

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/04/2023.



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

Bárbara Floriano Molina

**Investigação de mutações no genoma do ZIKV^{BR} após
passagens *in vitro* em células de hospedeiro humano e
símio**

São José do Rio Preto

2021

Bárbara Floriano Molina

Investigação de mutações no genoma do ZIKV^{BR} após passagens *in vitro* em células de hospedeiro humano e símio

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”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal

Coorientadoras: Dra. Mariana Nogueira Batista e
Dra. Cíntia Bittar Oliva

São José do Rio Preto

2021

M722i Molina, Bárbara Floriano
Investigação de mutações no genoma do ZIKVBR após
passagens in vitro em células de hospedeiro humano e símio /
Bárbara Floriano Molina. -- São José do Rio Preto, 2021
61 f. : il., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São
José do Rio Preto
Orientadora: Paula Rahal

1. Microbiologia molecular. 2. Virologia. 3. Arbovírus. 4.
Mutação. 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.

Bárbara Floriano Molina

Investigação de mutações no genoma do ZIKV^{BR} após passagens *in vitro* em células de hospedeiro humano e símio

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”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Cíntia Bittar Oliva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Coorientadora

Prof. Dr. Bruno Moreira Carneiro
UFR – Universidade Federal de Rondonópolis

Profa. Dra. Isabel Maria Vicente Guedes de Carvalho
IB – Instituto Butantan São Paulo

São José do Rio Preto
13 de Abril de 2021

Aos meus pais e avós que sempre me
incentivaram e fortaleceram para seguir
em direção ao que acredito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais que foram responsáveis pela formação do meu caráter e me deram a base para tudo na vida. Minha mãe, Elaine, que sempre me incentivou a ir atrás dos meus sonhos e que garante tudo de melhor para nossa família. Meu maior exemplo de um ser iluminado, dedicado e a mulher mais forte que conheço. Agradeço ao meu pai, Glauco, que se faz presente em tudo o que sou mesmo não estando mais ao nosso lado e que me ensinou a ver as coisas mais belas da vida. Espero estar conseguindo orgulhar os dois, sei que em breve estaremos todos juntos novamente.

Agradeço à minha irmã Rebeca que é a melhor amiga que alguém pode ter, dona de um coração de ouro. Obrigada por sempre me ensinar a ser bondosa, amorosa e por cuidar de mim! Seguimos evoluindo juntas sempre.

Agradeço ao meu namorado Gustavo que me ajuda a ser minha melhor versão todos os dias. Faz meus dias mais felizes mesmo que ainda de longe, transbordando amor, carinho e cuidado. Obrigada por topar compartilhar essa jornada comigo e fazer dela mais leve, bonita e feliz!

Aos meus avós Luiza e Fernando e Therezinha e João, que agora está em nossa memória, eu só tenho a agradecer por toda a vida de dedicação e amor que vocês têm por nossa família. Obrigada por nos lembrarem da importância das coisas mais simples e de ensinarem a valorizar a vida.

Aos amigos Patrícia, Gabriela, Sofia, Matheus e Augusto que estão comigo ao longo dos anos alegrando e apoiando em todos os momentos.

Agradeço em especial à Nayara que, além de amiga da graduação, é também parceira de laboratório há mais de três anos e é minha irmã do coração. Obrigada por todo apoio, conselhos, ensinamentos e aprendizados que construímos juntas até agora e que venham os próximos!

A toda a equipe do Laboratório de Estudos Genômicos que me acolheu desde 2018 com muitos ensinamentos nos âmbitos profissional e pessoal. Foram três anos de compartilhamento de conhecimentos, conselhos, responsabilidades e diversões. Agradeço a cada um de vocês que são capazes de transformar um ambiente de trabalho em uma atmosfera familiar e de apoio. Para mim vocês são família. Obrigada por tudo!

Especialmente à minha orientadora Profa. Dra. Paula Rahal que abriu as portas de seu laboratório e apostou no meu potencial. Agradeço por todas as contribuições pessoais e profissionais, por me mostrar a beleza do universo da virologia, por todas as trocas de conhecimento e orientações. Obrigada por todas as oportunidades que me ofereceu ao longo dos anos, por fazer parte do meu crescimento e por confiar no meu trabalho.

Agradeço grandemente às minhas coorientadoras Dra. Cíntia Bittar e Dra. Mariana Nogueira Batista por me ensinarem com excelência, além de ouvirem,

serem pacientes, compreensivas, me guiarem, direcionarem e apoiarem em todas as fases do mestrado. Obrigada por todos os aprendizados e trocas que tivemos.

Agradeço também a todos os profissionais da saúde que estão no combate à pandemia do COVID-19 diariamente e encontram-se desgastados frente à situação que resiste há mais de um ano. Agradeço grandemente pela dedicação e esforço de todos os envolvidos. À equipe LEGO-COVID, minha sincera gratidão por tudo o que fizeram no diagnóstico, suporte, aconselhamento e divulgação científica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

“Tudo depende do tipo de lente que você utiliza para ver as coisas”

O Mundo de Sofia – Jostein Gaarder

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) foi isolado pela primeira vez em 1947, mas se tornou uma preocupação mundial apenas após as epidemias de 2015, relacionado a manifestações clínicas severas como a Síndrome Congênita pelo vírus Zika e a Síndrome de Guillain-Barré. Transmitido principalmente pela picada de mosquitos *Aedes* sp., o ZIKV é mantido em dois ciclos de transmissão: urbano e silvestre, que envolvem humanos e macacos respectivamente. Ainda que a infecção alternada entre hospedeiros diferentes balanceie sua sequência consenso conservada na natureza, devido a ausência de atividade corretiva da RNA-polimerase dependente de RNA viral, o ZIKV possui alta taxa mutacional e circula em pools de quasiespécies com mutações pontuais que podem possibilitar adaptação a novos nichos e hospedeiros. O objetivo do presente estudo foi investigar mutações virais que surgiram após infecções alternadas em diferentes tipos celulares capazes de mimetizar os ciclos urbano (C_{Ur}) e semi-silvestre (C_{Si}). Para isso, foram realizadas dez passagens alternadas para cada ciclo. Tanto o inóculo inicial quanto os vírus resultantes das décimas passagens de C_{Si} e C_{Ur} tiveram seus genomas completos sequenciados pelo método de Sanger. Foram identificadas mutações sinônimas e não-sinônimas ao final das passagens de ambos os ciclos, sendo todas apresentadas como ambiguidades no eletroferograma. Substituições não-sinônimas foram encontradas nas proteínas E, NS1, NS2A, NS2B, NS3 e NS4B, em especial no resíduo 1263 (NS2A) que foi o único que apresentou mutações em ambos os ciclos, sendo que no C_{Ur} dois nucleotídeos do códon apresentaram variações resultando em quatro possíveis aminoácidos na população viral (V/A1263T/M/A/V). A conclusão das dez passagens alternadas do C_{Si} demonstra a habilidade do ZIKV^{BR} de infectar células de primatas não-humanos e chama atenção para a possibilidade de *spillback*. Além disso, os títulos alcançados no C_{Si} sugerem que o vírus ainda não esteja bem adaptado ao hospedeiro mamífero não-humano visto que seguiram padrão de “alto-e-baixo” no decorrer das passagens, sendo os mais altos nas células de mosquito e mais baixos nas de macaco. Enquanto isso, os títulos de C_{Ur} mostraram maior estabilidade, reforçando o sucesso do ciclo urbano bem estabelecido e com rápida disseminação no mundo todo. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de evolução viral, se as mutações identificadas são adaptativas aos hospedeiros e quais seus impactos no *fitness* viral.

Palavras chave: ZIKV. Alternância de hospedeiro. Mutações virais.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) was first isolated in 1947 but became a public global concern only after the 2015 outbreak being related to more severe clinical manifestations, such as Congenital Zika Syndrome and Guillain-Barré Syndrome. Mainly transmitted through *Aedes* sp. mosquito bites, ZIKV is maintained in two transmission cycles: urban and sylvatic, which involves humans and monkeys respectively. Although alternate passage between distinct hosts balances its conserved consensus sequence in nature, due to the lack of proofreading activity from the RNA-dependent RNA polymerase, ZIKV exhibits high mutational rate and circulates as quasispecies with point mutations that may enable successful adaptation to new niches and hosts. The aim of this study was to investigate viral mutations that emerged after alternate infections of different cell types capable to mimic ZIKV urban (UC) and sylvatic cycles (SC). To this end, ten alternate passages were performed in each cycle. The initial inoculum and the resulting viruses from the tenth passage of each cycle had their complete genome sequenced using Sanger method. Synonymous and non-synonymous mutations were identified at the end of the ten passages of both cycles, all appeared as ambiguities in the electropherogram. Non-synonymous substitutions were found at the E protein, NS1, NS2A, NS2B, NS3 and NS4B, especially in residue 1263 (NS2A) – which was the only one that showed mutations in both cycles and in UC two codon nucleotides exhibited variations resulting in four possible amino acids at that position in viral population (V/A1263T/M/A/V). The completion of the ten SC alternating passages with ZIKV Brazilian strain demonstrates its ability to infect non-human primate cells and draws attention to the possibility of spillback. In addition, the SC titers suggest the virus is not yet well adapted to the mammalian non-human host as they followed a “high-and-low” pattern through the passages, the highest in mosquito cells and lowest in monkey cells. Meanwhile, UC titers showed more stability along the passages, reinforcing the establishment of a successful urban cycle with rapid spread all over the world. Further studies are needed to elucidate the viral evolution mechanisms, whether the identified mutations are host adaptations and what are their impacts in viral *fitness*.

Keywords: ZIKV. Host alternation. Viral mutations.

Sumário

CAPÍTULO I – Considerações Gerais	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 História e disseminação global do ZIKV	11
1.2 Arbovirose	13
1.3 Transmissão	14
1.4 Sintomatologia, prognóstico e tratamento	15
1.5 O Genoma do ZIKV	16
1.6 Adaptação a diferentes hospedeiros	19
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos específicos	20
3. REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO II – Investigation of mutations found in ZIKV African and Asian lineages after mimicking semi-sylvatic and urban cycles in vitro	28
1. ABSTRACT	29
2. INTRODUCTION	30
3. METHODS	31
3.1 Cell culture and virus	31
3.2 Virus stocks	31
3.3 Viral adaptation by alternating host	32
3.4 Viral titration by Plaque Assay	33
3.5 Viral titration by Indirect Immunofluorescence Assay	34
3.6 Complete genome amplification	34
3.7 Sanger sequencing	37
3.8 Genome sequencing analysis	37
4. RESULTS	37
4.1 Viral adaptation by alternating host	37
4.2 Mutations in ZIKV ^{BR} from UC and SC	40
4.3 Mutations in ZIKV ^{AF} from UC and SC	43
5. DISCUSSION	44
6. CONCLUSION	50
7. REFERENCES	50
CAPÍTULO III - Conclusão	60
1. CONCLUSÃO	61

CAPÍTULO I

Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A febre Zika é uma doença viral transmitida por mosquitos que geralmente apresenta manifestações mais brandas muitas vezes similares aos sintomas causados pela infecção pelo vírus da dengue (DENV) e a partir de 2015 passou a ser associada a consequências clínicas mais graves, agora conhecida como Síndrome Congênita pelo vírus Zika (SCZ), que tem a microcefalia como principal quadro clínico em bebês (MITTAL et al., 2017; FRANÇA et al., 2018; PAHO, 2019). Ainda, em 2013 na Polinésia Francesa passou a ser relacionada a síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos (HIGGS; VANLANDINGHAM, 2016).

No início de 2018, a OMS liberou a lista atualizada das doenças consideradas prioritárias para pesquisa e desenvolvimento estando presente entre elas Zika, Ebola e SARS (WHO, 2018). Há a crescente necessidade de desenvolvimento de pesquisas por serem doenças que representam risco para a saúde pública de acordo com seu potencial epidêmico e que não possuem tratamentos ou vacinas eficazes (WHO, 2018).

1.1 História e disseminação global do ZIKV

O Zika vírus (ZIKV) foi descoberto em 1947 como resultado de um programa de pesquisas sobre febre amarela patrocinado pela Fundação Rockefeller na Uganda (*Yellow Fever Research Institute*) (DICK;KITCHEN; HADDOW, 1952; DICK, 1953) (**Figura 1**). Nesse ano, o vírus foi isolado da amostra de sangue de um macaco *Rhesus* sentinela (cepa MR766 do ZIKV) e foi nomeado “Zika vírus” de acordo com o local em que o macaco habitou: a floresta Zika na Uganda (DICK;KITCHEN; HADDOW, 1952; DICK, 1953). Em 1948 o vírus foi encontrado em mosquitos *Aedes africanus* coletados na floresta Zika (DICK;KITCHEN; HADDOW, 1952). O primeiro isolado de humanos ocorreu em 1954 decorrente da infecção de uma garota de 10 anos na Nigéria, sendo reportados outros dois casos no mesmo ano (MACNAMARA, 1954).

Na década de 1960, o ZIKV foi identificado em locais fora da África, em algumas regiões da Ásia, e análises filogenéticas demonstraram a existência de duas principais cepas do vírus: africana e asiática (PETTERSSON et al., 2016; WANG, L. et al., 2016; DUONG;DUSSART; BUCHY, 2017). Na Ásia o ZIKV foi

isolado pela primeira vez de mosquitos *Aedes aegypti* coletados na Malásia em 1969 (MARCHETTE;GARCIA; RUDNICK, 1969). A primeira suspeita de surto de ZIKV causado pela cepa asiática em humanos ocorreu na ilha de Java (Indonésia) em 1977, no qual os sete casos apresentaram sintomas leves (OLSON et al., 1981). Posteriores testes feitos com soro revelaram alta taxa de seroprevalência e indicaram que o ZIKV pode ter circulado pela África, pelo Sudeste e Sul asiático sem ser detectado por causar infecções assintomáticas (MUSSO; GUBLER, 2016; LIU;SHI; QIN, 2019).

Após cerca de sessenta anos da presumida circulação de infecção assintomática de ZIKV, a doença atingiu o Pacífico, mais precisamente a ilha de Yap (Micronésia), na qual ocorreu o primeiro grande surto de Zika em 2007 com 49 casos confirmados e testes sorológicos sugeriram a infecção de cerca de 2/3 da população (R DUFFY et al., 2009). Em 2013 houve um surto ainda maior da cepa asiática no Pacífico: na Polinésia Francesa foram confirmados 396 casos, sendo estipulado que 29 mil pessoas tenham sido infectadas. Esta foi a primeira vez que houve associação da Síndrome de Guillain-Barré com a infecção pelo vírus Zika (CAO-LORMEAU et al., 2014; CAO-LORMEAU, V. M. et al., 2016).

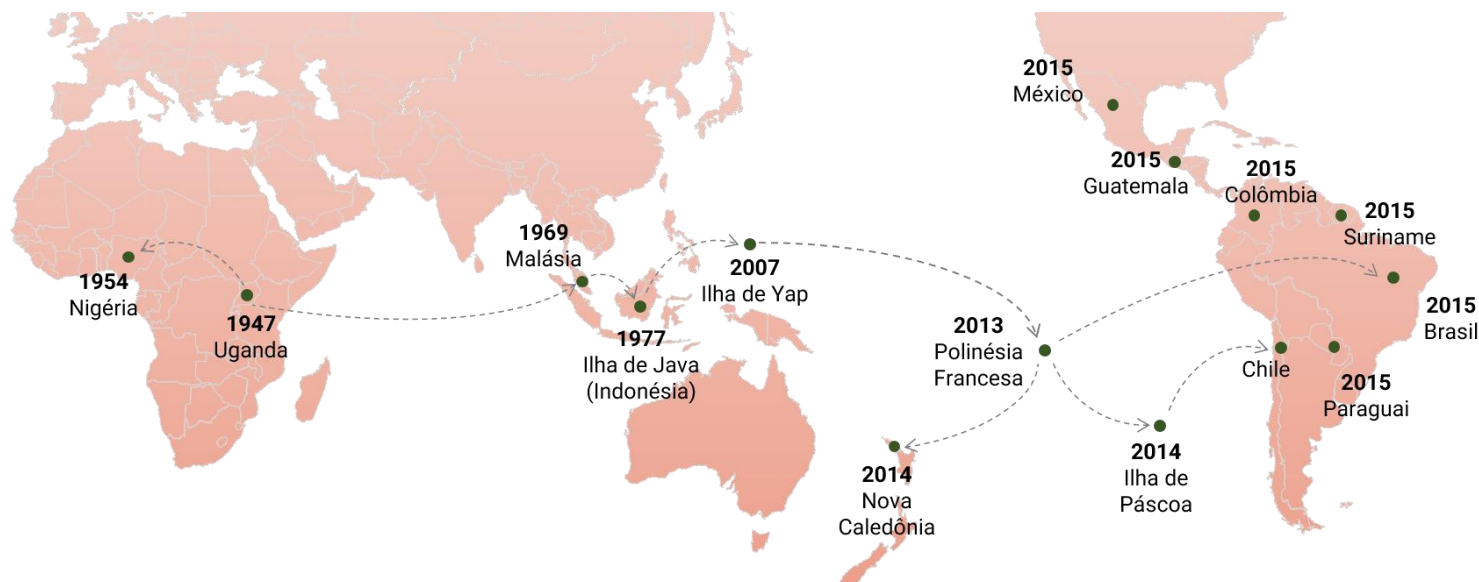
O ZIKV continuou se propagando pelo Pacífico, causando surtos nas ilhas Cook, ilha de Páscoa e da Nova Caledônia, os primeiros casos nas Américas foram reportados em maio de 2015 no Brasil, se espalhando para América Central e Estados Unidos rapidamente, sendo que no final de 2016 pelo menos 48 países e territórios das Américas haviam sido afetados (ZANLUCA et al., 2015; GRUBAUGH et al., 2017; IKEJEZIE et al., 2017; METSKY et al., 2017).

Análises filogenéticas sugerem que o vírus tenha sido introduzido no Brasil cerca de um ano antes de ser confirmado o primeiro caso humano no país entre maio e dezembro de 2013 (FARIA et al., 2017; LIU;SHI; QIN, 2019). A epidemia de Zika que ocorreu no Brasil (2015-2016) teve o maior número de casos até o momento: 215.319 casos prováveis até a última semana de 2016, sendo 130.701 confirmados; em relação às gestantes houve confirmação de mais de 11.000 casos (BRASIL, 2017; FARIA et al., 2017). De acordo com a ONU, até fevereiro de 2017 houve 2656 notificações de casos da SCZ, sendo 2366 relatos apenas no Brasil, que constituiu o “epicentro da epidemia” (WHO, 2017; LIU;SHI; QIN, 2019). A partir do ano de 2017 o número de casos notificados de Zika no Brasil começou a diminuir,

sendo notificados 17.593 casos neste ano, 8.680 em 2018 (BRASIL, 2019), 10.768 em 2019 (BRASIL, 2020a) e 5.334 prováveis casos até de julho de 2020 (BRASIL, 2020b).

Todas as cepas epidêmicas encontradas na região do Pacífico e das Américas desde 2007 pertencem à cepa asiática por apresentarem maior grau de similaridade com a sequência isolada do mosquito asiático (P6-740), que ancora a linhagem asiática (ZANLUCA et al., 2015; WANG, L. et al., 2016; LIU;SHI; QIN, 2019). As cepas isoladas da América Central e do Sul mostraram maior e mais rápida divergência genética e, considerando suas rápidas propagações, sugere-se que tenha funcionado como um novo agente infeccioso em uma população imunologicamente virgem (ZAMMARCHI;SPINICCI; BARTOLONI, 2016).

Figura 1. Disseminação global do ZIKV ao longo dos anos. A linhagem Africana é composta pelos isolados no continente Africano, enquanto a Asiática é representada por todos os isolados após 1969 apresentados no mapa. Fonte: autoria própria.



1.2 Arbovirose

O vírus Zika (ZIKV) é classificado como um arbovírus, ou seja, é um vírus mantido na natureza através de transmissão biológica entre um hospedeiro vertebrado e um artrópode hematófago, no caso os mosquitos (MUSSO; GUBLER, 2016). O gênero de mosquitos *Aedes* é responsável pela rota primária de transmissão do ZIKV, sendo as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* os principais vetores dos vírus Zika, Dengue, Chikungunya e Febre amarela (CHEN; TANG, 2016; MITTAL et al., 2017).

Nas últimas quatro décadas houve a reemergência de um grande número de arboviroses epidêmicas já conhecidas (GUBLER, 2002; MUSSO; GUBLER, 2016). O vírus da dengue (DENV), por exemplo, passou a ser considerado epidêmico em todas as regiões tropicais do mundo (GUBLER, 2011); a situação do vírus Chikungunya (CHIKV) passou de “incomum” e “pouco documentado” para causador de “doença epidêmica urgente” à saúde pública mundial (NHAN; MUSSO, 2015); o vírus da Febre do Nilo Ocidental (WNV) migrou do Hemisfério Oriental para o Ocidental no ano de 1999 e sua rápida disseminação nos dois continentes é conhecida por ser um dos eventos de maior destaque da arbovirologia nos últimos vinte anos (ROEHRIG, 2013). As epidemias de ZIKV, como já abordado, também se iniciaram com a reemergência do vírus que foi descoberto em 1947, e permaneceu silencioso até o primeiro surto ocorrido em 2007, e dispersão para outras regiões onde até então não circulava (LIU; SHI; QIN, 2019).

Há fortes evidências de que a ressurgência dessas arboviroses epidêmicas está associada a novos modos de transmissão e diferentes manifestações clínicas, o que em muitos casos é resultante de modificações genéticas (MUSSO; GUBLER, 2016). Ainda, diversos fatores estão associados ao reaparecimento dessas doenças de forma epidêmica, como: crescimento da população global e urbanização, aumento das viagens, globalização, adaptação a novos tipos de hospedeiro, falta de controle efetivo do vetor, expansão da distribuição geográfica de vetores mosquitos e mudanças climáticas (GUBLER, 2002; GUBLER, 2011; MUSSO; GUBLER, 2016; MATYSIAK; ROESS, 2017).

1.3 Transmissão

A principal e melhor descrita rota de transmissão do ZIKV é através do vetor – majoritariamente os mosquitos do gênero *Aedes*, que são mais ativos durante o dia e se reproduzem facilmente em reservatórios domésticos de água (CHEN; TANG, 2016; RUNGE-RANZINGER et al., 2019). De maneira geral o Zika possui dois ciclos ecológicos de transmissão: o ciclo silvestre ou enzoótico e o ciclo urbano. O silvestre envolve mosquitos como hospedeiro artrópode e os hospedeiros vertebrados, geralmente primatas não-humanos. Contudo alguns estudos apontam que outros animais vertebrados não primatas também podem fazer parte desse ciclo (DARWISH et al., 1983; OLSON et al., 1983; ALTHOUSE et al., 2016; MUSSO;

GUBLER, 2016). O ciclo urbano também envolve o vetor artrópode, mas tem como hospedeiro o ser humano: o mosquito se infecta picando uma pessoa infectada e espalha o vírus para outras pessoas através de sua picada (CHEN; TANG, 2016). O ZIKV demonstrou um ciclo urbano bem estabelecido no Brasil com base na magnitude da epidemia de 2015-2016 e por derivar das linhagens asiáticas contemporâneas que também foram responsáveis por surtos locais. Apesar da detecção do vírus em primatas não humanos, ainda não é possível comprovar a existência de um ciclo silvestre no país, que caso ocorra dificultaria muito os esforços de erradicação da doença e ocasionaria maior exposição humana à infecção por ZIKV (TERZIAN, ANA CAROLINA B. et al., 2018; VANCHIERE et al., 2018).

Além disso, existem as rotas de transmissão da mãe para o filho (transplacentar) e a rota sexual de transmissão (geralmente ocorre de um homem para uma mulher) (RUNGE-RANZINGER et al., 2019). Ainda há possíveis rotas que necessitam mais estudos para que sejam comprovadas, como: amamentação, transmissão perinatal e por transfusão sanguínea (RUNGE-RANZINGER et al., 2019).

1.4 Sintomatologia, prognóstico e tratamento

Geralmente a infecção por Zika resulta em sintomas relativamente leves como febre baixa, cefaleia, erupções cutâneas, mialgia, artralgia e astenia (PAHO, 2019). Apesar disso, os sintomas aparecem em apenas uma de cinco pessoas, sendo a taxa de mortalidade baixa (CHEN; TANG, 2016). As manifestações ocorrem de dois a doze dias após a picada do mosquito infectado e podem durar até uma semana (CHEN; TANG, 2016). Apesar disso, a infecção por ZIKV também é associada a condições severas em adultos e recém-nascidos (MITTAL et al., 2017; FRANÇA et al., 2018). Por ter a habilidade de invadir e ultrapassar a membrana placentária, a infecção pelo vírus pode resultar na Síndrome Congênita pelo vírus Zika (SCZ), que inclui microcefalia, calcificações intracranianas, anormalidades no corpo caloso, perda auditiva, lesões retinianas e distúrbio craniofacial em recém-nascidos (MITTAL et al., 2017). Em adultos é associada à síndrome de Guillain-Barré (SGB), que é uma neuropatologia autoimune grave na qual o sistema imune ataca os nervos periféricos, levando a uma paralisia parcial ou total, sendo a taxa de letalidade da

doença de 3% a 5% principalmente nos casos em que há paralisia na musculatura responsável pela respiração (WHO, 2016; LIU;SHI; QIN, 2019). A SGB também já foi relacionada a infecções por outros arbovírus como DENV, CHIKV, vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e WNV (CAO-LORMEAU, V.-M. et al., 2016). O tratamento atual para Zika é direcionado ao tratamento dos sintomas e inclui líquidos, repouso, analgésicos e antipiréticos, visto que ainda não há antivirais disponíveis, mas grandes esforços têm se aplicado ao desenvolvimento destes e de uma vacina (CHEN; TANG, 2016; SHREVE et al., 2019).

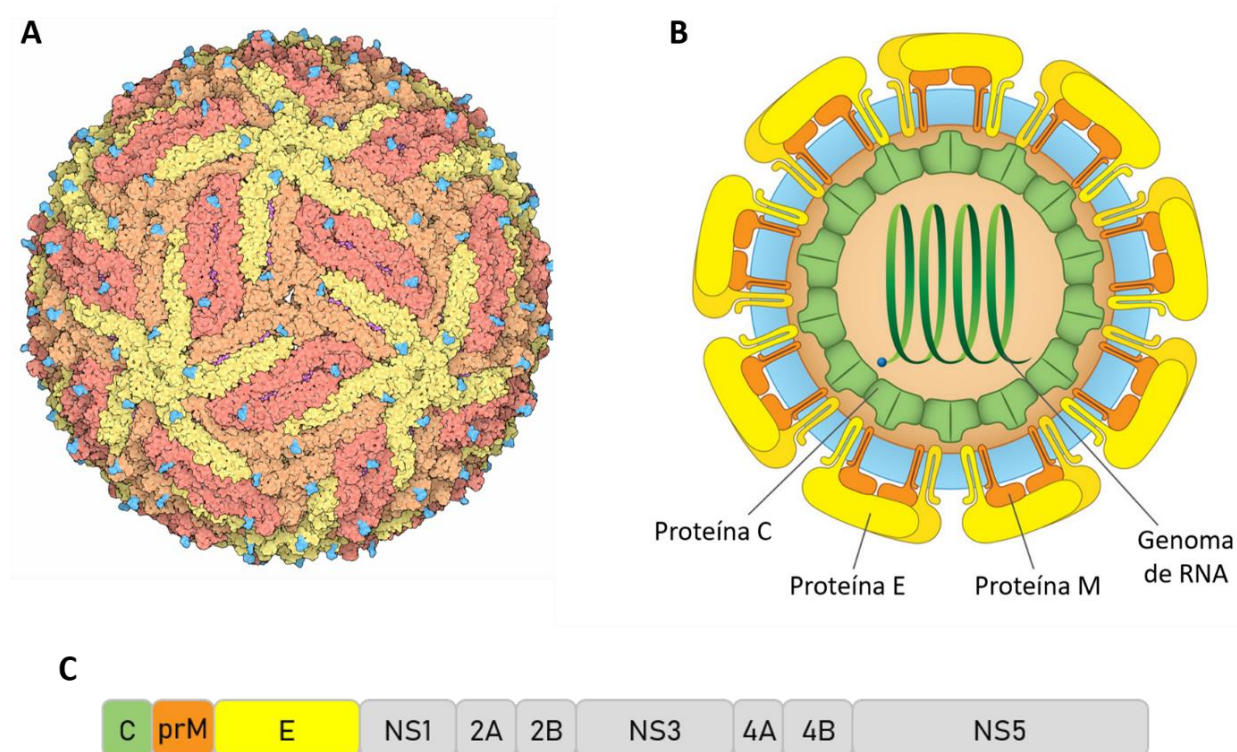
1.5 O Genoma do ZIKV

O ZIKV é um vírus envelopado esférico de aproximadamente 50 nm de diâmetro que pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (**Figura 2A**) (WEAVER et al., 2016; LIU;SHI; QIN, 2019; VIRALZONE, 2019). Seu genoma consiste em uma molécula de RNA fita simples sentido positivo de 10.8 kb de comprimento e é organizado em uma única fase de leitura aberta (ORF – do inglês, *Open Reading Frame*) flanqueada por regiões não traduzíveis (UTR), 5'UTR e 3'UTR (LIU;SHI; QIN, 2019) que codifica uma única poliproteína. A poliproteína gerada é processada por proteases virais e do hospedeiro em três proteínas estruturais que formam o vírion (capsídeo C, pré-membrana prM e envelope E – **Figura 2B**) e sete proteínas não estruturais que são responsáveis por diversas funções, dentre elas a replicação viral e modificação das respostas do hospedeiro (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (**Figura 2C**) (KUNO; CHANG, 2007; LIU;SHI; QIN, 2019).

A proteína C compõe o capsídeo viral, é a menor proteína do genoma do ZIKV, composta por 122 aminoácidos, e é o primeiro gene a ser traduzido da poliproteína. Sabe-se que interage com o RNA viral para auxiliar o empacotamento do genoma na partícula que está se formando (TAN et al., 2020).

A proteína precursora de membrana (prM) apresenta papel importante na montagem de vírions maduros por interagir com a proteína E formando o complexo prM-E na bicamada lipídica, que juntamente de C encapsula o genoma viral (PIERSON; DIAMOND, 2012; LIN et al., 2018). A clivagem de prM em M atua na maturação viral, estando presente no vírus maduro apenas a proteína M (NAMBALA; SU, 2018).

Figura 2. Organização da partícula e do genoma do Zika vírus. **A)** Microscopia crioelétrica da estrutura do ZIKV – proteínas E em amarelo e vermelho com glicosilações em azul; proteína M em magenta. Fonte: The RCSB PDB – Molecule of the Month. **B)** Estrutura interna do ZIKV – corte transversal da molécula mostra o arranjo das proteínas estruturais indicadas respectivamente na figura. Fonte: Luciano Cosmo - VectorStock - image ID 31980033. **C)** Poliproteína viral – proteínas não estruturais em cinza e estruturais coloridas. Fonte: autoria própria.



A proteína do envelope (E) é o principal componente da superfície do ZIKV e da maioria dos *Flavivirus* (VALENTE; MORAES, 2019). Formada por 504 aminoácidos, é a maior proteína estrutural do genoma e consiste em quatro domínios: um domínio transmembrana e três ectodomínios externos à membrana – domínio amino-terminal (DI), domínio de dimerização (DII) e o domínio carboxi-terminal tipo imunoglobulina (DIII) (HASAN et al., 2018). No vírus maduro a proteína E forma dímeros arranjados de forma compacta que torna a bicamada lipídica extremamente protegida, estando a proteína M localizada logo abaixo (SIROHI; KUHN, 2017; HASAN et al., 2018). Suas principais funções estão envolvidas na entrada do vírus na célula hospedeira a partir do reconhecimento de receptores no hospedeiro e fusão das membranas viral e do endossomo da célula hospedeira, além da montagem da partícula viral (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2014; VALENTE;

MORAES, 2019). Ainda, é alvo da resposta imune adaptativa por ser o principal foco de anticorpos neutralizantes (DAI et al., 2016).

A NS1 apresenta peso molecular variável por conta dos diferentes níveis de glicosilação, tendo em média aproximadamente 48 kDa (BROWN et al., 2016; VALENTE; MORAES, 2019). Possui papéis importantes na replicação, patogênese e resposta imune do hospedeiro (BROWN et al., 2016). Organizada em três domínios, N-terminal, C-terminal e região intermediária rica em epítomos, a NS1 pode se apresentar sob a forma de monômeros, dímeros (mNS1) ou hexâmetros (sNS1) (JAVED et al., 2018; SILVA, 2019).

Classificada como uma proteína multifuncional entre os *Flavivirus*, a NS2A atua na montagem do vírion, replicação viral, permeabilização da membrana e disseminação a partir dos mosquitos (CHANG et al., 1999; KÜMMERER; RICE, 2002; MCELROY et al., 2006; ROSSI et al., 2007). A NS2A recruta o RNA genômico, e os complexos prM/E e NS2B/NS3 para montagem do vírion e coordena a morfogênese (ZHANG et al., 2019). Além disso, também interfere na resposta imune inata antagonizando a resposta de interferon tipo I (THI THUY NGAN et al., 2019).

A proteína NS3 participa do complexo de replicação do ZIKV (VALENTE; MORAES, 2019). Uma de suas funções na replicação é relacionada à atividade enzimática de helicase em sua porção C-terminal; enquanto sua porção N-terminal localiza-se domínio com atividade proteolítica (serino-protease) que atua junto da proteína NS2B, que é seu cofator, clivando alguns pontos da poliproteína e individualizando proteínas virais (JAIN et al., 2016; VALENTE; MORAES, 2019).

A NS4A também atua como cofator da principal protease viral NS3; cofator para ativação da NS4B e está associada à replicação viral por auxiliar na estabilização de RNAs dupla-fita intermediários do processo de replicação (HASAN et al., 2018; SILVA, 2019).

A NS5 é a maior proteína codificada e representa a RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) viral. De acordo com sua função, é a proteína mais conservada, sendo sua sequência 94% idêntica entre as linhagens Africana e Asiática do ZIKV (WANG et al., 2017). Na extremidade N-terminal existe o domínio de metiltransferase e na porção C-terminal a RpRd: compreendem-se os

subdomínios palma, dedos e polegar, sendo que a palma funciona como o centro catalítico da polimerase com o Motif C localizado nela e o sítio catalítico também (WANG et al., 2018). Além de participar da replicação do genoma, atua no antagonismo da resposta de interferon e também pode participar da modulação da atividade do spliceossomo celular (DE MAIO et al., 2016; WANG et al., 2018).

1.6 Adaptação a diferentes hospedeiros

A capacidade de adaptação a novos vetores é comum à maioria dos arbovírus, tendo grande impacto na expansão geográfica das arboviroses (MUSSO; GUBLER, 2016). O ZIKV foi identificado primeiramente em mosquitos *Aedes aegypti* e passou a ser encontrado também em *Aedes albopictus* (nas ilhas Yap) e *Aedes hensilii* (em Gabão) (R DUFFY et al., 2009; GRARD et al., 2014). Além disso, arbovírus também são capazes de adaptarem-se a novos hospedeiros/reservatórios para amplificação (WEAVER, 2005). O ZIKV muito provavelmente adaptou-se de um ciclo ancestral silvestre, que envolvia primatas não-humanos como hospedeiro vertebrado e mosquitos que habitam os dosséis das florestas como vetores, para um novo ciclo urbano/periurbano que envolve humanos e mosquitos do gênero *Aedes* como vetores (ALTHOUSE et al., 2016; MUSSO; GUBLER, 2016).

As manifestações clínicas mais severas do ZIKV tornaram-se evidentes e a propagação geográfica atingida pelo vírus resultou de adaptação a novos hospedeiros, novos vetores, novas rotas de transmissão e impôs diversos efeitos de gargalo na população viral (JUN et al., 2017). De acordo com a alta taxa mutacional dos vírus de RNA, assume-se que algumas das novas características do ZIKV têm base genética direcionada por pressão seletiva (JUN et al., 2017).

Essa constante alternância entre hospedeiros a qual estão sujeitos balanceia a sequência consenso conservada dos arbovírus na natureza quando comparados aos outros vírus de RNA, visto que as habilidades de transmissão e replicação nesses diferentes hospedeiros estão sob diferentes pressões (JENKINS et al., 2002; CIOTA; KRAMER, 2010; MOSER et al., 2018). De maneira geral, as populações dos arbovírus são mantidas com *fitness* viral ligeiramente abaixo do ideal dentro de cada espécie com a finalidade de permitir que a replicação seja eficiente em todos seus hospedeiros; caso haja alguma seleção que aumente o *fitness* viral através de infecções repetidas do vírus em uma única espécie, muito provavelmente seu *fitness*

usage (RSCU) between ZIKV and hosts indicate the virus tends to develop codon usage pattern similar to those of its hosts (WANG, H. et al., 2016). According to Wang and collaborators (2016), the codon usage bias of the two major ZIKV lineages is relatively low and it is supported that translational selection and mutation pressure plays important roles in shaping ZIKV's codon usage pattern.

6. CONCLUSION

Even though performing the same adaptation experiments with the same cellular lineages, the distinct ZIKV strains behaved differently in each cycle. The completion of the ten alternate passages of the semi-sylvatic cycle with the ZIKV^{BR} strain draws attention to its potential to establish an enzootic cycle, while the interruption of the ZIKV^{AF} urban cycle at the third passage might be a sign of inability to adapt to human host and maintain the urban transmission. Both strains ZIKV^{BR} and ZIKV^{AF} had mutations at nucleotide and amino acid level, never at the same position. The greater number of variations found at the ZIKV^{BR} genomes when compared to the ZIKV^{AF} might be related to the ability of contemporary Asian strains to adapt more easily to few passages, which reinforces the genetic and phenotypic characteristics intrinsic to each lineage. Further studies are needed to elucidate the viral evolution mechanisms, whether the identified mutations are host adaptations and what are their impacts in viral fitness.

7. 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://tmcaculator.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>>.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico - Zika**. Ministério da Saúde, p.1-11. 2017.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico - Zika**. Ministério da Saúde, p.1-14. 2019.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico 02**. Ministério da Saúde 16 de janeiro de 2020. 2020a.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico - Zika**. Ministério da Saúde 21 de agosto de 2020. 2020b.

BROWN, W. C. et al. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. **Nat Struct Mol Biol**, v. 23, n. 9, p. 865-867, Sep 2016. ISSN 1545-9993 (Print).

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.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, 2016/04/09 2016. ISSN 0140-6736. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673616005626>>.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, Apr 9 2016. ISSN 0140-6736.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerg Infect Dis**, v. 20, n. 6, p. 1085-1086, Jun 2014. ISSN 1080-6040.

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).

CHANG, Y. S. et al. Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus. **J Virol**, v. 73, n. 8, p. 6257-6264, 1999. ISSN 0022-538X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10400716>>.

CHEN, H. L.; TANG, R. B. Why Zika virus infection has become a public health concern? **J Chin Med Assoc**, v. 79, n. 4, p. 174-178, Apr 2016. ISSN 1726-4901.

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>>.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, 12/23 2014.

DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696-704, May 11 2016. ISSN 1931-3128.

DARWISH, M. A. et al. A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 77, n. 4, p. 442-445, 1983. ISSN 0035-9203 (Print).

DE MAIO, F. A. et al. The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 8, p. e1005841, Aug 2016. ISSN 1553-7366 (Print).

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)>.

DUONG, V.; DUSSART, P.; BUCHY, P. Zika virus in Asia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 54, p. 121-128, 2017/01/01/ 2017. ISSN 1201-9712. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S120197121631640X>>.

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>>.

FARIA, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, v. 546, p. 406, 05/24/online 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature22401>>.

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).

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>.

GRARD, G. et al. Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*? **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2681-e2681, 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516683>>.

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).

GRUBAUGH, N. D. et al. Genomic epidemiology reveals multiple introductions of Zika virus into the United States. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 401-405, Jun 15 2017. ISSN 0028-0836.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch Med Res**, v. 33, n. 4, p. 330-342, Jul-Aug 2002. ISSN 0188-4409 (Print).

GUBLER, D. J. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 1, p. S3-S11, 2011. ISSN 1348-8945.

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/>>.

HASAN, S. S. et al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2018/01/01 2018. ISSN 1545-9985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>>.

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>>.

HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Search and one will find: Zika virus everywhere. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 4, p. 207-208, 2016. ISSN 0035-9203. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/trstmh/trw020>>. Acesso em: 10/31/2020.

IKEJEZIE, J. et al. Zika Virus Transmission - Region of the Americas, May 15, 2015-December 15, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 66, n. 12, p. 329-334, Mar 31 2017. ISSN 0149-2195.

JAIN, R. et al. Structure of the NS3 helicase from Zika virus. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 23, n. 8, p. 752-754, 2016/08/01 2016. ISSN 1545-9985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nsmb.3258>>.

JAVED, F. et al. Zika virus: what we need to know? **J Basic Microbiol**, v. 58, n. 1, p. 3-16, Jan 2018. ISSN 0233-111x.

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.

JUN, S. R. et al. Suggested mechanisms for Zika virus causing microcephaly: what do the genomes tell us? **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. Suppl 14, p. 471, Dec 28 2017. ISSN 1471-2105.

KÜMMERER, B. M.; RICE, C. M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **J Virol**, v. 76, n. 10, p. 4773-4784, May 2002. ISSN 0022-538X (Print).

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).

LIN, H. H. et al. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. **Biotechnol Adv**, v. 36, n. 1, p. 47-53, Jan-Feb 2018. ISSN 0734-9750.

LIU, J. et al. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. **Nature Microbiology**, v. 1, p. 16087, 06/20/online 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.87>>.

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) 1740-1526 (Linking). 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>>.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 48, n. 2, p. 139-145, Mar 1954. ISSN 0035-9203 (Print).

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.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 18, n. 3, p. 411-415, May 1969. ISSN 0002-9637 (Print).

MATYSIAK, A.; ROESS, A. Interrelationship between Climatic, Ecologic, Social, and Cultural Determinants Affecting Dengue Emergence and Transmission in Puerto Rico and Their Implications for Zika Response. **J Trop Med**, v. 2017, p. 8947067, 2017. ISSN 1687-9686 (Print).

MCELROY, K. L. et al. Manipulation of the yellow fever virus non-structural genes 2A and 4B and the 3'non-coding region to evaluate genetic determinants of viral dissemination from the *Aedes aegypti* midgut. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 6, p. 1158-1164, Dec 2006. ISSN 0002-9637 (Print).

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.

MITTAL, R. et al. Zika virus: An emerging global health threat. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 19, 2017. ISSN 2235-2988.

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) 0893-8512 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27029595>>.

NAMBALA, P.; SU, W. C. Role of Zika Virus prM Protein in Viral Pathogenicity and Use in Vaccine Development. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1797, 2018. ISSN 1664-302X (Print).

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>>.

NHAN, T. X.; MUSSO, D. The burden of chikungunya in the Pacific. **Clin Microbiol Infect**, v. 21, n. 6, p. e47-48, Jun 2015. ISSN 1198-743x.

OLSON, J. G. et al. A survey for arboviral antibodies in sera of humans and animals in Lombok, Republic of Indonesia. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 77, n. 2, p. 131-137, Apr 1983. ISSN 0003-4983 (Print).

OLSON, J. G. et al. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 75, n. 3, p. 389-393, 1981. ISSN 0035-9203 (Print).

PAHO. Zika virus infection. 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article%20&id=427&Itemid=41484&lang=en>. Acesso em: 07/03/2019.

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>>.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. **Curr Opin Virol**, v. 2, n. 2, p. 168-175, Apr 2012. ISSN 1879-6257 (Print).

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.

R DUFFY, M. et al. **Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia**. *N. Engl. J. Med.* 360: 2536-2543 p. 2009.

ROEHRIG, J. T. West nile virus in the United States - a historical perspective. **Viruses**, v. 5, n. 12, p. 3088-3108, Dec 10 2013. ISSN 1999-4915.

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 1080-6040. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29664391>>.

ROSSI, S. L. et al. Mutations in West Nile virus nonstructural proteins that facilitate replicon persistence in vitro attenuate virus replication in vitro and in vivo. **Virology**, v. 364, n. 1, p. 184-195, Jul 20 2007. ISSN 0042-6822 (Print).

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.

RUNGE-RANZINGER, S. et al. Zika transmission patterns: a meta-review. **Tropical Medicine & International Health**, 2019. ISSN 1360-2276. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1111/tmi.13216>>.

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).

SHREVE, M. et al. Zika: An Unfolding Story. **The Journal for Nurse Practitioners**, p. 5, 2019/02/10/ 2019. ISSN 1555-4155. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1555415518310468>>.

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.

SILVA, C. S. **Desenvolvimento e Caracterização de Linhagem Celular Expressando Estavelmente um Replicon Repórter Do Vírus Zika**. 2019. Biociências e Biotecnologia em Saúde, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

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>>.

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **J Infect Dis**, v. 216, n. suppl_10, p. S935-s944, Dec 16 2017. ISSN 0022-1899 (Print).

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>>.

TAN, T. Y. et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 895, 2020/02/14 2020. ISSN 2041-1723. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>>.

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.

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, 2018/10/30 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34423-6>>.

THI THUY NGAN, N. et al. Zika Virus Proteins NS2A and NS4A Are Major Antagonists that Reduce IFN- β Promoter Activity Induced by the MDA5/RIG-I Signaling Pathway. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 1665-1674, 2019. ISSN 1017-7825. Disponível em: <<http://jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1909.09017>>.

UPADHYAY, A. K. et al. Crystal structure of full-length Zika virus NS5 protein reveals a conformation similar to Japanese encephalitis virus NS5. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications**, v. 73, n. Pt 3, p. 116-122, 2017. ISSN 2053-230X. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28291746>>.

VALENTE, A. P.; MORAES, A. H. Zika virus proteins at an atomic scale: how does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection? %J *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. v. 25, 2019. ISSN 1678-9199. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992019000100206&nrm=iso>.

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>>.

VIRALZONE. Zika Virus. 2019. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species>.

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, B. et al. Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 75, n. 10, p. 1723-1736, 2018. ISSN 1420-9071. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29423529>>.

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) 1931-3128 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27091703>>.

WEAVER, S. C. Host range, amplification and arboviral disease emergence. **Arch Virol Suppl**, n. 19, p. 33-44, 2005. ISSN 0939-1983 (Print).

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).

WHO. Síndrome de Guillain-Barré. 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/mediacentre/factsheets/guillain-barre-syndrome/pt/>>.

WHO. **Situation Report - Zika Virus**. World Health Organization, p.1-6. 2017.

WHO. **2018 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint**. Geneva, Switzerland, p.1-17. 2018.

XIA, H. et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 414, 2018/01/29 2018. ISSN 2041-1723. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02816-2>>.

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.

YUAN, L. et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 933-936, Nov 17 2017. ISSN 0036-8075.

ZAMMARCHI, L.; SPINICCI, M.; BARTOLONI, A. Zika Virus: a Review from the Virus Basics to Proposed Management Strategies. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. e2016056-e2016056, 2016. ISSN 2035-3006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27872736>>.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569-572, 2015. ISSN 0074-0276. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000400569&nrm=iso>.

ZHANG, X. et al. Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. v. 10, n. 5, p. e02375-02319, 2019. Disponível em: <<https://mbio.asm.org/content/mbio/10/5/e02375-19.full.pdf>>.

ZHAO, B. et al. Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14762, 2017/03/27 2017. ISSN 2041-1723. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ncomms14762>>.

CAPÍTULO III

Conclusão

1. CONCLUSÃO

A realização das dez passagens alternadas do CUr com pouca variação nos títulos virais reforça o que pode ser visto a partir dos surtos recentes de Zika vírus, que a transmissão da linhagem Asiática contemporânea entre humanos e mosquitos é bem estabelecida e sucedida, com rápida disseminação global. Contrastante com os “altos e baixos” dos títulos ao longo das passagens do CSi, sendo os maiores títulos alcançados nas infecções feitas em células de mosquito, sugerindo que o vírus ainda não está muito bem adaptado ao hospedeiro mamífero não-humano. Ainda, a conclusão das dez infecções do CSi demonstra capacidade da cepa brasileira de infectar células de macaco, o que chama atenção para a eventual ocorrência do fenômeno *spillback*. Os genomas virais dos ciclos urbano e semi-silvestre apresentaram mutações sinônimas e não sinônimas distintas, demonstrando que a mesma cepa do ZIKV se comporta de maneira diferente dependendo do hospedeiro. Somente o resíduo 1263 (NS2A) apresentou mutações em ambos os genomas e destacou-se pela grande variação de aminoácidos encontrada no CUr. As substituições sinônimas encontradas no presente estudo podem estar relacionadas a utilização preferencial de códons e também a adaptação ao hospedeiro. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de evolução viral, se as mutações identificadas são adaptativas aos hospedeiros e quais são seus impactos no *fitness* viral.