

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/04/2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Nayara Nathie Marques

**Investigação das mutações encontradas após adaptação
por alternância de hospedeiros *in vitro* da linhagem
africana de ZIKV**

São José do Rio Preto
2021

Nayara Nathie Marques

**Investigação das mutações encontradas após adaptação
por alternância de hospedeiros *in vitro* da linhagem
africana de ZIKV**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES 88882.434311/2019-01

Orientador: Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Cintia Bittar
Dr^a. Mariana Nogueira Batista

São José do Rio Preto
2021

M357i	Marques, Nayara Nathie Investigação das mutações encontradas após adaptação por alternância de hospedeiros in vitro da linhagem africana de ZIKV / Nayara Nathie Marques. -- São José do Rio Preto, 2021 54 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Paula Rahal Coorientadora: Cintia Bittar 1. Microbiologia. 2. Virologia. 3. Biologia Molecular. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Nayara Nathie Marques

**Investigação das mutações encontradas após adaptação
por alternância de hospedeiros *in vitro* da linhagem
africana de ZIKV**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES 88882.434311/2019-01

Comissão Examinadora

Dr^a. Mariana Nogueira Batista
Universidade Rockefeller – Nova Iorque, Estados Unidos
Co-orientadora

Prof. Dr. Bruno Moreira Carneiro
Universidade Federal de Rondonópolis, Rondonópolis/MT

Profa. Dra. Isabel Maria Vicente Guedes de Carvalho
Instituto Butantan, São Paulo/SP

São José do Rio Preto
14 de Abril de 2021

Àqueles que apesar de todas as adversidades sempre acreditaram que eu seria capaz de atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Em especial ao meu avô, Sr. José Francisco, que me apoiou desde o período de cursinho até o início de meu mestrado, que me acariciava com palavras de carinho ao me chamar de “doutora”, que tanto confiava em mim e me incentivava a ser quem sou hoje. Eu sou eternamente grata a você, vô! Sinto muito pelo senhor não estar vendo daqui da Terra a conclusão de meu mestrado, mas eu sei que você está me mandando boas energias neste momento, presente em meu coração eternamente.

Aos meus pais, Neide e Antonio Carlos, que tanto se esforçaram e se dedicaram a mim, sempre acreditando nos meus sonhos. Vocês são o meu mundo, eu os amo muito!

Ao meu irmão, Antonio Lucas, que foi meu melhor amigo durante toda a minha vida e assim sempre o será! Eu te amo, brô.

Ao meu marido, Marco, obrigada por sempre me incentivar a ser melhor como pessoa e profissionalmente. Você mudou meu mundo, coloriu minha vida e é muito importante para mim! it's always better when we're together.

Aos meus cães: Jade, Luna, Luke, Apple e Banjo, por cada lambeijo, olhar e pela companhia madrugadas à fora nos meus pés embaixo da escrivaninha. Vocês iluminam a minha vida.

Aos meus avós, tios, sogros e primos, que sempre me apoiaram a ser o que sou hoje, principalmente minha tia Leni, pelo alto astral e amparo.

À minha melhor amiga e parceira de laboratório Bárbara, que perdeu dias e noites comigo no celular, na bancada e na escrivaninha, sempre sendo minha companheira. Ever together, eu amo você.

Aos meus amigos da graduação, Matheus, Augusto e Nayara Vicente, que aguentaram todas as adversidades e passamos muitos momentos de alegria juntos.

Às minhas orientadoras, Profa. Dra. Paula Rahal, Profa. Dra. Cintia Bittar e Dra. Mariana Batista Nogueira, que me ensinaram o que é ser cientista. Obrigada pelo conhecimento, carinho e paciência!

Aos meus amigos do LEGO, Renan, Guilherme, Dayla, Ricardo, Tamara, Pâmela, Marilê, Gabi, Agata e Diego, por cada momento de aprendizado, companhia e alegria!

Ao Ibilce e todos os meus professores, instituição que possibilitou com que eu fosse a profissional que hoje sou.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço grandemente pelo financiamento.

“Tradicionalmente, alguém se torna biólogo ou por formação na área médica ou por ter sido um jovem naturalista. Hoje, é comum para um jovem se empolgar com as ciências da vida através dos meios de comunicação, sobretudo por filmes sobre a natureza na televisão, de visitas a um museu, (geralmente à sala dos dinossauros) ou de um professor inspirador. Há também milhares de jovens observadores de pássaros, alguns dos quais acabarão se tornando biólogos profissionais (como foi o meu caso). O ingrediente mais importante é a fascinação diante das maravilhas das criaturas vivas. E isso permanece com a maioria dos biólogos para o resto da vida. Eles nunca perdem a empolgação com a descoberta científica, seja ela empírica ou teórica, nem o amor pela perseguição de novas ideias, novos vislumbres, novos organismos. E muita coisa na biologia tem uma relação direta com as circunstâncias e com os valores pessoais do biólogo. Ser um biólogo não significa ter um emprego; significa escolher um estilo de vida.” (MAYR; ANGELO, 2008)

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus da família *Flaviviridae* que foi isolado pela primeira vez em 1947 e tornou-se uma preocupação de saúde pública após um surto em 2015 relacionado a outras manifestações clínicas graves: Síndrome de Guillain-Barré e Síndrome Congênita de o vírus Zika. Transmitido principalmente pela picada do mosquito *Aedes*, o ZIKV é mantido em dois ciclos de transmissão: urbano e silvestre. Embora a passagem alternada entre diferentes hospedeiros equilibre sua sequência consenso conservada na natureza, devido à falta de atividade de correção da RNA polimerase dependente de RNA, o ZIKV exibe uma alta taxa de mutação e circula como *quasiespecies* com mutações pontuais. O objetivo deste estudo foi avaliar as mutações que surgiram no genoma viral da cepa africana do Zika vírus após infecções alternadas entre dois tipos celulares capazes de mimetizar o ciclo urbano (HEK-293 e C6/36) e o ciclo semi-silvestre (LLC-MK2 e C6/36) em dez passagens. O estoque do vírus foi produzido em células C6/36 e titulado a cada passagem através do ensaio de formação de placa em células Vero E6, de modo que sempre a mesma quantidade de vírus foi utilizada em cada infecção. O genoma completo do vírus estoque e do vírus da última passagem de cada ciclo foi sequenciado pela técnica de Sanger. No ciclo semi-silvestre, todas as dez passagens previstas foram realizadas e seus títulos virais demonstraram estabilidade. O ciclo urbano, no entanto, foi interrompido na terceira passagem e não pôde ser titulado. Esses resultados vão ao encontro do que já é visto na literatura e na natureza: um ciclo bem estabelecido entre primatas não-humanos e baixa capacidade de circulação em humanos. Em ambos ciclos, mutações sinônimas apareceram nas regiões NS3 e NS5 e podem estar relacionadas ao viés de códon e adaptação do hospedeiro. Curiosamente, a mesma inserção de citosina foi observada na mesma posição 10697 na UTR 3' em ambos ciclos, uma possibilidade é que esta seja uma mutação adaptativa relacionada às células do vetor, utilizada em ambos. No ciclo semi-silvestre, uma das seis mutações que surgiram era não-sinônima na região NS2A, sem relação com nenhum dado da literatura. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de evolução viral, se as mutações identificadas podem realmente ser adaptações do hospedeiro e quais são seus impactos na aptidão viral.

Palavras-chave: ZIKV africano; Mutações virais; Alternância de hospedeiros *in vitro*.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus of the family *Flaviviridae* which was isolated for the first time in 1947 and became a public health concern after an outbreak in 2015, related to serious clinical manifestations: Guillain-Barré Syndrome and Congenital Syndrome of the Zika Virus. Transmitted mainly through the bite of the *Aedes* mosquito, the ZIKV is maintained in two transmission cycles: urban and sylvatic. Although the alternating passages between different hosts balances the viral consensus sequence conserved in nature, due to the lack of proofreading activity by the RNA-dependent RNA polymerase, ZIKV exhibits a high mutation rate and circulates as quasispecies with pontual mutations. The aim of this study was to evaluate mutations that appeared in the viral genome of African strain of the Zika virus after alternating infections between two cell types capable of mimicking the urban cycle (HEK-293 and C6/36) and semi-sylvatic cycle (LLC-MK2 and C6/36) for ten passages. The stock virus was produced in C6 / 36 cells and titrated at each passage through plaque assay in Vero E6 the same amount of virus was used in each infection. The complete genome of the stock virus and the virus from the last passage of each cycle was sequenced by the Sanger technique. In the semi-sylvatic cycle, all ten predicted passages were performed and their viral titers demonstrated stability. The urban cycle, however, was abrogated in the third passage which and could not be titered. These results are in line with what is already seen in the literature and in nature: a well-established cycle between non-human primates and low capacity of circulating in humans. In both cycles, synonymous mutations appeared in the NS3 and NS5 regions and may be related to codon-bias and host adaptation. Interestingly, the same cytosine insertion was observed at the same position 10697 in the 3' UTR in both cycles, one possibility is that this is an adaptive mutation related to the vector cells, used in both cycles. In the semi-sylvatic cycle, one of the six mutations that emerged was non-synonymous in the NS2A region, unrelated to any data in the literature. Further studies are needed to elucidate the mechanisms of viral evolution, whether the mutations identified may actually be adaptations of the host and what are their impacts on viral fitness.

Keywords: African ZIKV strain; Viral mutations; Alternation in vitro of hosts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação do vírus Zika. Adaptado de EXPASY - VIRALZONE, [s.d].	15
Figura 2 Genoma viral do Vírus Zika. Adaptado de LIU; SHI; QIN, 2019.	16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Capsídeo
CHIKV	Vírus chikungunya
DENV	Vírus da dengue
E	Envelope
HCV	Vírus da hepatite C
M	Membrana
MAYV	Vírus Mayaro
NS	Não-estrutural
OROV	Vírus Oropouche
prM	Pré-membrana
RdRp	Polimerase dependente de RNA
RNA	Ácido ribonucleico
ROCV	Vírus rocio
SBG	Síndrome de Guillain-Barré
UTR	Untranslated Region – Região não traduzida
WNV	Vírus west nile
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus zika

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.1 INTRODUÇÃO	13
1.2 JUSTIFICATIVA.....	19
1.3 OBJETIVO.....	19
1.3.1 Objetivo geral	19
1.3.2 Objetivos específicos	20
REFERÊNCIAS	21
2 CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO: INVESTIGATION OF MUTATIONS FOUND IN ZIKV AFRICAN AND ASIAN LINEAGES AFTER MIMICKING SEMI-SYLVATIC AND URBAN CYCLES IN VITRO	25
2.1 ABSTRACT	26
2.2 INTRODUCTION	27
2.3 METHODS	28
2.3.1 Cell culture and virus.....	28
2.3.2 Virus stocks	28
2.3.3 Viral adaptation by alternating host.....	29
2.3.4 Viral titration by Plaque Assay	30
2.3.5 Viral titration by Indirect Immunofluorescence Assay.....	30
2.3.6 Complete genome amplification.....	31
2.3.7 Sanger sequencing	34
2.3.8 Genome sequencing analysis	34
2.4 RESULTS	34
2.4.1 Viral adaptation by alternating host.....	34
2.4.2 Mutations in ZIKV ^{BR} from UC and SC	36
2.4.3 Mutations in ZIKV ^{AF} from UC and SC	40
2.5 DISCUSSION	41
2.6 CONCLUSION.....	47
REFERENCES	48
3 CAPÍTULO 3 – CONCLUSÃO.....	52

1 CAPÍTULO I CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus são vírus transmitidos por vetores artrópodes para hospedeiros vertebrados a partir da picada da fêmea de mosquito infectada (YOUNG, 2018). Cinco famílias virais *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* são comumente descritas *como sendo* capazes de causar doenças em humanos e em outros animais (CLETON et al., 2012).

As arboviroses geram preocupações nas mais diversas regiões do globo. Em regiões tropicais, por exemplo, temos uma visão clara do efeito das rápidas mudanças climáticas, desmatamentos, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas, precariedade das condições sanitárias. Nesse contexto, ocorre o favorecimento de um local adequado para a existência do vetor e, consequentemente, transmissão de diversas arboviroses. Os principais vetores são carrapatos e mosquitos (RUST, 2012; VASCONCELOS; CALISHER, 2016).

O Brasil está situado em uma área com predominância tropical com grandes regiões florestais, o que o torna um local adequado para a existência e proliferação de vetores que sabidamente são transmissores de arboviroses como Dengue (DENV), Mayaro (MAYV), West Nile (WNV), Oropouche (OROV), Vírus do Complexo da Encefalite Japonesa como Rocio (ROCV), Chikungunya (CHIKV) e, mais recentemente, Zika (ZIKV) (COSTA et al., 2018; FIGUEIREDO, 2000, 2007; “IBGE | Projeção da população”, [s.d.]; NAYARA LOPES; CARLOS NOZAWA; ROSA ELISA CARVALHO LINHARES, 2014).

Identificado pela primeira vez na floresta Zika, em Uganda em 1947 durante um estudo sobre o vírus da Febre Amarela a partir de um macaco Rhesus sentinela (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952b), o ZIKV era conhecido por causar infecções humanas esporádicas na África e na Ásia. Em 2007, surgiram casos da doença na Ilha de Yap, nos Estados Federados da Micronésia, infectando uma grande parcela da população. Em 2013 houve um grande surto nas ilhas da Polinésia Francesa e, posteriormente em 2015, o vírus chegou ao Brasil causando cerca de 1,3 milhão de infecções naquele ano. Em 2016 a Organização Mundial da Saúde declarou o ZIKV uma emergência de saúde pública a níveis globais (BEST, 2016; DUFFY et al., 2009a; LIU; SHI; QIN, 2019)(IOOS et al., 2014); (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952a)(PAYNE; PAYNE, 2017).

Os sintomas clínicos associados a infecção pelo vírus Zika são leves caracterizados por febre, dor de cabeça, erupções cutâneas, conjuntivite, vômitos,

cefaleia, dor retro orbital, artralgia e mialgia (PETERSEN et al., 2016b; WEAVER et al., 2016). Em casos mais graves em adultos, pode causar a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma neuropatologia que afeta a bainha de mielina, causando sua destruição, levando a um mau funcionamento dos nervos periféricos e, em casos ainda mais severos, pode ocasionar paralisia da musculatura esquelética e até mesmo parada respiratória. Até 2013, não haviam relatos que relacionavam a SGB com o Zika, que até então era relacionado apenas a casos leves ou assintomáticos. Os primeiros casos foram descritos na Polinésia Francesa, com um total de 42 notificações feitas na época e associados à infecção primária de ZIKV. (WANG; WANG; AN, 2016; CAO-LORMEAU et al., 2016; (ANDERSON; THOMAS; ENDY, 2016; SAMPATHKUMAR; SANCHEZ, 2016).

Além dos sintomas já descritos e da sua relação com a SGB no último grande surto, o Zika também foi relacionado com outros casos clínicos. O ZIKV é capaz de atravessar a barreira placentária e afetar células do embrião ou feto, podendo causar má-formação neonatal caracterizada por um perímetro cefálico até três desvios-padrão menor do que outros bebês da mesma idade e sexo: a microcefalia. (LIANG et al., 2016; YOON et al., 2017, LIU; SHI; QIN, [s.d.]). Além da microcefalia, o Zika também pode causar calcificações intracranianas, anomalias cerebrais graves, anomalias oculares, distúrbios psicomotores dentre outras condições clínicas. Diante disso, passou-se a relacionar essas condições como Síndrome Congênita pelo Zika vírus (TEIXEIRA et al., 2020).

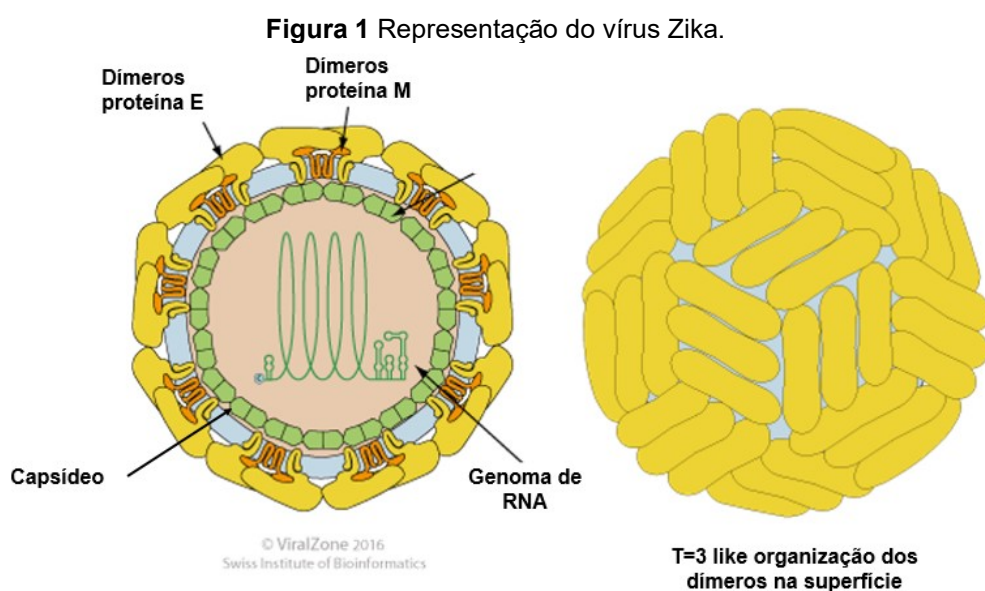
Até o momento, não há vacina contra o vírus Zika, portanto, a prevenção é feita com o controle do vetor por meio de uso de telas em janelas, eliminação de criadouros, uso de inseticidas, larvicidas, uso de repelentes e de preservativos durante as relações sexuais. Não há tratamento específico para a doença, portanto, este consiste no alívio dos sintomas à medida que eles surgem (BRUNKARD et al., 2007; PAYNE, 2017; PETERSEN et al., 2016a; REITER et al., 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

O ZIKV possui ciclo enzoótico, doença que é peculiar de uma localidade ou grupo de espécies, e circula entre primatas, isso inclui humanos. Também pode infectar ovelhas, cabras e alguns roedores. Os insetos vetores são mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* podendo haver ciclos urbanos e silvestres. A transmissão pode também ocorrer via perinatal, transfusão de sangue e sexualmente (LIGIA FERNANDES ABDALLA, 2018;

PETERSEN et al., 2016c; SOLOMON; MILNER; FOLKERTH, 2016; MUSSO et al., 2014; PAYNE, 2017).

O vírus Zika pertence à família *Flaviviridae* que possui quatro gêneros atualmente: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus* (SIMMONDS et al., 2017); além do Zika, esta família conta com outros exemplares de grande importância na saúde, filogeneticamente relacionados com o ZIKV, como Dengue (DENV), Hepatite C (HCV) e Febre Amarela (YFV - *do inglês Yellow Fever Virus*) (NAYARA LOPES; CARLOS NOZAWA; ROSA ELISA CARVALHO LINHARES, 2014; SIMMONDS et al., 2017).

O vírus Zika é um vírus que apresenta capsídeo de geometria icosaédrica e envelopada (Figura 1), características estruturais comuns à família *Flavivirus*. A partícula viral possui aproximadamente 50 nm de diâmetro (FREED; MARTIN, 2013, cap. Flaviviridae).

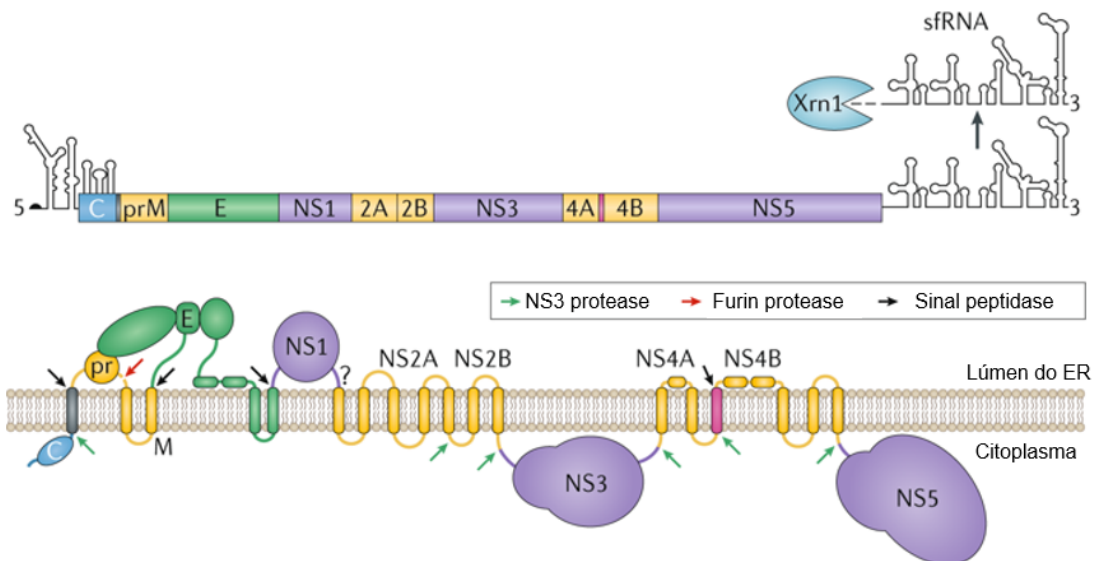


Adaptado de EXPASY - VIRALZONE, [s.d.].

Este arbovírus possui um genoma de RNA fita simples de senso positivo de aproximadamente 10,8 Kb (Figura 2) que é traduzido em uma única poliproteína, flanqueada por duas regiões não traduzidas (UTR – Untranslated Region) nas extremidades. Em seu genoma há três proteínas estruturais, C (capsídeo), prM (pré-membrana) ou M (membrana) e E (envelope), e sete não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), responsáveis pela replicação do genoma viral e

modificação das funções celulares e respostas imunes do hospedeiro (LIU; SHI; QIN, 2019).

Figura 2 Genoma viral do Vírus Zika.



Adaptado de LIU; SHI; QIN, 2019.

A proteína do capsídeo, ou proteína C, tem a importante função de se ligar ao genoma viral e compor o nucleocapsídeo do vírion, participando, portanto, do processo de formação de partículas virais. A proteína precursora de membrana, abreviada com a sigla prM, atua como uma chaperona no dobramento da proteína do envelope durante os processos de montagem e maturação do vírus (OLIVEIRA et al., 2017; SAMPATHKUMAR; SANCHEZ, 2016; SILVA, 2019)

Outra importante proteína é a proteína do envelope (E), cuja função é mediar a entrada do vírus na célula por intermédio da ligação e fusão com as membranas do hospedeiro, e apresenta 53 kDa quando dimerizada com três domínios distintos: domínio I, domínio II e domínio III. O domínio I é responsável pela comunicação pelos domínios II e III; o domínio II tem atuação no processo de fusão de membranas; por fim, o domínio III é uma estrutura de ligação a imunoglobulinas (CHÁVEZ et al., 2010; LI et al., 2008; SAMPATHKUMAR; SANCHEZ, 2016; SILVA, 2019).

As proteínas não estruturais NS1, NS2 (a e b), NS4 (a e b) e NS5 atuam nos processos replicativos da partícula viral: replicação (NS1, NS2, NS4 e NS4),

cofatores de enzimas virais (NS2B e NS4A), atividade proteolítica (NS3), síntese do RNA viral (NS5). (JAVED et al., 2018; SILVA, 2019; SIROHI; KUHN, 2017).

De acordo com alguns estudos genéticos obtidos a partir de sequenciamento viral, foi possível revelar padrões da evolução e movimento deste vírus pelo mundo. Avaliando os dados moleculares, é provável que o vírus tenha se originado na África Oriental e se espalhado para a África Ocidental e depois para a Ásia, o que resultou em três linhagens distintas (MR766 Cluster, Nigerian Cluster e Asian Cluster). Até o momento, todas as cepas associadas ao surto nas Américas são associadas à linhagem Asiática, filogeneticamente relacionadas com as cepas de Yap, Camboja, Tailândia e Polinésia Francesa (FAYE et al., 2014; LANCIOTTI et al., 2016).

A linhagem asiática é a responsável pelos surtos mais recentes da doença no ciclo urbano e é relacionada com a apresentação clínica mais grave da doença, no entanto, *in vitro*, a cepa africana é mais virulenta como demonstrado por placas de lise maiores devido a seu efeito citopático mais intenso. Além disso, a cepa africana possui uma vantagem vetorial já que consegue ser transmitida de maneira mais eficiente pelo mosquito *Aedes ae*. Por outro lado, a intensa virulência da cepa africana poderia induzir respostas imunes mais eficientes e, portanto, uma infecção rapidamente eliminada (MOSER et al., 2018; SHERIDAN et al., 2017, 2018); (WEGER-LUCARELLI et al., 2016).

Não se sabe com clareza a causa de linhagem africana não ter provocado um surto de larga escala, sugere-se que isto se deva a múltiplos fatores. Estudos demonstram que a infecção pela cepa africana resulta em uma maior replicação viral e lise celular, o que pode indicar que, ao atravessar a barreira placentária, poderia ocasionar a interrupção da gestação, o que não é vantajoso; a cepa asiática, em contrapartida é capaz de atravessar esta barreira sem causar a interrupção da gravidez, o que indica que esta estirpe é menos virulenta e, portanto, mais crônica, levando ao desenvolvimento de má formações (LIN et al., 2011); (SHERIDAN et al., 2017); (LIU; SHI; QIN, 2019) (SIMONIN et al., 2017).

Além de diferenças intrínsecas na patogenicidade entre as cepas Africana e Asiática, a comparação de diversas sequências obtidas no *Genbank* de isolados de ambas as linhagens revelam um total de 19 modificações localizadas em regiões codificadoras de proteínas estruturais e 47 em regiões codificadoras de proteínas não-estruturais. Dentre essas modificações na região estrutural, várias delas se encontram em domínios importantes do gene que codifica a proteína do envelope, o

que poderia influenciar na eficiência da ligação do vírus na membrana do hospedeiro e montagem de novos vírions, além de contribuir com patogenicidade, aptidão e transmissão. (FRITZ et al., 2011; YE et al., 2016).

Como é próprio dos vírus de RNA, a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) do ZIKV não possui atividade de correção, o que pode acarretar no acúmulo de mutações no genoma deste vírus, apesar de seu genoma ser considerado conservado apresentando mutações em baixa frequência. Essas, no entanto, podem ocasionar mudanças importantes no genoma viral e podem atuar de diversas maneiras: serem deletérias, neutras ou, ainda, serem positivas. Além disso, o Zika é capaz de circular como um *pool* de variantes conhecidas como *quasiespecies*. Essa característica confere a possibilidade de que alguma dessas variantes apresentem características que possibilitem a adaptação a novos hospedeiros. (ABDALLA, 2018; ARIAS-GOETA et al., 2014; LIGIA FERNANDES ABDALLA, 2018; MOSER et al., 2018; SILVEIRA et al., 2016).

Sendo o ZIKV um arbovírus, ele possui dificuldades a serem enfrentadas: ele deve estar adaptado a dois hospedeiros com características diferentes, o hospedeiro artrópode e o vertebrado. Assim, mutações que surjam em um hospedeiro serão eliminadas por seleção purificadora caso alterem o fitness viral no outro hospedeiro. Provavelmente, no início, o ZIKV circulava somente entre mosquitos *Aedes africanus* e primatas não humanos, ou seja, um ciclo silvestre; no decorrer do tempo, devido a condições favoráveis para tal, surge um novo ciclo, o ciclo urbano, onde passa a incluir o ser humano e outros mosquitos como vetores (*Aedes ae.*, *A. hesilii*), o que corrobora a capacidade de adaptação a novos hospedeiros que as arboviroses possuem (CIOTA; KRAMER, 2010; DUFFY et al., 2009b; GRARD et al., 2014; MOSER et al., 2018; MUSSO; GUBLER, 2016; SALVADOR; FUJITA, 2016; SANJUAN et al., 2010; WEAVER, 2005).

Mutações como a S139N (Ser139→Asn139 na proteína prM), por exemplo, encontrada em uma cepa isolada do Camboja em estudos feitos em ratos neonatais, resulta em uma maior neurovirulência do vírus Zika, ou seja, as mutações podem ocasionar mudanças nas conformações proteicas resultando em cepas mais agressivas. O contrário (N139S), porém, resulta em diminuição da neurovirulência (YUAN et al., 2017) .

Assim, a circulação do Zika vírus em ciclos urbanos e silvestres pode resultar na seleção de mutações que conferem características próprias aos vírus

REFERENCES

- ALIOTA, M. T. et al. Zika in the Americas, year 2: What have we learned? What gaps remain? A report from the Global Virus Network. **Antiviral Res**, v. 144, p. 223-246, 2017. ISSN 1872-9096. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28595824>>.
- ALPUCHE-LAZCANO, S. P. et al. Higher Cytopathic Effects of a Zika Virus Brazilian Isolate from Bahia Compared to a Canadian-Imported Thai Strain. **Viruses**, v. 10, n. 2, Jan 27 2018. ISSN 1999-4915.
- ALTHOUSE, B. M. et al. Potential for Zika Virus to Establish a Sylvatic Transmission Cycle in the Americas. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005055-e0005055, 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27977671>>.
- ÁVILA-PÉREZ, G. et al. A natural polymorphism in Zika virus NS2A protein responsible of virulence in mice. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 19968, 2019/12/27 2019. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56291-4>>.
- AZAR, S. R. et al. Differential Vector Competency of Aedes albopictus Populations from the Americas for Zika Virus. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97, n. 2, p. 330-339, Aug 2017. ISSN 0002-9637 (Print).
- BAHIR, I. et al. Viral adaptation to host: a proteome-based analysis of codon usage and amino acid preferences. **Mol Syst Biol**, v. 5, p. 311, 2009. ISSN 1744-4292.
- BIOLABS, N. E. NEB Tm Calculator. 2020. Disponível em: <<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>>.
- BOWEN, J. R. et al. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 2, p. e1006164-e1006164, 2017. ISSN 1553-7374. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28152048>>.
- CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 653-660, Jun 2016. ISSN 1473-3099.
- CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. **Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125-2132, May 21 2016. ISSN 0140-6736 (Print).
- CIOTA, A. T.; KRAMER, L. D. Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. **Viruses**, v. 2, n. 12, p. 2594-2617, Dec 2010. ISSN 1999-4915.
- COLLINS, N. D. et al. Inter- and intra-lineage genetic diversity of wild-type Zika viruses reveals both common and distinctive nucleotide variants and clusters of genomic diversity. **Emerg Microbes Infect**, v. 8, n. 1, p. 1126-1138, 2019. ISSN 2222-1751. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31355708>>.
- DE MELO FREIRE, C. C. et al. Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans. **bioRxiv**, p. 032839, 2015. Disponível em: <<http://biorxiv.org/content/early/2015/11/25/032839.abstract>>.
- DE OLIVEIRA, W. K. et al. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **Lancet**, v. 390, n. 10097, p. 861-870, Aug 26 2017. ISSN 0140-6736.
- DEARDORFF, E. R. et al. West Nile virus experimental evolution in vivo and the trade-off hypothesis. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 11, p. e1002335, Nov 2011. ISSN 1553-7366.

DICK, G. W. A. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda (Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, n. 1, p. 13-48, 1953. ISSN 0035-9203. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(53\)90021-2](https://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(53)90021-2)>.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. 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. ISSN 0035-9203. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)>.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, 2016. ISSN 1095-9203. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27013429>>.

FAVORETTO, S. et al. First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir. **bioRxiv**, p. 049395, 2016. Disponível em: <<http://biorxiv.org/content/early/2016/04/20/049395.abstract>>.

FAVORETTO, S. R. et al. Zika Virus in Peridomestic Neotropical Primates, Northeast Brazil. **EcoHealth**, v. 16, n. 1, p. 61-69, 2019/03/01 2019. ISSN 1612-9210. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10393-019-01394-7>>.

FAYE, M. et al. Biological Characteristics and Patterns of Codon Usage Evolution for the African Genotype Zika Virus. **Viruses**, v. 12, n. 11, p. 1306, 2020. ISSN 1999-4915. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33202554>>.

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014. ISSN 1935-2727 (Print) 1935-2727.

FLEMING, A. M. et al. Zika Virus Genomic RNA Possesses Conserved G-Quadruplexes Characteristic of the Flaviviridae Family. **ACS Infect Dis**, v. 2, n. 10, p. 674-681, Oct 14 2016. ISSN 2373-8227.

FRANÇA, G. V. A. D. et al. Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em nascidos vivos no Brasil: descrição da distribuição dos casos notificados e confirmados em 2015-2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. 2, 2018. ISSN 2237-9622. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222018000200315&nrm=iso>.

GRUBAUGH, N. D.; EBEL, G. D. Dynamics of West Nile virus evolution in mosquito vectors. **Curr Opin Virol**, v. 21, p. 132-138, Dec 2016. ISSN 1879-6257 (Print) 1879-6257.

GUTH, S. et al. Ecological processes underlying the emergence of novel enzootic cycles: Arboviruses in the neotropics as a case study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008338, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008338>>.

HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012. ISSN 1935-2727 (Print).

HADDOW, A. D.; WOODALL, J. P. Distinguishing between Zika and Spondweni viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 10, p. 711-711A, 2016. ISSN 1564-0604. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27843157>>.

HALL, T. A. BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999 1999. Disponível em: <<https://ci.nii.ac.jp/naid/10029727236/en/>>.

HERRERA, B. B. et al. Continued Transmission of Zika Virus in Humans in West Africa, 1992-2016. **J Infect Dis**, v. 215, n. 10, p. 1546-1550, 2017. ISSN 1537-6613. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28398562>>.

JENKINS, G. M. et al. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. **J Mol Evol**, v. 54, n. 2, p. 156-165, Feb 2002. ISSN 0022-2844.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch Virol**, v. 152, n. 4, p. 687-696, 2007. ISSN 0304-8608 (Print).

LAITON-DONATO, K. et al. Complete Genome Sequence of a Colombian Zika Virus Strain Obtained from BALB/c Mouse Brain after Intraperitoneal Inoculation. **Microbiology resource announcements**, v. 8, n. 46, p. e01719-01718, 2019. ISSN 2576-098X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31727724>>.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720-730, May 11 2016. ISSN 1931-3128 (Print).

LI, L. et al. Attenuation of Zika Virus by Passage in Human HeLa Cells. v. 7, n. 3, p. 93, 2019. ISSN 2076-393X. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-393X/7/3/93>>.

LIU, Z. Y.; SHI, W. F.; QIN, C. F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. **Nat Rev Microbiol**, v. 17, n. 3, p. 131-139, Mar 2019. ISSN 1740-1534 (Electronic). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30617340>>.

LONGDON, B. et al. The Evolution and Genetics of Virus Host Shifts. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 11, p. e1004395, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004395>>.

MAGALHÃES-BARBOSA, M. C. et al. Trends of the microcephaly and Zika virus outbreak in Brazil, January-July 2016. **Travel Med Infect Dis**, v. 14, n. 5, p. 458-463, Sep-Oct 2016. ISSN 1477-8939.

METSKY, H. C. et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 411-415, Jun 15 2017. ISSN 0028-0836.

MOSER, L. A. et al. Growth and adaptation of Zika virus in mammalian and mosquito cells. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 11, p. e0006880, Nov 2018. ISSN 1935-2727.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clin Microbiol Rev**, v. 29, n. 3, p. 487-524, Jul 2016. ISSN 1098-6618 (Electronic). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27029595>>.

NG, W. C. et al. The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. **Viruses**, v. 9, n. 6, p. 137, 2017. ISSN 1999-4915. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28587300>>.

PETTERSSON, J. H.-O. et al. How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? **mBio**, v. 7, n. 5, p. e01239-01216, 2016. Disponível em: <<https://mbio.asm.org/content/mbio/7/5/e01239-16.full.pdf>>.

QUEIROZ, S. R. D. A. **Estratégias moleculares para utilização do vírus da febre amarela como vetor vacinal**. 2011. 115 (PhD). Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

RIDLEY, M. Co-evolução. In: ARTMED (Ed.). **Evolução**. 3rd. Porto Alegre, 2006. cap. 22, p.633-662.

ROSENSTIERNE, M. W. et al. Zika Virus IgG in Infants with Microcephaly, Guinea-Bissau, 2016. **Emerg Infect Dis**, v. 24, n. 5, p. 948-950, 2018. ISSN 1080-6059. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29664391>>.

ROUNDY, C. M. et al. Variation in *Aedes aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 4, p. 625-632, Apr 2017. ISSN 1080-6040.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec 1977. ISSN 0027-8424 (Print).

SHRIVASTAVA, S. et al. Whole genome sequencing, variant analysis, phylogenetics, and deep sequencing of Zika virus strains. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 15843, Oct 26 2018. ISSN 2045-2322.

SIMONIN, Y. et al. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005821-e0005821, 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28934211>>.

STROTTMANN, D. M. et al. Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates from different Brazilian regions. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e190150-e190150, 2019. ISSN 1678-8060. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31432892>>.

TERZIAN, A. C. B. et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 16034, Oct 30 2018. ISSN 2045-2322.

VANCHIERE, J. A. et al. Experimental Zika Virus Infection of Neotropical Primates. **Am J Trop Med Hyg**, v. 98, n. 1, p. 173-177, Jan 2018. ISSN 0002-9637 (Print).

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Flavivirus transmission focusing on Zika. **Curr Opin Virol**, v. 22, p. 30-35, 2017. ISSN 1879-6265. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27936448>>.

WANG, A. et al. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerg Microbes Infect**, v. 6, n. 3, p. e13, Mar 22 2017. ISSN 2222-1751.

WANG, H. et al. Analysis of Synonymous Codon Usage Bias of Zika Virus and Its Adaption to the Hosts. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0166260, 2016. ISSN 1932-6203.

WANG, L. et al. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 561-565, May 11 2016. ISSN 1934-6069 (Electronic). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27091703>>.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Res**, v. 130, p. 69-80, Jun 2016. ISSN 0166-3542.

WEGER-LUCARELLI, J. et al. Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 10, p. e0005101, Oct 2016. ISSN 1935-2727 (Print).

YE, Q. et al. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. **Infect Genet Evol**, v. 43, p. 43-49, Sep 2016. ISSN 1567-1348.

3. Conclusão

O ciclo semi-silvestre foi realizado com as dez passagens alternadas previstas e seus títulos virais demonstraram estabilidade entre as passagens. O ciclo urbano, no entanto, transcorreu até a terceira passagem possível de ser titulada, em duas tentativas distintas a fim de confirmar o resultado. O trabalho foi, portanto, concluído com resultados que reforçam o que já é visto na literatura por outros autores e também na natureza: o vírus Zika da linhagem africana apresenta um ciclo silvestre estável entre vetor e primata não-humano e, quanto ao ciclo urbano, pouca habilidade em circular entre primatas humanos. Sobre as análises do genoma sequenciado do vírus adaptado em comparação com o genoma inicial, mutações sinônimas e não-sinônimas puderam ser observadas. No ciclo semi-silvestre, uma mutação não-sinônima foi vista na região NS2A e outra mutação com pico-duplo na NS5 que, se fixada, também resultaria em alteração de aminoácido. Outras três mutações não-sinônimas, sendo duas na NS3 e mais uma NS5, também surgiram. No ciclo urbano, duas mutações não-sinônimas na região NS3, na mesma posição do ciclo semi-silvestre, também surgiram. A grande maioria das mutações deste estudo apareceram em pico-duplo no cromatograma, indicando a existência de duas populações virais no sequenciamento e evidenciando um talvez um possível viés de códon. Se alguma dessas mutações não-sinônimas for fixada na população viral, pode impor mudanças positivas ou negativas na aptidão viral (se não neutras), ainda a serem determinadas. Uma curiosa inserção surgiu na mesma posição em ambos ciclos adaptados na 3' UTR, uma região importante na atenuação viral em outros flavivírus como a Febre Amarela. Tal inserção pode ter sido resultado do único fator comum entre os ciclos: a linhagem celular utilizada como vetor, que pode ter ocasionado uma pressão seletiva. Por fim, mais estudos sobre as mutações encontradas aqui neste trabalho são necessários a fim de elucidar os mecanismos evolutivos envolvidos e até avaliar qual poderia ser o impacto dessas mutações no *fitness* viral.