



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

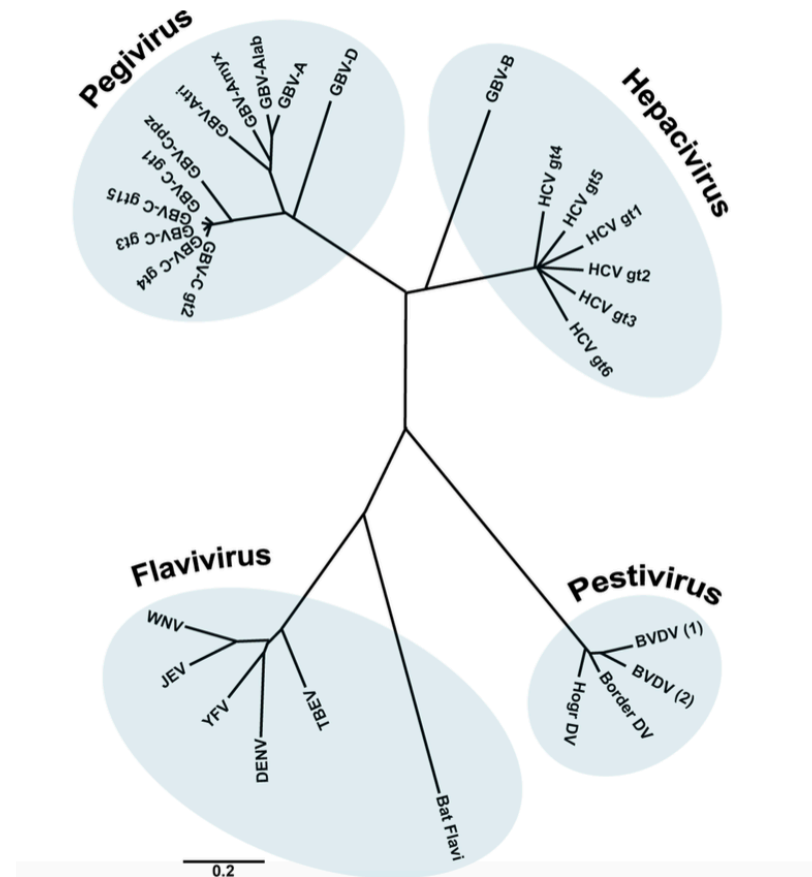
# **Sistemas de genética reversa do ZIKV: desenvolvimento, aplicações e perspectivas**

**Laura H. V. G. Gil, PhD.**

**Departamento de Virologia, CPqAM-FIOCRUZ**

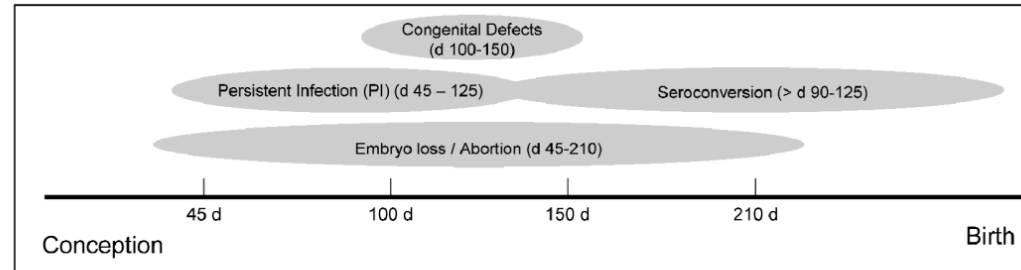
**Workshop ABCDE do Zika vírus, 02 de março de 2016.**

# Flaviviridae



Viruses 2014, 6, 2826-2857

# Flaviviridae: Pestivirus



**Figure 14.1.** The effect of stage of gestation at the time of BVDV infection of susceptible pregnant cows on clinical outcome.

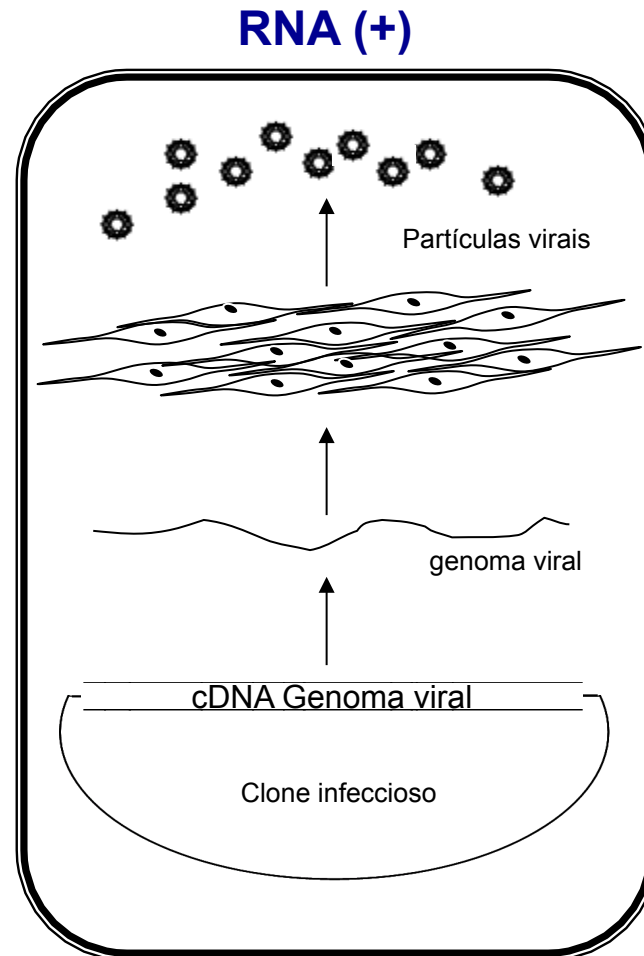
Goyal & Ridpath, 2005

- **Defeitos congênitos: 100-180 dias de gestação**
  - SNC: hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, hipomielinização;
  - Defeitos oculares: atrofia ou displasia retinal, catarata, microftalmia, neurite óptica;
  - Outros: hipoplasia do timo, hipoplasia pulmonar, alopecia/hipotricose, artrogripose, osteogênese imperfeita e retardo no crescimento.
- **Pesquisas com ZIKV.**

# Genética Reversa Viral

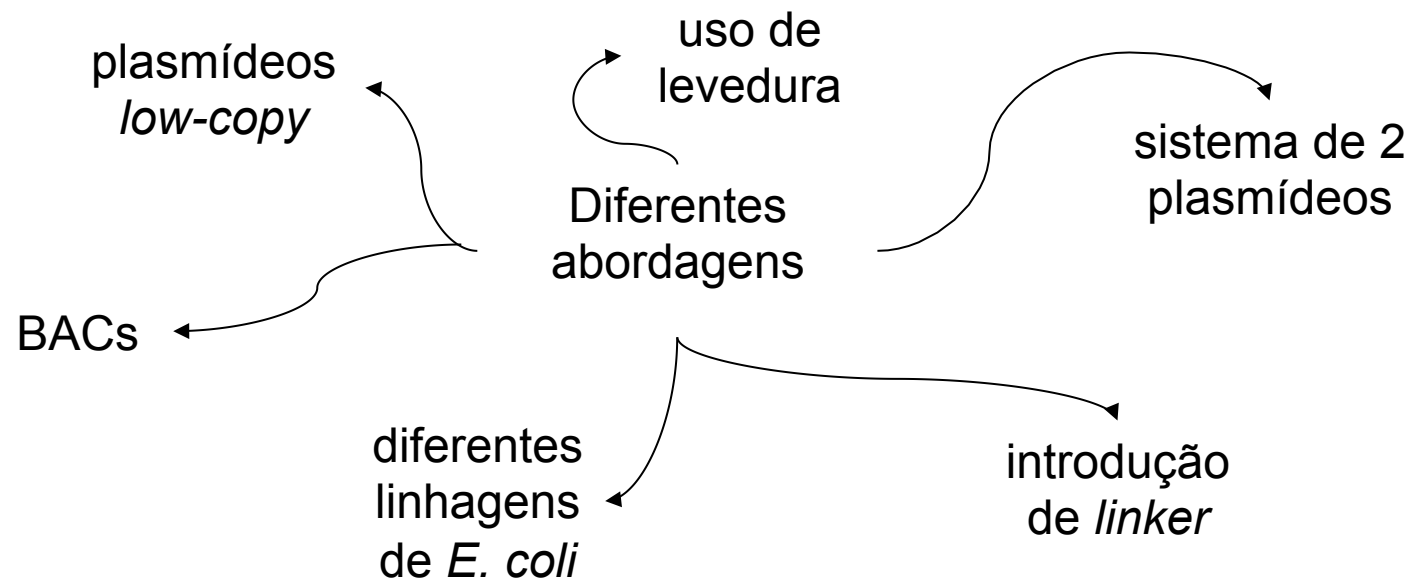
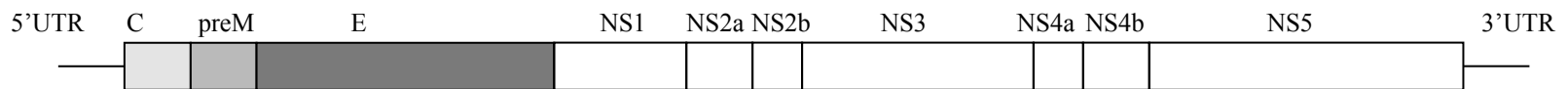
- **É a principal ferramenta da virologia molecular!!!**
  - **Manipulação do genoma viral**
    - Replicação;
    - Função de proteínas virais;
    - Estudos imunopatogênicos;
    - Expressão de genes heterólogos;
    - Desenvolvimento de ferramentas para triagem de antivirais;
    - Desenvolvimento de vacinas: atenuadas ou quiméricas.

O sistema de genética reversa é uma poderosa ferramenta que permite a direta manipulação do genoma viral clonado



Geração de partículas virais infecciosas a partir do genoma viral clonado, clone Infeccioso.

# Uma das principais dificuldades no estabelecimento de um sistema de genética reversa para flavivírus é a instabilidade do cDNA clonado do genoma viral



## Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3

Jefferson José da Silva Santos<sup>1</sup>, Marli Tenório Cordeiro<sup>1,2</sup>, Giovani Rota Bertani<sup>3</sup>, Ernesto Torres de Azevedo Marques<sup>1,4</sup>, Laura Helena Vega Gonzales Gil<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório Central de Saúde Pública, Departamento de Saúde do Estado de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil <sup>4</sup>Department of Infectious Diseases and Microbiology, Center for Vaccine Research, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

## Full-length infectious clone of a low passage dengue virus serotype 2 from Brazil

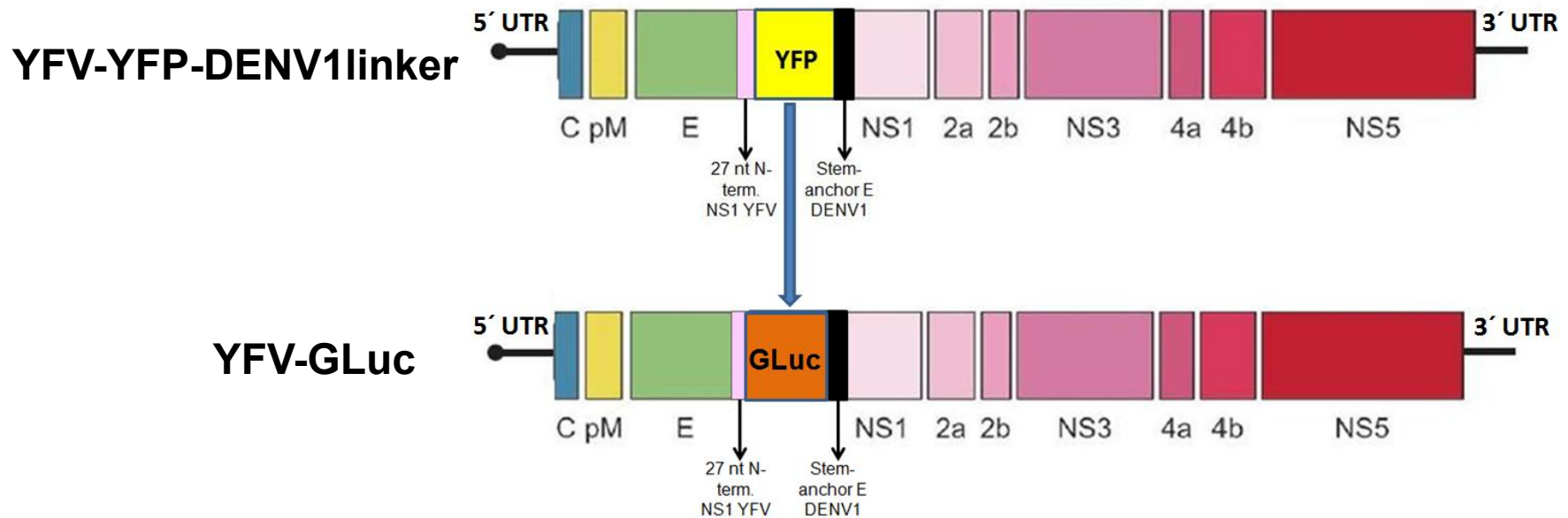
Jefferson José da Silva Santos<sup>1</sup>, Tereza Magalhães<sup>1</sup>, José Valter Joaquim Silva Junior<sup>1</sup>, Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva<sup>1</sup>, Marli Tenório Cordeiro<sup>1,2</sup>, Laura Helena Vega Gonzales Gil<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Saúde do Estado de Pernambuco, Laboratório Central de Saúde Pública, Recife, PE, Brasil

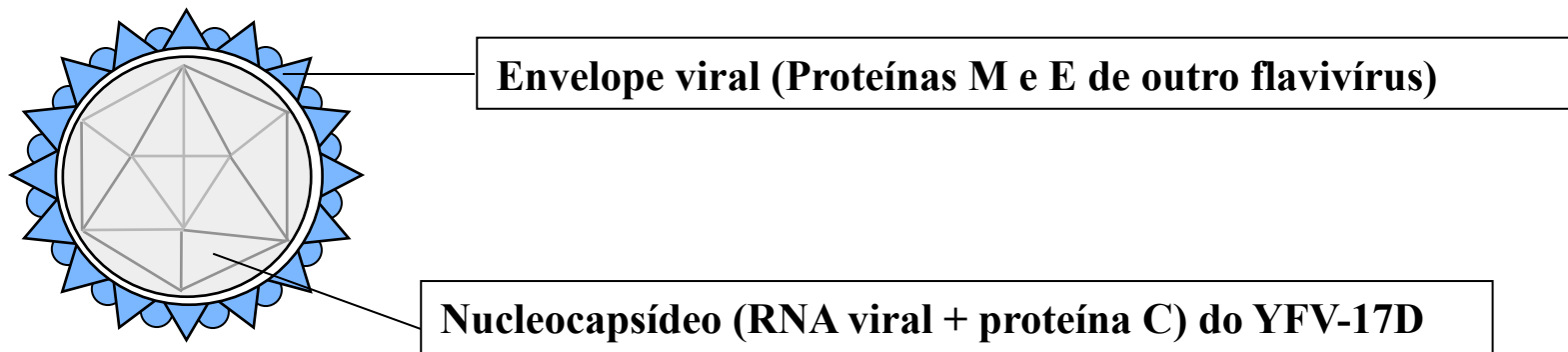
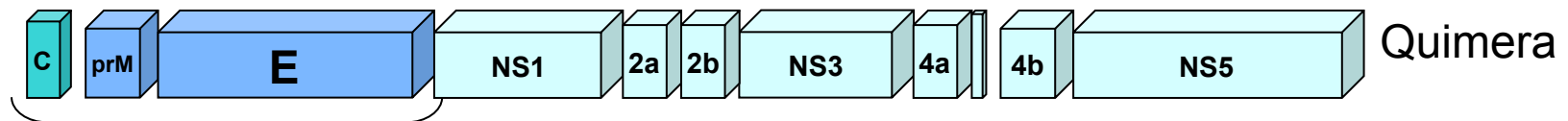
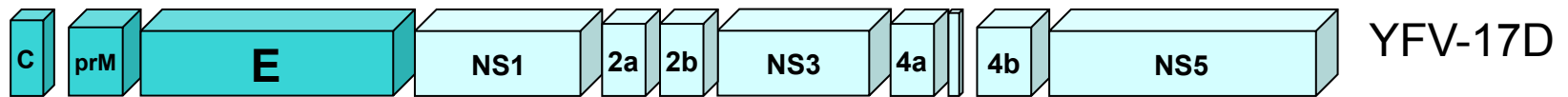
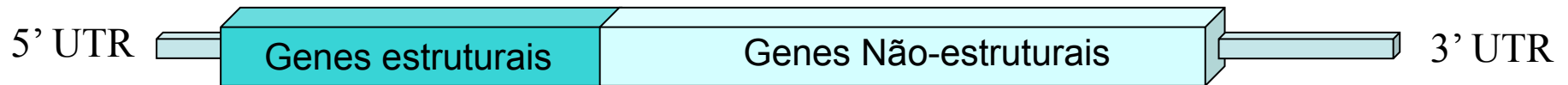
*Full-length dengue virus (DENV) cDNA clones are an invaluable tool for many studies, including those on the development of attenuated or chimeric vaccines and on host-virus interactions. Furthermore, the importance of low passage DENV infectious clones should be highlighted, as these may harbour critical and unique strain-specific viral components from field-circulating isolates. The successful construction of a functional Brazilian low passage DENV serotype 2 full-length clone through homologous recombination reported here supports the use of a strategy that has been shown to be highly useful by our group for the development of flavivirus infectious clones and replicons.*

# Vírus da febre amarela (YFV) repórteres



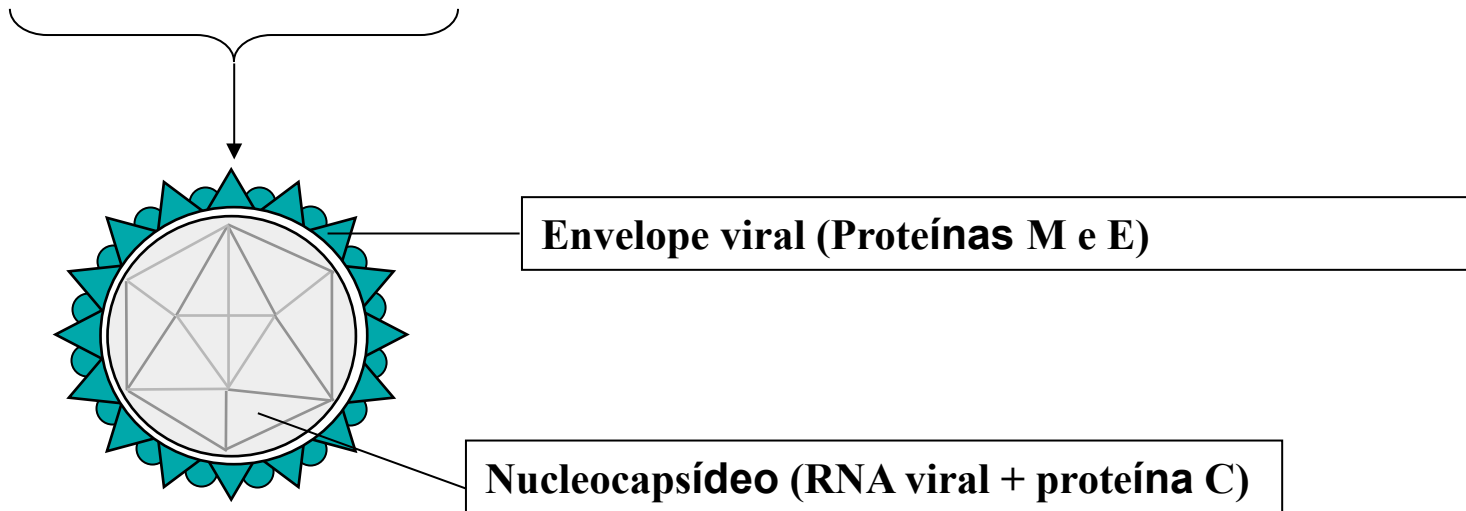
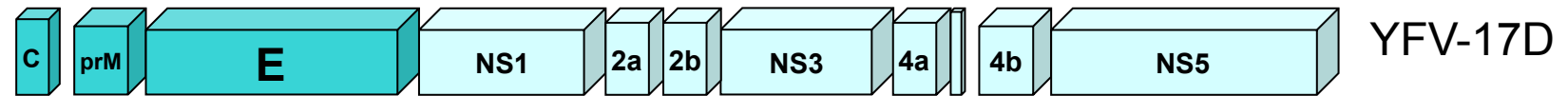
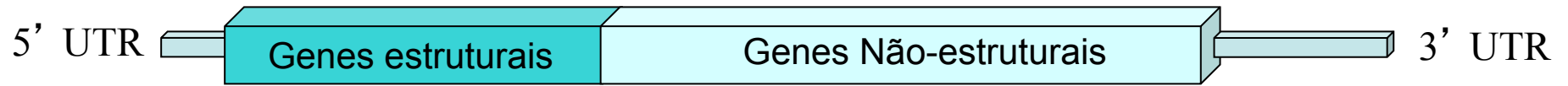


# Quimeras de YFV-17D

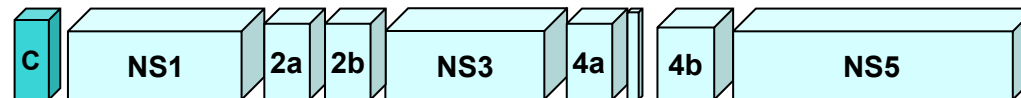


Quimeras de YFV: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, SLEV, ILHV, Rocio, WNV (2 tipos)  
- Vacinas e diagnóstico (NB2)

# Replicons: RNAs auto replicativos

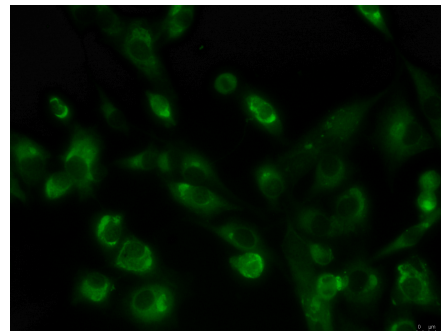
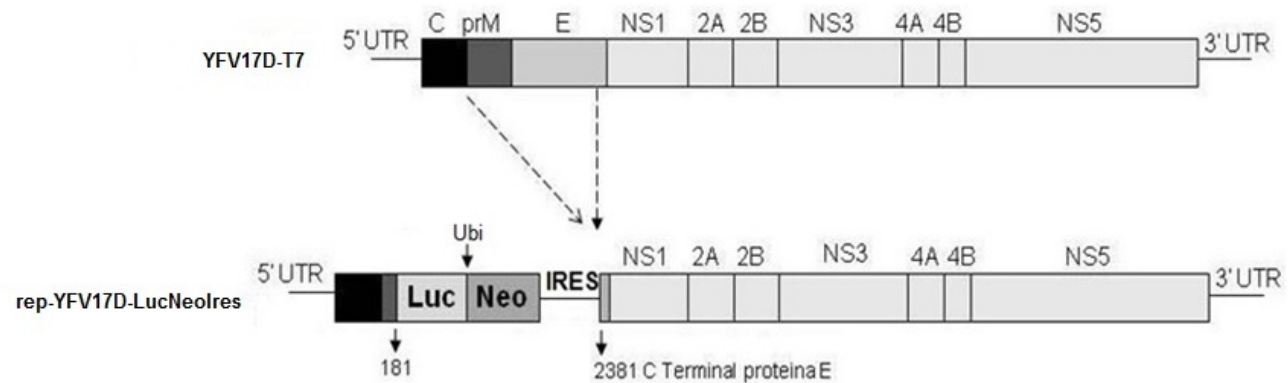


replicon YFV



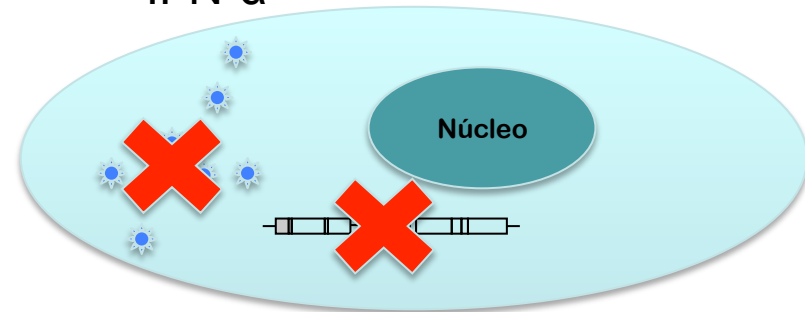
# Linhagem celular

## BHK-21-repYFV17D-LucNeoIres



Imunofluorescência da linhagem BHK21-repYFV-LucNeoIres resistente de Geneticina. Anticorpo policlonal anti-flavivírus

IFN- $\alpha$



# Triagem de 5200 extratos Naturais

- Coleção de extratos naturais do CPqRR-Fiocruz;
- Identificação de 83 extratos naturais com atividade antiviral para o YFV e dengue em cultivo celular.

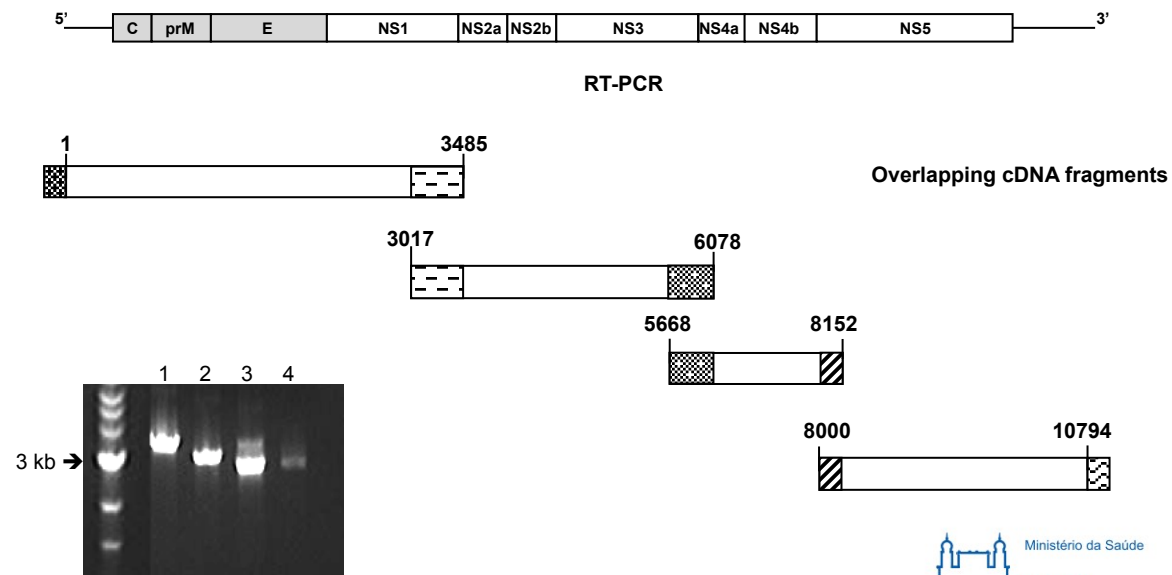
Porcentagem de Inibição da Infecção	YFV	DENV2
61 a 70%	-	2
71 a 80%	4	4
81 a 90 %	7	2
Acima de 91 % (IFN)	72 (87%)	75 (90%)
Total	83	83

## ❖ Replicação do genoma viral

# Sistema de genética reversa do ZIKV

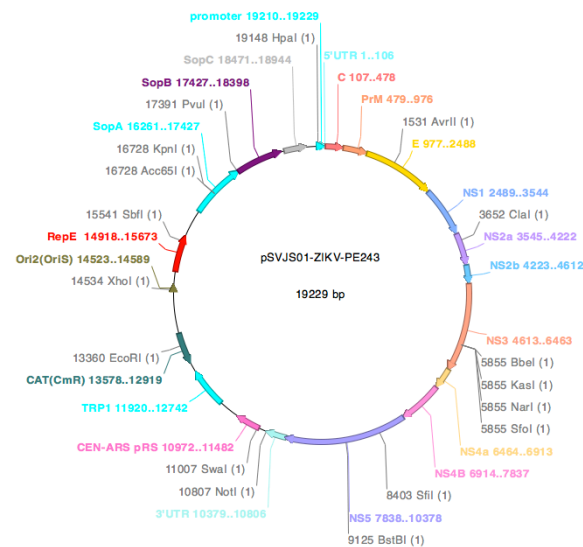
## ■ Desenvolvimento:

- ZIKV PE243/2015 (Dra. Marli T. Cordeiro)
- Clonagem por recombinação homóloga em levedura



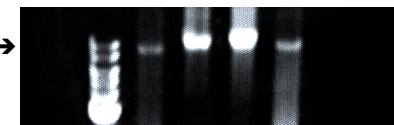
# Sistema de genética reversa do ZIKV

- Clonagem do genoma completo;
- Recuperação da partícula viral.



PCR do genoma completo do ZIKV

10,7 kb →



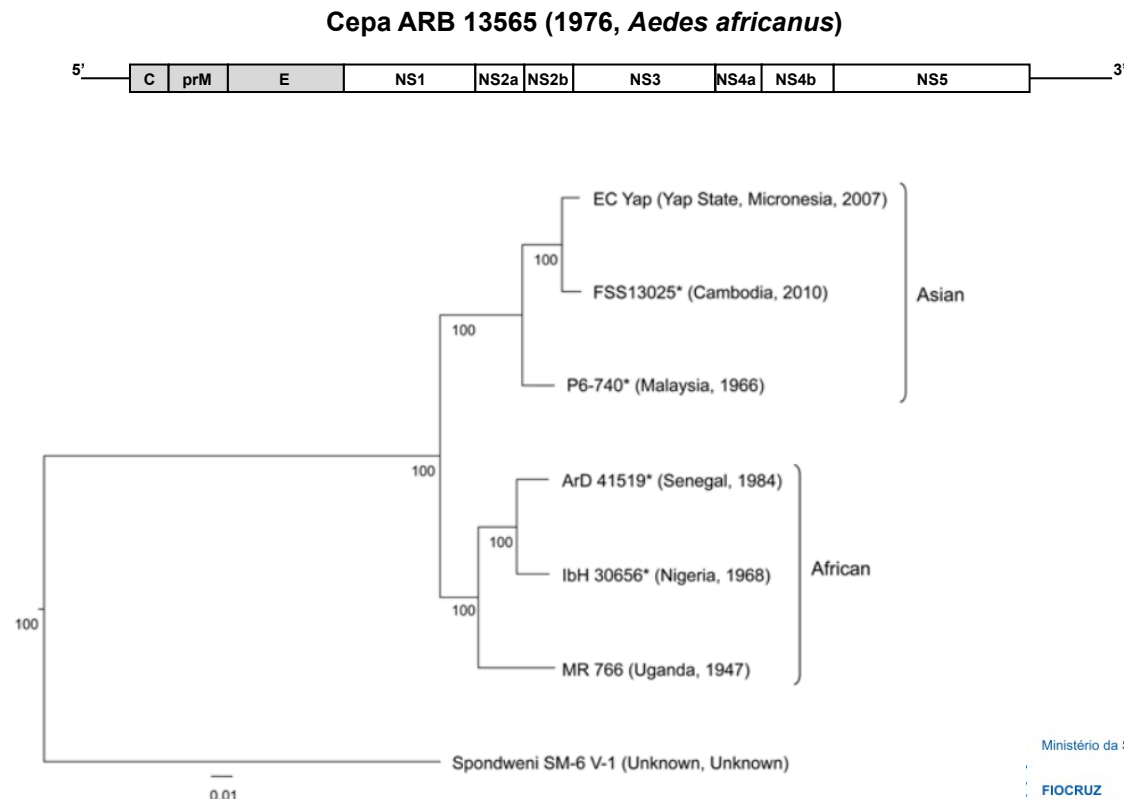
Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

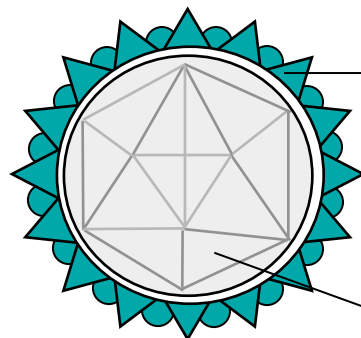
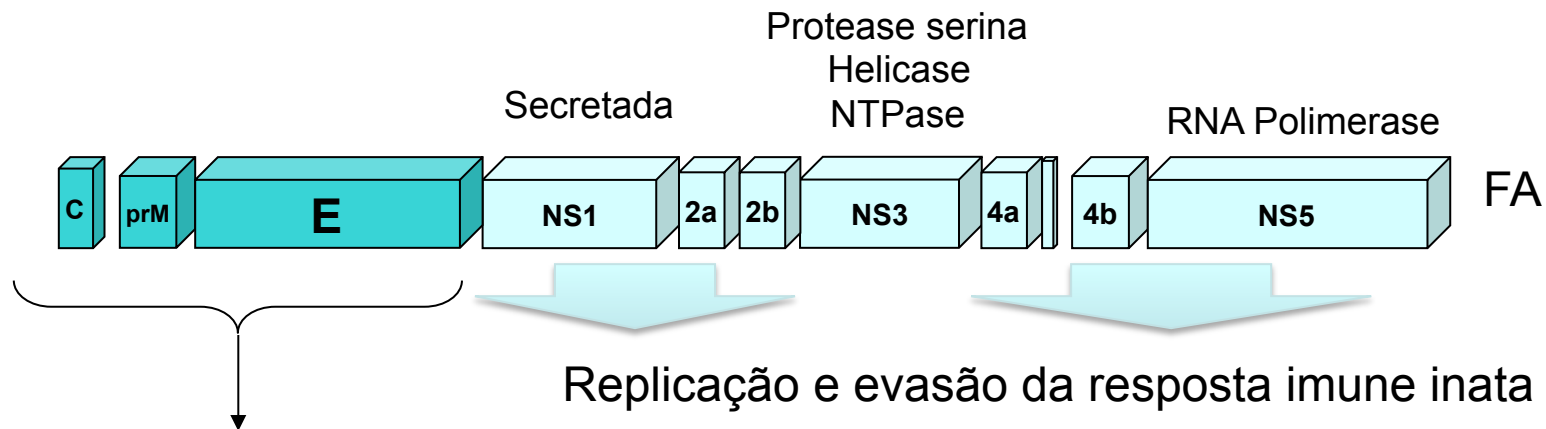
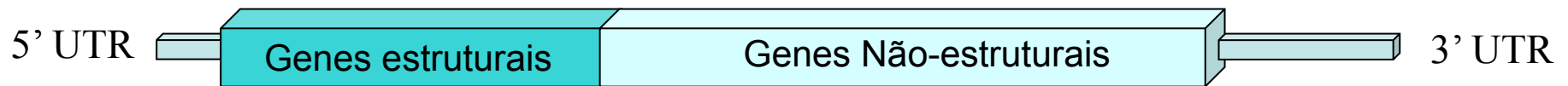
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

# Sistema de genética reversa do ZIKV

- Clone infeccioso da cepa africana ARB13565 (1976, *Aedes Africanus*)



# Sistema de genética reversa do ZIKV



**Envelope viral (Proteínas M e E)**  
**E: tropismo, ligação ao receptor, anticorpos neutralizantes**

**Nucleocapsídeo (RNA viral + proteína C)**



# Aplicações e perspectivas

- **Biologia molecular do vírus, competência vetorial e patogenia**
  - **Comparar ≠ ZIKV: Africana x Asiática.**
    - **Replicação e tropismo *in vitro*;**
      - » Células de mamíferos e inseto.
    - **Replicação no mosquito;**
    - **Estudo de neurovirulência em animais;**
      - **Camundongos, embrião de galinha e zebrafish;**
        - » **Laboratório Nacional de Biociências, Campinas – SP.**

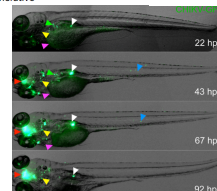
OPEN ACCESS Freely available online



## Real-Time Whole-Body Visualization of Chikungunya Virus Infection and Host Interferon Response in Zebrafish

Nuno Palha<sup>1,2,3</sup>, Florence Guivel-Benhassine<sup>4,5</sup>, Valérie Briolat<sup>1,2</sup>, Georges Lutfalla<sup>6,7</sup>, Marion Sourisseau<sup>4,5,8a</sup>, Felix Ellett<sup>8b</sup>, Chieh-Huei Wang<sup>8</sup>, Graham J. Lieschke<sup>8</sup>, Philippe Herbomel<sup>1,2</sup>, Olivier Schwartz<sup>4,5</sup>, Jean-Pierre Levrard<sup>1,2\*</sup>

1 Institut Pasteur, Macrophages et Développement de l'Immunité, Department of Developmental and Stem Cells Biology, Paris, France, 2 CNRS URA2578, Paris, France, 3 Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, 4 Institut Pasteur, Virus et Immunité, Department of Virology, Paris, France, 5 CNRS URA3015, Paris, France, 6 CNRS UMRS235, Dynamiques des Interactions Membranaires et Pathologiques, Montpellier, France, 7 Université Montpellier II, Montpellier, France, 8 Australian Regenerative Medicine Institute, Monash University, Clayton, Victoria, Australia



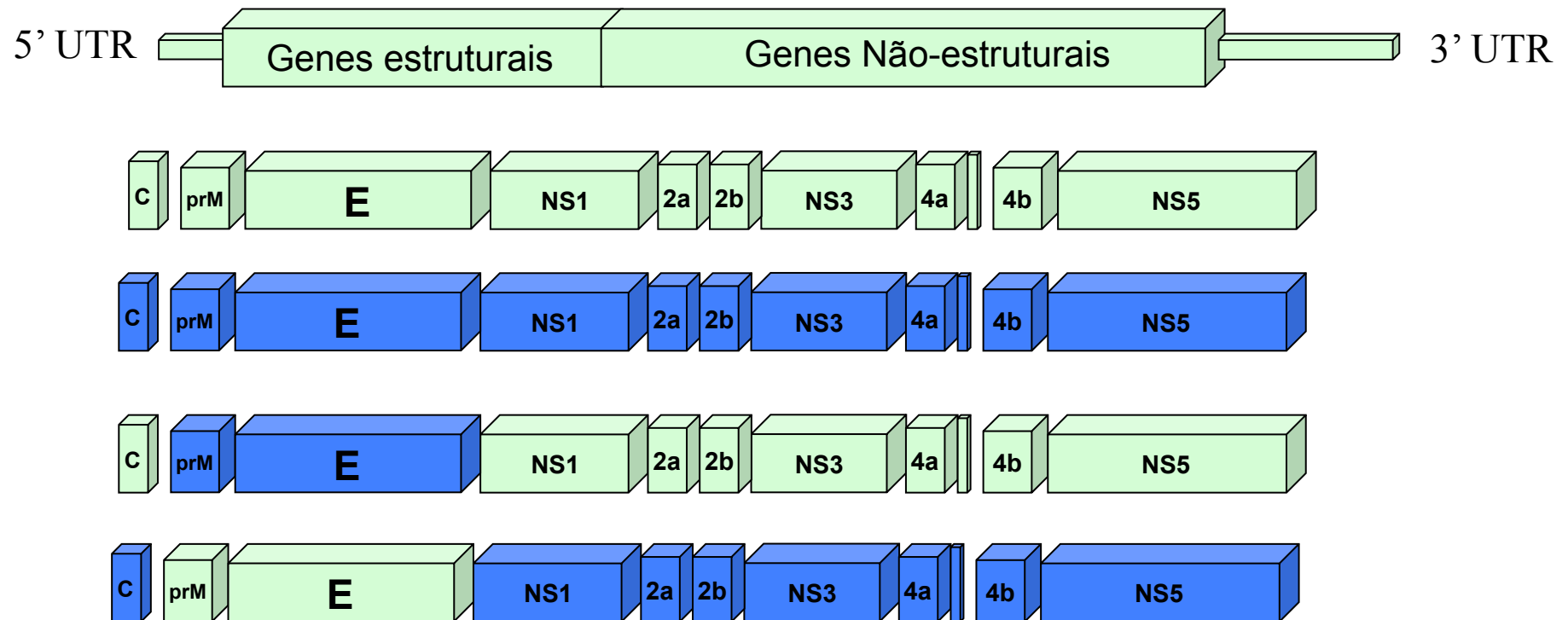
ZEBRAFISH  
Volume 11, Number 1, 2014  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
DOI: 10.1089/zeb.2013.0920

## Zebrafish: Modeling for Herpes Simplex Virus Infections

Thessicar Evadney Antoine,<sup>1</sup> Kevin S. Jones,<sup>2</sup> Rodney M. Dale,<sup>3</sup> Deepak Shukla,<sup>1</sup> and Vaibhav Tiwari<sup>1,4</sup>

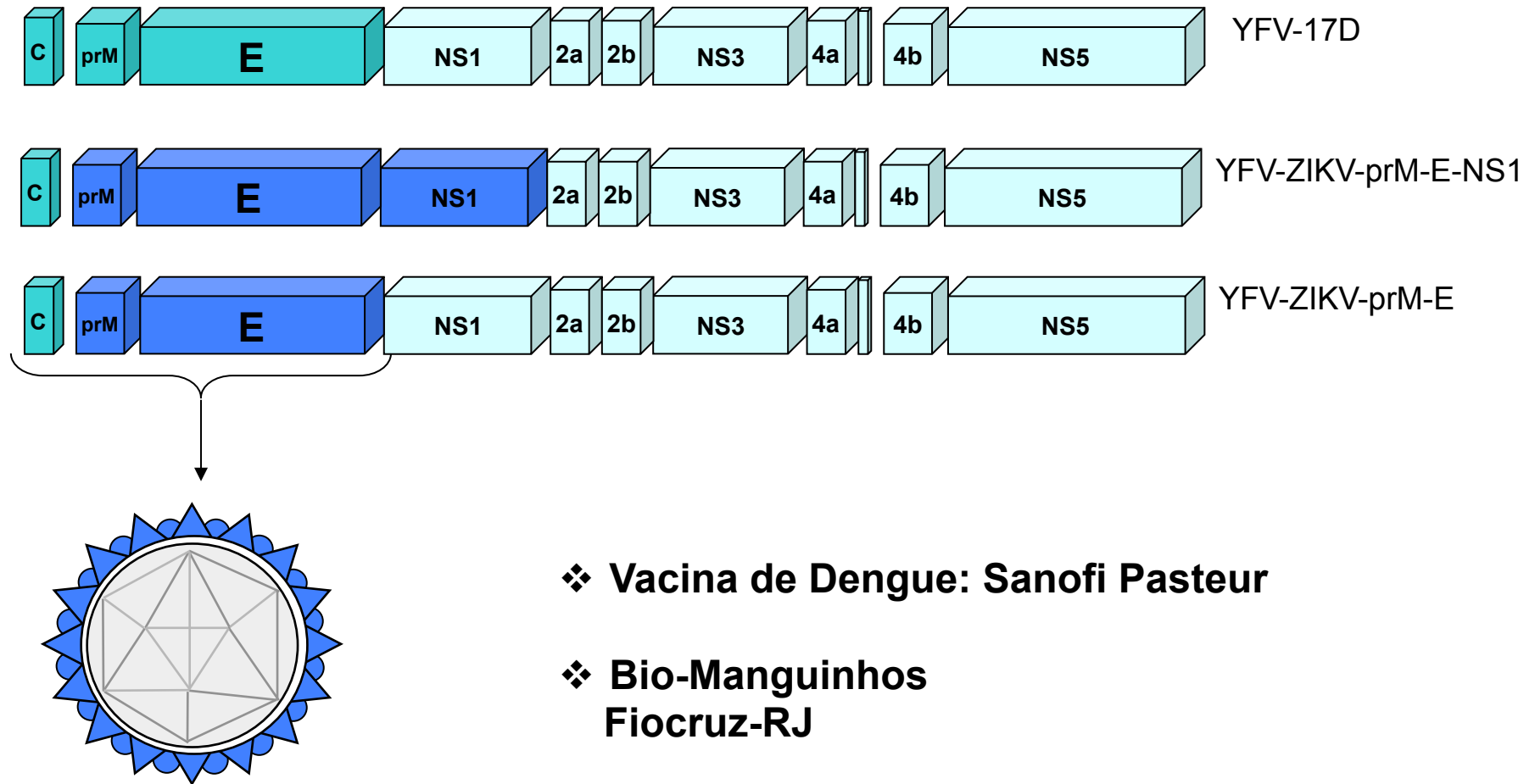
# Aplicações e perspectivas

- Asiática ≠ Africana:
  - Neurovirulência e replicação.
- Construção de quimeras e mutantes;
- Quimeras com outros flavivírus.



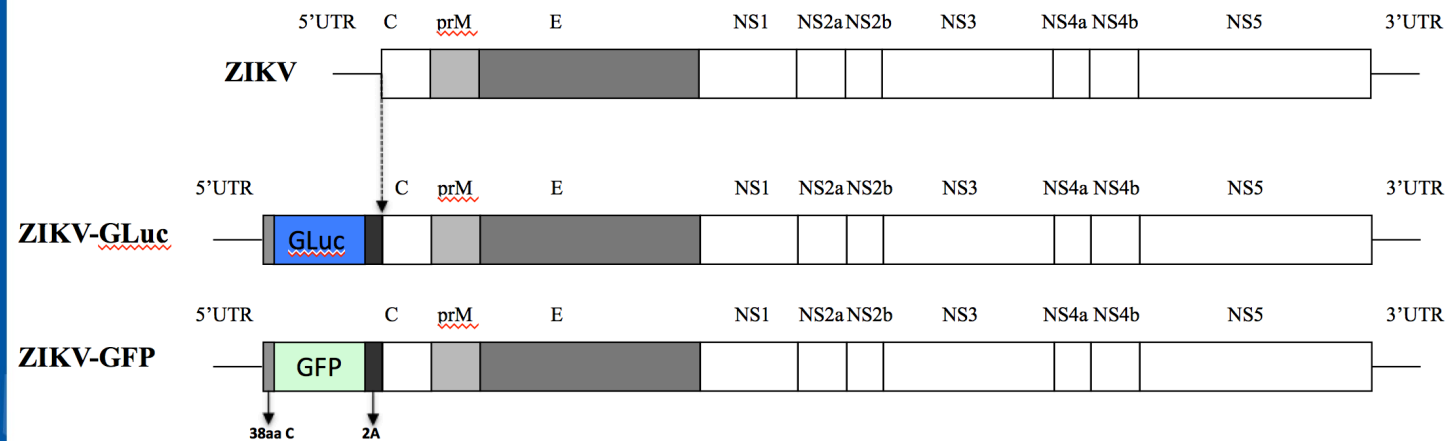
# Desenvolvimento de Vacina

- Vacina quimérica: YFV-17D e ZIKV



# Aplicações e perspectivas

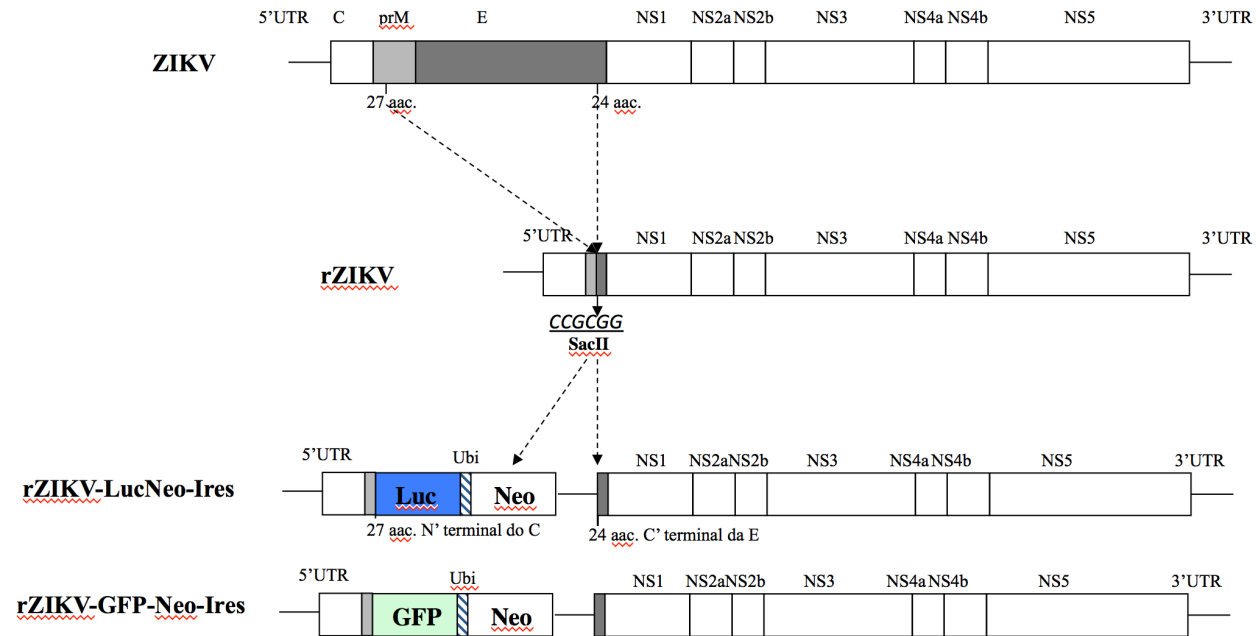
## ■ Desenvolvimento de vírus repórteres



## ■ Aplicações:

- Patogenia e replicação viral:
  - *In vivo* ou *in vitro*;
- Competência vetorial;
- Outras...

# Replicons Bicistrônicos repórteres



## ■ Aplicações

- Pesquisa de antivirais;
- Estudo da biologia molecular do ZIKV;
- Evasão do sistema imune;
- Outras...

# Agradecimentos

- **Departamento de Virologia – CPqAM-Fiocruz**
  - Dra. Marli Tenório Cordeiro;
  - Alunos de pós-graduação, pós-docs e técnicos.
- **Colaboradores:**
  - **Laboratório Nacional de Biociências, Campinas-SP.**
    - » Dr. Kleber Franchini
    - » Dr. Lúcio Freitas
    - » Dr. Márcio Chaim
    - » Dr. José Xavier Neto
  - **Centro de Pesquisas René Rachou, CPqRR - Fiocruz**
    - » Dra. Tânia Almeida e Dr. Carlos Zani
  - **Dr. Marcos Freire, Bio-Manguinhos.**
  - **Dr. Marcos Sorgine, UFRJ.**
  - **Dr. John Hiscott, Instituto Pasteur, Itália.**
  - **Dra. Nolwenn Jouvenet, Instituto Pasteur, França.**
  - **Dr. Alessandro Marcello, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology – ICGEB, Itália.**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

# Obrigada!

[laura@cpqam.fiocruz.br](mailto:laura@cpqam.fiocruz.br)

[lgilfiocruz@gmail.com](mailto:lgilfiocruz@gmail.com)