

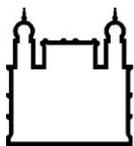
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical

Introdução e análise filogenética do Vírus Zika no estado do Rio de Janeiro

Allison de Araújo Fabri

Rio de Janeiro
23 de fevereiro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical

Allison de Araújo Fabri

Introdução e origem do Vírus Zika no estado do Rio de Janeiro

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador (es): Dra. Ana Maria Bispo de Filippis
Dr. Marcos César de Lima Mendonça

RIO DE JANEIRO
23 de fevereiro de 2018

Fabri, Allison de Araújo .

Introdução e análise filogenética do Vírus Zika no estado do Rio de Janeiro / Allison de Araújo Fabri. - Rio de Janeiro, 2018.

123 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

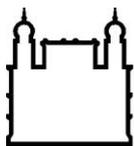
Orientadora: Ana Maria Bispo de Filippis.

Co-orientador: Marcos César Lima de Mendonça.

Bibliografia: f. 110-121

1. ZIKV. 2. Rio de Janeiro. 3. RT-PCR em tempo real. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical

AUTOR: Allison de Araújo Fabri

Introdução e origem do Vírus Zika no estado do Rio de Janeiro

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Ana Maria Bispo de Filippis e Prof. Dr. Marcos César de Lima Mendonça

Aprovado em: 23/02/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão (IOC/FIOCRUZ) - Presidente

Prof. Dr. Guilherme Amaral Calvet (INI/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo (UFRN)

Prof. Dra. Nieli Rodrigues da Costa Faria (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Fernando Couto Motta (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 23 de fevereiro de 2018.

À Thamires Fabri,
à memória de Kiara
e para Tucça,
pelo que sou.

AGRADECIMENTOS

Nestes dois anos, em que fiz esta pesquisa, passei por muitos desafios, mas todo o “suor” e todos os esforços valeram demais.

Todo o aprendizado, o amadurecimento e os momentos que vivi durante essa jornada são inesquecíveis e de um valor inestimável.

Primeiramente, quero agradecer aos meus orientadores, Dra. Ana Maria Bispo e Dr. Marcos de Mendonça, por todo o apoio, dedicação e conhecimento passado no desenvolver deste trabalho e também pela amizade que foi essencial durante todo esse tempo. Vocês sempre terão destaque especial na minha vida. Meus sinceros agradecimentos!

À Dra. Rita Nogueira, pela oportunidade, conhecimento e atenção dedicada.

À Dra. Flávia Barreto, que me recebeu muito bem quando eu estava começando no laboratório e teve uma grande valia no desenvolver de meu conhecimento.

Ao José Farias, pela sabedoria, conversas, conselhos e momentos de descontração. À Thiara Manuele, pelos “puxões” de orelha e incentivo. À Cintia Damasceno, pela amizade, e por ter sido a pessoa a qual eu mais recorri quando precisei de ajuda. À Celeste Torres, por estar sempre disposta a ajudar e me passar seu conhecimento. À Carolina Santos, pela compreensão e ajuda no dia-a-dia. À Nieli Faria, pelas discussões e incentivo que contribuíram para este trabalho. À Angélica Mares-Guia, pelo carinho, amizade e risadas. Ao Ronaldo Lapa, pela disposição e proatividade. À Suelen Soares, pela parceria e apoio.

A todos do Laboratório de Flavivírus, Aline Santos, Flávia Levy, Solange Regina, Leda Santos, Eliane Araújo, Everton Rodrigues, Patrícia Sequeira, Simone Sampaio, Marcelle Santos, Sheila Cheles, Ana Lúcia, Raquel Medialdea, Marco Horta, Nívia Oliveira, Bianca Gonçalves e a Monique Queiroz e Fernanda de Bruycker. O laboratório teve muito a me oferecer e busquei adquirir o máximo de experiências e aprendizado neste período, com certeza todos vocês me ajudaram muito.

Aos amigos de turma (MedTrop2016).

Ao Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, pela grande ajuda, disponibilizando o sequenciador.

Ao Dr. Eduardo de Mello Volotão, por ser o revisor deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Eduardo de Mello Volotão, Dr. Guilherme Amaral Calvet, Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo, Dra. Nieli Rodrigues da Costa Faria e Dr. Fernando do Couto Motta.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Por fim, agradeço em especial a minha esposa, Thamires Fabri, que sempre esteve em total disposição a ajudar, não só por este trabalho, mas por todos estes nove anos de parceria. Tenho certeza que você é a que mais compartilha de minha felicidade. Obrigado, não estaria aqui hoje se não fosse por você.

E aos meus familiares, meu pai, minha mãe, meus irmãos e minha eterna melhor amiga Kiara, que mesmo não estando mais aqui, sempre me dá forças para seguir em frente. Vocês foram de uma importância sem igual em tudo que me foi necessário, apostam e torcem por em mim, e seguramente estarão me apoiando e me guiando por todo meu caminho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

INTRODUÇÃO E ORIGEM DO VÍRUS ZIKA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

O Brasil no ano de 2015 confirmou o primeiro caso autóctone de transmissão do Vírus Zika (ZIKV) e partir de então enfrentou uma emergência de saúde pública em relação ao aumento dramático no número de casos e o aumento de 20 vezes no número de recém-nascidos com microcefalia, cujas mães eram suspeitas de terem contraído infecção por ZIKV durante a gestação. Existem três hipóteses baseadas em estudos utilizando análise filogenética, que sugerem que o ZIKV foi introduzido no Brasil durante um campeonato de canoagem em agosto de 2014, durante a Copa do Mundo em 2014 ou durante a Copa das Confederações em junho de 2013. No entanto, esses estudos não deixam clara a cidade que foi a porta de entrada do vírus no país. O Rio de Janeiro que é considerado o maior polo turístico do país hospedou vários eventos de massa entre 2012 e 2015, além de ter sido a porta de entrada para três dos quatro sorotipos de dengue no país. Esses fatores determinaram o desenvolvimento desse estudo retrospectivo com o objetivo de pesquisar ZIKV em amostras de pacientes com clínica compatível com infecção pelo ZIKV que tiveram resultado não detectável para os vírus dengue e da rubéola, no período compreendido entre 2012 a 2014. Foram submetidas à PCR em tempo real 630 amostras de soro. ZIKV não foi detectado em nenhuma das amostras, dessa forma sugerimos que no período do estudo poderia estar ocorrendo uma baixa circulação ou que não havia circulação de ZIKV no estado do Rio de Janeiro. Ademais do estudo retrospectivo, o genoma completo de três amostras de ZIKV do Rio de Janeiro correspondentes aos anos 2015, 2016 e 2017 foram sequenciadas e analisadas. As amostras de 2015 e 2016 não tiveram substituições de aminoácido entre elas, enquanto a amostra de 2017 teve cinco substituições comparadas com as demais. As três amostras tiveram a substituição V2634 quando comparadas com a cepa referência da Polinésia Francesa, além das cinco substituições observadas somente na amostra de 2017. A partir de uma árvore filogenética gerada neste estudo, utilizando as três amostras e sequências de região codificante completa do ZIKV obtidas no GenBank, confirmamos a circulação do genótipo asiático do ZIKV no estado do Rio de Janeiro, as sequências das Américas foram divididas em oito grupos monofiléticos e as amostras de 2015 e 2016 que sequenciamos foram incluídas no grupo monofilético 3 e a amostra sequenciada de 2017 foi incluída no grupo G5c. A partir da análise desta árvore e da observação de uma maior divergência da amostra de 2017 foi possível identificar que esta amostra era proveniente de um caso cuja infecção ocorreu fora do Rio de Janeiro. Identificamos que a maioria dos grupos monofiléticos possuem alterações de aminoácido específicas para cada grupo e que com o passar dos anos, mais divergentes as amostras ficam em relação ao seu ancestral. O Brasil apresenta a maior diversidade de sequências das Américas. A análise filogenética revela que as cepas epidêmicas contemporâneas têm acumulado múltiplas substituições em relação aos seus antepassados asiáticos que podem ter aumentado a virulência e a dispersão do vírus e dificulta o desenvolvimento de vacinas, uma vez que as mutações podem causar variação antigênica.

Palavras-chave: ZIKV, Rio de Janeiro, RT-PCR em tempo real.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INTRODUCTION AND ORIGIN OF ZIKA VIRUS IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

Allison de Araújo Fabri

Brazil in the year 2015 confirmed the first autochthonous case of ZIKV transmission and since then faced a public health emergency in relation to the dramatic increase in the number of cases and a 20-fold increase in the number of newborns with microcephaly, whose mothers were suspected of having contracted ZIKV infection during gestation. There are three hypotheses based on studies using phylogenetic analysis, which suggest that ZIKV was introduced in Brazil during a canoeing championship in August 2014, during the World Cup in 2014 or during the Confederations Cup in June 2013. However, these studies do not make clear the city that was the gateway of the virus in the country. Rio de Janeiro, considered the country's largest tourist pole, hosted several mass events between 2012 and 2015, as well as being the gateway to three of the four dengue serotypes in the country. These factors led to the development of a retrospective study with the objective of investigating ZIKV in samples from patients with a clinic compatible with ZIKV infection from the period 2012 to 2014 that had undetectable results for dengue and rubella virus. A total of 630 serum samples were submitted to real-time PCR, ZIKV was not detected in any of the samples, so we suggest that during the study period there could be occurring a low circulation or no circulation of ZIKV in the state of Rio de Janeiro. In addition to the retrospective study, as the second main objective, the complete genome of three Rio de Janeiro ZIKV samples corresponding to the years 2015, 2016 and 2017 were sequenced and analyzed. The 2015 and 2016 samples did not have amino acid substitutions between them, while the 2017 sample had five substitutions compared to the others. The three samples had the V2634 substitution when compared to the reference strain of French Polynesia, in addition to the five substitutions observed only in the 2017 sample. From a phylogenetic tree generated in this study, using the three samples and complete coding region sequences of ZIKV obtained from GenBank, confirmed the circulation of the Asian ZIKV genotype in the state of Rio de Janeiro, the Americas sequences were divided into eight monophyletic groups and the 2015 and 2016 samples we sequenced were included in the monophyletic group 3 and the sequenced sample of 2017 was included in the G5c group. From the analysis of this tree and the observation of a greater divergence of the sample of 2017 it was possible to identify that this sample came from a case whose infection occurred outside Rio de Janeiro. We have identified that most of the monophyletic groups have specific amino acid changes for each group and that with the passage of the most divergent years the samples are in relation to their ancestor. Brazil presents the greatest diversity of sequences in the Americas. Phylogenetic analysis reveals that contemporary epidemic strains have accumulated multiple substitutions over their Asian ancestors that may have increased virulence and spread of the virus and hindered the development of vaccines, since mutations may cause antigenic variation.

Keywords: ZIKV, Rio de Janeiro, real-time RT-PCR.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Histórico.....	20
1.2	Introdução do ZIKV No Brasil.....	21
1.3	Agente Etiológico.....	22
1.3.1	Classificação.....	22
1.3.2	Morfologia do ZIKV.....	23
1.3.3	Estrutura do genoma.....	24
1.4	Transmissão.....	27
1.5	Vetor.....	28
1.6	Epidemiologia.....	30
1.6.1	Zika nas Américas.....	31
1.6.2	Zika no Brasil.....	32
1.7	Epidemiologia Molecular.....	36
1.8	Aspectos clínicos e Patogênicos.....	37
1.9	Diagnóstico.....	39
1.9.1	Clínico e epidemiológico.....	39
1.9.2	Laboratorial.....	39
1.10	Sequenciamento.....	41
1.11	Prevenção e controle.....	42
1.12	Justificativa.....	43
2	OBJETIVOS.....	45
2.1	Objetivo geral.....	45
2.2	Objetivos específicos.....	45
3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	46
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1	Análise retrospectiva.....	47
4.1.1	Critérios de inclusão.....	47
4.1.2	Critérios de exclusão.....	47
4.1.3	Metodologia.....	47
4.1.4	Extração do RNA viral.....	47
4.1.5	RT-PCR em tempo real.....	48

4.2	Sequenciamento completo da ORF do ZIKV do ano de 2015, 2016 e 2017.....	50
4.2.1	Descrição das três amostras sequenciadas.....	56
4.2.2	RT-PCR convencional para obtenção dos fragmentos e posterior sequenciamento completo.....	56
4.2.3	Eletroforese em gel de agarose.....	58
4.2.4	Purificação do DNA.....	58
4.2.5	Quantificação do DNA.....	59
4.2.6	Caracterização genotípica.....	59
4.2.7	Reação de sequenciamento.....	60
4.2.8	Purificação do produto da reação de sequenciamento.....	61
4.2.9	Eletroferograma.....	61
4.2.10	Análise Filogenética.....	61
5	RESULTADOS.....	62
5.1	Análise retrospectiva.....	62
5.1.1	RT-PCR em tempo real da análise retrospectiva.....	62
5.2	Sequenciamento completo da ORF do ZIKV dos anos de 2015, 2016 e 2017.....	62
5.2.1	RT-PCR convencional para o sequenciamento da ORF do ZIKV das três amostras do período de 2015 a 2017.....	62
5.2.2	Análise Filogenética.....	63
5.2.3	Comparação entre as amostras do estado do Rio de Janeiro no período de 2015 a 2017 e com amostra de referência.....	69
5.2.4	Similaridade das sequencias brasileiras (ORF).....	73
5.2.5	Similaridade das sequencias das Américas (ORF).....	79
6	DISCUSSÃO.....	95
7	CONCLUSÕES.....	107
8	PERSPECTIVAS.....	109
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
10	ANEXOS.....	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura da partícula viral (Chancey et al. 2015).....	24
Figura 2.1: Representação estrutural do ZIKV (Adaptado de Freire et al. 2014)...	25
Figura 3.1: Modos de transmissão do ZIKV (Rodriguez-Morales et al. 2016).....	28
Figura 4.1: Países com transmissão autóctone do ZIKV por meio de transmissão vetorial (2015-2017) (OPAS, 2017).....	31
Figura 5.1: Indicação para o diagnóstico segundo o dia de início dos sintomas (OPAS, 2016b).....	41
Figura 1.4: Alinhamento dos iniciadores utilizados para o sequenciamento completo do ZIKV.....	55
Figura 1.5: Quantificação por eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos amplificados por RT-PCR da amostra 5420/2016, utilizando 24 pares de iniciadores.....	63
Figura 2.5: Árvore filogenética baseada na região codificante completa das três amostras do Rio de Janeiro sequenciadas no estudo e todas as sequências da região codificante completa disponíveis no GenBank.....	64
Figura 3.5a: Árvore filogenética baseada na região codificante completa das três amostras do Rio de Janeiro sequenciadas no estudo e todas as sequências das Américas da região codificante completa disponíveis no GenBank.....	65
Figura 3.5b: Árvore filogenética do grupo monofilético 1 baseada na região codificante completa de sequências das Américas.....	66
Figura 3.5c: Árvore filogenética do grupo monofilético 2 baseada na região codificante completa de sequências das Américas.....	66
Figura 3.5d: Árvore filogenética do grupo monofilético 3 baseada na região codificante completa de sequências das Américas.....	67
Figura 3.5e: Árvore filogenética do grupo monofilético 4 baseada na região codificante completa de sequências das Américas.....	67
Figura 3.5f: Árvore filogenética do grupo monofilético 5 baseada na região codificante completa de sequências das Américas.....	68
Figura 3.5g: Árvore filogenética do grupo monofilético 6 baseada na região codificante completa de sequências das Américas.....	68

Figura 3.5h: Árvore filogenética do grupo monofilético 7 baseada na região codificante completa de sequências das Américas.....	69
Figura 3.5i: Árvore filogenética do grupo monofilético 8 baseada na região codificante completa de sequências das Américas.....	69
Figura 3.5j: Árvore filogenética do grupo monofilético não definido baseada na região codificante completa de sequências das Américas.....	69
Figura 3.6a: Diversidade de sequências das Américas.....	87
Figura 3.6b: Diversidade de regiões das sequências das Américas.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Número de casos prováveis e incidência de zika, por região e estado, até a Semana epidemiológica 35, Brasil, 2016 e 2017 (SVS/MS, 2017).....	35
Tabela 1.4: Reagentes utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real.....	49
Tabela 2.4: Parâmetros de ciclagem para a reação de RT-PCR em tempo real...	49
Tabela 3.4: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos do gene do Envelope do ZIKV (Lanciotti et al. 2008).	50
Tabela 4.4: Sequências dos iniciadores utilizados para o sequenciamento do genoma completo do ZIKV (Quick et al. 2017).....	51
Tabela 5.4: a) Parâmetros de termociclagem na RT-PCR convencional para o sequenciamento. b) Reagentes para a RT-PCR convencional para o sequenciamento.....	57
Tabela 6.4: Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.....	60
Tabela 7.4: Parâmetros de termociclagem para a reação de sequenciamento....	60
Tabela 1.5: Amostras analisadas por ano e resultado de qRT-PCR da análise retrospectiva.....	62
Tabela 2.5: Substituições de nucleotídeos e aminoácidos das três amostras do ZIKV sequenciadas neste estudo comparadas com amostra de referência. French_Polynesia/2013/KX447510.1.....	72
Tabela 3.5: Matriz de similaridade de nucleotídeos baseada na região codificante completa (C→NS5) dos grupos monofiléticos do ZIKV do Brasil.....	75
Tabela 4.5: Matriz de diferença de nucleotídeos baseada na região codificante completa (C→NS5) dos grupos monofiléticos do ZIKV do Brasil.....	76
Tabela 5.5: Matriz de similaridade de aminoácidos baseada na região codificante completa (C→NS5) dos grupos monofiléticos do ZIKV do Brasil.....	77
Tabela 6.5: Matriz de diferença de aminoácidos baseada na região codificante completa (C→NS5) dos grupos monofiléticos do ZIKV do Brasil.....	78
Tabela 7.5: Diferença de aminoácidos das amostras das Américas.....	82
Tabela 8.5: Análise das substituições citadas em artigos referenciados.....	91

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL – microlitro

aa – aminoácido (s)

AVE – tampão de eluição

BLAST – ferramenta de pesquisa de alinhamento, do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*.

BWAV – vírus Bwamba

C – proteína estrutural de capsídeo

CHIKV – Vírus Chikungunya

CR – Complexo de replicação

CT – Limiar de detecção

ddNTPs – dideoxynucleotídeos

DENV – Vírus Dengue

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxinucleotídeo

E – proteína de envelope

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública

EUA – Estados Unidos da América

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

G1, G2, G3, G4, G5a, G5b, G5c, G6, G7, G8 – Grupos monofiléticos

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IC – Intervalo de confiança

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

JEV – Vírus da Encefalite Japonesa

Kb – quilobase

LABFLA – Laboratório de Flavivírus

ml – mililitro

MR766 – protótipo da cepa africana do Vírus Zika

MS – Ministério da Saúde

NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 – proteínas não estruturais do Vírus Zika

nm – nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde
ORF – fase aberta de leitura, do inglês “open Reading frame”
prM – precursora da proteína de membrana
qRT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, em tempo real
RE – retículo endoplasmático
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotação por minuto
RpRd – RNA polimerase RNA-dependente
RT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SE – semana epidemiológica
SGB – síndrome de Guillain-Barré
SVS – Serviço de Vigilância em Saúde
TBE – tampão de lavagem
TBEV – Vírus da encéfopata
WNV – Vírus do Oeste do Nilo, do inglês, West Nile Virus
YFV – Vírus da Febre Amarela, do inglês, Yellow Fever Virus
ZIKV – Vírus Zika

A – Alanina
R – Arginina
N – Asparagina
D – Aspartato
C – Cisteína
Q – Glutamina
E – Ácido glutâmico
G – Glicina
H – Histidina
I – Isoleucina
L – Leucina
K – Lisina
M – Metionina
F – Fenilalanina
P – Prolina

S – Serina

T – Treonina

W – Triptófano

Y – Tirosina

V – Valina

1- INTRODUÇÃO

Em março de 2015, o Brasil confirmou, na Bahia, o primeiro caso autóctone de transmissão pelo Vírus Zika (ZIKV) e após alguns meses enfrentou sua maior emergência em saúde pública já descrita na era moderna devido ao aumento dramático no número de recém-nascidos com microcefalia e outras malformações congênitas, cujas mães foram acometidas pela infecção do ZIKV durante a gestação (Ministério da Saúde, 2017). O vírus se espalhou rapidamente pelo continente americano e um ano depois, a circulação autóctone do ZIKV foi relatada em pelo menos 33 países nas Américas (Sampathkumar; Sanchez, 2016).

Os sintomas clínicos da zika podem ser confundidos com outras duas arboviroses circulantes no Brasil, a dengue e a chikungunya, portanto não se pode descartar a possibilidade de que casos com resultado negativo para pesquisa de umas dessas duas arboviroses ocorridos antes de 2015 pudessem estar relacionados à infecção pelo ZIKV. Para o Brasil e para as Américas, o arbovírus mais recente é o ZIKV. Embora diversos estudos tenham contribuído para a compreensão da biologia evolutiva dos flavivírus (Kuno et al. 1998), existem poucos dados sobre a biologia evolutiva do ZIKV. De acordo com as características genotípicas, estudos recentes descrevem três grandes linhagens: a Linhagem Africana II, a Linhagem Africana I e a Linhagem Asiática. Sendo que as duas últimas foram descritas fora do continente africano, espalhando-se para Ásia e Américas, a partir de 2007 (Shen et al. 2016). Desde então o ZIKV passou a apresentar comportamento epidêmico, gerando surtos em vários países da região do Pacífico e nas Américas (Musso; Gubler, 2016). Desde o primeiro artigo publicado em 1952 até 2015 foram publicados 124 artigos sobre ZIKV, sendo 37 no ano de 2015. Somente em 2016 e 2017, após a emergência do vírus no Brasil e sua dispersão por toda região das Américas, foram publicados 3271 artigos e no ano de 2018 já foram publicados, até oito de fevereiro, 242 artigos. Dezenas de novas informações relacionadas à apresentação clínica, gravidade da doença, diferentes formas de transmissão e patogênese do vírus foram descritas no intervalo de pouco mais de dois anos. Apesar de todo o conhecimento gerado, ainda existem perguntas sem respostas e o objetivo desse estudo é contribuir com informações complementares para o entendimento da epidemiologia da doença e assim como das características biológicas do vírus.

1.1- Histórico

O ZIKV foi identificado à primeira vez em 1947, durante um estudo de dez anos (1937-1947) sobre febre amarela na floresta de Zika em Uganda, a partir da amostra de sangue de um macaco rhesus sentinela colocado na copa de uma árvore (Haddow et al. 2012; Vasconcelos, 2015). Um total de dez vírus distintos foi isolado no Instituto de Pesquisa de Febre Amarela, em Entebbe, Uganda. Entre eles sete foram descritos pela primeira vez, são eles: Vírus do Oeste do Nilo (WNV) e Vírus Bwamba (BWAV) em 1937, o Vírus da Floresta de Semliki em 1942, Vírus Bunyamwera e Vírus Ntaya em 1943 e Uganda S Vírus e ZIKV em 1947. Quatro destes vírus foram relacionados e pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (WNV, Ntaya, Vírus de Uganda S e ZIKV) (Kindhauser et al. 2016; Musso; Gubler, 2016). Em 1948, buscando também isolar o Vírus da Febre Amarela (YFV), entomologistas coletaram diferentes espécies de mosquitos e os experimentos identificaram o ZIKV em *Aedes africanus* (Dick et al. 1952; Hayes, 2009). Após, embora o ZIKV tenha sido isolado em diversas ocasiões a partir de *Aedes africanus*, não havia nenhuma indicação de que o vírus causasse doença em humanos. No entanto, um inquérito sorológico envolvendo moradores de várias áreas de Uganda revelou uma soroprevalência de 6,1% contra ZIKV. Outros inquéritos sorológicos indicaram uma distribuição geográfica muito maior de infecção humana, incluindo o Egito, África Oriental, Nigéria, Índia, Tailândia, Vietnã, Filipinas e Malásia (Musso; Gubler, 2016; Petersen et al. 2016).

A primeira descrição clínica da infecção pelo ZIKV ocorreu em 1954 na Nigéria, onde uma menina de dez anos apresentou dores de cabeça e febre por cinco dias. Desde então, até 2007, menos de 20 casos naturalmente infectados foram relatados (Musso; Gubler, 2016; Petersen et al. 2016). Após, alguns casos esporádicos foram relatados no sudeste da Ásia, incluindo a Malásia, Indonésia, Índia, Camboja, Paquistão, Filipinas, Singapura, Tailândia e Vietnã (Sampathkumar; Sanchez, 2016).

O primeiro grande surto de zika relatado ocorreu em 2007 na Ilha do Pacífico Ocidental de Yap, na Micronésia, causado por uma cepa da linhagem asiática. Estima-se que 70% da população da ilha tenham sido infectadas pelo ZIKV, mostrando que o vírus se espalhou para fora de sua distribuição geográfica usual (Musso; Gubler, 2016; Petersen et al. 2016).

Após isso, uma epidemia maior ocorreu na Polinésia Francesa, no Pacífico Sul em 2013 e 2014, com uma estimativa de 30.000 infecções sintomáticas, que difere do surto na Ilha de Yap devido à ocorrência de casos de síndrome de Guillan-Barré (SGB) associadas à infecção. A incidência de casos de SGB durante o surto foi de 20 vezes maior do que o esperado, apoiando assim uma ligação da SGB com ZIKV (Musso; Gubler, 2016). Até 2013, o Vírus Dengue (DENV) era o único arbovírus detectado na Polinésia Francesa. A cepa do ZIKV encontrada no surto da Polinésia Francesa tinha 99,9% de identidade nucleotídica e de aminoácidos com a cepa asiática observada no surto da Ilha Yap, sugerindo que o surto da Polinésia Francesa tenha tido sua origem na ilha. O ZIKV se espalhou em 2014, chegando à Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa e em 2015 em Vanuatu, Ilhas Salomão, Samoa e Fiji. A sequência de nucleotídeos da cepa do ZIKV na Ilha de Páscoa era 99,9% idêntica na região que foi sequenciada à cepa do ZIKV no surto da Polinésia Francesa, sugerindo então que o surto na Ilha de Páscoa tenha se originado também na Polinésia Francesa (Basu; Tumban, 2016; Cao-Lormeau, 2016).

Em março de 2015, o vírus foi identificado pela primeira vez no Brasil em um surto de uma doença exantemática ocorrido na Bahia. Em setembro de 2015, em Pernambuco, o ZIKV foi associado com a descrição de complicações neurológicas graves como a microcefalia em recém-nascidos. Em outubro do mesmo ano, o vírus foi detectado em 14 estados brasileiros e em dezembro, estima-se que até 1,3 milhão de casos suspeitos tenham ocorrido (Petersen et al. 2016; Ministério da Saúde, 2017). Em outubro do mesmo ano, a Colômbia registrou o primeiro caso de transmissão autóctone do ZIKV fora do Brasil. Em 01 de fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que o surto de infecção pelo ZIKV constituía uma emergência de saúde pública internacional devido a possível ligação com a microcefalia e outras síndromes neurológicas (Gulland, 2016; Musso; Gubler, 2016).

1.2- Introdução do ZIKV no Brasil

O ZIKV foi identificado no Brasil pela primeira vez, em março de 2015, causando um surto de uma doença exantemática, com febre baixa ou ausente, em Camaçari,

Bahia. Sete casos, de vinte e quatro suspeitos, foram positivos para ZIKV, sendo este o primeiro relato da introdução do vírus no país (Campos et al. 2015).

Após isso, também em março do mesmo ano, foram confirmados, através de RT-PCR, oito casos positivos de ZIKV em Natal/RN, de um total de vinte e um suspeitos que apresentaram febre por um curto período de tempo, exantema, conjuntivite e artralgia. Todos os pacientes foram negativos para DENV e CHIKV, ambos, vírus que cocirculavam com ZIKV. Com base na análise filogenética, ZIKV foi identificado pertence ao genótipo asiático (Zanluca et al. 2015).

Foram relatados retrospectivamente surtos de doenças exantemáticas no Brasil. Desde fevereiro de 2015 um surto de doença exantemática afetou milhares de pacientes no Nordeste do Brasil, principalmente na Bahia, Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe e Paraíba (Campos et al. 2015).

Já no início de dezembro de 2015, 18 estados no Brasil confirmaram a transmissão autóctone do vírus em todas as regiões do país. No entanto, o ZIKV provavelmente já estava circulando em outros estados, mas ainda não tinha sido detectado (Musso; Gubler, 2016).

1.3- Agente etiológico

1.3.1- Classificação

Os arbovírus são um grupo de vírus mantidos na natureza principalmente através de ciclos que envolvem vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados suscetíveis (Figueiredo, 2007; Fauci e Morens, 2016). Do inglês “**arthropode-borne**” acrescentando a palavra vírus, este grupo constitui um grupo bastante heterogêneo considerando suas propriedades físico-químicas, porém com características epidemiológicas em comum (Gubler, 1988).

Como denominada, os arbovírus requerem no mínimo dois hospedeiros, sendo um artrópode e um vertebrado. Esses vírus geralmente não causam nada ao artrópode, sendo este infectado durante o repasto sanguíneo, já nos hospedeiros vertebrados, produzem alta viremia, causando problemas de saúde. (Gubler, 1988).

Os arbovírus têm uma distribuição geográfica ubíqua, abrangendo todos os continentes, tanto nas regiões temperadas como nas tropicais, com predominância nas regiões tropicais por oferecerem condições ecológicas mais favoráveis. Nos

trópicos, os vetores coexistem com os hospedeiros vertebrados em todas as estações do ano, ao passo que nos países de clima temperado, o ciclo de transmissão é interrompido durante o inverno, reiniciando-se na primavera ou verão (Travassos da Rosa et al. 1997).

Estima-se que haja mais de 545 espécies de arbovírus, dentre as quais, mais de 150 deles estão relacionados com doenças em seres humanos, onde a maioria é zoonótica (Lopes et al. 2014). Taxonomicamente, os arbovírus são divididos em diversas famílias, porém, as mais representativas para a saúde pública por causar infecções em humanos e em animais, são: *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Flaviviridae* (Bolling et al. 2014; Lopes et al. 2014).

A família *Flaviviridae* é composta pelos gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus*, sendo *Flavivirus* o mais representativo por contemplar a maioria dos vírus causadores de doenças humanas (Assenberg et al. 2009). Alguns vírus desta família possuem grande importância médica, tais como o Vírus da Febre Amarela, Vírus Ilhéus, Vírus Rocio, Vírus da Encefalite de São Luís, Vírus do Nilo Ocidental, Vírus da Encefalite Japonesa, Vírus Dengue e Vírus Zika (Casseb et al. 2013; Gatherer; Kohl, 2016). O ZIKV é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, tem esse nome devido à floresta onde foi identificado pela primeira vez; na língua Luganda “zika” significa “mato”. O nome da família *Flaviviridae* (do latim flavus “amarelo”) é derivado da febre amarela, uma doença humana causada por um flavivírus que causa uma icterícia característica. Os membros dessa família têm entre 40 a 60 nm de diâmetro, com capsídeo icosaédrico e envelope firmemente aderidos contendo o genoma. O genoma é composto de RNA de fita simples de sentido positivo. O vírus está intimamente relacionado com o DENV e, portanto, testes de anticorpos também têm problemas distinguindo os dois vírus devido à reatividade cruzada (Bollati et al. 2010; Zanluca; Santos, 2016).

1.3.2- Morfologia do ZIKV

Os ZIKV são pequenas partículas esféricas e envelopadas de aproximadamente 40 nm de diâmetro. Contém três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (componente estrutural do nucleocapsídeo), membrana (proteína transmembrana que interage com a proteína do envelope) e envelope (principal e maior proteína

estrutural; Intervém na montagem da partícula viral; interação com receptores celulares e fusão de membranas; principal alvo para anticorpos neutralizantes) (Murphy, 1980; Heinz; Stiasny, 2012).

Múltiplas cópias da proteína do capsídeo encapsulam o RNA de cadeia simples e polaridade positiva, que contém aproximadamente 11 kb de comprimento, formando o nucleocapsídeo. Este nucleocapsídeo tem de 25 a 30 nm de diâmetro com simetria icosaédrica e é envolto por lipídeos derivados da célula hospedeira, no qual estão ancoradas as proteínas de membrana e do envelope (Figura 1.1) (Wahid et al. 2016; Sirohi et al. 2016).

A proteína do envelope do ZIKV contém em torno de 500 aminoácidos e possui quatro domínios: o domínio de haste transmembranar que ancora a proteína a membrana e os domínios I, II, e III que predominantemente constituem a porção da superfície. Esta proteína cobre uma grande parte da superfície do vírus e desempenha um papel de ligação durante a fusão e replicação. Já a proteína de membrana tem em torno de 75 aminoácidos e é um fragmento obtido da proteólise da proteína Pré-Membrana (Demir; Kilic, 2016).

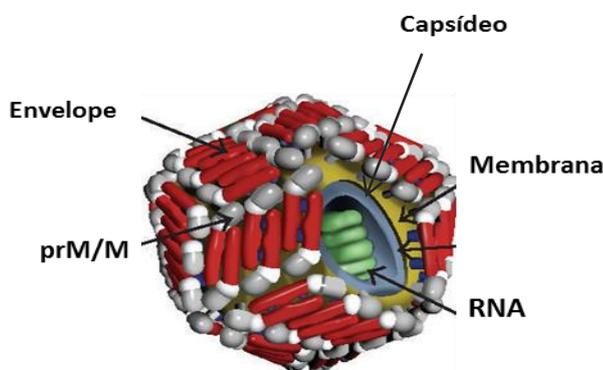


Figura 1.1: Estrutura da partícula do ZIKV (Chancey et al. 2015)

1.3.3- Estrutura do genoma

O RNA genômico tem uma única fase aberta de leitura (ORF) que é flanqueada por regiões 5' e 3' não codificantes que atuam como sítio de ligação e ativação da polimerase viral, contém uma sequência complementar a outra na região 3', uma região que atua promovendo a replicação viral e contém estruturas essenciais para a replicação viral (Lodeiro et al. 2009; Villordo et al. 2015). O genoma é traduzido para

uma única poliproteína que é subsequentemente clivada por enzimas virais e da célula hospedeira, resultando em três proteínas estruturais que formam o vírus (capsídeo, pré-membrana e envelope) e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, que estão envolvidos na replicação, montagem, e repressão da resposta inata do hospedeiro à infecção (Figura 2.1) (Logan, 2016; Sirohi et al. 2016; Wahid et al. 2016)

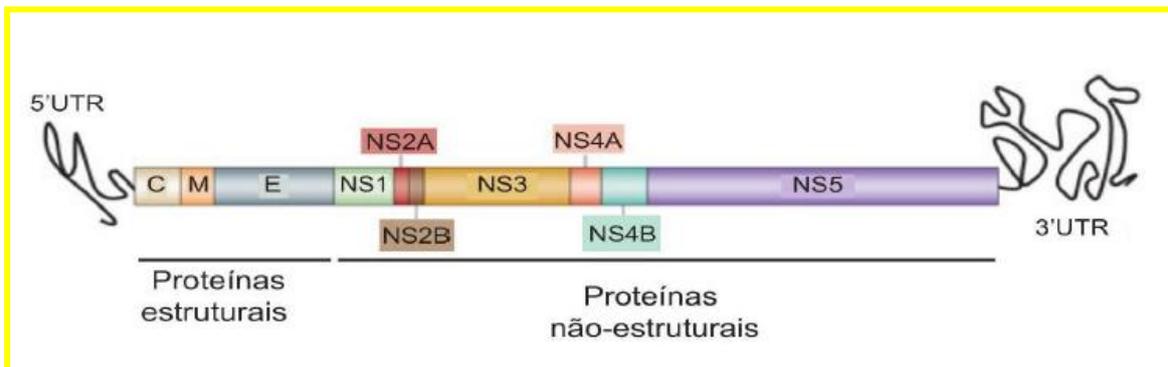


Figura 2.1: Representação estrutural do ZIKV (adaptado de Freire et al. 2014).

De maneira geral a proteína NS1 (~ 48 kDa) está envolvida na morfogênese da partícula viral (Muylaert et al. 1997). Apresenta-se em três formas: retidas no interior das células infectadas, localizadas na superfície celular e secretada. Ela é translocada para o retículo endoplasmático (RE) e clivada na extremidade C-terminal da proteína do envelope por uma peptidase do hospedeiro e na junção NS1/NS2A por enzimas presentes no RE (Lindenbach et al. 2007). A NS1 atua como um cofator no processo de replicação viral (Muller; Young, 2013).

A NS2A é uma proteína hidrofóbica, relativamente pequena (~22KDa). Sua extremidade N-terminal é gerada através da clivagem na junção NS1/NS2A por enzimas do RE. A clivagem na junção NS2A/NS2B é realizada por uma serina protease NS2B-NS3. A NS2A participa do processo de montagem da partícula viral e do complexo de replicação (CR) do RNA, interagindo com as proteínas NS3 e NS5. A NS2B também é uma pequena proteína (~14KDa), associada à membrana. Forma um complexo estável com a NS3 e atua como um cofator para a serina protease NS2B-NS3 (Lindenbach et al. 2007).

A proteína NS3 é conservada entre os Flavivírus, apresentando atividade de protease e helicase (Henchal; Putnak, 1990). É uma grande proteína multifuncional (~70KDa), contendo diversas atividades necessárias para o processamento da

poliproteína e replicação do RNA. A extremidade N-terminal da proteína é o domínio catalítico do complexo de serina protease da NS2B-NS3. Além da clivagem da NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5, a protease gera as extremidades C-terminal da proteína do capsídeo madura e NS4A, podendo decompor a NS2A e NS3 internamente (Lindenbach et al. 2007).

A NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas (~16 KDa e ~27 KDa, respectivamente). A NS4A apresenta interação genética com NS1, estando envolvida na replicação do RNA como um dos componentes do complexo de replicação. A NS4B está localizada com a NS3 nas estruturas membranosas derivadas do RE, possivelmente o sítio de replicação do RNA (Lindenbach; Rice, 1999).

A NS5 é uma proteína grande, com aproximadamente 103 KDa, e assim como a NS3 é conservada entre os flavivírus e multifuncional, com função metiltransferase e RNA polimerase RNA-dependente (RpRd) (Henchal; Putnak, 1990). Junto com a NS3 participa do processo de replicação viral, sendo um dos componentes do complexo de replicação.

Forma um complexo com NS3 e pode estimular a atividade NTPase e RTPase (Lindenbach et al, 2007).

Não está claro como o ZIKV evoluiu para uma pandemia. Foi observado que existe uma sequência de 12 nucleotídeos a mais na região do envelope do vírus que levou à epidemia Yap Island em 2007 e que não estava presente no protótipo do vírus MR766 isolado em Uganda. Esta sequência de quatro aminoácidos corresponde ao sítio 154 de glicosilação da proteína do envelope que pode desempenhar um papel na virulência ou na adaptação ao hospedeiro humano. No entanto, mais pesquisas são necessárias para esclarecer o papel da glicosilação na patogênese da infecção pelo ZIKV (Lanciotti et al. 2008).

Uma mutação na proteína NS1 nas amostras mais atuais do ZIKV pode aumentar a eficácia de transmissão do ZIKV de humanos para mosquitos, aumentando sua prevalência em mosquitos, o que pode ter contribuído para a aceleração da propagação do vírus nos últimos anos. Isto ajuda a explicar por que esse vírus, descoberto na África em 1947, passou a provocar epidemias cada vez maiores a partir de 2013, quando um surto foi registrado na Polinésia Francesa (Liu et al. 2017).

1.4- Transmissão

O ZIKV, nas Américas, é mantido na natureza por um ciclo de transmissão que envolve hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, com o homem atuando como fonte de infecção (Gubler, 2002; Loos et al. 2014; Basarab et al. 2016).

O principal meio de contrair a infecção pelo ZIKV é através da picada do vetor (Ministério da Saúde, 2015). Fatores relacionados ao ambiente, do vetor, do ZIKV e do hospedeiro influenciam a transmissão desse patógeno e seu controle. A transmissão vetorial do vírus se dá através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Hayes, 2009; Valle et al. 2015; Basarab et al. 2016; Fauci e Morens, 2016). Os macacos rhesus podem ser a fonte inicial de infecções em humanos, através da picada de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (várias outras espécies deste gênero também têm sido implicadas fora das Américas), em macacos infectados e posterior transmissão para hospedeiros humanos suscetíveis (Petersen et al. 2016). Além desse meio de transmissão, outros meios de transmissão são relatados (Figura 3.1) (Basarab et al. 2016; Rodriguez-Morales et al. 2016).

O isolamento do vírus no sêmen, dezessete dias após o diagnóstico clínico de infecção aguda, e a detecção do RNA do ZIKV no sêmen, sessenta e dois dias após o início dos sintomas, embasam a transmissão sexual, e uma vez que o risco de transmissão sexual do ZIKV existe, há uma recomendação para que homens que residem ou tenham viajado para uma área de transmissão do ZIKV e apresentem sintomas compatíveis considerem a abstinência sexual ou o uso do preservativo durante a relação sexual, especialmente se a parceira é uma mulher grávida (Basarab et al. 2016; Rodriguez-Morales et al. 2016).

Foi detectado ZIKV em aproximadamente 3% dos doadores de sangue assintomáticos durante o surto na Polinésia Francesa, sugerindo que a transmissão pode ser possível através da doação de sangue infectado. Também houve relatos de transmissão através de transplante de órgãos e acidente de laboratório (Rodriguez-Morales et al. 2016).

Também ocorre transmissão transplacentária e transmissão perinatal, com o RNA do ZIKV sendo encontrado no líquido amniótico e em amostras de sangue pareadas colhidas de neonatos e mães. (Calvet et al. 2016).

Apesar de o vírus ter sido encontrado em saliva, urina e gotículas respiratórias, não existem evidências, até o momento, para dar suporte à transmissão via estes fluidos corporais (Basarab et al. 2016).

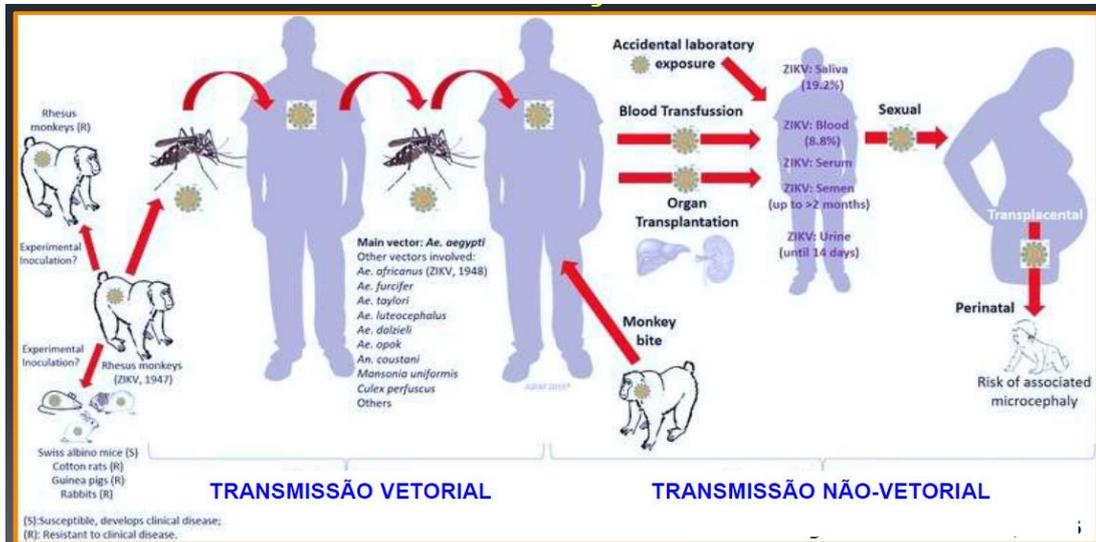


Figura 3.1: Modos de transmissão do ZIKV (adaptado de Rodriguez-Morales et al. 2016).

A infecção do mosquito vetor (fêmea) pelo ZIKV se inicia a partir da ingestão de partículas virais infecciosas (presentes no sangue humano) durante o repasto sanguíneo. Após o período do repasto, há o período de incubação que varia de oito a 12 dias para que o vírus possa replicar-se no estômago do mosquito e chegar às glândulas salivares. O vírus será inoculado em um novo hospedeiro, durante um novo repasto sanguíneo, pelas glândulas salivares do vetor, agora contaminadas, iniciando assim um novo ciclo. (Salazar et al. 2007; Chan; Johansson, 2012). Outra forma de infecção do mosquito vetor se dá pela transmissão transovariana ou vertical, passando da fêmea contaminada aos seus descendentes sem a necessidade de outro hospedeiro (Anderson; Rico-Hesse, 2006).

1.5- Vetor

O Brasil teve ótimas condições para o surgimento do ZIKV em relação a vetor, uma vez que *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* têm uma ampla distribuição geográfica no país. *Aedes aegypti* é disperso no Brasil, especialmente na região

Norte, Nordeste e Sudeste e *Aedes albopictus* tem grande população em áreas subtropicais, especialmente no sul do país (Musso; Gubler, 2016).

Aedes aegypti e *Aedes albopictus* têm sido associados com quase todos os surtos de zika nas Américas, embora outras espécies também tenham sido consideradas para serem vetores nas Ilhas de Yap e Polinésia Francesa, como *Aedes hensilli* e *Aedes polynesiensis* (Petersen et al. 2016).

Ambos, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* picam principalmente durante o dia e são amplamente distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. *Aedes albopictus* vivem em áreas mais temperadas do que *Aedes aegypti*, aumentando assim os locais em que podem ocorrer surtos. *Aedes albopictus* é amplamente distribuído no leste dos Estados Unidos e Havaí (onde causou surtos de dengue) (Petersen et al. 2016).

O isolamento de um vírus de uma espécie de mosquito não é evidência de que a mesma seja um vetor do vírus. Para demonstrar que uma espécie é um vetor, ela deve ser capaz de transmissão. *Aedes aegypti* tem uma alta capacidade vetorial, muito maior do que a de outros mosquitos do gênero, uma vez que vive em estreita associação com a habitação humana, se alimenta para maturar os ovos principalmente de seres humanos e, além disso, tem uma picada quase imperceptível (Petersen et al. 2016).

Aedes aegypti é a principal espécie de vetor do ZIKV e está distribuída em áreas tropicais e subtropicais do mundo. É uma espécie doméstica que se reproduz preferencialmente em água estagnada e limpa, acumulada em recipientes geralmente fabricados pelo homem, como pneus, vasos de plantas, latas, cisternas, entre outros. As fêmeas são as responsáveis pela transmissão e dispersão do vírus e uma única fêmea, se infectada, pode infectar várias pessoas (Demir; Kilic, 2016). Como em outros continentes, o crescimento populacional humano rápido e urbanização descontrolada, levando a favelas com infraestrutura inadequada e água encanada, fazem com que fique muito difícil reduzir as populações de *Aedes aegypti* para níveis seguros (Marconde; Ximenes, 2016).

O vírus atualmente foi isolado de diversos mosquitos do gênero *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes africanus*, *Aedes hensilli*, *Aedes polynesiensis*, *Aedes furcifer*, *Aedes vitattus*) e, mais recentemente, a partir de um mosquito doméstico, *Culex quinquefasciatus* (Basu; Tumban, 2016).

1.6- Epidemiologia

Grandes proporções das regiões tropicais e subtropicais do mundo possuem condições ambientais para manutenção da transmissão do ZIKV e mais de 2,17 bilhões de pessoas vivem nestas áreas. Atualmente, mais de 73 países nos cinco continentes relataram a infecção pelo ZIKV (Ministério da Saúde, 2017). Os países mais afetados e com maior risco de ser infectado pelo ZIKV são: Nigéria, Congo, Uganda e Tanzânia na África, Índia, Indonésia, China e Bangladesh na Ásia e nas Américas: Brasil, Colômbia, México e Venezuela (Messina et al. 2016).

O elevado potencial para a propagação deste vírus é evidenciado por vários fatores, como os surtos recentes, a velocidade pelo qual o vírus se espalhou nas Américas e a detecção de casos importados em diferentes regiões do mundo. Diversos casos importados de zika foram relatados em viajantes que retornaram de áreas endêmicas e epidêmicas. Estas importações aumentam o risco de disseminação do ZIKV para áreas onde potenciais vetores competentes estão presentes, especialmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

O primeiro caso importado de zika na Europa foi relatado em um viajante alemão infectado na Tailândia em novembro de 2013. Outros casos na Alemanha teriam sido importados de Borneo e Malásia em setembro de 2014 e do Haiti em dezembro de 2015. A espécie de vetor *Aedes albopictus* tem uma distribuição limitada na Alemanha, e *Aedes aegypti* não está presente, o que diminui o risco de disseminação (Musso; Gubler, 2016).

No entanto, a transmissão através de meios sem a participação do vetor é um fator preocupante, que deve ser levado em consideração na adoção de medidas profiláticas, a fim de evitar a disseminação do ZIKV. Outras formas de transmissão como, por exemplo, a transmissão sexual e a sanguínea podem ter um impacto epidemiológico em países não endêmicos, uma vez que o vírus pode permanecer infectante no sêmen por semanas após o desaparecimento dos sintomas (Basarab et al. 2016; Rodriguez-Morales et al. 2016).

1.6.1- Zika nas Américas

Do início 2015 até agosto de 2017, 48 países nas Américas confirmaram casos autóctones de transmissão vetorial do ZIKV (figura 4.1), e cinco países relataram casos de zika por transmissão sexual (OPAS, 2017).



Figura 4.1: Países com transmissão autóctone do ZIKV por meio de transmissão vetorial (2015-2017) (OPAS, 2017). Acessado em 03/01/2018.

Nos Estados Unidos a área de transmissão do ZIKV diminuiu bastante a partir de 2017, não havendo mais nenhuma área com transmissão do ZIKV ativa na Flórida e um caso de transmissão local no Texas (OPAS, 2017).

No México, observou-se um aumento de casos confirmados entre a semana 16 e a semana 27 de 2017, semelhante ao visto para a dengue no país durante o mesmo período. Aproximadamente 51% dos casos confirmados de zika nas primeiras 32 semanas de 2017 correspondem aos estados de Nayarit (171 casos), Tamaulipas (146 casos) e San Luis Potosí (123 casos). O número de casos confirmados nesses estados é superior ao reportado em 2015-2016 (OPAS, 2017).

Na América Central, observou-se um pequeno aumento nos casos suspeitos e confirmados devido a um aumento relatado em Belize e Costa Rica, com uma média de 117 casos suspeitos e confirmados entre as semanas 21 e 30 de 2017. No Caribe, casos esporádicos continuam sendo relatados, com uma média semanal de 252 casos suspeitos e confirmados relatados entre as semanas 21 e 30 de 2017. Em Porto Rico, o número de casos está diminuindo (OPAS, 2017).

Na América do Sul, observou-se uma queda de casos suspeitos e confirmados, com exceção do Equador, onde foi relatado um aumento no número de casos suspeitos e confirmados entre a semana 4 e 20 de 2017. Entre as semanas 21 e 30 de 2017, foi relatado uma média de 293 casos suspeitos e confirmados (OPAS, 2017).

Desde outubro de 2015, um total de 27 países e territórios nas Américas relataram casos confirmados de síndrome congênita associada à infecção pelo ZIKV. A Guiana foi adicionada à lista de países e territórios que relataram casos de síndrome congênita associada à infecção pelo ZIKV (OPAS, 2017).

1.6.2- Zika no Brasil

A zika provavelmente foi confundida com outras arboviroses por apresentar sinais e sintomas muito semelhantes, como por exemplo, a dengue. O vírus pode ter circulado silenciosamente por mais de um ano até os primeiros casos serem reportados. Um estudo retrospectivo confirmou que o ZIKV estava circulando no Rio de Janeiro em janeiro de 2015. (Campos et al. 2015, Brasil et al. 2016a, Petersen et al. 2016; Passos et al. 2017).

Com base nos poucos relatos mundiais anteriores sobre surtos de infecção pelo ZIKV, não parecia haver motivos para grande preocupação, pois não eram relatados casos graves ou fatais. Havia alguns poucos estudos que mostravam uma incerta possibilidade de associação com o aumento de casos de síndrome de Guillain Barré (SGB). No final de 2015, observou-se o aumento significativo de casos de microcefalia nos estados de Pernambuco e Paraíba (Brasil et al. 2016b; Petersen et al. 2016; Ministério da Saúde, 2017). O estado de Pernambuco foi o primeiro a relacionar que o possível aumento do número de casos de microcefalia poderia estar relacionado com a infecção congênita pelo ZIKV. Em novembro de 2015, o governo brasileiro, declarou Emergência Sanitária de Importância Nacional, devido ao aumento do número de casos de microcefalia em bebês, sobretudo no Nordeste, o que levou a uma “guerra” contra o *Aedes aegypti* considerado o principal vetor do ZIKV. Em alguns estados da região Nordeste houve um aumento de até 20 vezes no número de casos de recém-nascidos com microcefalia (Ministério da Saúde, 2017). No final deste mesmo ano, o vírus já havia se espalhado por quase todo o país (Musso; Gubler, 2016).

O Brasil foi o país mais afetado pelo ZIKV durante a epidemia nas Américas, tendo seu início possivelmente em 2014 (Ministério da Saúde, 2017).

O Ministério da Saúde em poucos dias de recebido a informação do aumento de casos de microcefalia possivelmente associados ao ZIKV, comunicou ao mundo a presença de uma mudança de padrão, após dois meses do início das investigações, a associação do ZIKV com a microcefalia foi confirmada e reconhecida. Depois do alerta brasileiro, a Polinésia Francesa reconheceu 17 casos de microcefalia após o surto de Zika, cuja média anterior era de 0-2 casos de microcefalia por ano (Cauchemez et al. 2016; Ministério da Saúde, 2017)

Em 2015 foram confirmados laboratorialmente três óbitos pelo ZIKV no país: em São Luís/MA, Benevides/PA e Serrinha/RN. Em 2016, foram registrados 216.207 casos prováveis de zika no país. Foram confirmados laboratorialmente oito óbitos - Rio de Janeiro (4), no Espírito Santo (2), no Maranhão (1) e na Paraíba (1). Em 2017, até a semana epidemiológica (SE) 35, foram registrados 15.586 casos prováveis de zika no país, com taxa de incidência de 7,6 casos/100 mil hab., destes, 6.679 (42,9%) foram confirmados. As regiões Centro-Oeste e Norte apresentaram as maiores taxas de incidência: 35,9 casos/100 mil hab. e 13,9 casos/100 mil hab., respectivamente. Entre os estados, destacaram-se Tocantins (62 casos/100 mil

hab.), Mato Grosso (59,4 casos/100 mil hab.) e Goiás (53,3 casos/100 mil hab.) (tabela 1.1). Em relação às gestantes, foram registrados 2.105 casos prováveis, sendo 728 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial (SVS/MS, 2016/2017).

O número de casos de zika no país caiu drasticamente entre 2016 e 2017 (tabela 1.1), sendo notificados 211.487 casos em 2016 para 15.586 casos em 2017, uma queda de mais de 92%. O Centro-Oeste apareceu em 2017 com a maior quantidade de casos confirmados 5.625, com uma incidência de 35,9 casos/100 mil hab., bem diferente do ano anterior, que mesmo com 33.712 casos registrados a região ficou em terceiro lugar de casos no país, o que sugere que o vírus continua migrando e/ou as medidas preventivas para eliminação do vetor não estão sendo eficazes. (SVS/MS, 2017).

Tabela 1.1: Número de casos prováveis e incidência de zika, por região e estado, até a Semana epidemiológica 35, Brasil, 2016 e 2017 (SVS/MS, 2017).

Região/Unidade da Federação	Casos (n)		Incidência (/100 mil hab.)	
	2016	2017	2016	2017
Norte	12.168	2.457	68,7	13,9
Roraima	120	230	23,3	44,7
Pará	4.357	650	52,7	7,9
Amapá	334	12	42,7	1,5
Tocantins	2.077	951	135,5	62,0
Nordeste	73.253	4.560	128,7	8,0
Maranhão	4.508	446	64,8	6,4
Piauí	225	162	7,0	5,0
Ceará	4.054	1.484	45,2	16,6
Rio Grande do Norte	3.567	277	102,6	8,0
Paraíba	3.719	101	93,0	2,5
Pernambuco	423	52	4,5	0,6
Alagoas	6.717	158	200,0	4,7
Sergipe	211	12	9,3	0,5
Bahia	49.829	1.868	326,2	12,2
Sudeste	91.530	2.865	106,0	3,3
Minas Gerais	13.722	767	65,4	3,7
Espírito Santo	2.252	306	56,7	7,7
Rio de Janeiro	70.539	1.458	424,0	8,8
São Paulo	5.017	334	11,2	0,7
Sul	824	79	2,8	0,3
Paraná	606	51	5,4	0,5
Santa Catarina	62	13	0,9	0,2
Rio Grande do Sul	156	15	1,4	0,1
Centro-Oeste	33.712	5.625	215,3	35,9
Mato Grosso do Sul	1.694	48	63,2	1,8
Mato Grosso	21.491	1.963	650,2	59,4
Goiás	10.195	3.566	152,3	53,3
Distrito Federal	332	48	11,2	1,6
Brasil	211.487	15.586	102,6	7,6

Até o momento o genótipo detectado no país é o asiático e, pouco se sabe sobre o impacto de linhagens deste genótipo na evolução da doença e sua relação com o vetor e as epidemias (Oliveira; Vasconcelos, 2016).

1.7- Epidemiologia Molecular

Haddow et al. 2012, Faria et al. 2016 e Wang et al. 2016 identificaram duas grandes linhagens de ZIKV: Africana e Asiática. No entanto, Shen et al. 2016 identificaram três linhagens, Africana I, Africana II e Asiática. A identificação da terceira linhagem (Africana II) foi possível porque o estudo de Shen et al. 2016 foi baseado em sequências do gene do Envelope e NS5, sendo que nenhum genoma das cepas de linhagem africana II foi completamente sequenciado, enquanto, as de outros estudos se basearam em sequências completas ou quase completas (Gong et al. 2016).

Considerando duas linhagens para ZIKV não é possível afirmar a origem e direção da propagação do vírus, enquanto a identificação de três linhagens apoia que ZIKV surgiu na África e depois se espalhou para a Ásia (Gong et al. 2016).

As análises filogenéticas do ZIKV têm o objetivo de investigar a diversidade genética e as relações existentes com outros arbovírus, bem com a influência sobre sua circulação. Os polimorfismos genéticos podem influenciar a circulação do vírus, uma vez que a variação antigênica desempenha um papel importante na capacidade de escape da resposta imune do hospedeiro e podem contribuir para compreender melhor a história epidemiológica, as rotas de difusão e para o planejamento de estratégias de prevenção (Giovanetti et al. 2016a).

O ZIKV teve origem na África e se espalhou por diferentes rotas para outros locais, incluindo as regiões Africanas (Senegal, Costa do Marfim e Uganda) e Asiáticas (Malásia, Micronésia, Polinésia Francesa). Os dados epidemiológicos suportam a hipótese de que as cepas epidêmicas do ZIKV surgiram através de alteração genética no vírus da cepa asiática e foram introduzidas no Brasil em 2015 (Musso; Gubler, 2016). No entanto, as cepas das Américas são geneticamente muito semelhantes entre si, com homologia de nucleotídeos de aproximadamente 99% (Petersen et al. 2016; Musso; Gubler, 2016).

As sequências já conhecidas do ZIKV mostram evidências de sua evolução a partir de modificações genéticas que interferiram em sua característica viral e assim em sua epidemiologia e patogenicidade. As diferenças entre linhagens do ZIKV podem ser explicadas, pois o mesmo tem mudado de característica genética em decorrência de sua abrangência geográfica (Kindhauser et al. 2016).

Estudos de filogenia molecular estão sendo usados para determinar a estrutura genética de populações de patógenos, além de explicar os fatores que produziram essa estrutura, nos permitindo assim, determinar a origem evolutiva dos vírus, associando-os ou não à gravidade de uma doença, além de possibilitar o monitoramento de genótipos mais virulentos em epidemias e esclarecer a patogênese viral, bem como o entendimento da influência do vetor na seleção das variantes genéticas. O mapeamento da incidência de cada genótipo dentro de um mesmo sorotipo permite, por exemplo, rastrear a origem do vírus e suas principais rotas de transmissão (Holmes, 1998).

O ZIKV vem sofrendo alterações genéticas, o que fez com que sua proteína do envelope lhe propiciasse a possibilidade de penetração em diferentes células do corpo humano com mais facilidade (Faye et al. 2014; Sirohi et al. 2016).

1.8- Aspectos clínicos e Patogênicos

O Brasil possui a maior diversidade de arbovírus do mundo e muitos deles são patógenos de humano. Atualmente existe a cocirculação de três arbovírus com circulação urbana de grande impacto para a saúde pública, são eles: o DENV, CHIKV e ZIKV. Mais recentemente outro arbovírus, o Vírus da Febre Amarela (YFV) voltou ao cenário epidemiológico do país devido a sua expansão para áreas da região sudeste onde não se tinha registro de casos há quase um século.

O surgimento do ZIKV é mais um desafio para a saúde pública, porque além das características clínicas que se sobrepõem com as doenças causadas pelo DENV e CHIKV (Musso; Gubler, 2016; Brasil et al. 2016b), ainda existem lacunas sobre as formas de transmissão, o que dificulta a adoção de medidas eficazes de controle.

O ZIKV passa aproximadamente dez dias em incubação extrínseca no mosquito, enquanto no homem, esse período de incubação varia de 3-6 dias e pouco tempo depois, surgem os sintomas da infecção (Kutsuna et al. 2014).

A maioria das infecções pelo ZIKV é assintomática (Ministério da Saúde, 2015; Bogoch et al. 2016). O vírus adquiriu uma baixa capacidade de estimular a resposta imunológica, inflamatória e a produção de anticorpos no hospedeiro, fato que pode estar relacionado com a grande parte dos quadros assintomáticos da infecção (Faye et al. 2014).

No caso de doença sintomática, o quadro clínico mais comum se assemelha ao de dengue e chikungunya. Os sinais e sintomas são caracterizados por início agudo de febre, exantema maculopapular, mialgia, conjuntivite não purulenta, fadiga, artralgia, cefaleia e mal-estar e também pode ocorrer edema, tosse seca e alterações gastrointestinais, principalmente vômitos, um complexo de sintomas que dificulta o diagnóstico diferencial. Formas graves e atípicas são raras, mas quando ocorrem podem até evoluir para óbito (Musso; Gubler, 2016).

Inicialmente a zika foi descrita como uma doença leve, autolimitada, sem complicações graves com uma baixa taxa de hospitalização. Esta descrição foi baseada em um número limitado de casos. No entanto, a zika tornou-se uma importante doença infecciosa, ligada a diversas malformações congênitas e síndromes neurológicas (Petersen et al. 2016).

No Brasil foi relatado um aumento de SGB, onde de janeiro a julho 2015, o país relatou 121 casos no Nordeste, onde 62% dos pacientes tinham sintomas característicos de zika anteriormente a SGB (Zanluca; Santos, 2016; Musso; Gubler, 2016).

A síndrome de Guillain-Barre normalmente se apresenta como paralisia muscular ascendente, progressiva, subaguda, com picos a cada quatro semanas e é acompanhado por ausência de reflexos. Normalmente afeta os membros sem o envolvimento de nervos cranianos, mas pode progredir e afetar os nervos faciais e também os músculos respiratórios (OPAS, 2016a).

A Microcefalia é uma anormalidade rara que pode causar deficiência intelectual, retardo no desenvolvimento, problemas motores, de visão e de audição, mas a microcefalia é apenas a “ponto do iceberg”, diversos outros problemas podem ocorrer devido à síndrome congênita pelo ZIKV, como por exemplo, artrogripose, esofagite, epilepsia, e más formações de diversos de órgãos (Ministério da Saúde, 2015; Brasil et al. 2016a; Miranda-Filho et al. 2016).

Os modos e características de transmissão incomum de ZIKV podem apresentar muitos desafios para o desenvolvimento de drogas e vacinas. Além disso, a cocirculação do DENV e ZIKV, que compartilham uma relação antigênica próxima nos níveis de anticorpos e células T, pode complicar a produção de uma vacina (Ngono; Shresta, 2018).

À medida que DENV e ZIKV estão intimamente relacionados, o conhecimento baseado em estudos DENV tem sido usado para priorizar a investigação da

imunidade e patogênese de ZIKV. Para ambos os vírus, o interferon é o mediador central da defesa do hospedeiro (Ngono; Shresta, 2018). A replicação do ZIKV ativa células T durante a fase aguda da infecção (Th1, Th2, Th9 e Th17) e a produção de interferon de tipo I em células infectadas (Musso; Gubler, 2016; Tappe et al. 2016)

1.9- Diagnóstico

1.9.1- Clínico e epidemiológico

O diagnóstico de zika é feito pela anamnese do paciente, para verificar se o mesmo viajou para áreas endêmicas, vive em locais onde o vírus está circulando, contatos sexuais, exposição ao vetor, e pela observação dos sinais e sintomas (Basarab et al. 2016).

A sintomatologia de uma infecção pelo ZIKV é semelhante à de outros vírus transmitidos por mosquitos, como DENV e CHIKV, que costumam circular em conjunto nas áreas onde ZIKV é endêmico. Além disso, outras doenças febris agudas devem ser consideradas, como: soro-conversão do HIV, escarlatina, infecção por rickettsias, leptospirose, parvovírus, enterovírus, rubéola e sífilis, entre outras. Portanto, o diagnóstico diferencial é amplo e complicado. Sendo assim, são necessários exames laboratoriais para auxiliar o diagnóstico etiológico (Demir; Kilic, 2016).

1.9.2- Laboratorial

Em uma infecção pelo ZIKV podem ocorrer alterações inespecíficas em exames laboratoriais, como: hipoalbuminemia, aumento de transaminases, leucopenia, trombocitopenia, aumento da desidrogenase láctica e de marcadores de atividade inflamatória (Musso; Gubler, 2016).

O diagnóstico laboratorial das infecções pelo ZIKV pode ser realizado por métodos diretos que visam isolar ou identificar o vírus ou por métodos indiretos, os quais consistem na detecção de anticorpos específicos do tipo IgM e IgG decorrentes da infecção.

O diagnóstico específico de zika é uma ferramenta importante para a confirmação dos casos e para a vigilância epidemiológica.

As técnicas utilizadas no diagnóstico da infecção pelo ZIKV por métodos diretos englobam o isolamento viral, seguido de imunofluorescência, considerado o “padrão ouro”, no entanto, este possui baixa sensibilidade e um elevado tempo para o resultado (Faye et al. 2013) e a detecção do ácido nucléico por RT-PCR em tempo real a partir de amostras de soro, urina e saliva, que é o método mais indicado para o diagnóstico por ser mais sensível e rápido (Ioos et al. 2014).

O diagnóstico por métodos indiretos consistem em testes sorológicos para pesquisa de anticorpos, como o MAC-ELISA (CDC) para detecção de anticorpos específicos contra o ZIKV, a imunofluorescência, teste de neutralização e redução de placa (PRNT), para detecção de anticorpos neutralizantes, esta técnica é mais utilizada como confirmatória ao MAC-ELISA e testes comerciais para a detecção de IgM ou IgG. Testes rápidos também têm sido desenvolvidos (Ioos et al. 2014; Granger et al. 2017).

Esses métodos apresentam uma limitação que é a possibilidade de haver reação cruzada com outros flavivírus, resultando em resultados falso-positivos (Ioos et al. 2014). Até o momento, não há disponibilidade de testes sorológicos específicos para ZIKV eficazes em áreas com circulação de outros flavivírus, como é o caso do Brasil, devido à reação cruzada de respostas imunológicas entre outros vírus da mesma família, como por exemplo, o DENV.

É importante considerar o período da doença em que o paciente se encontra para se decidir qual o tipo mais apropriado de teste que será utilizado para que se possa fazer uma correta interpretação dos resultados obtidos (Figura 5.1) (Sampathkumar; Sanchez, 2016).

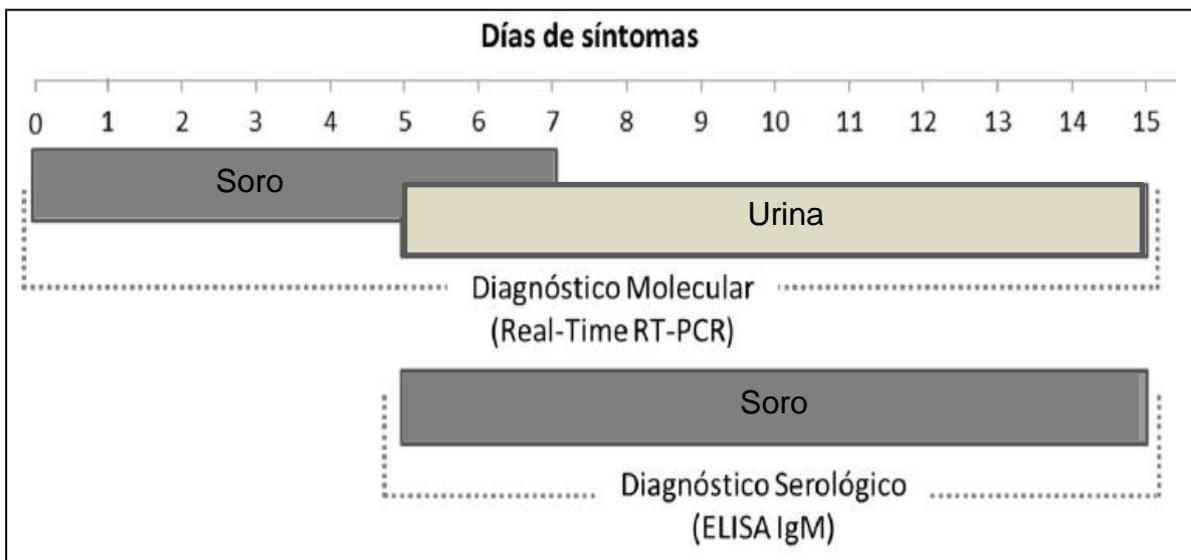


Figura 5.1: Indicação para o diagnóstico segundo o dia de início dos sintomas (OPAS, 2016b).

1.10- Sequenciamento

Embora a técnica de sequenciamento não seja considerada um método de diagnóstico para a zika, ela é utilizada como uma ferramenta complementar que pode ser utilizada na confirmação de um resultado de PCR, seja com iniciadores tipo-específicos ou genéricos, assim como na genotipagem do vírus.

Atualmente, existem diversas técnicas que usam os métodos moleculares em uma identificação simultânea para vários vírus como, por exemplo, sequenciamento do genoma (parcial ou completo) pelo método Sanger e o sequenciamento de nova geração, sendo dois já amplamente utilizados em todo o mundo (Carvalho; Silva, 2010). Outros dois sistemas de sequenciamento que começam a ser utilizados são a plataforma da Applied Biosystems, denominada SOLiD System, e o HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing (tSMS), da Helicos. Estas novas plataformas possuem como características em comum, o poder de gerar bilhões de informações num curto espaço de tempo, quando comparado ao sequenciamento por Sanger, porém são técnicas muito caras (Carvalho; Silva, 2010).

1.11- Prevenção e controle

A descrição de diferentes formas de transmissão do ZIKV vem requerendo a adoção de diferentes estratégias para o controle da doença.

Ainda não existe vacina para zika, sendo assim, as medidas de prevenção se baseiam no controle vetorial e proteção individual, evitando a exposição ao vetor com o uso de camisas de mangas compridas, calças e chapéus, repelentes (especialmente durante o dia, quando o *Aedes aegypti* está mais ativo), mosquiteiros, telas nas janelas e ar condicionado. As mulheres grávidas devem fazer a avaliação de sintomas da doença, o diagnóstico laboratorial durante o pré-natal e uma avaliação cuidadosa do feto para verificar anomalias cerebrais, incluindo microcefalia e calcificações intracranianas. Estas devem evitar viagens para áreas de circulação do vírus e o contato sexual desprotegido com parceiros que estão em risco de infecção (Sampathkumar; Sanchez, 2016).

O controle que é feito para o vetor transmissor da dengue fornece as bases para uma preparação adequada contra o ZIKV, uma vez que os dois vírus são transmitidos pelo mesmo mosquito. Um controle vetorial eficaz depende de uma abordagem integrada que envolva a eliminação de criadouros de *Aedes aegypti*, aplicação de larvicidas e aplicação de inseticidas para matar os mosquitos adultos (Sampathkumar; Sanchez, 2016).

Uma vez que há uma alta infestação de *Aedes aegypti* e também de *Aedes albopictus* é necessário intensificar as ações de controle do mosquito, principalmente na eliminação dos criadouros nos domicílios e em áreas comuns de bairros e cidades; organizar campanhas de limpeza urbana para eliminação de depósitos em áreas específicas em que a coleta de lixo não é regular, entre outras (MS, 2015).

Algumas estratégias novas que visam o controle vetorial têm sido desenvolvidas nos últimos anos, apresentando importantes evoluções. Uma medida utilizada contra a dengue é a adaptação endossimbiótica da bactéria *Wolbachia* de *Drosophila* no *Aedes Aegypti*, que tem demonstrado uma redução no tempo de vida do mosquito, além da redução da replicação do vírus (Hoffmann et al. 2011). Outra medida é a liberação na natureza de machos de *Aedes aegypti* geneticamente modificados carregando um gene dominante letal, que também tem se mostrado uma medida de controle biológico efetiva na redução de índices entomológicos (Harris et al. 2011). Óleos essenciais com ação larvicida e biopesticidas derivados de outros

microrganismos também estão sendo desenvolvidos (Veerakumar et al. 2013; Dias; Moraes, 2014).

Vacinas inativadas e atenuadas vivas foram desenvolvidas para diversos flavivírus, incluindo YFV, JEV, vírus da encefalopatia bovina (TBEV) e DENV. Foram feitos progressos rápidos e promissores em direção a uma vacina para a zika, porém ainda estão em fase de estudo (Shan et al. 2017).

Embora a transmissão vetorial pelo *Aedes aegypti* ainda não tenha sido totalmente confirmada como a principal, devido à escassez de registros na literatura descrevendo a detecção do ZIKV nesses mosquitos, o controle do vetor e o uso de repelentes são considerados as melhores estratégias para a prevenção desta arbovirose. A transmissão sexual e a transmissão por transfusão sanguínea também são descritas como vias de transmissão, sendo assim, enquanto não houver a disponibilidade de uma vacina ou um antiviral para o tratamento da doença, também devem ser consideradas como medidas de controle na prevenção da zika, o uso de preservativo e o controle dos bancos de sangue.

1.12- Justificativa

O ZIKV representa um sério problema de saúde pública, devido a sua distribuição geográfica, estando presente em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, e por sua relação com diversas malformações congênitas como a microcefalia e outras alterações neurológicas (Brasil et al. 2016a; Petersen et al. 2016; Zanluca; Santos, 2016).

Embora o tempo exato e o local de introdução do ZIKV nas Américas sejam desconhecidos, no final de 2014 estava sendo observada, em estados do Nordeste do Brasil, uma doença que causava erupções cutâneas (Campos et al. 2015; Zanluca et al. 2015)

Segundo estudo publicado por Brasil et al. (2016), um aumento de casos de doença exantemática no Rio de Janeiro começou a ser observado em abril de 2015. Neste estudo foi demonstrado, com base em critério clínico e diagnóstico laboratorial, que o ZIKV estava circulando no estado desde janeiro de 2015 e a partir de maio observou-se o aumento considerável de casos. No entanto, o vírus pode ter sido introduzido no estado antes de 2015 e talvez pela falta de condições ideais para

o vírus, o mesmo não conseguiu se implantar. No momento em que essas condições foram favoráveis ocorreu a epidemia.

Estudos filogenéticos e de caracterização molecular podem constituir uma importante ferramenta para monitorar a introdução e dispersão dos vírus, bem como prever as possíveis consequências epidemiológicas de tais eventos. Baseado em análises de sequências de amostras de ZIKV de diferentes estados brasileiros e de diversos países da região das Américas foi possível estimar quando e como ele se espalhou pelas Américas.

Com isso, existem hipóteses baseadas em análise filogenética que sugerem que o ZIKV foi introduzido no Brasil durante um campeonato de canoagem (VI Mundial Sprint, em agosto de 2014), ocorrido no Rio de Janeiro, no qual participaram equipes de quatro países do Pacífico, onde o vírus circulou durante 2014, ou durante a Copa do Mundo em 2014, quando muitos asiáticos circularam pelo país, ou foi introduzido no país durante a Copa das Confederações, evento-teste da Copa do Mundo, realizado em junho de 2013 (Faria et al. 2016; Musso 2015).

O vírus entrou no Brasil entre outubro de 2012 a agosto de 2014 (Faria et al. 2016; Ayllón et al. 2017; Faria et al. 2017; Metsky et al. 2017; Worobey et al. 2017; Zhang et al. 2017).

Devido aos estudos de análise filogenética que sugerem que o ZIKV foi introduzido no Brasil entre um período que varia de 2012 a 2014 este trabalho teve como objetivo rastrear a entrada do vírus no Brasil tendo como porta de entrada o estado do Rio de Janeiro, considerado o maior polo turístico do país e que hospedou grandes eventos de massa nos últimos anos.

Diversas mutações que o ZIKV sofreu ao longo do tempo, sugerem que o vírus se tornou mais patogênico e adquiriu maior capacidade de dispersão, sendo assim, o sequenciamento completo da ORF do genoma viral de amostras obtidas durante o período de estudo fez-se necessário para melhor compreensão da evolução do vírus no estado do Rio de Janeiro.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Investigar a circulação do ZIKV no estado do Rio de Janeiro anterior ao ano de 2015 e realizar análise filogenética de amostras do ZIKV do período de 2015 - 2017.

2.2- Objetivos Específicos

- 1) Pesquisar a infecção por ZIKV em pacientes suspeitos de dengue e rubéola, com resultado negativo por RT-PCR e/ou isolamento viral no período de 2012 a 2014.
- 2) Realizar análise filogenética de três amostras do ZIKV dos anos de 2015, 2016, 2017, comparando-as com uma amostra referência da Polinésia Francesa, amostras brasileiras e amostras de outras regiões do mundo.
- 3) Identificar o genótipo do ZIKV circulante no Estado do Rio de Janeiro.

3- CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As amostras que foram utilizadas neste estudo, provêm da demanda espontânea recebidas no Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ, Centro de Referência Regional para Dengue, Febre Amarela, Chikungunya e Zika e Laboratório de Vírus Respiratórios, armazenadas a -70°C após a realização de testes diagnósticos, sem qualquer procedimento adicional para o paciente. O estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 027/2007) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Análise retrospectiva

Foram analisadas 630 amostras de soro de fase aguda (coletadas com até cinco dias após o início dos sintomas) de pacientes do estado do Rio de Janeiro com clínica compatível com zika (exantema e/ou conjuntivite) e resultado negativo para dengue e rubéola, coletadas no período de 2012 a 2014.

4.1.1- Critérios de inclusão

- Amostras suspeitas de dengue e rubéola, com clínica sugestiva de infecção pelo ZIKV.

- Amostras coletadas até o quinto dia após o aparecimento dos sintomas.

4.1.2- Critérios de exclusão

- Amostras positivas para dengue (Lanciotti, 1992) ou rubéola (CDC), detectadas através da RT-PCR.

- Amostras sem volume suficiente.

4.1.3 Metodologia

O diagnóstico laboratorial das amostras foi realizado por extração do RNA viral seguido de RT-PCR em tempo real (sistema TaqMan).

4.1.4- Extração do RNA viral

O RNA viral utilizado para a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) e para o sequenciamento completo foi extraído das amostras utilizando o QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e descrito a seguir.

Em um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml foram adicionados 560 µl de tampão de lise AVL, 5,6 µl de Carrier/AVE e 140 µl da amostra. A suspensão foi

homogeneizada e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 560 µl de álcool etílico 100% PA e a suspensão homogeneizada. Após a homogeneização, 630 µl da mistura foram transferidos para uma coluna previamente numerada e levados a centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm. O eluido do tubo coletor foi desprezado e um novo tubo coletor foi colocado na coluna. Os 630 µl restantes da mistura foram transferidos para a coluna e após mais uma centrifugação de 1 minuto a 8000 rpm, o eluido foi descartado e a coluna transferida para novo tubo coletor. Adicionou-se 500 µl do tampão de lavagem AW1 e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm, o eluido foi descartado. Adicionou-se 500 µl do tampão de lavagem AW2 e seguiu-se para uma nova centrifugação, desta vez por 3 minutos a 14000 rpm. O eluido foi descartado e a coluna foi mais uma vez transferida para um novo tubo coletor e após centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm, a coluna foi então transferida para um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml previamente identificado. Adicionou-se 60 µl de tampão de eluição AVE e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm a coluna foi descartada e o RNA armazenado em freezer - 70°C.

4.1.5- RT-PCR em tempo real

As reações foram realizadas conforme protocolo adaptado descrito por Lanciotti et al. (2008). Este protocolo utiliza iniciadores e sonda específicos para cepas isoladas em Yap, no ano de 2007. Numa microplaca de 96 micropoços (PE Applied Biosystems - Foster City, California) foram adicionados 20µl da mistura de reagentes em cada poço conforme a tabela 1.4 e 5µl do RNA extraído, obtendo assim um volume final de 25µl/reação. Cada amostra e controles foram aplicados em duplicatas. Após isso, foi colocado o filme plástico (PE Applied Biosystems - Foster City, California) na parte superior para selagem e em seguida a placa foi levada para centrífuga, colocando na opção de “spin”. Posteriormente a placa foi colocada no equipamento LinerGene 9660 para a reação de qRT-PCR, seguindo os parâmetros de ciclagem disponíveis na tabela 2.4 e posterior coleta de dados e análise dos resultados.

Tabela 1.4: Reagentes utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO (estoque)	μL/ TUBO
2X Go Taq Probe Master Mix	1X	12,5
Iniciador F 1086	6,9 μM	1,45
Iniciador R 1162c	6,9 μM	1,45
Sonda 1107-FAM	10 μM	0,25.
50X GoScript RT Mix	---	0,5
H ₂ O (Promega)	---	3,85
Mix PCR em tempo real		20
RNA		5
Volume total		25

Tabela 2.4: Parâmetros de ciclagem para a reação de RT-PCR em tempo real.

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	CICLO
RT	45° C	15 min	1 ciclo
Inativação da transcriptase	95° C	2 min	1 ciclo
Desnaturação da dupla fita	95° C	15 seg	45 ciclos
Hibridização/polimerização/coleta de fluorescência (FAM)	60° C	1 min	

A sequência e posição dos iniciadores e da sonda do protocolo utilizado estão apresentadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos do gene do envelope do ZIKV (Lanciotti et al. 2008).

Iniciador/sonda	Posição no genoma	Sequencia (5→3)
ZIKV1086	1086-1102	CCGCTGCCCAACACAAG
ZIKV1162c	1162-1139	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
ZIKV1107-FAM	1107-1137	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACATCAA

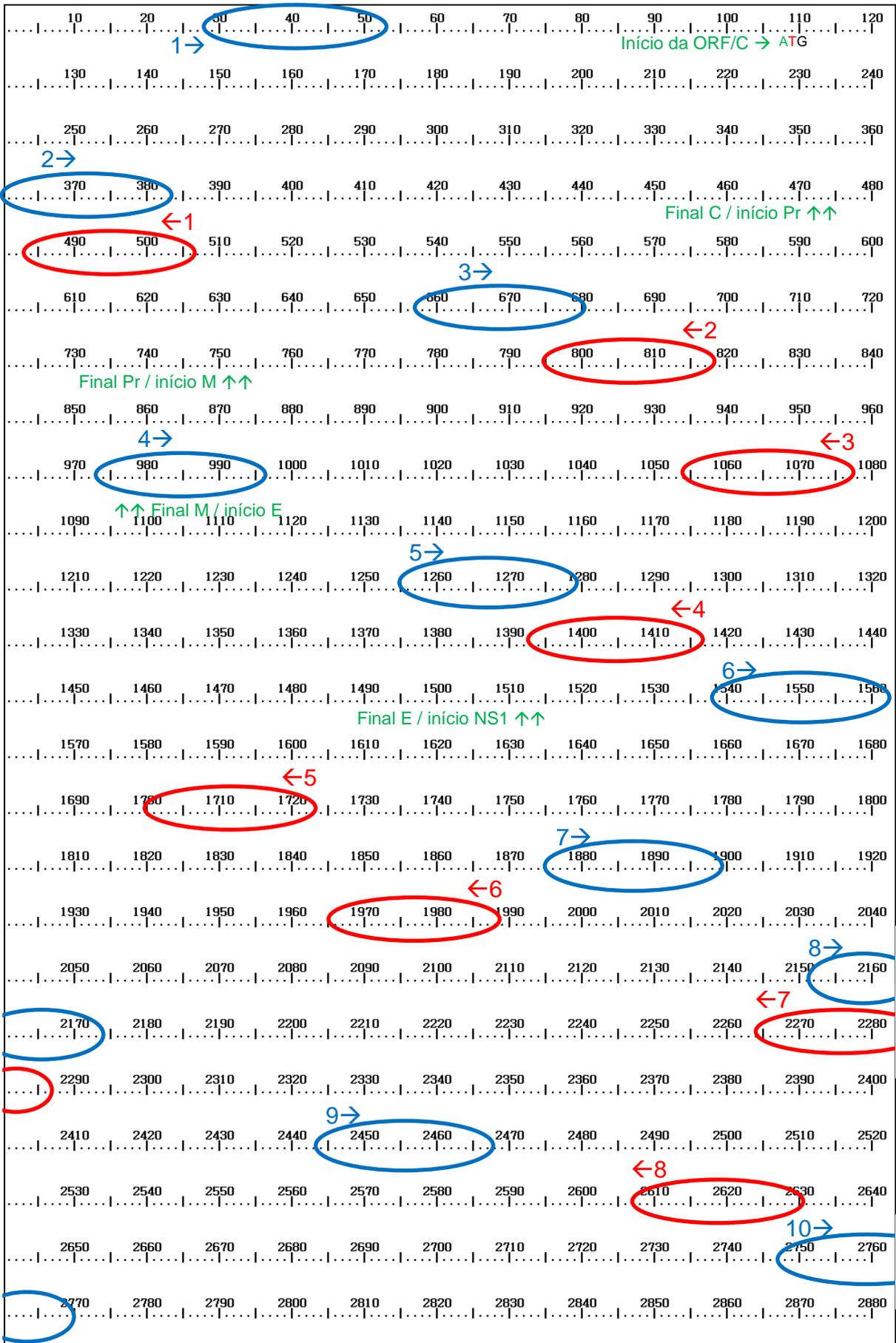
4.2- Sequenciamento completo da ORF do ZIKV do ano de 2015, 2016 e 2017

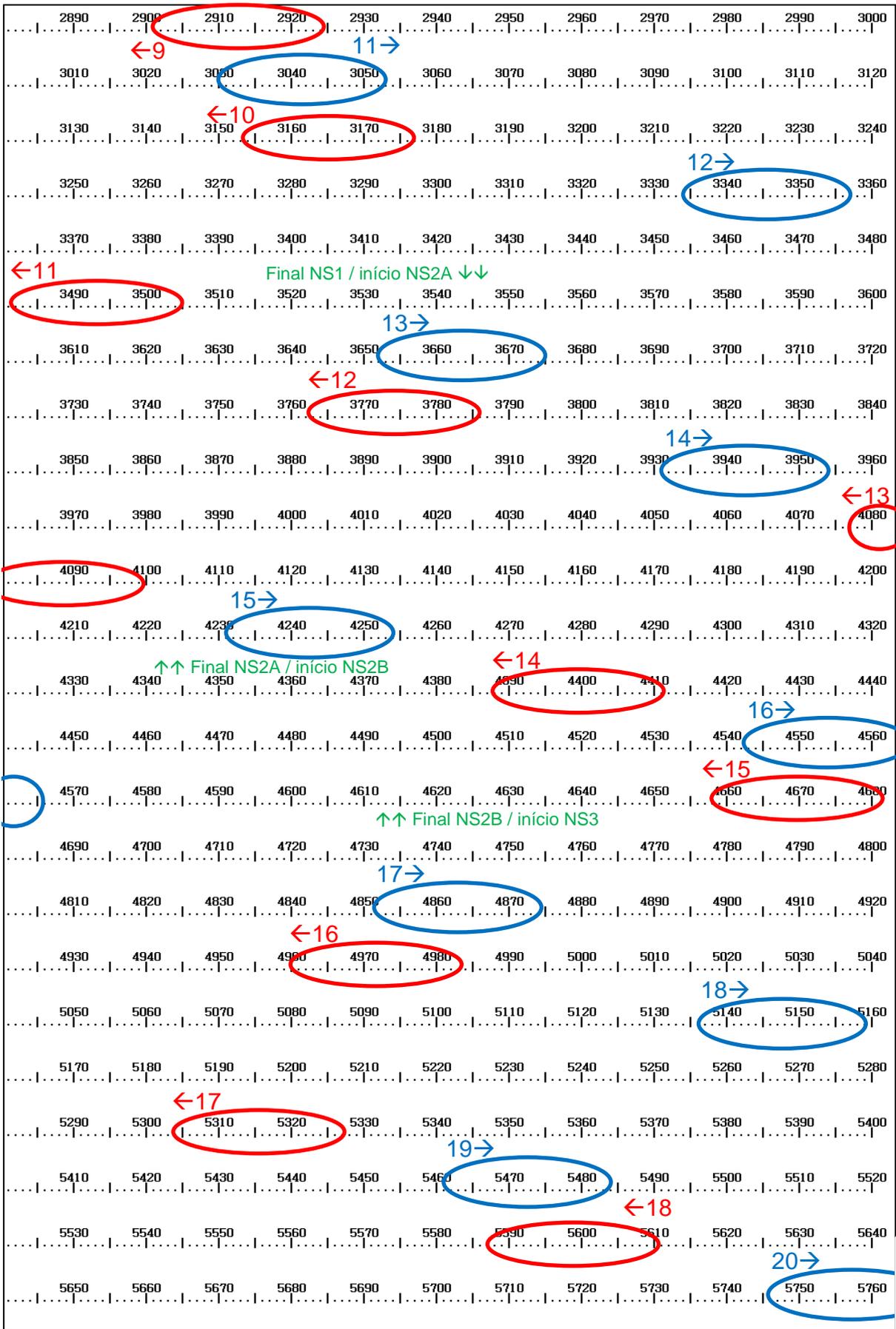
Para o sequenciamento completo da ORF do ZIKV foram selecionadas três amostras provenientes de amostras clínicas de pacientes do estado do Rio de Janeiro, positivos para zika por RT-PCR em tempo real, recebidas no Laboratório de Flavivírus (LABFLA), IOC/FIOCRUZ, Centro de Referência Regional para Dengue, Febre Amarela, Zika e Chikungunya, procedentes de cada ano após o início da epidemia de zika no Brasil (2015, 2016, 2017). Inicialmente as amostras foram extraídas utilizando o QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia) conforme descrito no item 4.1.4. Após isso, as amostras foram sequenciadas utilizando 70 iniciadores (35 diretos e 35 reversos) que abrangem toda a ORF do genoma conforme a tabela 4.4 e figura 1.4. Para isso, foram amplificados, por One-Step RT-PCR convencional, 12 fragmentos de aproximadamente 1050 pares de base (pb) utilizando 24 iniciadores (tabela 4.4).

Tabela 4.4: Sequências dos iniciadores utilizados para o sequenciamento do genoma completo do ZIKV (Quick et al. 2017).

Iniciadores diretos	Sequência	Fragmento	Iniciadores reversos	Sequência
ZIKA_400_1_LEFT	GACAGTTCGAGTTTGAAGCGAAAG	1	ZIKA_400_1_RIGHT	AGTATGCACTCCCACGTCTAGT
ZIKA_400_2_LEFT	AAGAAAGATCTGGCTGCCATGC		ZIKA_400_2_RIGHT	TGATTCCAACCAGGTTTGCAGC
ZIKA_400_3_LEFT	AGATGACGTCGATTGTTGGTGC		ZIKA_400_3_RIGHT	TACGGTGACACAACCTCCATGT
ZIKA_400_4_LEFT	TCAGGTGCATAGGAGTCAGCAA	2	ZIKA_400_4_RIGHT	GGAGCCATGAACTGACAGCATT
ZIKA_400_5_LEFT	AGAACGTTAGTGGACAGAGGCT		ZIKA_400_5_RIGHT	TGTGCGTCTTGAACCTACCA
ZIKA_400_6_LEFT	TTGATTGTGAACCGAGGACAGG		ZIKA_400_6_RIGHT	CCATCTGTCCCTGCGTACTGTA
ZIKA_400_7_LEFT	TGAAGGGCGTGCATACTCCTT	3	ZIKA_400_7_RIGHT	CGCTCCAACCTGATCCAAAGTC
ZIKA_400_8_LEFT	GGGAGAAGAAGATCACCCACCA		ZIKA_400_8_RIGHT	TTGACTGCTGCTGCCAATCTAC
ZIKA_400_9_LEFT	GCCTAGGGGGAGTGTGATCT		ZIKA_400_9_RIGHT	GAGTGGGCATTCTTCAGTGTG
ZIKA_400_10_LEFT	ACGGTCGTTGTTGGGATCTGTAA	4	ZIKA_400_10_RIGHT	GTGGGACTTTGGCCATTACAT
ZIKA_400_11_LEFT	CAGCCGTTATTGGAACAGCTGT		ZIKA_400_11_RIGHT	CCTGGCCTTATCTCCATTCCA
ZIKA_400_12_LEFT	CACTAAGGTCCACGTGGAGGAA		ZIKA_400_12_RIGHT	TATCAGCGCCAGATGAGCTACA
ZIKA_400_13_LEFT	TGGCAGTGCTGGTAGCTATGAT	5	ZIKA_400_13_RIGHT	AGAGAGAGGAGCATAAACCC
ZIKA_400_14_LEFT	CAATGGTTTTGCTTTGGCCTGG		ZIKA_400_14_RIGHT	TTCCCATGTGATGTCACCTGC
ZIKA_400_15_LEFT	CCCTAGCGAAGTACTCACAGCT		ZIKA_400_15_RIGHT	TACACTCCATCTGTGGTCTCCC
ZIKA_400_16_LEFT	GTGGCATGAACCAATAGCCAT	6	ZIKA_400_16_RIGHT	GCTCCAATGTCCCATCCTTTG
ZIKA_400_17_LEFT	GTGGTCCATGGAAGCTAGATGC		ZIKA_400_17_RIGHT	CCTCTAAGGGCCTCTCCATTT
ZIKA_400_18_LEFT	CTGTTGAGTGCTTCGAGCCTTC		ZIKA_400_18_RIGHT	TGGTGAGTTGGAGTCCGGAAAT
ZIKA_400_19_LEFT	TATGGATGAGGCCCACTCACA	7	ZIKA_400_19_RIGHT	GCCATCAAGTATGACCGGCTTT
ZIKA_400_20_LEFT	GGCTGGAAAACGGGTCATACAG		ZIKA_400_20_RIGHT	CCTTTGCTCCGCTCTAAGCTTG
ZIKA_400_21_LEFT	AGAGACTGACGAAGACCATGCA		ZIKA_400_21_RIGHT	CTCCAAAAGCCGCTCCTCTTTT
ZIKA_400_22_LEFT	TGGACCAGACACGGAGAGAAAA	8	ZIKA_400_22_RIGHT	ATTCTGGCTGGCTCAATTTCCG
ZIKA_400_23_LEFT	CGTCTTGATGAGGAACAAGGGC		ZIKA_400_23_RIGHT	AAGTGGTCACTGCATGTTGGAC
ZIKA_400_24_LEFT	TAATGGGAAGGAGAGAGGAGGG		ZIKA_400_24_RIGHT	TCTCCACTGGGGGTCAATTGT
ZIKA_400_25_LEFT	CCCTGACCCTAATAGTGGCCAT	9	ZIKA_400_25_RIGHT	CCTTCCATTTCTCTCCAGGGT
ZIKA_400_26_LEFT	ACTGGAACCTCTACAGCCAC		ZIKA_400_26_RIGHT	ACCAGGGCCTCTTTTGTGTAT
ZIKA_400_27_LEFT	AGTGCAAAGCTGAGATGTTGG		ZIKA_400_27_RIGHT	ATGTGTAGAGTTGCGGGAGAGT
ZIKA_400_28_LEFT	GGTGGGGATTGGCTTGAAAAA	10	ZIKA_400_28_RIGHT	GGGCTCATAGCTCCATGGTA
ZIKA_400_29_LEFT	AGGATGTGAATCTCGGCTCTGG		ZIKA_400_29_RIGHT	ATGCTGCATTGCTACGAACCTT
ZIKA_400_30_LEFT	AAAAGTGGACACTAGGGTGCCA		ZIKA_400_30_RIGHT	TAATCCCAGCCCTCAACACCA
ZIKA_400_31_LEFT	ACAAGGGGAATTTGGAAGGCC	11	ZIKA_400_31_RIGHT	CGTAAGTGACAACCTGTCCGCT
ZIKA_400_32_LEFT	AAATGGAAAAAGGGCACAGGGC		ZIKA_400_32_RIGHT	TGTCCCATCCAGTTGAGGGTTT
ZIKA_400_33_LEFT	CAAACGAATGGCAGTCAGTGGA		ZIKA_400_33_RIGHT	ATCCACACTCTGTCCACACCA
ZIKA_400_34_LEFT	ATTCCACAGAAGGGACCTCCG	12	ZIKA_400_34_RIGHT	TGACTAGCAGGCCTGACAACAT
ZIKA_400_35_LEFT	ACCACCTGGGCTGAGAACATTA		ZIKA_400_35_RIGHT	ACCACTAGTCCCTCTTCTGGAG

Fragmento 1 (5'→C/PrM/Envelope) / Fragmento 2 (Envelope→Envelope) / Fragmento 3 (Envelope→NS1) / Fragmento 4 (NS1→NS2A) / Fragmento 5 (NS2A→NS3) / Fragmento 6 (NS2B→NS3) / Fragmento 7 (NS3→ NS3/NS4A) / Fragmento 8 (NS3→NS4B) / Fragmento 9 (NS4B→NS5) / Fragmento 10 (NS5→NS5) / Fragmento 11 (NS5→NS5) / Fragmento 12 (NS5→3')





5770	5780	5790	5800	5810	5820	5830	5840	5850	5860	5870	5880
5890	5900	5910	5920	5930	5940	5950	5960	5970	5980	5990	6000
6010	6020	6030	6040	6050	6060	6070	6080	6090	6100	6110	6120
6130	6140	6150	6160	6170	6180	6190	6200	6210	6220	6230	6240
6250	6260	6270	6280	6290	6300	6310	6320	6330	6340	6350	6360
6370	6380	6390	6400	6410	6420	6430	6440	6450	6460	6470	6480
6490	6500	6510	6520	6530	6540	6550	6560	6570	6580	6590	6600
6610	6620	6630	6640	6650	6660	6670	6680	6690	6700	6710	6720
6730	6740	6750	6760	6770	6780	6790	6800	6810	6820	6830	6840
6850	6860	6870	6880	6890	6900	6910	6920	6930	6940	6950	6960
6970	6980	6990	7000	7010	7020	7030	7040	7050	7060	7070	7080
7090	7100	7110	7120	7130	7140	7150	7160	7170	7180	7190	7200
7210	7220	7230	7240	7250	7260	7270	7280	7290	7300	7310	7320
7330	7340	7350	7360	7370	7380	7390	7400	7410	7420	7430	7440
7450	7460	7470	7480	7490	7500	7510	7520	7530	7540	7550	7560
7570	7580	7590	7600	7610	7620	7630	7640	7650	7660	7670	7680
7690	7700	7710	7720	7730	7740	7750	7760	7770	7780	7790	7800
7810	7820	7830	7840	7850	7860	7870	7880	7890	7900	7910	7920
7930	7940	7950	7960	7970	7980	7990	8000	8010	8020	8030	8040
8050	8060	8070	8080	8090	8100	8110	8120	8130	8140	8150	8160
8170	8180	8190	8200	8210	8220	8230	8240	8250	8260	8270	8280
8290	8300	8310	8320	8330	8340	8350	8360	8370	8380	8390	8400
8410	8420	8430	8440	8450	8460	8470	8480	8490	8500	8510	8520
8530	8540	8550	8560	8570	8580	8590	8600	8610	8620	8630	8640

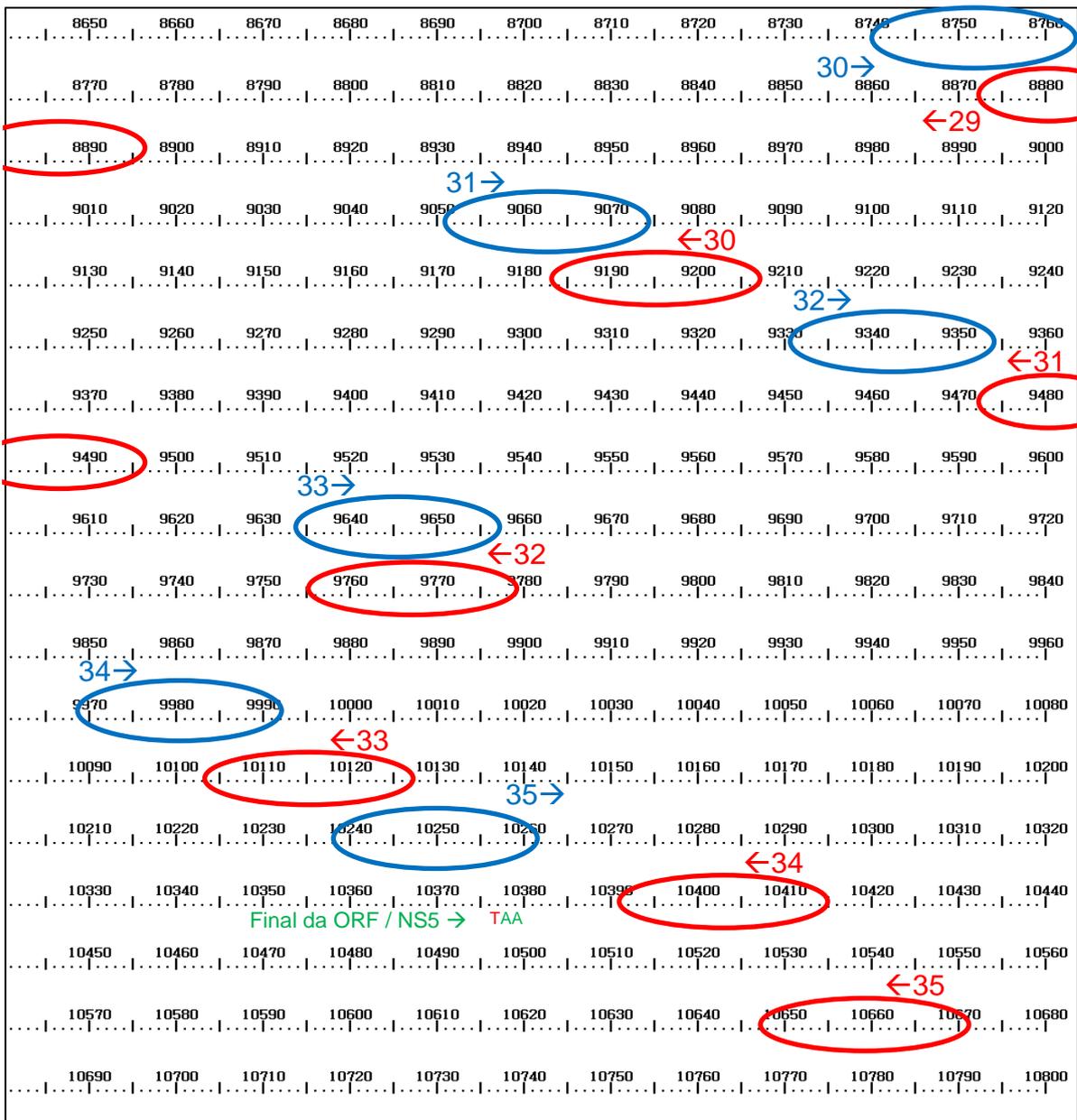


Figura 1.4: Alinhamento dos iniciadores utilizados para o sequenciamento completo do ZIKV. Foram utilizados 35 iniciadores diretos e 35 iniciadores reversos para o sequenciamento. Os iniciadores que estão em azul são diretos e os que estão em vermelho são reversos.

4.2.1- Descrição das três amostras sequenciadas

Foram selecionadas três amostras positivas para ZIKV por RT-PCR em tempo real (Lanciotti et al, 2008), uma do ano de 2015, uma de 2016 e uma de 2017, de modo a contemplar os anos após o início da epidemia de zika no Brasil. O critério de seleção das amostras respeitou os seguintes requisitos: soro de paciente do estado Rio de Janeiro; limiar de detecção (CT) baixo pela técnica de PCR em tempo real (abaixo de 28) e volume suficiente para as análises.

A amostra 2015, 737/15 é uma amostra de soro de um paciente brasileiro do sexo masculino, idade 27 anos, morador do Bairro de Manguinhos no município do Rio de Janeiro. O início dos sintomas foi em 05/04/2015 e a coleta do sangue realizada no mesmo dia. O quadro clínico era: febre, cefaleia, prostração, mialgia, náuseas e dor retro orbitária.

A amostra de 2016, 5420/16 é uma amostra de soro de uma paciente brasileira do sexo feminino, 31 anos, moradora do bairro de Icaraí no município de Niterói/RJ.. O início dos sintomas foi em 15/02/2016 e a coleta do soro no mesmo dia com a suspeita de zika. Apresentou exantema, cefaleia, febre de 38°C, anorexia, artralgia e mialgia.

A amostra de 2017, 1911/17 é uma amostra de soro de um paciente brasileiro do sexo masculino, 23 anos, morador do Bairro Jardim Guanabara, Ilha do Governador no município do Rio de Janeiro/RJ. O início dos sintomas foi em 08/03/2017 e a coleta do sangue foi realizada no dia 10/03/2017. O paciente apresentou febre (38°C), cefaleia e dor retro orbitária e suspeitou-se de malária, uma vez que o paciente viajou do dia 15/02/2017 até 08/03/2017 para Manaus (AM), Boa Vista (RR) e Santa Helena na Venezuela.

4.2.2- RT-PCR convencional para obtenção dos fragmentos e posterior sequenciamento completo da ORF

Previamente foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti et al. 2008 (conforme item 4.1.5) para o diagnóstico de positividade das três amostras. Após a extração, foram utilizados 24 iniciadores para amplificar 12 fragmentos do genoma completo do ZIKV em um PCR One-Step (tabela 4.4). Em tubo tipo eppendorf de 0,2 ml foi acrescentado 20µL da mistura de reagentes e 5µL do RNA extraído.

Inicialmente foi realizada a transcrição reversa do RNA (50°C/90 minutos) e posteriormente a polimerase foi ativada (95°C/15 minutos). As condições de termociclagem para a amplificação do DNA consistiram de 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/30 segundos), hibridização (53°C/1 minuto), extensão (72°C/3 minutos) e um ciclo de extensão final (72°C/10 minutos) (tabela 6.4a), utilizando os reagentes (QIAGEN, Inc., Valencia) descritos na tabela 6.4b.

Tabela 5.4: a) Parâmetros de termociclagem na RT-PCR convencional para o sequenciamento. b) Reagentes para a RT-PCR convencional para o sequenciamento.

a)

Parâmetros de Termociclagem			
Etapas de termociclagem	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
RT	50°C	90 minutos	*
Ativação da polimerase	95°C	15 minutos	*
Desnaturação	94°C	30 segundos	40 ciclos
Hibridização	53°C	1 minuto	
Extensão	72°C	3 minutos	
Extensão final	72°C	10 minutos	*
Temperatura final	4°C	∞	*

b)

Reagentes	ul/tubo	*X
H2O	9	*
5X qiagen	5	*
dNTP	1	*
Primer L	2	*
Primer R	2	*
Enzima	1	*
Total	20	*
Total 20 ul de mix 5 ul de RNA		

Após a RT-PCR dos 12 fragmentos, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% acrescido de 5 µl de solução de brometo de etídeo - 10 mg/ml (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis) e visualizados em luz ultravioleta em captador de imagem (Bio-Rad, Hercules, Califórnia). As bandas com tamanho previsto foram retiradas e purificadas utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Inc., California). Esta técnica foi utilizada para extrair e purificar o DNA, sem deixar traços de agarose, bandas inespecíficas e restos de iniciadores.

4.2.3- Eletroforese em gel de agarose

Em um Erlenmeyer, foi dissolvido 1,5g de agarose em 100 ml de Tris-ácido bórico – EDTA (TBE 0,5X), aquecendo a solução no forno de micro-ondas (potência máxima) por 1 minuto, seguindo da homogeneização manual e aquecimento posterior de mais 30 segundos. A solução foi resfriada e foi adicionado 5µL de brometo de etídeo (10 mg/ml). O gel foi transferido para um molde de acrílico, colocando-se pente para geração dos poços, permanecendo desta forma por ~15 min para a gelificação. Após isso, endurecimento o gel foi acondicionado em cuba de eletroforese contendo TBE 0,5X. As amostras diluídas em azul de bromofenol foram aplicadas nos poços. A eletroforese foi realizada a 100 V por ~70min.

4.2.4- Purificação do DNA

O produto de DNA amplificado evidenciado com o uso de luz ultravioleta foi retirado do resto do gel de agarose com auxílio de uma lâmina de bisturi e colocado em um tubo tipo eppendorf. O produto foi purificado utilizando o Kit comercial “Gel extraction” (QIAGEN, Inc., California).

O tubo contendo o fragmento de gel e o produto da PCR foi pesado e para cada volume do fragmento do gel foram adicionados três volumes de tampão QG. Depois disso, para dissolver o gel, o tubo foi incubado a 50°C por 10 minutos e para ajudar a dissolução, o tubo foi agitado a cada 3 minutos durante a incubação. Depois disso, foi adicionado um volume de isopropanol a amostra para cada volume inicial do gel e o tubo foi agitado. Após isso, a amostra foi transferida para a coluna fixada a um tubo coletor e centrifugada por 1 minuto a 17,900 xg. O volume do tubo coletor foi desprezado e o tubo coletor fixado a coluna novamente. Para remover todos os traços de agarose da coluna, foi adicionado 0,5 ml de tampão QG e a coluna foi

centrifugada por 1 minuto a 17,900 xg. Para lavar, foi adicionado 0,75 ml de tampão PE na coluna. Aguardou-se por 5 minutos e a coluna foi centrifugada por 1 minuto a 17,900 xg. Para remoção completa do tampão, a coluna foi centrifugada mais uma vez por 1 minuto a 17,900 xg. A coluna então foi transferida para um tubo de micro centrifuga tipo eppendorf. Para eluição, foram adicionados 30µl do tampão EB na coluna e esta foi centrifugada novamente por 1 minuto a 17,900 xg. A coluna foi descartada e o eluido foi estocado a -20°C até a quantificação e reação de sequenciamento.

4.2.5- Quantificação do DNA

Após a purificação, as concentrações de DNA dos produtos foram determinadas ao serem comparadas com as bandas apresentadas pelo peso molecular “Low Mass Ladder” (Invitrogen, California) em gel de agarose 2%, corado com 5µL de brometo de etídeo (10mg/ml) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis) e visualizado em luz ultravioleta.

4.2.6- Caracterização genotípica

A caracterização genotípica do vírus foi realizada através do sequenciamento nucleotídico. O método utilizado foi o método de Sanger.

Neste método de sequenciamento de DNA foi realizada uma reação de sequenciamento onde foram adicionados os componentes básicos da reação.

A mistura do Big Dye contém dNTPs e em quantidades menores os quatros ddNTPs. Estes ddNTPs estavam marcados com fluoróforos distintos, que permitiu distingui-los um dos outros quando foram excitados com laser. Durante a reação, de forma aleatória, um ddNTP foi inserido na cadeia no lugar do respectivo dNTP e a polimerização da cadeia foi finalizada, parando assim a reação daquela fita específica. O resultado da amplificação foi uma mistura de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos e que foram finalizados pela adição de um ddNTP. Ou seja, os fragmentos diferenciaram-se por um nucleotídeo até atingir o tamanho total do fragmento de DNA molde.

4.2.7- Reação de sequenciamento

Todos os procedimentos a partir desta etapa foram realizados com cuidados para minimizar a exposição à luz. A reação ocorreu em uma placa de 96 poços (Applied Biosystems®, California).

Os fragmentos de cDNA amplificados e purificados foram sequenciados em ambas direções, utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, versão 3.1 (Applied Biosystems, California).

Os parâmetros de termociclagem para a reação de sequenciamento seguem na tabela 8.4.

Para cada um dos 12 fragmentos das amostras sequenciadas foram utilizados seis tubos (um iniciador em cada). Além dos iniciadores utilizados para obtenção dos fragmentos, foram utilizados também quatro iniciadores internos conforme a figura 1.4. Cada tubo de reação continha os reagentes descritos na tabela 7.4

Tabela 6.4: Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.

Tampão MgCl ₂	2 µl
Big Dye	2 µl
Iniciador	3,2 pmol
DNA purificado	de 40 a 80 ng
Volume final em H ₂ O q.s.p	10 µl

Tabela 7.4: Parâmetros de termociclagem para a reação de sequenciamento.

Parâmetros de Termociclagem			
Etapas de termociclagem	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
	94°C	2 minutos	*
Desnaturação	94°C	45 segundos	40 ciclos
Hibridização	50°C	30 segundos	
Extensão	60°C	4 minutos	
Extensão final	60°C	10 minutos	*
Temperatura final	4°C	∞	*

4.2.8- Purificação do produto da reação de sequenciamento

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram purificados utilizando o kit de purificação Big Dye X terminator (Life Technologies/Applied Biosystems). Para isso, foram adicionados a cada amostra 45 µl do tampão SAM e 10 µl do X terminator. A amostra ficou sob agitação por 30 minutos e após foi centrifugada em centrífuga para microplaca de 96 poços por 2 minutos a 4000 rpm.

4.2.9- Eletroferograma

Depois de concluída a purificação, foi realizada a separação dos fragmentos de DNA amplificados em microcapilares (3130xl – Applied Biosystems). À medida que os fragmentos de DNA migraram pelo microcapilar, eles foram separados por ordem de tamanho crescente. O fluoróforo presente na extremidade do fragmento foi excitado por um feixe de laser e, então, emitiu uma fluorescência específica que o caracterizou. Esta fluorescência foi capturada por um sistema de detecção que converteu esse sinal em um gráfico chamado de eletroferograma.

4.2.10- Análise Filogenética

A análise e edição das sequências de bases obtidas foram feitas pelo BioEdit 7.2.0 e estas foram alinhadas e comparadas com sequências dos dois genótipos disponíveis no GenBank, usando o algoritmo Clustal W incluso no BioEdit. A identidade da sequência foi determinada através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As árvores filogenéticas foram construídas com software PhyML (Guindon et al., 2010), sendo o modelo de substituição GTR+G escolhido no Automatic model selection by SMS (AIC), presente no próprio software. A construção das árvores filogenéticas foram realizadas pelo método de aLRT SH-like com o tipo de melhoria de árvore SPR. As árvores foram visualizadas utilizando o programa Mega 7.

O ZIKV foi identificado anteriormente no Haiti e como pode ter ocorrido uma introdução no Brasil a partir deste país, pesquisamos o ZIKV, através de RT-PCR em tempo real (conforme item 4.1.4 e 4.1.5), em 50 amostras de militares que participaram de missões no Haiti.

5- RESULTADOS

5.1- Análise retrospectiva

5.1.1- RT-PCR em tempo real da análise retrospectiva – 2012-2014

Um total de 630 amostras (552 - dengue / 78 – rubéola) foi analisado pela técnica de RT-PCR em tempo Real na pesquisa do ZIKV antes de 2015. Para isto, foram utilizados iniciadores específicos, que amplificam a região do gene do envelope do vírus. O vírus não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas (tabela 1.5).

Tabela 1.5: Amostras analisadas por ano e resultado de qRT-PCR da análise retrospectiva.

Ano	Amostras analisadas	PCR Positivo	PCR negativo
2012	189	0	189
2013	350	0	350
2014	91	0	91

5.2- Sequenciamento completo da ORF do ZIKV dos anos de 2015, 2016 e 2017

5.2.1- RT-PCR convencional para o sequenciamento da ORF do ZIKV das três amostras do período de 2015 a 2017

A estratégia de amplificação utilizada nas amostras para sequenciamento do genoma permitiu a geração de 12 produtos de aproximadamente 1050pb, evidenciados após a eletroforese (figura 1.5).

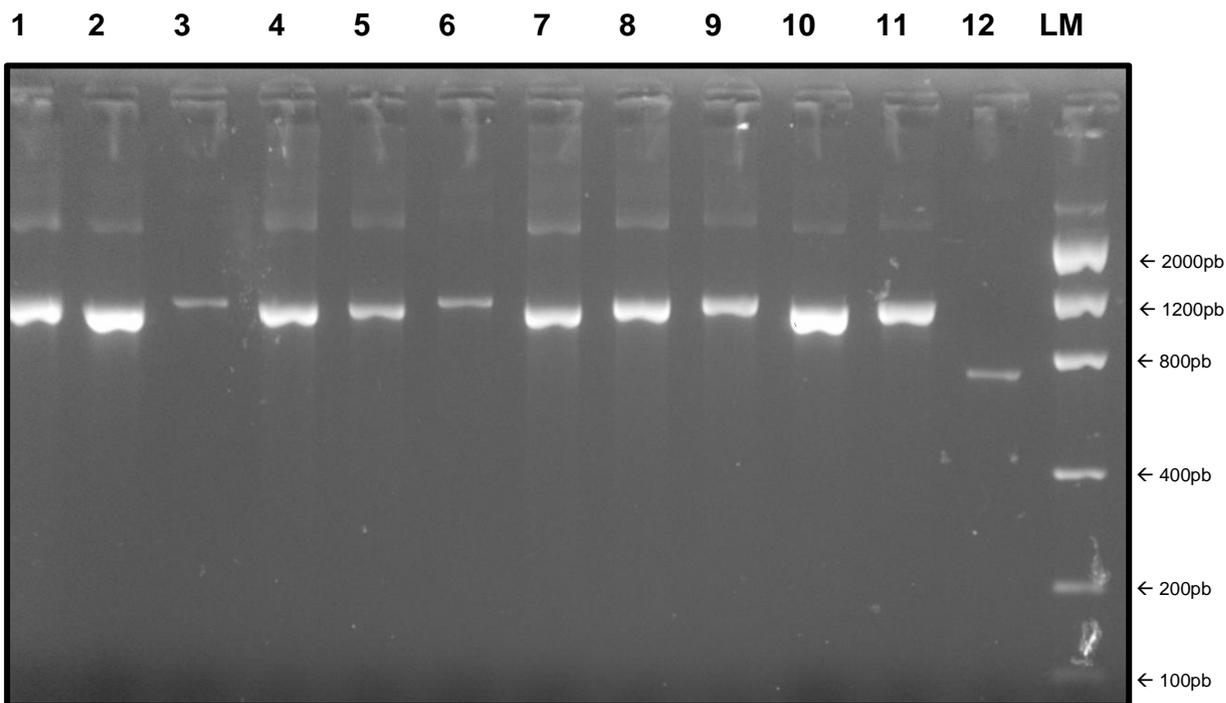


Figura 1.5: Quantificação por eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos amplificados por RT-PCR da amostra 5420/2016, utilizando 24 pares de iniciadores. Poço 1 – Fragmento 1; Poço 2 – Fragmento 2; Poço 3 – Fragmento 3; Poço 4 – Fragmento 4; Poço 5 – Fragmento 5; Poço 6 – Fragmento 6; Poço 7 – Fragmento 7; Poço 8 – Fragmento 8; Poço 9 – Fragmento 9; Poço 10 – Fragmento 10; Poço 11 – Fragmento 11; Poço 12 – Fragmento 12; Poço 13 – Low Mass (marca conforme tabela 4.4).

5.2.2- Análise filogenética

Através das sequências da região codificante completa de três amostras do estado Rio de Janeiro, sequenciadas neste estudo no Laboratório de Flavivírus, juntamente com todas as sequências da região codificante completa do ZIKV obtidas após Blast no GenBank, disponíveis até dezembro de 2017, foi construída uma árvore filogenética utilizando 432 sequências do ZIKV de todo o mundo (figura 2.5). Contendo a ORF completa das respectivas sequências na figura 2.5 temos a árvore completa e as demais árvores são recortes dessa árvore inicial, para evidenciar as amostras do Brasil e das Américas.

Para este estudo foi dado ênfase as sequências das Américas, em especial às sequências do Brasil. Foram divididas em oito grupos monofiléticos, denominadas neste estudo por G1, G2, G3, G4, G5 (a,b,c), G6, G7, G8 e uma sequência não apresentou um grupo definido. As sequências brasileiras estão espalhadas por todos os oito grupos monofiléticos descritos neste estudo (figura 3.5a).

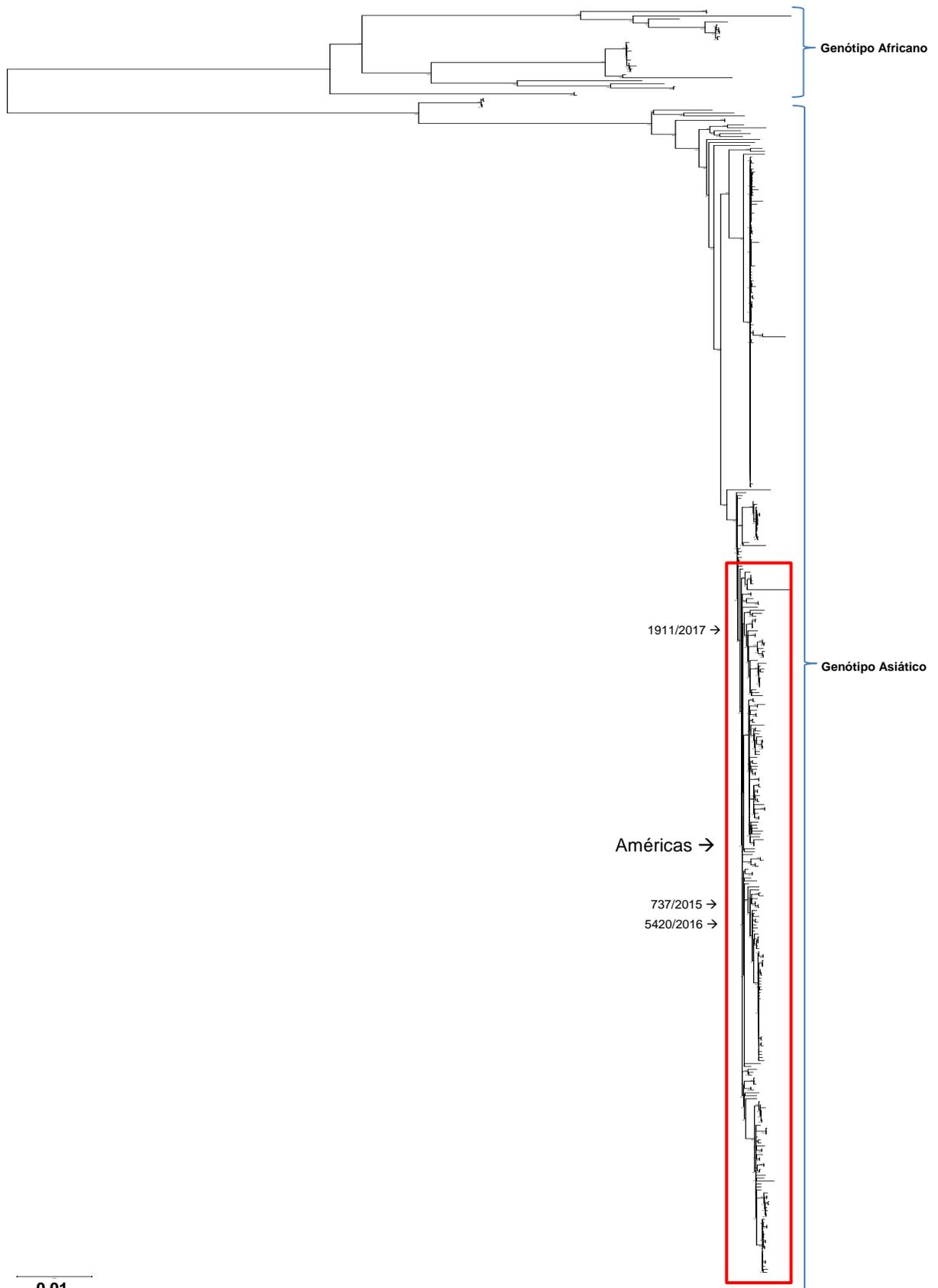


Figura 2.5: Árvore filogenética baseada na região codificante completa das três amostras do Rio de Janeiro sequenciadas no estudo e todas as sequências da região codificante completa disponíveis no GenBank. Método de aLRT SH-like com o tipo de melhoria de árvore STR. Modelo de substituição GTR+G.

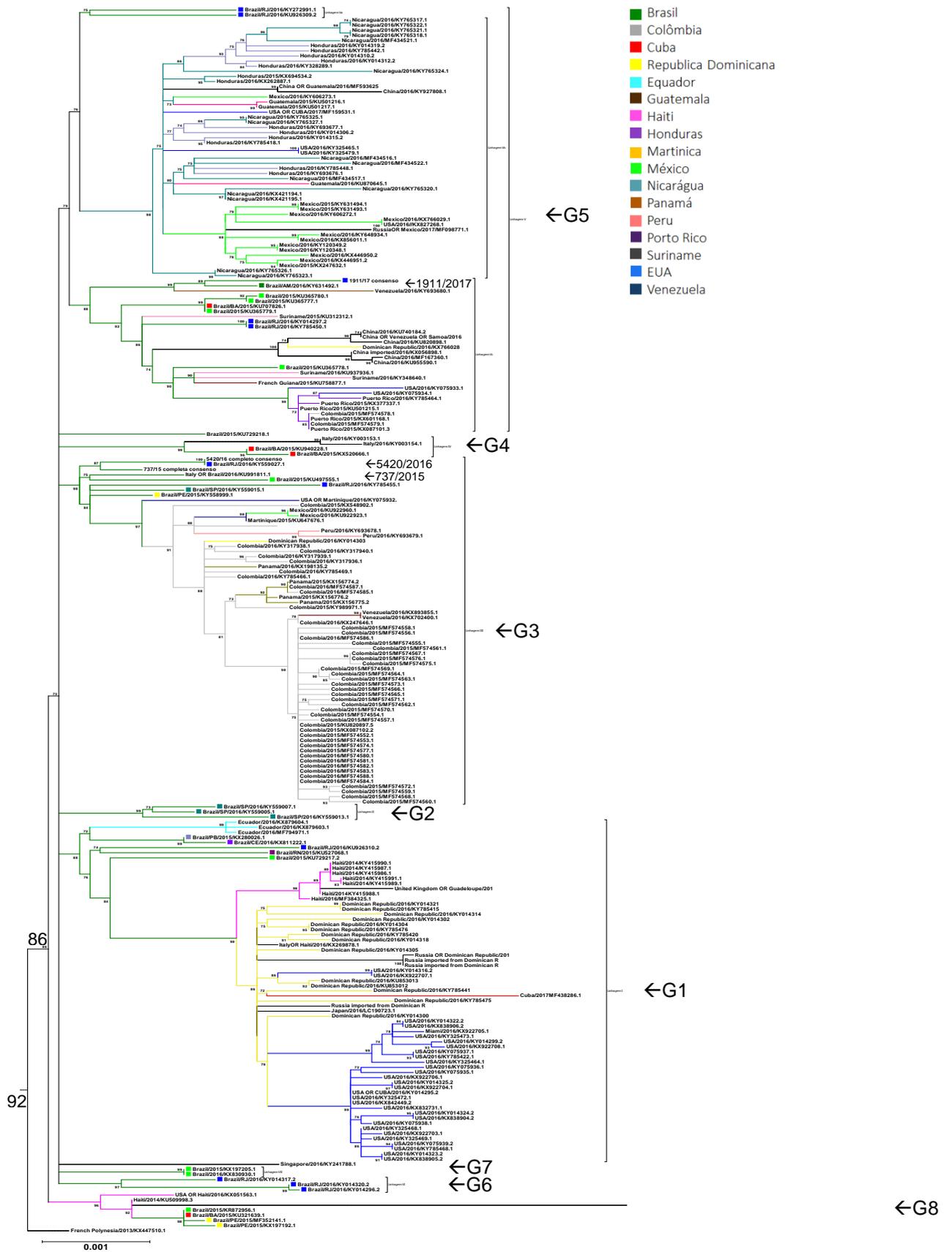


Figura 3.5a: Árvore filogenética baseada na região codificante completa das três amostras do Rio de Janeiro sequenciadas no estudo e todas as seqüências da região codificante completa das Américas disponíveis no GenBank. Método de aLRT SH-like com o tipo de melhoria de árvore STR. Modelo de substituição GTR+G.

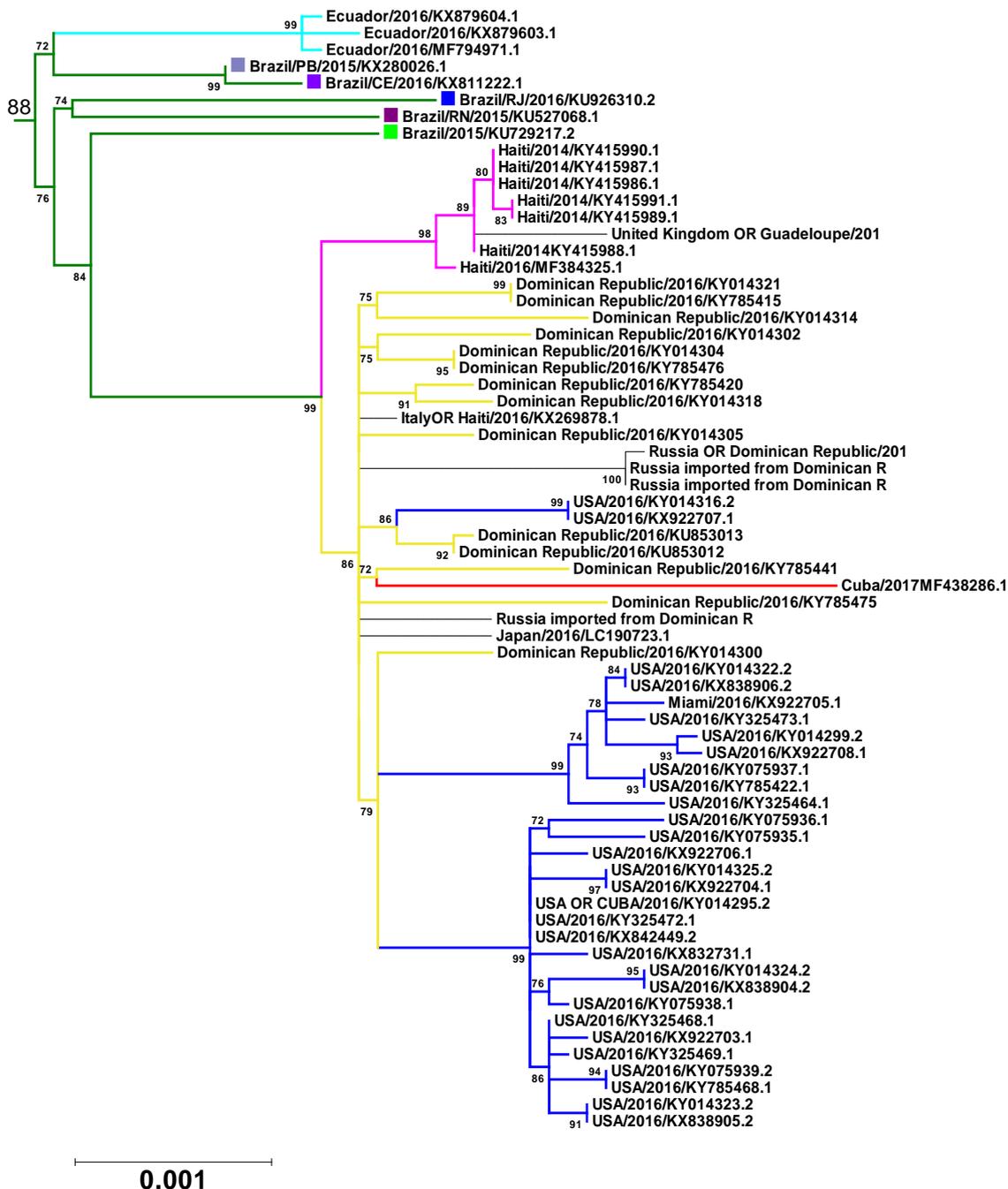


Figura 3.5b: Recorte do grupo monofilético 1 da árvore filogenética baseada na região codificante completa de seqüências das Américas.



Figura 3.5c: Recorte do grupo monofilético 2 da árvore filogenética baseada na região codificante completa de seqüências das Américas.

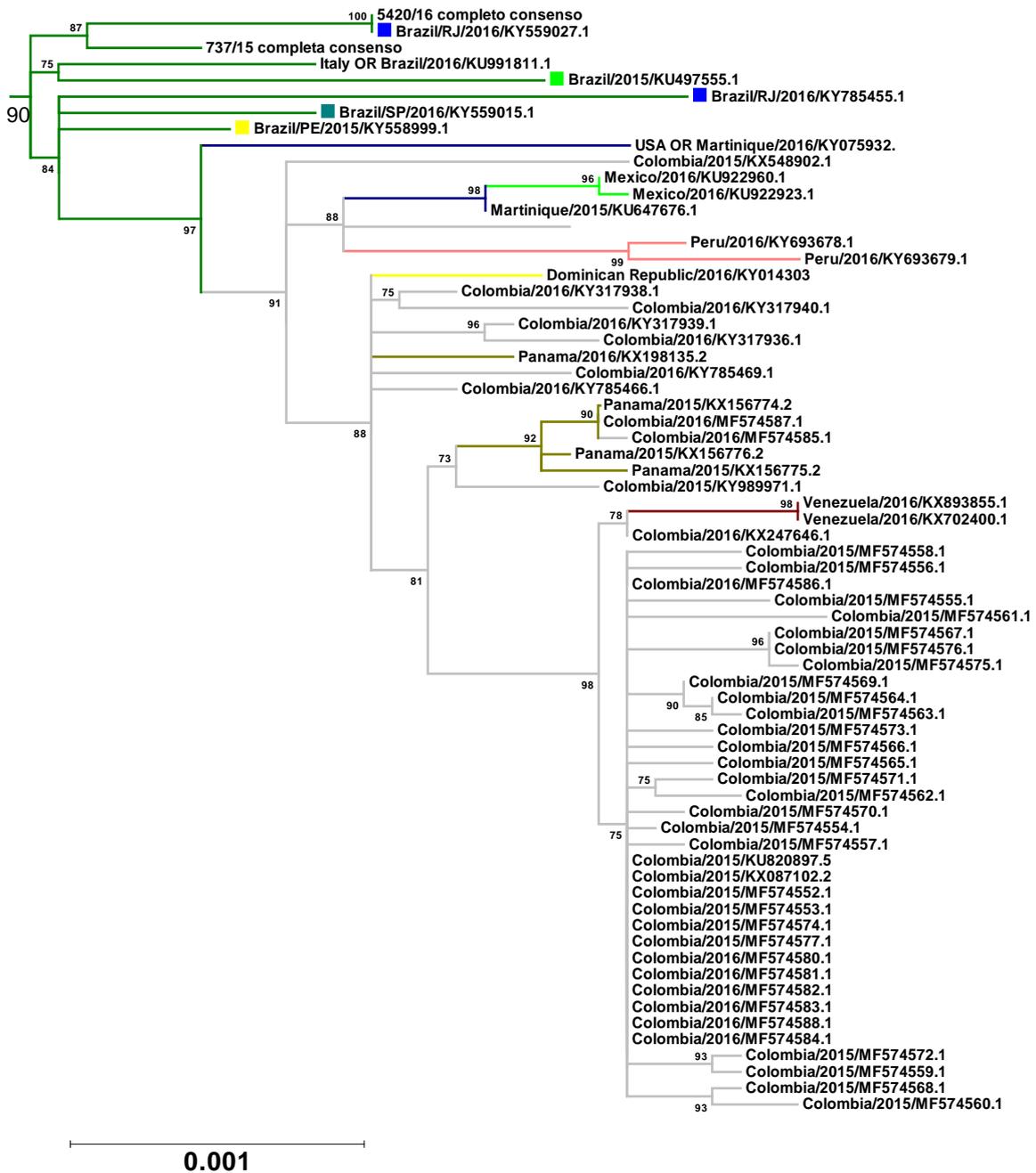


Figura 3.5d: Recorte do grupo monofilético 3 da árvore filogenética baseada na região codificante completa de sequências das Américas.

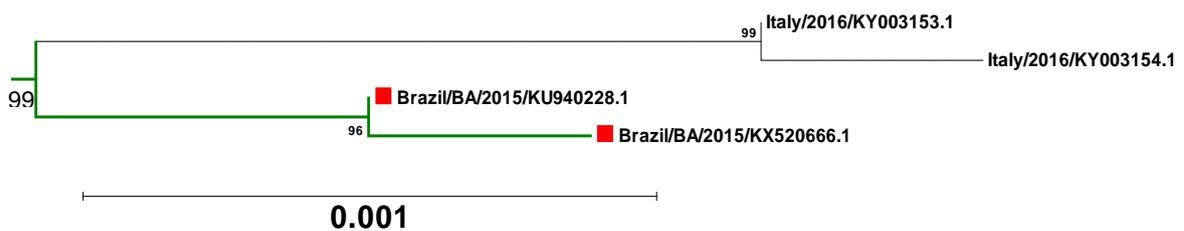


Figura 3.5e: Recorte do grupo monofilético 4 da árvore filogenética baseada na região codificante completa de sequências das Américas.

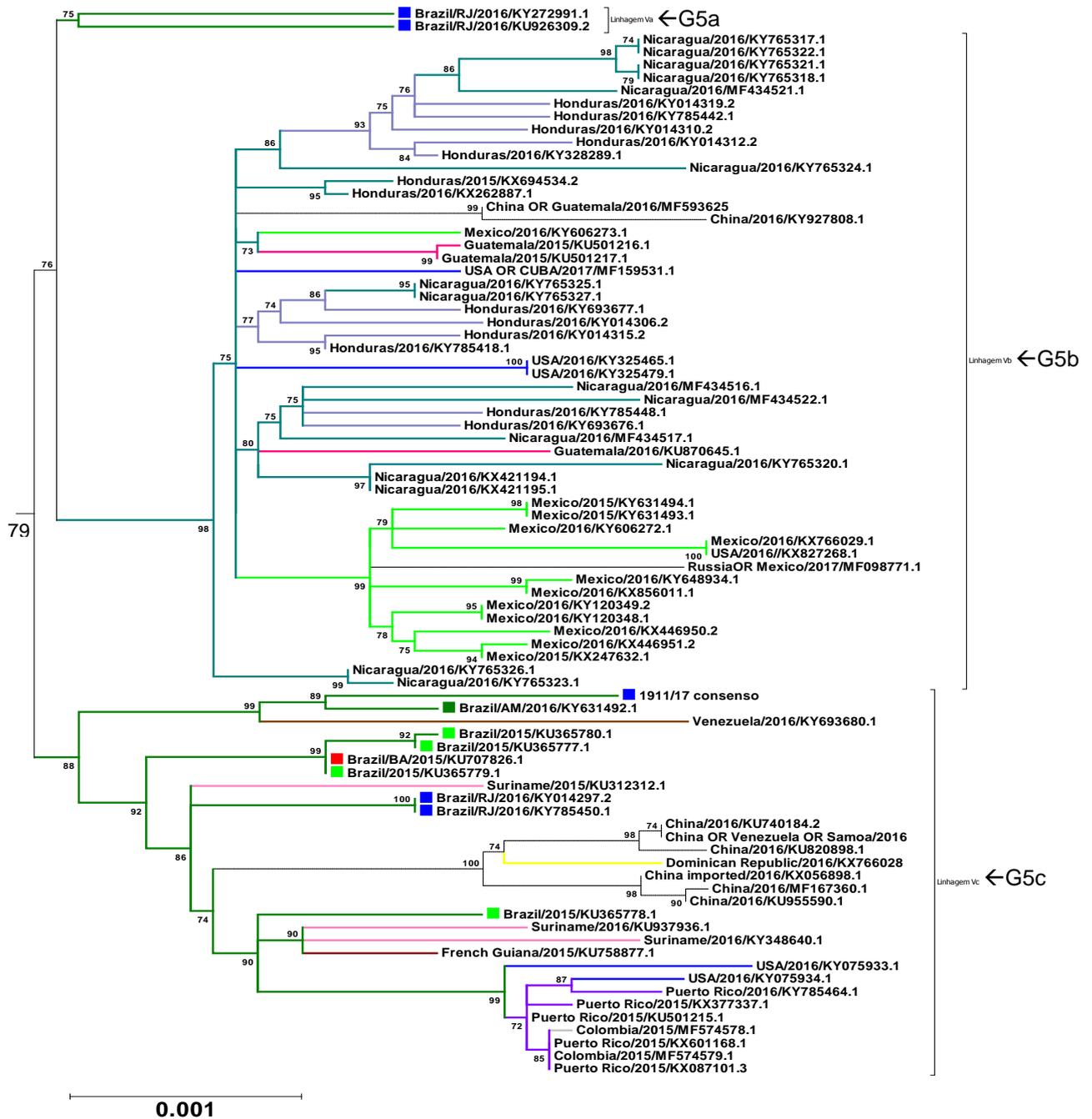


Figura 3.5f: Recorte do grupo monofilético 5 da árvore filogenética baseada na região codificante completa de sequências das Américas.

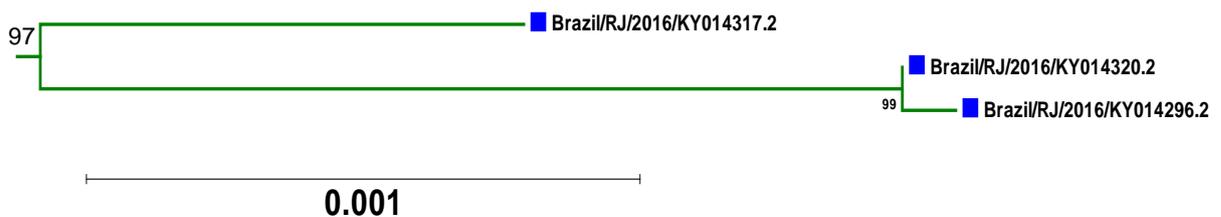


Figura 3.5g: Recorte do grupo monofilético 6 da árvore filogenética baseada na região codificante completa de sequências das Américas.

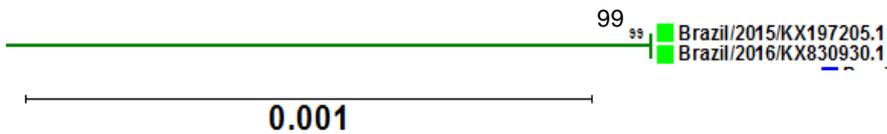


Figura 3.5h: Recorte do grupo monofilético 7 da árvore filogenética baseada na região codificante completa de sequências das Américas.



Figura 3.5i: Recorte do grupo monofilético 8 da árvore filogenética baseada na região codificante completa de sequências das Américas.



Figura 3.5j: Recorte do grupo monofilético não definido da árvore filogenética baseada na região codificante completa de sequências das Américas.

5.2.3- Comparação entre as amostras do estado do Rio de Janeiro no período de 2015 a 2017 e com amostra de referência

Após análise filogenética das três amostras do estado do Rio de Janeiro selecionadas para o sequenciamento completo da ORF do ZIKV (737/2015, 5420/2016 e 1911/2017) foi constatado que as amostras 737/2015 e 5420/2016 pertencem a um mesmo grupo monofilético (G3) com origem que comprova uma infecção no estado do Rio de Janeiro (figura 3.5d). A amostra analisada do ano de 2017 pertence ao grupo monofilético G5c, mesma origem de outras amostras da Amazônia (figura 3.5f), que supõe que o mesmo tenha sido infectado durante uma viagem feita para Venezuela, Manaus e Roraima no período que antecedeu ao aparecimento dos sintomas.

Foi realizada uma matriz de similaridade de nucleotídeos que indicou uma similaridade de 99,86% entre as amostras 737/2015 e 5420/2016, grupo monofilético 3 (tabela 3.5).

Comparando a região codificante da poliproteína das amostras de 2015 e 2016 observou-se 14 diferenças pontuais de nucleotídeos. Destas, nenhuma resultou em substituição de aminoácidos, sendo assim as duas são idênticas em suas proteínas (tabela 4.5 e tabela 5.5).

Ao comparar a amostra do ano de 2017, observamos uma similaridade de nucleotídeos de 99,66% com a amostra de 2015, totalizando 35 diferenças de nucleotídeos na região codificante da poliproteína e 99,60% com a amostra de 2016, totalizando 41 diferenças de nucleotídeos (tabela 3.5 e tabela 4.5).

A amostra do ano 2017 apresentou 0,15 % de divergência de aminoácidos na poliproteína em comparação às outras duas amostras. Tendo cinco diferenças. São elas: 1) Substituição não sinônima do nucleotídeo G por um T na posição 1356 do genoma da poliproteína (região do envelope), resultando na substituição do Ácido glutâmico por Aspartato (E452D). 2) Substituição não sinônima do nucleotídeo A por um G na posição 2480 do genoma da poliproteína (região da NS1), resultando na substituição da Lisina por Arginina (K827R). 3) Substituição não sinônima do nucleotídeo A por um G na posição 7101 do genoma da poliproteína (região da NS4B), resultando na substituição da Isoleucina por Metionina (I2367M). 4) Substituição não sinônima do nucleotídeo T por uma A na posição 8444 do genoma da poliproteína (região da NS5), resultando na substituição da Fenilalanina por Tirosina (F2815Y). 5) Substituição não sinônima do nucleotídeo C por uma T na posição 10052 do genoma da poliproteína (região da NS5), resultando na substituição da Prolina por Leucina (P3351L) (tabela 5.5 e tabela 6.5).

Para este estudo foi considerada como cepa de referência uma amostra da Polinésia Francesa (French_Polynesia/2013/KX447510.1), uma vez que, segundo a nossa filogenia, é a amostra que tem um ancestral em comum mais recente com as amostras das Américas. Consideramos como posição um a adenina do códon de iniciação (ATG).

Comparando as três amostras com a amostra de referência (French_Polynesia/2013/KX447510.1) foram observadas 15 alterações nucleotídicas com a amostra de 2015 (LABFLA 737/15), destas 14 alterações foram sinônimas e 1 resultou em substituição do aminoácido, na posição 2634 da poliproteína traduzida,

na região NS5 (Metionina → Valina); 21 alterações com amostra de 2016 (LABFLA 5420/16), destas 20 alterações foram sinônimas e 1 resultou em substituição do aminoácido, na posição 2634 da poliproteína traduzida, na região NS5 (Metionina → Valina) e 34 alterações com a amostra de 2017 (LABFLA 1911/17), destas 28 alterações foram sinônimas e seis resultaram em substituições do aminoácido, na posição 452 da poliproteína traduzida, na região do Envelope (Ácido glutâmico → Aspartato), na posição 827 da poliproteína traduzida, na região do NS1 (Lisina → Arginina), na posição 2367 da poliproteína traduzida, na região do NS4B (Isoleucina → Metionina), na posição 2634 da poliproteína traduzida, na região NS5 (Metionina → Valina), na posição 2815 da poliproteína traduzida, na região do NS5 (Fenilalanina → Tirosina), na posição 3351 da poliproteína traduzida, na região do NS5 (Prolina → Leucina) (tabela 2.5).

Tabela 2.5: Substituições de nucleotídeos e aminoácidos das três amostras do ZIKV sequenciadas neste estudo comparadas com amostra de referência. French_Polynesia/2013/KX447510.1.

ORF	Proteína	aa	French_Polynesia/2013/KX447510.1		Sub linhagem 3				Sub linhagem 5	
					LABFLA 737/15		LABFLA 5420/16		LABFLA 1911/17	
			nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
12	Capsídeo	4	T	P	A	*	A	*	A	*
165	Capsídeo	55	A	R	*	*	*	*	G	*
174	Capsídeo	58	T	A	A	*	A	*	A	*
669	Membrana	223	C	S	*	*	*	*	T	*
681	Membrana	227	G	L	*	*	*	*	A	*
759	Membrana	259	G	L	A	*	*	*	*	*
900	Envelope	300	C	D	*	*	*	*	T	*
1356	Envelope	452	G	E	*	*	*	*	T	D
1491	Envelope	497	T	N	*	*	*	*	C	*
1768	Envelope	590	T	L	*	*	*	*	C	*
1797	Envelope	599	C	T	*	*	*	*	T	*
2037	Envelope	679	A	I	*	*	*	*	C	*
2115	Envelope	705	G	V	*	*	A	*	*	*
2304	Envelope	768	C	N	*	*	*	*	T	*
2335	Envelope	779	T	L	*	*	C	*	*	*
2427	NS1	809	C	C	T	*	T	*	*	*
2480	NS1	827	A	K	*	*	*	*	G	R
2892	NS1	964	G	K	*	*	*	*	A	*
2895	NS1	965	T	V	*	*	C	*	*	*
2907	NS1	969	T	Y	*	*	*	*	C	*
2922	NS1	974	T	D	C	*	*	*	*	*
3435	NS1	1145	T	L	*	*	*	*	C	*
3459	NS2A	1153	T	G	*	*	*	*	C	*
3837	NS2A	1279	T	A	*	*	*	*	C	*
3838	NS2A	1280	T	L	C	*	*	*	*	*
3843	NS2A	1281	C	A	T	*	*	*	*	*
3882	NS2A	1294	T	D	C	*	C	*	*	*
3945	NS2A	1315	G	A	*	*	*	*	A	*
3969	NS2A	1323	T	C	C	*	C	*	C	*
4767	NS3	1589	C	A	*	*	T	*	*	*
5160	NS3	1720	T	R	*	*	C	*	*	*
5208	NS3	1736	A	E	*	*	*	*	G	*
5397	NS3	1799	A	A	*	*	*	*	C	*
5499	NS3	1833	A	S	*	*	*	*	G	*
6021	NS3	2007	T	A	C	*	C	*	C	*
6084	NS3	2028	G	T	*	*	*	*	A	*
6318	NS3	2106	G	A	A	*	*	*	*	*
6609	NS4A	2203	A	G	*	*	G	*	*	*
6918	NS4B	2306	C	A	*	*	*	*	T	*
6951	NS4B	2317	T	T	*	*	C	*	*	*
7101	NS4B	2367	A	I	*	*	*	*	G	M
7398	NS4B	2466	C	A	T	*	T	*	*	*
7410	NS4B	2470	T	A	C	*	C	*	C	*
7900	NS5	2634	A	M	G	V	G	V	G	V
7938	NS5	2646	T	L	*	*	*	*	C	*
7950	NS5	2650	G	V	A	*	A	*	*	*
8444	NS5	2815	T	F	*	*	*	*	A	Y
8661	NS5	2887	C	P	*	*	*	*	T	*
9327	NS5	3109	G	K	A	*	A	*	A	*
9945	NS5	3315	T	T	*	*	C	*	*	*
10052	NS5	3351	C	P	*	*	*	*	T	L
10146	NS5	3382	T	A	*	*	C	*	*	*

5.2.4- Similaridade das sequências brasileiras (ORF)

Um total de 37 sequências brasileiras, divididas em oito grupos monofiléticos, foram comparadas entre si para avaliarmos a similaridade e divergência que apresentam.

A identidade nucleotídica dos oito grupos monofiléticos onde se analisou a região codificante completa demonstrou uma variação de 99,64 – 99,96%, 37 - 4 substituições pontuais entre as sequências do grupo monofilético G1; 99,84%, 18 substituições pontuais entre as sequências do grupo monofilético G2; 99,60 – 99,86%, 41 – 14 substituições pontuais entre as sequências do grupo monofilético G3; 99,96%, 4 substituições pontuais entre as sequências do grupo monofilético G4; 99,59 - 100%, 41 – 0 substituições pontuais entre as sequências do grupo monofilético G5; 99,75% - 99,99%, 26 – 1 substituições pontuais entre as sequências do grupo monofilético G6; 100%, 0 substituições pontuais entre as sequências do grupo monofilético G7; 99,95% - 100%, 5 – 0 substituições pontuais entre as sequências do grupo monofilético G8 (tabela 3.5 e tabela 4.5).

Analisando as tabelas 3.5 e 4.5, a maior variação nucleotídica entre grupos monofiléticos encontrada foi entre as sequências do grupo monofilético G1 (G1/RJ/2016/KU926310.2), do grupo monofilético G3 (G3/RJ/2016/KY785455.1) e grupo monofilético G6 (G6/RJ/2016/KY014296.2) com o grupo monofilético G5 (G5c/RJ/LABFLA_1911/17), todas com 99,51% de similaridade, 50 substituições pontuais e a menor variação nucleotídica entre grupos monofiléticos foi observada entre as sequências do grupo monofilético G1 (L1/PB/2015/KX280026.1) e grupo monofilético G3 (G3/RJ/LABFLA_737/15) com 99,81% de similaridade, 20 substituições pontuais; grupo monofilético G3 (G3/RJ/LABFLA_737/15) e ambas do grupo monofilético G7 (G7/2015/KX197205.1 e G7/2016/KX830930.1) com 99,81% de similaridade, 20 substituições pontuais; grupo monofilético G3 (G3/RJ/LABFLA_737/15) e duas do grupo monofilético G8 (G8/2015/L8/KR872956.1 e G8/BA/2015/KU321639.1) com também 99,81% de similaridade, 20 substituições pontuais.

Analisando as tabelas 5.5 e 6.5, a maior variação de aminoácidos entre grupos monofiléticos encontrada foi entre as sequências do grupo monofilético G2 (G2/SP/2016/KY559005.1), do grupo monofilético G4 (G4/BA/2015/KX520666.1) com o grupo monofilético G1 (G1/2015/KU729217.2), e entre as sequências da

grupo monofilético G2 (G2/SP/2016/KY559005.1) com o grupo monofilético G4 (G4/BA/2015/KX520666.1) todas com 99,53% de similaridade de aminoácidos, 16 substituições de aminoácidos e a menor variação de aminoácidos entre grupos monofiléticos foi observada entre as sequências do grupo monofilético G3 (L3/RJ/LABFLA737/15) com grupo monofilético G3 (G3/RJ/LABFLA_5420/16), grupo monofilético G5 (G5c/2015/KU365778.1), (G5c/2015/KU365779.1), (G5c/BA/2015/KU707826.1); entre as sequências do grupo monofilético G3 (G3/RJ/LABFLA_5420/16) com as sequências G3 (G3/RJ/LABFLA_737/15), G5 (G5c/2015/KU365778.1), (G5c/2015/KU365779.1), (G5c/BA/2015/KU707826.1); entre as sequências do grupo monofilético G5 (G5c/2015/KU365779.1) com (G5c/2015/KU365780.1); entre as sequências do grupo monofilético G5 (G5c/2015/KU365778.1) com (G5c/BA/2015/KU707826.1); entre as sequências da grupo monofilético G5 (G5c/2015/KU365779.1) com (G5c/BA/2015/KU707826.1); entre as sequências do grupo monofilético G6 (G6/RJ/2016/KY014320.2) com (G6/RJ/2016/KY014296.2); entre as sequências do grupo monofilético G7 (G7/2016/KX830930.1) com (G7/2015/KX197205.1); entre as sequências do grupo monofilético G8 (G8/BA/2015/KU321639.1) com (G8/2015/L8/KR872956.1) todas com 100% de similaridade, e nenhuma substituição de aminoácidos.

Comparando as amostras brasileiras com a amostra de referência (French_Polynesia/2013/KX447510.1), a maior variação nucleotídica foi observada com uma amostra do grupo monofilético G3 (G3/RJ/2016/KY785455.1) com 99,69% de similaridade, 32 substituições de nucleotídeo e a menor variação foi observada com uma amostra do grupo monofilético G3 (G3/RJ/LABFLA_737/15) com 99,85 % de similaridade, 15 substituições de nucleotídeos.

A maior variação de aminoácidos foi observada com as amostras dos grupos monofiléticos G1 (G1/2015/KU729217.2), G2 (G2/SP/2016/KY559005.1) e G4 (G4/BA/2015/KX520666.1) com 99,91% de similaridade, 9 substituições de aminoácido e a menor variação foi observada com as amostras dos grupos monofiléticos G3 (G3/RJ/LABFLA_737/15), (G3/RJ/LABFLA_5420/16) e G5 (G5c/2015/KU365778.1), (G5c/2015/KU365779.1), (G5c/BA/2015/KU707826.1) com 99,99 % de similaridade, uma substituição de aminoácido.

Tabela 3.5: Matriz de similaridade de nucleotídeos baseada na região codificante completa (C→NS5) dos grupos monofiléticos do ZIKV do Brasil.

Sequências	Sequências																																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
French_Polynesia/2013/KX447510.1	100	99,74	99,69	99,82	99,71	99,74	99,76	99,74	99,74	99,83	99,69	99,80	99,85	99,79	99,82	99,76	99,72	99,77	99,77	99,76	99,73	99,80	99,77	99,75	99,80	99,75	99,73	99,67	99,71	99,79	99,72	99,82	99,82	99,82	99,82	99,79	99,80	99,80	
America/Brazil/G/12015/KU729217.2	99,74	100	99,69	99,73	99,64	99,67	99,61	99,63	99,63	99,71	99,58	99,67	99,73	99,66	99,69	99,63	99,59	99,66	99,64	99,63	99,60	99,67	99,64	99,64	99,67	99,62	99,60	99,56	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,69	99,69	99,66	99,67	99,67	
America/Brazil/G/12016/KX811222.1	99,78	99,69	100	99,96	99,66	99,69	99,65	99,67	99,65	99,75	99,60	99,71	99,77	99,70	99,73	99,68	99,64	99,68	99,68	99,67	99,64	99,71	99,68	99,66	99,71	99,66	99,64	99,58	99,62	99,70	99,63	99,73	99,73	99,73	99,70	99,71	99,71	99,71	
America/Brazil/G/12015/KX280026.1	99,82	99,73	99,96	100	99,70	99,73	99,69	99,67	99,69	99,79	99,64	99,75	99,81	99,74	99,77	99,72	99,68	99,72	99,71	99,68	99,75	99,72	99,70	99,75	99,70	99,68	99,62	99,66	99,62	99,70	99,63	99,73	99,73	99,77	99,77	99,77	99,74	99,75	99,75
America/Brazil/G/12016/KU926310.2	99,71	99,64	99,66	99,70	100	99,66	99,60	99,62	99,60	99,68	99,53	99,64	99,70	99,63	99,66	99,60	99,56	99,61	99,61	99,60	99,57	99,64	99,61	99,59	99,64	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69
America/Brazil/G/12015/KU527068.1	99,74	99,67	99,69	99,73	99,66	100	99,61	99,63	99,61	99,71	99,56	99,67	99,73	99,66	99,69	99,63	99,59	99,64	99,64	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69	99,67	
America/Brazil/G/2SP/2016/KY559005.1	99,74	99,61	99,65	99,69	99,60	99,61	100	99,82	99,61	99,71	99,56	99,67	99,73	99,68	99,69	99,63	99,59	99,64	99,64	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,69	99,69	99,69	99,66	99,67	
America/Brazil/G/2SP/2016/KY559007.1	99,76	99,63	99,67	99,71	99,62	99,63	99,82	100	99,63	99,75	99,58	99,69	99,75	99,72	99,71	99,65	99,61	99,67	99,68	99,63	99,60	99,72	99,69	99,65	99,72	99,65	99,63	99,57	99,60	99,68	99,61	99,71	99,71	99,71	99,71	99,71	99,68	99,69	99,69
America/Brazil/G/3/2015/KU497555.1	99,74	99,63	99,65	99,69	99,60	99,61	99,63	99,75	100	99,75	99,60	99,71	99,77	99,70	99,75	99,63	99,59	99,64	99,64	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69	99,67	
America/Brazil/G/3/PE/2015/KY558999.1	99,83	99,71	99,75	99,79	99,68	99,71	99,75	99,75	99,75	100	99,72	99,81	99,86	99,83	99,82	99,73	99,69	99,75	99,75	99,74	99,71	99,78	99,75	99,73	99,78	99,73	99,71	99,65	99,69	99,77	99,70	99,79	99,79	99,79	99,79	99,76	99,77	99,77	
America/Brazil/G/3/RJ/ABFLA_542016	99,69	99,58	99,67	99,73	99,64	99,67	99,66	99,76	99,76	99,72	99,66	99,72	99,83	99,82	99,78	99,59	99,56	99,59	99,58	99,55	99,62	99,59	99,59	99,62	99,57	99,55	99,61	99,54	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,62	99,62	
America/Brazil/G/3/RJ/ABFLA_73715	99,80	99,67	99,73	99,79	99,69	99,71	99,79	99,86	99,86	99,71	99,66	99,76	99,79	99,71	99,67	99,70	99,70	99,70	99,71	99,66	99,73	99,72	99,68	99,73	99,68	99,66	99,60	99,64	99,72	99,65	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,72	99,73	99,73
America/Brazil/G/3/SP/2016/KY559015.1	99,79	99,66	99,73	99,79	99,69	99,71	99,79	99,82	99,80	99,77	99,66	99,76	99,79	99,71	99,67	99,73	99,76	99,76	99,75	99,72	99,79	99,76	99,74	99,79	99,74	99,72	99,66	99,70	99,78	99,71	99,81	99,81	99,81	99,81	99,81	99,78	99,79	99,79	
Italy_OR_Brazil/G/3/2016/KU991811.1	99,82	99,76	99,72	99,77	99,72	99,72	99,72	99,72	99,72	99,72	99,66	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62
America/Brazil/G/4/BA/2015/KU940228.1	99,76	99,72	99,77	99,77	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,66	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62
America/Brazil/G/4/BA/2015/KX520666.1	99,72	99,77	99,77	99,77	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,66	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62
America/Brazil/G/5a/RJ/2016/KU926309.2	99,77	99,77	99,77	99,77	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,76	99,66	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62	99,62
America/Brazil/G/5a/RJ/2016/KY272991.1	99,76	99,73	99,78	99,78	99,77	99,77	99,77	99,77	99,77	99,77	99,67	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63	99,63
America/Brazil/G/5c/2015/KU365777.1	99,73	99,80	99,77	99,75	99,80	99,75	99,73	99,80	99,77	99,73	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69	99,67
America/Brazil/G/5c/2015/KU365778.1	99,80	99,77	99,75	99,80	99,75	99,73	99,80	99,77	99,73	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69	99,67	
America/Brazil/G/5c/2015/KU365779.1	99,77	99,80	99,77	99,75	99,80	99,75	99,73	99,80	99,77	99,73	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69	99,67
America/Brazil/G/5c/2015/KU365780.1	99,75	99,80	99,77	99,75	99,80	99,75	99,73	99,80	99,77	99,73	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69	99,67
America/Brazil/G/5c/AM/2016/KY631492.1	99,80	99,75	99,80	99,75	99,80	99,75	99,73	99,80	99,77	99,73	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69	99,67
America/Brazil/G/5c/BA/2015/KU07826.1	99,75	99,80	99,77	99,75	99,80	99,75	99,73	99,80	99,77	99,73	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69	99,67
America/Brazil/G/5c/RJ/2016/KY014297.2	99,73	99,78	99,73	99,78	99,73	99,73	99,73	99,73	99,73	99,73	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69	99,67
America/Brazil/G/5c/RJ/2016/KY786450.1	99,73	99,78	99,73	99,78	99,73	99,73	99,73	99,73	99,73	99,73	99,63	99,60	99,67	99,64	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,67	99,62	99,60	99,54	99,58	99,66	99,59	99,69	99,69	99,71	99,71	99,68	99,69	99,67
America/Brazil/G/5c/RJ/ABFLA_191117	99,67	99,71	99,66	99,71	99,66	99,66	99,66	99,66	99,66	99,66	99,56	99,53	99,61	99,58	99,55	99,62	99,59	99,59	99,58	99,55	99,62	99,59	99,59	99,62	99,57	99,55	99,61	99,54	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,64	99,62	99,62
America/Brazil/G/6/RJ/2016/KY014296.2	99,71	99,79	99,72	99,82	99,71	99,79	99,72	99,82	99,71	99,79	99,69	99,72	99,79	99,72	99,79	99,72	99,79	99,72	99,79	99,72	99,79	99,72	99,79	99,72	99,79	99,72	99,70	99,78	99,71	99,81	99,81	99,81	99,81	99,81	99,81	99,78	99,79	99,79	
America/Brazil/G/6/RJ/2016/KY014317.2	99,79	99,72	99,82	99,71	99,79	99,72	99,82	99,71	99,79	99,72	99,69																												

Tabela 4.5: Matriz de diferença de nucleotídeos baseada na região codificante completa (C→NS5) dos grupos monofiléticos do ZIKV do Brasil.

Sequências da região codificante completa	French_Polynesia/2013/KX447510.1																																					
	America/Brazil/G1/2015/KU729217.2	America/Brazil/G1/CE/2016/KX811222.1	America/Brazil/G1/PB/2015/KX280026.1	America/Brazil/G1/RJ/2016/KU926310.2	America/Brazil/G1/RN/2015/KU527068.1	America/Brazil/G2/SP/2016/KY559005.1	America/Brazil/G2/SP/2016/KY559007.1	America/Brazil/G3/2015/KU497555.1	America/Brazil/G3/PE/2015/KY558999.1	America/Brazil/G3/RJ/2016/KY785455.1	America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_5420/16	America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_737/15	America/Brazil/G3/SP/2016/KY559015.1	Italy_OR_Brazil/G3/2016/KU991811.1	America/Brazil/G4/BA/2015/KU940228.1	America/Brazil/G4/BA/2015/KX520666.1	America/Brazil/G5a/RJ/2016/KU926309.2	America/Brazil/G5a/RJ/2016/KY272991.1	America/Brazil/G5c/2015/KU365777.1	America/Brazil/G5c/2015/KU365778.1	America/Brazil/G5c/2015/KU365779.1	America/Brazil/G5c/2015/KU365780.1	America/Brazil/G5c/AM/2016/KY631492.1	America/Brazil/G5c/BA/2015/KU707826.1	America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY014297.2	America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY785450.1	America/Brazil/G5c/RJ/LABFLA_1911/17	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014296.2	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014317.2	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014320.2	America/Brazil/G7/2015/KX197205.1	America/Brazil/G7/2016/KX830930.1	America/Brazil/G8/2015/G8/KR872956.1	America/Brazil/G8/BA/2015/KU321639.1	America/Brazil/G8/PE/2015/KX197192.1	America/Brazil/G8/PE/2015/MF352141.1	America/Brazil/SGD/2015/KU729218.1	
French_Polynesia/2013/KX447510.1	27	23	19	30	27	27	25	27	17	32	21	15	22	19	25	29	24	24	25	28	21	24	26	21	26	28	34	30	22	29	19	19	19	19	22	21	21	
America/Brazil/G1/2015/KU729217.2	27		32	28	37	34	40	38	38	30	43	34	28	35	32	38	42	35	37	38	41	34	37	37	34	39	41	45	43	35	42	32	32	32	32	35	34	34
America/Brazil/G1/CE/2016/KX811222.1	23	32		4	35	32	36	34	36	26	41	30	24	31	28	33	37	33	33	34	37	30	33	35	30	35	37	43	39	31	38	28	28	28	28	31	30	30
America/Brazil/G1/PB/2015/KX280026.1	19	28	4		31	28	32	30	32	22	37	26	20	27	24	29	33	29	29	30	33	26	29	31	26	31	33	39	35	27	34	24	24	24	24	27	26	26
America/Brazil/G1/RJ/2016/KU926310.2	30	37	35	31		35	41	39	41	33	48	37	31	38	35	41	45	40	40	41	44	37	40	42	37	42	44	50	46	38	45	35	35	35	35	38	37	37
America/Brazil/G1/RN/2015/KU527068.1	27	34	32	28	35		40	38	40	30	45	34	28	35	32	38	42	37	37	38	41	34	37	39	34	39	41	47	43	35	42	32	32	30	30	33	32	34
America/Brazil/G2/SP/2016/KY559005.1	27	40	36	32	41	40		18	40	30	45	34	28	33	32	38	42	37	37	38	41	34	37	39	34	39	41	47	43	35	42	32	32	32	32	35	34	34
America/Brazil/G2/SP/2016/KY559007.1	25	38	34	30	39	38	18		38	26	43	32	26	29	30	36	40	34	34	33	38	29	32	36	29	36	38	44	41	33	40	30	30	30	33	32	32	
America/Brazil/G3/2015/KU497555.1	27	38	36	32	41	40	40	38		26	41	30	24	31	26	38	42	37	37	38	41	34	37	39	34	39	41	47	43	35	42	32	32	32	33	35	34	34
America/Brazil/G3/PE/2015/KY558999.1	17	30	26	22	33	30	30	26	26		29	20	14	17	18	28	32	26	26	27	30	23	26	28	23	28	32	34	21	22	22	22	22	22	25	24	24	
America/Brazil/G3/RJ/2016/KY785455.1	32	43	41	37	48	45	45	43	41	29		35	29	33	33	43	45	42	42	43	46	39	42	42	39	44	46	50	48	40	47	37	37	37	40	39	39	
America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_5420/16	21	34	30	26	37	34	34	32	30	20	35		14	25	22	30	34	31	31	30	35	28	29	33	28	33	35	41	37	29	36	26	26	26	29	28	28	
America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_737/15	15	28	24	20	31	28	28	26	24	14	29	14		19	16	24	28	25	25	26	29	22	25	27	22	27	29	35	31	23	30	20	20	20	23	22	22	
America/Brazil/G3/SP/2016/KY559015.1	22	35	31	27	38	35	33	29	31	17	33	25	19		21	33	37	31	31	32	35	28	31	33	28	33	35	41	38	30	37	27	27	27	27	30	29	
Italy_OR_Brazil/G3/2016/KU991811.1	19	32	28	24	35	32	32	30	26	18	33	22	16	21		30	34	29	29	30	31	26	29	31	26	31	33	39	35	27	34	24	24	24	24	27	26	
America/Brazil/G4/BA/2015/KU940228.1	25	38	33	29	41	38	38	36	38	28	43	30	24	33	30		4	35	35	36	39	32	35	37	32	37	38	45	41	31	40	30	30	30	30	33	32	30
America/Brazil/G4/BA/2015/KX520666.1	29	42	37	33	45	42	42	40	42	32	45	34	28	37	34	4		39	39	40	43	36	39	41	36	41	42	49	45	35	44	34	34	34	34	37	36	34
America/Brazil/G5a/RJ/2016/KU926309.2	24	35	33	29	40	37	37	34	37	26	42	31	25	31	29	35	39		28	33	36	29	32	34	29	34	36	42	40	32	39	27	27	29	29	32	31	31
America/Brazil/G5a/RJ/2016/KY272991.1	24	37	33	29	40	37	37	34	37	26	42	31	25	31	29	35	39	28		33	36	29	32	34	29	34	36	42	40	32	39	27	27	29	29	32	31	31
America/Brazil/G5c/2015/KU365777.1	25	38	34	30	41	38	38	33	38	27	43	30	26	32	30	36	40	33	33		27	4	1	31	4	25	27	39	41	33	40	30	30	30	30	33	32	32
America/Brazil/G5c/2015/KU365778.1	28	41	37	33	44	41	41	38	41	30	46	35	29	35	31	39	43	36	36	27		23	26	34	23	24	26	42	42	36	43	33	33	33	33	36	35	35
America/Brazil/G5c/2015/KU365779.1	21	34	30	26	37	34	34	29	34	23	39	28	22	28	26	32	36	29	29	4	23		5	27	0	21	23	35	37	29	36	26	26	26	29	28	28	
America/Brazil/G5c/2015/KU365780.1	24	37	33	29	40	37	37	32	37	26	42	29	25	31	29	35	39	32	32	1	26	5		30	5	24	26	38	40	32	39	29	29	29	29	32	31	31
America/Brazil/G5c/AM/2016/KY631492.1	26	37	35	31	42	39	39	36	39	28	42	33	27	33	31	37	41	34	34	31	34	27	30		27	32	34	18	42	34	41	31	31	31	31	34	33	33
America/Brazil/G5c/BA/2015/KU707826.1	21	34	30	26	37	34	34	29	34	23	39	28	22	28	26	32	36	29	29	4	23	0	5	27		21	23	35	37	29	36	26	26	26	26	29	28	28
America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY014297.2	26	39	35	31	42	39	39	36	39	28	44	33	27	33	31	37	41	34	34	25	24	21	24	32	21		4	40	42	34	41	31	31	31	31	34	33	33
America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY785450.1	28	41	37	33	44	41	41	38	41	30	46	35	29	35	33	38	42	36	36	27	26	23	26	34	23	4		42	44	36	43	33	33	33	33	36	35	35
America/Brazil/G5c/RJ/LABFLA_1911/17	34	45	43	39	50	47	47	44	47	36	50	41	35	41	39	45	49	42	42	39	42	35	38	18	35	40	42		50	42	49	39	39	39	42	41	41	
America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014296.2	30	43	39	35	46	43	43	41	43	32	48	37	31	38	35	41	45	40	40	41	42	37	40	42	37	42	44	50		26	1	35	35	33	33	36	35	37
America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014317.2	22	35	31	27	38	35	35	33	35	24	40	29	23	30	27	31	35	32	32	33	36	29	32	34	29	34	36	42	26		25	27	27	27	30	29	29	
America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014320.2	29	42	38	34	45	42	42	40	42	31	47	36	30	37	34	40	44	39	39	40	43	36	39	41	36	41	43	49	1	25		34	34	32	32	35	34	36
America/Brazil/G7/2015/KX197205.1	19	32	28	24	35	32	32	30	32	22	37	26	20	27	24	30	34	27	27	30	33	26	29	31	26	31	33	39	35	27	34		0	24	24	27	26	26
America/Brazil/G7/2016/KX830930.1	19	32	28	24	35	32	32	30	32	22	37	26	20	27	24	30	34	27	27	30	33	26	29	31	26	31	33	39	35	27	34	0		24	24	27	26	26
America/Brazil/G8/2015/G8/KR872956.1	19	32	28	24	35	30	32	30	32	22	37	26	20	27	24	30	34	29	29	30	33	26	29	31	26	31	33	39	33	27	32	24	24		0	3	2	26
America/Brazil/G8/BA/2015/KU321639.1	19	32	28	24	35	30	32	30	32	22	37	26	20	27	24	30	34	29	29	30	33	26	29	31	26	31	33	39	33	27	32	24	24	0		3	2	26
America/Brazil/G8/PE/2015/KX197192.1	22	35	31	27	38	33	35	33	35	25	40	29	23	30	27	33	37	32	32	33	36	29	32	34	29	34	36	42	30	35	27	27	3	3		5	29	
America/Brazil/G8/PE/2015/MF352141.1	21	34	30	26	37	32	34	32	34	24	39	28	22	29	26	32	36	31	31	32	35	28	31	33	28	33	35	41	35	29	34	26	26	2	2	5		28
America/Brazil/SGD/2015/KU729218.1	21	34	30	26	37	34	34	32	34	24	39	28	22	29	26	30	34	31	31	32	35																	

Tabela 6.5: Matriz de diferença de aminoácidos baseada na região codificante completa (C→NS5) dos grupos monofiléticos do ZIKV do Brasil.

Sequências da região codificante completa	Sequências da região codificante completa																																				
	French_Polynesia/2013/KX447510.1	America/Brazil/G1/2015/KU729217.2	America/Brazil/G1/CE/2016/KX811222.1	America/Brazil/G1/PB/2015/KX280026.1	America/Brazil/G1/RJ/2016/KU926310.2	America/Brazil/G1/RN/2015/KU527068.1	America/Brazil/G2/SP/2016/KY559005.1	America/Brazil/G2/SP/2016/KY559007.1	America/Brazil/G3/2015/KU497555.1	America/Brazil/G3/PE/2015/KY558999.1	America/Brazil/G3/RJ/2016/KY785455.1	America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_5420/16	America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_737/15	America/Brazil/G3/SP/2016/KY559015.1	Italy_OR_Brazil/G3/2016/KU991811.1	America/Brazil/G4/BA/2015/KU940228.1	America/Brazil/G4/BA/2015/KX520666.1	America/Brazil/G5a/RJ/2016/KU926309.2	America/Brazil/G5a/RJ/2016/KY272991.1	America/Brazil/G5c/2015/KU365777.1	America/Brazil/G5c/2015/KU365779.1	America/Brazil/G5c/2015/KU365780.1	America/Brazil/G5c/AM/2016/KY631492.1	America/Brazil/G5c/BA/2015/KU707826.1	America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY014297.2	America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY785450.1	America/Brazil/G5c/RJ/LABFLA_1911/17	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014296.2	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014317.2	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014320.2	America/Brazil/G7/2015/KX197205.1	America/Brazil/G7/2016/KX830930.1	America/Brazil/G8/BA/2015/KU321639.1	America/Brazil/G8/PE/2015/KX197192.1	America/Brazil/G8/PE/2015/MF352141.1	America/Brazil/SGD/2015/KU729218.1	
French_Polynesia/2013/KX447510.1	9	5	2	5	5	9	6	4	5	3	1	1	7	3	7	9	3	4	2	1	2	3	1	4	6	6	4	4	4	4	4	4	6	6	7	8	4
America/Brazil/G1/2015/KU729217.2	9	10	7	10	10	16	13	11	11	10	8	8	14	10	14	16	8	11	9	8	8	9	10	8	11	13	11	11	11	11	11	11	13	13	14	15	11
America/Brazil/G1/CE/2016/KX811222.1	5	10	3	6	6	12	9	7	7	6	4	4	10	6	10	12	6	7	5	4	4	5	6	4	7	9	9	7	7	7	7	9	9	10	11	7	
America/Brazil/G1/PB/2015/KX280026.1	2	7	3	3	3	9	6	4	4	3	1	1	7	3	7	9	3	4	2	1	1	2	3	1	4	6	6	4	4	4	4	4	6	6	7	8	4
America/Brazil/G1/RJ/2016/KU926310.2	5	10	6	3	6	12	9	7	7	6	4	4	10	6	10	12	6	7	5	4	4	5	6	4	7	9	9	7	7	7	9	9	10	11	7		
America/Brazil/G1/RN/2015/KU527068.1	5	10	6	3	6	12	9	7	7	6	4	4	10	6	10	12	6	7	5	4	4	5	6	4	7	9	9	7	7	7	9	9	10	11	7		
America/Brazil/G2/SP/2016/KY559005.1	9	16	12	9	12	12	7	11	12	10	8	8	12	10	14	16	10	11	9	8	8	9	10	8	11	13	13	11	11	11	13	13	14	15	11		
America/Brazil/G2/SP/2016/KY559007.1	6	13	9	6	9	9	7	8	7	7	5	5	7	7	11	13	7	8	6	5	5	6	7	5	8	10	10	8	8	8	8	10	11	12	8		
America/Brazil/G3/2015/KU497555.1	4	11	7	4	7	7	11	8	7	5	3	3	9	5	9	11	5	6	4	3	3	4	5	3	6	8	8	6	6	6	6	8	8	9	10	6	
America/Brazil/G3/PE/2015/KY558999.1	5	11	7	4	7	7	12	7	7	4	4	4	10	6	10	12	6	7	5	4	4	5	6	4	7	9	9	7	7	7	9	9	10	11	7		
America/Brazil/G3/RJ/2016/KY785455.1	3	10	6	3	6	6	10	7	5	4	2	2	6	4	8	10	4	5	3	2	2	3	4	2	5	7	7	5	5	5	7	7	8	9	5		
America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_5420/16	1	8	4	1	4	4	8	5	3	4	2	0	6	2	6	8	2	3	1	0	0	1	2	0	3	5	5	3	3	3	3	5	5	6	7	3	
America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_737/15	1	8	4	1	4	4	8	5	3	4	2	0	6	2	6	8	2	3	1	0	0	1	2	0	3	5	5	3	3	3	3	5	5	6	7	3	
America/Brazil/G3/SP/2016/KY559015.1	7	14	10	7	10	12	7	9	6	6	6	6	8	12	14	8	9	7	6	6	7	8	6	9	11	11	9	9	9	9	11	11	12	13	9		
Italy_OR_Brazil/G3/2016/KU991811.1	3	10	6	3	6	6	10	7	5	6	4	2	2	8	8	10	4	5	3	2	2	3	4	2	5	7	7	5	5	5	5	7	7	8	9	5	
America/Brazil/G4/BA/2015/KU940228.1	7	14	10	7	10	12	14	11	9	10	8	6	6	12	8	10	4	2	8	9	7	6	6	7	8	6	9	11	9	9	9	11	11	12	13	9	
America/Brazil/G4/BA/2015/KX520666.1	9	16	12	9	12	12	16	13	11	12	10	8	8	14	10	2	10	11	9	8	8	9	10	8	11	13	13	11	11	11	11	13	13	14	15	11	
America/Brazil/G5a/RJ/2016/KU926309.2	3	8	6	3	6	6	10	7	5	6	4	2	2	8	4	8	10	3	3	2	2	3	4	2	5	7	7	5	5	3	3	7	7	8	9	5	
America/Brazil/G5a/RJ/2016/KY272991.1	4	11	7	4	7	7	11	8	6	7	5	3	9	5	9	11	3	4	3	3	4	5	3	6	8	8	6	6	4	4	4	8	8	9	10	6	
America/Brazil/G5c/2015/KU365777.1	2	9	5	2	5	5	9	6	4	5	3	1	1	7	3	7	9	3	4	1	1	0	3	1	4	6	6	4	4	4	4	6	6	7	8	4	
America/Brazil/G5c/2015/KU365779.1	1	8	4	1	4	4	8	5	3	4	2	0	6	2	6	8	2	3	1	0	0	1	2	0	3	5	5	3	3	3	3	5	5	6	7	3	
America/Brazil/G5c/2015/KU365780.1	2	9	5	2	5	5	9	6	4	5	3	1	1	7	3	7	9	3	4	0	1	1	3	1	4	6	6	4	4	4	4	6	6	7	8	4	
America/Brazil/G5c/AM/2016/KY631492.1	3	10	6	3	6	6	10	7	5	6	4	2	2	8	4	8	10	4	5	3	2	2	3	2	5	7	3	5	5	5	5	7	7	8	9	5	
America/Brazil/G5c/BA/2015/KU707826.1	1	8	4	1	4	4	8	5	3	4	2	0	6	2	6	8	2	3	1	0	0	1	2	0	3	5	5	3	3	3	3	5	5	6	7	3	
America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY014297.2	4	11	7	4	7	7	11	8	6	7	5	3	9	5	9	11	5	6	4	3	3	4	5	3	4	8	6	6	6	6	6	8	8	9	10	6	
America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY785450.1	6	13	9	6	9	9	13	10	8	9	7	5	5	11	7	11	13	7	8	6	5	5	6	7	5	4	10	8	8	8	8	10	11	12	8		
America/Brazil/G5c/RJ/LABFLA_1911/17	6	13	9	6	9	9	13	10	8	9	7	5	5	11	7	11	13	7	8	6	5	5	6	3	5	8	10	8	8	8	8	10	11	12	8		
America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014296.2	4	11	7	4	7	7	11	8	6	7	5	3	9	5	9	11	5	6	4	3	3	4	5	3	6	8	8	4	0	6	6	8	8	9	10	6	
America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014317.2	4	11	7	4	7	7	10	8	6	7	5	3	9	5	9	11	5	6	4	3	3	4	5	3	6	8	8	4	4	6	6	8	8	9	10	6	
America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014320.2	4	11	7	4	7	7	11	8	6	7	5	3	9	5	9	11	5	6	4	3	3	4	5	3	6	8	8	0	4	6	6	8	8	9	10	6	
America/Brazil/G7/2015/KX197205.1	4	11	7	4	7	7	11	8	6	7	5	3	9	5	9	11	3	4	4	3	3	4	5	3	6	8	8	6	6	6	0	8	8	9	10	6	
America/Brazil/G7/2016/KX830930.1	4	11	7	4	7	7	11	8	6	7	5	3	9	5	9	11	3	4	4	3	3	4	5	3	6	8	8	6	6	6	0	8	8	9	10	6	
America/Brazil/G8/2015/G8/KR872956.1	6	13	9	6	9	9	13	10	8	9	7	5	5	11	7	11	13	7	8	6	5	5	6	7	5	8	10	10	8	8	8	8	0	1	2	8	
America/Brazil/G8/BA/2015/KU321639.1	6	13	9	6	9	9	13	10	8	9	7	5	5	11	7	11	13	7	8	6	5	5	6	7	5	8	10	10	8	8	8	8	0	1	2	8	
America/Brazil/G8/PE/2015/KX197192.1	7	14	10	7	10	10	14	11	9	10	8	6	6	12	8	12	14	8	9	7	6	6	7	8	6	9	11	11	9	9	9	1	1	3	9		
America/Brazil/G8/PE/2015/MF352141.1	8	15	11	8	11	11	15	12	10	11	9	7	7	13	9	13	15	9	10	8	7	7	8	9	7	10	12	12	10	10	10	2	2	3	10		
America/Brazil/SGD/2015/KU729218.1	4	11	7	4	7	7	11	8	6	7	5	3	9	5	9	11	5	6	4	3	3	4	5	3	6	8	8	6	6	6	6	8	8	9	10	6	

As cores variam do verde, amarelo e vermelho, sendo que o verde representa uma maior diferença de nucleotídeos e o vermelho uma menor diferença de nucleotídeos. A diferença de nucleotídeos foi determinada através do programa BioEdit 7.2 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

5.2.5- Similaridade das sequencias das Américas (ORF)

Foram analisadas as substituições pontuais de nucleotídeos em toda a ORF utilizando a amostra de referência da Polinésia Francesa (French_Polynesia/2013/KX447510.1). Houve sete substituições pontuais que ocorreram em todas as amostras das Américas quando comparadas com a amostra de referência. São elas: posição 12 da poliproteína (Capsídeo) (substituição de T → A), posição 174 da poliproteína (Capsídeo) (substituição de T → A), posição 3969 da poliproteína (NS2A) (substituição de T → C) com exceção da amostra (Nicarágua/2016/MF434522.1) que manteve o nucleotídeo da amostra de referência, posição 6021 da poliproteína (NS3) (substituição de T → C), posição 7410 da poliproteína (NS4B) (substituição de T → C), posição 7900 da poliproteína (NS5) (substituição de A → G), responsável pela substituição do aminoácido Metionina para Valina, posição 9327 da poliproteína (NS5) (substituição de G → A) com exceção das amostras (Haiti/2014/KU509998.3), (USA_imported/2016/KX051563.1) e (China_imported/2016/KU744693.1) que mantiveram o nucleotídeo da amostra de referência.

Foram analisadas as substituições que causaram a mudança do aminoácido (tabela 7.5). A região da poliproteína da amostra (French_Polynesia/2013/KX447510.1) foi utilizada como referência. No aminoácido 80 da poliproteína, região do Capsídeo, houve uma substituição do aminoácido I (Isoleucina) para T (Treonina), presente em algumas sequências do grupo monofilético G3 (três amostras da Colômbia - 2015) e grupo monofilético G5c (duas amostras da Colômbia - 2015, duas amostras dos Estados Unidos da América (EUA) - 2016 e todas de Porto Rico - 2015 e 2016). No aminoácido 107 da poliproteína, região do Capsídeo, houve uma substituição do aminoácido D (Aspartato) para E (Ácido glutâmico) presente em quase todas as sequências do grupo monofilético G3 (três amostras do Brasil - 2015 e 2016, todas as amostras da Colômbia deste grupo - 2015 e 2016, todas do Panamá - 2015 e 2016, todas do Peru (duas) - 2016, as duas do México deste grupo - 2016, uma da República Dominicana - 2016, Martinica - 2015 e um caso importado para EUA - 2016), e em uma do grupo monofilético G5c (um caso importado para china - 2016). No aminoácido 313 da poliproteína, região do Envelope, houve uma substituição do aminoácido V (Valina) para I (Isoleucina), presente somente e em todas as sequências do grupo monofilético G8 do Brasil (quatro amostras - 2015). No aminoácido 894 da poliproteína, região da NS1, houve

uma substituição do aminoácido G (Glicina) para A (Alanina), presente somente e em todas as sequências do grupo monofilético G5B (Todas as amostras da Guatemala (três - 2015 e 2016), todas de Nicarágua (16 - 2016), todas de Honduras (13 - 2015 e 2016), 12 amostras do México (todas do grupo – 2015 e 2016), três dos EUA - 2016 e casos importados para EUA, Rússia e China – 2016 e 2017). No aminoácido 916 da poliproteína, região da NS1, houve uma substituição do aminoácido Y (Tirosina) para H (Histidina), presente somente e em todas as sequências do grupo monofilético G8 (quatro amostras do Brasil e duas amostras do Haiti – 2014 e 2016). No aminoácido 1118 da poliproteína, região da NS1, houve uma substituição do aminoácido R (Arginina) para W (Triptofano), presente em quase todas as sequências do grupo monofilético G3 (todas as amostras da Colômbia deste grupo, todas do Panamá, as duas do México deste grupo, uma do Peru, República Dominicana - 2016, Martinica - 2015, Venezuela -2016 e um caso importado para EUA - 2016). No aminoácido 1143 da poliproteína, região da NS1, houve uma substituição do aminoácido M (Metionina) para V (Valina), presente em todas as sequências do grupo monofilético G1. Uma sequência brasileira do grupo monofilético G3 teve a substituição do aminoácido diferente das demais, sendo ela de M (Metionina) para T (Treonina). No aminoácido 1285 da poliproteína, região da NS2A, houve uma substituição do aminoácido I (Isoleucina) para V (Valina), presente em algumas sequências do grupo monofilético G5C (uma da República Dominicana - 2016 e casos importados para China - 2016). No aminoácido 1394 da poliproteína, região NS2B, houve uma substituição de A (Alanina) para T (Treonina), presente somente e em todas as sequências do grupo monofilético G2 (duas amostras do Brasil – 2016). No aminoácido 1542 da poliproteína, região da NS3, houve uma substituição do aminoácido V (Valina) para I (Isoleucina), presente em algumas sequências do grupo monofilético G5B (todas do México deste grupo com exceção de uma - 2015 e 2016, uma dos EUA - 2016 e um caso importado para Rússia - 2017). No aminoácido 1622 da poliproteína, região NS3, houve uma substituição de D (Aspartato) para G (Glicina), presente somente em sequências do grupo monofilético G4 (duas amostras do Brasil – 2016). No aminoácido 1857 da poliproteína, região da NS3, houve uma substituição do aminoácido H (Histidina) para Y (Tirosina), presente em todas as sequências do grupo monofilético G8 (quatro amostras do Brasil e duas amostras do Haiti – 2014 e 2016) e em duas do

grupo monofilético G5B (casos importados para China – 2016). No aminoácido 2039 da poliproteína, região da NS3, houve uma substituição do aminoácido K (Lisina) para R (Arginina), presente somente em sequências do Brasil, todas do grupo monofilético G5a (duas – 2016) e todas do grupo monofilético G7 (duas – 2015 e 2016). No aminoácido 2074 da poliproteína, região da NS3, houve uma substituição do aminoácido M (Metionina) para L (Leucina), presente somente e em todas as sequências do grupo monofilético G5B. No aminoácido 2123 da poliproteína, região NS4A, houve uma substituição de F (Fenilalanina) para L (Leucina), presente somente e em todas as sequências do grupo monofilético G4 (duas amostras do Brasil – 2016 e duas amostras importadas para Itália - 2016). No aminoácido 2295 da poliproteína, região da NS4B, houve uma substituição do aminoácido I (Isoleucina) para M (Metionina), presente em todas as sequências do grupo monofilético G8 e em uma de Honduras do grupo monofilético G5B. No aminoácido 2445, região da poliproteína NS4B, houve uma substituição do aminoácido I (Isoleucina) para M (Metionina), presente em quase todas as sequências do grupo monofilético G8 (quatro amostras do Brasil e uma amostra do Haiti – 2014) e em algumas do grupo monofilético G5B (três amostras de Nicarágua - 2016) No aminoácido 2611 da poliproteína, região da NS5, houve uma substituição do aminoácido A (Alanina) para V (Valina), presente em algumas sequências do grupo monofilético G5c (as duas da Colômbia deste grupo, todas de Porto Rico com exceção de uma e duas dos EUA). Duas amostras de Nicarágua do grupo monofilético G5B tiveram a substituição do aminoácido diferente das demais, sendo ela de A (Alanina) para T (Treonina). No aminoácido 2634 da poliproteína, região da NS5, houve uma substituição do aminoácido M (Metionina) para V (Valina) em todas as sequências de todos os grupos monofiléticos das Américas. No aminoácido 3074 da poliproteína, região da NS5, houve uma substituição do aminoácido I (Isoleucina) para V (Valina), presente somente e em todas as sequências do grupo monofilético G6 do Brasil (três amostras).

Tabela 7.5: Diferença de aminoácidos das amostras das Américas.

Região da poliproteína			C		E		NS1				NS2A		NS2B		NS3				NS4A		NS4B		NS5		
Posição			80	107	313	894	916	1118	1143	1285	1394	1542	1622	1857	2039	2074	2123	2295	2445	2611	2634	3074			
Ref		Polynesia/2013/KX447510.1	I	D	V	G	Y	R	M	I	A	V	D	H	K	M	F	I	I	A	M	I			
1	G1	Brazil/G1/2015/KU729217.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*		
2	G1	Brazil/G1/CE/2016/KX811222.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
3	G1	Brazil/G1/PB/2015/KX280026.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
4	G1	Brazil/G1/RJ/2016/KU926310.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
5	G1	Brazil/G1/RN/2015/KU527068.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
6	G1	Cuba/2017MF438286.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
7	G1	D_Republic/2016/KU853012.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
8	G1	D_Republic/2016/KU853013.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
9	G1	D_Republic/2016/KY014300.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
10	G1	D_Republic/2016/KY014302.3	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
11	G1	D_Republic/2016/KY014304.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
12	G1	D_Republic/2016/KY014305.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
13	G1	D_Republic/2016/KY014314.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
14	G1	D_Republic/2016/KY014318.3	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
15	G1	D_Republic/2016/KY014321.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
16	G1	D_Republic/2016/KY785415.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
17	G1	D_Republic/2016/KY785420.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
18	G1	D_Republic/2016/KY785441.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
19	G1	D_Republic/2016/KY785475.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
20	G1	D_Republic/2016/KY785476.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
21	G1	Ecuador/2016/KX879603.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
22	G1	Ecuador/2016/KX879604.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
23	G1	Ecuador/2016/MF794971.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
24	G1	Haiti/2014/KY415986.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
25	G1	Haiti/2014/KY415987.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
26	G1	Haiti/2014/KY415989.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
27	G1	Haiti/2014/KY415990.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
28	G1	Haiti/2014/KY415991.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
29	G1	Haiti/2014/KY415988.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
30	G1	Haiti/2016/MF384325.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
31	G1	Miami/2016/KX922705.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
32	G1	USA/2016/KX832731.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
33	G1	USA/2016/KX838904.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
34	G1	USA/2016/KX838905.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
35	G1	USA/2016/KX838906.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
36	G1	USA/2016/KX842449.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
37	G1	USA/2016/KX922703.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
38	G1	USA/2016/KX922704.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
39	G1	USA/2016/KX922706.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
40	G1	USA/2016/KX922707.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
41	G1	USA/2016/KX922708.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
42	G1	USA/2016/KY014299.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
43	G1	USA/2016/KY014316.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
44	G1	USA/2016/KY014322.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
45	G1	USA/2016/KY014323.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
46	G1	USA/2016/KY014324.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
47	G1	USA/2016/KY014325.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
48	G1	USA/2016/KY075935.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
49	G1	USA/2016/KY075936.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
50	G1	USA/2016/KY075937.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
51	G1	USA/2016/KY075938.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
52	G1	USA/2016/KY075939.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
53	G1	USA/2016/KY325464.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
54	G1	USA/2016/KY325468.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
55	G1	USA/2016/KY325469.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
56	G1	USA/2016/KY325472.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
57	G1	USA/2016/KY325473.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
58	G1	USA/2016/KY785422.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
59	G1	USA_imp/2016/KY014295.2	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
60	G1	Italy/Haiti/2016/KX269878.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
61	G1	Japan/2016/LC190723.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
62	G1	United_imp/2016/KX673530.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
63	G2	Brazil/G2/SP/2016/KY559005.1	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	
64	G2	Brazil/G2/SP/2016/KY559007.1	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	

Tabela 7.5 (continuação): Diferença de aminoácidos das amostras das Américas.

Região da poliproteína			C		E		NS1				NS2A	NS2B	NS3				NS4A	NS4B	NS5				
Posição			80	107	313	894	916	1118	1143	1285	1394	1542	1622	1857	2039	2074	2123	2295	2445	2611	2634	3074	
Ref	Polynesia/2013/KX447510.1		I	D	V	G	Y	R	M	I	A	V	D	H	K	M	F	I	I	A	M	I	
65	G3	Brazil/G3/2015/KU497555.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
66	G3	Brazil/G3/PE/2015/KY558999.1	*	E	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
67	G3	Brazil/G3/RJ/2016/KY785455.1	*	E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
68	G3	Brazil/G3/RJ/LABFLA_5420/16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
69	G3	Brazil/G3/RJ/LABFLA737/15	*	E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
70	G3	Brazil/G3/SP/2016/KY559015.1	*	E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
71	G3	Italy/Brazil/G3/2016/KU991811.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
72	G3	Colombia/2015/KU820897.5	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
73	G3	Colombia/2015/KX087102.2	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
74	G3	Colombia/2015/KX548902.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
75	G3	Colombia/2015/KY989971.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
76	G3	Colombia/2015/MF574552.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
77	G3	Colombia/2015/MF574553.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
78	G3	Colombia/2015/MF574554.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
79	G3	Colombia/2015/MF574555.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
80	G3	Colombia/2015/MF574556.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
81	G3	Colombia/2015/MF574557.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
82	G3	Colombia/2015/MF574558.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
83	G3	Colombia/2015/MF574559.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
84	G3	Colombia/2015/MF574560.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
85	G3	Colombia/2015/MF574561.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
86	G3	Colombia/2015/MF574562.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
87	G3	Colombia/2015/MF574563.1	T	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
88	G3	Colombia/2015/MF574564.1	T	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
89	G3	Colombia/2015/MF574565.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
90	G3	Colombia/2015/MF574566.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
91	G3	Colombia/2015/MF574567.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
92	G3	Colombia/2015/MF574568.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
93	G3	Colombia/2015/MF574569.1	T	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
94	G3	Colombia/2015/MF574570.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
95	G3	Colombia/2015/MF574571.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
96	G3	Colombia/2015/MF574572.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
97	G3	Colombia/2015/MF574573.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
98	G3	Colombia/2015/MF574574.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
99	G3	Colombia/2015/MF574575.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
100	G3	Colombia/2015/MF574576.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
101	G3	Colombia/2015/MF574577.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
102	G3	Colombia/2016/KX247646.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
103	G3	Colombia/2016/KY317936.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
104	G3	Colombia/2016/KY317937.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
105	G3	Colombia/2016/KY317938.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
106	G3	Colombia/2016/KY317939.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
107	G3	Colombia/2016/KY317940.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
108	G3	Colombia/2016/KY785466.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
109	G3	Colombia/2016/KY785469.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
110	G3	Colombia/2016/MF574580.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
111	G3	Colombia/2016/MF574581.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
112	G3	Colombia/2016/MF574582.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
113	G3	Colombia/2016/MF574583.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
114	G3	Colombia/2016/MF574584.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
115	G3	Colombia/2016/MF574585.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
116	G3	Colombia/2016/MF574586.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
117	G3	Colombia/2016/MF574587.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
118	G3	Colombia/2016/MF574588.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
119	G3	D_Republic/2016/KY014303.2	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
120	G3	Martinique/2015/KU647676.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
121	G3	Mexico/2016/KU922923.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
122	G3	Mexico/2016/KU922960.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
123	G3	Panama/2015/KX156774.2	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
124	G3	Panama/2015/KX156775.2	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
125	G3	Panama/2015/KX156776.2	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
126	G3	Panama/2016/KX198135.2	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
127	G3	Peru/2016/KY693678.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
128	G3	Peru/2016/KY693679.1	*	E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
129	G3	Venezuela/2016/KX702400.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
130	G3	USA/2016/KY785468.1	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
131	G3	USA_imported/2016/KY075932.1	*	E	*	*	*	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*

Tabela 7.5 (continuação): Diferença de aminoácidos das amostras das Américas.

Região da poliproteína		C		E		NS1				NS2A	NS2B	NS3				NS4A	NS4B		NS5		
Posição		80	107	313	894	916	1118	1143	1285	1394	1542	1622	1857	2039	2074	2123	2295	2445	2611	2634	3074
Ref	Polynesia/2013/KX447510.1	I	D	V	G	Y	R	M	I	A	V	D	H	K	M	F	I	I	A	M	I
132	G4	Brazil/G4/BA/2015/KU940228.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	L	*	*	*	V	*
133	G4	Brazil/G4/BA/2015/KX520666.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	L	*	*	*	V	*
134	G4	Italy/2016/KY003153.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	V	*
135	G4	/Italy/2016/KY003154.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	V	*
136	G5A	Brazil/G5a/RJ/2016/KU926309.2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	*	V	*
137	G5A	Brazil/G5a/RJ/2016/KY272991.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	*	V	*
138	G5B	Guatemala/2015/KU501216.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
139	G5B	Guatemala/2015/KU501217.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
140	G5B	Guatemala/2016/KU870645.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
141	G5B	Honduras/2015/KX694534.2	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
142	G5B	Honduras/2016/KX262887.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
143	G5B	Honduras/2016/KY014306.2	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
144	G5B	Honduras/2016/KY014310.2	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	M	*	*	V	*
145	G5B	Honduras/2016/KY014312.2	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
146	G5B	Honduras/2016/KY014315.2	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
147	G5B	Honduras/2016/KY014319.2	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
148	G5B	Honduras/2016/KY328289.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
149	G5B	Honduras/2016/KY693676.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
150	G5B	Honduras/2016/KY693677.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
151	G5B	Honduras/2016/KY785418.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
152	G5B	Honduras/2016/KY785442.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
153	G5B	Honduras/2016/KY785448.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
154	G5B	Mexico/2015/KX247632.1	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
155	G5B	Mexico/2015/KY631493.1	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
156	G5B	Mexico/2015/KY631494.1	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
157	G5B	Mexico/2016/KX446950.2	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
158	G5B	Mexico/2016/KX446951.2	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
159	G5B	Mexico/2016/KX766029.1	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
160	G5B	Mexico/2016/KX856011.1	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
161	G5B	Mexico/2016/KY120348.1	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
162	G5B	Mexico/2016/KY120349.2	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
163	G5B	Mexico/2016/KY606272.1	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
164	G5B	Mexico/2016/KY606273.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
165	G5B	Mexico/2016/KY648934.1	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
166	G5B	Nicaragua/2016/KX421194.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	L	*	V	*
167	G5B	Nicaragua/2016/KX421195.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	L	*	V	*
168	G5B	Nicaragua/2016/KY765317.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
169	G5B	Nicaragua/2016/KY765318.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
170	G5B	Nicaragua/2016/KY765320.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	L	*	V	*
171	G5B	Nicaragua/2016/KY765321.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
172	G5B	Nicaragua/2016/KY765322.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
173	G5B	Nicaragua/2016/KY765323.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	T	V	*
174	G5B	Nicaragua/2016/KY765324.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
175	G5B	Nicaragua/2016/KY765325.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
176	G5B	Nicaragua/2016/KY765326.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	T	V	*
177	G5B	Nicaragua/2016/KY765327.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
178	G5B	Nicaragua/2016/MF434516.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
179	G5B	Nicaragua/2016/MF434517.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
180	G5B	Nicaragua/2016/MF434521.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
181	G5B	Nicaragua/2016/MF434522.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
182	G5B	USA/2016/KX827268.1	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
183	G5B	USA/2016/KY325465.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
184	G5B	USA/2016/KY325479.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
185	G5B	USA_imp/2017/MF159531.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*
186	G5B	China/2016/KY927808.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	Y	*	L	*	*	*	*	V	*
187	G5B	China_imp/2016/MF593625.1	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	Y	*	L	*	*	*	*	V	*
188	G5B	Russia_imp/2017/MF098771.1	*	*	*	A	*	*	*	*	I	*	*	*	L	*	*	*	*	V	*

Tabela 7.5 (continuação): Diferença de aminoácidos das amostras das Américas.

Região da poliproteína			C		E		NS1				NS2A	NS2B	NS3				NS4A	NS4B		NS5			
Posição			80	107	313	894	916	1118	1143	1285	1394	1542	1622	1857	2039	2074	2123	2295	2445	2611	2634	3074	
Ref	Polynesia/2013/KX447510.1		I	D	V	G	Y	R	M	I	A	V	D	H	K	M	F	I	I	A	M	I	
189	G5C	Brazil/G5c/2015/KU365777.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
190	G5C	Brazil/G5c/2015/KU365778.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
191	G5C	Brazil/G5c/2015/KU365779.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
192	G5C	Brazil/G5c/2015/KU365780.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
193	G5C	Brazil/G5c/AM/2016/KY631492.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
194	G5C	Brazil/G5c/BA/2015/KU707826.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
195	G5C	Brazil/G5c/RJ/2016/KY014297.2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
196	G5C	Brazil/G5c/RJ/2016/KY785450.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
197	G5C	Brazil/G5c/RJ/LABFLA_1911/17	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
198	G5C	Colombia/2015/MF574578.1	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V	*
199	G5C	Colombia/2015/MF574579.1	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V	*
200	G5C	D_Republic/2016/KX766028.1	*	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
201	G5C	French_Guiana/2015/KU758877.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
202	G5C	Puerto_Rico/2015/KU501215.1	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V	*
203	G5C	Puerto_Rico/2015/KX087101.3	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V	*
204	G5C	Puerto_Rico/2015/KX377337.1	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V	*
205	G5C	Puerto_Rico/2015/KX601168.1	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V	*
206	G5C	Puerto_Rico/2016/KY785464.1	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V	*
207	G5C	Suriname/2015/KU312312.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
208	G5C	Suriname/2016/KU937936.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
209	G5C	Suriname/2016/KY348640.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
210	G5C	Venezuela/2016/KY693680.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
211	G5C	USA/2016/KY075933.1	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V	*
212	G5C	USA/2016/KY075934.1	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V	*
213	G5C	China/2016/KU740184.2	*	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
214	G5C	China/2016/KU820898.1	*	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
215	G5C	China/2016/KU955590.1	*	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
216	G5C	China/2016/MF167360.1	*	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
217	G5C	China_imported/2016/KX056898.1	*	E	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*
218	G6	Brazil/G6/RJ/2016/KY014296.2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V
219	G6	Brazil/G6/RJ/2016/KY014317.2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V
220	G6	Brazil/G6/RJ/2016/KY014320.2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V
221	G7	Brazil/G7/2015/KX197205.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	*	*	V	*	
222	G7	Brazil/G7/2016/KX830930.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	*	*	V	*	
223	G8	Brazil/G8/2015/G8/KR872956.1	*	*	I	*	H	*	*	*	*	*	Y	*	*	*	M	M	*	V	*		
224	G8	Brazil/G8/BA/2015/KU321639.1	*	*	I	*	H	*	*	*	*	*	Y	*	*	*	M	M	*	V	*		
225	G8	Brazil/G8/PE/2015/KX197192.1	*	*	I	*	H	*	*	*	*	*	Y	*	*	*	M	M	*	V	*		
226	G8	Brazil/G8/PE/2015/MF352141.1	*	*	I	*	H	*	*	*	*	*	Y	*	*	*	M	M	*	V	*		
227	G8	Haiti/2014/KU509998.3	*	*	*	*	H	*	*	*	*	*	Y	*	*	*	M	M	*	V	*		
228	G8	USA_OR_Haiti/2016/KX051563.1	*	*	*	*	H	*	*	*	*	*	Y	*	*	*	M	*	*	V	*		
229	SLD	Brazil/SLD/2015/KU729218.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	

Todas as sequências utilizadas na análise filogenética possuíam 10.272 bases nucleotídicas (ORF). A figura 3.6a demonstra a diversidade das amostras das Américas. As cores da figura variam do verde, amarelo e vermelho, sendo que a cor verde representa uma maior diversidade, enquanto a cor vermelha representa uma maior similaridade. As sequências das Américas estão distribuídas por oito grupos monofiléticos e a variação máxima e mínima da diversidade vai de 0 a 89 diferenças de nucleotídeos. Cada país na figura 3.6a é representado por uma cor. As cores e faixa de diferença de nucleotídeos de cada país estão descritas a seguir: Brasil – verde escuro (0 a 50 diferenças, média (\bar{X}) - 32,47 e intervalo de confiança de 95% (IC) - 32,04-32,09), Colômbia – cinza (0 a 51 diferenças, \bar{X} - 13,57 e IC - 13,08-14,06), Cuba – vermelho, Republica Dominicana – Amarelo (3 a 71 diferenças, \bar{X} - 28,42 e IC - 26,48-30,42), Equador – azul claro (2 a 4 diferenças, \bar{X} - 3,33 e IC - 2,51-4,15), Guatemala – marrom (1 a 24 diferenças, \bar{X} - 16 e IC - 6,71-25,29), Haiti – rosa (0 a 32 diferenças, \bar{X} - 9,07 e IC - 5,73-12,41), Honduras – roxo claro (4 a 36 diferenças, \bar{X} - 22,79 e IC - 21,66-23,9), Martinica – amarelo escuro, México – verde claro (1 a 53 diferenças, \bar{X} - 24,70 e IC - 22,62-26,78), Nicarágua – verde água (0 a 39 diferenças, \bar{X} - 23,28 e IC - 21,99-24,55), Panamá – marrom claro (3 a 14 diferenças, \bar{X} - 8,5 e IC - 5,81-11,19), Peru – rosa “salmão”, Porto Rico – roxo escuro (0 a 9 diferenças, \bar{X} - 4,20 e IC - 2,52-5,88), Suriname – cinza escuro (25 a 33 diferenças, \bar{X} - 28,67 e IC - 25,78-31,54), EUA – azul (0 a 65 diferenças, \bar{X} - 30,83 e IC - 29,77-31,93), Venezuela – azul escuro (2 a 57 diferenças, \bar{X} - 38,67 e IC - 15,94-61,38), respectivamente.

O Brasil apresenta a maior diversidade de sequências das Américas, quando levamos em consideração amostras sequenciadas do mesmo país, como evidenciada pela figura 3.6a. Analisando as regiões em que as sequências do Brasil se encontram, observa-se que estas têm um tom mais amarelado em relação às regiões onde as sequências dos outros países da Américas se encontram, com uma média de diferenças de 32,47 nucleotídeos. Isto também pode ser observado na árvore filogenética das Américas, uma vez que as sequências do Brasil estão espalhadas por todos os grupos monofiléticos da América. Enquanto as sequências da Colômbia são mais similares e apresentam um tom mais avermelhado com uma média de diferenças de 13,57 nucleotídeos, isto é corroborado pelo fato da maioria das sequências da Colômbia se distribuir apenas por um grupo monofilético, o grupo monofilético G3. (Figura 3.6a, figura 3.5b e 3.5d).

A divergência das sequências brasileiras entre si é parecida com a divergência das sequências brasileiras quando comparadas com outras sequências das Américas (figura 3.6).

As sequências do Haiti e EUA são pouco divergentes, ambas do grupo monofilético G1. Do mesmo modo as sequências da Colômbia e Venezuela, são pouco divergentes, ambas do grupo monofilético G3. (Figura 3.6a, figura 3.5b e 3.5d).

A diversidade das amostras das Américas foi subdividida por figuras auxiliares de cada proteína, descritas a seguir por ordem decrescente com a maior divergência de nucleotídeos observada entre as amostras. NS5 (23), NS3 (17), Envelope (16), NS1 (15), NS2A (12), NS4A (9), Membrana (8), NS4B (8), Propeptídeo (5), Capsídeo (4), NS2B (4) e 2K (3).

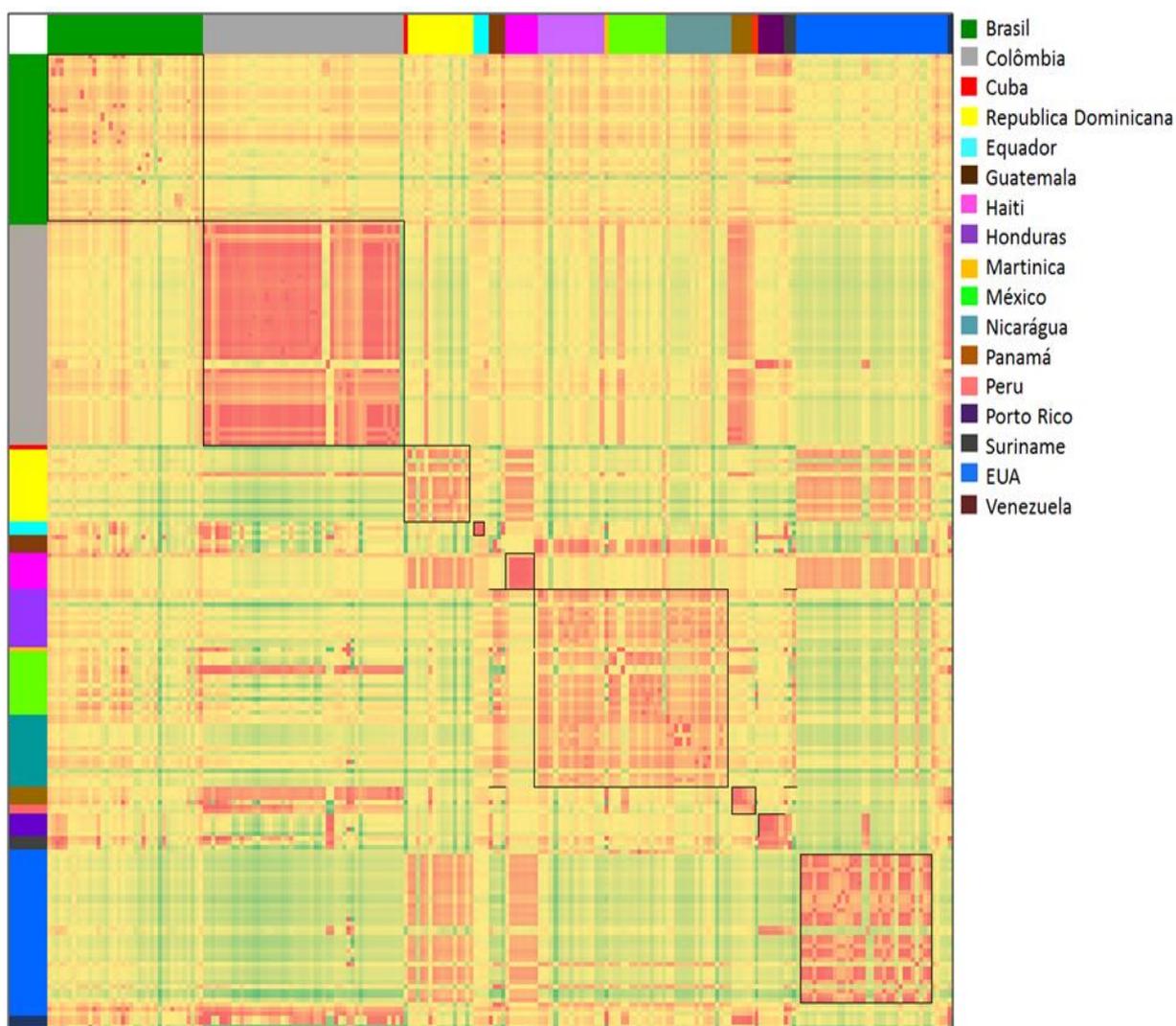


Figura 3.6a: Diversidade de sequências das Américas.

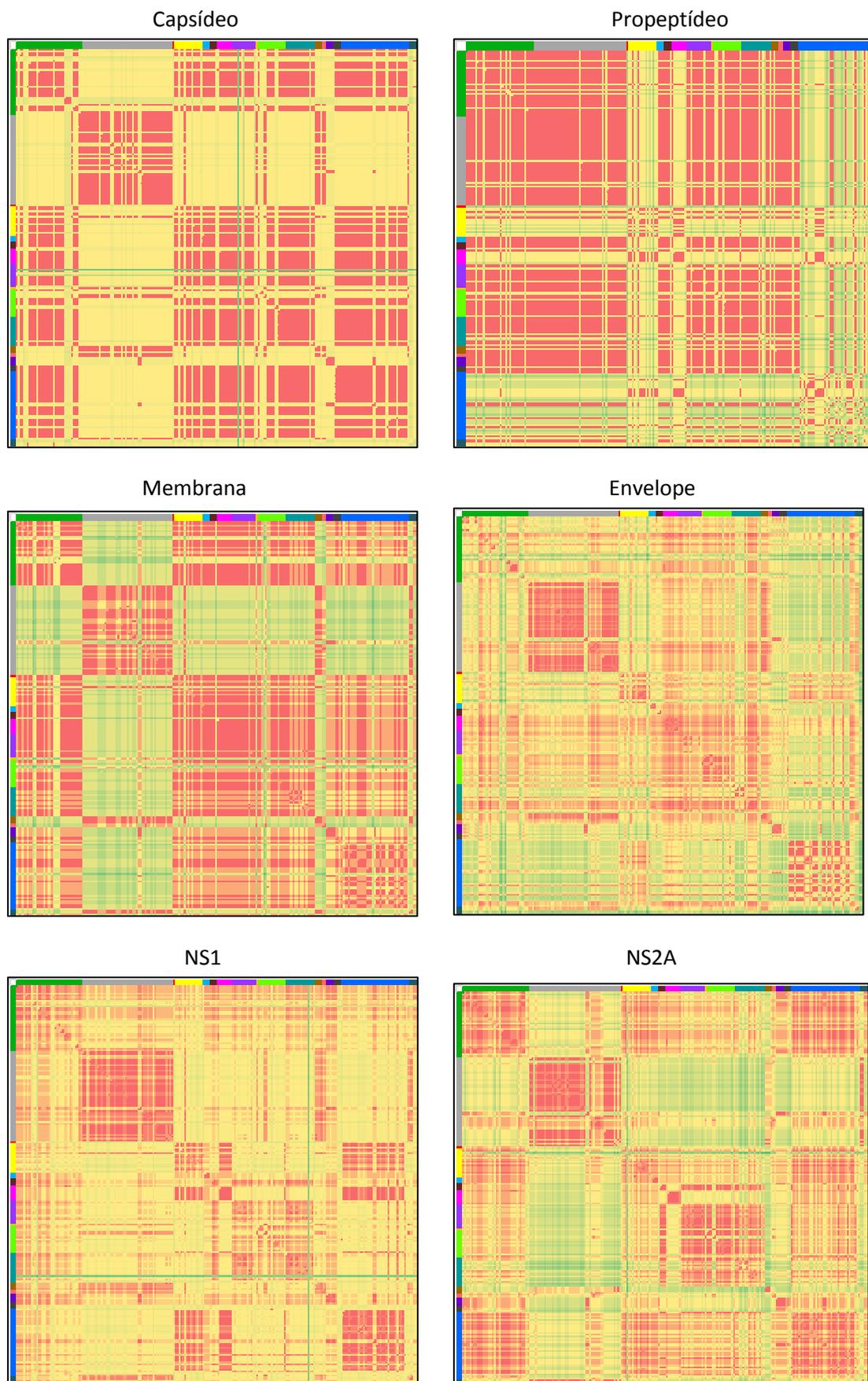


Figura 3.6b: Diversidade de regiões das sequências das Américas.

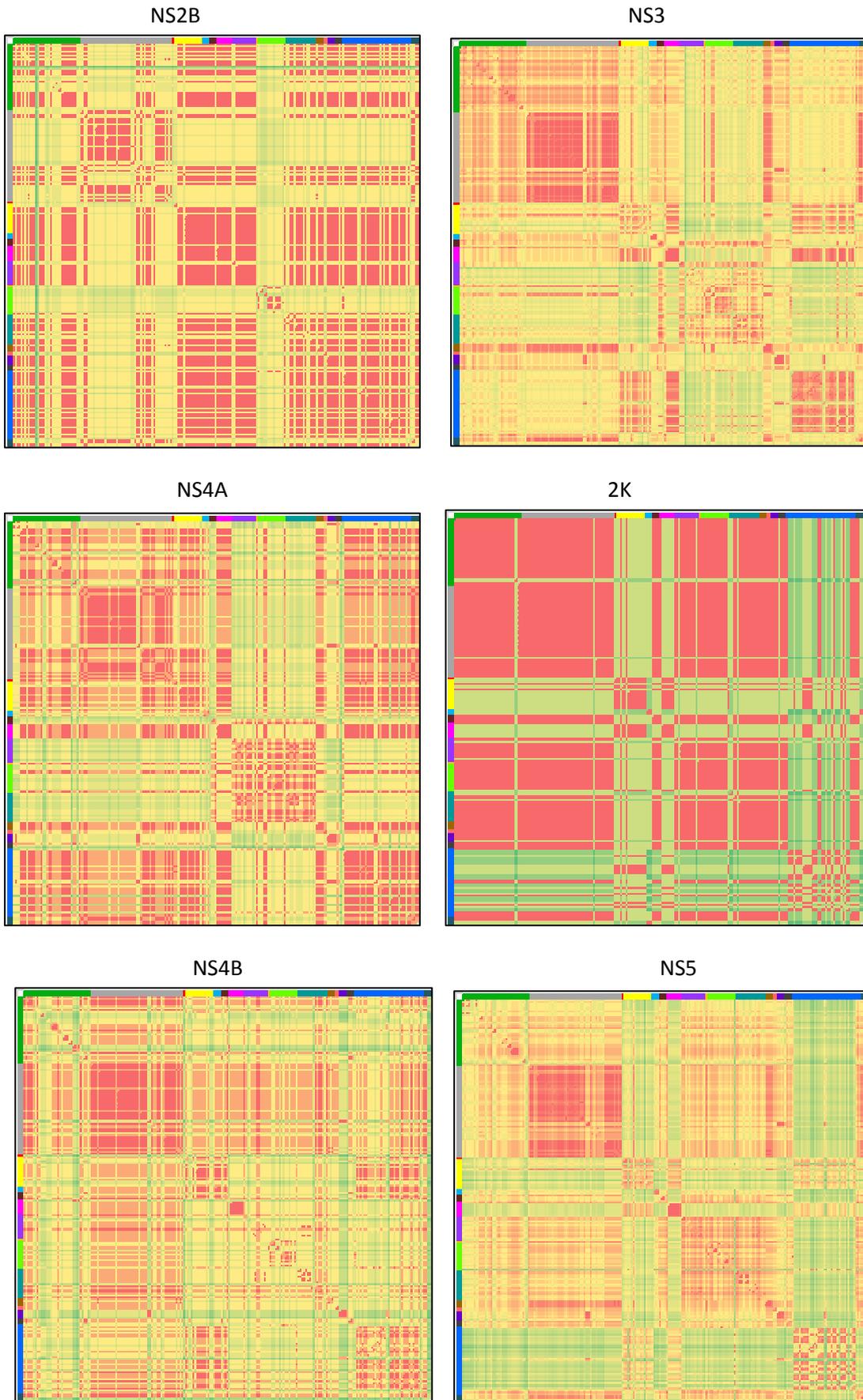


Figura 3.6b (continuação): Diversidade de regiões das sequências das Américas.

Foram levantadas publicações relacionadas as substituições que o ZIKV sofreu ao longo do tempo, disponíveis no PubMed (NCBI) em oito de novembro de 2017. Foram utilizadas como palavras-chave: Flavivírus, Zika, Zika no Brasil, Zika nas Américas, Espalhamento do Zika, Filogenia do Zika e Evolução do Zika. Os artigos selecionados apresentam um conteúdo mais dissertativo compatível ao trabalho. As substituições citadas foram comparadas com as amostras brasileiras (tabela 8.5).

Faria et al. 2016 citaram as substituições V123A, S139N, A982V, N1902H, Y2086H, M2634V e M3392V, comparando com as referências EU545988 (Micronésia, 2007), HQ23499 (Malásia, 1966) e JN860885 (Camboja, 2010). Giovanetti et al. 2016b citaram as substituições F575S e V603I, comparando com a referência MR766 NC_012532.1. Liu et al. 2017 citaram as substituições V759M e A982V, comparando com a referência FSS13025 (Camboja, 2010). Yuan L et al. 2017 citaram a substituição S139N, comparando com a referência Camboja 2010.. Diaz-Quíñonez et al. 2016 citaram as substituições M2634V, V1226T, T3353A, comparando com uma referência da África. Lin Liu et al. 2017 citaram as substituições S109N, K709R, R1118Q, K3190R e N3144S, comparando com a referência Polinésia Francesa/2013 (KJ776791.1).

Wang et al. 2016 citaram as substituições S139N, S550T, K940E, A982V, T1027A, K2039R, M2295I, M2367I, T2509I, S2659P, P3162S, comparando com a referência Malásia 1966. Kochakarn et al. 2016 citaram as substituições G894A, T1027A, M1143V, Y916H, R1118W, S550T, V313I, V346I, S139N, M166T, comparando com uma referência da América do Sul.

Zhu et al. 2016 citaram as substituições V153M, D683E, V763M, T7M, A1289V, M1974L, L2318F, V2453I, L2455S, A2787V, N2896S, K3050R, P3162S, S3223D, D3387N, comparando com a referência Malásia 166. Mlakar el al., 2016 citaram as substituições K940E, T1027A, M1143V, T2509I, M2634V, comparando com a referência H / PF / 2013 (KJ776791).

Tabela 8.5: Análise das substituições citadas em artigos referenciados.

Artigo	Faria et al., 2016							Giovannetti et al., 2016		Liu et al., 2017		Yuan L et al., 2017			Díaz-Quiróñez et al., 2016			Lin Liu et al., 2017				
Referência	EU545988 (Micronésia, 2007)/HQ23499 (Malásia, 1966)/JN860885 (Camboja, 2010)							MR766 NC_012532.1		FSS13025 (Camboja2010)		Camboja 2010			África			Polinésia Francesa/2013 (KJ776791.1)				
Proteína	PrM	NS1	NS3		NS5			E		E	NS1	PrM	NS5	NS2A	NS5	C	E	NS1	NS5			
Posição na poliproteína traduzida	123	139	982	1902	2086	2634	3392	575	603	759	982	139	2634	1226	3353	109	709	1118	3190	3144		
Substituição	V→A	S→N	A→V	N→H	Y→M	M→V	M→V	F→S	V→I	V→M	A→V	S→N	M→V	V→T	T→A	S→N	K→R	R→Q	Q→K	R→N	N→S	
1	America/Brazil/G1/2015/KU29217.2	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
2	America/Brazil/G1/CE/2016/KX811222.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
3	America/Brazil/G1/PB/2015/KX280026.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
4	America/Brazil/G1/RJ/2016/KU926310.2	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
5	America/Brazil/G1/RN/2015/KY527068.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
6	America/Brazil/G2/SP/2016/KY559005.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
7	America/Brazil/G2/SP/2016/KY559007.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
8	America/Brazil/G3/2015/KU497555.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
9	America/Brazil/G3/PE/2015/KY558999.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
10	America/Brazil/G3/RJ/2016/KY785455.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
11	America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_5420/16	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
12	America/Brazil/G3/RJ/LABFLA737/15	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
13	America/Brazil/G3/SP/2016/KY559015.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
14	Italy_OR_Brazil/G3/2016/KU991811.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
15	America/Brazil/G4/BA/2015/KU940228.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
16	America/Brazil/G4/BA/2015/KX520666.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
17	America/Brazil/G5a/RJ/2016/KU926309.2	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
18	America/Brazil/G5a/RJ/2016/KY272991.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
19	America/Brazil/G5c/2015/KU365777.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
20	America/Brazil/G5c/2015/KU365778.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
21	America/Brazil/G5c/2015/KU365779.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
22	America/Brazil/G5c/2015/KU365780.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
23	America/Brazil/G5c/AM/2016/KY631492.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
24	America/Brazil/G5c/BA/2015/KU707826.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
25	America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY014297.2	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
26	America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY785450.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
27	America/Brazil/G5c/RJ/LABFLA_1911/17	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
28	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014296.2	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
29	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014317.2	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
30	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014320.2	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
31	America/Brazil/G7/2015/KX197205.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
32	America/Brazil/G7/2016/KX830930.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
33	America/Brazil/G8/2015/G8/KR872966.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
34	America/Brazil/G8/BA/2015/KU321639.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
35	America/Brazil/G8/PE/2015/KX197192.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
36	America/Brazil/G8/PE/2015/MF352141.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	
37	America/Brazil/SGD/2015/KU729218.1	A	N	V	H	H	V	V	S	I	M	V	N	V	I	T	S	K	R	K	N	

Tabela 8.5 (continuação): Análise das substituições citadas em artigos referenciados.

Artigo		Wang et al., 2016											Kochakam et al., 2016									
Referência		Malásia 1966											América do Sul									
Proteína		PrM	E	NS1			NS3	NS4B			NS5	Ns1				E			PrM			
Posição na poliproteína traduzida		139	550	940	982	1027	2039	2295	2367	2509	2659	3162	894	1027	1143	916	1118	550	313	346	139	166
Substituição		S→N	S→T	K→E	A→V	T→A	K→R	M→I	M→I	T→I	S→P	P→S	G→A	T→A	M→V	Y→H	R→W	S→T	V→I	V→I	S→N	M→T
1	America/Brazil/G1/2015/KU729217.2	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	V	Y	R	S	V	V	N	M
2	America/Brazil/G1/CE/2016/KX811222.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	V	Y	R	S	V	V	N	M
3	America/Brazil/G1/PB/2015/KX280026.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	V	Y	R	S	V	V	N	M
4	America/Brazil/G1/RJ/2016/KU926310.2	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	V	Y	R	S	V	V	N	M
5	America/Brazil/G1/RN/2015/KU527068.1	N	S	E	V	A	K	I	I	I	P	S	G	A	V	Y	R	S	V	V	N	M
6	America/Brazil/G2/SP/2016/KY559005.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
7	America/Brazil/G2/SP/2016/KY559007.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
8	America/Brazil/G3/2015/KU497555.1	N	T	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	T	V	V	N	M
9	America/Brazil/G3/PE/2015/KY558999.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	T	Y	R	S	V	V	N	M
10	America/Brazil/G3/RJ/2016/KY785455.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
11	America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_5420/16	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
12	America/Brazil/G3/RJ/LABFLA737/15	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
13	America/Brazil/G3/SP/2016/KY559015.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
14	Italy_OR_Brazil/G3/2016/KU991811.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
15	America/Brazil/G4/BA/2015/KU940228.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	P	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
16	America/Brazil/G4/BA/2015/KX520666.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	P	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
17	America/Brazil/G5a/RJ/2016/KU926309.2	N	S	K	V	T	R	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
18	America/Brazil/G5a/RJ/2016/KY272991.1	N	S	K	V	T	R	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
19	America/Brazil/G5c/2015/KU365777.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
20	America/Brazil/G5c/2015/KU365778.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
21	America/Brazil/G5c/2015/KU365779.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
22	America/Brazil/G5c/2015/KU365780.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
23	America/Brazil/G5c/AM/2016/KY631492.1	N	S	K	V	T	K	I	M	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
24	America/Brazil/G5c/BA/2015/KU707826.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
25	America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY014297.2	N	S	K	V	T	K	I	I	T	S	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
26	America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY785450.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	S	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
27	America/Brazil/G5c/RJ/LABFLA_1911/17	N	S	K	V	T	K	I	M	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
28	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014296.2	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
29	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014317.2	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
30	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014320.2	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
31	America/Brazil/G7/2015/KX197205.1	N	S	K	V	T	R	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
32	America/Brazil/G7/2016/KX830930.1	N	S	K	V	T	R	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M
33	America/Brazil/G8/2015/G8/R872966.1	N	S	K	V	T	K	M	I	T	P	S	G	T	M	H	R	S	I	V	N	M
34	America/Brazil/G8/BA/2015/KU321639.1	N	S	K	V	T	K	M	I	T	P	S	G	T	M	H	R	S	I	V	N	M
35	America/Brazil/G8/PE/2015/KX197192.1	N	S	K	V	T	K	M	I	T	P	S	G	T	M	H	R	S	I	V	N	M
36	America/Brazil/G8/PE/2015/MF352141.1	N	S	K	V	T	K	M	I	T	P	S	G	T	M	H	R	S	I	V	N	M
37	America/Brazil/SGD/2015/KU729218.1	N	S	K	V	T	K	I	I	T	P	S	G	T	M	Y	R	S	V	V	N	M

Tabela 8.5 (continuação): Análise das substituições citadas em artigos referenciados.

Artigo		Zhu et al., 2016														Mlakar et al., 2016					
Referência		Malásia 1966														H / PF / 2013 (KJ776791)					
Proteína		PrM	E				NS2	NS3	NS4B			NS5					NS1			NS4B	NS5
Posição na poliproteína traduzida		153	683	763	777	1289	1974	2318	2453	2455	2787	2896	3050	3162	3223	3387	940	1027	1143	2509	2634
Substituição		V→M	D→E	V→M	T→M	A→V	M→L	L→F	V→I	L→S	A→V	N→S	K→R	P→S	S→D	D→N	K→E	T→A	M→V	T→I	M→V
1	America/Brazil/G1/2015/KU729217.2	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	V	T	V
2	America/Brazil/G1/CE/2016/KX811222.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	V	T	V
3	America/Brazil/G1/PB/2015/KX280026.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	V	T	V
4	America/Brazil/G1/RJ/2016/KU926310.2	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	V	T	V
5	America/Brazil/G1/RN/2015/KU527068.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	E	A	V	I	V
6	America/Brazil/G2/SP/2016/KY559005.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
7	America/Brazil/G2/SP/2016/KY559007.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
8	America/Brazil/G3/2015/KU497555.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
9	America/Brazil/G3/PE/2015/KY558999.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	T	T	V
10	America/Brazil/G3/RJ/2016/KY785455.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
11	America/Brazil/G3/RJ/LABFLA_5420/16	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
12	America/Brazil/G3/RJ/LABFLA737/15	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
13	America/Brazil/G3/SP/2016/KY559015.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
14	Italy_OR_Brazil/G3/2016/KU918111.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
15	America/Brazil/G4/BA/2015/KU940228.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	P	D	N	K	T	M	T	V
16	America/Brazil/G4/BA/2015/KX520666.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	P	D	N	K	T	M	T	V
17	America/Brazil/G5a/RJ/2016/KU926309.2	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
18	America/Brazil/G5a/RJ/2016/KY272991.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
19	America/Brazil/G5c/2015/KU365777.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
20	America/Brazil/G5c/2015/KU365778.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
21	America/Brazil/G5c/2015/KU365779.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
22	America/Brazil/G5c/2015/KU365780.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
23	America/Brazil/G5c/AM/2016/KY631492.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
24	America/Brazil/G5c/BA/2015/KU707826.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
25	America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY014297.2	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
26	America/Brazil/G5c/RJ/2016/KY785450.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
27	America/Brazil/G5c/RJ/LABFLA_1911/17	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
28	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014296.2	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
29	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014317.2	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
30	America/Brazil/G6/RJ/2016/KY014320.2	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
31	America/Brazil/G7/2015/KX197205.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
32	America/Brazil/G7/2016/KX830930.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
33	America/Brazil/G8/2015/G8/KR872956.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
34	America/Brazil/G8/BA/2015/KU321639.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
35	America/Brazil/G8/PE/2015/KX197192.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
36	America/Brazil/G8/PE/2015/MF352141.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V
37	America/Brazil/SGD/2015/KU729218.1	M	E	M	M	V	L	F	I	S	V	S	R	S	D	N	K	T	M	T	V

6- DISCUSSÃO

As análises de genomas virais com dados ecológicos permitem rastrear a relação genética entre os vírus e assim dar uma estimativa de data provável da introdução, origem e propagação, seguindo um rastro de mutações acumuladas pelos vírus coletados em diferentes momentos e lugares.

Há incerteza em torno do tempo de introdução do ZIKV no Brasil, embora os achados epidemiológicos e genéticos estimem que o ZIKV tenha chegado ao país entre outubro de 2012 e agosto de 2014, mesma data que o Rio de Janeiro hospedou grandes eventos de massa, sugerindo que a porta de entrada do ZIKV no Brasil possa ter sido o estado (Faria et al. 2016; Ayllón et al. 2017; Faria et al. 2017; Metsky et al. 2017; Worobey et al. 2017; Zhang et al. 2017). A demora na confirmação pode ser explicada pela complexidade da sintomatologia da doença, que é semelhante à de outras arboviroses, como por exemplo, a dengue (Brasil et al. 2016b). Outra possível explicação poderia ser a necessidade de adaptação do vírus ao vetor local.

A causa do surgimento repentino e a rápida disseminação do ZIKV não são completamente compreendidas. Vários fatores ambientais possíveis foram propostos. De acordo com Zhu et al. 2016, primeiramente, a globalização e a urbanização permitiram que o ZIKV e seus vetores se espalhassem para além dos seus habitats geográficos originais. Em segundo lugar, grandes eventos desportivos, com a movimentação de pessoas de vários países, como a Copa do Mundo e a corrida de canoas do Campeonato Mundial no Brasil em 2014, podem ter proporcionado uma introdução do vírus na América. Em terceiro, as mudanças climáticas associadas com El Niño na América do Sul em 2015 e o aquecimento global possivelmente facilitaram a rápida propagação do vetor e do ZIKV. Em quarto lugar, o aumento da consciência e capacidade de diagnóstico para infecção pelo ZIKV provavelmente levaram ao aumento da detecção da doença previamente negligenciada. O vírus pode ter circulado silenciosamente por mais de um ano até os primeiros casos serem reportados no Brasil (Campos et al. 2015, Brasil et al. 2016b, Petersen et al. 2016; Passos et al. 2017).

Segundo Zhang e colaboradores (2017), os locais mais prováveis da introdução do ZIKV, em ordem decrescente, são Rio de Janeiro (Sudeste), Brasília (Centro-oeste), Fortaleza (Nordeste) e Salvador (Nordeste). O Rio de Janeiro tem um maior

fluxo de passageiros, fazendo com que a probabilidade de introdução seja maior. As cidades localizadas no Nordeste do Brasil têm menor fluxo de passageiros em comparação com o Rio de Janeiro, mas apresentam maior transmissão do DENV durante todo o ano. Brasília, em comparação, tem pouca sazonalidade em termos de densidade de mosquito, embora a área tenha baixa transmissão do DENV (Zhang et al. 2017). Por outro lado, Faria e colaboradores (2017) estimam que a introdução do ZIKV nas Américas provavelmente deu-se pelo Nordeste do Brasil e a partir daí se espalhou para os outros países.

Uma possível rota de entrada do vírus pode ter sido através de viajantes que chegaram ao país. A partir do final de 2012 houve um aumento de viajantes vindos de regiões onde o vírus circulou (52,5% até o início de 2014). Este aumento do número de viajantes de países afetados pelo ZIKV coincide com a estimativa de quando o vírus entrou nas Américas (Faria et al. 2016)

A não detecção do ZIKV nas amostras do período 2012-2014 sugere que o Rio de Janeiro pode não ter sido a porta de entrada do vírus no país reforçando a suposição de Faria et al. 2017, que diz que a introdução do ZIKV pode ter sido através da região Nordeste entre 2013-2014. No entanto, devemos ressaltar que alguns fatores podem ter contribuído para não detecção do vírus nas amostras analisadas, entre os quais podemos citar a baixa e curta viremia do ZIKV, o quantitativo de amostras analisadas, a intermitência do vírus considerando que a coleta de soro foi única por paciente e a indisponibilidade de amostras de urina que antes de 2015 não era considerada no Brasil como amostra adequada para pesquisa de arbovírus. De acordo com a literatura, há relatos de detecção do ZIKV em urina até 29 dias após o início do quadro clínico (Calvet et al. 2018). Por último, sabe-se que a maioria das infecções é assintomática. A disponibilidade de um teste sorológico anti-ZIKV, poderia ser uma alternativa para confirmar a circulação do vírus no estado do Rio de Janeiro anterior ao ano de 2015. No entanto, a sorologia como método alternativo requer um teste específico e no momento, ainda não está disponível nenhum teste com especificidade e sensibilidade suficiente para confirmar a infecção pelo ZIKV, todos apresentam alto grau de reações cruzadas com outros flavivírus, principalmente DENV.

Em estudos recentes, Passos et al. 2017 identificaram o ZIKV em amostras de abril de 2013 do estado Rio de Janeiro, de acordo com o trabalho de Metsky et al. 2017, que sugerem que o vírus já circulava neste período e Ayllón et al. 2017, que

estima a introdução em outubro de 2012. Até o momento não há informações sobre o genoma destas amostras, no entanto, seria importante ter sequenciado estas amostras para uma maior confiabilidade e seria também de vital importância para o embasamento de estudos filogenéticos, principalmente se fosse de genoma completo. Embora não tenhamos detectado o ZIKV antes de 2015, é possível que vírus já circulasse de forma silenciosa alguns anos antes e que os vários fatores já citados tenham contribuído para sua implantação e epidemia explosiva a partir de 2015.

A introdução do ZIKV no Brasil e em outros países das Américas expôs a população a infecção. A entrada de novos arbovírus em países já endêmicos para dengue, como o Brasil, pode desencadear uma crise aos serviços de saúde durante epidemias simultâneas. O impacto econômico que estas novas arboviroses podem causar também é um fator preocupante, isto porque embora a maioria dos pacientes infectados com CHIKV, ZIKV e DENV apresentem recuperação após a fase aguda da doença, o ZIKV está associado a casos de microcefalia em recém-nascidos e o desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré em alguns pacientes, causando fraqueza muscular e paralisia. Estes fatores interferem diretamente nas atividades ocupacionais da população.

Diversas substituições que o ZIKV que circula no Brasil possui foram responsáveis por uma virulência maior do vírus, e conseqüentemente o tornaram mais infectante aos mosquitos, assim como aumentaram o tropismo do mesmo por células do sistema nervoso central. No entanto, outros fatores também contribuíram para o espalhamento do vírus pelo país. O monitoramento epidemiológico de vírus no Brasil deixa muito a desejar, provavelmente ele não foi feito ou quando iniciado a doença já estava disseminada. O país certamente não estava preparado para uma epidemia de tal magnitude e gravidade. O fato do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor do ZIKV, estar amplamente distribuído por todas as regiões do Brasil foi também outro fator determinante para que o vírus se espalhasse por todo o país, estabelecendo inúmeras rotas de transmissão.

Determinar quando o vírus chegou a regiões específicas ajuda a elucidar a propagação do surto e acompanhar possíveis complicações da infecção pelo ZIKV (Metsky et al. 2017).

As análises filogenéticas têm como objetivo investigar a diversidade genética, a influência sobre sua circulação e as relações existentes com outros arbovírus, assim

podem contribuir para compreendermos melhor a história epidemiológica, as rotas de difusão e para o planejamento de estratégias de prevenção (Giovanetti et al. 2016a).

Análises prévias de flavivírus relacionados sugerem que para serem informativos os estudos epidemiológicos moleculares do ZIKV devem usar sequências da região de codificação completa ou quase completa. (Nunes et al. 2012; Pybus et al. 2012).

Nosso estudo confirmou que o ZIKV circulante no Rio de Janeiro nos anos de 2015, 2016 é de origem asiática, o que corrobora com estudos anteriores, os quais demonstraram que o patógeno que se espalhou por toda a América é intimamente relacionado ao que circulou em várias ilhas do Pacífico em 2013 e 2014. Estes mesmos estudos demonstraram uma homologia de 99,7% com o vírus responsável pelo surto ocorrido na Polinésia Francesa em 2013 (Enfissi et al. 2016).

A taxa de similaridade de nucleotídeos das amostras G3/RJ/LABFLA_737/2015 e G3/RJ/LABFLA_5420/16 é de 99,86%, ambas pertencentes do mesmo grupo monofilético G3 que varia entre 99,60% a 99,86% de similaridade entre si. Entre elas há somente substituições pontuais de nucleotídeos, sem nenhuma substituição de aminoácido. A amostra G5c/RJ/LABFLA_1911/17 possui uma taxa de similaridade de 99,66% com a amostra G3/RJ/LABFLA_737/2015 e 99,60% com a amostra G3/RJ/LABFLA_5420/16, com cinco alterações de aminoácidos E452D, K827R, I2367M, F2815Y e P3351L. Somente a substituição F2815Y parece ter uma maior significância, uma vez que altera a hidrofobicidade na região.

Observamos que as amostras do ano de 2015 e 2016, ambas do grupo monofilético G3, que são casos autóctones do estado do Rio de Janeiro, não apresentam uma diversificação significativa, com poucas alterações nucleotídicas e nenhuma de aminoácido. Comparando com outras amostras do estado do Rio de Janeiro depositadas no GenBank, identificamos uma média de similaridade de nucleotídeo de 99,6%, com quatro substituições de aminoácidos com a amostra KU926310.2 do grupo G1, uma média similaridade de nucleotídeo de 99,65%, com duas substituições com a amostra KY785455.1 do grupo G3, média de 99,65%, com duas substituições com a amostra KU926309.2 do grupo G5a, média de 99,65%, com três substituições com a amostra KY272991.1 do grupo G5a, média de 99,65%, com duas substituições com as amostras KY785450.1 e KY014297.2 do grupo G5c e média de 99,65%, com três substituições com as amostras KY014320.2,

KY014296.2 e KY014317.2 do grupo G6. Quando comparada a amostra sequenciada de 2017 do Rio de Janeiro com as demais do Rio de Janeiro depositadas no GenBank foi visto uma maior diferença entre elas, 99,5% de similaridade de nucleotídeos, tendo além destas substituições de aminoácidos, outras cinco substituições.

A amostra G5c/RJ/LABFLA_1911/17 pertence ao grupo monofilético G5c, juntamente com amostras de Manaus e Venezuela, enquanto as amostras G3/RJ/LABFLA_737/2015 e G3/RJ/LABFLA_5420/16 pertencem ao grupo monofilético G3, isso sugere que a amostra do ano de 2017 seja um caso importado para o Rio de Janeiro a partir da Amazônia. As substituições E452D, K827R F2815Y são exclusivas da amostra G5c/RJ/LABFLA_1911/17 quando comparada com as outras sequências do Brasil. Já as substituições I2367M e P3351L foram encontradas também na amostra G5c/AM/2016/KY631492.1, reforçando que seja um caso de importação para o Rio de Janeiro ou a cepa que circula na Amazônia tenha sido introduzida no estado Rio de Janeiro. Este achado ressalta a importância do sequenciamento, uma vez que fomos capazes de observar na árvore filogenética que a amostra de 2017 era diferente das outras duas sequenciadas de 2015 e 2016.

Quando comparada a amostra de referência da Polinésia Francesa (French_Polynesia/2013/KX447510.1) com as amostras sequenciadas neste estudo, observou-se que ocorreram 15 substituições de nucleotídeos na amostra G3/RJ/LABFLA_737/2015, 21 substituições de nucleotídeos na amostra G3/RJ/LABFLA_5420/16 e 34 substituições de nucleotídeos na amostra G5c/RJ/LABFLA_1911/17 com uma média anual de 9,5 substituições de nucleotídeos, seguindo Faria et al. 2017 que dizem que o ZIKV pode ter em média 10 mutações ao ano.

O acúmulo de substituições também pode ser evidenciado ao compararmos a amostra de referência com as amostras do Brasil do ano de 2015 e 2016, onde foi observado um maior número de substituições nas amostras de 2016. Este resultado demonstra que com passar dos anos mais divergentes as amostras ficam em relação ao seu ancestral. Entretanto, foi observado que a média de substituições das amostras do Brasil de 2015 e 2016 variou bem menos, de 22 substituições no ano de 2015 para 26 substituições no ano de 2016 em comparação a Polinésia Francesa. Estas substituições, mesmo não alterando o aminoácido, podem alterar a

estrutura secundária do RNA e isto pode ter um impacto na infectividade e virulência do ZIKV (Wang et al. 2016).

Uma alteração que causa uma substituição não sinônima é frequentemente considerada significativa. No entanto, se a mudança for entre aminoácidos de propriedades químicas semelhantes, provavelmente não há mudanças efetivas no funcionamento da proteína (Logan, 2016).

Quando comparadas com a amostra de referência, as três amostras sequenciadas apresentaram a mesma substituição de nucleotídeo A7900G que resultou na substituição do aminoácido M2634V. Esta substituição também é encontrada em todas as sequências das Américas analisadas neste estudo, sendo esta a única substituição de aminoácidos encontrada nas amostras G3/RJ/LABFLA_737/2015 e G3/RJ/LABFLA_5420/16.

A substituição observada M2634V é correspondente à região NS5. Esta substituição é comum a todas as sequências do vírus de países da América do Sul e Central e é causada pela substituição do nucleotídeo A para G na posição 7900 da poliproteína. Segundo Zhao et al. 2015, esta substituição é improvável que seja importante quanto à virulência ou comportamento geral do ZIKV, uma vez que ocorre no gene da NS5. O gene NS5 está envolvido na replicação de novos vírus e não é um gene estrutural (Zhao et al. 2015; Logan, 2016). Além disso, esta substituição não altera a polaridade na região da proteína, uma vez que os dois aminoácidos são apolares.

No entanto, talvez seja muito cedo para dizer que esta substituição não tenha absolutamente nenhum efeito, uma vez que proteína NS5 se trata de uma polimerase viral e uma alteração nesta proteína pode resultar em um aumento na produção de novos vírus e assim aumentar a capacidade de infecção e dispersão do vírus, além de influenciar na patogênese da infecção. Mesmo não comprovada à relação desta substituição com a patogênese do ZIKV, esta substituição identifica as cepas mais virulentas do vírus.

A amostra G5c/RJ/LABFLA_1911/17 apresentou mais cinco alterações de aminoácidos quando comparada com a referência: E452D, K827R, I2367M, F2815Y e P3351L.

O ZIKV que circula no Brasil é da linhagem asiática. Tem ancestral em comum com as sequências da Polinésia Francesa, sugerindo assim que o vírus seguiu uma rota de transmissão pelo Oceano Pacífico até chegar ao Brasil. O Brasil está

presente nos oito grupos monofiléticos das Américas descritos neste estudo, sendo que o estado do Rio de Janeiro apresentou sequências dos grupos monofiléticos G1, G3, G5a, G5c e G6, sugerindo várias introduções no estado ou uma evolução local dos grupos monofiléticos com posterior distribuição para outras localidades. Isso é corroborado por Ayllón et al. 2017, que sugerem múltiplas introduções do ZIKV de outros estados do Brasil, e a presença do vírus em 2013 no estado do Rio de Janeiro.

O fato de circularem todos os grupos monofiléticos descritos neste trabalho no Brasil sugere que o vírus ao chegar às Américas se espalhou pelo Brasil e depois para outros países. Isto é corroborado pelo fato de ser o único país que parece ter um primeiro pico bem definido em março de 2015, diferentemente da maioria dos outros países das Américas que tiveram o primeiro pico nos primeiros meses de 2016 (Cardoso et al. 2015. Faria et al. 2016). Através de estudos utilizando árvores evolutivas foi sugerido que o vírus entrou pelo Brasil e se espalhou para o resto das Américas (Worobey, 2017).

Ao analisarmos nossa árvore filogenética das Américas, observamos que podem ter ocorrido introduções no país através da Venezuela e/ou Haiti.

Nós sequenciamos neste estudo a amostra 1911/2017, e observamos que esta foi agrupada em um mesmo clado de amostras da Venezuela e Manaus. Não é possível dizer qual o país está enraizando o clado. Sendo assim, existe a possibilidade do caso da amostra 1911/2017 e dos casos de Manaus serem oriundos de uma introdução a partir da Venezuela. No entanto, a amostra da Venezuela pode ser importada do Brasil e será necessário um maior número de amostras da Venezuela de anos anteriores para embasar uma introdução Venezuela/Brasil.

O grupo G8 contém amostras do Haiti de 2014 e 2016 e amostras do Brasil de 2015 e 2016. A partir da análise filogenética do grupo G8, percebe-se que as amostras deste grupo tiveram um ancestral em comum a todas outras amostras das Américas após a introdução no continente. Do mesmo modo, percebe-se que as amostras do Brasil deste grupo têm um ancestral em comum com amostras do Haiti. Isto sugere que além da introdução única nas Américas a partir das Ilhas do Pacífico para o Brasil sugerida por Faria et al. 2016, Metsky et al. 2017 e Worobey, 2017, pode ter ocorrido também uma introdução a partir do Haiti. Além disso, também não é possível provar que a introdução única sugerida das Ilhas do Pacífico para o Brasil

foi direta, o Haiti pode na verdade ter sido um intermediário para a introdução no Brasil. A introdução do Haiti para o Brasil pode ter ocorrido através dos militares que voltaram infectados de missões no Haiti. Neste trabalho, foi pesquisado o ZIKV, através de qRT-PCR, em 50 amostras de militares com suspeita de chikungunya. O vírus não foi detectado em nenhuma destas, no entanto a infecção do ZIKV pode ter passado despercebida, uma vez que a maioria das infecções é assintomática.

Entretanto, além disso, o Brasil passou a ser um dos destinos preferenciais dos haitianos, devido à dificuldade de entrada em outros países. Em 2013, triplicou a imigração de haitianos no estado do Acre, o que levou o estado a decretar situação de emergência social em alguns municípios. Em 2014, os haitianos se espalharam também pelo sudeste. Esta data coincide com o período estimado da introdução do ZIKV no Brasil. Serão necessárias mais amostras relacionadas ao grupo monofilético G8 para dar uma maior confiabilidade a estas informações.

Para ajudar a elucidar como ocorreu a introdução do ZIKV no continente Americano seria importante incluir sequências de genoma completo da Ilha de Páscoa, uma vez que estas demonstraram uma alta similaridade na região NS5 com amostras da Polinésia Francesa. No entanto, até o momento não há genomas completos sequenciados.

A substituição V313I, na região do Envelope, não está presente em nenhuma das três amostras que sequenciamos, sendo encontrada somente e em todas as sequências do grupo monofilético G8 do Brasil. Está presente em uma região que medeia a ligação do receptor da célula hospedeira e é reconhecida por anticorpos do hospedeiro e pode causar uma maior interação e infecção com as células do hospedeiro. G894A, na região do NS1, também não está presente em nenhuma das três amostras que sequenciamos e foi encontrada somente e em todas as sequências do grupo monofilético G5b (Guatemala, Honduras, Nicarágua, EUA, China e Rússia importadas). Esta substituição identifica esse grupo monofilético. Y916H, na região do NS1, é exclusiva do grupo monofilético G8. Todas as três foram citadas por Kochakarn et al. 2016 que apontam as substituições somente em amostras da América do Sul e não em amostras da África e do Sudeste Asiático.

As três amostras que sequenciamos neste estudo não apresentam a substituição R1118W, na região do NS1, no entanto esta foi encontrada na maioria das amostras do grupo monofilético G3. Esta substituição foi citada por Kochakarn et al. 2016, porém Lin Liu et al. 2017 encontraram nesta mesma região uma

substituição diferente em sua amostra da China, sendo a substituição R1118Q. A substituição R1118W altera a polaridade e hidrofiliçidade da região, enquanto que na substituição R1118Q ocorre uma alteração de polaridade.

O grupo monofilético G3 é um grupo bastante heterogêneo, com certa predominância de amostras da Colômbia e não possui uma substituição única determinante para todo o grupo.

A substituição M1143V, na região NS1, não está presente em nenhuma das três amostras que sequenciamos. Esta substituição é exclusiva do grupo monofilético G1, sendo que a amostra KU527068.1 (Mlakar et al. 2016) é um caso de microcefalia.

Determinar um grupo monofilético pode acabar ajudando no monitoramento do vírus, rotas de transmissão e evolução. O grupo monofilético G1 é um grupo bastante heterogêneo quando se trata de países.

A substituição K2039R, na região NS3, identifica os grupos monofiléticos G5a e G7. A1394V, na região NS2B, identifica o grupo monofilético G2. F2123L, na região NS4A, identifica o grupo monofilético G4. I3074V identifica o grupo monofilético G6, porém é importante salientarmos que nestes grupos a quantidade de amostras analisadas foi bastante limitada, e isto, pode ainda ser uma afirmação precoce quanto à região predominante e as substituições que identificam os grupos monofiléticos. Nenhuma destas altera as propriedades físico-químicas da região da proteína.

Todas as três amostras sequenciadas neste estudo e todas analisadas do Brasil, com exceção de todo o grupo monofilético G8, continham I2295, na região NS4B, diferentemente da M2295I descrita por Wang et al. 2016 em seu estudo utilizando uma referência da Malásia (1966).

As substituições H1857Y na região NS1 e I2445M na região NS4B identificam o grupo monofilético G8. M2074L identifica o grupo monofilético G5b.

As três amostras sequenciadas neste estudo apresentaram a substituição A982V, na região NS1, descrita por Liu et al. 2017. Segundo sua pesquisa, a infectividade do ZIKV foi reforçada por esta substituição, facilitando a transmissão do ZIKV para os mosquitos durante as epidemias nas Américas. Além disso, as substituições na NS1 podem afetar significativamente a replicação viral e a virulência. Estudos de deleção sugerem que NS1 é necessária para o início da síntese do RNA, especialmente durante a síntese precoce de RNA de cadeia

negativa (Zhu et al. 2016). Ao compararmos a sua referência de Camboja 2010 com as nossas amostras sequenciadas e as amostras do Brasil disponíveis no GenBank notamos que a substituição foi observada em todas elas, o que reforça a infectividade adquirida pelo vírus através desta substituição, porém percebemos que Camboja 2010 tem origem do genótipo asiático que antes da epidemia não possuía essa substituição, mas ao consideramos as amostras do ZIKV com o genótipo africano percebemos que nesta mesma posição existe uma Valina e não Alanina como nas amostras epidêmicas. Está claro que o aumento evolutivo na infectividade dos vírus transmitidos por mosquitos pode resultar em epidemia, porém a substituição de Alanina para Valina no genótipo asiático não pode sozinha ser responsável pelo aumento expressivo da infectividade, uma vez que este aminoácido existe no genótipo africano e o mesmo até hoje não causou uma epidemia expressiva. No entanto esta substituição associada a outras ajuda a explicar por que esse vírus passou a provocar epidemias cada vez maiores a partir de 2013. É importante salientar que a substituição se deu entre dois aminoácidos apolares e não alteraram a hidrofobicidade.

Nossas amostras sequenciadas apresentaram todas as substituições citadas por Faria et al. 2016. Das sete substituições citadas em seu trabalho, nenhuma afeta substancialmente as propriedades físico-químicas da proteína, exceto possivelmente Y2086H, que pode aumentar a hidrofobicidade da região.

A substituição citada por Giovanetti e colaboradores também foi observada em nossas três amostras. Os autores sugerem que a substituição F575S, na região do envelope, pode levar a uma população de vírus resistente à neutralização, além disso, esta substituição altera a polaridade da região na proteína. (Giovanetti et al. 2016b)

As amostras que sequenciamos não apresentaram nenhuma das substituições descritas por Lin Liu et al. 2017, mantendo o aminoácido de referência. Os autores utilizaram uma sequência da Polinésia Francesa comparando com sequências da China e identificaram as seguintes substituições: S109N, K709R, R118Q, K3190R e N3144S.

Ao compararmos as sequências de Wang et al. 2016 com as nossas sequências, identificamos que as substituições V123A, V153M, D683E, V763M, T777M, V1058M, A1289V, N1902H, M1974L, Y2086H, G2283S, L2318F, I2449V, V2453I, L2455S, T2634V, I2749T, A2787V, L2795M, V2802I, N2896S, T3046I, K3050R,

R3107K, S3167N, S3223D, Y3239H, D3387N também estão presentes em nossas três amostras e todas do Brasil. Algumas sequências do Brasil não apresentaram as substituições M2367I, S2659P, P3162 e mantiveram o aminoácido de referência. A substituição S550T que também foi citada por Kochakarn et al. 2016 não está presente em nenhuma de nossas três amostras, estando presente em somente uma sequência brasileira (KU497555.1), o restante das amostras brasileiras analisadas também permaneceu S550. Esta sequência é um caso de microcefalia e está no grupo monofilético G3. As substituições K940E, T1027A, T2509I não estão presentes em nenhuma de nossas três amostras. Estas foram encontradas somente em um caso de microcefalia (KU527068.1) do grupo monofilético G1 descritas por além de Wang et al. 2016, Mlakar et al. 2016 e Kochakarn et al. 2016 (para somente T1027A). A substituição K940E pode ter causado uma inversão de polaridade na região, mas esta substituição sozinha não parece ter relação direta com a microcefalia, uma vez que a maioria das sequências da linhagem africana apresentam E940, já T1027A e T2509I alteraram a hidrofobicidade. S550T, T1027A e T2509I não são encontradas em nenhuma outra sequência, inclusive quando comparada a linhagem africana sendo mais provável uma relação com casos de microcefalia, porém são necessários mais estudos para correlacionarmos tais substituições com o aparecimento de casos da doença. Além dessas substituições observadas ao compararmos nossas três amostras com os dois casos de microcefalia, identificamos também outras duas substituições com a amostra KU497555.1 (L1259F e E2831V) que não descritas anteriormente e uma substituição com a amostra KU527068.1 (M1143V). A amostra sequenciada de 2017 apresentou mais cinco substituições (E452D, K827R, I2367M, F2815Y e P3351L).

Nossas três amostras apresentam todas as 15 substituições de aminoácidos identificadas por Zhu et al. 2016 nas cepas epidêmicas do ZIKV em comparação com as cepas pré-epidêmicas. Estas substituições merecem mais estudos, uma vez que são exclusivas das cepas epidêmicas. Cinco substituições, dentre as 15, alteraram as propriedades físico-químicas da região da proteína (T777M, L2455S, P3162S, S3223D, D3387N). Todas estas também estão presentes nas sequências do Brasil, com exceção das duas sequências do grupo monofilético G4, que têm P3162, o mesmo das cepas pré-epidêmicas.

O Brasil apresenta a maior diversidade de sequências das Américas, evidenciado por nosso resultado de diversidade de sequências das Américas. Isto sugere que o país sofreu várias introduções do ZIKV ou foi o palco da evolução de diversos grupos monofiléticos, corroborado pelo fato da divergência das sequências brasileiras entre si ser parecida com a divergência das sequências brasileiras quando comparadas com outras sequências das Américas. Enquanto a Colômbia parece ter sofrido de poucas introduções, uma vez que tem a maior similaridade de sequências dentro do país.

Neste estudo, descobrimos que NS5, sendo a maior proteína, tem o maior número de divergência de aminoácidos ($n = 25$) entre as sequências das Américas. Isto foi observado por Zhu et al. 2016 ao analisarem as linhagens asiáticas e africanas. Além disso, ao contrário do que se espera, observamos que a divergência na proteína E não foi significativamente maior das demais.

O Nordeste desempenhou um papel central no estabelecimento e disseminação do ZIKV nas Américas. Das cinco regiões do Brasil, a região Nordeste tem o maior número de casos de zika notificados (40% dos casos brasileiros) e o maior número de casos de microcefalia confirmados (76% dos casos), levantando questões sobre por que a região foi tão gravemente afetada. Além disso, o Nordeste tem potencial para a transmissão do ZIKV durante o ano todo (Faria et al. 2017). Estudos utilizando árvores filogenéticas apontam o Nordeste como centro do surto nas Américas (Worobey, 2017).

O Grupo monofiléticos G8 contém amostras de Pernambuco de 2015. Dentro deste grupo ocorreram substituições de aminoácidos características (V313I, Y916H, H1857Y, I2295M, I2445M). As substituições Y916H, H1857Y alteram a polaridade da região. Em teoria isto pode ser uma explicação para o maior número de casos de microcefalia no Nordeste do país. No entanto, é importante ampliar o número de amostras sequenciadas oriundas de casos de microcefalia e da região em geral para verificar o percentual da presença de cada grupo monofilético em cada época, e assim, determinar se a predominância de algum grupo tem relação com um maior número de microcefalia encontrado na região. Faria et al. 2016 em seu trabalho não identificaram nenhuma substituição de aminoácido compartilhada entre três genomas do vírus obtido de casos de microcefalia.

Faria e colaboradores e Yuan e colaboradores identificaram a substituição S139A na poliproteína traduzida. Yuan e colaboradores dizem que esta substituição

de aminoácido pode ter levado o vírus a desenvolver uma preferência por células neuronais e são mais neurovirulentas, e assim, pode estar diretamente relacionada com o aumento no número de casos de microcefalia (Faria et al. 2016; Yuan et al. 2017). Analisamos esta substituição para verificar se estava presente em nossas sequências e em outras disponíveis no GenBank. Utilizamos a amostra da Camboja 2010 (JN860885.1) como referência. A substituição está presente em nossas três amostras sequenciadas, em todas as sequências do Brasil e também em todas das Américas, nas sequências da Polinésia Francesa e não está presente em nenhuma das sequências de Singapura e da África. Essa substituição por ser uma alteração de um aminoácido hidrofílico por um hidrofóbico e ocorrer em todas as sequências das Américas, onde foi observado um maior número de microcefalia, reforça que esta pode estar relacionada com uma maior neurovirulência. Na África e no Sudeste Asiático não há evidência direta ligando o ZIKV a qualquer distúrbio neurológico. A diferença no neurotropismo pode ser resultado de variações genéticas no vírus que circula nas Américas. No entanto, não podemos ignorar a possibilidade de que o dano neurológico, que foi visto no Brasil, possa ser devido a interações específicas do hospedeiro com o vírus. Além disso, o número de casos de Zika no Sudeste Asiático pode não ser suficientemente elevado para manifestar sintomas neurológicos relacionados com o ZIKV.

O ZIKV evoluiu para uma ameaça global à saúde por causa de seu vínculo causal inesperado com a microcefalia. A análise filogenética revela que as cepas epidêmicas contemporâneas têm acumulado múltiplas substituições de seus antepassados asiáticos. Entender como o vírus entrou e se espalhou no Brasil é importante para ajudar nas tomadas de decisões de políticas de saúde, para o monitoramento epidemiológico, reconhecendo as muitas falhas que ocorreram na epidemia de zika.

Conhecer as rotas de transmissão do ZIKV, através da vigilância epidemiológica com auxílio de ferramentas moleculares, é uma estratégia importante para o melhor conhecimento e controle da zika.

7- CONCLUSÕES

- ZIKV não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas do período 2012-2014, sugerindo que a circulação poderia ser baixa ou que o vírus não estava circulando no estado neste período.
- Os ZIKV sequenciados neste estudo pertencem ao genótipo asiático.
- As amostras de 2015 e 2016 não apresentam nenhuma alteração significativa entre si, ao passo que a amostra de 2017 apresentou 35 e 41 substituições de nucleotídeos e cinco substituições de aminoácidos quando comparada com as amostras de 2015 e 2016, respectivamente.
- As amostras de 2015 e 2016, quando comparadas com as sequências de amostras brasileiras disponíveis no GenBank, apresentaram maior similaridade de aminoácidos do que a amostra de 2017.
- Ocorreu um aumento na divergência de nucleotídeos das amostras sequenciadas, ao longo dos três anos, quando comparadas com a referência da Polinésia Francesa.
- As amostras de 2015 e 2016 pertencem a um grupo monofilético distinto da amostra de 2017, que apresentou as substituições E452D, K827R, I2367M, F2815Y e P3351L em relação às outras duas.
- Através do sequenciamento da amostra de 2017, identificamos que essa cepa era similar a que circula em Manaus e na Venezuela. Sendo assim, podemos sugerir que o provável local de infecção do paciente foi fora do Rio de Janeiro.
- A substituição V2634 identificada nas três amostras em relação à referência, também está presente em todas as sequências do Brasil e outros países das Américas e pode diferenciar as amostras da linhagem Americana das linhagens que circulam na África e na Ásia atualmente.

- As três amostras sequenciadas neste estudo apresentam a mesma substituição A982V, na região NS1, descrita como uma mutação que favorece a transmissão do ZIKV para os mosquitos ao aumentar a carga viral no sangue do hospedeiro vertebrado.
- A substituição S139N, descrita como uma mutação que aumentou a neurovirulência do ZIKV, está presente nas amostras de 2015, 2016 e 2017, assim como em todas as sequências do Brasil e das Américas e nas sequências da Polinésia Francesa, no entanto, não está presente em nenhuma das sequências de Singapura e da África.

8- PERSPECTIVAS

- Ampliar o número de amostras de casos com clínica compatível com Zika do período de 2012 a 2014, a fim de detectar o ZIKV antes de 2015.
- Pesquisar anticorpos anti-ZIKV em amostras de períodos anteriores a 2015 de pacientes do Rio de Janeiro.
- Sequenciar o genoma completo de amostras de ZIKV oriundas de gestantes que tiveram bebês com e sem microcefalia.
- Comparar as sequências do genoma de ZIKV detectados em diferentes fluidos corporais.
- Analisar as amostras de militares assintomáticos que participaram de missões no Haiti entre 2012 e 2014.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson CR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(5):886-92.

Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, et al. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol.* 2009;83(24):12895-906.

Ayllón T, Campos RM, Brasil P, Morone FC, Câmara DCP, Meira GLS, et al. Early Evidence for Zika Virus Circulation among *Aedes aegypti* Mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(8):1411-2.

Basarab M, Bowman C, Aarons EJ, Cropley I. Zika virus. *BMJ.* 2016;352:i1049.

Basu R, Tumban E. Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. *Virology Journal.* 2016;13:165.

Bogoch II, Brady OJ, Kraemer MUG, German M, Creatore MI, Kulkarni MA, et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *Lancet.* 2016;387(10016):335-6.

Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, Coutard B, Decroly E, et al. Structure and functionally in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, vol.87, 2010; p.125-148.

Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. *Viruses.* 2015;7(9):4911-28.

Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med.* 2016a;375(24):2321-34.

Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016b;10(4):e0004636.

Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, 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. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):653-60.

Calvet GA, Kara EO, Giozza SP, Bôtto-Menezes CHA, Gaillard P, de Oliveira Franca RF, et al. Study on the persistence of Zika virus (ZIKV) in body fluids of patients with ZIKV infection in Brazil. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):49.

Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1885-6.

Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 2016;387(10027):1531-9.

Cardoso CW, Paploski IA, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MM, Campos GS, et al. Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, Chikungunya, and Dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:2274–2276.

Carvalho MCGG, Silva DCG. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. *Ciência Rural*. 2010;V.40, n.3, p.735-744.

Casseb AR, Casseb LN, Silva SP, Vasconcelos PFC. Arbovírus: Importante Zoonose Na Amazônia Brasileira. *Veterinária e Zootecnia*. 2013; v. 20, n. 3, p. 391–403.

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. *Lancet*. 2016;387(10033):2125-32.

Chan M, Johansson MA.. The incubation periods of dengue viruses. PLoS ONE. 2012;7(11): e50972.

Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. Biomed Res Int. 2015;2015:376230.

Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1952;46(5):509-20.

Dash PK, Parida M, Santhosh SR, Saxena P, Srivastava A, Neeraja M, et al. Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62(1):52-7.

Demir T, Kilic S. Zika virus: a new arboviral public health problem. Folia Microbiol (Praha). 2016;61(6):523-7.

Dias CN, Moraes DF. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. Parasitol Res. 2014;113: 565–92.

Enfissi A, Codrington J, Roosblad J, Kazanji M, Rousset D. Zika virus genome from the Americas. Lancet. 2016;387(10015):227-8.

Faria NR, Azevedo RoS, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. Science. 2016;352(6283):345-9.

Faria NR, Quick J, Claro IM, Thézé J, de Jesus JG, Giovanetti M, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. Nature. 2017;546(7658):406-10.

Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. N Engl J Med. 2016;374(7):601-4.

Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Viol J.* 2013;10:311.

Faye O, Freire CC, Iamarino A, de Oliveira JV, Diallo M, Zanotto PM, et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl Trop. Dis.* 2014;8:e2636.

Figueiredo LT. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(2):224-9.

Freire CCM. Caracterização de processos evolutivos de vírus de RNA a partir de padrões deixados nas filogenias virais. 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/95/95131/tde-21012015-165014/pt-br.php>>. Acesso em: 08/01/2018

Gatherer D, Kohl A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *J Gen Virol.* 2016;97(2):269-73.

Giovanetti M, Faria NR, Nunes MR, de Vasconcelos JM, Lourenço J, Rodrigues SG, et al. Zika virus complete genome from Salvador, Bahia, Brazil. *Infect Genet Evol.* 2016a;41:142-5.

Giovanetti M, Milano T, Alcantara LC, Carcangiu L, Cella E, Lai A, et al. Zika Virus spreading in South America: Evolutionary analysis of emerging neutralizing resistant Phe279Ser strains. *Asian Pac J Trop Med.* 2016b;9(5):445-52.

Gong Z, Gao Y, Han GZ. Zika Virus: Two or Three Lineages? *Trends Microbiol.* 2016;24(7):521-2.

Granger D, Hilgart H, Misner L, Christensen J, Bistodeau S, Palm J, et al. Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2127-36.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-96.

Gubler D, Sather G. Laboratory diagnostic of Dengue hemorrhagic fever. *Simpósio Internacional sobre Febre Amarela e Dengue: Cinquentenário da Introdução da cepa 17D no Brasil; Maio 15-19; Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1988. p. 291-322.*

Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 2002;33(4):330-42.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59(3):307-21.

Gulland A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ.* 2016;352:i657.

Harris AF, Nimmo D, McKemey AR, et al. Field performance of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol.* 2011;29: 1034–37.

Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1347-50.

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 Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1477.

Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1347-50.

Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol.* 2012;55(4):289-95. doi: 10.1016/j.jcv.2012.08.024.

Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(4):376-96.

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, et al. Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 2011;476: 454–57.

Holmes EC. Molecular epidemiology and evolution of emerging infectious diseases. *Br Med Bull*. 1998;54(3):533-43.

Ioos S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect*. 2014;44(7):302-7.

Karabastos N. International catalogue of arboviruses : including certain other viruses of vertebrates (N Karabastos, Ed.). Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses by the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, In: *Am Soc Trop Med Hyg*. San Antonio, Tex. 1985.

Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bulletin of the World Health Organization*, published online, p.1-8. 2016.

Kochakarn T, Kotanan N, Kümpornsinn K, Loesbanluechai D, Thammasatta M, Auewarakul P, et al. Comparative genome analysis between Southeast Asian and South American Zika viruses. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9(11):1048-54.

Kuno G, Chang G, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp B. Phylogeny of the Genus Flavivirus. *J Virol*. 1998;Jan;72(1):73-83.

Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi M, Kotaki A, Uemura H, et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014 [corrected]. *Euro Surveill*. 2014;19(4).

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika Virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008;14(8); 1232-1239.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 1992;30(3), p. 545-551.

Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2007. p. 1101-33.

Lindenbach BD, Rice CM. Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. *J Virol*. 1999;73(6):4611-4621.

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;545(7655):482-6.

Liu L, Zhang S, Wu, Song J, Li A, Zhang H, et al. Identification and genetic characterization of Zika virus isolated from an imported case in China. *Infect Genet Evol*. 2017;48:40-6.

Lodeiro MF, Filomatori CV, Gamarnik AV.. Structural and functional studies of the promoter element for dengue virus RNA replication. *J Virol* 2009;83:993–1008.

Logan IS. ZIKA--How fast does this virus mutate? *Dongwuxue Yanjiu*. 2016;37(2):110-5.

Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2014;v. 5, n. 3, p. 55–64.

Messina JP, Kraemer MU, Brady OJ, Pigott DM, Shearer FM, Weiss DJ, et al. Mapping global environmental suitability for Zika virus. *Elife*. 2016;5.

Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*. 2017;546(7658):411-5.

Ministério da Saúde-Brasil. Plano Nacional de enfrentamento a microcefalia - Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo Vírus Zika. 2015.

Ministério da Saúde, 2017. Vírus Zika no Brasil. A resposta do SUS. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf

Miranda-Filho DeB, Martelli CM, Ximenes RA, Araújo TV, Rocha MA, Ramos RC, et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. *Am J Public Health*. 2016;106(4):598-600.

Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 2016;374(10):951-8.

Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res*. 2013;98(2):192-208.

Murphy FA. Togavirus: morphology and morphogenesis. In: Schlesinger RW (Ed). *The Togaviruses*. New York: Academic Press. 1980.

Musso D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1887.

Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):487-524.

Muyllaert IR, Galler R, Rice CM. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J Virol*. 1997;71(1):291-8.

Ngono AE, Shresta S. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu Rev Immunol.* 2018.

Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, Carvalho VL, et al. Dengue Virus Serotype 4, Brazil, 2010–2011. *Emerging Infectious Diseases* 2012;Vol. 18, No. 11.

Oliveira CS, Vasconcelos PFC. Microcephaly and Zika virus. *Jornal de Pediatria.* 2016;92:103---5.

OMS. Report of Director of WHO: Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/en/>>. Acesso em: 28/12/2017.

OPAS. Guia para la vigilancia de la enfermedad por el virus del Zika y sus complicaciones. 2016a.

OPAS. Diagnóstico por laboratorio para la enfermedad por el virus del Zika. 2016b.

OPAS. Regional Zika Epidemiological Update (Americas) August 25, 2017. 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599%3Aregional-zika-epidemiological-update-americas&catid=8424%3Acontents&Itemid=41691&lang=en. Acessado em 03/01/2018.

Passos SRL, Borges Dos Santos MA, Cerbino-Neto J, Buonora SN, Souza TML, de Oliveira RVC, et al. Detection of Zika Virus in April 2013 Patient Samples, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(12):2120-1.

Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *N Engl J Med.* 2016;374(16):1552-63.

Pybus OG, Suchard MA, Lemey P, Bernardin FJ, Rambaut A, Crawford FW, et al. Unifying the spatial epidemiology and molecular evolution of emerging epidemics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):15066-71.

Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc*. 2017;12(6):1261-76.

Rodriguez-Morales AJ, Bandeira AC, Franco-Paredes C. The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: a global concern. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15:13.

Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*. 2007;7:9.

Sampathkumar P, Sanchez JL. Zika Virus in the Americas: A Review for Clinicians. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(4):514-21.

Shan C, Muruato AE, Nunes BT, Luo H, Xie X, Medeiros DBA, et al. A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nat Med*. 2017;23(6):763-7.

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*. 2016;352(6284):467-70.

Shen S, Shi J, Wang J, Tang S, Wang H, Hu Z, et al. Phylogenetic analysis revealed the central roles of two African countries in the evolution and worldwide spread of Zika virus. *Viol Sin*. 2016;31(2):118-30.

SVS/Ministério da Saúde, 2016. Boletim Epidemiológico - Volume 47 - nº 33. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>.

SVS/Ministério da Saúde, 2017. Boletim Epidemiológico - Volume 48 - nº 44. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>.

Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol*. 2016;205(3):269-73.

Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa JFS, Pinheiro FP, Vasconcelos PFC. Arboviroses. In: Leão RNQ. Doenças Infecciosas e Parasitárias – Enfoque Amazônico. Belém: CEJUP: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997;p. 207-225.

Valle D, Pimenta DN, Cunha RV. Dengue: teorias e práticas. Editora Fiocruz, Brasil. 2015.

Vasconcelos PFC. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2015; v. 6, n. 2, p. 9–10.

Veerakumar K, Govindarajan M, Rajeswary M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Sida acuta* (Malvaceae) leaf extract against *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles tephensi*, and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. 2013;112: 4073–85.

Villordo SM, Filomatori CV, SánchezVargas I, Blair CD, Gamarnik AV. Dengue Virus RNA Structure Specialization Facilitates Host Adaptation. *PLoS Pathog*. 2015;11(1): e1004604.

Yuan L, Huang XY, Liu ZY, Zhang F, Zhu XL, Yu JY, et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*. 2017;358(6365):933-6.

Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. Zika: As an emergent epidemic. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9(8):723-9.

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;19(5):561-5.

Worobey M. Epidemiology: Molecular mapping of Zika spread. *Nature*. 2017;546(7658):355-7.

Zanluca C, Dos Santos CN. Zika virus - an overview. *Microbes Infect*. 2016;18(5):295-301.

Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569-72.

Zhang Q, Sun K, Chinazzi M, Pastore Y Piontti A, Dean NE, Rojas DP, et al. Spread of Zika virus in the Americas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(22):E4334-E43.

Zhao Y, Soh TS, Zheng J, Chan KW, Phoo WW, Lee CC, et al. A crystal structure of the Dengue virus NS5 protein reveals a novel inter-domain interface essential for protein flexibility and virus replication. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):e1004682.

Zhu Z, Chan JF, Tee KM, Choi GK, Lau SK, Woo PC, et al. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5:e22.

10- ANEXOS

10.1- Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa



Rio de Janeiro, 26 de outubro de 2015.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa

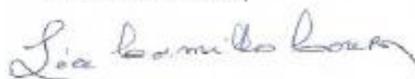
Para: Dra. Patrícia Brasil

Prezada Dra. Patricia,

Com referência ao projeto “**Detecção de formas não usuais de dengue a partir da vigilância de síndrome febris agudas**”, CAAE 0026.0.009.000-07, aprovado por este Comitê em 04/06/2007 – Parecer 027/2007, acusamos o recebimento da NOTIFICAÇÃO de inclusão de amostras de saliva e urina e eventualmente lágrima, para investigação de novas viroses como a infecção por Zika, recentemente demonstrada no soro dos participantes do projeto mencionado. Foi apresentado um novo TCLE (Versão de 20 de outubro de 2015).

Este documento foi apreciado e aprovado por esta Coordenação na presente data.

Atenciosamente,



Dr^a Liza Ferreira Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
Mat. SIAPE 003709620
IPEC / FIOCRUZ

CAAE: 0026.0.009.000-07

VL

10.2- Resumo enviado e aceito ao Congresso de virologia 2017

RETROSPECTIVE STUDY OF ZIKA VIRUS IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO

Allison de Araújo Fabri; Marcos Cesar Lima de Mendonça¹; Rita Maria Ribeiro Nogueira¹; Ana Maria Bispo de Filippis¹

¹*Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Email: allison.fabri@ioc.fiocruz.br*

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. The disease is characterized as mild and self-limiting, usually without serious complications. In 2015, Brazil confirmed the first autochthonous case of zika resulting in a serious public health problem due to the dramatic increase in the number of newborns with microcephaly associated with ZIKV. Based on phylogenetic studies there are hypotheses suggesting that ZIKV was introduced in the country in 2014 during the World Cup or Canoeing Championship or in 2013 in the Confederations Cup. However, these studies did not include samples from Rio de Janeiro (RJ), considered the largest tourist center in the country, which hosted several mass events between 2012 and 2014. Therefore, it is important to carry out a retrospective study in negative sera for dengue and rubella from patients who presented a clinical picture compatible with zika infection from the period of 2012 to 2014. The real-time RT-PCR method applied to look for RNA of ZIKV in dengue and rubella negative sera patient's from different municipalities of the state of RJ. To date, 680 sera were analyzed and ZIKV has not been detected, suggesting that the virus has not circulated in the period 2012-2014, which reinforces that the introduction of the virus into the state may have occurred in January 2015, when the first autochthonous cases were detected. However, 550 sera comprising the period from August to December 2014 are being tested. After the completion of this study, we hope to be able to estimate the year the ZIKV was introduced in the State of Rio de Janeiro.

Palavras-chave: ZIKV, Rio de Janeiro, Real-time RT-PCR