

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Caroline Simões da Silva

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR
EXPRESSANDO ESTAVELMENTE UM REPLICON REPÓRTER DO VÍRUS ZIKA**

RECIFE

2019

Caroline Simões da Silva

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR
EXPRESSANDO ESTAVELMENTE UM REPLICON REPÓRTER DO VÍRUS ZIKA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde no Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil
Co Orientador: José Valter Joaquim Silva Júnior

RECIFE - PE

2019

Caroline Simões da Silva

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR
EXPRESSANDO ESTAVELMENTE UM REPLICON REPÓRTER DO VÍRUS ZIKA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde no Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada

Aprovado em: 21/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ

Dr. Rafael Freitas de Oliveira França
Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ

Dr. Renato Antônio dos Santos Oliveira
Universidade Federal da Paraíba, UFPB

Ao meu tio Augusto Simões (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar essas gratulações, agradecendo a Deus, por ter me dado calma, paciência e sabedoria para enfrentar todos os desafios que apareceram nessa jornada.

Palavras não seriam suficientes para expressar a gratidão aos meus pais (Jairo e Aldenize) e a minha tia Neide. “Tudo” é uma palavra de significado muito curto para expressar todo o amor e agradecimento que tenho por eles. A toda a família Simões, por ser minha base social e afetiva. A Michelly, por todo amor, paciência e companheirismo em todas as horas, suavizando todos os momentos de dificuldade.

Aos amigos que a vida me deu e sempre estiveram comigo, alegrando essa jornada que por vezes é tão difícil, apesar de prazerosa. A Éden, Marília, Kalebe, Rick, Amanda, Vitinho, Priscylla, Ruanne, Rodrigo, Renatinha. Gratidão, também aos que fazem o Centro Espírita Deus à Procura de Seus Filhos, a minha casa de oração e trabalho.

Aos professores que tive até este momento em minha jornada acadêmica. Em especial, a minha orientadora, professora Laura por todos os ensinamentos. Ao também professor, co-orientador e amigo de muitos momentos, José Valter, sua grande amizade e paciência para comigo.

Aos amigos do LaViTE, em especial ao “The Rivotril” (Fábia, Jefferson, Vanessa, Poliana, Renata, Klarissa, Pablo), por todos os almoços e momentos de risadas no laboratório e fora dele. A todos que fazem o LG Grupo, as Déboras (com e sem “H”), Juliana, Kennya, Lívia, Cláudio, gratidão por constituírem um grupo tão bom para o trabalho.

A FIOCRUZ/IAM por toda a estrutura física e humana cedida para a realização desse projeto de pesquisa. A CAPES, pelo fomento da pesquisa desenvolvida neste documento.

SILVA, Caroline Simões. **Desenvolvimento e Caracterização de Linhagem Celular Expressando Estavelmente um Replicon Repórter Do Vírus Zika**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

O vírus Zika (*Zika virus*, ZIKV) é um arbovírus membro da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. Seu genoma é de RNA de sentido positivo e constituído por única matriz de leitura, responsável pela tradução das proteínas virais estruturais e não estruturais, ladeada por terminações não codificantes nas extremidades 5' e 3'. Atualmente, a ausência de vacinas ou fármacos anti-ZIKV licenciados e o número de casos reportados de infecções por ZIKV, além das complicações neurológicas decorrentes das infecções pelo vírus, colocam as infecções por ZIKV como um grande problema de saúde pública, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais. Diante disso, o presente trabalho objetivou a construção de uma linhagem celular expressando estavelmente um subgenoma autoreplicativo (replicon) do ZIKV, expressando o gene repórter luciferase *firefly* (FLuc). Para tal, foi utilizado o genoma do ZIKV cepa ZIKVPE243/2015, previamente isolado em Pernambuco e clonado no vetor pSVJS01. A construção foi dividida estrategicamente em 3 fragmentos: i) o primeiro, abrangendo a extremidade 5'UTR e a sequência do capsídeo do ZIKV; ii) o segundo, formado pelo gene repórter FLuc, uma região de ubiquitinação, gene da neomicina fosfotransferase e o IRES (*Internal ribosome entry site*) do vírus da encefalomiocardite; iii) o último fragmento, formado pelas proteínas não estruturais do ZIKV. Após a recombinação homóloga, a identidade do replicon, denominado de repZIKVPE243-LucNeoIres, foi confirmada através de PCR e sequenciamento. Transcritos *in vitro* produzidos a partir do cDNA clonado foram transfectados em células BHK-21 por eletroporação. Três dias após a transfecção, as células foram selecionadas em meio com geneticina (600µg/mL) e a linhagem celular recombinante obtida, BHK-21-rZIKV-LucNeoIres, foi avaliada quanto à expressão de FLuc. Durante 20 passagens, as células BHK-21-rZIKV-LucNeoIres apresentaram um aumento da atividade da FLuc de no mínimo 20 vezes em relação ao controle negativo. Por fim, a linhagem celular recombinante BHK-21-rZIKV-LucNeoIres poderá ser usada para o desenvolvimento de uma plataforma biotecnológica para triagem em larga escala de compostos anti-ZIKV e em estudos sobre a replicação viral.

Palavras chave: Vírus Zika. Genética reversa. Replicon

DA SILVA, Caroline Simões. **Development and characterization of cell line stably expressing a Zika virus reporter replicon.** Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

The Zika virus (*Zika virus*, ZIKV) is an arbovirus member of the family *Flaviviridae* and genus *Flavivirus*. Its genome is positive-sense RNA and consists of a single reading matrix, responsible for the translation of structural and non-structural viral proteins, flanked by noncoding endings at ends 5 and 3. Currently, the absence of licensed anti-ZIKV vaccines or drugs and the number of reported cases of ZIKV infections, in addition to the neurological complications resulting from the virus infections, place ZIKV infections as a major public health problem, especially in tropical regions and subtropical regions. Therefore, the present work aimed to construct a cell line stably expressing a ZIKV autoreplicative subgenome (replicon), expressing the reporter gene luciferase firefly (FLuc). For this, the genome of the ZIKV strain ZIKVPE243 / 2015, previously isolated in Pernambuco and cloned in vector pSVJS01, was used. The construct was strategically divided into 3 fragments: i) the first, harboring the 5'UTR end and the ZIKV capsid sequence; ii) the second, formed by the FLuc reporter gene, a ubiquitination region, neomycin phosphotransferase gene and the IRES (Internal ribosome entry site) of encephalomyocarditis virus; iii) the last fragment, formed by the non-structural proteins of ZIKV. After homologous recombination, the identity of replicon repZIKVPE243-LucNeoIres was confirmed by PCR and sequencing. In vitro transcripts produced from the cloned cDNA were transfected into BHK-21 cells by electroporation. Three days after transfection, the cells were selected in medium with geneticin (600µg / ml) and the recombinant cell line obtained, BHK-21-rZIKV-LucNeoIres, was evaluated for FLuc expression. During 20 passages, BHK-21-rZIKV-LucNeoIres cells showed an increase in FLuc activity of at least 20-fold compared to the negative control. Finally, the recombinant BHK-21-rZIKV-LucNeoIres cell line could be used in the development of a biotechnological platform for large-scale screening of anti-ZIKV compounds and studies on viral replication.

Keywords: Zika virus, Reverse genetics, Reporter replicon

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Disseminação do ZIKV entre 1947 e 2017	17
Figura 2 -	Casos prováveis de doença aguda pelo ZIKV no Brasil entre os anos de 2017 e 2018	19
Figura 3 -	Estrutura do ZIKV	20
Figura 4 -	Esquematização do genoma do ZIKV	21
Figura 5 -	Esquema do processo de replicação do ZIKV	25
Figura 6 -	Ciclos de transmissão silvestre e urbano do ZIKV	26
Figura 7 -	Diagnóstico viral de acordo com o tempo de infecção	29
Figura 8 -	Estratégias de desenvolvimento e recuperação de clones infecciosos obtidos em bactérias ou leveduras	32
Figura 9 -	Estratégia de recuperação de vírus recombinantes com a metodologia ISA	36
Figura 10 -	Estratégia de construção do replicon biscistrônico repórter do ZIKV	42
Figura 11 -	Predição <i>in silico</i> da construção rep-ZIKV-PE243-LucNeoIRES	43
Quadro 1 -	Oligonucleotídeos utilizados na construção do replicon repZIKVPE243-LucNeoIres	44
Figura 12 -	Amplificação dos fragmentos 1, 2 e 3 do repZIKVPE243-LucNeoIres	49

Figura 13-	Eletroforese da PCR de confirmação da clonagem	50
Figura 14 -	Eletroferograma representativo do sequenciamento das regiões do gene repórter e do EMCV do repZIKVPE243-LucNeoIres, respectivamente	51
Figura 15 –	Eletroforese dos produtos de amplificação e transcrição <i>in vitro</i> do replicon repZIKV-LucNeoIres	52
Figura 16 -	Atividade da luciferase para diferentes clones biológicos expressando o repZIKVPE243-LucNeoIres clone 2	54
Figura 17 -	Atividade da luciferase para o clone biológico expressando o repZIKVPE243-LucNeoIres clone 1	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Capsídeo
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
DC-SIGN	Receptores Específicos de Células Dendríticas / <i>Dendritic Cell Specific</i>
DENV	Vírus da Dengue / <i>Dengue virus</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Envelope
EBOV	Vírus Ebola / <i>Ebola virus</i>
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente por Ligação Enzimática / <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMCV	Vírus da encefalomiocardite / <i>Encephalomyocarditis virus</i>
FL-PCR	<i>Full-Lenght-PCR</i>
FLU	Vírus da influenza / <i>Influenza virus</i>
GFP	Proteína Verde Fluorescente / <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GLuc	<i>Gaussia</i> luciferase
IgM	Imunoglobulina M
IRES	Sítio Interno de Entrada Ribossomo / <i>Internal Ribosome Entry Site</i>
JEV	Encefalite Japonesa / <i>Japanese encephalitis virus</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
NAT	Teste de Ácido nucleico / <i>Acid Nucleic Test</i>
NS	Não Estruturais / <i>Nonstructural</i>
ORF	Região Aberta de Leitura / <i>Open Reading Frame</i>
prM	Pré-membrana
PRNT	Teste por Neutralização de Redução de Placas / <i>Plaque reduction neutralization test</i>
RLuc	<i>Renilla</i> luciferase
RNA	Ácido Ribonucleico
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
UTR	Regiões Não Codificantes / <i>Untranslated regions</i>
VLP	Partículas Semelhantes a Vírus / <i>Virus-Like Particle</i>
WNV	Oeste do Nilo / <i>West Nile virus</i>
YFV	Vírus da Febre Amarela / <i>Yellow fever virus</i>

ZIKV

Vírus Zika / *Zika virus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Aspectos históricos e epidemiológicos	16

2.2 Vírus Zika	19
2.3 Transmissão do ZIKV	25
2.4 Sinais e sintomas clínicos	27
2.5 Diagnóstico	28
2.6 Prevenção e Manejo terapêutico	29
2.7 Genética Reversa	30
2.7.1 Histórico	31
2.7.2 Aplicações dos sistemas de genética reversa	31
2.7.3 Genética reversa de <i>flavivírus</i>	34
2.7.4 Sistemas de genética reversa para o ZIKV	36
3 JUSTIFICATIVA	39
4 OBJETIVO GERAL	40
4.1 Objetivos específicos	40
5 MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1 Cultivo de células	41
5.2 Construção do replicon repórter repZIKV-LucNeoIres	41
5.2.1 Fragmentação da construção e amplificação dos insertos	41
5.2.2 Digestão do vetor de clonagem	44
5.2.3 Recombinação homóloga em levedura	45
5.2.3.1 <i>Transformação da levedura</i>	45
5.2.3.2 <i>Extração do DNA plasmideal</i>	46
5.3 Confirmação da clonagem do replicon repZIKVPE243-LucNeoIres	46
5.4 Recuperação do replicon construído	46
5.4.1 Amplificação completa do genoma do replicon repZIKVPE243-LucNeoIres por PCR	46
5.4.2 Transcrição <i>in vitro</i>	47
5.4.3 Transfecção em células BHK-21	47
5.4.4 Desenvolvimento de linhagem celular contendo o replicon bicistrônico Repórter repZIKVPE243-LucNeoIres	47
5.5 Análise estatística	48
6 RESULTADOS	49
6.1 Amplificação dos fragmentos 1, 2 e 3 para recombinação homóloga em levedura.	49

6.2 Construção e confirmação do replicon repZIKVPE243-LucNeoIres	49
6.3 Recuperação dos replicons construídos	50
6.4 Desenvolvimento da linhagem celular BHK-21-repZIKVPE-LucNeoIres	52
7 DISCUSSÃO	56
8 CONCLUSÃO	59
9 PERSPECTIVAS	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (*Zika virus*, ZIKV) é um arbovírus membro do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, transmitido principalmente de maneira horizontal através de artrópodes hematófagos pertencentes ao gênero *Aedes* (por exemplo, *A. aegypti*, *A. africanus* e *A. albopictus*) (PLOURDE ; BLOCH, 2016).

O genoma dos flavivírus é formado por uma fita simples de RNA de sentido positivo, de tamanho variável entre 10-11Kb, com uma única região aberta de leitura (*Open Reading Frame*, ORF) flanqueada por regiões não codificantes (*Untranslated regions*, UTR) nas extremidades 5' e 3' (LIU et al., 2010). A extremidade 5' apresenta um cap (m⁷G5'ppp5' A), que contribui para estabilidade do genoma e início da tradução, e a extremidade 3' não apresenta poliadenilação (LINDENBACH et al., 2013). A ORF codifica uma poliproteína que, posteriormente, é clivada em três proteínas estruturais [capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E)], responsáveis pela formação viral, e sete não estruturais (*Non-structural proteins*, NS), que são NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, responsáveis pela replicação, montagem e maturação das partículas virais. Não obstante, algumas proteínas não estruturais estão envolvidas também na evasão do sistema imune do hospedeiro (BLITVICH; FIRTH, 2017).

Entre os anos de 2015 e 2017, as epidemias por ZIKV passaram a figurar entre os graves problemas da saúde pública mundial, principalmente devido às complicações neurológicas e neonatais acarretadas pela infecção com o vírus durante o primeiro terço da gestação (BRASIL, 2017a). Apesar das estratégias já propostas para vacinas anti-ZIKV e dos potenciais compostos anti-virais já avaliados, ainda não há uma vacina ou fármacos anti-ZIKV licenciados (LI et al., 2018).

Nesse contexto, sistemas de genética reversa apresentam-se como uma ferramenta capaz de ser usada para a construção de vírus e subgenomas virais autoreplicativos (replicons) recombinantes, passíveis de serem usados em formulação vacinais e triagem em larga escala de candidatos anti-virais. Além disso, sistemas de genética reversa também podem ser direcionados para estudos das funções das proteínas virais, dos mecanismos envolvidos na replicação do vírus e na interação do vírus com o sistema imune do hospedeiro (AUBRY et al., 2015).

A avaliação de compostos antivirais, por exemplo, frequentemente é feita por ensaios de placa, através da observação de efeitos citopáticos ou por ensaios baseados na presença de antígenos virais, como proteína NS1 ou do E. Esses testes apresentam um demandam muito

tempo e considerável labor para sua execução (LI et al., 2018). Como alternativa, plataformas baseadas em replicons têm sido sugeridas para a avaliação em larga escala de compostos antivirais. Nesses sistemas, os genes das proteínas estruturais ou parte desses são deletados, sendo mantidas apenas as regiões que expressam as proteínas não estruturais e as regiões UTRs, necessárias para tradução e replicação autônoma do RNA viral, de forma que não há formação de partículas virais viáveis (KATO; HISHIKI, 2016). Em seguida, genes repórteres, a exemplo dos genes das luciferases *Firefly* (FLuc) e *Renilla* (RLuc), cloranfenicol acetiltransferase (*Chloramphenicol acetyltransferase*, CAT), proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein*, GFP) (LI et al., 2018; WOERZ et al., 2009; YOUNG; CHUNG, 2013) podem ser inseridos em substituição às proteínas estruturais e assim passam a ter sua expressão dependente da maquinaria viral. Dessa forma, uma vez inseridos na célula, o replicon repórter tem sua atividade replicativa e estabilidade indicadas pelos níveis de expressão do gene repórter (KATO; HISHIKI, 2016).

Vários replicons repórteres e linhagens recombinantes expressando replicons têm sido utilizados para a triagem de compostos antivirais e estudos sobre a replicação viral de diversos vírus com genoma de RNA, a exemplo dos replicons repórteres do vírus da rubéola (TZENG et al., 2005), dengue 2 (*Dengue virus 2*, DENV-2) (LEARDKAMOLKARN et al., 2015) e Ebola (*Ebola virus*, EBOV) (TAO et al., 2017), expressando GFP, e subgenomas autoreplicativos do vírus da hepatite C (*Hepatitis C virus*, HCV) e ZIKV com expressão de RLuc (WOERZ et al., 2009; XIE et al., 2016).

Especificamente sobre ZIKV, foram relatadas na literatura algumas construções de replicons repórteres. Entre esses sistemas, destacamos aquelas desenvolvidas por Xie et al. (2016), Li et al. (2017) e Münster et al. (2018). Todas essas construções foram obtidas por técnicas convencionais de clonagem em *Escherichia coli*, as quais apresentam as desvantagens de precisarem de vários sítios de restrição e variadas etapas de ligação *in vitro* para a clonagem dos subgenomas virais. Em relação aos flavivírus, a clonagem e manipulação em bactéria é ainda limitada pela instabilidade de alguns genomas virais, que quando mantidos em sistema procarioto podem apresentar alterações nucleotídicas que inviabilizam a recuperação do vírus ou subgenoma recombinante (AUBRY et al., 2015).

Uma alternativa ao hospedeiro procarioto é a clonagem em *Saccharomyces cerevisiae* através de recombinação homóloga (SANTOS et al., 2013). Essa técnica consiste na recombinação entre insertos e vetor mediada pelo reconhecimento de sequências homólogas de DNA. O processo de ligação entre essas sequências homologas é realizado pela levedura sem a necessidade de etapas sucessivas de subclonagem, permitindo que vários insertos sejam

clonados em uma única etapa de ligação *in vivo* (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012; JOSKA et al., 2014). Com o uso desse sistema, genomas que eram instáveis em *E.coli* foram clonados de forma estável no sistema eucarioto, a exemplo do replicon repórter de DENV-2, clonado em *S. cerevisiae* (cepa YPH 857) (PANG et al., 2001), e o sistema de genética reversa de DENV-3 manipulado em *S. cerevisiae* (cepa YPH 252) (SANTOS et al., 2013).

Diante do exposto, nosso trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de uma linhagem celular expressando de forma estável o replicon biscitrônico repórter do ZIKV, clonado por recombinação homóloga em levedura. Essa linhagem poderá ser utilizada futuramente para estudos sobre as funções das proteínas não estruturais do ZIKV, sobre suas possíveis interações com a célula hospedeira, além de seu uso como plataforma biotecnológica para triagem em larga escala de compostos com potencial atividade anti-ZIKV.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Este tópico consiste de uma revisão bibliográfica a respeito do ZIKV e genética reversa.

2.1 Aspectos históricos e epidemiológicos do ZIKV

A primeira detecção do ZIKV ocorreu na floresta de Zika, em Uganda, no ano de 1947, durante uma pesquisa da Fundação Rockefeller sobre o vírus da febre amarela (*Yellow fever virus*, YFV) e outros arbovírus. O novo vírus foi isolado através da inoculação intracraniana em camundongos de soro proveniente de macacos *Rhesus* sentinelas que apresentaram febre e viremia. Em 1948, foi realizado um segundo isolamento do ZIKV, dessa vez em homogeneizado de mosquitos *A. africanus* presentes na mesma localidade (DICK, 1952). O primeiro isolamento de amostra de humanos ocorreu em 1954, na Nigéria (MACNAMARA, 1954). Em 1966, o vírus foi isolado de mosquitos *A. aegypti* no continente asiático, Malásia. Esse isolamento se deu em vetor urbano, o que serviu como o primeiro subsídio de que o ZIKV teria também um ciclo urbano (MARCHETTE et al., 1969).

Ainda em 1947 (ano do seu primeiro isolamento), foram relatados casos de infecção pelo ZIKV em outros países africanos, como o Egito, Nigéria e Tanzânia (NOOR; AHMED, 2018). Estudos sorológicos realizados posteriormente indicaram uma ampla distribuição do vírus também no Quênia, Gabão Senegal e Serra Leoa. No continente asiático, os primeiros casos da infecção pelo ZIKV surgiram entre as décadas de 60 e 70, tendo o primeiro relato ocorrido na ilha de Java. Ao longo desses anos, foram relatados casos em outros países asiáticos como Indonésia, Índia e Malásia (NOOR; AHMED, 2018; WEAVER et al, 2016) (Figura 1). Apesar desses relatos, a associação da infecção pelo ZIKV a um quadro febril auto-resoluto e com poucos relatos de epidemias fez com que sua gravidade fosse subestimada (YUN; LEE, 2017).

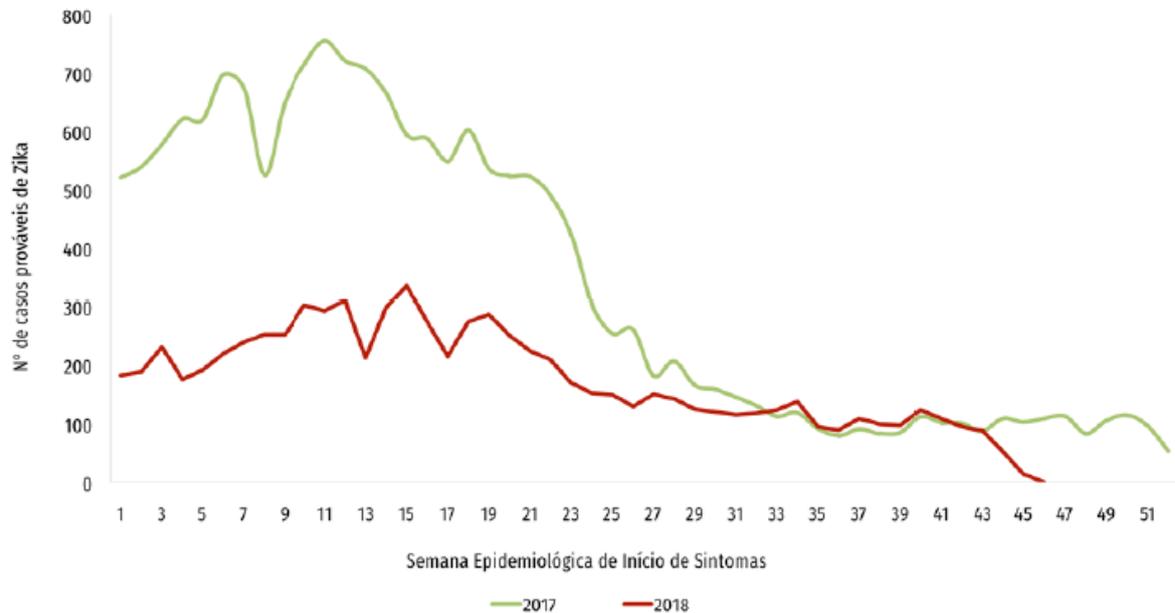
afetaram a América do Sul teriam contribuído na dispersão dos vetores e na disseminação do ZIKV pelas Américas (CHANG et al., 2016; HE et al., 2015).

No segundo semestre de 2015, no estado de Pernambuco, Brasil, foi relatado um acréscimo no número de recém-nascidos com microcefalia em paralelo ao aumento das notificações de infecção por ZIKV. Nesse mesmo ano foram contabilizados, 2.781 casos suspeitos de nascidos vivos com microcefalia, relacionados a infecção por ZIKV (BRASIL, 2015). Até a semana 47, do ano de 2015, 18 estados confirmaram a transmissão autóctone do ZIKV no país. Ainda nesse período, foram registrados 37.011 prováveis casos de Zika (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b). Em 2016, segundo o Ministério da Saúde do Brasil, foram registrados aproximadamente 200.000 casos confirmados de febre pelo ZIKV (BRASIL, 2017b).

Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde declarou a infecção pelo ZIKV uma emergência de saúde pública internacional (LOWE et al., 2018). Em maio de 2017, o Ministério da Saúde do Brasil informou o fim da emergência nacional para o ZIKV (BRASIL, 2017c). Em dezembro do mesmo ano, ao final da 49ª semana epidemiológica, foram registrados 17.321 possíveis casos de febre pelo vírus, revelando uma taxa de incidência de 8,4 casos a cada 100 mil habitantes. Dos possíveis casos registrados, 8.703 (50,2%) foram confirmados (BRASIL, 2017).

Em contraste aos dados apresentados no ano anterior, em 2018, até a 46ª semana epidemiológica, foram registrados um total de 8.024 possíveis casos de infecções pelo ZIKV. Desses, apenas 3.625 casos foram confirmados. A taxa de incidência de casos diminuiu e foi contabilizada em 3,8 casos a cada 100 mil habitantes (Figura 2) (BRASIL, 2018b). No Brasil, de 2015 até o ano de 2018, também foram notificados aproximadamente 16.900 casos suspeitos de alterações e malformações relacionadas ao ZIKV e outras etiologias infecciosas. Desse montante, 2.118 foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão no inquerito de investigação. Dentre os 14.782 casos incluídos na avaliação, cerca de 7.746 (45,8%) foram descartados, 3.279 (cerca de 19,4%) foram confirmados, 2.718 (16,1%) casos ainda estão sob investigação, 615 (3,6%) casos classificados como prováveis para a relação com infecção pelo durante a gestação ZIKV e 424 (2,5%) foram inconclusivos (BRASIL, 2018c).

Figura 2 - Casos prováveis de doença aguda pelo ZIKV no Brasil entre os anos de 2017 e 2018



Fonte: Adaptado de Brasil (2018a)

Legenda: Em verde, a distribuição do número de casos prováveis de Zika ao longo das semanas epidemiológicas no ano de 2017. Em vermelho, é plotada a mesma distribuição de prováveis casos ao longo do ano de 2018.

No ano de 2015, países vizinhos ao Brasil, como Colômbia e Bolívia, confirmaram a transmissão autóctone do ZIKV (ANDERSON et al., 2016). No início de 2016, o vírus aumentou sua distribuição geográfica, alcançando mais de 20 países dos territórios das Américas do Sul e Central (ANDERSON et al., 2016). Por fim, o último surto por ZIKV registrado foi localizado em maio de 2017 na Índia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

2.2 Vírus Zika

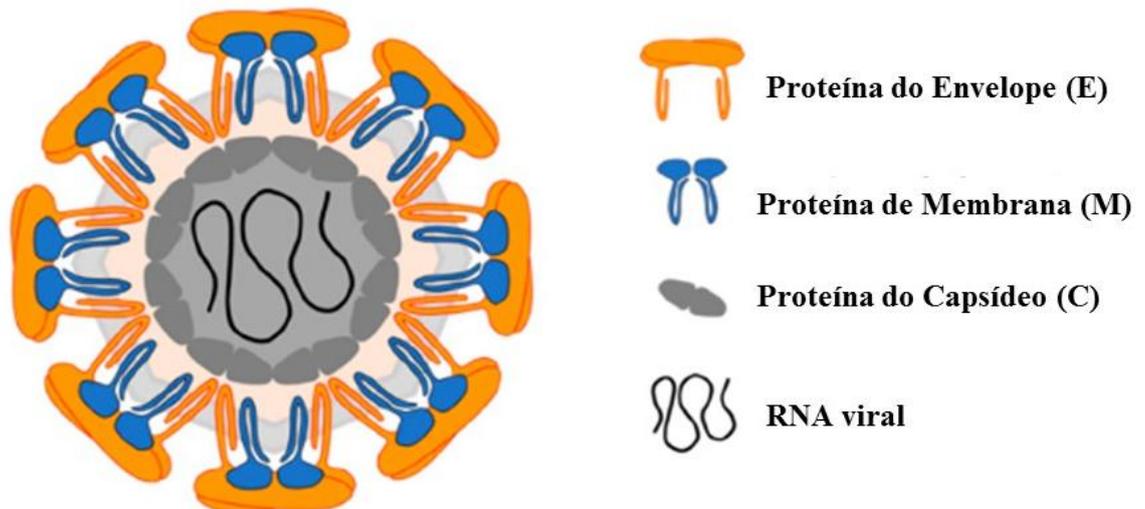
A família *Flaviviridae* (do latim *flavus*, “amarelo”) abrange quatro gêneros virais: *Flavivirus*, *Pestivirus* (do latim *pestes*, “praga”) , *Hepacivirus* (do grego, *hepar*, *hepatos*, “fígado”) e *Pegivirus* (vírus GB persistente) (LINDENBACH et al., 2013; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2018). Segundo a classificação taxonômica, o ZIKV é um membro do gênero *Flavivirus*, em conjunto com os vírus da DENV, YFV, Oeste do Nilo (*West Nile virus*, WNV) e da Encefalite Japonesa (*Japanese encephalitis virus*, JEV) (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF

VIRUSES, 2018). O ZIKV apresenta ainda uma subdivisão filogenética entre duas linhagens, a africana e a asiática (CHANG et al., 2016; WANG et al., 2017).

Os flavivírus apresentam também uma subclassificação que diz respeito à forma de transmissão, os quais estão divididos entre os vírus transmitidos por carrapatos, vírus que não usam vetores artrópodes e vírus transmitidos por mosquitos (STRAUSS; STRAUSS, 2002). Esses últimos são denominados arbovírus, pois são transmitidos através do repaste sanguíneo de mosquitos hematófagos. Os arbovírus são imputados como causadores de doenças de relevante importância em humanos e outros animais. A esse grupo também pertencem vírus de outras famílias, como *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae* (CHANG et al., 2016).

As partículas virais maduras da família *Flaviviridae* apresentam capsídeo de geometria icosaédrica, envolto por um envelope lipídico, advindo da membrana do retículo endoplasmático da célula hospedeira. Seu tamanho é aproximadamente 500Å de diâmetro e seu genoma é caracterizado por uma fita simples de RNA de senso positivo (Figura 3) (LINDENBACH et al., 2013).

Figura 3 - Estrutura do ZIKV

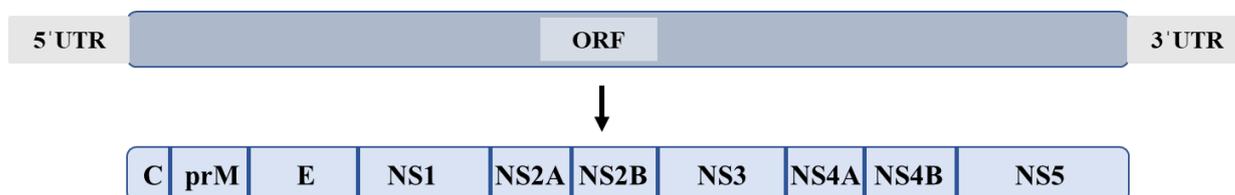


Fonte Martínez-Sobrido et al (2018, tradução nossa).

O genoma do ZIKV tem cerca de 10,7Kb, com UTRs nas extremidades 5' e 3'. Entre seus flancos, encontra-se uma matriz única de leitura responsável pela codificação da poliproteína viral, que é processada no retículo endoplasmático (RE) em dois grupos de

proteínas: as estruturais (C, prM e E) e as proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 4) (SILVA; GAO, 2016).

Figura 4 - Esquematização do genoma do ZIKV



Fonte: A autora (2019)

Nota: O genoma do ZIKV é formado por uma única região aberta de leitura (*Open Reading Frame*, ORF) ladeada pelas extremidades que apresentam sequências não codificantes. Uma vez traduzido, o RNA viral origina uma poliproteína que é processada por proteases virais e do hospedeiro nas proteínas estruturais (C, prM e E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

A proteína C tem cerca de 11kDa, o que a torna uma das menores proteínas codificadas pelo genoma dos flavivírus. Há um consenso a respeito de sua função, que concerne em ligar-se ao genoma viral e formar o nucleocapsídeo do vírion, participando, assim, do processo de formação da partícula viral. Entretanto, estudos vêm apontando a sua importância também para o ciclo de replicação viral, tornando essa proteína um potencial alvo para o desenvolvimento de antivirais (OLIVEIRA et al., 2017; SAMPATH; PADMANABHAN, 2009).

A proteína precursora de membrana (prM) apresenta um tamanho aproximado de 26 kDa. A prM possui atividade como proteína chaperona, atuando na montagem correta da proteína E durante os processos de montagem e maturação viral. O processamento da prM em M ocorre através de sítios de clivagens de furina existentes na prM e que são alvos de endoproteases celulares (LI et al., 2018; MUKHOPADHYAY et al., 2005; SAMPATH; PADMANABHAN, 2009; YU et al., 2008).

A maior dentre as proteínas estruturais dos flavivírus é a proteína E, que quando dimerizada apresenta-se com 53kDa e tem grande expressão na superfície do vírus. Seu arcabouço é formado por três domínios distintos, cada qual com sua função: o domínio I realiza a comunicação entre os domínios II e III; o domínio II está envolvido no processo de fusão de membrana; e o terceiro domínio (III) é uma estrutura de ligação a imunoglobulinas, sendo importante no reconhecimento pelos receptores celulares e anticorpos neutralizantes. De maneira geral, a proteína E é responsável por mediar a entrada do vírus na célula através

da ligação e fusão com as membranas hospedeiras (KOSTYUCHENKO et al., 2016; SAMPATH; PADMANABHAN, 2009).

As proteínas não estruturais desempenham suas funções a nível da replicação da partícula viral (NS1, NS2 e NS4), evasão da resposta imune do hospedeiro (a exemplo das NS2A, NS4B e NS5), ação como cofatores de enzimas virais (NS2B e NS4A), atividade proteolítica (NS3) e síntese e modificação do RNA viral (NS5). Além disso, a proteína NS1 está envolvida na montagem da partícula viral madura (HASAN et al., 2018; LINDENBACH et al., 2013).

A proteína NS1 é muito conservada dentro do gênero *Flavivirus*. Ela apresenta um peso molecular que pode variar de 46 a 55kDa. Essa variação é devida aos diferentes níveis de glicosilação, que por sua vez são de grande relevância para o correto funcionamento da NS1 (JAVED et al, 2017; RASTOGI et al., 2016). A NS1 é de extrema importância para a replicação viral, assim como para o início da resposta imune. Ela também está envolvida na evasão da resposta imunológica (MULLER; YOUNG, 2013, SHI; GAO, 2017). A proteína está arranjada sob a forma de três domínios, N-terminal, C-terminal e uma região intermediária rica em epítomos (JAVED et al, 2017). Ainda sobre a sua disposição, a proteína não estrutural pode ser encontrada nas conformações monoméricas, de dímeros (mNS1) ou hexâmeros (sNS1), a depender de sua localização na célula. Uma vez que a célula está infectada pelo vírus, a NS1 apresenta-se como mNS1, associada à membrana plasmática hospedeira. (BROWN et al., 2016). Além de participar da replicação, quando localizada no retículo, a proteína pode ancorar-se a outras macromoléculas de membrana, como a glicosilfosfatidilinositol ou colesterol, e ser trafegada para outras membranas celulares, para maturação no complexo de Golgi, ou para vias secretoras a fim de serem liberadas da célula (sNS1) (RASTOGI et al., 2016).

A proteína NS2A é relativamente pequena, cerca de 20kDa, sendo formada por aproximadamente 231 aminoácidos, responsáveis pelo seu caráter hidrofóbico. A NS2A está intimamente relacionada à replicação do RNA viral, apresentando uma alta afinidade pela região 3'UTR do genoma viral (CUMBERWORTH et al., 2017;LEUNG et al., 2008,). A NS2A tem um amplo espectro de ação, agindo desde a replicação do RNA viral, até a inibição das vias do interferon (IFN) (LAURENT-ROLLE et al.,2003; LIU et al., 2006). Essa inibição ocorre devido ao bloqueio da cascata de sinalização JAK/STAT. Além dessas atribuições, a NS2A está relacionada à permeabilização da membrana e disseminação da infecção em mosquitos (CUMBERWORTH et al., 2017). A outra subdivisão da proteína não estrutural, a proteína NS2B, tem 14kDa. É classificada como uma proteína integral de membrana,

apresentando uma porção central que divide dois seguimentos transmembrana localizados nas extremidades da proteína. Esses seguimentos agem como co-fatores da proteína NS3 (LUO et al., 2015).

A proteína NS3 apresenta um peso molecular de 69kDa, sendo uma das maiores codificadas pelo genoma dos flavivírus (LUO et al., 2015). Sua porção C-terminal tem uma sequência com atividade enzimática de helicase (NS3-Hel), que atua na replicação viral (JAIN et al., 2016). Na outra extremidade, está localizado o domínio com atividade proteolítica semelhante à quimiotripsina. Essa região permite que a NS3 atue na clivagem da poliproteína para a individualização das outras proteínas não estruturais. Entretanto, como já mencionado acima, sua ação é dependente da ligação ao seu co-fator, a proteína NS2B (LUO et al., 2015).

A NS4 é uma pequena proteína dos flavivírus, com peso médio de 16kDa. Agregada à membrana plasmática, possui quatro domínios transmembranares e sua porção N-terminal está voltada para o citoplasma celular (McLEAN et al, 2011). Quando madura, a NS4A é responsável por uma mudança na conformação da estrutura da membrana do RE, estando também associada à replicação do genoma viral. Além disso, age como um co-fator para a ativação da NS4B e ajuda a estabilizar RNAs de dupla-fita, intermediários na replicação viral. Não obstante, também pode induzir a apoptose celular (McLEAN et al., 2011).

Assim como a proteína anterior, NS4B é uma proteína integral de membrana. Seu peso é estimado em 27kDa, sendo uma molécula de caráter apolar. Quando madura, a proteína não apresenta glicosilação e atua no processo de replicação viral, ajudando a compor uma espécie de molde para a formação do complexo replicativo (XIE et al, 2015). Para além disso, NS4B modula o sistema imunológico atuando em oposição ao IFN, através da inibição da via sinalização JAK/STAT (CUMBERWORTH et al., 2017).

A maior dentre as proteínas codificadas pelos flavivírus é a proteína NS5, com cerca de 100kDa. Essa é altamente conservada entre as linhagens do ZIKV, com grau de similaridade de 94% entre os ZIKV asiático e africano (CUMBERWORTH et al., 2017; WANG et al., 2018). A NS5 apresenta dois domínios, os quais são responsáveis por sua atividade biológica. A porção C-terminal abriga uma região que exerce função de RNA-polimerase dependente de RNA, protagonizando o processo de replicação do RNA viral. Na extremidade oposta, a região N-terminal comporta o domínio da metiltransferase. (WANG et al., 2018). A atividade de metiltransferase proporciona a confecção do Cap localizado na porção 5' do genoma viral, o qual passa a mimetizar o RNA da célula. Essa estratégia ajuda o vírus a evadir-se do sistema imunológico do hospedeiro (CUMBERWORTH et al., 2017). Além disso, a função de metiltransferase da NS5 do ZIKV está envolvida na supressão do

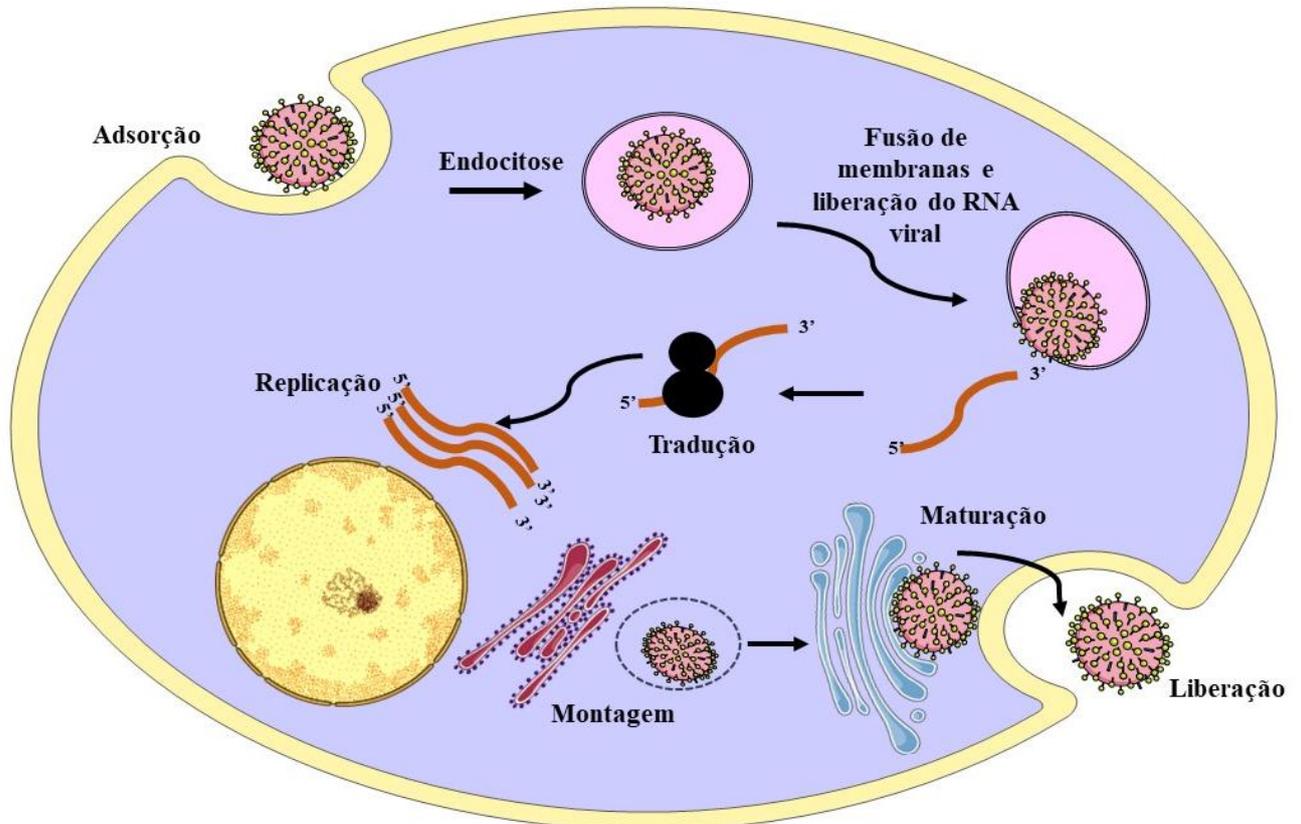
IFN do tipo I, através da marcação de indutores do IFN-I e fatores de transcrição STAT para a via do proteossoma (WANG et al., 2018).

Assim como acontece com os demais flavivírus, o processo de replicação do ZIKV tem início através da sua adsorção à superfície celular mediante reconhecimento de receptores pela proteína E, como os receptores específicos de células dendríticas (*Dendritic Cell Specific*, DC-SIGN), receptor de manose em macrófagos, e aqueles pertencentes a família das fosfatidilserinas. Em seguida, o vírus é internalizado por um mecanismo de endocitose com vesículas revestidas internamente com clatrina, encaminhadas a seguir para o citoplasma (LINDENBACH et al., 2013; YUN; LEE, 2017).

Quando o vírus se encontra no endossomo, o pH ácido possibilita uma mudança conformacional da proteína do E que resulta na liberação do RNA viral no citoplasma. Dessa forma, o processo de replicação do genoma dos flavivírus tem seu início com a tradução da poliproteína viral, que são adiante clivadas em proteínas individuais mediante a ação de proteases virais e do hospedeiro. Individualizadas, as proteínas resultantes da clivagem participam tanto da replicação do RNA, como da montagem da nova progênie viral (PICCONE; FLORES, 2007).

A formação da nova partícula viral é iniciada no RE, com o auxílio da proteína estrutural do capsídeo. Essa proteína, junto ao RNA replicado, forma uma partícula viral imatura e não infecciosa. O direcionamento dessa partícula imatura para o lúmen do retículo é feito através da heterodimerização da proteína C do vírion não infeccioso. No interior do RE, o novo vírion, ainda imaturo, recebe o envelope oriundo da membrana dessa organela, e segue através de canais secretórios para o complexo de Golgi, onde ocorre sua maturação. O amadurecimento da nova progênie é marcado pela clivagem da prM, que leva a uma mudança conformacional na superfície do vírion. (Figura 5) (TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013; YUN; LEE, 2017)

Figura 5 - Esquema do processo de replicação do ZIKV



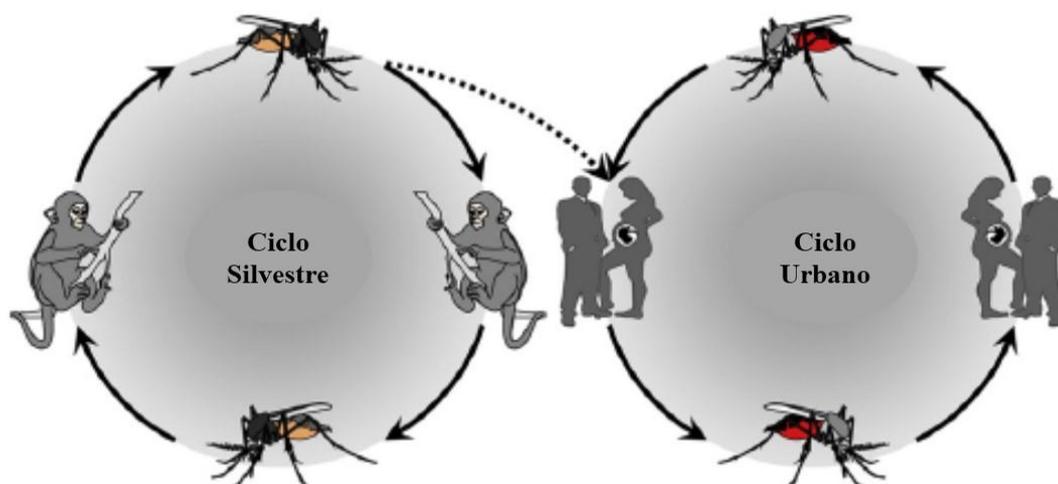
Fonte: A autora (2019)

Nota: Após adsorção à superfície da membrana externa celular, o vírus é endocitado e o baixo pH do endossomo permite a mudança de conformação na proteína do envelope e sua fusão com a membrana endossomal. Após essa fusão, o RNA viral é liberado no citoplasma, onde é traduzido pelos ribossomos na poliproteína viral. Em seguida, a poliproteína é clivada por proteases virais e hospedeiras. A partir dessa etapa, ocorre a replicação do genoma, seguida ao processo de montagem que ocorre no retículo endoplasmático rugoso. A partícula viral imatura é dirigida ao complexo de Golgi para concluir sua maturação e em seguida ser liberada.

2.3 Transmissão do ZIKV

O ZIKV apresenta dois ambientes de circulação, um ambiente silvestre, quando vetores artrópodes infectam primatas não humanos, e um urbano, no qual os mosquitos transmitem o vírus aos humanos (Figura 6) (WEAVER et al., 2016). O ZIKV já foi isolado em sete espécies do gênero *Aedes*: *A. aegypti*, *A. albopictus* e *A. africanus*, *A. apicoargenteus*, *A. furcifer*, *A. luteocephalus*, *A. opok* e *A. vittatus* (PLOURDE ; BLOCH, 2016; SONG et al., 2017). Porém, em ambiente urbano, há a predominância do *A. aegypti* nas transmissões, isso devido a sua boa adaptação às áreas urbanas tropicais, sendo, por isso, também responsável pela disseminação urbana de outras arboviroses (MARTÍNEZ et al., 2016; MUSSO; GLUBER, 2016; SONG et al, 2017).

Figura 6 - Ciclos de transmissão silvestre e urbano do ZIKV



Fonte: Song et al. (2017, tradução nossa)

Nota: O ciclo silvestre envolve apenas o vetor e primatas não humanos. Ocasionalmente, há a transmissão do vírus para humanos e o vírus passa a circular na zona urbana, tendo como hospedeiro definitivo o ser humano.

Em concordância com o que ocorre com os demais flavivírus, o ZIKV tem sua inoculação feita na pele do hospedeiro através do repasto das fêmeas artrópodes. No hospedeiro humano, é iniciado o período de incubação intrínseca, que é o espaço de tempo entre picada do mosquito e o surgimento dos primeiros sinais e sintomas, frequentemente entre três dias a duas semanas após a inoculação. Após essa etapa, tem início o período de viremia. Nesse momento, o vírus pode ser transmitido a outro mosquito através do repasto sanguíneo em hospedeiros infectados. Estando o vetor infectado, instala-se o período de incubação extrínseca, ou seja, o intervalo necessário para que uma fêmea adulta do mosquito, após o repasto em uma pessoa infectada, torne-se infectiva, o que pode durar entre sete e dez dias (BOORMAN; PORTERFIELD, 1956; SAMPATHKUMAR; SANCHEZ, 2016).

Além da transmissão vetorial, tem-se observado nas últimas epidemias uma disseminação do ZIKV que independe da presença dos artrópodes. No ano de 2014, foram relatadas evidências da transmissão vertical do vírus através do aleitamento materno (BESNARD et al., 2014) e de sua capacidade de infectar células da barreira placentária, tendo, assim, acesso facilitado ao cérebro do feto (JURADO et al., 2016).

Musso e colaboradores (2016) identificaram alta carga viral em amostras de sêmen que eram contemporâneas de amostras sanguíneas negativas para a presença do vírus, evidenciando uma possível replicação viral no sistema genital. Ainda segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTIONS) (2017), pessoas infectadas, mesmo aquelas que não apresentam sintomas,

podem transmitir o vírus pela via sexual, bem como pode ocorrer a transmissão para fetos e neonatos ao longo da gestação ou no momento do parto.

2.4 Sinais e sintomas clínicos

Apesar da maioria das infecções por ZIKV ser assintomáticas, quando as manifestações clínicas estão presentes, essas apresentam um largo espectro de sinais e sintomas. Dentre os sintomas clínicos, estão aqueles que são comuns a outras flavivirose, como a dengue, a exemplo de fadiga, dores no corpo, *rash* cutâneos, macropápulas, febre baixa e transiente, prurido e distúrbios digestivos. Geralmente, a infecção evolui de forma benigna, com duração de até uma semana a partir do início dos sintomas (WANG, et al., 2016).

Além desses sinais e sintomas, na última epidemia causada pelo ZIKV foi comprovada a capacidade de infecção transplacentária do vírus. Nessa situação, o vírus pode infectar células progenitoras neuronais do feto ou embrião, levando ao aparecimento de sinais clínicos, como a microcefalia (NOOR; AHMED, 2018). Além dessa, os lactantes podem apresentar desproporção crânio-facial, convulsões, anormalidades oftalmológicas, ventriculomegalia, calcificações distróficas, disfunções motoras, hiperatividade, dificuldades fonoaudiológicas. Devido à grande e variável quantidade de alterações neurológicas, foi conferido às anomalias congênitas a denominação de síndrome congênita do ZIKV (COSTELLO et al., 2016; NOOR; AHMED, 2018; SAMPATHKUMAR; SANCHEZ, 2016)

O primeiro relato de associação entre SGB e as infecções causadas por ZIKV foi feito na Polinésia Francesa (2013), onde 42 casos de SGB foram associados à infecção prévia pelo vírus (SAMPATHKUMAR;SANCHEZ, 2016; WEAVER et al., 2017;). A SGB, que é uma polirradiculoneuropatia autoimune, é caracterizada pela destruição da bainha de mielina, o que afeta o funcionamento dos nervos periféricos e leva à paralisia da musculatura esquelética e, com o agravamento do quadro, à interrupção da atividade respiratória (ANDERSON et al., 2016).

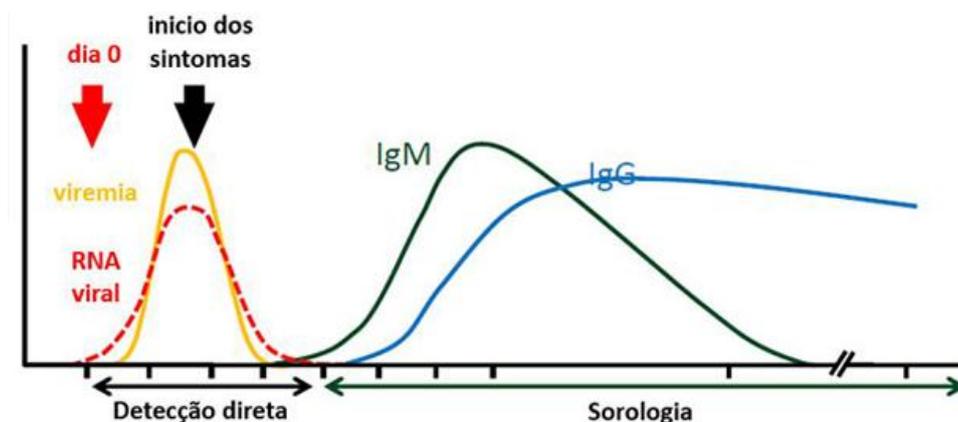
2.5 Diagnóstico

O tipo de teste diagnóstico a ser usado depende do momento da infecção, durante a viremia ou na fase convalescença, sendo nesses o diagnóstico direto e indireto, respectivamente (ANDERSON et al., 2016).

Os ensaios moleculares são o padrão ouro para o diagnóstico das infecções por ZIKV. Esses podem ser feitos através de teste de ácido nucléico (*Acid nucleic test*, NAT), como RT-PCR, qRT-PCR e RT-PCR LAMP. As autoridades de saúde preconizam que esse tipo de diagnóstico seja realizado até seis dias após o início das manifestações clínicas (CHANG et al., 2016), com amostras de sangue e urina pareadas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTIONS, 2017). Apesar de estarem na vanguarda do diagnóstico para as infecções por ZIKV, os testes diretos apresentam como limitações o baixo período para detecção, média de 10 dias para amostras de plasma, e o fato de muitas infecções serem assintomáticas, o que dificulta a coleta de amostras durante a viremia (MISHRA et al., 2018).

Os testes sorológicos ou indiretos, como o ensaio imunoabsorvente por ligação enzimática (*Enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA), são realizados uma semana após o início do curso da doença (Figura 7). Seu intuito é a detecção qualitativa principalmente de IgM e IgG, podendo ser realizada em amostras biológicas de sangue e líquido cefalorraquidiano. Os testes sorológicos que forem considerados como positivos, duvidosos ou inconclusivos, devem ser submetidos ao teste de neutralização por redução de placas (*Plaque reduction neutralization test*, PRNT), considerado padrão ouro diagnóstico diferencial (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTIONS, 2017). Uma limitação dos testes indiretos é a possibilidade de reação cruzada entre o ZIKV e demais flavivírus, como DENV, YFV, JEV (BALMESADA et al, 2017; MISHRA et al., 2018).

Figura 7 - Diagnóstico viral de acordo com o tempo de infecção



Fonte: Euroimmun (2016)

No dia zero (seta vermelha) não há presença de RNA viral ou anticorpos contra o ZIKV. O início dos sintomas coincide com o período de viremia (em amarelo) e conseqüentemente a possibilidade de detecção do RNA viral (tracejado vermelho) por uma diagnóstico direto. Com o fim do período virêmico, é iniciada a produção de anticorpos de fase aguda IgM (em verde) e de fase crônica IgG (em azul). A partir de então preconiza-se o diagnóstico sorológico.

2.6 Prevenção e manejo terapêutico

Até o presente momento, a principal forma de prevenção as infecções causadas pelo ZIKV está limitada ao controle de circulação do vetor (MASMEJAN et al., 2018). Além disso, o uso de preservativos no ato sexual também contribui para a profilaxia da transmissão horizontal (TUMEL et al., 2016).

Atualmente, existem alguns protótipos de vacinas contra o ZIKV em desenvolvimento, baseados em diferentes estratégias. Dentre elas, a produção de uma vacina de DNA, semelhante a que foi construída para o WNV. Esta candidata está na fase clínica 2, onde é avaliada a segurança e imonogenicidade vacinal, além de avaliar a melhor dose para administração (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018). O plasmídeo vacinal é baseado na cepa isolada na Polinésia Francesa em 2013 (H/ PF/2013). Deste isolado, são expressas no plasmídeo vacinal, as proteínas prM/E do ZIKV. Para isso, foram construídas dois plasmídeos, que expressam proteínas quiméricas de ZIKV. No primeiro, foi realizada a substituição da sequência sinal da prM do ZIKV por uma sequência análoga do JEV. Isso foi feito para aumentar a expressão proteica. Essa construção foi nomeada VRC5283 (NCT02996461). A segunda quimera, designada VRC5288 (NCT02840487), apresenta uma troca adicional entre a sequência de 98 aminoácidos da proteína E e uma sequência correspondente do JEV. Essa permuta foi realizada para facilitar a secreção da proteína E (DOWD et al., 2016; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018).

Um outro protótipo vacinal para o ZIKV baseado em vírus quimérico foi desenvolvido pelo Instituto Nacional de Alérgia e Doenças Infecciosas dos EUA (*National Institute of Allergy and Infection Diseases*, NIAID). Nessa abordagem, as proteínas prM e E do ZIKV foram inseridas em uma cepa do DENV-4. Atualmente, esse protótipo está em ensaio clínico fase 1 (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2018). Outra abordagem para o desenvolvimento de vacinas contra o ZIKV é a utilização de vírus inativados. Essa metodologia foi utilizada pelo Instituto Militar de Pesquisa Walter Reed (*Walter Reed Army Institute of Research*, WRAIR) e está em fase clínica 1 (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2019).

Até o momento também não existe um tratamento específico e licenciado para as infecções com ZIKV. Uma proposta muito utilizada é o reaproveitamento de fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e que apresentam atividade antiviral *in vitro* contra outros flavivírus, como por exemplo a ribavirina, além de alguns antibióticos (a exemplo da azitromicina), antimaláricos e até antihelmínticos (MASMEJAN et al., 2018).

Como uma outra alternativa para o tratamento da infecção pelo ZIKV, Fink et al. (2018) testaram o arbidol, um fármaco utilizado há mais de 30 anos contra o vírus influenza, licenciado apenas na Rússia e na China. A formulação foi capaz de impedir com eficiência que seis cepas diferentes do ZIKV infectassem células epiteliais primárias da vagina e da cérvix humana (FINK et al., 2018).

Diante desse cenário, atualmente o tratamento do quadro infeccioso causado pelo ZIKV varia de acordo com o grau da sintomatologia. Em casos brandos, deve-se fazer o tratamento com acetaminofeno para alívio dos sintomas, assim como manter cuidados com a hidratação e repouso. Não é recomendado o uso de paracetamol ou formulações derivadas até que seja descartada a hipótese de infecção por DENV (ANDERSON et al., 2016; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTIONS, 2017).

2.7 Genética Reversa

2.7.1 Histórico

De maneira convencional, na genética direta, as mutações e alterações que acontecem no genoma são avaliadas através da expressão fenotípica por elas conferidas. Entretanto, a linha de raciocínio da genética convencional não permite elucidar completamente algumas questões, a exemplo de como seria a expressão de determinado gene com uma mutação ou se o mesmo fosse silenciado (HARDY et al., 2010). A genética reversa pode ser definida como uma modificação específica no gene ou na sua expressão, seguida da observação do fenótipo resultante, complementando, assim, as lacunas deixadas pela genética convencional (HARDY et al., 2010). Esse recente ramo da genética tem ampla aplicação em diversas áreas, como pesquisas ecológicas com bactérias (SCHWACHTJE; KUTSBACH; BALDWIN, 2008) e a piscicultura (BIACCHESSI, 2011).

No que concerne à virologia, a genética reversa consiste na recuperação (*rescue*) de uma partícula viral através de transfecção em células eucarióticas, principalmente de um DNA complementar viral (DNA_{cv}) ou de um RNA viral (RNA_v) transcrito *in vitro* (BOYER; HAENNI, 1994; SILVA Jr, 2018) (Figura 8). Uma das principais ferramentas da genética reversa viral é a confecção de clones infecciosos. Esses últimos são conceituados como sendo moléculas de DNA_{cv} clonadas de maneira estável e, que quando transfectados em células permissivas, são capazes de gerar vírus recombinantes (RUGGLY; RACE, 1999). Essas construções, por sua vez, podem ser utilizadas para o desenvolvimento de vírus atenuados

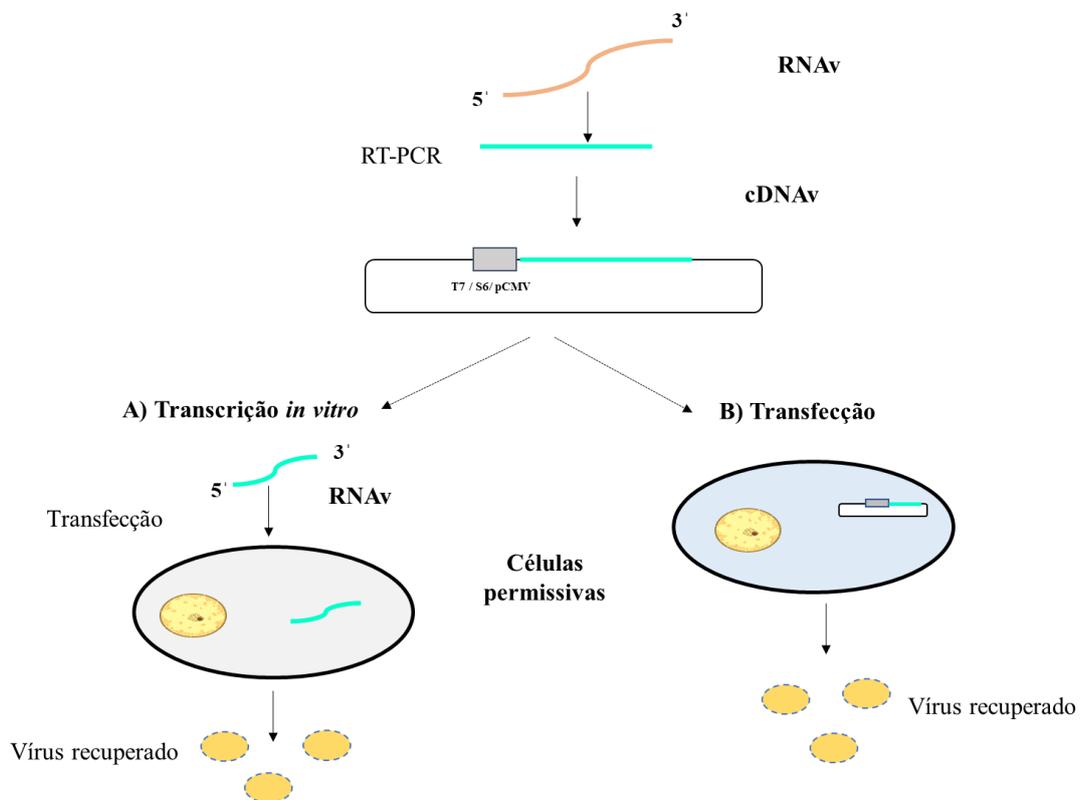
para vacinas, e de outras ferramentas de genética reversa, como os RNAs subgenômicos autorreplicáveis (AUBRY et al., 2015).

2.7.2 Aplicações dos sistemas de genética reversa

As ferramentas de genética reversa desenvolvidos ao longo dos anos têm subsidiado muitas descobertas a respeito da transcrição e replicação viral, dos mecanismos de patogenicidade desses agentes, sua interação com as células hospedeiras e estratégias de evasão do sistema imunológico. Além disso, os instrumentos gerados pela genética reversa podem contribuir com o desenvolvimento de vacinas e para a triagem de drogas antivirais, essa última principalmente através da construção de replicons repórteres (MARTÍNEZ-SOBRIDO et al.,2018).

Replicons são RNAs autoreplicativos e não infecciosos construídos através da deleção de proteínas estruturais virais e manutenção de sequências virais importantes para a tradução e replicação viral, como por exemplo, as proteínas não estruturais e regiões terminais 5'UTR e 3' UTR. (KATO e HISHIKI, 2016b; MARTÍNEZ-SOBRIDO et al, 2018).

Figura 8 - Estratégias de desenvolvimento e recuperação de clones infecciosos obtidos em bactérias ou leveduras.



Fonte: A autora (2019).

Nota: Representação de algumas das estratégias para recuperação de clone infecciosos de vírus de RNA positivo. Transcrição reversa do RNA viral, seguida da clonagem, que pode ser realizada em levedura ou bactérias. Em seguida, é realizada a transcrição do RNA viral (8A) (para na sequência ser transfectado em células permissivas) ou a transfecção direta (8B) em células permissivas (desde que aja uma compatibilidade entre o promotor utilizado e a célula transfectada).

A expressão de genes heterólogos por parte dos replicons pode contribuir para a otimização de testes com drogas antivirais. Há uma necessidade de melhoramento desse processo, pois os ensaios até o momento existentes demandam muito tempo, uma vez que são fundamentados no processo de infecção viral em cultivos celulares. Nesses ensaios, a capacidade de um composto teste em inibir a replicação viral é avaliada por quantificação do título viral através de ensaios de placa (BRIESE et al., 2000; MORREY et al., 2002).

Em oposição a esses ensaios de rendimento limitado, os replicons são opções de ferramentas que podem contribuir para a otimização do processo, permitindo a triagem em larga escala de candidatos antivirais. Uma vez abrigando um gene heterólogo repórter, o subgenoma pode ser transfectado e seu nível de replicação poder ser analisado através da quantificação da expressão do gene repórter e não mais da observação do aparecimento de efeitos citopáticos ou quantificação viral por ensaios de placa (SHY, 2003).

Um exemplo da aplicação de replicons para ensaios de alto rendimento é o subgenoma de WNV, expressando RLuc e utilizado para triagem de drogas, desenvolvido por Puig-Basagoiti et al. (2005). Além desse, já foram descritos na literatura outros subgenomas autoreplicativos para WNV (KOBAYASHI et al., 2017) e outros flavivirus, como: YFV (JONES et al., 2005;), vírus Kunjin (*Kunjin virus*, KUNV) (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997), DENV-1 (KATO; HISHIKI, 2016b), DENV-2 (LEARDKAMOLKARN et al., 2012), DENV-3 (SANTOS et al., 2013) e ZIKV (XIE et al., 2016; LI et al., 2018; MÜNSTER et al., 2018; MUTSO et al., 2017). Esses replicons foram utilizados para o desenvolvimento de linhagens celulares recombinantes. Essas células podem, então, ser utilizadas para triagem em larga escala de drogas com possível atividade antiviral. São exemplos dessa aplicação, as linhagens celulares de YFV (JONES et al., 2005; KASSAR et al., 2017; OLIVEIRA, 2011;), de DENV (KATO e HISHIKI, 2016b), WNV (LI, Wei et al., 2017) e ZIKV (XIE e colab., 2016; LI et al., 2018).

Os genomas autoreplicativos repórter também podem ser utilizados para a formação de partícula pseudo-infecciosas repórteres através do seu revestimento por proteínas estruturais co-transfectadas (OLIVEIRA, 2011). Dentre suas aplicações, esse sistema pode ser aplicado na detecção de inibidores tanto da entrada quanto da replicação viral (PUIG-BASAGOITI et al., 2005), bem como para ensaios vacinais (PYANKOV et al., 2015).

2.7.3 Genética reversa de *Flavivírus*

Os vírus de RNA de sentido positivo figuram entre os principais agentes infecciosos no mundo. Dada essa importância, muitos estudos de genética reversa foram desenvolvidos para os vírus que possuem essa característica. De modo especial, destaca-se o gênero *Flavivirus* (STOBART; MOORE, 2014).

A primeira construção de genética reversa feita para estudo dos flavivírus foi publicada em 1989, utilizando como modelo o YFV (RICE et al., 1989). A partir desse marco, nos anos seguintes foram desenvolvidos outros modelos de genética reversa para os membros do mesmo gênero, como para DENV (GUALANO et al., 1998; SANTOS et al., 2013), JEV (LI et al., 2013; SUMIYOSHI et al., 1995;), WNV (PAVITRAKAR et al., 2015; YAMSHCHIKIV, et al 2001) e ZIKV (XIE et al., 2016; MUNSTER et al., 2018 MUTSO et al., 2017).

O desenvolvimento de um clone infeccioso tem início com a produção de um cDNA completo e de alta fidelidade a partir do RNA viral. A clonagem desse cDNA pode ser

realizada em bactérias ou leveduras, sendo as primeiras um hospedeiro muito utilizado para clonagens em geral. No entanto, quanto aos flavivírus, esse hospedeiro pode apresentar limitações ao desenvolvimento de sistemas de genética reversa, devido ao reconhecimento de sequências crípticas no genoma dos flavivírus. Essas regiões são traduzidas em proteínas ou peptídeos tóxicos a esses hospedeiros, que conseqüentemente modificam essas regiões, resultando em mutações no genoma viral clonado, inviabilizando a recuperação da partícula viral (AUBRY et al., 2015; PU et al., 2011).

A técnica de recombinação homóloga em levedura é uma alternativa para sanar as lacunas deixadas pelas clonagens convencionais de flavivírus em *E.coli*. A recombinação homóloga ocorre facilmente em levedura devido à facilidade com que a *S. cerevisiae* possui de recombinar insertos lineares de DNA. Qualquer fragmento, desde que apresente homologia suficiente (entre 15 e 50 paras de bases) em suas extremidades com o vetor, tem capacidade de iniciar o evento da recombinação. Outra vantagem da técnica é a clonagem de vários fragmentos de DNA em uma única molécula sem a necessidade de sítios de restrições, possibilitando, assim, a montagem do genoma viral completo em uma única etapa de clonagem (SANTOS, 2010).

Os cromossomos bacterianos artificiais (*Bacterial artificial chromosome*, BAC) são uma outra alternativa à clonagem em bactéria com vetores convencionais. Esses sistemas são moléculas de DNA circular, capazes de conservar insertos de DNA grandes, de até 350Kb, e também podem ser utilizados para o desenvolvimento de clones infecciosos. Os BACs já foram utilizados para a construção de clones infecciosos de JEV (YUN et al., 2003), YFV (MOST et al., 1999), DENV-1 (SUZUKI et al., 2007) e DENV-2 (USME CIRO et al., 2014).

Uma outra alternativa para a obtenção de sistemas de genética reversa são os métodos que não utilizam vetores bacterianos. Dentre eles, estão o *long PCR* (GRITSUN; GOULD, 1995), clonagem de extensão de polimerase circular (*Circular polymerase extension cloning*, CPEC) (EDMONDS et al., 2013) e a produção de amplicons subgenômicos infecciosos (*Infectious Subgenomic-Amplicons*, ISA) (AUBRY et al., 2014).

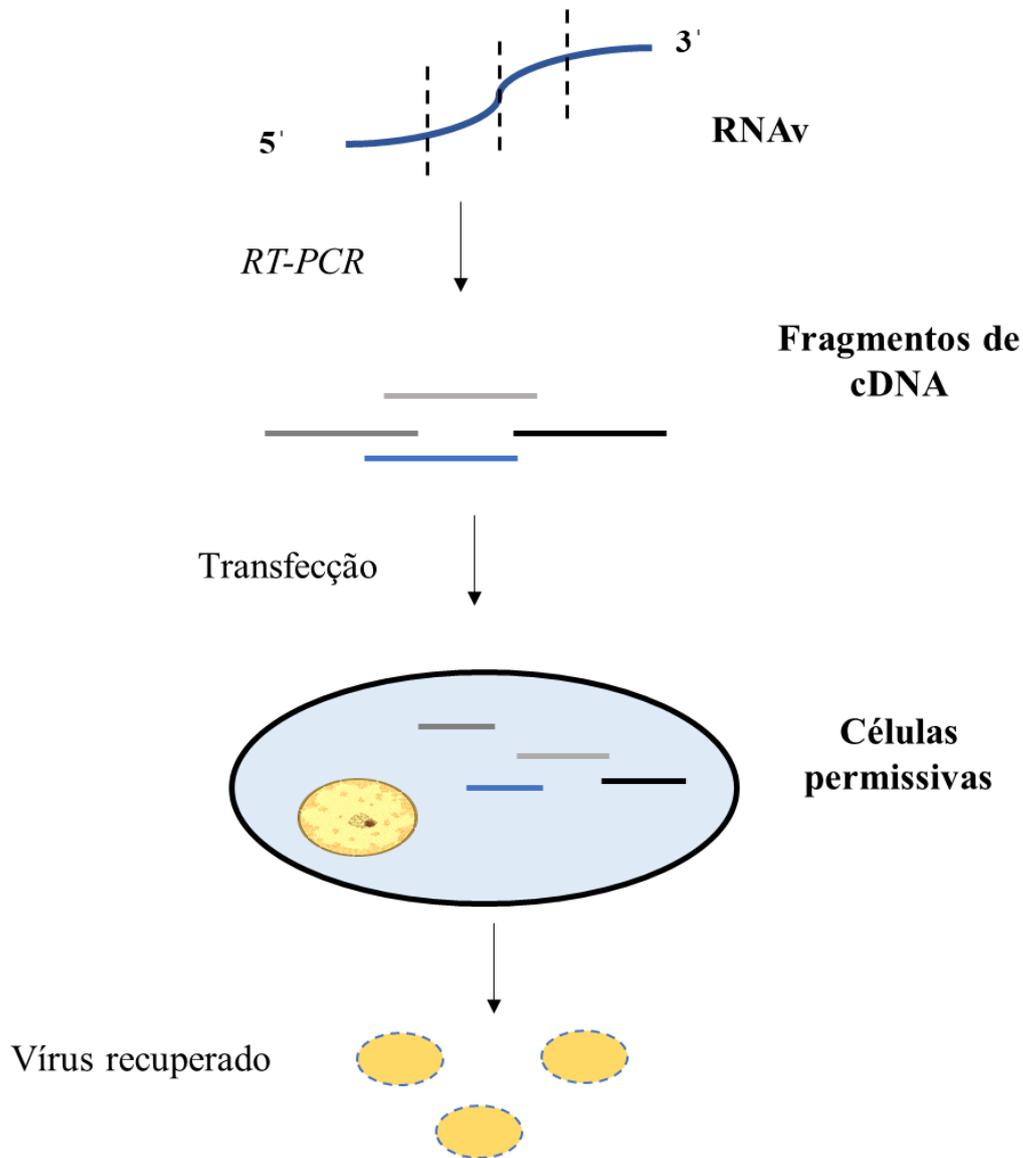
O *long PCR* consiste na confecção de cDNA de alta fidelidade a partir do RNA viral. Em seguida, esse é dividido em apenas dois fragmentos, que são amplificados em sua totalidade. Posteriormente, essas porções são ligadas por PCR de fusão, para em seguida serem transcritos *in vitro* (GRITSUN; GOULD, 1995).

Outra opção para a produção de sistemas de genética reversa para flavivírus sem clonagem em bactérias é a CPEC. Essa técnica foi testada pela primeira vez por Edmonds et al. (2013) para a construção de um sistema de genética reversa para o vírus Kunjin (*Kunjin virus*,

KUNV). De forma breve, a técnica consiste na amplificação (mediante enzima de alta fidelidade) de múltiplos amplicons de cDNA. Esses fragmentos apresentam regiões de sobreposição entre si e também entre o fragmento do vetor. Em seguida, esses insertos são desnaturados e em seguida religados, na ordem correta, por sobreposição. A DNA polimerase faz a extensão dos fragmentos, gerando um produto circular. O plasmídeo gerado é então transfectado em células competentes, sem a necessidade de uma transcrição *in vitro*, uma vez que essa metodologia utilizou o promotor do citomegalovírus humano (*Human cytomegalovirus*, CMV), expresso virtualmente em todo tipo celular (EDMONDS et al., 2013).

Como uma outra alternativa a essas estratégias, há também o método ISA, que é baseado na divisão do genoma viral em amplicons complementares e parcialmente homólogos (AUBRY et al., 2014). Nesse estudo, o primeiro fragmento contém o promotor do CMV, o fragmento intermediário apresenta o genoma do vírus de interesse e o último abriga a sequência da ribozima do vírus da hepatite delta (*Hepatitis delta ribozime*, HDR). Esses fragmentos são transfectados em células permissivas e essas, por sua vez, realizam a sua fusão dos amplicons *in vivo*. Dessa forma, essa técnica não necessita de uma etapa adicional de PCR de fusão e de uma transcrição *in vitro* (Figura 9). Vírus recuperados por ISA já têm sido descritos para WNV, YFV, JEV e DENV (AUBRY et al., 2014).

Figura 9 - Estratégia de recuperação de vírus recombinantes com a metodologia ISA.



Fonte: A autora (2019).

Nota: Representação do método ISA (*Infectious Subgenomic-Amplicons*) para recuperação de vírus recombinantes. O método é livre de clonagem em bactérias ou leveduras e a recombinação dos amplicons do genoma é feita por homologia na célula transfectada.

2.7.4 Sistemas de genética reversa para o ZIKV

Dentre os sistemas de genética reversa desenvolvidos, até o momento para o ZIKV, citamos neste documento alguns clones infecciosos e replicons.

O clone desenvolvido por Shan et al. (2016) usou como base a cepa do Camboja ZIKV FSS13025, isolada no ano de 2010. Essa construção foi clonada em bactéria, utilizando

um plasmídeo de baixo número de cópias (*Low copy number*), de modo a reduzir a expressão das sequências do genoma viral que são tóxicas às bactérias. Esse clone, foi utilizado para a construção de um vírus repórter, que expressava o gene RLuc. No mesmo ano, o vírus repórter, foi utilizado como base para o replicon construído por Xie et al. (2016) (SHAN et al., 2016; XIE et al., 2016).

Em 2017, Mutso et al. (2017) relataram a construção de um outro clone infeccioso de ZIKV. Essa construção utilizou a cepa brasileira BeH81915, isolada no ano de 2015, em Belo Horizonte, durante o período epidêmico. Para seu desenvolvimento foi utilizado como vetor de clonagem um BAC. A partir desse clone infeccioso foram construídas variáveis repórteres desse cDNA, expressando a nanoluciferase. Esse clone serviu como arcabouço para o desenvolvimento do replicon repórter, expressando o gene *Gaussia* luciferase (GLuc) (MUTSO et al., 2017).

Além de seu uso para a construção de replicon de ZIKV, os clones infecciosos também foram utilizados para estudo sobre os mecanismos patogênicos virais. Por exemplo, Annamalai et al. (2017) observaram, através da manipulação genômica do ZIKV, que uma glicosilação na proteína E pode estar envolvida no processo de neuroinvasão realizado pelo vírus (ANNAMALAI et al., 2017).

Em 2016, Xie e colaboradores desenvolveram um replicon monocistrônico para o ZIKV. Essa construção tinha como gene repórter o RLuc entre as sequências residuais das proteínas do C e do E. Entretanto, esse replicon não era capaz de formar linhagem celular, dificultando seu uso em testes de triagens de antivirais. Para que isso fosse possível, foi necessário a inserção de outro cassete, agora contendo a sequência IRES e o gene de resistência à neomicina. Esse cassete foi inserido na porção terminal da extremidade 3'.

Em 2018, Li e colaboradores conseguiram desenvolver um replicon bicistrônico para o ZIKV, expressando simultaneamente o gene repórter, RLuc e o gene de seleção que codifica a enzima puromicina N-acetil-transferase (*puromycin N-acetyl-transferase*, PAC). Esses genes foram inseridos entre as sequências residuais de 38 aminoácidos da porção N' terminal do C e de 30 aminoácidos da região C' terminal da proteína E. Esses resíduos são sequências conservadas entre os flavivirus e atuam, respectivamente, na replicação do RNA viral e no direcionamento para o RE no momento da tradução (LI et al, 2018; XIE et al, 2016). O replicon construído foi utilizado para gerar linhagens celulares que podem ser utilizadas em testes diagnósticos de grande escala.

Münster et al. (2018) relataram o desenvolvimento de um vírus e um replicon de ZIKV repórter expressando RLuc, através da técnica de silenciamento das sequências

críticas para os procariotos. A cepa BeH819015, também foi utilizada nessa construção. As regiões silenciadas no estudo estavam localizadas, em sua grande maioria, na proteína do envelope. Essas sequências foram preditas *in silico*.

3 JUSTIFICATIVA

Em 2015, a epidemia causada pelo ZIKV surpreendeu a todas autoridades de saúde pública. Isso ocorreu não apenas por sua grande disseminação, mas também pelo amplo espectro de complicações e ineditismo de sinais clínicos apresentados pela infecção, a exemplo das notificações de SGB e da síndrome congênita do ZIKV. Desde então, muitos esforços foram feitos afim de buscar uma maior compreensão sobre as interações do ZIKV com moléculas hospedeiras, bem como para o desenvolvimento de antivirais e formulações vacinais.

Apesar do fim da emergência nacional para o ZIKV, ainda é necessário compreendermos mais o seu ciclo replicativo e sua interação com a maquinaria celular. Nessa conjuntura, as técnicas de genética reversa são ferramentas fundamentais para aprofundarmos os conhecimentos sobre a biologia molecular e replicativa do ZIKV e de outros patógenos e até o presente instante nenhuma instituição nacional possui um sistema de genética reversa para o ZIKV. Diante dessas ressalvas, o desenvolvimento de uma linhagem celular expressando um replicon repórter do ZIKV deverá fornecer subsídios tecnológicos para aprofundarmos os estudos moleculares sobre o vírus e auxiliará na avaliação em larga escala de potenciais compostos anti-ZIKV.

4 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma linhagem celular expressando estavelmente um replicon bicistrônico repórter do ZIKV.

4.1 Objetivos específicos

- a) Construir o replicon bicistrônico repórter pSVJS01-repZIKVPE243-LucNeoIres, expressando o gene repórter FLuc e o gene de resistência neomicina fosfotransferase;
- b) Desenvolver e avaliar a estabilidade de uma linhagem celular recombinante expressando o replicon repórter repZIKVPE243-LucNeoIres.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico, estão discriminados os materiais e métodos utilizados para obtenção tanto do objetivo geral, quanto dos objetivos específicos.

5.1 Cultivo de células

Células BHK-21 foram mantidas em meio MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000µg/mL, Gibco) em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

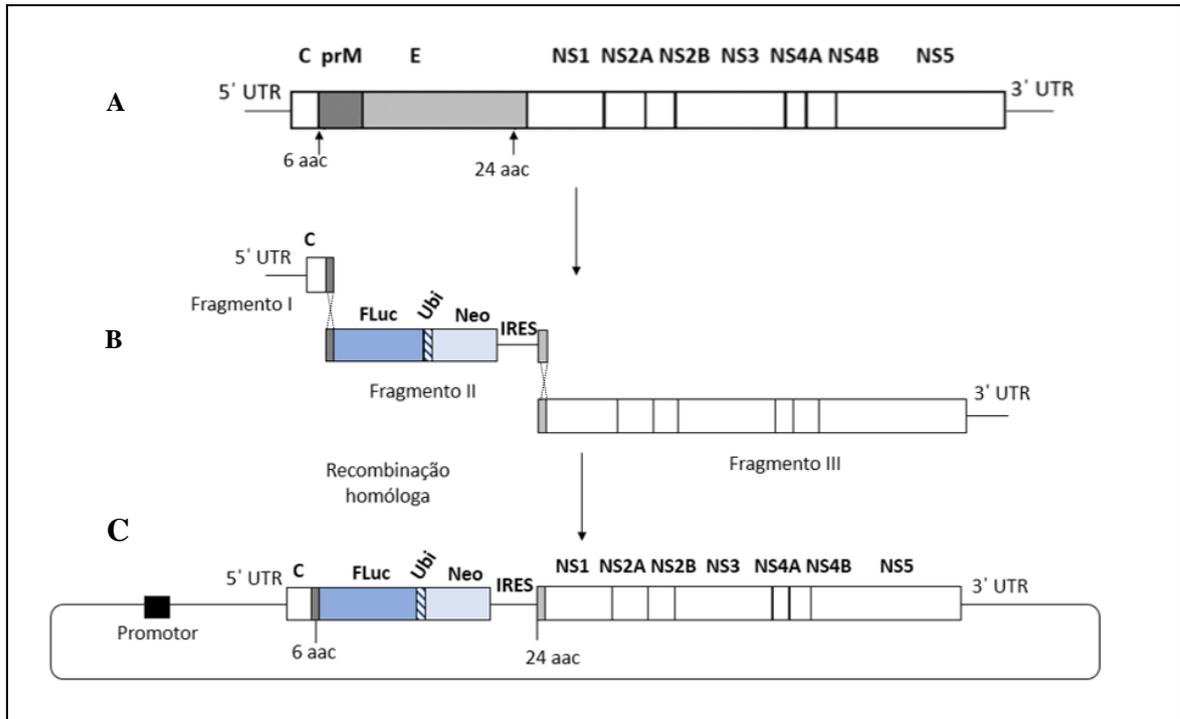
5.2 Construção do replicon repórter pSVJS01-repZIKV-LucNeoIres

Neste item, são descritos as etapas de construção do replicon bicistrônico do ZIKV.

5.2.1 Amplificação dos insertos e construção do replicon

O replicon pSVJS01-repZIKVPE243-LucNeoIres foi construído por recombinação homóloga entre o vetor pSVJS01 (previamente construído no Departamento de Virologia/IAM) e três fragmentos gênicos (Figura 10): i) fragmento 1, de aproximadamente 0,5Kb e relativo à região 5'UTR, o capsídeo do ZIKV e os seis primeiros aminoácidos da prM, amplificado a partir da construção pSVJS01-ZIKV-PE243, a qual contém o genoma completo clonado do ZIKV cepa PE243/2015 (GIL et al., dados não publicados); ii) fragmento II, com cerca de 3,4Kb, amplificado da construção rep-FA17D-LucNeoIres (GIL et al., dados não publicados), que contém o gene da FLuc, o sítio de clivagem para ubiquitina, o gene de resistência à neomicina e a sequência IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) do vírus da encefalomiocardite (*Encephalomyocarditis virus*, EMCV); iii) fragmento 3, com um tamanho aproximado de 8,4Kb, e formado pelos últimos 24 códons da proteína E, os genes das proteínas não estruturais e a região 3'UTR do ZIKV, amplificados da construção pSVJS01-ZIKV-PE243. A figura 11 resume a organização do replicon após sua clonagem.

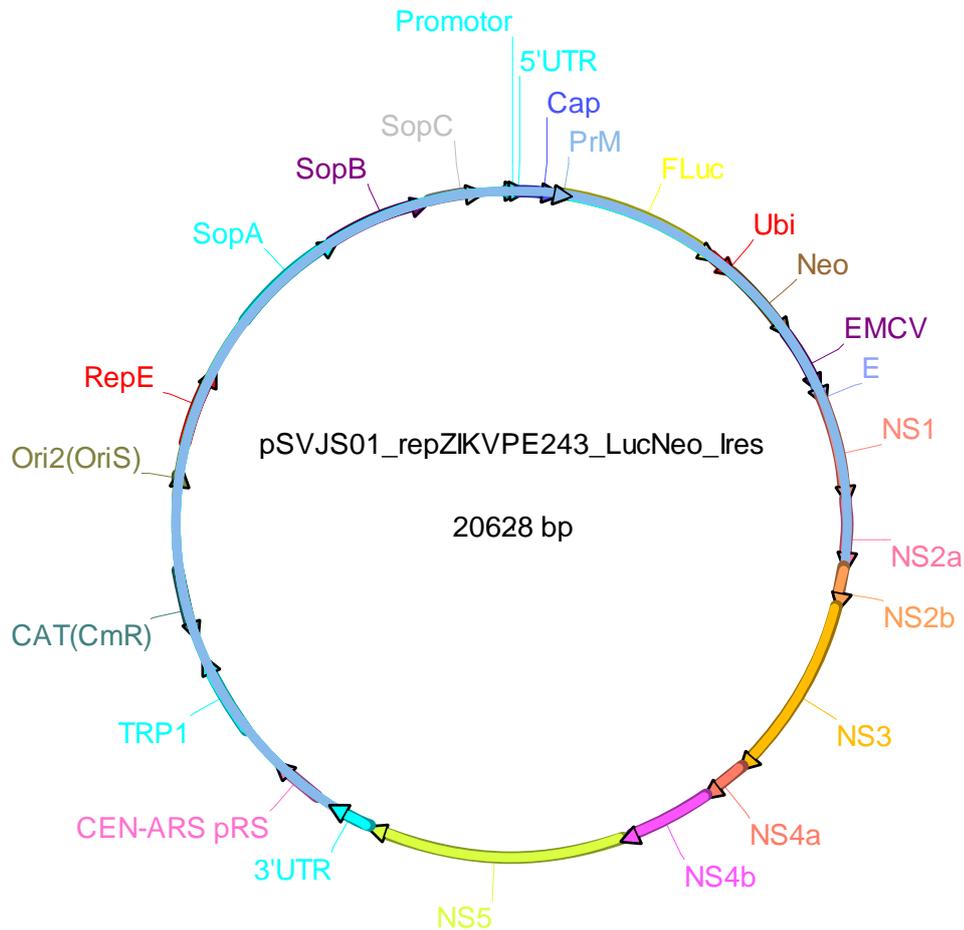
Figura 10- Estratégia de construção do replicon biscitrônico repórter do ZIKV



Fonte: A autora (2018)

Legenda: Em A está esquematizada a poliproteína do ZIKV. Em B, estão representados os fragmentos 1, 2 e 3 usados para a construção do pSVJS01-repZIKV-PE243-LucNeoIres. As regiões de homologia entre os fragmentos estão representadas pelos quadrados em preto e as regiões de homologia entre os fragmentos 1 e 3 e o vetor estão representadas em vermelho. Em C, as regiões finais do replicon biscitrônico: as UTRs e as proteínas não estruturais do ZIKV, o gene repórter da FLuc e o gene de resistência à neomicina. A região T7 compreende a sequência promotora da RNA polimerase T7 necessária à transcrição *in vitro* do replicon.

Figura 11 - Mapa da construção pSVJS01-rep-ZIKV-PE243-LucNeoIRES ao final da recombinação homóloga em levedura



Fonte: A autora (2019).

Legenda: Esquema feito no programa *A plasmid editor* (Ape), mostrando as principais regiões do replicon: o promotor para RNA polimerase T7 (promotor), as seqüências das proteínas estruturais (Cap, prM e E) e não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5), regiões terminais (5' UTR, 3'UTR), seqüência codificante do triptofano (TRP1), gene repórter (FLuc) e gene de resistência à neomicina (NEO).

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos necessários para a recombinação contém as seqüências necessárias para a amplificação e as regiões homólogas para a recombinação (Quadro 1). Os fragmentos 1 e 2 foram amplificados em uma reação de 50µL com a enzima *Taq long Amp* (New England Biolabs) com: 100ng de DNA, 5pmol de oligonucleotídeo *forward*, 5pmol de oligonucleotídeo *reverse* e 20µL de tampão 2X e 1µL da enzima polimerase. As condições para essa reação foram: 95°C a 5 minutos para a desnaturação inicial, em seqüência 32 ciclos, cada um composto por 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos a 56°C para o anelamento, 4 minutos a 68°C para extensão e, por último, 15 minutos a 68°C para a extensão final. O terceiro fragmento foi amplificado

com a enzima Accutaq™ LA Polymerase (Sigma), em uma reação de 50µL, composta por: 100ng de DNA, 5µL do tampão Accutaq™ LA Polymerase (Sigma) 1X, 1,3% DMSO, 0,4 M betaína (Sigma), 200µM de cada dNTP, 1U Accutaq™ LA Polymerase, 5pmol de oligonucleotídeo *forward* e 5 pmol de oligonucleotídeo *reverse*. As condições de amplificação do terceiro fragmento foram: 2 minutos a 94°C para desnaturações iniciais, seguidas de 32 ciclos, cada ciclo composto de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 60°C, 8 minutos de extensão a 68°C e 20 minutos finais de extensão a 68°C.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados na construção do replicon pSVJS01-repZIKVPE243-LucNeoIres

Insertos	Oligonucleotídeos	Sequências (5'-3')
Fragmento 1	pSVJS01-ZIKV-F	<u>CGACGAGCTCGCGAGCTCCGGTCCGCAGTAATAC</u> <u>GACTCACTATTAGTTGTTGATCTGTGTGARTCAG</u>
	ZIKV-PE243-497R	<u>ACTCCCACGTCTAGTGACCTC</u>
Fragmento 2	ZIKV-PE243-LucNeoIres-F	<u>CAGCGGAGGTCCTAGACGTGGGAGTATGGAAGA</u> <u>CGCCAAAAACATAAAG</u>
	ZIKV-PE243-LucNeoIres-R	<u>AAGGGAAATAGATCCATTCTTTGTCATGGTATTAT</u> <u>CGTGTTTTTCAAAGG</u>
Fragmento 3	ZIKV-PE243-2412F	<u>ACAAAGAATGGATCTATTTCCC</u>
	pSVJS01_ZIKV-10807R	<u>TATTCAACATTTCCGTGTCGCGCGGCCGCAGACCC</u>
		<u>ATGGATTTCCCC</u>

Fonte: Da autora (2019)

Nota: As sequências homólogas estão sublinhadas na tabela. Em negrito está representada uma base degenerada que pode ser ou uma adenina (A) ou uma guanina (G).

5.2.2 Digestão do vetor de clonagem

A digestão do vetor pSVJS01 foi realizada com as enzimas Bam-HI (New England Biolabs) e SacII (New England Biolabs). Foram utilizados 2µg do vetor, 1µL da enzima Bam-HI (20.000 U/mL), 1µL da enzima Sac-II (20.000 U/mL) e 2µL do tampão *Cutsmart*. O volume final da reação foi de 20µL e incubado por 6 horas, sob uma temperatura de 37°C. Em seguida, foi realizada a desfosforilação do material digerido sob uma temperatura de 37°C, durante 1 hora, com 1µL da enzima fosfatase alcalina (*Calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP, 20U/ mL) (Promega).

5.2.3 Recombinação homóloga em levedura

A seguir, serão descritas as etapas de transformação e recombinação homóloga da levedura.

5.2.3.1 Transformação da levedura

Para a recombinação homóloga utilizou-se a levedura *S. cerevisiae*, cepa YPH 252. A levedura foi crescida em 10mL de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*), por 18 horas, sob agitação de 130rpm e temperatura de 30°C. A partir desse pré-inóculo, foi realizado um inóculo de 30mL, com densidade óptica (DO) de 0,2. As leveduras foram então crescidas por aproximadamente quatro horas até atingirem uma DO de 0,6. Em seguida, as leveduras foram centrifugadas por 10 minutos a 3.500rpm e ressuspensas em 50mL de ddH₂O estéril.

Resumidamente, após a lavagem das leveduras, essas foram ressuspensas em 2mL (1mL para cada recombinação) da solução 1X de acetato de lítio (*lithium acetate*, LiAc) e TE (Tris-EDTA) e distribuídas em dois tubos. Em seguida, foram centrifugadas e novamente lavadas com 1X LiAc/TE. Em outros dois tubos, foram adicionados 30µg do carreador de DNA de esperma de salmão (Invitrogen), 2µL de TE (10X) e 2µL LiAc (10X). No tubo de recombinação para construção do replicon, foram adicionados os fragmentos 1, 2, e 3 e o vetor. No tubo controle negativo, foi adicionado apenas o vetor vazio. O *pellet* de levedura foi ressuspenso com essas reações. Em sequência, foi adicionado 140µL da solução 1X TE/LiAc/ polietilenoglicol (PEG).

As células foram, então, homogeneizadas e incubadas por 40 minutos a 30°C. Posteriormente, foi adicionado 20µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Essa suspensão foi incubada por 20 minutos sob uma temperatura de 42°C. Por último, as células foram centrifugadas e em seguida ressuspensas em 200µL de uma solução de aminoácidos sem triptofano. As suspensões foram semeadas em placas de cultura contendo meio YNB (*Yeast Nitrogen Base*, sem triptofano) e incubadas por três dias a 30°C.

5.2.3.2 Extração do DNA plasmideal

Após as 72 horas da recombinação, as colônias que cresceram na placa da recombinação foram inoculadas em 20mL de meio YNB (sem triptofano) e mantidas sob

agitação de 130rpm a 30°C, por 20 horas. Em seguida, as leveduras foram centrifugadas a 3.500rpm por 5 minutos e lavadas com água milli-Q. Após essa etapa, as células foram novamente centrifugadas e seu *pellet* foi ressuspensionado em 400µL de tampão SCE (1M Sorbitol, 100mM de acetato de sódio, NaAc, e 60mM de EDTA). A essa solução foi acrescentada 2µL da enzima Zymolase (Sigma) e 10µL de β-mercaptoetanol para lise das leveduras. As condições utilizadas para a lise foram: incubação por 4 horas, sob agitação de 100 rpm, a uma temperatura de 37°C. Por fim, o DNA plasmideal foi extraído com o kit *Pure Plasmid Miniprep System* (Promega), segundo as instruções do fabricante.

5.3 Confirmação dos clones

Para a confirmação do sucesso da clonagem, o DNA plasmideal de diferentes colônias foi submetido a uma reação de PCR para a região do gene repórter e do ECMV, com os *Oligonucleotídeos* LucEMCV-F (CAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGtgaGGCCGGCCAGACCACAACGGTTTCCCT C) e ZIKV-3485R (GCCTTATCTCCATTCCATACC). Os produtos de PCR foram purificados e utilizados em reações de sequenciamento. As reações foram realizadas com o kit *ABI BigDye terminator cycle sequencing* (Applied Biosystems) e os produtos dessa reação foram separados em um sequenciador *ABI 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências adquiridas foram analisadas com o auxílio do software *A plasmid editor* (Ape).

5.4 Recuperação do replicon construído

Neste item, são descritas as etapas para a recuperação do replicon de ZIKV.

5.4.1 Amplificação do genoma do replicon repZIKVPE243-LucNeoIres

A amplificação completa do replicon foi realizada em uma reação de 50µL utilizando a enzima Accutaq™ LA Polymerase (Sigma). A reação foi composta de 100ng de plasmídeo DNA (extraído de levedura), 1X do tampão Accutaq™ LA Polymerase (Sigma), 1,3% DMSO, 0.4 M betaína (Sigma), 200µM de cada dNTP, 1U Accutaq™ LA Polymerase e 20pmol de *Oligonucleotídeos* específicos: pSVJS01-ZIKV-1F (CGACGAGCTCGCGAGCTCCGGTCCGcagtaatacactcactattagttgtgatctgtgtgaRtcag) e pSVJS01-ZIKV-10807R

(TATTCAATTTCCGTGTCGCGCGCGCAGACCCATGGATTTCCC). As condições de amplificação foram: 2 minutos a 94°C para desnaturações iniciais, seguidas de 32 ciclos, cada ciclo composto de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 60°C, 20 minutos de extensão a 68°C, e por último 10 minutos de extensão a 68°C.

5.4.2 Transcrição *in vitro*

Para a transcrição do replicon foi utilizado como molde o DNA proveniente do PCR descrito acima, após sua purificação com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol. Esse produto de PCR contém a região 5' terminal a sequência para o promotor T7 proveniente do *Oligonucleotídeo* pSVJS01-ZIKV-F. Para a transcrição *in vitro* foi utilizado o kit T7 MEGAscript (Ambion), seguindo as recomendações do fornecedor. O produto da transcrição foi visualizado em gel desnaturante de agarose. Esse gel foi composto por 0,5g de agarose 1%, 5mL de tampão de corrida 10X [3-N-Morfolino-propano-ácido sulfônico (MOPS)], 40mL de água DEPC e 5mL de formalina.

5.4.3 Transfecção celular

A transfecção do RNA em células BHK-21 ocorreu através de eletroporação. Para isso, foram utilizados: 2×10^6 células BHK-21 ressuspensas em 100 μ L de cytomix (120 mM KCl, 0,15mM CaCl₂, 10mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.6, 25mM HEPES pH 7,6, 2,0mM EGTA, 5,0 mM MgCl₂), mais 2mM de ATP e 5mM de glutathiona. A eletroporação foi realizada em cuvetas de 2mm, seguindo as seguintes condições: 160V, 15 msec, 1 pulsos, 1sec (GenePulser X Cell Electroporation System).

5.4.4 Desenvolvimento da linhagem celular contendo o replicon bicistrônico repZIKVPE243-LucNeoIres

Para a seleção das células transfectadas, três dias após a eletroporação, 600 μ g/mL de geneticina (antibiótico análogo à neomicina) (Gibco) foram adicionados ao meio de cultura e as células foram acompanhadas diariamente por treze dias. Uma vez selecionadas, as células, agora denominadas BHK-21- repZIKVPE243-LucNeoIres, foram avaliadas quanto à expressão da FLuc. Para isso, 3×10^5 células foram incubadas em placa de 48 poços, durante 18 horas. Em seguida, as células foram lisadas em 80 μ L do tampão *Cell culture lysis reagent*

5X (Promega). Em seguida, 40 μ L de lisado celular foram misturados a 100 μ L de substrato para luciferase (*Luciferase Reporter Assay System*, Promega) para avaliação da atividade de FLuc. Esta, por sua vez, foi mensurada através da quantidade de luz emitida pela catalise da luciferina (substrato), realizada por FLuc. Essa luminosidade emitida foi quantificada pelo luminômetro Mitras LB940 (Berthold Technologies).

Observada a atividade positiva para o gene repórter, foi feita uma diluição seriada das células para que fosse possível isolar clones biológicos da linhagem celular. Para isso, as células foram diluídas de modo que em cada poço da placa de 96 contivesse apenas uma célula, sendo essa mantida em um volume final de 100 μ L de meio completo com geneticina 600 μ g/mL.

De posse dos clones biológicos isolados, esses foram crescidos por 20 passagens. As avaliações comparativas da atividade da FLuc foram realizadas nas passagens 10 e 20. Os ensaios foram realizados segundo as condições descritas anteriormente.

5.5 Análise estatística

Todos os ensaios de leitura da atividade do gene repórter FLuc foram realizados em triplicata e com controle negativo (células BHK-21 sem replicon). Os resultados foram expressos através do aumento da atividade da FLuc da linhagem em relação ao valor expresso pelo controle negativo. Por fim, os dados foram através do teste *T Student* pareado, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância de $p < 0,05$, através do programa *GraphPad Prism 6*.

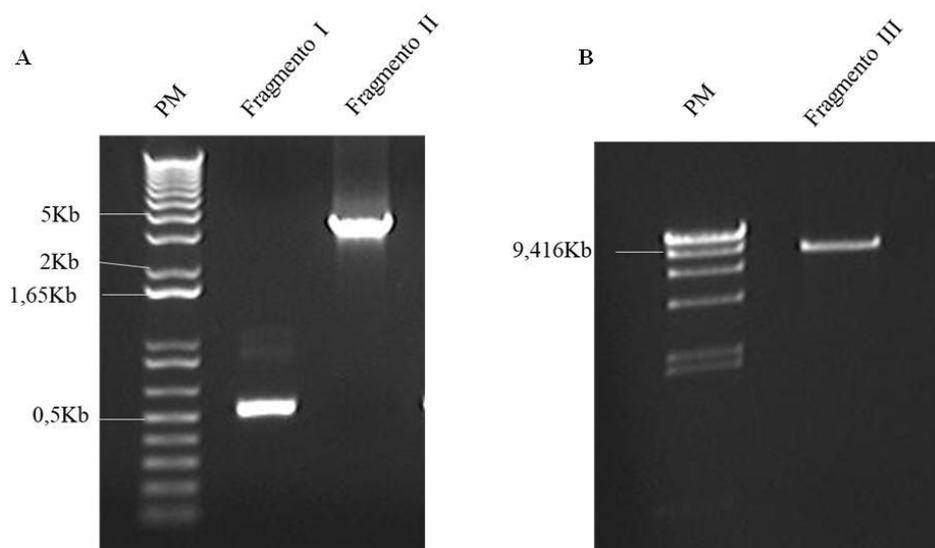
6 RESULTADOS

A seguir, são descritos os resultados obtidos no desenvolvimento do replicon biscitrônico de ZIKV, assim como a linhagem celular expressando esse subgenoma.

6.1 Amplificação dos fragmentos 1, 2 e 3 para recombinação homóloga em levedura.

Os fragmentos 1, 2 e 3, necessários para a recombinação homóloga, foram amplificados por PCR, gerando produtos de aproximadamente 0,5Kb, 3,4Kb e 8,4Kb respectivamente (Figura 12).

Figura 12 – Amplificação dos fragmentos 1, 2 e 3 do repZIKVPE243-LucNeoIres.



Fonte: A autora (2019)

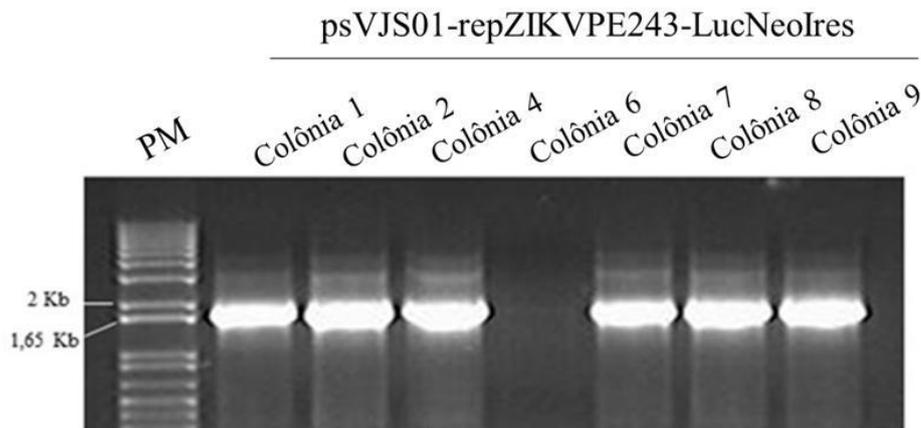
Lgenda: Na figura 12A, P.M indica o marcador molecular 1Kb *plus* DNA *Ladder* (Invitrogen) .Em seguida, estão os produtos de PCR dos fragmentos 1 e 2, com aproximadamente 0,5Kb e 3,4Kb, respectivamente . Em 12B está o produto de amplificação do fragmento 3, com aproximadamente 8,4Kb.

6.2 Confirmação da construção do plasmídeo pSVJS01-repZIKVPE243-LucNeoIres contendo o replicon repórter de ZIKV

A construção do replicon biscitrônico repórter de ZIKV foi confirmada por PCR. Essa reação resultou em um amplicon de aproximadamente 1,7Kb e confirmou os clones 1, 2, 4, 7, 8 e 9 (Figura 13). Além disso, os produtos de PCR da região do gene repórter (Figura 14A) e do EMVC (Figura 14B) visualizados no eletroferograma, representam o

sequenciamento dessas regiões. Para a região do gene repórter, houve uma homologia de 100% com sequências consenso que expressam o mesmo gene repórter, como por exemplo as construções *reporter vector* pNF κ B-Luc (AF053315.1) e *reporter vector* pSRE-Luc (AF053462.1). O mesmo foi visto para a região do EMCV, que quando alinhado com as sequências do *GenBank*, apresentou 100% de homologia com as sequências de construções cadastradas que expressam o mesmo gene. São exemplos, as construções *Yeast shuttle Vector* p316-Ires-GFP (MG833229.1) e *Cloning vector* pCDH-EF1a-mIgk-MCS-IRES-zeo (KX757248.1)

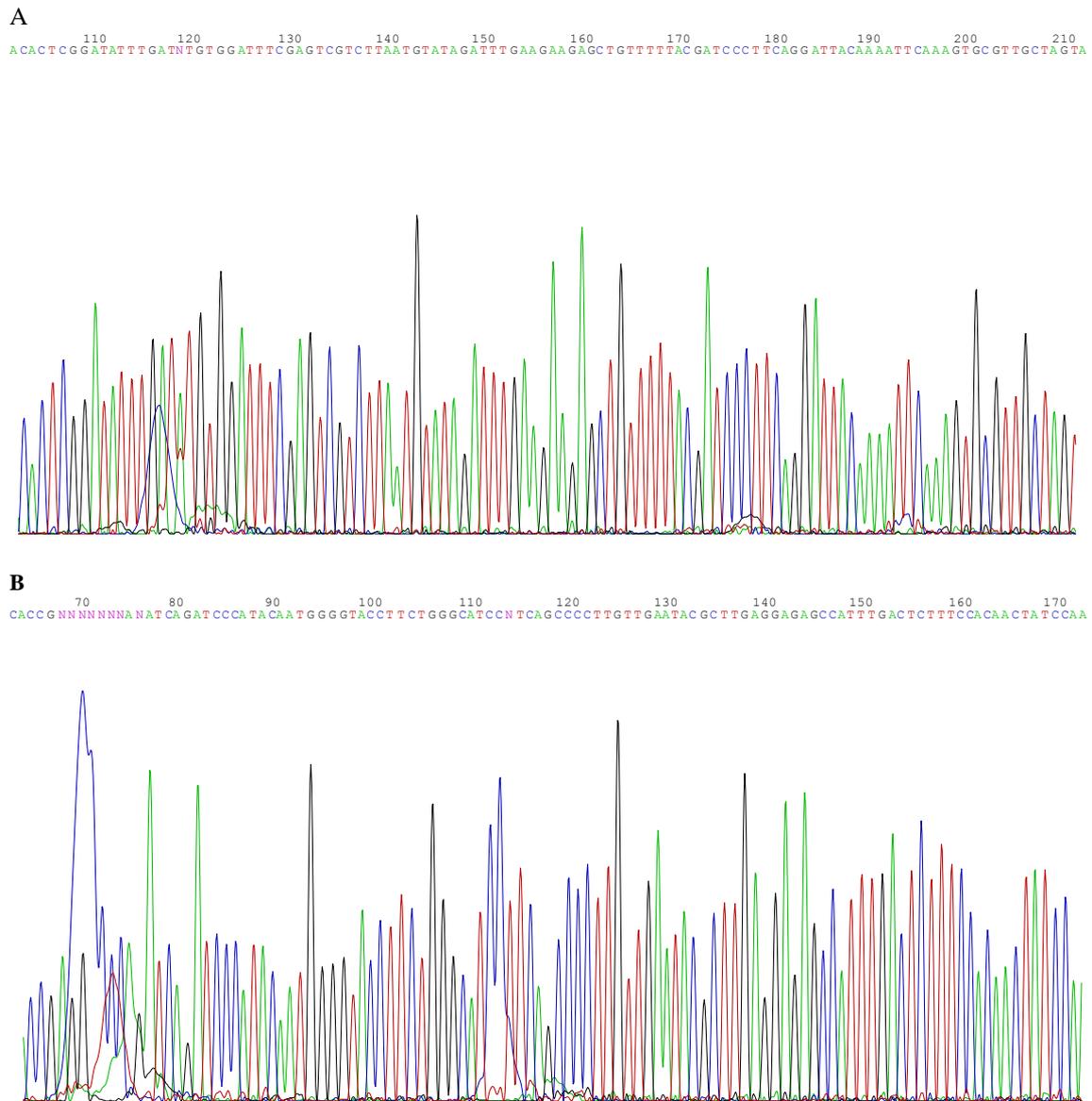
Figura 13 - Eletroforese da PCR de confirmação da clonagem.



Fonte: A autora (2019)

Legenda: Na figura estão os produtos de PCR feitos para confirmar a clonagem das construções. P.M indica o marcador molecular 1Kb *plus DNA Ladder* (Invitrogen). Foram positivos os clones psVJS01-repZIKVPE243-LucNeoIres 1, 2, 4, 7, 8 e 9 (poços 1- 3 e 5-7), com tamanho aproximado de 1,7Kb. Dentre os triados, apenas a colônia 6 (poço 4) não teve sua clonagem confirmada.

Figura 14 - Eletroferograma representativo do sequenciamento das regiões do gene repórter e do EMCV do repZIKVPE243-LucNeoIres, respectivamente.



Fonte: A autora (2019)

Legenda: Em 14A está o eletroferograma da região do gene repórter da Fluc e em 14B a representação do sequenciamento da região EMCV.

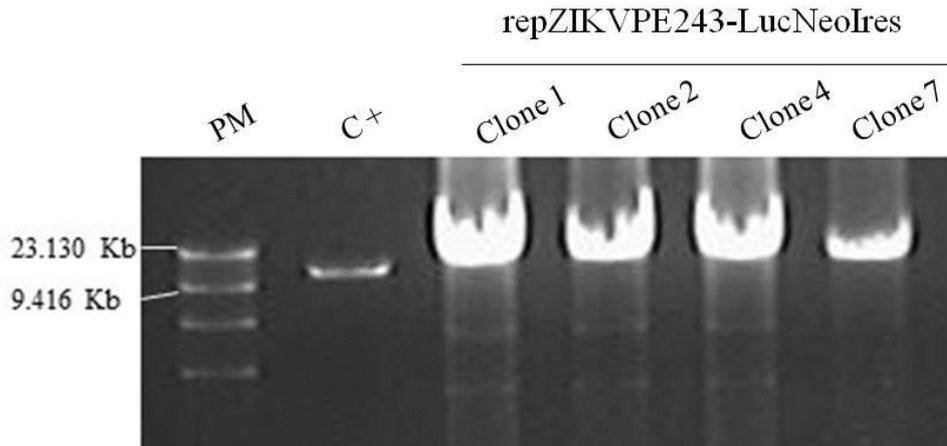
6.3 Recuperação dos replicons construídos

Após a confirmação dos clones, foi feita a amplificação do genoma dos replicons repZIKVPE243-LucNeoIres clones 1, 2, 4 e 7. Em seguida, esses amplicons foram resolvidos em gel de agarose, revelando uma banda de aproximadamente 20Kb (Figura 15A). Posteriormente, esses produtos foram purificados e utilizados como molde para transcrição *in vitro*. Os transcritos foram resolvidos em gel desnaturante de agarose (Figura 15B) e inseridos em células BHK-21 por eletroporação. Como controle positivo, utilizou-se um replicon de

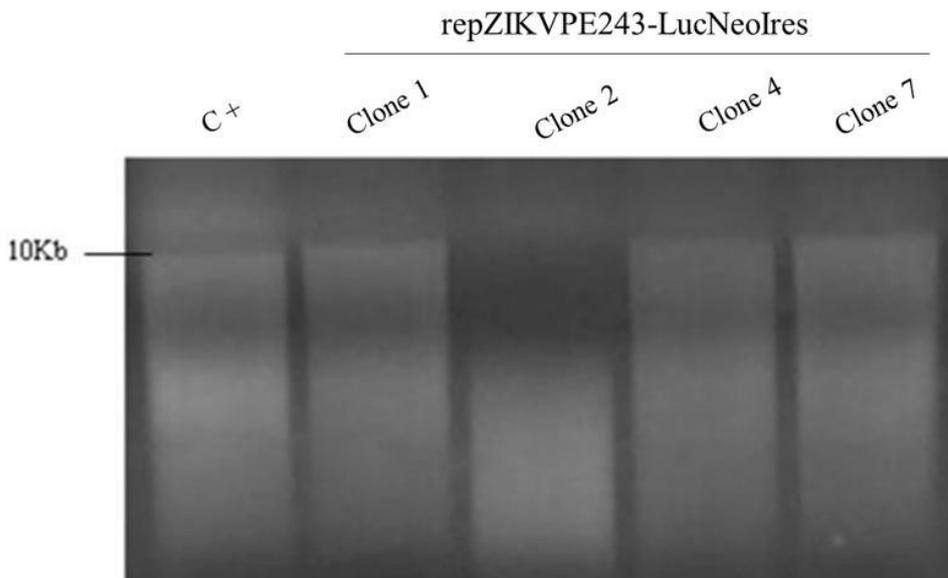
febre amarela (repYFV17D-LucNeoIRES) construído previamente no Departamento de Virologia/IAM e como controle negativo foram utilizadas células BHK-21 que não receberam RNA.

Figura 15 – Eletroforese dos produtos de amplificação e transcrição *in vitro* do replicon repZIKV-LucNeoIres

A



B



Fonte: A autora (2019).

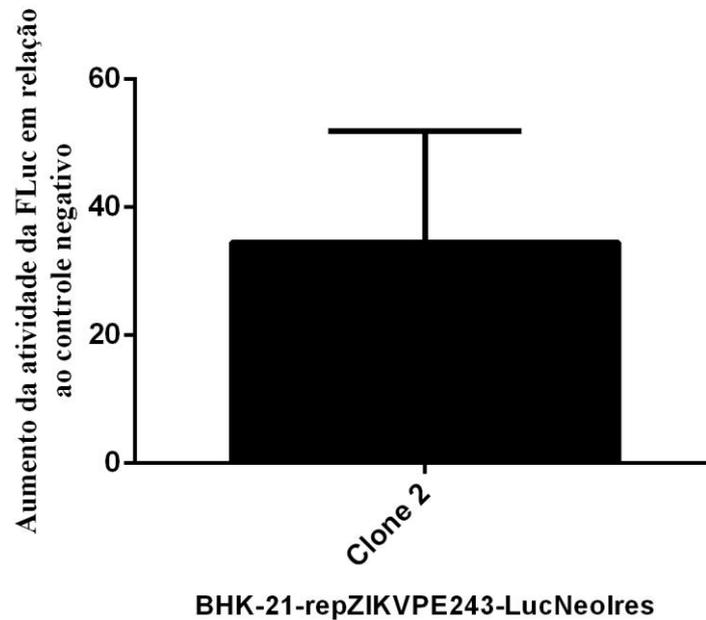
Legenda: Em 15A estão, em sequência, o peso molecular Hind III (Thermo Scientific) (PM), o produto de amplificação do controle positivo repYFV17D-LucNeoIRES (poço 1) e amplicons do replicon pSVJS01-repZIKVPE243-LucNeoIres 1, 2 4 e 7 (poços 2-5). Em 15B, os produtos de transcrição do controle positivo repYFV17D-LucNeoIRES (poço 1) e dos clones 1,2, 4 e 7 (poços 2-5) foram resolvidos em gel de agarose desnaturante com formalina.

6.4 Desenvolvimento da linhagem celular BHK-21- repZIKVPE243-LucNeoIres

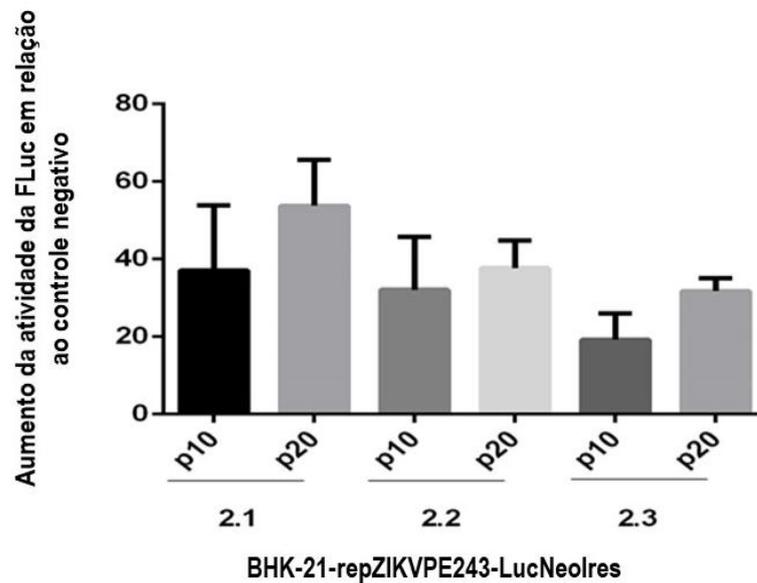
Inicialmente, foram observadas células resistentes à geneticina apenas na transfecção com o RNA do replicon repZIKVPE243-LucNeoIres clone 2. Essas células foram crescidas, estocadas e apresentaram atividade de luciferase cerca de 20 vezes em relação ao controle negativo (Figura 16A). Em seguida, as células foram submetidas à clonagem biológica por diluição limitante. Nesse processo foram obtidos três clones biológicos, os quais foram denominados de repZIKVPE243-LucNeoIres clone 2.1, repZIKVPE243-LucNeoIres clone 2.2 e repZIKV-LucNeoIres clone 2.3. A atividade da FLuc foi avaliada nesses clones entre as passagens 10 e 20. Apesar de não haver uma variação estatisticamente significativa, há um aumento na atividade entre as passagens, com um melhor desempenho do clone 2.1 em relação aos demais (Figura 16B).

Figura 16 - Atividade da luciferase dos diferentes clones biológicos celulares expressando o repZIKVPE243-LucNeoIres clone 2

A



B



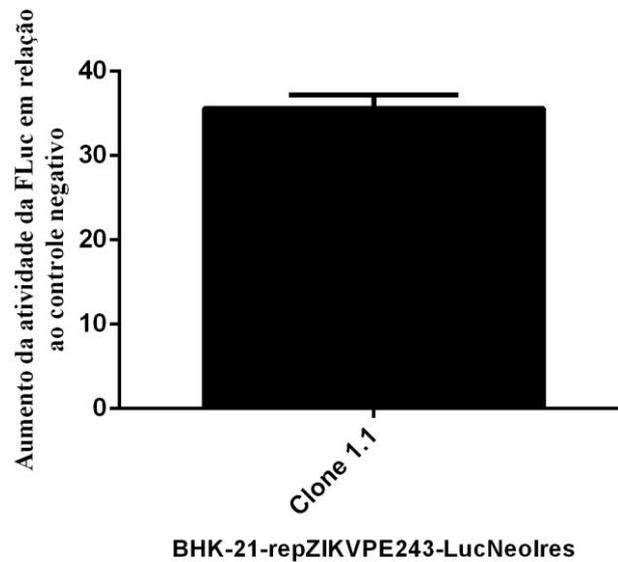
Fonte: Da autora (2019).

Em 16A esta o diagrama que representa a atividade da FLuc das células selecionadas, e que expressavam o replicon ZIKVPE243-LucNeoIres 2. Em 16B estão representadas a atividade da FLuc dos clones biológicos do repZIKVPE243-LucNeoIres 2, após a diluição limitante. No eixo das abscissas estão representadas as duas passagens testadas (p10 e p20) de clones biológicos expressando o repZIKVPE243-LucNeoIres clone 2. No eixo das ordenadas estão os valores que refletem o aumento da atividade de FLuc dos clones biológicos em relação ao controle negativo. Nenhum dos clones apresentou variação significativamente estatística entre as leituras nas passagens 10 e 20 ($p < 0,05$).

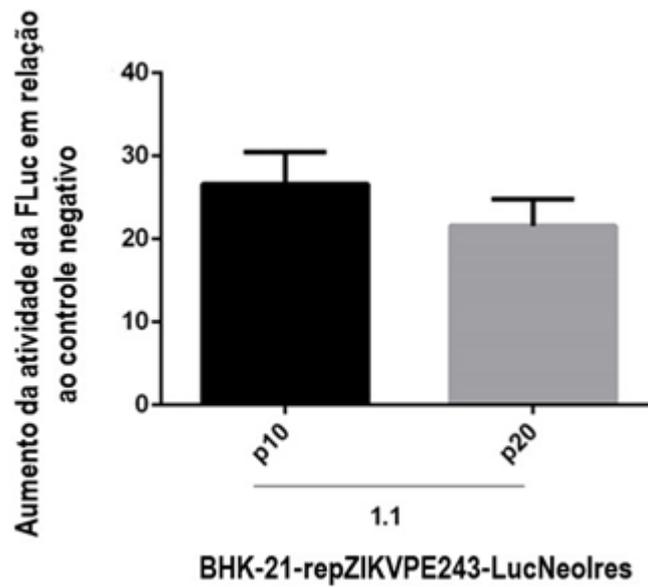
Com o intuito de obter linhagens oriundas de outros clones foi repetida a transfecção. Nesse segundo momento, o RNA dos clones 1, 2, 4 e 7 foram novamente transfectados nas células BHK-21, sob as condições já descritas nesse documento. Nessa nova tentativa, apenas o clone 1 do replicon repZIKVPE243-LucNeoIres apresentou células resistentes à seleção feita com o antibiótico. Essa cultura foi realizada em placa de cultivo celular, o que possibilitou a individualização de apenas uma colônia resistente, a qual recebeu a denominação BHK-21-repZIKVPE243-LucNeoIres 1.1. Uma vez isolado e cultivado, esse clone foi submetido à avaliação da expressão do gene da FLuc, cujo atividade foi 20 vezes maior que a leitura do controle negativo (Figura 17A). Posteriormente, avaliamos a estabilidade da expressão de luciferase da linhagem BHK-21-repZIKVPE243-LucNeoIres 1.1 que não apresentou variação estatisticamente significativa entre as passagens 10 e 20 (Figura 17B).

Figura 17 - Atividade da luciferase da linhagem celular BHK-21-repZIKVPE243-LucNeoIres clone 1.1

A



B



B

Fonte: Da autora (2019).

Em 17A esta o diagrama que representa a atividade da FLuc das células selecionadas, e que expressavam o replicon ZIKVPE243-LucNeoIres 1. Em 17B, no eixo das abscissas estão representadas as duas passagens testadas (p10 e p20) de clones biológicos expressando o repZIKVPE243-LucNeoIres clone 1.1. No eixo das ordenadas estão os valores que refletem o aumento da atividade de FLuc dos clones biológicos em relação ao controle negativo. Nenhum dos clones apresentou variação significativamente estatística entre as leituras nas passagens 10 e 20 ($p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

Os replicons ou RNA subgenômicos autoreplicativos são importantes ferramentas de genética reversa para o estudo das funções das proteínas não estruturais virais, e investigação da interação vírus-célula, além disso pode conferir mais celeridade aos estudos de triagens de drogas com possível atividade antiviral (KATO; HISHIKI, 2016b; MARTÍNEZ-SOBRIDO et al, 2018; PUIG-BASAGOITI et al., 2005; SHY, 2003). Devido a essa importância, alguns replicons repórteres já foram construídos para o ZIKV, a exemplo dos descritos por Xie et al (2016), Mutso et al (2017), Li et al (2017) Münster et al (2018). No entanto, apesar de já desenvolvidos, essas construções apresentam diferenças consideráveis em relação a nossa construção repZIKVPE243-LucNeoIRES.

Em Xie et al. (2016), foi desenvolvido, inicialmente, um replicon monocistrônico que expressava o gene repórter da RLuc. Essa construção sozinha não seria suficiente para o desenvolvimento de uma linhagem celular recombinante, pois não continha um gene de seleção, como o da neomicina. Dessa forma, para contornar essa limitação, o replicon monocistrônico foi subclonado com outro fragmento, esse apresentando a sequência IRES e o gene de resistência à neomicina (XIE et al, 2016). Em contrapartida, e de maneira mais simples, o repZIKVPE243-LucNeoIRES foi desenvolvido com apenas uma construção, a qual apresenta originalmente dois cístrons, um abrigando a sequência do gene repórter e do gene de seleção ao antibiótico e o outro responsável pela expressão das proteínas não estruturais do ZIKV. Além disso, por ter sido obtida em *E. coli*, a construção de Xie et al (2016) foi conseguida por sucessivas etapas de digestões e ligação *in vitro*, ao passo que nosso sistema foi desenvolvido em apenas uma única etapa de clonagem *in vivo*, apresentando como vantagens o reduzido tempo e insumos necessários ao processo.

Mutso et al. (2017) também desenvolveu um replicon monocistrônico para o ZIKV, mas expressando o gene repórter GLuc. Semelhante às demais construções e diferentemente do repZIKVPE243-LucNeoIRES, o subgenoma de Mutso et al. também foi clonado em bactéria, através de sucessivas digestões e etapas de ligação. Essa construção, no entanto, não foi utilizada para o desenvolvimento de uma linhagem celular, sendo avaliada apenas sua capacidade de replicação transiente em células Vero, BHK-21 e C6/36 (MUTSO et al., 2017).

Quanto ao replicon elaborado por Li et al (2017), a principal diferença em relação a nossa construção foi a grande quantidade de subclonagens que os autores fizeram para obter a construção final. A construção de Li et al. (2017) foi obtida a partir de quatro fragmentos que foram subfragmentados para em seguida serem ligados em múltiplos ciclos de digestão e

subclonagem. Porém, de maneira semelhante ao repZIKVPE243-LucNeoIRes, o replicon de Li et al (2017) também foi bicistrônico, diferindo apenas em relação a marca de seleção e o gene repórter utilizado. A marca de seleção utilizada para repZIKVPE243-LucNeoIRes garante resistência à neomicina e nosso gene repórter é a FLuc, enquanto que Li et al. (2017) usaram puromicina para selecionarem as células transfectadas e a RLuc como gene repórter.

Diferentemente dos exemplos anteriores, Münster et al. (2018) desenvolveram um replicon biscistrônico para o ZIKV baseado no silenciamento das sequências crípticas preditas *in silico*. Essa estratégia visou solucionar o problema da instabilidade da clonagem de alguns genomas de flavivírus. Grande parte dessas sequências estavam localizadas nas proteínas estruturais virais e em minoria na NS1 (MUNSTER et al, 2018). Por outro lado, o repZIKVPE243-LucNeoIRes demonstrou uma expressão estável em células, sem a necessidade da edição dessas sequências.

Ainda a respeito das diferenças entre as sequências gênicas e as estratégias de construção dos replicons de ZIKV encontrados na literatura e o subgenoma por nós relatado, estão as sequências virais que foram mantidas ou adicionadas nas construções. Em todas as construções já referidas estão presentes a sequência da protease 2A do vírus da febre aftosa (*Foot-and-mouth disease virus*, FMDV) para auxiliar na clivagem da poliproteína dos replicons durante o processo de replicação e tradução do subgenoma (XIE et al, 2016; LI et al, 2018; MUNSTER et al, 2018). Alternativamente à protease 2A, em nosso replicon foi adicionado a sequência da ubiquitina entre os sítios do gene repórter e da marca de seleção à neomicina.

Assim como a nossa construção, os replicons desenvolvidos por Xie et al (2016) e Li et al (2018) também foram utilizados para o desenvolvimento de linhagens que expressam o replicon. Nesse aspecto, a avaliação da estabilidade da replicação desses subgenomas nas células é um ponto extremamente relevante para as suas futuras aplicações. Para isso, os grupos já referidos utilizaram a leitura transiente (entre 24 e 72 horas após a transfecção) (XIE et al, 2016; LI et al, 2018) da atividade do gene repórter e a leitura feita passagens após o estabelecimento da linhagem celular (XIE et al, 2016; LI et al, 2018).

A expressão do gene repórter da linhagem desenvolvida por Xie e seus colaboradores (2016) foi avaliada até a sexta passagem, enquanto que a estabilidade do replicon construído por Li et al (2018) foi avaliada até a trigésima passagem. No entanto, o primeiro não relata detalhadamente a expressão do subgenoma ao longo do cultivo célula. Além disso, a estabilidade foi avaliada até uma passagem relativamente baixa. Enquanto que Li et al. (2018), apesar de ter estendido sua avaliação de estabilidade até a trigésima passagem, o seu

replicon apresentou considerável estabilidade até a vigésima passagem. Nosso replicon, o rep-ZIKVPE243-LucNeoIres, foi avaliado até a vigésima passagem. Em p20, a atividade do gene repórter de nossa linhagem foi comparável à apresentada na passagem 10, confirmando assim a estabilidade da expressão do replicon.

Para além das comparações realizadas entre a nossa construção e aquelas referidas na literatura, um elemento diferente entre o nosso replicon e os demais é a cepa utilizada. A cepa que utilizamos foi a isolada no estado de Pernambuco, no ano de 2015, a ZIKVPE243. Dentre as construções referidas, apenas aquelas desenvolvidas por Mutso et al. (2017) e Münster et al. (2018) utilizaram uma cepa brasileira, isoladas no período epidêmico (BeH819015), cuja poliproteína difere em seis nucleotídeos da cepa utilizada em nossos estudos (MUTSO et al., 2017; MÜNSTER et al., 2018). Apesar desses autores utilizarem uma cepa do Brasil, isolada no período epidêmico, nenhuma instituição nacional possui um replicon para o ZIKV ou uma linhagem celular que expresse essa ferramenta.

Por fim, a funcionalidade da construção repZIKVPE243-LucNeoIres, bem como de sua expressão estável na linhagem celular BHK-21-repZIKVPE243-LucNeoIres, fazem desse replicon uma ferramenta em potencial para futuros estudos sobre o ZIKV, podendo, futuramente, contribuir para o desenvolvimento de vacinas, triagem de drogas com possível atividade antiviral e em estudos de virologia molecular

8 CONCLUSÃO

- a) Nós reportamos a construção bem-sucedida do replicon repZIKVPE243-LucNeoIres, o qual expressa o gene repórter FLuc. O subgenoma foi obtido através da técnica de recombinação homóloga em levedura, sendo a primeira manipulação genética do ZIKVPE243, a primeira do ZIKV feita em levedura e a primeira construção de genética reversa para o vírus feita em nosso país;
- b) A linhagem celular BHK-21-repZIKVPE243-LucNeoIres, obtida pela transfecção do replicon repZIKVPE243-LucNeoIres, expressou de forma constante o gene repórter FLuc ao longo de 20 passagens, confirmando a estabilidade do nosso sistema de genética reversa.

9 PERSPECTIVAS

- a) Usar a linhagem celular BHK-21-repZIKVPE243-LucNeoIres para a triagem em larga escala de candidatos naturais e sintéticos com atividade anti-ZIKV;
- b) Usar a linhagem celular BHK-21-repZIKVPE243-LucNeoIres para estudos sobre função das proteínas não estruturais do ZIKV e interação vírus-célula.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, K. et al. The emergence of zika virus a narrative review. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 165, n. 3, p. 175–183, 2016.
- ARENHART, S. et al. Use of homologous recombination in yeast to create chimeric bovine viral diarrhoea virus cDNA clones. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 993–999, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5052387/pdf/main.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2018.
- AUBRY, F. et al. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 114, p. 67–85, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.12.007>>.
- BALMASEDA, A. et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 114, n. 31, p. 8384–8389, 2017.
- BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro surveillance**, Stockholm, v. 19, n. 13, 2014.
- BLITVICH, B. et al. A review of flaviviruses that have no known arthropod vector. **Viruses**, v. 9, n. 6, p. 1–25, 2017.
- BOORMAN, J. P.T. e PORTERFIELD, J. S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses transmission of Zika virus. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 238–242, 1956.
- BOYER, J. C; HAENNI, A.L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. **Virology**, New York, v.198, n.2, p. 415–426, 1994.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: Ministério da Saúde, v. 46, n. 46, dez. 2015.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Situação Epidemiológica da infecção pelo vírus Zika no Brasil, de 2015 a 2017, v. 49, nº 47. Dezembro, 2018. (a)
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48 de 2018, v. 49, nº 57. Dezembro, 2018. (b)
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 45 de 2018, v. 49 nº54. Dezembro, 2018. (c)
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Saúde Brasil 2015/2016**. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS**. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2017.
- BROWN, W Clay et al. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. **Nature structural and molecular biology**, New York, v. 23, n. 9, p. 865–867, 2016.
- CHANG, Christopher et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, London, v. 68, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.02.006>>.
- COSTELLO, Anthony et al. Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 94, n. 6, p. 406–406A, 2016.
- COX, M.M, DOUDNA, J.A, O'DONNELL, M. Recombinação Homóloga e reparo de DNA. in *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas*. Porto Alegre: Artmed, 2012. p.445–480.

- CUMBERWORTH, Stephanie L et al. Inhibition of type I interferon induction and signalling by mosquito borne flaviviruses. **Cellular microbiology**, Oxford, v.19, n. 5 February, p. 1–8, 2017.
- DICK, G. W.A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DOWD, K.A. Rapid Development of a DNA Vaccine for Zika virus. **Science**, New York, v. 14, n.354, 2016.
- FAJARDO, A. et al. Emergence and spreading potential of zika virus. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. OCT, p. 1–8, 2016.
- FINK, S. L. et al. The Antiviral Drug Arbidol Inhibits Zika Virus. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 2–10, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-27224-4>>.
- GUALANO, R.C. et al. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. **The Journal of general virology**, London, n. 1998, p. 437–446, 2019.
- HASAN, S. S. et al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural e Molecular Biology**, New York, v. 25, n. 1, p. 13–20, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41594-017-0010-8>>.
- HAVIERNIK, J. et al. Arbidol (Umifenovir): A broad-spectrum antiviral drug that inhibits medically important arthropod-borne flaviviruses. **Viruses**, Basel, v. 10, n. 4, p. 1–8, 2018.
- HE, Q. et al. HHS Public Access. **Clin Psychol Rev.**, v. 33, n. 4, p. 395–401, 2015.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Taxonomy, *Flaviviridae*, *Flavivirus*. Disponível em <<https://talk.International Committee on Taxonomy of Virusesonline.org/taxonomy/>>. Acessado em 07 de fevereiro de 2019.
- JAIN, R. et al. Structure of the NS3 helicase from Zika virus. **Nature structural & molecular biology**, New York, v. 23, n. 8, p. 752–754, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3258>>.
- JAVED, F. Zika virus : what we need to know ? **Journal of basic microbiology**, Berlin, v.58, n.1, September, 2017.
- JONES, C.T. et al Construction and applications of yellow fever virus replicons. **Virology**, New York, v. 331, n. 2, p. 247–259, 2005.
- JOSKA, T.M. et al. A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 46–51, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2013.11.013>>.
- JURADO, K. Ann. et al. Zika virus productively infects primary human placenta-specific macrophages. **Journal of clinical investigation insight**, Ann Arbor, v. 1, n. 13, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<https://insight.jci.org/articles/view/88461>>.
- KASSAR, T. C. et al. Construction and characterization of a recombinant yellow fever virus stably expressing Gaussia luciferase. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3 Suppl, p. 2119-2130, 2017.
- KATO, Fumihiko e HISHIKI, Takayuki. Dengue virus reporter replicon is a valuable tool for antiviral drug discovery and analysis of virus replication mechanisms. **Viruses**, Basel, v. 8, n. 5, p. 1–11, 2016a.
- LAURENT-ROLLE, M. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 24, p. 14333–14338, 2003.
- LEUNG, J.Y. et al. Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. **Journal of virology**, Baltimore, v. 82, n. 10, p. 4731–4741, 2008.
- LI, J.Q. et al . Development of a replicon cell line-based high throughput antiviral assay for

- screening inhibitors of Zika virus. **Antiviral Research**, Amsterdam v. 150, n. November 2017, p. 148–154, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354217305570>>.
- LI, L. et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: Structure and maturation. **Science**, Amsterdam, v. 319, n. 5871, p. 1830–1834, 2008.
- LI, W. et al. West Nile virus infectious replicon particles generated using a packaging-restricted cell line is a safe reporter system. **Scientific reports**, London, v.7, n.1, p. 1–10, 2017.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae. In: KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter. **Fields virology**. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 712-746.
- LIU, L. et al. Flavivirus RNA cap methyltransferase: Structure, function, and inhibition. **Frontiers of Biology**, Beijing v. 5, n. 4, p. 286–303, 2010.
- LUO, D. et al. The flavivirus NS2B – NS3 protease – helicase as a target for antiviral drug development. **Antiviral research**, Amsterdam, v. 118, n. September 2005, p. 148–158, 2015.
- LOWE, R. et al. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 15, n. 1, p. 96, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/15/1/96>>.
- MACNAMARA FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, n. 48, p. 139–145 1954. Disponível em <[http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1)>
- MARCHETTE N.J et al. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, n.18, p.411–415, 1969.
- MARTÍNEZ DE SALAZAR, P. et al. Zika fever. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 34, n. 4, p. 247–252, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.016>>.
- MARTÍNEZ-SOBRIDO, L. et al. Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus. **Viruses**, Basel, v. 10, n 597, 2018.
- MASMEJAN, S. et al. Zika virus, vaccines, and antiviral strategies. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 16, n. 6, p. 471–483, 2018.
- MISHRA, M, et al. Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **mBio**. Washington, p. 1–16, [S.d.].
- MOST, R.G. et al. Mutagenesis of the RGD Motif in the Yellow Fever Virus 17D Envelope Protein. **Virology**, New York, v. 95, p. 83–95, 1999.
- MUKHOPADHYAY, S. et al. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, London, . [S.l: s.n.], 2005.
- MULLER, D. A. et al. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 192–208, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.National Institutes of Health.gov/pubmed/23523765>>.
- MÜNSTER, M. et al. A Reverse Genetics System for Zika Virus Based on a Simple Molecular Cloning Strategy. **Viruses**, Basel, n. 2007, p. 1–17, [S.d.].
- MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.
- MUTSO, M. et al. Reverse genetic system, genetically stable reporter viruses and packaged subgenomic replicon based on a Brazilian Zika virus isolate. **The Journal of general virology**, London, p. 2712–2724, 2017.

- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (Estados Unidos). **Zikv Vaccines**. Disponível em: <<https://www.niaid.NationalInstitutesofHealth.gov/diseases-conditions/zika-vaccines>>. Acessado em: 4 jan. 2019.
- NOOR, R; AHMED, T. Zika virus : Epidemiological study and its association with public health risk. **Journal of Infection and Public Health, Oxford**, v. 11, n. 5, p. 611–616, 2018.
- NUNES, M. et al . Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 3, p. 230–240, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2016.02.009>>.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report , French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice ,. v. 1, n. December 2013, p. 7–9, 2014.
- OLIVEIRA, E. et al. The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. **Virus Research**, Amsterdam, v. 227, p. 115–123, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.005>>.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Disease outbreak news 2017. Disponível em: <https://www.who.int/csr/don/archive/year/2017/en/>
- PANG, X. et al. Development of Dengue virus type 2 replicons capable of prolonged expression in host cells. **BMC Microbiology**, London, v. 1, p. 1–7, 2001.
- PICONNE, M. E. & FLORES, E. F. Replicação de vírus de RNA. *Virologia Veterinária*. Santa Maria, 2007. P. 165-188.
- PLOURDE, A.R. et al. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.
- PU, S. et al. Successful Propagation of Flavivirus Infectious cDNAs by a Novel Method To Reduce the Cryptic Bacterial Promoter Activity of Virus Genomes. **Journal of virology**, Baltimore, v. 85, n. 6, p. 2927–2941, 2011.
- PUIG-BASAGOITI, F, et al. High-Throughput Assays Using a Luciferase-Expressing Replicon, Virus-Like Particles, and Full-Length Virus for West Nile Virus Drug Discovery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n.12, 2005.
- RASTOGI, M. et al. NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, London, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>>.
- SAMPATH, A; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Research**, Amsterdam. [S.l.: s.n.]. , 2009
- SAMPATHKUMAR, P. et al. Zika Virus in the Americas: A Review for Clinicians. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v. 91, n. 4, p. 514–521, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.02.017>>.
- SANTOS, Jefferson José da Silva e colab. Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 8, p. 983–991, 2013.
- SHAN, C et al . An infectious cDNA clone of Zika virus to study viral virulence, mosquito transmission, and antiviral inhibitors. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v.19, 891–900, 2016.
- SHI, et al. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 20, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009>>.
- SILVA Jr., J. V. J. **Genética reversa de arbovírus: chikungunya, febre amarela e dengue**. 2018. Tese (Doutorado em Biociência e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.
- SIMMONDS, P. et al. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES Virus Taxonomy Profile : Flaviviridae. p. 2–3, 2017.
- STOBART, C. C; MOORE, M.L. RNA Virus Reverse Genetics and Vaccine Design. **Viruses**,

Basel, p. 2531–2550, 2014.

STRAUSS, J.H; STRAUSS, E.G. *Viruses and Human Disease*. **Academic Press**, San Diego, 2002.

SUMIYOSHI, H. et al. Characterization of a Highly Attenuated Japanese Encephalitis Virus Generated from Molecularly Cloned cDNA. **The Journal of infectious diseases**, Oxford, p. 1144–1151, [S.d.].

SUZUKI, R. et al. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1 : Characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology**, New York, v. 362, p. 374–383, 2007.

TAO, W. et al. Novel Stable Ebola Virus Minigenome Replicon Reveals Remarkable Stability of the Viral Genome. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 91, n. 22, p. JVI.01316-17, 2017. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.01316-17>>.

TUISKUNEN BÄCK, A; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses – an overview. **Infection Ecology Epidemiology**, Stockholm, v. 3, n. 1, p. 19839, 2013. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/iee.v3i0.19839>>.

XIE, X. et al. Zika Virus Replicons for Drug Discovery. **EBioMedicine**, Amsterdam, v. 12, p. 156–160, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.013>>.

ZOU, J. et al. Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. **Journal of virology**, Baltimore, v. 89, n. 7, p. 3455–3470, 2015.

WANG, A. et al. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging Microbes e Infections**, New York, v. 6, n. 3, p. e13, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/emi.2016.141>>.

WANG, B. et al. Structure and function of Zika virus NS5 protein : perspectives for drug design. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 75, n. 10, p. 1723–1736, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2751-x>>.

WANG, Z. et al. Zika virus and Zika fever. **Virológica Sinica**, Beijing, v. 31, n. 2, p. 103–109, 2016.

WOERZ, I. et al. Hepatitis C virus replicons: Dinosaurs still in business? **Journal of Viral Hepatitis**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2009.

YAMSHCHIKOV, V.F. et al. An Infectious Clone of the West Nile Flavivirus. **Virology**, Baltimore, v. 304, p. 294–304, 2001.

YOUN, H. et al. Reporter gene imaging. **American Journal of Roentgenology**, Springfield, v. 201, n. 2, p. 206–215, 2013.

YUN, S. et al. Development and Application of a Reverse Genetics System for Japanese Encephalitis Virus. **Journal of virology**, Baltimore, v. 77, n. 11, p. 6450–6465, 2003.

YUN, S. et al. Zika virus: An emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 55, n. 3, p. 204–219, 2017.

