/vir.0.068023-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.068023-0)
- Ávila-Pérez, G., Nogales, A., Martín, V., Almazán, F., and Martínez-Sobrido, L. (2018). Reverse genetic approaches for the generation of recombinant Zika virus. *Viruses* 10:597. doi: [10.3390/v10110597](https://doi.org/10.3390/v10110597)
- Avila-Perez, G., Nogales, A., Park, J. G., Vasquez, D. M., Dean, D. A., Barravecchia, M., et al. (2020). In vivo rescue of recombinant Zika virus from an infectious cDNA clone and its implications in vaccine development. *Sci. Rep.* 10:512.
- Bernatchez, J. A., Tran, L. T., Li, J., Luan, Y., Siqueira-Neto, J. L., and Li, R. (2019). Drugs for the treatment of Zika virus infection. *J. Med. Chem.* 63, 470–489.
- Bonaldo, M. C., Garratt, R. C., Caufour, P. S., Freire, M. S., Rodrigues, M. M., Nussenzweig, R. S., et al. (2002). Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. *J. Mol. Biol.* 315, 873–885. doi: [10.1006/jmbi.2001.5258](https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5258)
- Bonaldo, M. C., Garratt, R. C., Marchevsky, R. S., Coutinho, E. S., Jabor, A. V., Almeida, L. F., et al. (2005). Attenuation of recombinant yellow fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface. *J. Virol.* 79, 8602–8613. doi: [10.1128/jvi.79.13.8602-8613.2005](https://doi.org/10.1128/jvi.79.13.8602-8613.2005)
- Bonaldo, M. C., Mello, S. M., Trindade, G. F., Rangel, A. A., Duarte, A. S., Oliveira, P. J., et al. (2007). Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virol. J.* 4:115. doi: [10.1186/1743-422x-4-115](https://doi.org/10.1186/1743-422x-4-115)
- Bonaldo, M. C., Ribeiro, I. P., Lima, N. S., Dos Santos, A. A., Menezes, L. S., da Cruz, S. O., et al. (2016). Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004816. doi: [10.1371/journal.pntd.0004816](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004816)
- Campos, S. S., Fernandes, R. S., Dos Santos, A. A. C., de Miranda, R. M., Telleria, E. L., Ferreira-de-Brito, A., et al. (2017). Zika virus can be venereally transmitted between aedes aegypti mosquitoes. *Parasit. Vectors* 10:605.
- Cao, B., Diamond, M. S., and Mysorekar, I. U. (2017). Maternal-fetal transmission of Zika virus: routes and signals for infection. *J. Interferon Cytokine Res.* 37, 287–294. doi: [10.1089/jir.2017.0011](https://doi.org/10.1089/jir.2017.0011)
- Carson, F. L., Martin, J. H., and Lynn, J. A. (1973). Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am. J. Clin. Pathol.* 59, 365–373. doi: [10.1093/ajcp/59.3.365](https://doi.org/10.1093/ajcp/59.3.365)
- Chen, Y., Liu, T., Zhang, Z., Chen, M., Rong, L., Ma, L., et al. (2018). Novel genetically stable infectious clone for a Zika virus clinical isolate and identification of RNA elements essential for virus production. *Virus Res.* 257, 14–24. doi: [10.1016/j.virusres.2018.08.016](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.08.016)
- Chong, H. Y., Leow, C. Y., Majeed, A. B. A., and Leow, C. H. (2019). Flavivirus infection—a review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus Res.* 274:197770. doi: [10.1016/j.virusres.2019.197770](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197770)
- Costello, A., Dua, T., Duran, P., Gülmezoglu, M., Oladapo, O. T., Perea, W., et al. (2016). Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. *Bull. World Health Organ.* 94, 406–406A.
- Cumberworth, S. L., Barrie, J. A., Cunningham, M. E., de Figueiredo, D. P. G., Schultz, V., Wilder-Smith, A. J., et al. (2017). Zika virus tropism and interactions in myelinating neural cell cultures: CNS cells and myelin are preferentially affected. *Acta Neuropathol. Commun.* 5:50. doi: [10.1186/s40478-017-0450-8](https://doi.org/10.1186/s40478-017-0450-8)
- de Santana, M. G., Neves, P. C., dos Santos, J. R., Lima, N. S., dos Santos, A. A., Watkins, D. I., et al. (2014). Improved genetic stability of recombinant yellow fever 17D virus expressing a lentiviral gag gene fragment. *Virology* 452-453, 202–211. doi: [10.1016/j.virol.2014.01.017](https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.017)
- Deng, C. L., Zhang, Q. Y., Chen, D. D., Liu, S. Q., Qin, C. F., Zhang, B., et al. (2017). Recovery of the Zika virus through an in vitro ligation approach. *J. Gen. Virol.* 98, 1739–1743. doi: [10.1099/jgv.0.000862](https://doi.org/10.1099/jgv.0.000862)
- Dowall, S. D., Graham, V. A., Rayner, E., Atkinson, B., Hall, G., Watson, R. J., et al. (2016). A susceptible mouse model for Zika virus infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004658.
- Fernandes, R. S., Campos, S. S., Ferreira-de-Brito, A., Miranda, R. M., Barbosa, da Silva, K. A., et al. (2016). Culex quinquefasciatus from rio de janeiro is not competent to transmit the local Zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004993. doi: [10.1371/journal.pntd.0004993](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004993)
- Gadea, G., Bos, S., Krejbich-Trotot, P., Clain, E., Viranaicken, W., El-Kalamouni, C., et al. (2016). A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology* 497, 157–162. doi: [10.1016/j.virol.2016.07.015](https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.07.015)
- Gorman, M. J., Caine, E. A., Zaitsev, K., Begley, M. C., Weger-Lucarelli, J., Uccellini, M. B., et al. (2018). An immunocompetent mouse model of Zika virus infection. *Cell Host Microbe* 23:672–685.e6.
- Hamel, R., Ferraris, P., Wichit, S., Diop, F., Talignani, L., Pompon, J., et al. (2017). African and Asian Zika virus strains differentially induce early antiviral responses in primary human astrocytes. *Infect. Genet. Evol.* 49, 134–137. doi: [10.1016/j.meegid.2017.01.015](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.015)
- Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S., and Dye, C. (2016). Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull. World Health Organ.* 94, 675–686c.
- Kuno, G., and Chang, G. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of bagaza, kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* 152, 687–696. doi: [10.1007/s00705-006-0903-z](https://doi.org/10.1007/s00705-006-0903-z)
- Liu, Z. Y., Yu, J. Y., Huang, X. Y., Fan, H., Li, X. F., Deng, Y. Q., et al. (2017). Characterization of cis-Acting RNA elements of Zika virus by using a self-splicing ribozyme-dependent infectious clone. *J. Virol.* 91:JV1.000484-17.
- Lum, F. M., Low, D. K., Fan, Y., Tan, J. J., Lee, B., Chan, J. K., et al. (2017). Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. *Clin. Infect. Dis.* 64, 914–920. doi: [10.1093/cid/ciw878](https://doi.org/10.1093/cid/ciw878)
- Magnani, D. M., Rogers, T. F., Beutler, N., Ricciardi, M. J., Bailey, V. K., Gonzalez-Nieto, L., et al. (2017). Neutralizing human monoclonal antibodies prevent Zika virus infection in macaques. *Sci. Transl. Med.* 9:eaan8184.
- Magnani, D. M., Rogers, T. F., Maness, N. J., Grubaugh, N. D., Beutler, N., Bailey, V. K., et al. (2018). Fetal demise and failed antibody therapy during Zika virus infection of pregnant macaques. *Nat. Commun.* 9:1624.

- Márquez-Jurado, S., Nogales, A., Ávila-Pérez, G., Iborra, F. J., Martínez-Sobrido, L., and Almazán, F. (2018). An alanine-to-valine substitution in the residue 175 of Zika virus NS2A protein affects viral RNA synthesis and attenuates the virus in vivo. *Viruses* 10:574.
- Messias, C. V., Lemos, J. P., Cunha, D. P., Vasconcelos, Z., Raphael, L. M. S., Bonaldo, M. C., et al. (2019). Zika virus infects human blood mononuclear cells. *BMC Infect. Dis.* 19:986.
- Messias, C. V., Lemos-Morais, G., Carvalho, J. B., Gonzalez, M. N., Cunha, D. P., Vasconcelos, Z., et al. (2020). Zika virus targets the human thymic epithelium. *Sci. Rep.* 10:1378.
- Miner, J. J., and Diamond, M. S. (2017). Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe* 21, 134–142. doi: 10.1016/j.chom.2017.01.004
- Münster, M., Ptaszczyca, A., Cortese, M., Neufeldt, C. J., Goellner, S., Long, G., et al. (2018). A reverse genetics system for Zika virus based on a simple molecular cloning strategy. *Viruses* 10:368. doi: 10.3390/v10070368
- Musso, D., and Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 487–524.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., and Cao-Lormeau, V.-M. (2015). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 359–361. doi: 10.3201/eid2102.141363
- Mutso, M., Saul, S., Rausalu, K., Susova, O., Žusinaite, E., Mahalingam, S., et al. (2017). Reverse genetic system, genetically stable reporter viruses and packaged subgenomic replicon based on a Brazilian Zika virus isolate. *J. Gen. Virol.* 98, 2712–2724. doi: 10.1099/jgv.0.000938
- Nogueira, R. T., Nogueira, A. R., Pereira, M. C., Rodrigues, M. M., Galler, R., and Bonaldo, M. C. (2011). Biological and immunological characterization of recombinant yellow fever 17d viruses expressing a Trypanosoma cruzi amastigote surface protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. *Virol. J.* 8:127. doi: 10.1186/1743-422x-8-127
- Pallares, H. M., Costa Navarro, G. S., Villordo, S. M., Merwaiss, F., de Borja, L., Gonzalez Lopez, et al. (2020). Zika virus subgenomic flavivirus RNA generation requires cooperativity between duplicated RNA structures that are essential for productive infection in human cells. *J. Virol.* 94:e00343-20.
- Panganiban, A. T., Blair, R. V., Hattler, J. B., Bohannon, D. G., Bonaldo, M. C., Schouest, B., et al. (2020). A Zika virus primary isolate induces neuroinflammation, compromises the blood-brain barrier and upregulates CXCL12 in adult macaques. *Brain Pathol.* 30, 1017–1027. doi: 10.1111/pga.12873
- Pierson, T. C., and Diamond, M. S. (2018). The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature* 560, 573–581. doi: 10.1038/s41586-018-0446-y
- Pierson, T. C., and Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat. Microbiol.* 5, 796–812. doi: 10.1038/s41564-020-0714-0
- Pu, S. Y., Wu, R. H., Yang, C. C., Jao, T. M., Tsai, M. H., Wang, J. C., et al. (2011). Successful propagation of flavivirus infectious cDNAs by a novel method to reduce the cryptic bacterial promoter activity of virus genomes. *J. Virol.* 85, 2927–2941. doi: 10.1128/jvi.01986-10
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A., and Petersen, L. R. (2016). Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. *N. Engl. J. Med.* 374, 1981–1987. doi: 10.1056/nejmsr1604338
- Rice, C. M., Grakoui, A., Galler, R., and Chambers, T. J. (1989). Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol.* 1, 285–296.
- Rossi, S. L., and Vasilakis, N. (2016). Modeling Zika virus infection in mice. *Cell Stem Cell* 19, 4–6. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.009
- Ruggli, N., and Rice, C. M. (1999). Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. *Adv. Virus Res.* 53, 183–207. doi: 10.1016/s0065-3527(08)60348-6
- Schwarz, M. C., Sourisseau, M., Espino, M. M., Gray, E. S., Chambers, M. T., Tortorella, D., et al. (2016). Rescue of the 1947 Zika virus prototype strain with a cytomegalovirus promoter-driven cDNA clone. *mSphere* 1:e246-16.
- Setoh, Y. X., Prow, N. A., Peng, N., Hugo, L. E., Devine, G., Hazlewood, J. E., et al. (2017). De novo generation and characterization of New Zika virus isolate using sequence data from a microcephaly case. *mSphere* 2:e190-17.
- Shaily, S., and Upadhyay, A. (2019). Zika virus: molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. *Rev. Med. Virol.* 29:e2050. doi: 10.1002/rmv.2050
- Shan, C., Xie, X., and Shi, P. Y. (2017b). Reverse genetics of Zika virus. *Methods Mol. Biol.* 1602, 47–58.
- Shan, C., Xie, X., and Shi, P.-Y. (2017a). “Reverse genetics of Zika virus,” in *Reverse Genetics of RNA Viruses*, ed. A. Bridgen (Berlin: Springer), 47–58. doi: 10.1007/978-1-4939-6964-7_4
- Shan, C., Xie, X., and Shi, P.-Y. (2018). Zika virus vaccine: progress and challenges. *Cell Host Microbe* 24, 12–17. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.021
- Shan, C., Xie, X., Muruato, A. E., Rossi, S. L., Roundy, C. M., Azar, S. R., et al. (2016). An infectious cDNA clone of zika virus to study viral virulence, mosquito transmission, and antiviral inhibitors. *Cell Host Microbe* 19, 891–900. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.004
- Sips, G. J., Wilschut, J., and Smit, J. M. (2012). Neuroinvasive flavivirus infections. *Rev. Med. Virol.* 22, 69–87. doi: 10.1002/rmv.712
- Stobart, C. C., and Moore, M. L. (2014). RNA virus reverse genetics and vaccine design. *Viruses* 6, 2531–2550. doi: 10.3390/v6072531
- Tsetsarkin, K. A., Kenney, H., Chen, R., Liu, G., Manukyan, H., Whitehead, S. S., et al. (2016). A full-length infectious cDNA clone of zika virus from the 2015 epidemic in Brazil as a genetic platform for studies of virus-host interactions and vaccine development. *mBio* 7:e01114-16. doi: 10.1128/mBio.01114-16
- Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E., and Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439, 344–348. doi: 10.1038/nature04388
- Weger-Lucarelli, J., Duggal, N. K., Braut, A. C., Geiss, B. J., and Ebel, G. D. (2017a). Rescue and characterization of recombinant virus from a new world Zika virus infectious clone. *J. Vis. Exp.* 124:55857.
- Weger-Lucarelli, J., Duggal, N. K., Bullard-Feibelman, K., Veselinovic, M., Romo, H., Nguyen, C., et al. (2017b). Development and characterization of recombinant virus generated from a new world Zika virus infectious clone. *J. Virol.* 91:e1765-16.
- Widman, D. G., Young, E., Yount, B. L., Plante, K. S., Gallichotte, E. N., Carbaugh, D. L., et al. (2017). A reverse genetics platform that spans the Zika virus family tree. *mBio* 8, e2014-e2016.
- Zhao, F., Xu, Y., Lavellette, D., Zhong, J., Zou, G., and Long, G. (2018). Negligible contribution of M2634V substitution to ZIKV pathogenesis in AG6 mice revealed by a bacterial promoter activity reduced infectious clone. *Sci Rep* 8:10491.

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

Copyright © 2021 de Mello, Fernandes, Furtado, dos Santos, dos Santos, Ribeiro, Raphael, Nogueira, da Cruz, Rocha, Manso, Pelajo-Machado and Bonaldo. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary information of “**Recovery of synthetic Zika virus based on Rio-U1 isolate using a genetically stable two plasmid system and cDNA amplification**”

Iasmim Silva de Mello¹&, Déberli Ruiz Fernandes¹&, Nathália Dias Furtado¹, Alexandre Araújo Cunha dos Santos¹, Marta Pereira dos Santos¹, Ieda Pereira Ribeiro¹, Lidiane Menezes Souza Raphael¹, Mônica da Silva Nogueira ², Stephanie Oliveira Diaz da Cruz¹, Adalgiza da Silva Rocha³, Pedro Paulo de Abreu Manso ⁴, Marcelo Pelajo Machado⁴ and Myrna Cristina Bonaldo¹*

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

²Centro de Experimentação Animal, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

³Central Analítica, Unidade de Apoio ao Diagnóstico do COVID-19 - UNADIG-RJ, Vice-Presidência em Produção e Inovação - FIOCRUZ

⁴Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

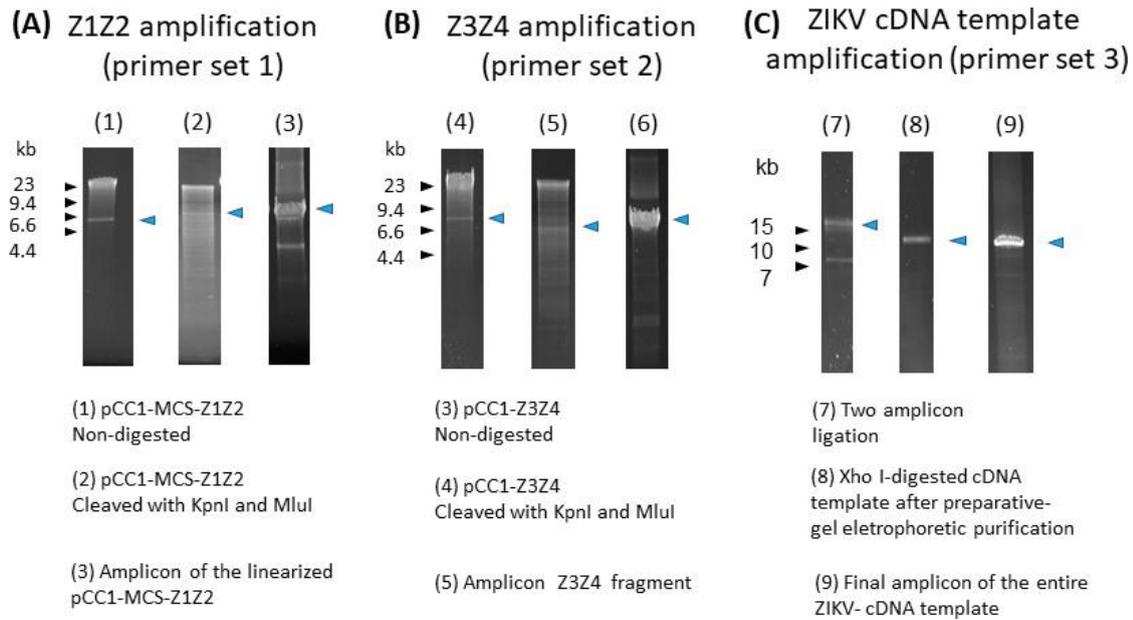
*** Correspondence:**

Myrna Cristina Bonaldo

mbonaldo@ioc.fiocruz.br



Supplemental Figure 1 – Pair primers utilized to construct pCC1-MCS-Z1Z2 containing a polylinker sequence. The original low-copy plasmid pCC1-Z3 was digested with the restriction enzymes NotI and NsiI, and the Z3 fragment was replaced with the polylinker with cohesive ends NotI and NsiI. Using the new plasmid named pCC1-MCS, we subsequently cloned the ZIKV cDNA Z1 and Z2 with NotI and KpnI and MluI-XhoI cohesive ends, respectively.



Supplemental Figure 2 – ZIKV infectious clone construction. The construction of a ZIKV-infectious clone was reached by developing a genetically stable two-plasmid system. The plasmidial mass yields after DNA extraction of pCC1-MCS-Z1Z2 (lane A1; 8,255 pb; DNA mass 17.2 ng/ul) and Z3Z4 (lane B1; 7,456 pb; DNA mass 26.8 ng/ul) were reduced, hampering the subsequent genome assembly. The quantifications were overestimated, considering the inevitable contamination with chromosomal DNA. The cleavage with *KpnI* and *MluI* of the plasmid preparations, necessary to construct the complete ZIKV infectious clone, produced barely detected bands (indicated by blue arrows) of the digested plasmids (lane A2 and lane B5). To circumvent this constraint, we directly PCR amplified the pCC1-MCS-Z1Z2 and Z3Z4 fragments as indicated by blue arrows in lanes A3 (27.8ng/ul) and B6 (8.52 ng/ul), respectively. After the digestion of the amplicons with *KpnI* and *MluI*, the fragments were ligated (lane C7, blue arrow). In a further step, we cleaved the ligated DNA with *XhoI* and purified the template band by preparative gel electrophoresis (lane C8, blue arrow; DNA mass 1,99 ng/ul). We proceeded with the PCR amplification of the synthetic viral cDNA using primer pair 3, generating the complete template of 10,847 pb containing the ZIKV genomic cDNA of 10,807 pb (lane C9, blue arrow, DNA mass 82.2ng/ul).

Supplemental Table 1. Set of primers employed in part or the entire ZIKV cDNA template amplification.

Target	Primer	Sequence 5' → 3'	Amplicon (pb)
pCC1-MCS- Z1Z2	1F	CCTAAGCTTAGGTACCTTGCAAGGTCCATC	8255
	1R	GCTTAGGATCCGAGCTCACGCGTCTGTACC	
pCC1-Z3Z4	2F	GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	7456
	2R	CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC	
IC.Rio-U1	3F	CCTTATGTATCATAACACATACGATTTAGGTGA CACTATAGAG	10847
	3R	AGACCCATGGATTTCCCCACACCGG	

Supplemental Table 2 – Primer set designed for RT-PCR and viral genome sequencing.

Primer	Position	Sequence 5' → 3'
ZK1F	1 - 25	AGTTGTTGATCTGTGTGAATCAGAC
ZKGAP5'AR	166 - 182	GCTCACACGGGCTACTC
ZK1AR	623 - 644	ATCCAGCATAGGGCATTTCATAG
ZK1AF	627 - 646	GAATGCCCTATGCTGGATGA
ZK1BF	982 - 1003	GGTGCATAGGAGTCAGCAATAG
ZK1BR	1007 - 1028	ACCTGACATACCTTCCACAAAG
ZK1CR	1202 - 1221	GGTAGGCTTCACCTTGTGTT
ZK1CF	1373 - 1395	AGAGAATCTGGAGTACCGGATAA
ZK2F	1732 - 1751	GGCAAACGTGTCGTGGTTCTA
ZK1R	1872 - 1892	GTATGACACGCCCTTCAATCT
ZK2AF	2431 - 2450	CCCTTATGTGCTTGGCCTTA
ZK2AR	2434 - 2453	CCCTAAGGCCAAGCACATAA
ZK24L1F	2608 - 2626	GTAGATTGGCAGCAGCAGT
ZK2BR	2731 - 2751	CCGTCAGTTGAACTCCATTCT
ZK24L1R	2927 - 2948	AAAGCTGTTCCATGCTCTATGT
ZK3F	3085 - 3107	GCTACTGGATTGAGAGTGAGAAG
ZK2R	3364 - 3385	CTCAGAGATGGTCCTCTTGTTTC
ZK3AR	3743 - 3764	ATCTCCTCCAGTGTTTCATTTC
ZK24L2F	3807 - 3827	GCGTTGCTGGTATCTTTCATC
ZK3AF	3972 - 3992	GTTGTTCCACGCACTGATAAC
ZK24L2R	4045 - 4061	TGCTCTCCACGCCACAA
ZK4F	4345 - 4366	GTTACGTGGTCTCAGGAAAGAG
ZK3R	4548 - 4567	GGGTATGGCTATTGGGTTTCAT
ZK4BF	4715 - 4735	ACAAGTTGGAGTGGGAGTTAT
ZK4AR	5026 - 5047	CTCCCACACTTGTCTAGGATTG
ZK4AF	5034 - 5055	GACAAGTGTGGGAGAGTGATAG

ZK4BR	5358 – 5377	GTTCCAGAGTGGGTGACATT
ZK5F	5593 – 5613	CGGACTCCAACCTACCAATTA
ZK4R	5912 – 5933	GACTCTCTCGCCATCAAGTATG
ZK5AR	6277 – 6299	GCACCATCTTCTATCTGTGTAGG
ZK5AF	6282 – 6304	ACAGATAGAAGATGGTGCTTTGA
ZK5BR	6518 – 6537	TGGCTTCCTGGAATCTCTCT
ZK6F	6959 – 6980	TCTAATGGGAAGGAGAGAGGAG
ZK5R	7104 – 7125	CCATCGCCATTAAGGAGTAGTT
ZK6AF	7607 – 7628	CTTGGCTGGAGCTTCTCTAATC
ZK6AR	7607 – 7628	GATTAGAGAAGCTCCAGCCAAG
ZK6BF	8018 - 8039	AAGCTATGGGTGGAACATAGTC
ZK6BR	8062 - 8081	CTCAGCCGCCATATGAAAGA
ZK7F	8549 – 8569	CTTTGACGAGAACCACCCATA
ZK6R	8689 – 8708	GGTGTGCGTCATGGCTATTC
ZK7AF	9187 – 9206	GTGTTGAAGGGCTGGGATTA
ZK7AR	9228 – 9249	CTGGTATGCGACTCATCTCTTC
ZK7BF	9514 – 9534	ACCTAGTGGTGCAACTCATTC
ZK7BR	9537 – 9558	GAACTTCCTCAGCCTCCATATT
ZK8F	10034 – 10054	GGTTCCAACCTGGGAGAACTAC
ZK7R	10205 – 10227	CTATGAGAGATCCACACCACAAG
ZKGAP3'F	10643 – 10664	TGGATCTCCAGAAGAGGGACTA
ZK8R	10788 – 10807	AGACCCATGGATTTCCCCAC
zkmelt65f	10034 - 10068	GGTTCCAACCTGGGAGAACTACCTGGTCAATCCATG
zkmelt65r	10782 - 10807	AGACCCATGGATTTCCCCACACCGGC
zkmelt70f	10034 - 10090	GGTTCCAACCTGGGAGAACTACCTGGTCAATCCATGGA AAGGGAGAATGGATGACCAC
zkmelt70r	10778-10807	AGACCCATGGATTTCCCCACACCGGCCGCC

Supplemental Table 3 - Clinical scores for monitoring signs of disease in AG129 mice

Observation	Score
Body weight	
Loss of 5-10%	1
Loss of 10-15%	2
Loss of 16-20%	3
Loss of 20% or more	6
Fur	
Slightly ruffled	2
Evidently ruffled	3
Respiration	
Accelerated breathing (tachypnea)	1
Difficult breathing (dyspnea)	3
Clinical complications	
Tension during handling	1
Tremors, breath noises, aggression, vocalizations	3
Motility	
Abnormal walking and posture (slightly hunched, reduced activity)	1
Massively abnormal walking and posture (evidently hunched, moderately reduced activity)	2
Motility only after stimulation, isolation, lethargy	3
No activity for more than 24 hours	6
Measures according to total score	
3	Animals are carefully observed, with monitoring 2 times a day
6	Implementation of humane endpoint, abort experiment (euthanasia)

ANEXO II

PROTOCOLOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

RT – PCR

Primeira reação: Incubação a 65 °C por 5 minutos.

RNA	10 µl
<i>Primer</i> randômico (20 ng / µL)	1 µl (20 ng / µl)
dNTP (10 mM)	1 µl
H ₂ O <i>RNA free</i>	1 µl

Segunda reação: ver condições de ciclagem

5x First – Strand Buffer	4 µl
0,1 M DTT	1 µl
RIN (40 U / µL)	1 µl
Super Script III (200 U / µL)	1 µl

Condições de ciclagem

Temperatura	Tempo	n. ^o ciclos
25 °C	5 minutos	1
55 °C	60 minutos	1
70 °C	15 minutos	1
4 °C	∞	-

PCR

*Protocolo de PCR utilizado para detecção dos fragmentos de interesse.

Reação:

GoTaq Master Mix Green 2X	12,5 µL
Primer F (20 pmol / µL)	0,5 µL
Primer R (20 pmol / µL)	0,5 µL
H ₂ O	9,5 µL
cDNA	2 µL

Condições de ciclagem

Temperatura	Tempo	n.º ciclos
95 °C	5 minutos	1
95 °C	40 segundos	
55 °C	40 segundos	35
72 °C	1 min / Kb	
72 °C	10 minutos	1
4 °C	∞	-

*Protocolo de PCR utilizado para amplificação da massa de DNA plasmidial

Reação:

Buffer HF 5x	5 µL
Phusion High Fidelity (2 U / µL)	0,5 µL
dNTP 10 mM	0,5 µL
Primer F 20 pmol / µL	0,625 µL
Primer R 20 pmol / µL	0,625µL
H ₂ O	14,5 µL
cDNA	1 ng (aproximadamente)

Condições de ciclagem

Temperatura	Tempo	n.º ciclos
98 °C	3 minutos	1
98 °C	10 segundos	
67 °C	15 segundos / Kb	35
72 °C	2 minutos	
72 °C	10 minutos	1
4 °C	∞	-

*Protocolo de PCR utilizado para amplificação da massa do cDNA molde final

Reação:

Buffer 5x Prime Star GXL	10 µL
Prime Star GXL (1.25 U / µL)	2 µL
dNTP (2.5 mM)	4 µL
Primer F 20 pmol / µL	0,5 µL
Primer R 20 pmol / µL	0,5µL
H2O	31 µL
cDNA	20 ng (aproximadamente)

Condições de ciclagem

Temperatura	Tempo	n.º ciclos
98 °C	1 minuto	1
98 °C	10 segundos	
67 °C	10 segundos / Kb (\leq 10 Kb)	35
	20 segundos / Kb (\geq 10 Kb)	
72 °C	2 minutos	
72 °C	10 minutos	1
4 °C	∞	-