

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE

Fiocruz Amazônia

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO – PPGBIO-INTERAÇÃO

Evolução *in vitro* do vírus Zika

KARINA PINHEIRO PESSOA

MANAUS – AM

2019

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO – PPGBIO-INTERAÇÃO

KARINA PINHEIRO PESSOA

Evolução *in vitro* do vírus Zika

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

ORIENTADOR: Dr. Felipe Gomes Naveca

MANAUS – AM

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

P475e

Pessoa, Karina Pinheiro

Evolução in Vitro do vírus Zika. / Karina Pinheiro Pessoa. –
Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

78 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-
Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca.

1. Zika vírus 2. Arbovírus I. Título

CDU 578:616.988 (043.3)

CDD 579.2562

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – CRB-11/ 287

KARINA PINHEIRO PESSOA

Evolução *in vitro* do vírus Zika

Dissertação de Mestrado
submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia da Interação
Patógeno Hospedeiro, como requisito
parcial e obrigatório para a obtenção do
título de Mestre em Ciências, área de
concentração em Biologia da Interação
Patógeno- Hospedeiro.

Dr. Felipe Gomes Naveca – Orientador

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Dra. Cláudia Maria Rios Velásquez – membro interno

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Dr. Fernando Lucas Melo – membro externo

Universidade de Brasília - UnB

*Dedico este trabalho às pessoas que tiveram suas vidas
afetadas pelas complicações causadas por esse vírus.
Conhecer a biologia básica desses patógenos
nos deixa mais próximo de combater-los.*

***“Se você quiser,
Se você se esforçar,
Se você treinar,
Se você entrar de cabeça,
Se você se concentrar...***

Nada garante que você vai conseguir. ”

(Daniel Furlan vulgo Craque Daniel, no quadro Falha de Cobertura, TVquase, 2018).

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser a base de tudo.

Aos meus pais Marco e Leonor, por terem tão pouca instrução, mas ainda assim me ensinarem tudo que eu preciso e principalmente, por compreenderem a minha ausência em datas importantes.

Aos meus irmãos Wallace e Karla, pelas caronas, lanches e todo cuidado que sempre tiveram comigo desde quando esperavam um irmãozinho na barriga da minha mãe, mas acabou sendo eu.

A minha irmã e meu cunhado Roberto, obrigada por uma das maiores alegrias da minha vida, meus sobrinhos. José, como é bom aprender contigo e te ver crescer. Minha vida é mais leve graças a você. Laura, nossa emancipação que está a caminho, estamos ansiosos para te conhecer!

Ao meu orientador Dr. Felipe Naveca, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa e toda a orientação desde a iniciação científica. Por arquivar as análises desse estudo como "Karina_mosquito" e "Karina_fitness", isso me fez rir em momentos de tensão. Brincadeiras à parte, sou muito grata por todas as oportunidades e ensinamentos, Professor.

Ao grupo de pesquisa da virologia: Valdinete Alves, Dana Monteiro, Camila Duarte, Arlesson Vianna, Victor Souza e André Corado, por todo apoio dentro e fora do laboratório. Em especial a Valdinete, que é tudo para mim, como sempre costumo brincar. Me instruiu em vários aspectos nessa pesquisa, sempre será um exemplo de generosidade e de profissionalismo. A Dana Monteiro, por ser sempre prestativa e uma ótima companhia. A Camila que se tornou uma grande amiga na reta final, sendo apoio pessoal e também na hora das extrações com Trizol. Ao Victor Souza pela ajuda com a parte do sequenciamento e ser companhia em festivais. Ao Arlesson Viana, que foi um incentivador no começo. Deixo aqui meu agradecimento a todos vocês.

Aos meus colegas da turma do PPG-BIOINTERAÇÃO pelos momentos de risos de nervoso durante as disciplinas. Em especial, a minha amiga que se tornou pessoal, Juliana, obrigada por todo apoio.

A gerente de laboratório Michele, que sempre esteve disponível para resolução de problemas no laboratório, foi incontáveis as vezes que precisei e também incontáveis as que esteve disponível. Muito obrigada.

Ao laboratório de Entomologia pela parceria e orientação na parte dos experimentos com mosquitos, em especial a Dra. Cláudia Rios e ao Doutorando Jordam por todo apoio e por doar até o próprio sangue para esse experimento, muito obrigada.

A SECA, em especial Renata e Rose que nem se eu quisesse, me deixariam esquecer de entregar algum documento, obrigada por sempre me reiterar de tudo em menos de 24 horas de atraso. A Marizete, por toda atenção, pelos lanches e bombons fornecidos. O açúcar que me deu energia na hora que não aguentava mais foi essencial para tudo. Obrigada meninas!

Aos professores doutores do PPG-BIOINTERAÇÃO que me trouxeram mais conhecimento ao longo das disciplinas.

A professora Tati Amabile, por todos os ensinamentos durante o estágio à docência na Faculdade Estácio. Foi uma grande incentivadora na graduação, para chegar nesse segundo degrau da vida acadêmica. Sou muito grata.

Ao programa PPG-BIOINTERAÇÃO pela oportunidade de fazer parte desse mundo agridoce da pós-graduação.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane Fiocruz Amazônia, pela estrutura que possibilitaram a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro.

As minhas amigas, Jomara e Geysy, que bem enfrentam essa relação abusiva de 15 anos sendo colado em momentos de puro desespero sem fundamento. As relações mais longa que tenho com alguém que não envolve dinheiro ou laços sanguíneos. Aprecio nossa dedicação para isso vir dando certo.

Aos podcasts, sem eles nada seria nas horas que passei no ônibus. *Respondendo em voz alta, É Nóia minha, Más Feministas, Dragões de Garagem, BBVA, Mamilos, Imagina, The office ladies e Projeto Humanos*. Sou uma pessoa mais crisada e ao mesmo tempo melhor graças a esses programas.

A toda discografia do Radiohead, que me acompanhou ao longo desses dois anos nas alegrias e tristezas, contem comigo para tudo.

Reiterar meu agradecimento a todas as mulheres com que convivi no Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia, que foram exemplo de fazer seus trabalhos com excelência: Valdinete Alves, Dana Monteiro, Camila Duarte, Juliana Leal, Priscila Aquino, Sthefane Lopes, Cláudia Rios, Dona Beth, Marizete, Renata Magalhães e Rose. Vocês são incríveis!

Agradecer a mim, pela coragem de defender em pleno retorno da última temporada de *Game of Thrones*. Acredito fielmente que aguardarei a defesa para assistir a casa *Targaryen* e *Stark* triunfar sobre os caminantes brancos.

E por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho, obrigada!

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus da família *Flaviviridae* gênero *Flavivirus* com genoma composto por uma fita única de RNA de polaridade positiva. Assim como os demais vírus RNA, exibe variações em suas sequências, o que ocorre devido a fatores, como por exemplo, a falta de atividade de correção da polimerase viral e a alta taxa de replicação. Considerando que a ocorrência de mutações é um evento que pode levar a seleção de variantes virais com *fitness* alterado, este trabalho teve como objetivo avaliar a evolução *in vitro* do vírus Zika, analisando as mutações ocorridas durante o processo de adaptação em cultura células, associadas ao aumento ou diminuição da competência viral (*viral fitness*). Uma amostra positiva para ZIKV denominada 0305JFMB, foi isolada em células de *Aedes albopictus* C6/36, e utilizada para processo de adaptação em cultura de células C6/36, sendo realizadas 33 passagens em replicatas. Finalizadas as passagens, foi realizada a extração do RNA viral e o cDNA foi produzido utilizando iniciadores randômicos. O genoma completo da amostra 0305JFMB direto do plasma e das passagens P1, P33.1, P33.2, foi obtido pelo método Sanger utilizando sequenciador automático ABI 3130. Os dados do sequenciamento foram analisados utilizando o software *Geneious*, e mostrou que no decorrer das passagens ocorreram 7 mutações nas regiões que codificam para as proteínas não estruturais: uma mutação sinônima em NS1; uma mutação sinônima em NS2A; uma mutação sinônima em NS3; 4 mutações não sinônimas, duas na região que codifica para proteína NS3 e duas mutações na região que codifica para NS5. Para avaliar o impacto das mutações observadas sobre a competência viral, as passagens P1 e P33 foram tituladas através de um ensaio de RT-qPCR utilizando o método $\Delta\Delta Ct$, realizado em triplicatas técnicas. Posteriormente foram realizados os ensaios para avaliação da competência viral *in vitro* (C6/36) e *in vivo* (*Aedes aegypti*). Em C6/36 foi avaliado o número de cópias de RNA viral presente tanto no sobrenadante de células infectadas quanto no interior das células. Os resultados mostraram um aumento significativo do número de cópias de RNA viral nas células infectadas com P33 no período de 72 horas pós infecção. A carga viral avaliada nos tempos (8 e 12 dias) no experimento *in vivo* em *Aedes aegypti* em ambos os tempos a carga viral relativa de P33 foi inferior à de P1. Nossos resultados sugerem que novos estudos devem ser realizados para confirmar os impactos das mutações observadas em outros sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro*, visto que as proteínas de ZIKV podem influenciar a forma que os componentes virais interagem com a célula hospedeira e, assim, podem modular sua infectividade em diferentes substratos celulares.

Palavras Chave: Arbovírus, Zika, Evolução, Genômica, Competência Viral

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus of the family Flaviviridae genus Flavivirus with a genome composed of a single RNA strip of positive polarity. Like other RNA viruses, it exhibits variations in its sequences, which occurs due to factors such as the lack of viral polymerase correction activity and the high replication rate. Considering that the occurrence of mutations is an event that may lead to the selection of viral variants with altered fitness, this work aimed to evaluate the *in vitro* evolution of the Zika virus, analyzing the mutations occurred during the adaptation process in culture cells, associated with increased or decreased viral competence (viral fitness). A positive sample for ZIKV named 0305JFMB was isolated in *Aedes albopictus* C6/36 cells and used for adaptation in culture of C6 / 36 cells, with 33 passages in replicates. After completion of the passages, the viral RNA was extracted and the cDNA was produced using random primers. The complete genome of the 0305JFMB sample from the plasma and passages P1, P30.1, P30.2, P33.1, P33.2, was obtained by the Sanger method using ABI 3130 automatic sequencer. Sequencing data were analyzed using the Geneious software, and showed that during the passages 7 mutations occurred in the regions coding for -structural proteins: a synonymous mutation in NS1, a synonymous mutation in NS2A, a synonymous mutation in NS3 and in NS5 a non-synonymous. To evaluate the impact of observed mutations on viral competence, passages P1 and P33 were titrated through an RT-qPCR assay using the $\Delta\Delta C_t$ method, performed in technical triplicates. Subsequently, the tests were carried out to evaluate *in vitro* viral competence (C6/36) and *in vivo* (*Aedes aegypti*). In C6/36 the number of copies of viral RNA present in both the supernatant of infected cells and inside the cells was evaluated. The results showed a significant increase in the number of copies of viral RNA in the cells infected with P33 within 72 hours post infection. The viral load evaluated at the times (8 and 12 days) in the *in vivo* experiment in *Aedes aegypti* at both times, the relative viral load of P33 was lower than that of P1. Our results suggest that further studies should be conducted to confirm the impacts of mutations observed in other biological systems *in vivo* and *in vitro*, since ZIKV proteins can influence the way that viral components interact with the host cell and can modulate its infectivity in different cell substrates.

Keywords: Arbovirus, Zika, Evolution, Genomics, Viral *fitness*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Histórico	20
2.2 Transmissão	22
2.3 Vírus Zika	24
2.4 Organização genômica	25
2.5 Replicação viral	28
2.7 Competência Viral (<i>Fitness</i>)	31
2.8 Cultura de Células para Zika	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
3. METODOLOGIA	35
3.1 Aspectos Éticos	35
3.2 Amostra utilizada no estudo	36
3.3 Cultura de Células	36
3.4 Adaptação do vírus em cultura de células	37
3.5 Extração de RNA viral	38
3.6 RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	39
4.7 Produção de cDNA	40
4.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	41
4.9 Purificação por Polietilenoglicol (PEG)	43
4.10 Sequenciamento do genoma viral por eletroforese capilar	43
4.11 Avaliação da competência viral (<i>fitness</i>)	45
4.11.1 <i>in vitro</i>	46
4.11. 2 <i>in vivo</i>	47
4.11.2.1 Maceração dos mosquitos	48
4.11.2.2 Extração de RNA dos mosquitos macerados	49
4.12 Análises dos dados	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Cultura de Células	51
5.2 RT-qPCR em Tempo Real	53
5.3 Sequenciamento	54
5.5 Avaliação da Competência viral (<i>Fitness</i>)	57
5.4.1 <i>in vitro</i>	58

5.4.1.1 Cinética da Carga Viral e Expressão Relativa nas células	58
5.4.1.2 Cinética da Carga Viral e Expressão Relativa no Sobrenadante	61
5.4.2 <i>in vivo</i>	63
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS	76
8. 1 Estatística Ct <i>Aedes aegypti</i> 8 DPI	76
8. 2 Tabela de Contingência <i>Aedes aegypti</i> 8 DPI	77
8.3 Estatística Ct <i>Aedes aegypti</i> 12 DPI	78
8. 4 Tabela de Contingência <i>Aedes aegypti</i> 12 DPI.....	79

ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácido
ADE	Anticorpos potencializadores da infecção (<i>Antibody dependent-enhancement</i>)
C	Proteína do Capsídeo
C6/36	Células de <i>Aedes albopictus</i>
cDNA	DNA complementar
DENV	Vírus dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dpi	Dias pós-infecção
E	Proteína do Envelope viral
ECP	Efeito Citopático
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
L-15	Meio de cultura Leibovitz's 15
M	Glicoproteína de Membrana viral
MEM	Meio Mínimo Essencial
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	milimolar
MS	Ministério da Saúde
NS	Proteína não-estrutural
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2	Proteína não-estrutural 2
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4	Proteína não-estrutural 4
NS5	Proteína não-estrutural 5
OMS	Organização Mundial da Saúde

OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	Fase aberta de leitura
Pb	Pares de base
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PIE	Período de incubação extrínseco
pH	Potencial Hidrogeniônico
prM	Proteína precursora de Membrana
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RpRd	RNA polimerase dependente de RNA
RT	Transcrição reversa (<i>reverse transcription</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
ssRNA	RNA de fita simples
U	Unidade Enzimática
uL	Microlitro
uM	Micromolar (micromol por litro)
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês (<i>World Health Organization</i>)
WNV	Vírus do Nilo Ocidental

LISTA FIGURAS

- Figura 1** - Dispersão global do vírus Zika.
- Figura 2** - Ciclo de transmissão silvestre e urbano do Zika.
- Figura 3** - Vírus Zika.
- Figura 4** - Árvore Filogenética do ZIKV.
- Figura 5** - Estrutura esquemática do genoma de Flavivirus.
- Figura 6** - Representação dos três domínios da proteína do envelope do vírus Zika.
- Figura 7** - Ciclo de Replicação do ZIKV.
- Figura 8** - Monocamada de células C6/36.
- Figura 9** - Representação do esquema das passagens seriadas.
- Figura 10** - Esquema de *iniciadores* utilizados para a amplificação do genoma completo do ZIKV.
- Figura 11** - Representação do experimento de competência viral em placa de 24 poços.
- Figura 12** - Esquema da infecção experimental em mosquitos.
- Figura 13** - Representação do experimento *in vivo*
- Figura 14** - Inóculo de P1 e P33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Conjunto de iniciadores e sondas utilizados na reação de RT-qPCR
- Tabela 2** - Conjunto de iniciadores para amplificação do genoma completo.
- Tabela 3** - Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento
- Tabela 4** - Cycle Threshold (Ct) das passagens da Série 1 e 2
- Tabela 5** - Mutações encontradas no genoma das passagens P0, P1 e P30.1, P30.2

Lista de Gráficos

- Gráfico 1** - Cinética da Carga Viral em células C6/36.
- Gráfico 2** - Expressão relativa de P1 e P33 em células C6/36.
- Gráfico 3** - Cinética da Carga Viral no sobrenadante de células C6/36
- Gráfico 4** - Expressão relativa de P1 e P33 no sobrenadante de células C6/36
- Gráfico 5** - –Médias de Ct dos mosquitos alimentados com P1 e P33
- Gráfico 6** - Estatística do número de positivos no ensaio *in vivo*
- Gráfico 7** - Carga viral relativa do experimento *in vivo*.

1 INTRODUÇÃO

O primeiro relato da detecção do vírus Zika (ZIKV) ocorreu em 1947 durante uma rede de vigilância de febre amarela a partir de uma amostra de soro de um macaco rhesus (*Macaca mulatta*) (DICK, 1952). Apesar de a sua descoberta datar de 1947 e várias pesquisas terem rastreado a dispersão desse vírus em populações humanas por toda África, Índia e Sudeste Asiático, o Zika era um vírus que não causava doença grave (DICK, 1952; SMITHBURN 1954; POND, 1963).

O ZIKV passou quase 60 anos de forma silenciosa sem causar sintomas graves em humanos e restrito a África e a Ásia, chamando atenção somente em 2007, quando ocasionou uma epidemia nas ilhas Yap, no oeste pacífico da Micronésia (LANCIOTTI, 2008; DUFFY, 2009), sendo esta a primeira vez que o vírus foi detectado fora da África e da Ásia, nesta ocasião o *Aedes hensilli* foi incriminado como vetor (DUFFY, 2009).

Posteriormente, em 2013 foi relatado um novo surto, dessa vez na Polinésia Francesa. A análise filogenética dos isolados mostrou que o vírus que causou este surto era mais próximo das estirpes isoladas no Sudeste Asiático do que da estirpe detectada nas Ilhas Yap, o que sugeriu uma introdução independente (GATHERER, 2016).

Após o surto na Polinésia Francesa, o ZIKV passou por outras ilhas do Pacífico, sendo reportados casos em 2014 na Nova Caledônia, Ilhas Cook, Ilha da Páscoa, Ilhas Salomão, Vanuatu, Samoa e Fiji (MUSSO; GUBLER, 2016). Em 2015, chegando ao Brasil, foi associado ao surgimento de quadros de complicações antes não relatadas, como por exemplo, a microcefalia. A confirmação se deu através da presença do material genético do ZIKV em amostras de pacientes com sintomas de arbovirose que desenvolveram quadro neurológico (GATHERER, 2016; MUSSO, 2015; CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015).

A doença causada pelo ZIKV pode apresentar-se de forma assintomática como na maior parte dos casos ou levar a sintomas como febre, erupção cutânea, dores de cabeça, dores nas articulações, dores musculares e conjuntivite (DUFFY, 2009; CDC, 2016). Com a realização de estudos, observou-se que a infecção levou, em alguns casos, ao desenvolvimento da síndrome de

Guillain-Barré (SGB) e a microcefalia em crianças recém-nascidas (SCHULER-FACCINI, 2016; FERREIRA, 2017).

O vírus Zika pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Seu genoma é composto por uma fita única de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 11 kb, que codifica para uma única poliproteína. Essa poliproteína é flanqueada por duas regiões não traduzidas, 5' UTR e 3' UTR, essenciais para o processo de replicação viral (GÖERTZ, 2018).

Muitos vírus RNA apresentam diversidades genéticas que podem ser geradas por eventos como recombinação, fluxo gênico, falta de atividade de correção da polimerase viral e pela densidade aumentada de hospedeiros humanos (FAYE, 2014). A ocorrência desses eventos faz com que os vírus passem por mutações ao longo do tempo que podem levar a seleção de uma variante que tenha uma capacidade replicativa alterada (DOMINGO, 2015).

A rápida expansão da escala geográfica e aumento de casos graves observados durante a epidemia do vírus Zika no Brasil, levantou questões sobre a evolução molecular deste vírus (WANG, 2016). Sendo assim, estudos que busquem avaliar a replicação viral e a capacidade de produção de partículas virais infecciosas em condições que mimetizem as interações vírus-hospedeiro além de nos mostrar o surgimento de um fenótipo alterado podem nos fornecer informações da origem desse fenótipo quando analisamos o genótipo.

Neste contexto, o conhecimento de quais regiões genômicas estão mais propensas a ocorrência de mutações e de quais substituições de resíduos de aminoácidos podem estar relacionadas a uma alteração na competência viral, são importantes para a compreensão dos processos evolutivos virais. Tais eventos podem expor a população a uma variedade de linhagens virais que podem estar associadas a uma melhor dispersão do vírus, a uma infecção mais eficiente e ao surgimento de casos mais graves.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus que foi isolado pela primeira vez em 1947, durante estudos realizados em macacos sentinelas na floresta de Zika em Uganda, África (DICK, 1952; DRIGGERS, 2016). Filogeneticamente existem três linhagens do ZIKV, duas linhagens africanas e uma linhagem asiática (FAYE, 2014). Comumente, este vírus é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* e tem como hospedeiro vertebrado, primatas não-humanos e o homem como hospedeiro ocasional (HAYES, 2009; FAGBAMI, 1979). O ZIKV também pode ser transmitido por transfusão sanguínea, transplacentária, perinatal e sexual (MUSSO, 2014; RODRIGUEZ-MORALES, 2016; MUSSO, 2017; BROOKS, 2016). Os primeiros casos em humanos foram registrados no ano de 1952, mas apenas no ano de 2007 foi reportada a transmissão fora da África, com uma epidemia registrada nas Ilhas Yap, na Micronésia, Oceano Pacífico (DUFFY, 2009; LANCIOTTI, 2008).

Após o surto de 2007, o vírus causou outra grande epidemia na Polinésia Francesa em 2013 e 2014 com mais de 30.000 casos (MUSSO, 2014). O vírus foi identificado também em Nova Caledônia, Ilhas Cook, Ilha de Páscoa e nas Américas (ROTH, 2014; GATHERER, 2016).



Figura 1- Dispersão global do vírus Zika. Desde a sua descoberta em 1947, o primeiro grande surto de ZIKV foi relatado nas ilhas Yap, na Micronésia. Posteriormente causou outra grande epidemia na Polinésia Francesa em 2013. Outros casos foram detectados na Nova Caledônia, Ilha de Páscoa, Ilhas Cook e em 2015 o vírus passou a circular no Brasil. Fonte: Revista FAPESP 2016.

No ano de 2015 foram confirmados os primeiros casos autóctones do ZIKV no Brasil (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Rapidamente o vírus se dispersou por todos os estados da Federação, fato este que se deu principalmente pela ampla distribuição do mosquito *Ae. aegypti* o que levou a maior epidemia de Zika já documentada (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; MARCONDES, 2016).

Um estudo filogenético mostrou que a epidemia de febre do ZIKV no Brasil foi causada pelo genótipo asiático (FREIRE, 2015). Evidências de análises moleculares mostram que esta foi introduzida no Brasil, possivelmente, em 2013 (FARIA, 2016).

A infecção por ZIKV pode ser assintomática em cerca de 80% dos casos, ou levar a sintomas semelhantes ao de outras arboviroses, que podem durar de 3 a 5 dias, fase em que o vírus é encontrado em maior quantidade no sangue (BALM, 2012). Os sintomas mais frequentes consistem em febre, dores de cabeça, artralgia, hiperemia conjuntival e exantema podendo perdurar por até 7 dias (HAYES, 2009; HAMEL, 2015; PETERSEN, 2016).

Ao entrar no Brasil, o ZIKV até então negligenciado, mudou a perspectiva do mundo sobre o quadro clínico que poderia gerar, devido ao fato de que, em alguns casos, a infecção pode levar ao desenvolvimento de quadros atípicos graves não anteriormente relatados (CALVET, 2016; MLAKAR, 2016). Em 2015 o Ministério da Saúde notificou um aumento do número de casos de microcefalia em alguns estados do Brasil. Iniciou-se então uma série de estudos que resultaram na detecção do material genético do vírus Zika em amostras de líquido amniótico de duas gestantes, o que permitiu associar a infecção pelo ZIKV com a ocorrência de microcefalia e outras complicações neurológicas (MUSSO, 2015; MENESES, 2017).

Durante a emergência do ZIKV no Brasil, chamou a atenção também, o aumento de notificações de casos de Síndrome Guillain-Barré (SGB), que foi crescente a medida que os casos de infecção pelo ZIKV aumentavam (CAO-LORMEAU, 2016; CAUCHEMEZ, 2016). Estudos revelaram que o material genético do ZIKV foi detectado nas amostras e pacientes com SGB e desta forma a pré-infecção pelo ZIKV foi associada ao desenvolvimento de SGB. (BRASIL, 2016; ARAÚJO, 2016).

Diante da situação epidemiológica reportada pelo Brasil, foi realizada uma revisão dos casos de ZIKV na Polinésia Francesa e foi possível observar que

junto com os casos de infecção pelo ZIKV houve um aumento dos casos de SGB. Durante o surto na Polinésia 41 casos foram notificados associados a infecção por Zika (CAO-LORMEAU, 2016).

Em 2016 com a rápida disseminação do vírus, a ocorrência de casos atípicos e a presença em escala global nas regiões tropicais levou a Organização Mundial da Saúde a declarar a epidemia ocasionada pelo vírus Zika, como uma emergência de saúde pública de preocupação internacional.

Nas Américas foram reportados 223.477 casos autóctones confirmados da infecção pelo Zika e 3.720 casos de síndrome congênita desde 2015 (PAHO, 2018). No ano de 2017, 17.593 casos prováveis foram notificados, havendo uma redução desses números para 8.680 em 2018 conforme a semana epidemiológica 52 de 2018 (VIGILÂNCIA, 2019). Mas ainda assim o vírus segue se espalhando geograficamente em regiões onde vetores competentes estão espalhados.

2.2 Transmissão

A transmissão do vírus Zika ocorre em dois ciclos, existe o ciclo que é denominado ciclo urbano, envolvendo hospedeiro humano e o vetor *Aedes aegypti*, secundariamente o *Aedes albopictus* e outros mosquitos do gênero *Aedes* (WEAVER, 2013; PLOURDE, 2016). O segundo ciclo é o zoonótico/selvagem, o qual tem sido descrito nas florestas, e envolve primatas não humanos como hospedeiros vertebrados e diferentes mosquitos do gênero *Aedes* como vetores (Vasilakis, 2017) (Figura 2).

A principal forma de transmissão do Zika é através da picada de mosquitos infectados, onde as fêmeas, durante o repasto sanguíneo, inoculam o vírus presente na saliva em um hospedeiro vertebrado (HADDOW, 1964; MUSSO; GUBLER, 2016). Estudos demonstram que o vírus pode ser mantido na natureza por meio da transmissão venérea, onde artrópodes adultos adquirem o vírus durante a cópula (PEREIRA-SILVA, 2018), ou vertical, onde o vírus é transmitido da mãe para os ovos, (DA COSTA, 2018).

Diversos tipos de *Aedes* foram associados à transmissão do ZIKV, podendo ser citados: *Ae. aegypti*, *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. hensilli*, *Ae. polynesiensis* e *Ae. Albopictus* (PLOURDE, 2016). O *Ae. aegypti* é o vetor

mais recorrente na região Asiática e nas Américas, o *Ae. Hensilli* foi incriminado como vetor durante o surto nas ilhas Yap e o *Ae. polynesiensis*, foi o vetor responsável pela disseminação do vírus na Polinésia Francesa (VALLE, 2016).

No Brasil, os principais *Aedes* (*Stegomyia*) responsáveis pela transmissão são o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (PLOURDE, 2016; MARCONDES, 2016). O tempo necessário para que uma fêmea adulta do mosquito se torne infectante após o repasto em indivíduo infectado é de aproximadamente 10 dias, tempo este denominado de período de incubação extrínseco (PIE) (VALLE, 2016).

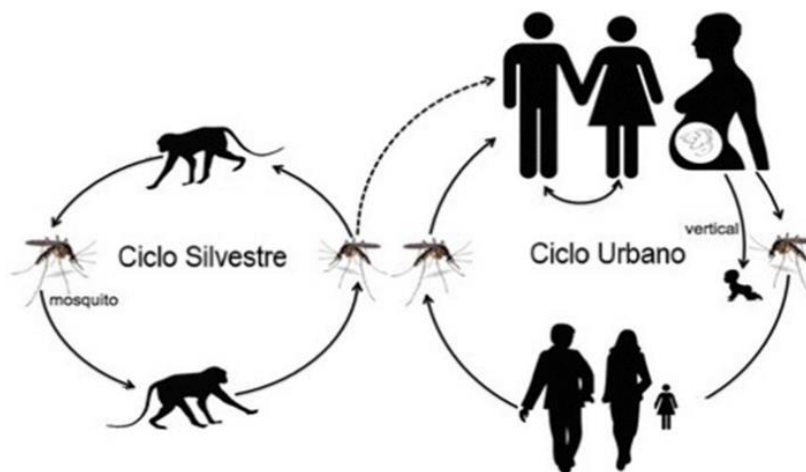


Figura 2 - Ciclo de transmissão Silvestre e urbano do Zika. No ciclo silvestre o vírus se mantém sendo circulando entre vetores artrópodes e primatas não humanos. No Ciclo urbano e epidêmico o vírus se mantém circulando entre vetores artrópodes e o homem, sendo relatada ainda a transmissão vertical e transmissão sexual. (Adaptado de R BASU, 2016).

Apesar do principal modo de transmissão do ZIKV ocorrer através de vetor artrópode, existe a possibilidade de infecção não adquirida por vetores, configurada após os eventos evolutivos da linhagem asiática a partir da passagem do vírus pela Polinésia Francesa (HADDOW, 2012; FAYE, 2014), entre elas a transmissão sexual (FOY, 2011; DECKARD, 2016; ATKINSON, 2016; MCCARTHY, 2016; MEAD, 2018), perinatal (CALVET, 2016; MLAKAR, 2016), leite materno (DUPONT-ROUZEYROL, 2016) e por transfusão de sangue (MUSSO, 2014). Contudo o potencial destas outras formas de transmissão ainda não está plenamente esclarecido (MUSSO, 2015).

2.3 Vírus Zika

Assim como outros vírus emergentes e reemergentes como o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus da dengue (DENV), e o vírus do Oeste do Nilo (WNV), o ZIKV faz parte da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus* (KUNO,1998; WEISSENBOCK, 2010). Apresenta forma esférica e capsídeo de simetria icosaédrica, com diâmetro entre 40–65 nanômetros (Figura 3), protegido por um nucleocapsídeo icosaédrico derivado da membrana do hospedeiro que contém a proteína envelope (E) e membrana (M) (CHAMBERS,1990; LINDENBACH, 2007; LANCIOTTI, 2008).

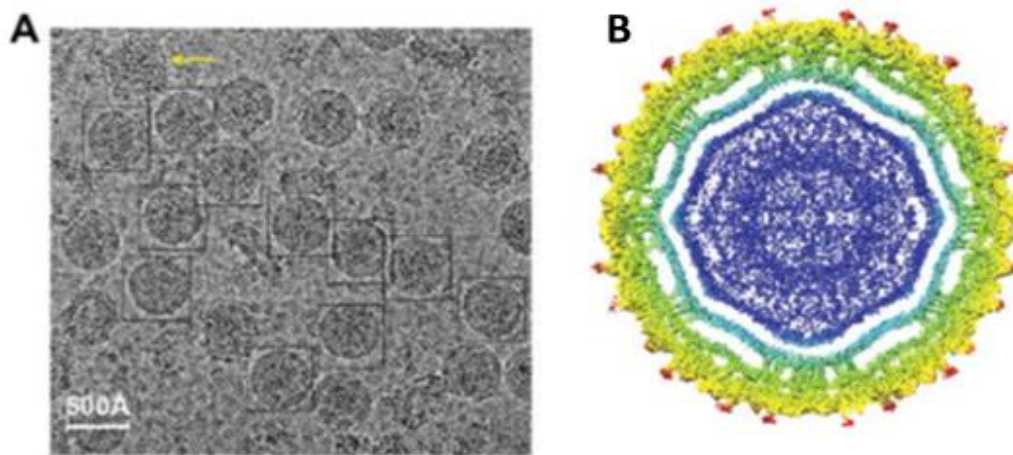


Figura 4 – Vírus Zika. (A) Crio eletro microscopia da partícula viral e (B) esquema representativo da partícula viral. Fonte: Adaptado de SIROHI, 2016.

Estudos filogenéticos demonstram a existência de três genótipos do vírus Zika (Figura 4), o genótipo Africano que se dispersou pelo Oeste africano e leste africano e o genótipo Asiático (FAYE, 2014; MUSSO; GUBLER, 2016; LANCIOTTI, 2016).

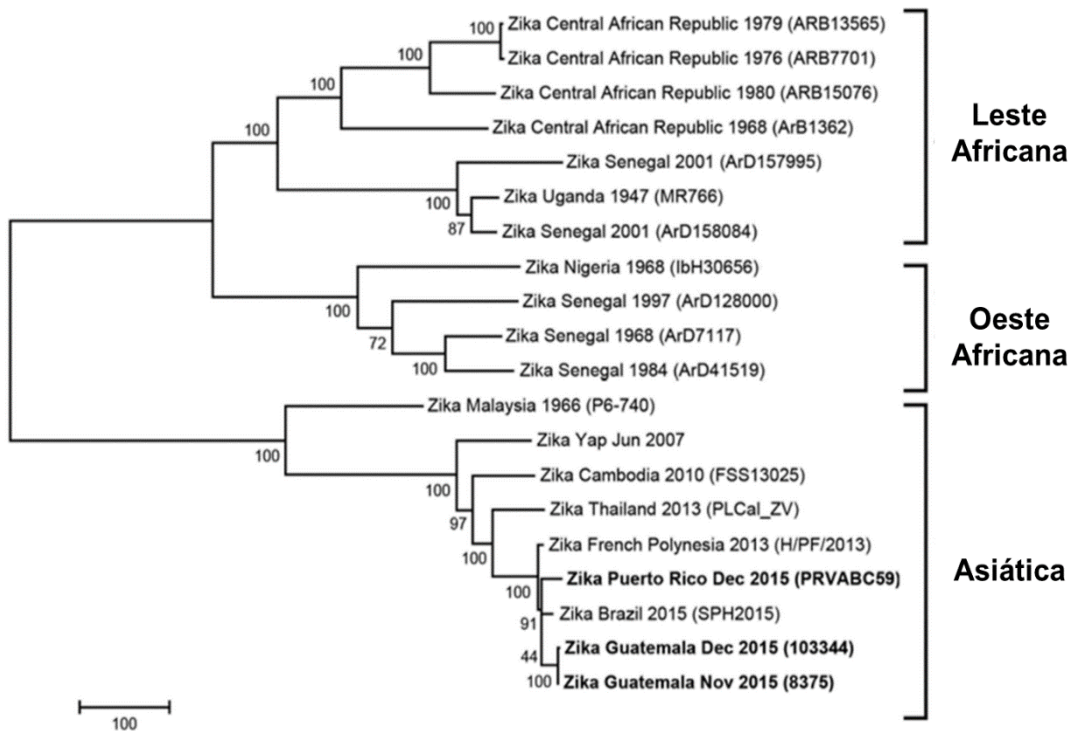


Figura 4 - Árvore filogenética do ZIKV. São demonstradas as linhagens Africanas e Asiática, incluindo as cepas que foram detectadas no Pacífico e no Brasil. Fonte: LANCIOTTI, 2016.

2.4 Organização genômica

Os vírus da família *Flaviviridae* possuem estrutura, organização do genoma e mecanismos de replicação semelhantes. O genoma do Zika é constituído por RNA fita simples de polaridade positiva, que codifica para uma única poliproteína em uma única fase de leitura aberta (ORF, *open reading frame*) (figura 5) (CHAMBERS, 1990).

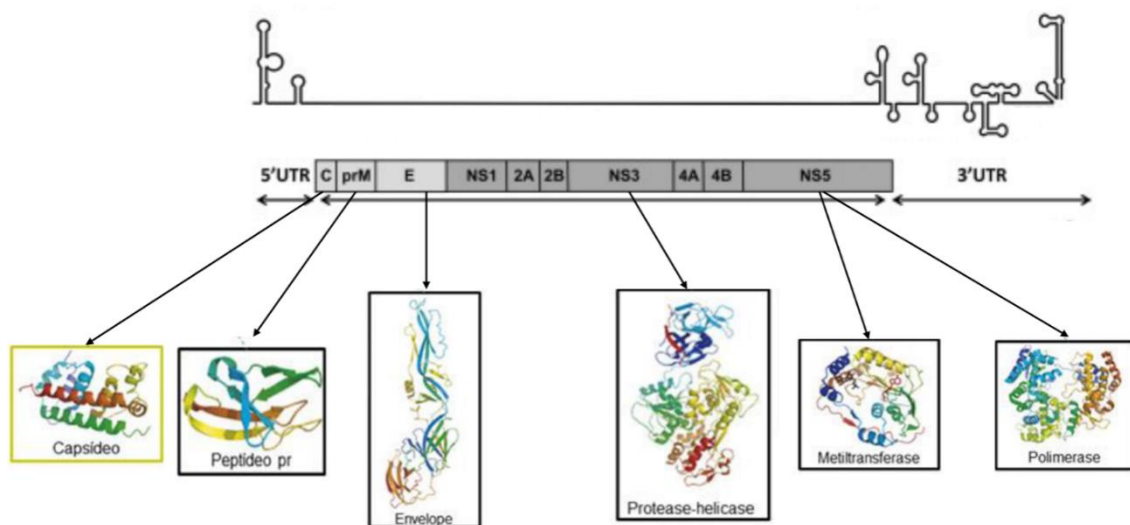


Figura 5 - Estrutura esquemática do genoma de flavivirus. O ZIKV possui genoma de RNA fita simples, senso positivo, que é traduzido em uma única poliproteína. Após o processamento, a poliproteína é clivada em três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS1 - NS5). Nas caixas estão dispostas as estruturas dos domínios enzimáticos. (GUZMAN, 2010; GÖERTZ, 2018).

O genoma do ZIKV contém 10.794 nucleotídeos que codificam cerca de 3.300 aminoácidos, flanqueado por duas regiões não codificantes 5' (107 nt) e 3' UTR's (428 nt) que têm papel chave na regulação dos processos relacionados à replicação viral (CHAMBERS,1990; KUNO, 2007; FAYE, 2014; GÖERTZ, 2018).

A região 3' UTR forma uma estrutura de loop que pode desempenhar um papel na tradução, empacotamento de RNA, ciclização, estabilização do genoma e reconhecimento. O genoma do ZIKV pode circularizar através do emparelhamento de bases entre as regiões 5' e 3'UTRs. A ciclização é essencial para a replicação do vírus, pois cria um modelo para a polimerase viral iniciar a replicação do genoma (GÖERTZ, 2016; LIU, 2017a).

Após tradução do genoma em uma única poliproteína, ocorre a clivagem desta por proteases virais e celulares, originando três proteínas estruturais, que resultam na própria conformação estrutural do vírus (capsídeo, pré-membrana e envelope) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que implicam na montagem e replicação do vírus (CHAMBERS,1990; BURKE, 2001; HARRIS, 2006; LINDENBACH,2007; LI, 2017; GARETT, 2018).

As proteínas estruturais têm função na entrada do vírus na célula, e na montagem e liberação de novas partículas (CHAMBERS,1990; LINDENBACH, 2007).

A proteína C é a primeira a ser traduzida a partir da ORF, é uma proteína pequena, de apenas 12 kDa na forma madura, totalmente básica. Essa região implica na montagem das partículas virais, e a ocorrência de deleções em sua sequência tem impacto negativo na capacidade de propagação do vírus *in vitro* (CHAMBERS, 1990; LINDENBACH, 2007; SIROHI, 2016).

A proteína precursora de membrana é outra proteína traduzida a partir da ORF. Ela tem 18 kDa, 165 aminoácidos, e é precursora da proteína estrutural de membrana do vírus. A proteína passa por clivagem em sua região N-terminal para formar a proteína M (75 aminoácidos), num processo que ocorre para maturação e liberação dos vírions. A proteína prM é encontrada em células infectadas e a M somente nas formas extracelulares (CHAMBERS,1990; LINDENBACH, 2007; SIROHI, 2016).

A proteína E, com aproximadamente 53 kDa e 495 aminoácidos, fica localizada na superfície do vírus, está associada ao mecanismo de adsorção e fusão à célula hospedeira (FAYE, 2014). A proteína E, é a maior proteína do vírion dos *Flavivirus* e induz a produção de anticorpos neutralizantes, sendo constituída por três domínios: domínio I (E-DI) central, domínio II (E-DII) que é o domínio de dimerização da proteína e parece participar da ligação inicial a um receptor viral. Neste domínio também está o peptídeo de fusão do vírus, que possibilita a fusão do envelope viral à membrana do endossomo, e o domínio III (E-DIII) envolvido na ligação ao receptor principal da célula (CHAMBERS, 1990; LINDENBACH, 2007; SIROHI, 2016).

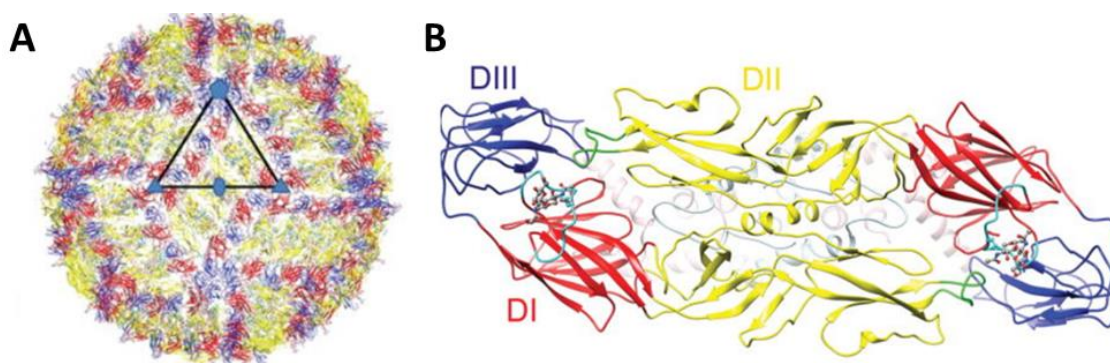


Figura 6 – Representação dos três domínios da proteína do envelope do vírus Zika. A) Padrão dos domínios da proteína E I (vermelho), domínio II (amarelo) e domínio III (azul). B) O dímero de proteína E, com a representação dos domínios da proteína. Fonte: Adaptado de SIROHI, 2016.

O processamento pós-traducional da região não estrutural resulta nas enzimas virais, helicase, metil-transferase a partir das proteínas NS que estão relacionadas ao processo de replicação viral e antagonização da resposta imune do hospedeiro à infecção (SIROHI, 2016; LEE, 2018).

A proteína NS1 pode ser encontrada no interior e na superfície da célula infectada, podendo alcançar concentrações altas no plasma, por isso é comumente utilizada como marcador de infecção viral por flavivírus (YOUNG, 2000). Durante a sua síntese, essa proteína é translocada para o interior do retículo endoplasmático (RE), em seguida é transportada até a superfície celular, onde pode permanecer associada a membrana, ou pode ser liberada para o meio extracelular. Essa proteína possui papel essencial no início da replicação e a interação com a proteína NS4A é essencial para atividade de replicação viral (LINDENBACH, 2007). Estudos sobre mutações na sequência de NS2A

demonstraram que essa proteína está envolvida tanto na montagem, quanto na replicação viral (LINDENBACH, 2007; WHITE, 2016).

A proteína NS3 é uma proteína multifuncional, com função serina protease. A ocorrência de mutações no domínio helicase, seguidas de mutações em E, foram relacionadas à neurovirulência *in vivo* em outros *flavivirus* (DE BORBA, 2012).

As proteínas NS4A e NS4B são proteínas transmembranares, altamente hidrofóbicas, e ambas estão envolvidas com o processo de replicação viral. Estudos *in vitro* relacionados a NS4B demonstram que ela pode também atuar como modulador da replicação viral, através de uma interação com NS3 (LINDENBACH, 2007).

A proteína NS5 tem função de metiltransferase (MTase) na porção amino-terminal e de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) na carboxi-terminal (LINDENBACH, 2007; WHITE, 2016; BRAND, 2017). É a mais conservada das proteínas em flavivírus, embora exiba até 45% de diferença de aminoácidos entre os flavivírus transmitidos por vetores (GRANT, 2016).

Os vírus que possuem RdRp, sofrem mutações frequentes, em média, a 1 erro a cada ciclo de replicação (HOLMES, 2003). A RdRp liga-se ao genoma através da interação com um promotor stem-loop A (SLA), situado na extremidade 5' UTR. A ligação à SLA marca o início da replicação do RNA viral. É a partir dele que a polimerase inicia a extensão dos cerca de 11.000 nucleotídeos, até a extremidade 3' (LINDENBACH, 2007; WHITE, 2016; LEE, 2018).

2.5 Replicação viral

O início do ciclo infeccioso ocorre através das interações entre a glicoproteína E e os receptores celulares. O vírus se liga e entra na célula hospedeira permissiva por endocitose mediada por receptores celulares. (CHAMBERS, 1990; MUKHOPADHY, 2005).

Devido ao pH baixo resultante da acidificação dos endossomos, ocorrem alterações conformacionais na proteína E que levam a sua fusão com a membrana endossomal, seguida da liberação do capsídeo para o citoplasma celular, desmontagem do nucleocapsídeo e a liberação do genoma viral no citoplasma. Em seguida, no retículo endoplasmático, inicia-se a tradução da

poliproteína, que é processada por proteases virais e do hospedeiro dando origem as proteínas necessárias para o processo de replicação (MUKHOPADHY, 2005; LINDENBACH, 2007).

O genoma viral, por possuir polaridade positiva, atua como um RNA mensageiro que é traduzido em uma longa poliproteína no retículo endoplasmático. Esta poliproteína é clivada e gera três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (CHAMBERS, 1990; LINDENBACH, 2007).

As partículas incompletas são formadas no lúmen do retículo endoplasmático. Essa partícula contém as proteínas prM e E na membrana lipídica e o nucleocapsídeo, e configuram partículas imaturas não infecciosas que são transportadas para o complexo de Golgi onde ocorre a clivagem da prM por uma protease do hospedeiro (furina), removendo a porção glicídica desta proteína e resultando numa partícula viral madura, que é liberada da célula hospedeira por exocitose (figura 7) (CHAMBERS, 1990; LINDENBACH, 2007).

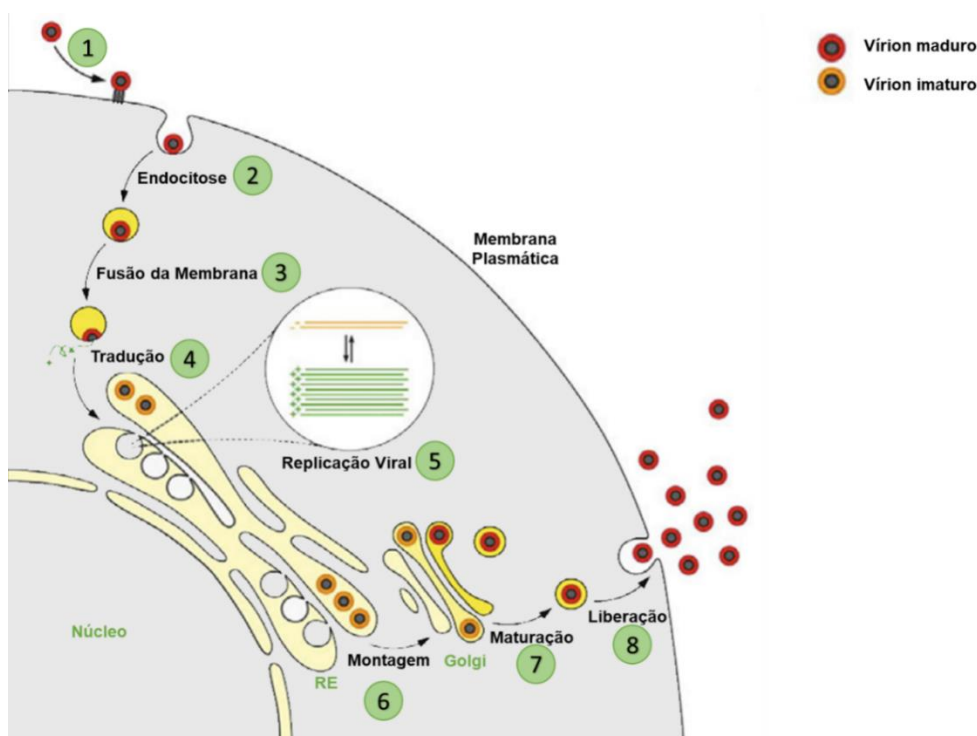


Figura 7 - Ciclo de replicação do ZIKV. 1) O vírus se liga aos receptores da célula hospedeira. 2) via endocitose entra na célula hospedeira. 3) A acidificação do endossomo induz a mudança conformacional da glicoproteína E, levando a fusão do vírus com a membrana endossômica e a liberação do material genético no citoplasma. 4) A tradução ocorre no retículo endoplasmático. Onde o ribossomo traduz diretamente o RNA genômico em uma poliproteína, onde as proteases hospedeiras e virais clivam esta poliproteína em proteínas estruturais e não estruturais. 5) A replicação do RNA ocorre em vesículas da membrana do Reticulo endoplasmático, induzida por vírus através do complexo de replicação viral, com as proteínas NS2a, NS2b, NS4a e NS4b. 6) ocorre o empacotamento das partículas virais imaturas durante a montagem. 7) estas partículas são transportadas através do complexo de Golgi, onde as proteases hospedeiras clivam a porção

pr de prM. 8) as partículas novas saem via exocitose como partículas virais completamente maduras. (Adaptado de YUN, 2017)

2.6 Evolução Viral

A rápida evolução dos vírus RNA surge da sua capacidade de utilizar abordagens variadas de replicação e de se adaptar a uma ampla gama de nichos enfrentados durante a disseminação viral no hospedeiro (OAKS, 1992).

Com suas diversas diferenças em estrutura, organização do genoma, tamanho e formas de replicação, os vírus com genoma RNA são reconhecidos como altamente mutáveis. Possuem uma taxa de mutação na natureza estimada entre 10^{-4} a 10^{-5} substituições por posição, por ano, resultando em alta variação nas sequências genômicas desses vírus (HOLMES; TWIDDY, 2003), com isso, esses vírus evoluem de forma mais rápida que os vírus DNA (STEINHAUER 1987; DUFFY, 2008). Suas altas taxas de mutação dificultam intervenções terapêuticas de funcionarem de forma eficaz e muitas vezes levam a resistência a medicamentos antivirais e anticorpos desencadeados por vacinas (DOMINGO, 1989).

No entanto, o acúmulo de mutações observadas nos arbovírus não possui a mesma velocidade que nos demais vírus RNA, os arbovírus possuem menor variação em suas sequências o que está relacionado a alternância que esses vírus passam em hospedeiros vertebrados e invertebrado (VASILAKIS, 2009). A alternância entre hospedeiros diferentes, aliada a fidelidade da RNA polimerase viral são as causas da estabilidade genética observada nos arbovírus (CIOTA, 2007; VASILAKIS, 2009). Além da interação com o hospedeiro vertebrado, o arbovirus precisa se adaptar ao organismo do hospedeiro artrópode, tanta para escape de seu sistema imune quanto para a adaptação, entrada e replicação eficiente nas células de mosquito (SIM, 2010).

A replicação deve ocorrer de forma eficiente em ambos hospedeiros vertebrado e invertebrado, a alternância resulta na ausência de adaptação a um único hospedeiro, proveniente das substituições que beneficiam a manutenção do vírus em ambos ambientes ou que sejam neutras, evitando a especificidade do vírus a um único hospedeiro (CIOTA,2010).

2.7 Competência Viral (*Fitness*)

Competência viral é definida como a capacidade de um vírus produzir cópias infecciosas em um determinado hospedeiro. Esta é uma definição utilizada que se refere a capacidade replicativa do vírus (DOMINGO; HOLLAND, 1997; DOMINGO, 2010), no entanto outros trabalhos têm extrapolado esse conceito e estão buscando entender as implicações do *fitness* em infecções naturais e sua relação com a gravidade das doenças (WARGO; KURATH, 2012).

Diversos estudos estão sendo realizados, com diferentes vírus, buscando compreender o impacto de mutações sobre cepas virais e sua relação com o aumento de infecções e emergência de novos agentes causadores de infecção (CIOTA, 2013; COFFEY, 2013; FORRESTER, 2014). Um estudo realizado *in vitro* e *in vivo* com o vírus Ross River demonstrou que a mudança entre hospedeiros favoreceu a infecção do hospedeiro vertebrado, no qual o vírus tem grande propagação e assim maior variabilidade (TAYLOR, 1975).

Sabe-se que a eficiência durante a replicação viral de arbovírus deve se igualar tanto para vertebrado quanto invertebrado, o que inviabiliza a adaptação a um único ambiente. Entretanto se ocorresse, impediria a transmissão devido ao ciclo de replicação não ser completado. As modificações no genoma que tem um caráter benéfico evitam a adaptação à um único hospedeiro (CIOTA, 2010).

Um estudo sobre a evolução do ZIKV genótipo asiático, identificou uma mutação ao comparar os vírus de epidemias anteriores a do surto ocorrido na Polinésia Francesa em 2013 e a emergência na América. O impacto de uma única mutação na posição S139N, de uma Serina para Asparagina, foi avaliado e os resultados obtidos demonstraram maior infecciosidade e danos em células progenitoras neurais, o que demonstra o fenótipo alterado devido a ocorrência de uma mutação adaptativa que ocorreu antes da chegada do vírus na Polinésia (YUAN, 2017). Um trabalho anterior havia demonstrado o surgimento de mutações nas sequências de ZIKV e inclusive a mutação S139N já havia sido identificada, no entanto seu impacto e associação a alterações de fenótipo veio ser testado em 2017 (FARIA, 2016; YUAN, 2017).

Há evidências de uma correlação entre o *fitness* do WNV e a diversidade intra-hospedeiro em cultura de células de mosquito (FITZPATRICK, 2010; CIOTA, 2007). O aumento da diversidade também foi associado à diminuição da virulência do WNV em camundongos (JERZAK, 2007), sugerindo que a

alteração da capacidade de acumular mutações poderia ter consequências fenotípicas específicas no hospedeiro.

2.8 Cultura de Células para Zika

Estudos demonstraram o sucesso replicativo do ZIKV em diversas células primárias, como células neuronais, células dendríticas ou queratinócitos e células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) (CUMBERWORTH, 2017; MICHLMAYR, 2017).

Outros trabalhos ainda demonstraram a suscetibilidade de infecção pelo vírus Zika em células provenientes do interior do testículo, células de Sertoli (SIEMANN, 2017) e do endométrio (PAGANI, 2017). As linhagens celulares prostáticas, testiculares e renais testadas em outro estudo, demonstraram que há aumento da carga viral e expressão da proteína NS1, sem levar a efeito citopático, sugerindo seus potenciais papéis na transmissão sexual com replicação viral persistente (CHAN, 2016).

Há indícios ainda de que as células do endométrio podem servir como rotas para o vírus chegar aos trofoblastos da placenta durante a gravidez (PAGANI, 2017). Células de origem placentária que marcam o início da gravidez demonstraram títulos virais maiores em comparação a células do final da gravidez (TABATA, 2016).

Outro trabalho demonstrou a capacidade do ZIKV de levar a desregulação das vias relacionadas ao ciclo celular e levar ao aumento da morte celular em células progenitoras neurais (NPCs) (TANG, 2016). Células mielinizantes do sistema nervoso periférico (SNP) e do sistema nervoso central (SNC) de camundongos foram infectadas com ZIKV. Através da quantificação dessas células infectadas, eles descobriram que as células do SNC são mais suscetíveis à infecção do que as células do SNP (CUMBERWORTH, 2017).

Ainda que o vírus consiga replicar de forma eficiente em uma variedade de células, a quantidade de partículas infecciosas intracelulares, bem como a liberação e o efeito citopático variam em alguns estudos entre as células testadas (BOS, 2018; MLADINICH, 2017; HIMMELSBACH, 2018).

Uma variedade de pesquisas é realizada com foco em arbovírus a partir do uso de cultura de células de invertebrados. Sua utilização, data da década de 60, quando iniciaram os primeiros cultivos que tinham como objetivo o

entendimento da fisiologia dos mosquitos (RODRIGUEZ-MORALES, 2016). O uso de cultivos celulares é mais frequente devido a sensibilidade, o baixo custo e a simplicidade de manutenção (DE PAULA, 2004).

Linhagens celulares contínuas como as de *Aedes albopictus* (C6/36), células de mamífero, provenientes de rim de macaco verde africano (Vero), proveniente de hepatocarcinoma (HepG2), (Huh-7) e (Hela) que são amplamente utilizadas para o isolamento de outros arbovírus (SIROHI, 2016; CHAN, 2016; DONALD, 2016; BARRETO-VIEIRA, 2016; TANG, 2016; OFFERDAHL, 2017).

As células C6/36 vem sendo utilizadas *in vitro* para isolamento do vírus Zika (BARRETO-VIEIRA, 2016; CIOTA, 2017; JURADO, 2016; CHAN, 2016). Um estudo no qual os autores utilizaram células C6/36 para isolamento primário e posteriormente utilizaram o sobrenadante deste isolado para infecção em células Vero confirmou a suscetibilidade desta linhagem ao vírus Zika. A cepa asiática do ZIKV demonstrou neste trabalho que as células de mamíferos foram mais suscetíveis à infecção por ZIKV do que as células de invertebrados (BARRETO-VIEIRA, 2016). Outro estudo utilizou as células C6/36 a fim de verificar o tempo em que o ZIKV estava com cargas mais altas de replicação, para avaliar as proteínas expressas do hospedeiro num trabalho de avaliação proteômica (XIN, 2017).

Esses autores têm demonstrado a suscetibilidade dessas células ao vírus Zika *in vitro*, corroborando com outros estudos sobre a suscetibilidade da mesma ao isolamento e replicação de arbovírus.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a microevolução de um isolado do vírus Zika, genótipo asiático, analisando a existência de variações genéticas associadas ao aumento ou diminuição da competência viral (*viral fitness*), durante sucessivas passagens *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

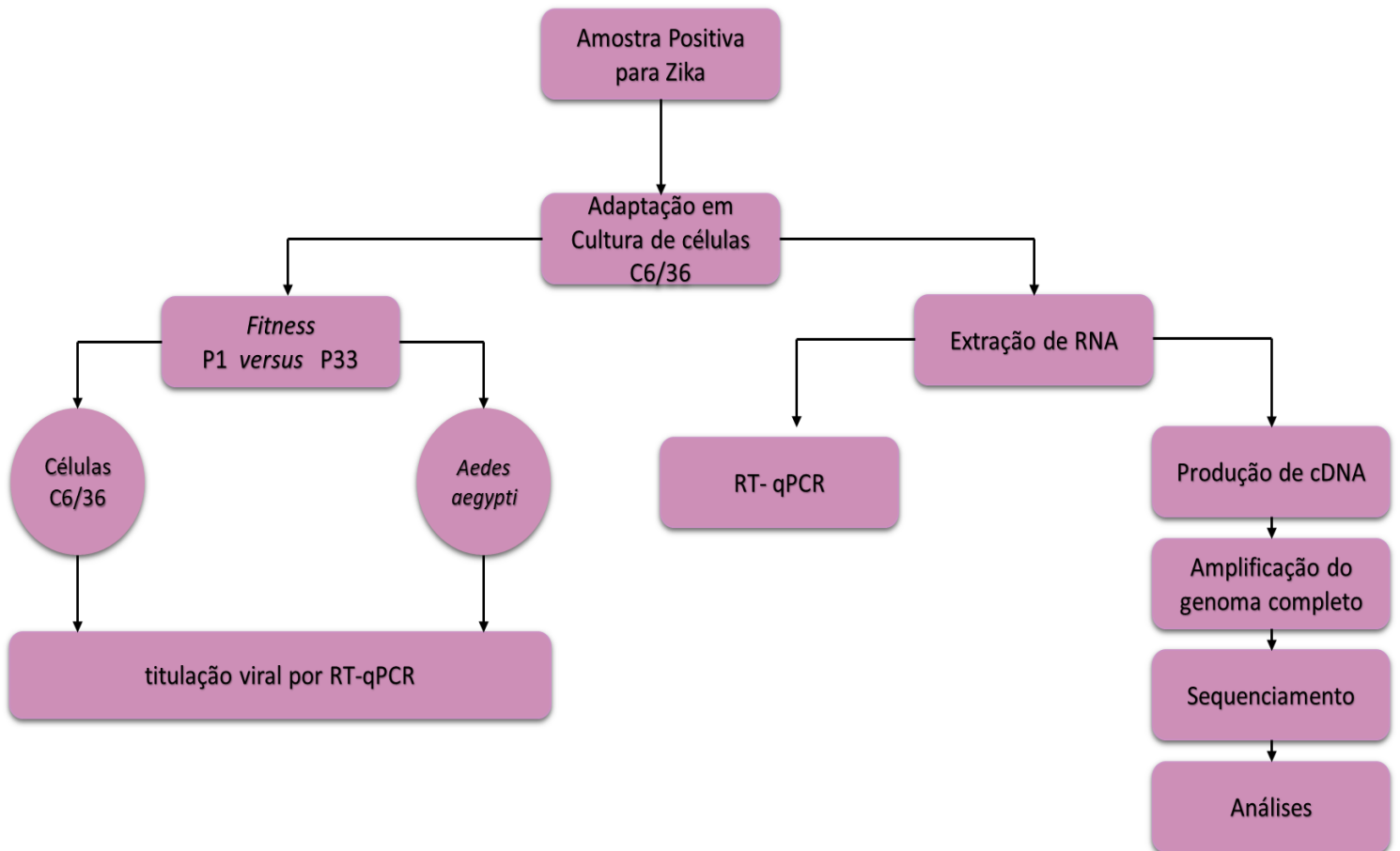
Descrever as mudanças na sequência majoritária do genoma completo de uma amostra do vírus Zika, durante o processo de adaptação *in vitro*.

Analisar o impacto das mutações observadas sobre a competência viral *in vitro*.

Analisar o impacto das mutações observadas sobre a competência viral *in vivo*.

3. METODOLOGIA

Neste trabalho, uma amostra positiva para Zika foi submetida ao processo de adaptação em cultura de células. Os sobrenadantes recolhidos desse processo foram submetidos aos seguintes experimentos apresentados no fluxograma abaixo.



3.1 Aspectos Éticos

A amostra utilizada neste trabalho faz parte do projeto “Casos sintomáticos e assintomáticos de infecções pelo vírus Zika: estudo de características virológicas e da resposta imune em uma população da Amazônia Ocidental Brasileira”. Esse projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa sob o número CAEE 56745116.60000.5016.

3.2 Amostra utilizada no estudo

A amostra positiva para o vírus Zika, genótipo asiático, utilizada neste trabalho, identificada como 0305JFMB, foi isolada em Manaus em abril de 2016, estando o paciente com dois dias de início dos sintomas. Essa amostra foi detectada por RT-qPCR durante a vigilância de arbovírus no Instituto Leônidas e Maria Deane, conforme protocolo descrito por Lanciotti e colaboradores (LANCIOTTI, 2008).

3.3 Cultura de Células

As células C6/36 utilizadas neste estudo eram mantidas em frascos de cultivo celular descartáveis de 25cm², com meio de cultura Leibovitz's L-15 e permaneciam em estufa a 28°C. A manutenção das células dava-se a cada três dias, a monocamada pode ser observada na figura 8. O procedimento de manutenção ocorria da seguinte forma: descartava-se o meio de cultivo presente na garrafa e lavava-se a monocamada celular com PBS 1X. Feito isso, era realizado o repique celular com a utilização de espalhador de células (*cell scraper*) e adição de um meio novo com os seguintes componentes e concentrações: 5mL de meio de cultura L-15 (Leibovitz's) (Gibco, cat.: 41300-039), 10% de soro fetal bovino (Gibco, cat.: 12657029), 100 µg/mL de estreptomocina, 0,25 µg/ml de anfotericina B e 100U/mL de penicilina. Após manuseio, armazenava-se novamente a garrafa de cultivo celular em estufa a 28°C.



Figura 8 - Monocamada de células C6/36. 72 horas após manutenção. Lab. Virologia/ILMD-Fiocruz Amazônia.

3.4 Adaptação do vírus em cultura de células

As células utilizadas para a realização das passagens seriadas do vírus eram preparadas 36h antes da infecção em garrafas de cultivo celular de 12,5cm, conforme procedimento descrito no item anterior. O primeiro inóculo do soro em células C6/36 foi denominado P1 e este foi recolhido com 10 dpi. A partir do sobrenadante de P1 foi dado início a uma série de 32 passagens do vírus neste sistema de células, chegando então na passagem P33. Todas passagens foram realizadas em duplicata denominadas série 1 e série 2.

No momento do inóculo a monocamada de células apresentava aproximadamente 80% de confluência. O meio L-15 de crescimento que estava na garrafa era descartado, seguindo de lavagem com PBS 1X por duas vezes. Adicionava-se então 500µl do inóculo em uma diluição 1/10, após o inóculo ser adicionado na monocamada de células, as garrafas eram encaminhadas a estufa (28°C) para a etapa de adsorção viral por 1 hora, com agitação a cada 15 minutos, para banhar toda a monocamada e assim evitar ressecamento das células. Ao término do tempo de adsorção, a monocamada era lavada e então era adicionado meio L-15 de manutenção (SFB 2%), sendo as garrafas novamente armazenadas em estufa (28°C), onde permaneciam por três dias, com observação em microscópio invertido.

Após o terceiro dia de inóculo, os frascos de cultivo eram submetidos ao método de congelamento à -80°C e descongelamento a 37°C para liberação das partículas virais, o sobrenadante era utilizado para o inóculo subsequente e o restante armazenado em freezer -80°C em alíquotas com glicerol (10%) e outras sem, até a utilização em experimentos posteriores. O sobrenadante de P1 deu origem a P2.1 (denominada série 1) e P2.2 (série 2). Os sobrenadantes de P2.1 e P2.2 deram origem a P3.1 e P3.2 respectivamente, assim sucessivamente até a passagem 33 de ambas as séries (figura 9).



Figura 9– Representação do esquema das Passagens seriadas. Amostra positiva para Zika utilizada nos inóculo em células C6/36. Após o primeiro inóculo do soro (P0) o sobrenadante de cultura servia para inóculo subsequente seguindo até a última passagem (P33).Fonte: a autora.

3.5 Extração de RNA viral

A extração de RNA viral foi realizada com a utilização do *QiAamp viral RNA mini kit*. Respectivamente seguiram para extração P0 (amostra de soro), P1, P5, P10, P15, P20, P25, P30 e P33 de ambas as séries de passagens. Em resumo, foram adicionados 140µL destas amostras em 560µL do tampão AVL acrescidos de RNA carreador em microtubo de 1,5 mL contendo 5µL do fago MS2 utilizado em uma diluição 10^{-4} e que serviu como controle da extração para os demais procedimentos. Em seguida esta solução foi homogeneizada em vórtex durante 15 segundos e incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação seguiu-se adicionando 560µL de etanol 96-100% e homogeneização por vórtex. Transferiu-se 630µL da solução para coluna de sílica do kit que foi centrifugada a 8.600 RPM por 1 minuto. Na etapa de lavagem usou-se tampão AW1, centrifugou-se a 8.600 RPM por 1 minuto, transferiu-se a coluna para tubos coletores e adicionou-se 500µL do tampão AW2 e centrifugou-se a 14.000 RPM por 3 minutos. O RNA viral foi eluído com 60µL de tampão AVE e armazenado a -80°C para experimentos posteriores.

3.6 RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Os RNAs da amostra e dos sobrenadantes das passagens em C6/36 foram utilizados nas reações de RT-qPCR, inicialmente para acompanhar se os inóculos estavam sendo bem-sucedidos e posteriormente para determinar a quantidade relativa de RNA viral dessas passagens.

As reações foram realizadas em multiplex para os alvos ZIKV, RPS e MS2, em placas de 96 poços com um volume final de 10µl sendo 7,5µl do mix e 2,5µl de RNA. Na tabela 1, estão descritas as regiões que tivemos como alvo, Envelope (LANCIOTTI, 2008), NS5 desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (não publicado), bacteriófago MS2 (NAVECA, 2017) e RPS (Proteína ribossomal de mosquitos S17) (MOREIRA, 2009). O Mix de reação era preparado com 2,5µl de TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix; iniciadores a uma concentração de 300 nm; sonda a 100nm; e H₂O livre de nucleases completando o volume. Uma vez preparado o mix, o RNA era distribuído na placa e a mesma, era levada ao termociclador QuantStudio 5 Real-Time PCR System.

Tabela 1 - Conjunto de Iniciadores e sondas utilizados no qRT-PCR.

Alvo	Posição	Refs.
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	LANCIOTTI, 2008
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	LANCIOTTI, 2008
ZIKV 1107-FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	LANCIOTTI, 2008
ZIKA_qPCR_FNF1	TGTTGAAGGGCTRGGATTAC	NS5, não publicado
ZIKA_qPCR_FNR	CTCCAGATCAAACCTGCTGAT	NS5, não publicado
ZIKA_qPCR_FNP	TGAGTCGCATACCAGGAGGAAGGA	NS5, não publicado
MS2_IC_FNF	GCGCAGAATCGCAAATACA	NAVECA, 2017
MS2_IC_FNR	CAACAGTCTGGGTTGCCACTT	NAVECA, 2017
MS2_IC_FNP	(NED) ATCAAAGTCGAGGTGCC	NAVECA, 2017
RPS17	CAGGAGGAGGAACGTGAGCGCAG	MOREIRA, 2009
RPS17 forward	CTGGAGATTTTCCGTTGTCA	MOREIRA, 2009
RPS-17 reverse	GACTTCCGGCACGTAGTT	MOREIRA, 2009

4.7 Produção de cDNA

A produção de cDNA foi realizada com volume final de 20µL com os reagentes nas seguintes concentrações: 4 µL de H₂O, 4µL de tampão 5X, 1µL de DTT [0,1M], 1µL de dNTPs [10mM], 1µL de Superase (20U), 1µL da enzima *SuperScript III reverse transcriptase* (200U).

Para a etapa de linearização do RNA adicionou-se 1µL do primer randômico [50 ng] juntamente com 7µL de RNA em um microtubo de 0,2 mL que foi levado ao termociclador por cinco minutos a temperatura de 65°C. Em seguida o microtubo foi colocado em gelo por 2 minutos para adição do mix de reação e levado ao termociclador na seguinte ciclagem: 25°C por 10 minutos/ 37°C por 15 minutos/ 45°C por 15 minutos/ 50°C por 15 minutos/ 55°C por 15 minutos/ 60°C por 15 minutos/ 80°C por 2 minutos/ 4°C∞.

4.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação do genoma completo do ZIKV, foram utilizados nove pares de iniciadores previamente publicados (tabela 2) (QUICK, 2017), como esses iniciadores foram publicados para outra metodologia, foram inicialmente padronizadas as melhores condições para amplificação, em outro projeto também desenvolvido em nosso grupo de pesquisa.

O mix de reação teve volume final de 50µL, sendo 2µL de cDNA e foi preparado utilizando os reagentes nas seguintes concentrações: Tampão 10X (5µL), 1,5mM de Mg²⁺; 0,2mM de dNTPs, 0,3mM de cada iniciador, 1U de enzima PlatinumTaq Brasil (Life Technologies -10996-030) e H₂O livre de nucleases, para completar o volume. Essa reação foi amplificada em um termociclador (Proflex) programado para 1 ciclo a 94° C por 2 minutos, 40 ciclos a 94° C por 30 segundos, 65° C por 30 segundos, 72° C por 2 minutos e um ciclo final a 72° C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed, padrão de peso molecular Fast ruler middle range, em tampão TAE 1X, e análise sob transiluminador ultravioleta.

Tabela 2 – Conjunto de iniciadores utilizados para amplificação do genoma completo.

Amplicon	Iniciadores	Tamanho
<i>Amplicon 1</i>	ZIKV 400_1L + ZIKV 400_4R	1388 pb
<i>Amplicon 2</i>	ZIKV 400_5L + ZIKV 400_8R	1373 pb
<i>Amplicon 3</i>	ZIKV 400_9L + ZIKV 400_12R	1341 pb
<i>Amplicon 4</i>	ZIKV 400_13L + ZIKV 400_16R	1332pb
<i>Amplicon 5</i>	ZIKV 400_17L + ZIKV 400_20R	1349 pb
<i>Amplicon 6</i>	ZIKV 400_21L + ZIKV 400_24R	1370 pb
<i>Amplicon 7</i>	ZIKV 400_25L + ZIKV 400_28R	1374 pb
<i>Amplicon 8</i>	ZIKV 400_29L + ZIKV 400_32R	1349 pb
<i>Amplicon 9</i>	ZIKV 400_33L + ZIKV 400_35R	1033 pb

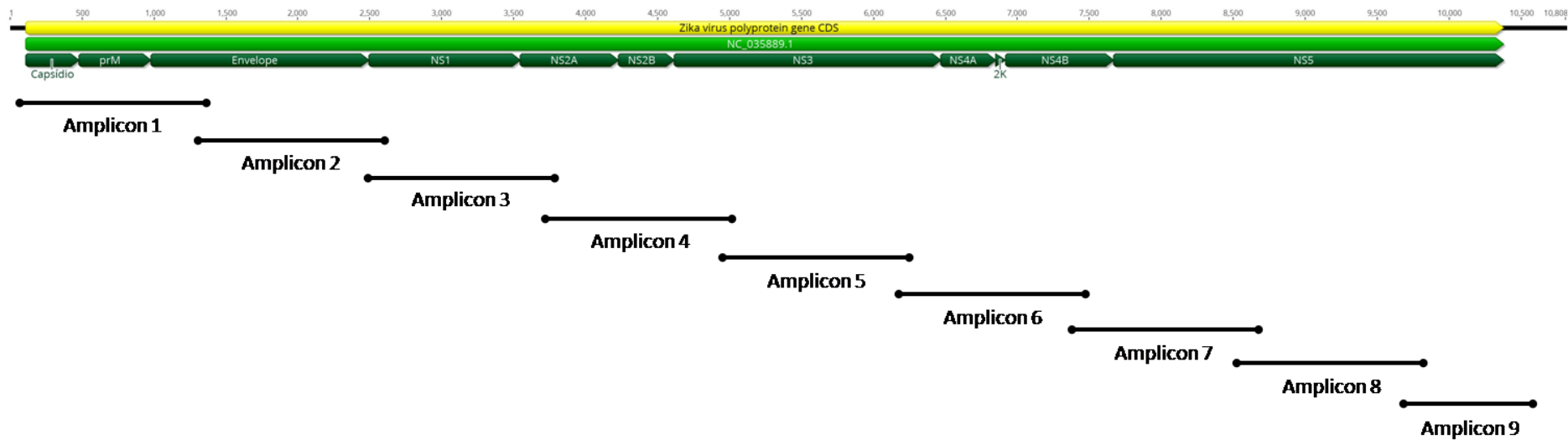


Figura 10 – Esquema de iniciadores utilizados para a amplificação do genoma completo do ZIKV. A figura mostra os nove pares de iniciadores utilizados para amplificação do genoma completo. Cada par de iniciadores amplifica uma região específica e todos geram amplicons parcialmente sobrepostos. Figura produzida com auxílio do software Geneious v 10.2.6.

4.9 Purificação por Polietilenoglicol (PEG)

Realizamos a purificação dos produtos gerados na PCR com o intuito de remover bases e iniciadores que não incorporaram duração a reação, utilizando um protocolo de precipitação por PEG, (HUMPHREYS; WILLSHAW; ANDERSON, 1975) adaptado por nosso grupo de pesquisa. O produto de PCR era transferido para um microtubo de 1,5mL ao qual era adicionado o PEG 8.000 a 20% (PEG – Promega, Madison, WI, USA, Cat. V3011) na proporção 1/1. Esta mistura era mantida em incubação a 37°C por 15 minutos. Após esta etapa era realizada centrifugação a 13.000g por 15 minutos e em seguida o sobrenadante era descartado sendo então adicionados 125µL de etanol 80% ao microtubo seguido de centrifugação a 12.000g por 2 minutos com descarte do sobrenadante. A fim de remover todo etanol, o microtubo era colocado para secar a 37°C por 15 minutos no concentrador de DNA a vácuo Mivac (Genevc SP Scientific) e em seguida o DNA era ressuspendido em 35µL de água livre de nucleases. Após a purificação, o produto de PCR era quantificado em espectrofotômetro (Biodrop Duo – Biochrom) para determinar o volume necessário a ser utilizado na reação de sequenciamento.

4.10 Sequenciamento do genoma viral por eletroforese capilar

Para as reações de sequenciamento utilizamos os nove *amplicons* previamente purificados do plasma e das passagens 5,10,15, 20, 25, 30 e 33 do vírus em cultura de células.

Com a finalidade de obter a sequência do genoma completo, foram utilizados 54 iniciadores (QUICK, 2017), sendo 27 no sentido senso e 27 no sentido anti-senso. As reações foram realizadas com o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, cat.: 4336917) para um volume final de 10µl utilizando 0,3µl de BigDye (0,075X final); 0,32µM de cada primer demonstrados na tabela 3; tampão 1X, além do produto da PCR de acordo com a concentração ideal para o tamanho de cada fragmento (aproximadamente 20ng) e H₂O livre de nucleases q.s.p. 10µl. Preparado o mix, a placa era levada ao termociclador VERITI (Applied Biosystems), onde foi seguido o programa 96°C/ 1' — 20X [96°C/10'' — 55°C/15'' — 60°C/2'] 10X [96°C/2' — 55°C/15'' — 60°C/3'] 4°C/∞.

Ao final das reações, os produtos eram purificados por precipitação com EtOH/EDTA/Acetado de Sódio. Após a purificação da reação de sequenciamento acrescentava-se 10µl de formamida HI-DI em cada poço, a placa era aquecida a 95°C por 1 minuto e levada ao sequenciador automático ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), instalado na plataforma de genômica do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazonas.

Os dados gerados pelo sequenciador foram analisados utilizando o software *Geneious* v10.2.6 para montagem dos contigs de cada amostra e identificação de variantes genéticas.

Tabela 3 – Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento.

Amplicon	Primer	Sentido
<i>Amplicon 1</i>	ZIKV 400_1L	S
	ZIKV 400_4R	AS
	ZIKV 400_1R	AS
	ZIKV 400_3L	S
	ZIKV 400_2R	AS
	ZIKV 400_4L	S
<i>Amplicon 2</i>	ZIKV 400_5L	S
	ZIKV 400_8R	AS
	ZIKV 400_5R	AS
	ZIKV 400_7L	S
	ZIKV 400_6R	AS
	ZIKV 400_8L	S
<i>Amplicon 3</i>	ZIKV 400_9L	S
	ZIKV 400_12R	AS
	ZIKV 400_9R	AS
	ZIKV 400_11L	S
	ZIKV 400_10R	AS
	ZIKV 400_12L	S
<i>Amplicon 4</i>	ZIKV 400_13L	S
	ZIKV 400_16R	AS
	ZIKV 400_13R	AS
	ZIKV 400_15L	S
	ZIKV 400_14R	AS
	ZIKV 400_16L	S
<i>Amplicon 5</i>	ZIKV 400_17L	S
	ZIKV 400_20R	AS
	ZIKV 400_17R	AS
	ZIKV 400_19L	S
	ZIKV 400_18R	AS
	ZIKV 400_20L	S

<i>Amplicon 6</i>	ZIKV 400_21L	S
	ZIKV 400_24R	AS
	ZIKV 400_21R	AS
	ZIKV 400_23L	S
	ZIKV 400_22R	AS
	ZIKV 400_24L	S
<i>Amplicon 7</i>	ZIKV 400_25L	S
	ZIKV 400_28R	AS
	ZIKV 400_25R	AS
	ZIKV 400_27L	S
	ZIKV 400_26R	AS
	ZIKV 400_28L	S
<i>Amplicon 8</i>	ZIKV 400_29L	S
	ZIKV 400_32R	AS
	ZIKV 400_29R	AS
	ZIKV 400_31L	S
	ZIKV 400_30R	AS
	ZIKV 400_32L	S
<i>Amplicon 9</i>	ZIKV 400_33L	S
	ZIKV 400_35R	AS
	ZIKV 400_34L	S
	ZIKV 400_33R	AS
	ZIKV 400_35L	S
	ZIKV 400_34R	AS

4.11 Avaliação da competência viral (*fitness*)

Os sobrenadantes de P1 e P33 que foram utilizados nos experimentos de *fitness* viral foram inicialmente submetidos à reação de RT-qPCR em triplicata para quantificação relativa do RNA viral pelo método comparativo $\Delta\Delta Ct$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) tendo como controle endógeno o RPS, com a finalidade de igualar as cargas virais presentes em cada uma dessas passagens.

O método $\Delta\Delta Ct$ baseia-se na razão da expressão relativa, em que se comparam os níveis de expressão dos genes em dois grupos, tratado versus controle (STEIBEL, 2009). Nesse ensaio o cálculo da quantificação relativa é realizado com a seguinte fórmula:

2- $\Delta\Delta Ct$, onde $\Delta Ct = \text{gene alvo} - Ct \text{ gene de referência}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

4.11.1 *in vitro*

A análise do *fitness in vitro* foi realizada em células C6/36 em placas de 24 poços. Utilizamos o Moxi-Z para a contagem de células e também para saber a viabilidade das mesmas, e foi possível observar que estavam com 92% de viabilidade. A placa foi preparada 24h antes da infecção, onde cada poço continha 200.000 células.

Após 24 horas do preparo da placa, cada poço foi lavado com PBS 1X, e os vírus de P1 e P33 já titulados por RT-qPCR utilizando o método $\Delta\Delta$ Ct e com a carga viral igualada, foram diluídos 1:10 em meio L-15 e utilizados para a infecção das células C6/36. Após a infecção, o sobrenadante e as células de cada poço foram recolhidos em duplicata em cinco tempos distintos: 24h P.I.; 48 h P.I.; 72h P.I.; 96h P.I e 120h P.I. representados no esquema da figura 11.

Os sobrenadantes e células recolhidos, foram extraídos e testados por RT-qPCR para a quantificação relativa de RNA.

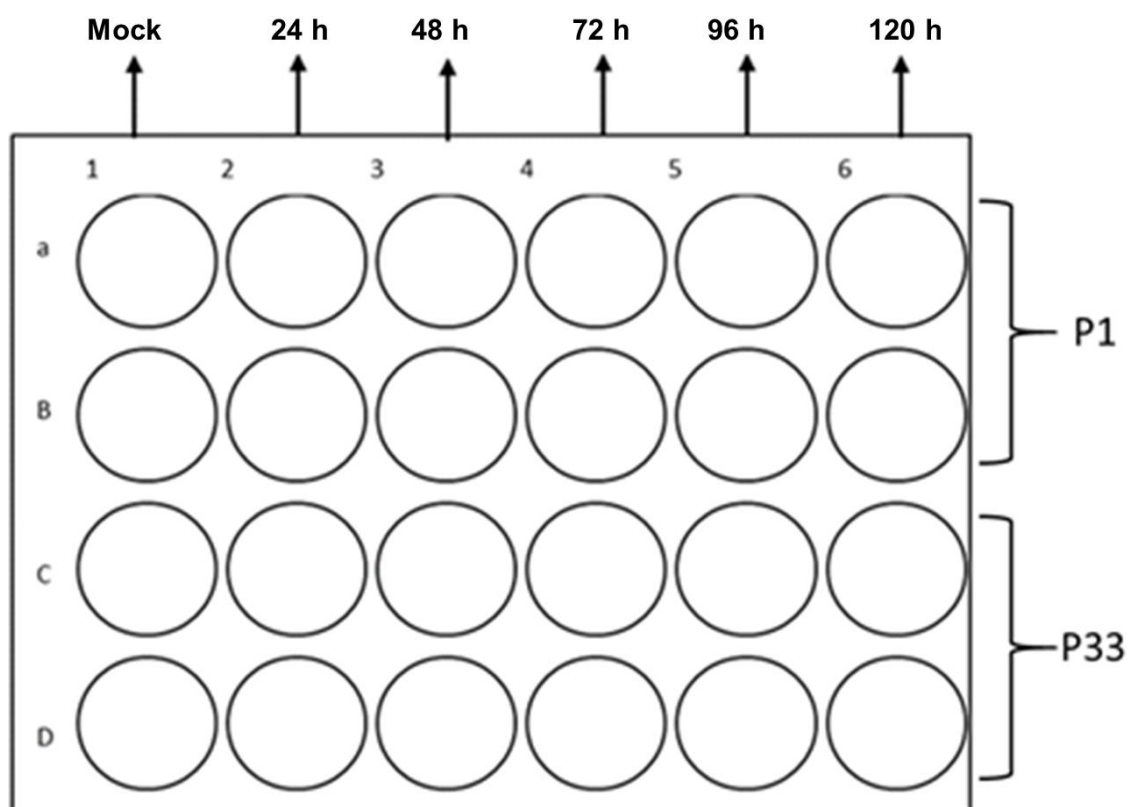


Figura 11 – Representação do experimento da Competência viral em placa de 24 poços. Após titulação de P1 e P33, essas amostras foram utilizadas para infecção em células C6/36. Os sobrenadantes e as células foram recolhidos conforme os tempos descritos, todos em duplicata. Fonte: a autora.

4.11. 2 *in vivo*

Os mosquitos utilizados neste experimento foram oriundos da colônia de *Aedes aegypti* estabelecida no laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia (EDTA), setor entomologia. As fêmeas utilizadas tinham entre 3-5 dias de vida e foram privadas de açúcar por 24 horas antes da realização do experimento.

Dois grupos de fêmeas de *Aedes aegypti* foram submetidas a alimentação artificial com os vírus de P1 e P33 titulados e com a carga viral igualada.

Foi utilizado um sistema de alimentação composto por alimentadores de vidro cobertos por pele de pinto, conectados a um sistema de mangueiras ligado a um banho maria, onde a água é bombeada e mantida à temperatura de 37°C (Figura12).



Figura12-Esquema de Infecção experimental dos mosquitos. Fonte: Laboratório de Entomologia/EDTA ILMD - Fiocruz Amazônia.

Um grupo de fêmeas foi alimentado com sangue, cujo soro foi previamente inativado, contendo suspensão viral de P1 e o outro grupo com P33. Após o tempo de alimentação, foram recolhidas 50 fêmeas, de cada grupo, totalmente ingurgitadas (figura 13). Essas fêmeas foram transferidas para gaiolas de plástico e mantidas à temperatura de 27°C, 70% de umidade relativa e alimentadas com sacarose 10% *ad libitum*.

Passados 8 e 12 dias da alimentação artificial, respectivamente, foram retiradas 20 fêmeas de cada grupo, que foram armazenadas a -80°C e posteriormente foram maceradas e submetidas a extração de RNA e RT-qPCR.

Ao longo dos 12 dias, que foi tempo máximo de recolhimento dos mosquitos infectados, foi verificada a mortalidade dos mosquitos de cada grupo a cada 24 horas.

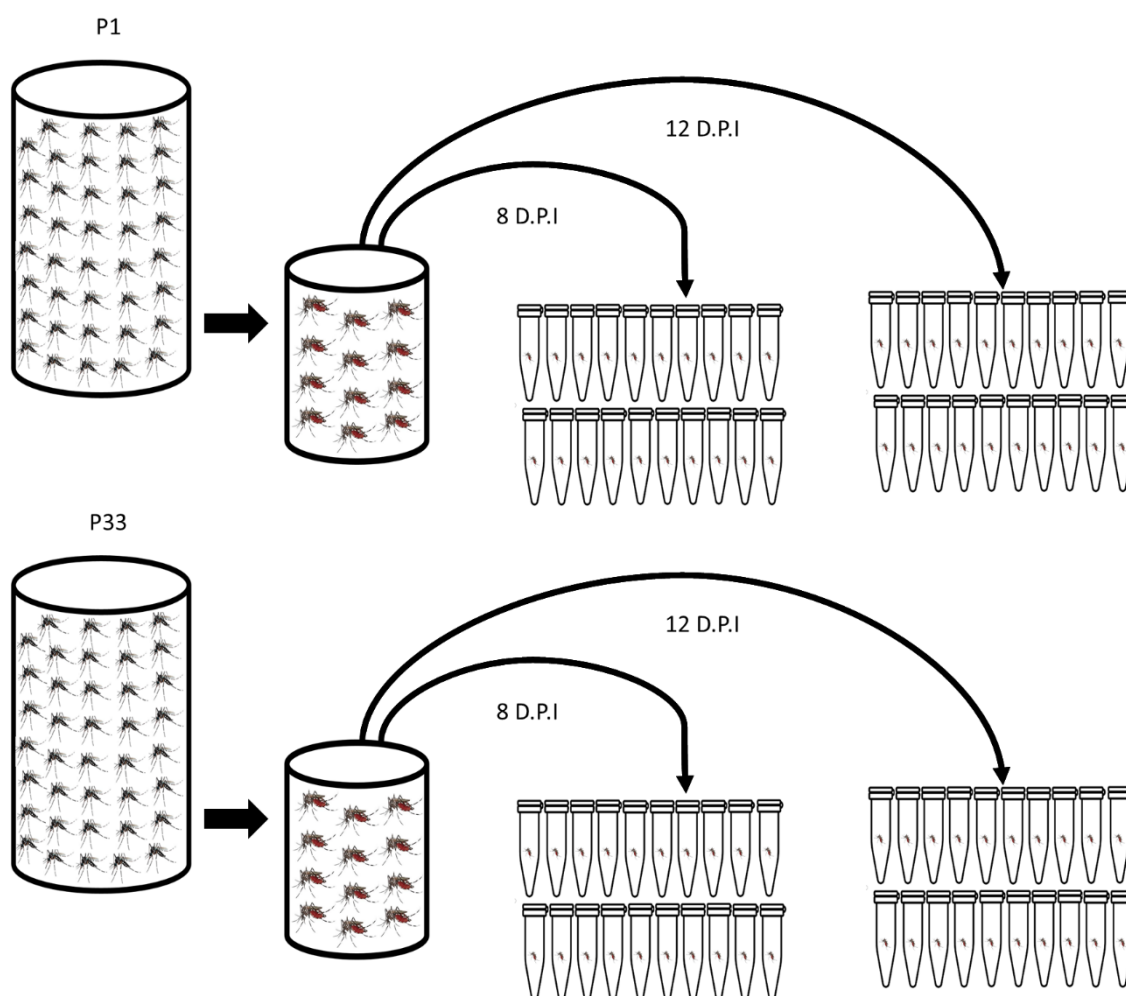


Figura 13 – Representação do experimento *in vivo*. Foram alimentadas artificialmente 100 fêmeas separadamente com os vírus da titulação do sobrenadante de P1 e P33. Feito isso, 50 fêmeas ingurgitadas foram selecionadas aleatoriamente e armazenadas. Foram retiradas 20 fêmeas de cada grupo nos determinados tempos. Fonte: a autora.

4.11.2.1 Maceração dos mosquitos

As fêmeas foram maceradas individualmente e utilizou-se o mosquito inteiro. Cada fêmea foi colocada em um microtubo de 2mL de fundo arredondado, contendo 5 μL de uma suspensão de MS2 (bacteriófago) e 300 μL de uma solução de maceração, composta por 1% de antibiótico Anti-Anti (Penicilina/estreptomicina/ Anfotericina B), 5% de soro fetal bovino e PBS 1X.

Em seguida, beads de aço inoxidável (QIAGEN) eram adicionadas a estes microtubos. Seguia-se então para a etapa de maceração utilizando o equipamento *TissueLyser LT* (QIAGEN), numa programação de 50 Hz por 5 minutos. Após esse procedimento, os microtubos eram centrifugados por 1 minuto e retirado 300µL desse sobrenadante que era transferido para outro microtubo e seguia para a extração de RNA.

4.11.2.2 Extração de RNA dos mosquitos macerados

A extração de RNA deu-se com a utilização do reagente Trizol® (Invitrogen™) que foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Em resumo: 250µL do macerado foi transferido para um microtubo de 1,5mL seguido de adição de 750µL de Trizol. Essa mistura foi homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foi adicionado 200µL de clorofórmio, seguido de uma nova homogeneização e incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação, os microtubos foram submetidos à centrifugação 12.000g por 15 minutos a 4°C. A parte aquosa foi transferida para um novo microtubo e neste microtubo foi adicionado 500 µL de isopropanol absoluto. Após nova homogeneização e incubação por 10 minutos, o microtubo foi novamente centrifugado a 12.000g por 10 minutos. Com isso foi retirado o isopropanol e adicionado 1mL de etanol 75% diluído em água livre de nucleases, em seguida, centrifugado a 7500g por 5 minutos a 4°C. Retirou-se o etanol cuidadosamente e foi deixado secar a temperatura ambiente por 20 minutos. O pellet de RNA foi ressuspendido em 40µL de água livre de nucleases e armazenado no freezer -80°C, até a utilização na reação de PCR tempo real.

4.12 Análises dos dados

Todos os dados foram analisados posteriormente com estatística descritiva representando as variações encontradas no genoma viral ao longo do processo de passagens em cultura de células C6/36. As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Prism® v 6.0. Os resultados dos testes de avaliação da competência viral foram comparados através do método de $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A análise de dados da quantificação relativa foi realizada através da ferramenta RQ disponível em Thermo Fisher na Plataforma Cloud (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/digital-science.html>). Os resultados dos ensaios *in vivo*: carga viral relativa detectados por RT-qPCR foram analisados com Teste exato de Fisher, a significância estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

As sequências foram editadas para remoção de fragmentos de baixa qualidade e montadas no Geneious com a ferramenta map to reference. Ao final cada sítio do contig foi analisado manualmente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultura de Células

As células de *Aedes albopictus* (C6/36) são utilizadas desde a década de 60 e são um modelo experimental essencial no estudo das interações de vírus e vetores em condições *in vitro* (WALKER, 2014).

Estas células são capazes de sobreviver de maneira independente em um ambiente que não tenha as mesmas condições do tecido que são provenientes (WALKER,2014) e são frequentemente utilizadas para isolamento de arbovírus, por esta razão foi a linhagem utilizada nesse estudo.

A amostra obtida do soro do paciente foi inoculada em uma monocamada de células C6/36. No tempo de 10 dias pós infecção o sobrenadante deste inóculo foi retirado e submetido a extração de RNA e RT-qPCR para detecção do ZIKV cujo resultado foi positivo com Ct de 12,99 mostrando que as células haviam sido permissivas a infecção e que o isolamento viral havia sido bem-sucedido.

Tal como observado em nosso trabalho, outros autores conseguiram isolar diversos arbovírus e o próprio ZIKV nesta linhagem de células (WALKER, 2014; BARRETO-VIEIRA, 2017; JASON, 2018).

Ao final do presente trabalho, foram realizadas 33 passagens do vírus em C6/36, em duas séries. Foi observado efeito citopático a partir da passagem P2 o qual podemos observar na figura 14. A monocamada de células da garrafa sem infecção e a garrafa com infecção, desde o primeiro inóculo até a passagem final P33 da série 1 e 2, podemos verificar que de uma monocamada com bastante células, há a redução e podemos notar o agrupamento dessas células e alongamento das mesmas.

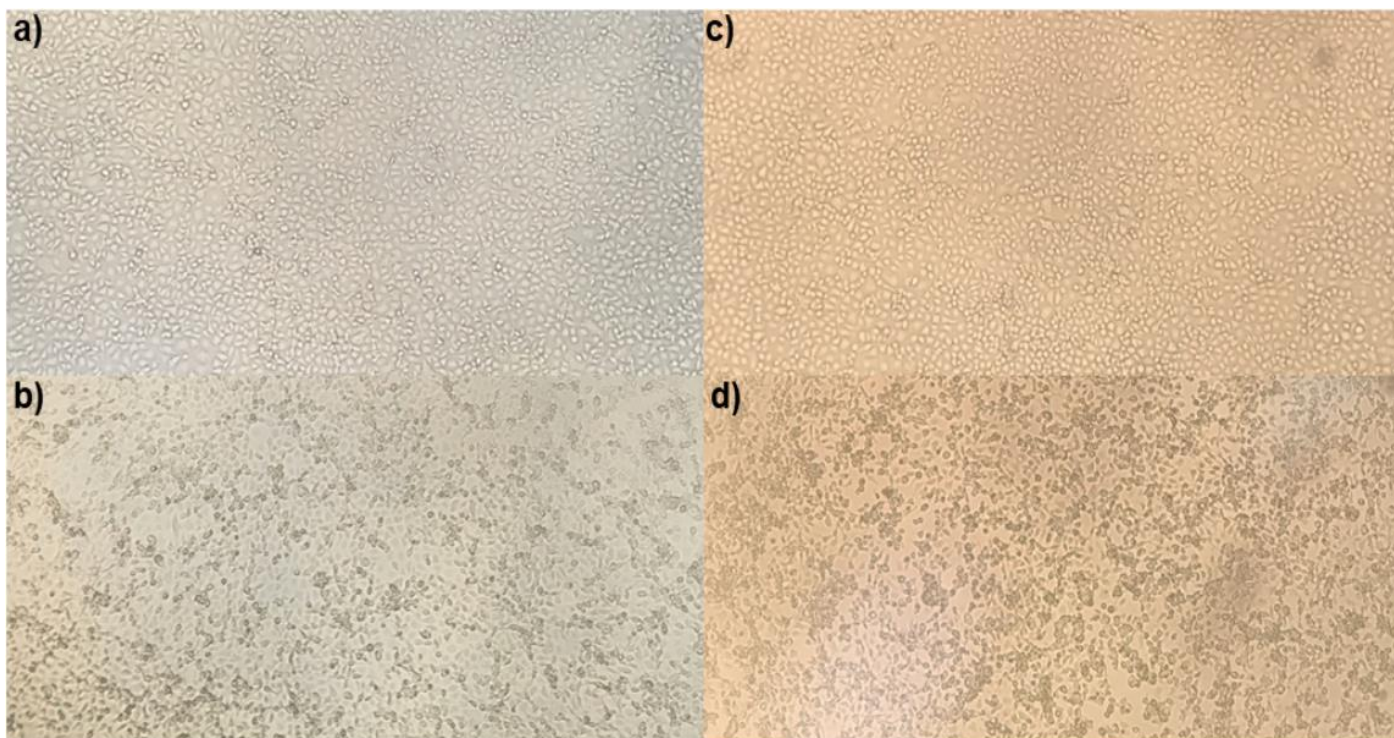


Figura 14 -Inóculo de P1 e P33. a) Mock do dia que foi realizado P2; b) Isolamento de ZIKV, P2 com 3 dias pós-infecção. c) Mock de P33; d) Células infectadas com P32, no 3º dia pós infecção.

Nossos resultados diferem de um estudo que avaliou a suscetibilidade de diferentes células ao vírus Zika, proveniente de um isolado de ZIKV de soro paciente. Nesse trabalho com 5 dpi em células C6/36, não foi observado efeito citopático apesar da carga viral ser progressiva (CHAN, 2016). Outros estudos demonstram o surgimento de efeito citopático com presença de sincícios em células C6/36 infectadas com ZIKV da linhagem asiática (CHAN, 2016; BARRETO-VIEIRA, 2017).

Um estudo monitorou os níveis relativos de RNA intracelular do ZIKV nas células C6/36 em diferentes tempos a fim de identificar o tempo que os níveis de replicação estavam mais altos, nesse trabalho houve aumento da carga viral ao passar dos dias atingindo 10^5 log com 120h pi, aumentando um log a cada 24 horas (XIN, 2017).

5.2 RT-qPCR em Tempo Real

As reações de RT-qPCR foram inicialmente realizadas neste trabalho para acompanhar os isolamentos virais. A cada cinco passagens do vírus nas células C6/36 foi realizada uma reação para verificar se os isolamentos estavam sendo bem-sucedidos. Ao término das passagens foi novamente utilizada esta metodologia para avaliação do *fitness*, estes resultados são apresentados no tópico de avaliação da competência viral.

A amostra utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi positiva para ZIKV na reação de RT-qPCR apresentando um Ct de 26,81. Após o isolamento primário (P1) do vírus presente nesta amostra em células C6/36 foi realizada nova reação de RT-qPCR e o Ct do isolado foi de 12,99.

Foram testadas também as passagens 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 33 de cada uma das séries de passagens, os resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Ct das passagens da Série 1 e 2.

C6/36	Série 1 Threshold Cycle (Ct)	Série 2 Threshold Cycle (Ct)
P5	14,28	14,31
P10	12,12	13,32
P15	13,36	12,51
P20	14,31	14,57
P25	12,96	13,01
P30	13,48	13,57
P33	13,11	13,74

Não foi observada uma diferença significativa entre os Cts das diferentes passagens, entretanto, como este experimento era apenas para verificar a eficiências das infecções, os valores de Ct não estão normalizados frente a um controle endógeno, então não podemos afirmar, com este resultado, que não há realmente diferença no número de cópias de material genético detectado.

5.3 Sequenciamento

O material genético obtido da amostra 0305JFMB (P0) e das passagens P1, P30.1 e P30.2, foram submetidos a PCR convencional para amplificação do genoma completo. Foram obtidos com sucesso os nove amplicons de cada uma dessas amostras. Todos os *amplicons* foram previamente purificados sendo submetidos a reação de sequenciamento capilar.

Após as reações de sequenciamento conseguimos obter o genoma completo de P0, P1, P30.1 e P30.2. As sequências obtidas foram analisadas e utilizadas para alinhamento no software *Geneious*. A sequência obtida de P0 foi inicialmente submetida ao alinhamento nucleotídico, utilizando a sequência de referência para ZIKV depositada no GenBank sob o número de acesso NC_035889. Posteriormente a sequência finalizada de P0 serviu como referência para o alinhamento e identificação de mutações das demais sequências obtidas neste trabalho. A tabela 5 reúne as mutações encontradas quando comparamos a sequência de P0 com P1, P30.1. e P30.2, visto as mutações observadas em P30, estendemos até a passagem P33.

Tabela 5 - Mutações encontradas no genoma das passagens P0, P1 e P33. Em negrito estão destacadas as mutações ocorridas.

nt pos	aa pos	pos cód	P0		P1		P30.1		P30.2		P33.1		P33.2		Tipo	PTN
			códon	aa	códon	aa	códon	aa	codon	aa	Codon	aa	codon	aa		
3038	977	3	GTT	V	GTY	V	GTC	V	GTC	V	GTC	V	GTC	V	S	NS1
4200*	1365	1	YTG	L	TTG	L	TTG	L	TTG	L	TTG	L	TTG	L	S	NS2A
5841	1912	1	GAC	D	GAC	D	GAC	D	GAC	D	RAC	D/N	RAC	D/N	NS	NS3
6227*	2040	3	AGA	A	AGR	A	AGR	A	AGR	A	AGR	A	AGR	A	S	NS3
6274	2056	2	ATA	I	ATA	I	AYA	I/T	AYA	I/T	AYA	I/T	AYA	I/T	NS	NS3
7884*	2593	1	TCC	S	CCC	S	CCC	P	CCC	P	CCC	S	CCC	S	NS	NS5
9208	3034	2	CAA	Q	CAA	Q	CAA	Q	CCA**	P	CAA	Q	CAA	Q	NS	NS5

* Mutações em relação ao P0; ** Somente observado em P30.2.

Estudos filogenéticos demonstraram que, após o surgimento do ZIKV em Uganda, o vírus se espalhou e evoluiu para três linhagens (oeste da África, leste da África e asiática) que parecem estar relacionadas a complicações clínicas distintas no hospedeiro humano (ZHU, 2016). A caracterização genômica do ZIKV sugere que, durante a disseminação geográfica, a linhagem asiática acumulou várias mutações que podem ter influenciado na virulência e ocorrência de novas complicações clínicas associadas às infecções por ZIKV durante o surto de 2015/2016 (YOKOYAMA, 2017).

Estudos suportam que o ZIKV, durante sua evolução, vem acumulando alterações genéticas que podem ter garantido alguma vantagem seletiva para a adaptação do vírus e a disseminação epidêmica da linhagem asiática. Esses trabalhos investigaram experimentalmente o papel de algumas dessas substituições de aminoácidos, e foi sugerida uma correlação entre alterações genéticas e o aumento da patogenicidade em surtos recentes (YUAN, 2017; XIA, 2018).

Em nosso trabalho de modo geral, ocorreram sete mutações, nas regiões que codificam para as proteínas não estruturais. Três Mutações sinônimas, aquelas que não modificam o aminoácido foram observadas, uma presente na região que codifica para a proteína NS1 no nucleotídeo 3038. Outras duas mutações ocorreram, uma em relação ao plasma, porém nas passagens em células não foram observadas, respectivamente nas posições 4200 que codifica para a proteína NS2A e a terceira mutação, no nucleotídeo 6227 que resulta na proteína NS3, nesse caso na primeira passagem houve uma população mista que permaneceu até a última passagem.

Mutações que não alteram as sequências de aminoácidos codificadas pelos genes, são neutras em relação a mecanismos, mas têm impacto nas características estruturais dos RNAs (TUBIANA, 2015). A proteína NS1 desempenha um papel na patogênese da infecção por flavivírus através da interação com imunidade inata (AKEY, 2014). Um estudo mostrou que após o ano de 2012, ocorreu uma mutação não sinônima no gene da proteína NS1 do ZIKV mudando de uma Alanina para uma Valina (A188V) na linhagem asiática, aumentando a infecção no mosquito e em cultura celular (LIU, 2017b). Outro trabalho demonstrou que a NS1 da linhagem asiática, isolada em 2015 do Suriname, inibiu a produção de IFN- β *in vitro* (WU, 2017).

A proteína NS2A tem papel na montagem de flavivírus, está envolvida na replicação de RNA e na modulação da resposta antiviral do hospedeiro (LEUNG, 2008). Estudos demonstraram que mutações no gene da proteína NS2A do vírus do oeste do Nilo, facilitaram a persistência da replicação *in vitro* e levou a atenuação na replicação viral *in vitro* e *in vivo* (WICKER, 2006; ROSSI, 2007). Um estudo confeccionou um clone infeccioso contendo uma única substituição de aminoácido (A175V) na proteína NS2A. Essa mutação levou a redução na síntese de RNA viral em culturas de células de vertebrados e atenuação *in vivo* em camundongos. No entanto não foi verificado o impacto desta mutação em invertebrados *in vitro* e *in vivo* (JURADO, 2018).

A primeira mutação não sinônima, que muda o aminoácido, ocorreu em relação ao plasma no nucleotídeo 7884 no aminoácido 2593, onde temos uma Serina um aminoácido polar, que logo na primeira passagem em cultura de células modifica para um aminoácido apolar, Prolina, na região que codifica para proteína NS5. Outra mutação não sinônima observada foi no nucleotídeo 6274, onde no plasma o aminoácido era uma Isoleucina (apolar) e na passagem 30 observamos uma população mista, para Treonina, um aminoácido polar.

Baseado nesses resultados aumentamos o número de passagens afim de verificar a sequência que seria majoritária. Com isso uma nova mutação não sinônima foi detectada no nucleotídeo 5841 no aminoácido 1912 que codifica para a proteína NS3, de Ácido aspártico para Asparagina. A última mutação que observamos foi no nucleotídeo 9208, aminoácido 3034, alteração que, no entanto, foi somente verificada na réplica de P30, o que pode ter ocorrido por conta de surgimento de alguma população.

Uma cepa asiática isolada no Japão apresentou uma mutação de nucleotídeo guanina-adenina na proteína da membrana, resultando em tamanhos menores de placa e menos virulência em células C6/36 após do que outras cepas asiáticas (KATO, 2017).

Um estudo com o vírus do Oeste do Nilo, identificou uma substituição de aminoácido T249P na helicase NS3, em uma cepa de baixa virulência. O suficiente para gerar um fenótipo virulento *in vivo*, demonstraram que o mesmo local (NS3-249) estava sujeito à evolução adaptativa (BRAULT, 2007). Em outro estudo foi demonstrado um alto nível de apoptose em culturas de células Vero infectadas com DENV, causado pela expressão de NS2B/NS3 proativa,

enquanto a expressão de NS2B/NS3 pro-inativa, contendo uma mutação His51 para Ala, reduziu significativamente a apoptose (SHAFEE, 2003). A região da proteína NS5 é reconhecidamente mais conservada na literatura para flavivirus por conta da RNA polimerase dependente de RNA (GRANT, 2016), entretanto em nosso estudo ocorreu uma substituição não sinônima no nucleotídeo 7775. Estudos filogenéticos mostraram que as sequências de proteínas NS5 de isolados de Zika de diferentes países contém sinais filogenéticos únicos (WANG, 2016), sugerindo que a mutação em NS5 pode trazer mudanças na replicação do RNA desde a substituição hidrofílica à hidrofóbica (ADIGA, 2016).

Villordo verificou o impacto de mutações em populações de DENV em células de mosquito e de mamíferos por 20 passagens consecutivas. 10 variantes diferentes que continham mutações pontuais e deleções foram significativamente enriquecidas em células de mosquitos. Em contraste, quando o vírus foi sucessivamente passado em células de mamífero (P10 e P20), apenas poucas variantes virais foram selecionadas (VILLORDO, 2015).

5.5 Avaliação da Competência viral (*Fitness*)

Para os ensaios de avaliação da competência viral utilizamos P1 e P33. Inicialmente verificamos se os títulos virais presente nessas passagens eram iguais. Para isso, foi realizada a extração de RNA em duplicata dos sobrenadantes de P1 e P33.1. No ensaio de RT-qPCR, foram normalizadas frente a um controle, o RPS, num ensaio realizado em triplicata técnica. O resultado da expressão relativa ($\Delta\Delta Ct$) onde assumisse que maior que 1 indica maior carga viral relativa e abaixo de 1, menor carga viral relativa, mostrou que P33 estava com maior carga viral relativa (4, 28) em relação a P1.

A quantificação relativa de RNA viral por RT-qPCR (carga viral) que tem sido utilizada por outros autores (COFFEY, 2011) inclusive para realizar experimentos de *fitness*. Coffey e colaboradores utilizaram essa metodologia afim de avaliar o *fitness* do vírus Chikungunya após ser inoculado em células de mamífero e mosquito.

No entanto é relevante frisar que os resultados encontrados no *fitness* não podem ser considerados compatíveis com a realidade das infecções naturais, uma vez que foram realizados em condições *in vitro* na titulação não foram consideradas as partículas infecciosas.

5.4.1 *in vitro*

5.4.1.1 Cinética da Carga Viral e Expressão Relativa nas células

Os vírus de P1 e P33 titulados por RT-qPCR foram inoculados em placa em duplicata. Nos tempos pré-estabelecidos foram recolhidos separadamente, o sobrenadante e as células de cada poço que foram submetidos a extração de RNA viral e posterior quantificação relativa por RT-qPCR em triplicata.

No gráfico 1 estão demonstrados os valores de Ct do experimento do *fitness* em função das horas baseada na média de Ct das replicatas técnicas do pellet em função dos 5 tempos submetidos.

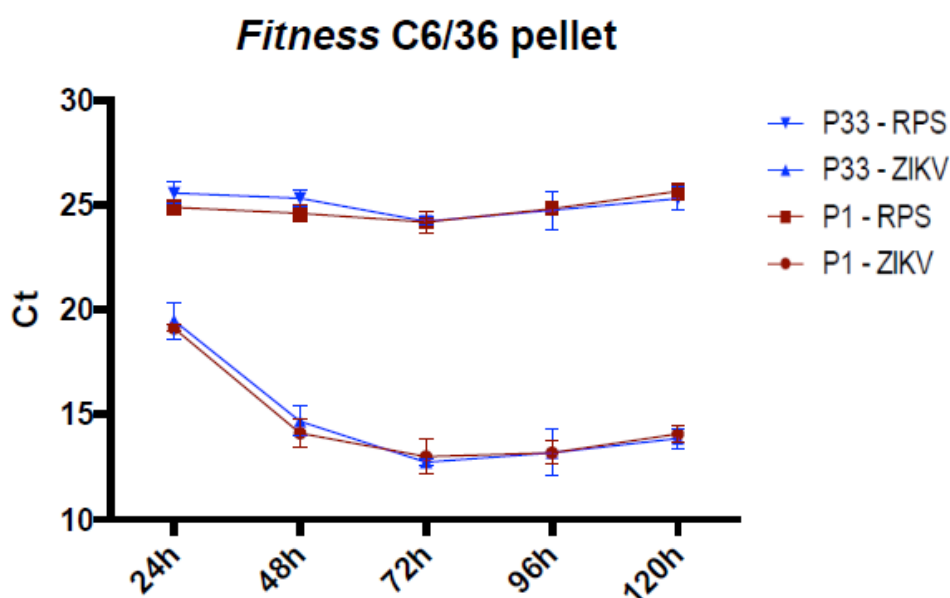


Gráfico 1 – Cinética da Carga Viral nas células. Cada ponto representa a média do Ct da triplicata de P1 e P33 nos tempos estipulados. O comportamento da cinética de produção de partículas virais foi semelhante em ambas passagens, e o controle endógeno no pellet RPS se manteve estabilizado. Gráfico gerado pelo software Graphpad prism 6.

As células C6/36 foram utilizadas no estudo de Xin, onde foram investigadas as proteínas hospedeiras envolvidas no processo de infecção pelo ZIKV, uma cinética da replicação foi gerada, das partículas no interior celular. Eles verificaram que no tempo de 96 horas pós infecção foi o tempo de maior replicação (XIN, 2017).

No nosso trabalho, com 24 horas pós infecção, a carga viral medida através do Ct tanto de P1 quanto P33 teve comportamento semelhante. Em

ambas passagens a carga viral aumentou no tempo de 48 horas. A partir do tempo de 72h elas se igualam e permanecem assim até o tempo de 120 horas.

A queda de Ct observada no tempo de 72h quando comparada com 24h foi de cerca de 5 Cts, vale ressaltar que a cada variação de 3.3 Cts para baixo, há um aumento de 10 vezes do número de cópias do material genético detectado. Com 72 horas observamos o pico de produção viral no pellet celular para ambos os vírus, P1 e P33. Com 96 horas pós infecção manteve o mesmo comportamento e em 120 horas começaram a diminuir os títulos virais, observado com o aumento do Ct.

Os resultados do experimento em triplicata foram importados em formato eds. para a Thermo Fisher Cloud onde uma ferramenta de quantificação relativa (RQ) gerou os gráficos pelo algoritmo $\Delta\Delta Ct$.

Podemos observar que no tempo de 24h, P33 estava com uma carga viral 1,42 vezes maior que P1. No entanto com 96 horas P1 e P33 tem expressões praticamente iguais e com 120 horas.



Gráfico 2 - Expressão relativa de P1 e P33 nas células. Neste gráfico estão dispostas a expressão para ZIKV P33 em relação a P1 Com 24horas, P33 está mais expresso no interior celular em relação a P1. Gráfico gerado pela Thermo Fisher Cloud.

5.4.1.2 Cinética da Carga Viral e Expressão Relativa no Sobrenadante

Os sobrenadantes de P1 e P33 colhidos do experimento em réplicas foram submetidas as mesmas análises que as células. Os Cts estão demonstrados no gráfico 4.

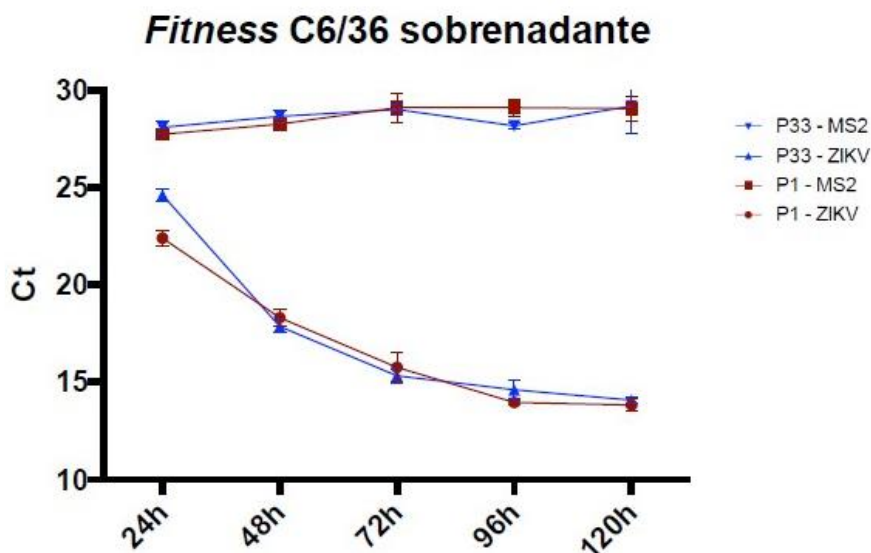


Gráfico 3 – Cinética da Carga Viral no Sobrenadante. Cada ponto representa a média do Ct da triplicata de P1 e P33 nos tempos estipulados. O comportamento da cinética de produção de partículas virais demonstrou que 24h pós infecção a média de ct das triplicatas do sobrenadante de P33 tinha cargas virais menores pós infecção em relação a P1. O controle endógeno no sobrenadante, o MS2 não variou. Gráfico gerado pelo software Graphpad prism 6.

Nesse experimento o MS2 foi utilizado como controle endógeno. Em 24 horas pós infecção a média de Ct de P33 é tardio com média entre 25, enquanto de P1 tem média 23 de Ct. Em 48 horas pós infecção há uma queda de Ct, onde ambas as passagens têm o mesmo comportamento enquanto a média de Ct, entre 16. Com 72 horas, 96 horas e 120 horas há diminuição em média de 1 Ct entre os tempos, onde em 120 horas P1 e P33 estão em média com Ct de 14.

Ao avaliar a expressão relativa do sobrenadante no gráfico 4, observamos que em 24 horas pós infecção P1 estava com 1,00 maior carga viral relativa em relação a P33 com 0,37. No entanto em 48 horas após a infecção P33 está com maior carga viral relativa, com 2,40 mais que P1 que permanece com a carga viral relativa com 1,00 até 120 horas. Esse comportamento em P33 tem uma queda em 72 horas, onde encontrasse 1,42, em 96 horas está com a carga viral relativa de 0,33 e em 120 horas com 0,93 menor em relação a P1.



Gráfico 4 - Expressão relativa de P1 e P33 no sobrenadante. Neste gráfico estão dispostas a expressão para ZIKV de P1 e P33 e o MS2 em função do tempo. Em 24 horas, P1 está mais expresso, no entanto em 48 horas há uma inversão onde P33 encontra-se mais expresso, o que permanece até 72 horas pós infecção. P1 tem sua expressão aumentada em 96 horas enquanto P33 está diminuindo. Em 120 horas é quando ambas se igualam. Gráfico gerado pela Thermo Fisher Cloud.

5.4.2 *in vivo*

Quando analisamos o impacto das mutações ocorridas em P33 adaptado em cultura de células de *Aedes albopictus in vitro* numa espécie diferente, *Aedes aegypti in vivo*, observamos o número reduzido de positivos do grupo alimentado com P33. No gráfico 5, dos indivíduos com 8 dias pós-infecção (dpi) dezessete de vinte foram positivos de P1 no RT-qPCR e em 12 dpi, quatorze de vinte. Dos alimentados com P33, com 8 dpi, dez foram positivos dos vinte assim como em 12 dpi.

Uma mutação de base única no genoma do vírus Chikungunya levou a um aumento na sua capacidade de infectar o *Aedes albopictus*, gerando assim uma grande epidemia na Ásia, uma vez que este vetor é abundante nesta região. Este caso mostra que mutações podem ser determinantes inclusive para o aumento da capacidade de infecção, no qual houve ganho de competência em um vetor (TSETSARKIN, 2007).

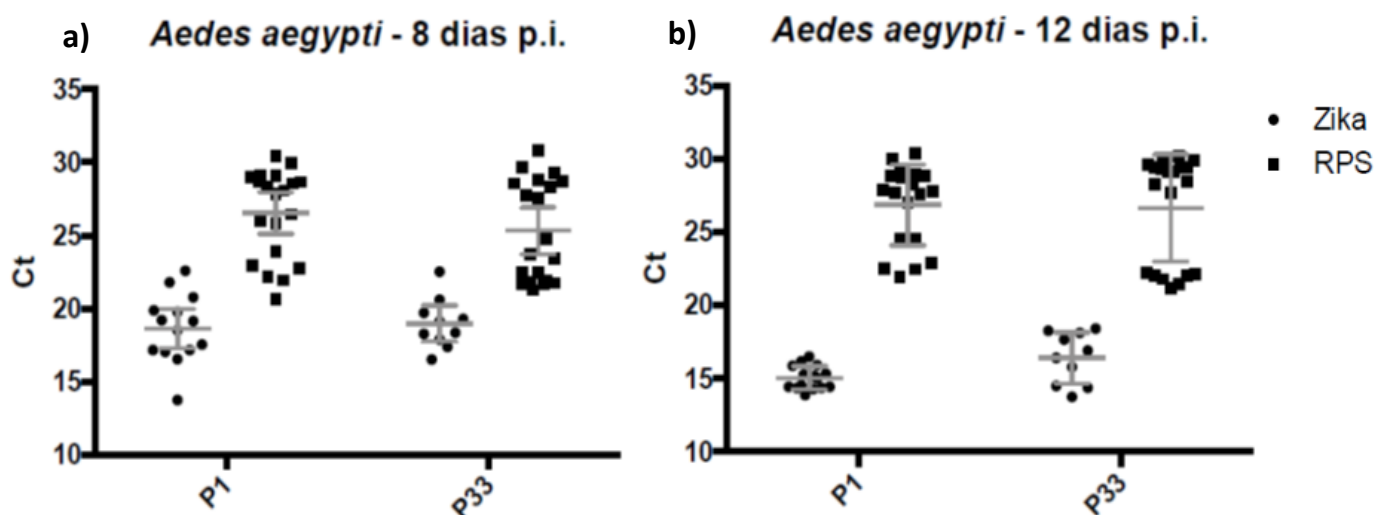


Gráfico 5 – Médias de Ct dos mosquitos alimentados com P1 e P33. A) representando média de Ct dos mosquitos infectados. 8 dias pós infecção. Neste experimento de um total de 20 mosquitos alimentados com P1, 17 foram positivos e de P33, 10 foram positivos de 20. b) Média de Ct dos alimentados com P1, 14 foram positivos dos 20. De P33, 10 de 20.

Foi realizado o teste exato de fisher, no gráfico 6 observamos que não há significância estatística em 8 dpi entre os valores de positivos de P1 (quatorze) de P33 (dez). Dos indivíduos com 12 dpi P1 (dezessete) e P33 (dez) o teste exato de fisher mostrou significância estatística, $p < 0,04$, odds ratio 5,667.

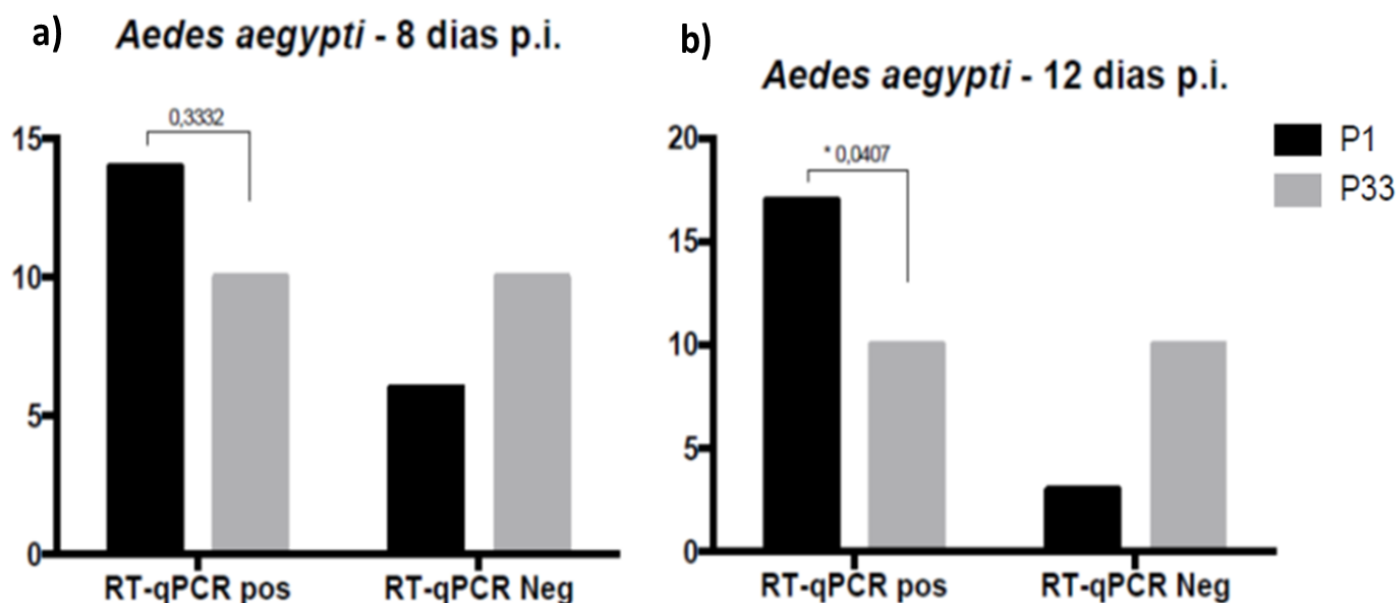


Gráfico 6 – Estatística do número de positivos e negativos *in vivo*. O teste exato de fisher demonstrou que nos indivíduos positivos de P1 e P33 com 8 dias D.P.I, não houve significância estatística. No entanto com 12 dias entre os dezessete indivíduos positivos de P1 e os dez de P33, houve significância estatística. Valores significativamente distintos ($p\text{-valor} \leq 0,04$). Gráfico gerado pelo software Graphpad prism 6.

Ao longo dos 12 dias, que foi tempo máximo de recolhimento dos mosquitos infectados, 5 indivíduos infectados com P33 haviam morrido. Enquanto apenas 1 de P1. No entanto essa mortalidade não é refletida nos resultados de carga viral relativa. No gráfico 7 a carga viral relativa dos indivíduos positivos frente ao controle endógeno RPS, demonstram que P1 apresentava carga viral relativa maior em relação a P33, e manteve essa condição em 12 dpi.

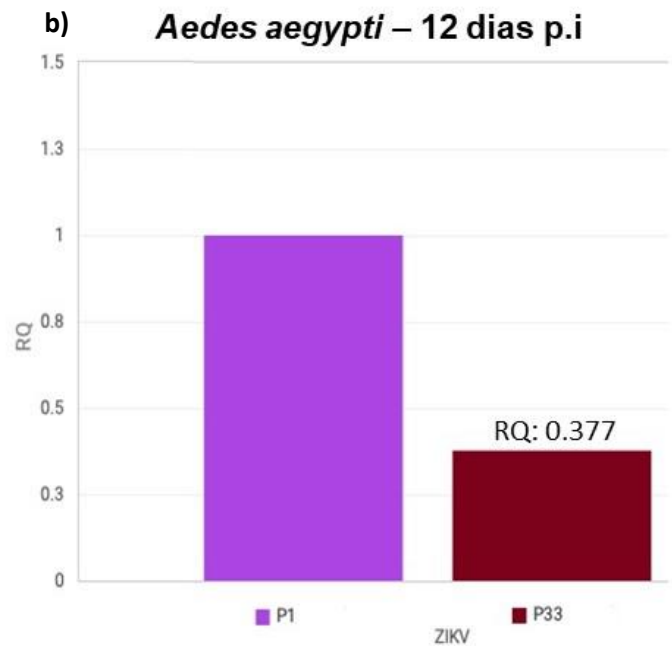
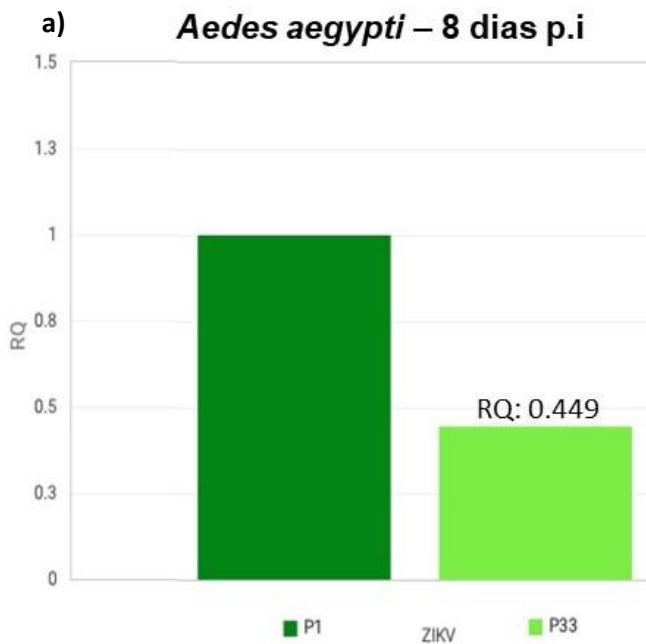


Gráfico 7 – Carga viral relativa do experimento *in vivo*. a) com 8 dpi a carga viral relativa nos mosquitos infectados com P33 era 45% do que foi observado em P1. b) Em 12 dpi a carga viral relativa de P33 diminuiu em relação ao 8º dia, com 37% do que foi observado para P1. Gráfico gerado pela Thermo Fisher Cloud.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho o vírus Zika foi isolado e passado continuamente em cultura de células C6/36, o que deu origem a 33 gerações em réplicas do vírus. Amostra de paciente, P1, P30.1, P30.2, P33.1 e P33.2 foram escolhidas para obtenção do genoma completo. Foram observadas sete mutações com o sequenciamento capilar.

Não podemos excluir outras mutações por conta de regiões de baixa qualidade ou outras mutações que poderiam ser observadas no sequenciamento de auto desempenho, como NGS – *Next Generation Sequencing*, afim de avaliar o surgimento de subpopulações.

Uma mudança de aminoácido (2593) foi observada desde P1 em relação a P0 (plasma) que se manteve. Nenhuma mutação nas regiões 5'UTR, 3'UTR, Capsídeo, prM, Envelope, NS2B, NS4A e NS4B foram observadas.

O *fitness in vitro* nas células demonstrou aumento das cópias de RNA viral de P33 em 24/48/72 horas pós infecção. O *fitness in vitro* no sobrenadante mostrou que P33 em 48/72 horas teve maior produção no sobrenadante e em 96 horas diminuiu.

Os resultados deste trabalho reforçam a necessidade de se comparar o comportamento de P1 e P33 em outros sistemas biológicos, outras linhagens celulares, visto que as proteínas de ZIKV podem influenciar a forma que os componentes virais interagem com a célula hospedeira e, assim, podem modular sua infectividade em diferentes substratos celulares.

O *fitness in vivo* em *Aedes aegypti* em ambos os tempos a carga viral relativa de P33 foi inferior à de P1. Sugerimos comparar P1 e P33 *in vivo* com *Aedes albopictus*, que teve o vírus adaptado a sua célula.

Avaliamos a expressão relativa baseada na carga viral, com isso esses experimentos do *fitness* serão repetidos com os vírus titulados por citometria de fluxo ou outro método que mensure vírus infeccioso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIGA, R. Phylogenetic Analysis of the NS5 Gene of Zika Virus. **Journal of Medical Virology**, 88:1821–1826, 2016.

AKEY D. L. *et al.* Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. **Science**, 343(6173):881-5, 2014.

ATKINSON B; HEARN P; AFROUGH B; *et al.* Detection of Zika virus in semen. **Emerging Infectious Diseases journal**, 22 (5): 940. 2016.

BALM *et al.* A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **Journal of Medical Virology**, 84(9):1501–1505. 2012.

BARRETO-VIEIRA D.F. *et al.* Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. **PLOS ONE**, 12(9). 2017.

BARRETO-VIEIRA, D.F., BARTH, O.M., SILVA, M.A., *et al.* Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 111, 532–534.2016.

BOS, S; VIRANAICKEN, W; TURPIN, J; *et al.* The structural proteins of epidemic and historical strains of Zika virus differ in their ability to initiate viral infection in human host cells. **Virology**, 516, 265–273. 2018.

BRAND, C. *et al.* Organization of the *Flavivirus* RNA replicase complex. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, 2017.

BRASIL, P. *et al.* Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. **The Lancet**, v. 387, n 10026, p.1482, 2016.

BRAULT AC, HUANG CY, LANGEVIN SA, *et al.* A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. **Nat Genet**, 39:1162–6 10.1038/ng2097, 2007.

BROOKS, R. B. *et al.* Likely sexual transmission of Zika virus from a man with no symptoms of infection. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 65, n. 34, p. 915-916, 2016.

CALVET, G; AGUIAR, R S; MELO, A S; *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis**, 16(6):653–60.2016.

CAMPOS, G.; BANDEIRA, A.; SARDI, S. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1881, 2015.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**.387, 1531–1539, 2016.

CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. **Lancet**. (16)00651-6. 2016.

CHAMBERS TJ, HAHN CS, GALLER R, *et al*. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews of Microbiology**, 44:649-488, 1990.

CHAN, J.F.; YIP, C.C.; TSANG, J.O.; *et al*. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: Implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. **Emerg. Microbes Infect**, 5, e93. 2016.

CIOTA A. T, KRAMER L. D. Insights into Arbovirus Evolution and Adaptation from Experimental Studies. **Viruses**, 2(12):2594-2617. 2010.

Ciota AT, Bialosuknia SM, Zink SD, Brecher M, Ehrbar DJ, Morrissette MN, *et al*. Effects of Zika Virus Strain and Aedes Mosquito Species on Vector Competence. **Emerg Infect Dis**; 23: 1110–1117. 2017.

CIOTA AT, NGO KA, LOVELACE AO, *et al*. Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus. **J Gen Virol**, 88: 865–874, 2007.

CIOTA, A. T. *et al*. The evolution of virulence of West Nile virus in a mosquito vector: implications for arbovirus adaptation and evolution. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 71, 2013.

COFFEY L; FORRESTER N, TSETSARKIN K; *et al*. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiol**, 8: 155–176. 2013.

CUMBERWORTH SL; BARRIE J A; CUNNINGHAM M E; *et al*. Zika virus tropism and interactions in myelinating neural cell cultures: CNS cells and myelin are preferentially affected. **Acta Neuropathologica Communications**, 5:50. 2017.

DA COSTA, C.F., DA SILVA, A.V., DO NASCIMENTO, V.A., *et al*. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of Aedes aegypti in the Brazilian Amazon. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 12, e0006594. 2018.

DE ARAUJO TV, RODRIGUES LC, DE ALENCAR XIMENES RA, *et al*. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **Lancet Infect Dis**. 2016.

DE BORBA L; STROTTMANN D M; DE NORONHA L; *et al*. Synergistic interactions between the NS3 (hel) and E proteins contribute to the virulence of dengue virus type 1. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 6: e1624. 2012.

DE PAULA, S. O; FONSECA, B. A. L. Dengue: A review of the Laboratory Tests a Clinician Must to Achieve a correct Diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 8: 390 – 398, 2004.

DECKARD, D. T. *et al*. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus—Texas, January 2016. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.** 65, 372–374. 2016.

DICK GW. Zika virus. (II). Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 46:521–534, 1952.

DICK, G. W. A. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annu Rev Microbiol**, 51: 151–178.1997.

Domingo E. Mechanisms of viral emergence. **Vet. Res.** 41:38. 2010.

DONALD CL; BRENNAN B; CUMBERWORTH SL; *et al.* Full genome sequence and sfRNA interferon antagonist activity of Zika virus from Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**,10:e0005048. 2016.

DRIGGERS, R W; HO, C Y; KORHONEN, E M; *et al.* Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. **The New England Journal of Medicine**, 374, 2142–2151.2016.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, p. 2536–2543, 2009.

DUFFY, S; SHACKELTON, L, A; HOLMES, E, C, *et al.* Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nat. Rev. Genet.** 9: 267 – 76, 2008.

DUPONT-ROUZEYROL, M. *et al.* Infectious Zika viral particles in breastmilk. **The Lancet**, v. 387, n. 10023, pp. 1051. 2016.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **The Journal of hygiene**, v. 83, p. 213–219, 1979.

FARIA, N.R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, 352, 345-349, 2016.

FAYE, O. *et al.* Molecular Evolution of Zika virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.

FERREIRA M.L.B , Brito C.A.A, Moreira A.J.P, *et al.* Guillain-Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with Zika virus infection in Brazil: detection of viral RNA and isolation of virus during late infection. **Am J Trop Med Hyg**, 97:1405-9. 2017.

FITZPATRICK KA, DEARDORFF ER, Pesko K, Brackney DE, Zhang B, Bedrick E, Shi PY, Ebel GD. Population variation of West Nile virus confers a host-specific *fitness* benefit in mosquitoes. **Virology**; 404: 89–95, 2010.

FORRESTER NL; COFFEY LL; WEAVER S.C. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and *fitness* during mosquito transmission. **Viruses**, 6: 3991-4004. 2014.

- FOY, B. D. *et al.* Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.
- FREIRE, C. C. M. *et al.* Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans. **bioRxiv**, v. 2015, n. August, p. 1–8, 2015.
- GATHERER, D. *et al.* Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **J Gen Virol**, 97:269–73, 2016.
- GÖERTZ GP, FROS JJ, MIESEN P, VOGELS CBF, *et al.* Noncoding subgenomic flavivirus RNA is processed by the mosquito RNA interference machinery and determines West Nile virus transmission by *Culex pipiens* mosquitoes. **J Virol**.90: 10145–10159. 2016.
- GOERTZ GP; ABBO SR; FROS JJ. Functional RNA during Zika virus. **Virus Research**, 2;254:41-53, 2018.
- GRANT, A; *et al.* Zika virus targets human STAT2 to inhibit Type I interferon signaling. **Cell Host Microbe**, 2016.
- GUZMAN, M.G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nat. Rev. Microbiol.** 8 Suppl, S7–S16. 2010.
- HADDOW AJ; WILLIAMS MC; WOODALL JP. Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. **Bull World Health Organ**, 31:57–69. 1964.
- HADDOW, A.D. *et al.* Genetic Characterization of Zika virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**,6(2): e1477, 2012.
- HAMEL R; DEJARNAC O; WICHIT S; *et al.* Biology of Zika virus Infection in Human Skin Cells. **J Virol**, 89:8880–8896. 2015.
- HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347–1350, 2009.
- HIMMELSBACH, K.; HILDT, E. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. **World J. Virol**, 10–20. 2018.
- HOLMES, E.C. & TWIDDY, S.S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Inf. Genetics Evol.** 3, 19–28. 2003.
- HUMPHREYS, G.O., WILLSHAW, G.A., AND ANDERSON, E.A. A simple method for precipitation of large quantities of pure plasmid DNA. **Biochim. Biophys. Acta.** 383: 457-463. 1975.
- JASON, R. M. *et al.* Analysis of the *Aedes albopictus* C6/36 genome provides insight into cell line utility for viral propagation, **Giga Science**, 7, 18, 1–13, 2018.

JERZAK GV, BERNARD K, KRAMER LD, *et al.* The West Nile virus mutant spectrum is host-dependant and a determinant of mortality in mice. **Virology**, 360: 469–476, 2007.

JURADO, A K, *et al.* Zika virus productively infects primary human placenta-specific macrophages. **JCI Insight**, 1(13): e88461, 2016.

Kato, F. *et al.* Characterization of large and small-plaque variants in the Zika virus clinical isolate ZIKV/Hu/S36/Chiba/2016. **Sci. Rep.** 7, 16160. 2017.

KUNO G, CHANG GJ, TSUCHIYA KR, KARABATSOS N, CROPP CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **J Virol.** 72:73–83. 1998.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LANCIOTTI, R.S., LAMBERT, A.J., HOLODNIY, M., SAAVEDRA, S. & SIGNOR, L. Phylogeny of Zika virus in western hemisphere, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, 22, 933–935.2016.

LEE, I. *et al.* Probing Molecular Insights into Zika Virus–Host Interactions. **Viruses**, 10, 233, 2018.

LEUNG, JY *et al.* The role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **J. Virol**, 82, pp. 4731-4741, 2008.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. *Flaviviridae: the viruses and their replication.* **Fields Virology**, p. 1101– 1152, 2007.

LIU ZY; Yu JY; HUANG XY; *et al.* Characterization of cis-acting RNA elements of Zika virus by using a self-splicing ribozyme-dependent infectious clone. **Journal of Virology**, 91:e00484-17. 2017a.

LIU, Y. *et al.* Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature**, 545, 482–486, 2017b.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} **Method. Methods** (San Diego, Calif.), v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MARCONDES, C. B; XIMENES, M. F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 49(1):4-10, 2016.

MCCARTHY M. First US case of Zika virus infection is identified in Texas. **BMJ**, 352:i212. 2016.

MEAD, P. S. *et al.* Zika virus shedding in semen of symptomatic infected men. **N. Engl. J. Med.** 378, 1377–1385, 2018.

MENESES JA, ISHIGAMI AC, MELLO LM, ALBUQUERQUE LL, BRITO CAA , CORDEIRO MT, et al. Lessons learned at the epicenter of Brazil's congenital Zika epidemic: evidence from 87 confirmed cases. **Clin Infect Dis**, 64:1302-8. 2017.

MICHLMAYR D, ANDRADE P, GONZALEZ K, BALMASEDA A, HARRIS E. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. **Nat Microbiol**. 2: 1462–1470. 2017.

MLADINICH, M.C; SCHWEDES, J; MACKOW, E.R. Zika virus Persistently Infects and Is Basolaterally Released from Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **MBio**, 8, e00952-17. 2017.

MLAKAR J; KORVA M; TUL N. *et al.* Zika virus Associated with Microcephaly. **The New England Journal of Medicine**. 374(10):951–8. 2016.

MUSSO D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**. 19(14). 2014.

MUSSO D. *et al.* Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**. 21:359–61, 2015.

MUSSO, D. *et al.* Molecular detection of Zika virus in blood and RNA load determination during the French Polynesian outbreak. **J. Med. Virol**. 89, 1505–1510. 2017.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, 2016.

OAKS, S.C., JR., SHOPE, R.E., LEDERBERG, J. Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States. National Academies Press: Washington, DC, USA. ; **Institute of Medicine, Committee on Emerging Microbial Threats to Health**. 1992.

OFFERDAHL D K; DORWARD D W; HANSEN B T; *et al.* Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and Aedes albopictus cell lines. **Virology**, 501:54–62. 2017.

PAGANI I; GHEZZI S; ULISSE A, *et al.* Human endometrial stromal cells are highly permissive to productive infection by Zika virus. **Scientific Reports**, 7:44286, 2017.

PEREIRA-SILVA, J.W.; DO NASCIMENTO, V.A.; BELCHIOR, H.C.M.; *et al.* First evidence of Zika virus venereal transmission in Aedes aegypti mosquitoes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 113, 56–61, 2018.

PETERSEN EE, STAPLES JE, MEANEY-DELMAN D, *et al.* Interim guidelines for pregnant women during a Zika virus outbreak—United States, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**.65:30 –33. 2016.

PLOURDE, A. R; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Disease Journal**, 22(7), 2016.

POND, W.L. Arthropod-borne virus antibodies in sera from residents of South-East Asia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 57, 364–371. 1963.

QUICK, J; GRUBAUGH N. D; PULLAN, S.T; *et al.* Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. **Nature Protocols**, 12(6):1261-1276. 2017.

RODRIGUEZ-MORALES *et al.* The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: a global concern. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, 15:13, 2016.

ROSSI, SL, *et al.* Mutations in West Nile virus nonstructural proteins that facilitate replicon persistence *in vitro* attenuate virus replication *in vitro* and *in vivo*. **Virology**, 364, pp. 184-195, 2007.

ROTH, A. *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. **Euro surveillance**, 19 (41). pii: 20929, 2014.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time pcr data by the comparative ct method. **Nature protocols**, London, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHULER-FACCINI, L. *et al.* Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.

SHAFEE N, ABUBAKAR, S. J. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. **Gen. Virol.** 84(8):2191-2195, 2003.

SIEMANN DN; STRANGE D P; MAHARAJ P N. *et al.* Zika virus infects human sertoli cells and modulates the integrity of the *in vitro* blood-testis barrier model. **Journal of Virology**, 1:e00623-17, 2017.

SIM, S; DIMOPOULOS, G. Dengue virus inhibits immune responses in aedes aegypti cells. **Plos One**, 5ed. 2010.

SIROHI D, CHEN Z, SUN L, KLOSE T, PIERSON TC ET AL. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**. 352: 467–470. 2916.

SMITHBURN, K.C; KERR, J.A; GATNE, P.B. Neutralising antibodies against certain viruses in the sera of residents of India. **Journal of Immunology**, 72, 248-251, 1954.

STEIBEL, J. P. *et al.* A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, San Diego, v. 94, n. 2, p. 146–152, 2009.

STEINHAUER DA, HOLLAND JJ. Rapid evolution of RNA viruses. **Annu Rev Microbiol** 41: 409–433. 1987.

TABATA T; PETITT M; PUERTA-GUARDO H; MICHELETTI C; WANG C. *et al.* Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. **Cell Host Microbe**, 20:155–166, 2016.

TANG H; HAMMACK C; OGDEN SC. *et al.* Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, 18:587–590, 2016.

TAYLOR WP; MARSHALL ID. Adaptation studies with Ross River virus: Laboratory mice and cell cultures. **Journal of General Virology**,28:59–72. 1975.

TSETSARKIN K.A. *et al.* A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. **PLoS Pathogens**, 3(12): e201. 2007.

TUBIANA L, BOZIC AL, MICHELETTI C, PODGORNİK R. Synonymous mutations reduce genome compactness in icosahedral ssRNA viruses. **Biophys J**. 2015;108(1):194–202.

VALLE, D; PIMENTA, D N; AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 25(2):419-422, 2016.

VASILAKIS, N. *et al.* Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. **PLoS Pathog**. 5, e1000467, 2009.

VASILAKIS, N. WEAVER. Flavivirus transmission focusing on Zika. **Current Opinion in Virology**, 22, pp. 30-35. 2017.

VILLORDO SM, FILOMATORI CV, SANCHEZ-VARGAS I, BLAIR CD, GAMARNIK AV. Dengue virus RNA structure specialization facilitates host adaptation. **PLoS Pathog** 11:e1004604, 2015.

WALKER, T., *et al.*, Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. **Parasit Vectors**. 7: p. 382. 2014.

WANG, L. *et al.* From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 561–565, 2016.

Wargo, A.R., and Kurath, G. Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. **Curr Opin Virol** 2: 538–545.2012.

WEAVER, S.C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends Microbiol.**, (2), pp. 360-363, 2013.

WEISSENBOCK H, HUBALEK Z, BAKONYI T, NOWOTNY N. Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven

pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. **Vet Microbiol.** 140(3–4):271–80. 2010.

WHITE, M. K. *et al.* Zika virus: An emergent neuropathological agent. **Annals of Neurology**, 80: 479–489. 2016.

WICKER J.A. *et al.* A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile virus NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice. **Virology**, 349, pp. 245-253, 2006.

WU, Y. *et al.* Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins *in vitro*. **Cell Discov**, 3, 17006 (2017).

XIA H, LUO H, SHAN C, MURUATO AE, NUNES BTD, MEDEIROS DBA, *et al.* An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. **Nat Commun**; 9(1): 414, 2018.

XIN Q-L, DENG C-L, CHEN X, *et al.* Quantitative proteomic analysis of mosquito C6/36 cells reveals host proteins involved in Zika virus infection. **J Virol**, 91:e00554-17, 2017.

YOKOYAMA S, STARMER WT. Possible roles of new mutations shared by Asian and American Zika viruses. **Mol Biol Evol.**; 34(3): 525-34, 2017.

YOUNG, P. R., HILDITCH, P. A., BLECHLY, C. & HALLORAN, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J. Clin. Microbiol.** 38, 1053–1057, 2000.

YUN, S.-I., & LEE, Y.-M. Zika virus: An emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, 55(3), 204–219, 2017.

ZHU Z, CHAN J, TEE K, CHOI G, LAU S, WOO PC, *et al.* Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. **Emerg Microbes Infect.** 16: 5-e22, 2016.

8. ANEXOS

8. 1 Estadística Ct *Aedes aegypti* 8 DPI

Row Stats		A			B		
		Zika			RPS		
	⊗	Mean	SD	N	Mean	SD	N
1	P1	18.647	2.320	14	26.521	3.039	20
2	P33	18.978	1.715	10	25.336	3.403	20
3							

Col Stats	A	B	C	D
	P1 - ZIKV	P1 - RPS	P33 - ZIKV	P33 - RPS
	Y	Y	Y	Y
Number of values	14	20	10	19
Minimum	13.76	20.67	16.54	21.28
25% Percentile	17.15	23.22	17.78	21.85
Median	18.84	27.97	18.75	23.71
75% Percentile	20.12	28.88	19.94	28.72
Maximum	22.60	30.44	22.53	30.80
Mean	18.65	26.52	18.98	25.22
Std. Deviation	2.320	3.039	1.715	3.453
Std. Error of Mean	0.6199	0.6795	0.5422	0.7922
Lower 95% CI of mean	17.31	25.10	17.75	23.55
Upper 95% CI of mean	19.99	27.94	20.20	26.88
95% CI of median				
Actual confidence level	98.71%	95.86%	97.85%	98.08%
Lower confidence limit	17.06	23.92	17.38	21.85
Upper confidence limit	20.79	28.65	20.61	28.72

8. 2 Tabela de Contingência *Aedes aegypti* 8 DPI

Contingency				
1	Table Analyzed	Mosq pos 8 dias		
2				
3	Fisher's exact test			
4				
5	P value	0.3332		
6	P value summary	ns		
7	One- or two-tailed	Two-tailed		
8	Statistically significant? (alpha<0.05)	No		
9				
10	Strength of association			
11				
12				
13	Odds ratio	2.333		
14	95% confidence interval	0.6374 to 8.541		
15				
16	Data analyzed	P1	P33	Total
17	RT-qPCR pos	14	10	24
18	RT-qPCR Neg	6	10	16
19	Total	20	20	40

8.3 Estadística Ct *Aedes aegypti* 12 DPI

Col Stats		A	B	C	D
		P1 - ZIKV	P1 - RPS	P33 - ZIKV	P33 - RPS
		Y	Y	Y	Y
1	Number of values	17	19	10	20
2					
3	Minimum	13.86	21.95	13.74	21.16
4	25% Percentile	14.40	24.57	14.46	22.05
5	Median	15.16	27.77	16.66	28.79
6	75% Percentile	16.05	28.83	18.16	29.43
7	Maximum	25.47	30.39	18.41	30.20
8					
9	Mean	15.92	26.84	16.41	26.63
10	Std. Deviation	2.818	2.755	1.750	3.667
11	Std. Error of Mean	0.6836	0.6319	0.5533	0.8199
12					
13	Lower 95% CI of mean	14.47	25.51	15.16	24.91
14	Upper 95% CI of mean	17.37	28.16	17.67	28.34
15					
16	95% CI of median				
17	Actual confidence level	95.10%	98.08%	97.85%	95.86%
18	Lower confidence limit	14.42	24.57	14.36	22.10
19	Upper confidence limit	15.91	28.83	18.26	29.38

8. 4 Tabela de Contingência *Aedes aegypti* 12 DPI

Contingency				
1	Table Analyzed	Mosq pos 12 dias		
2				
3	Fisher's exact test			
4				
5	P value	0.0407		
6	P value summary	*		
7	One- or two-tailed	Two-tailed		
8	Statistically significant? (alpha<0.05)	Yes		
9				
10	Strength of association			
11				
12				
13	Odds ratio	5.667		
14	95% confidence interval	1.254 to 25.62		
15				
16	Data analyzed	P1	P33	Total
17	RT-qPCR pos	17	10	27
18	RT-qPCR Neg	3	10	13
19	Total	20	20	40