



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Thiago Silva Messias

Investigação sorológica, molecular e filogenética do *Zika virus*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Virginia Bodelão Richini Pereira

Botucatu

2019

Thiago Silva Messias

Investigação sorológica, molecular e filogenética do *Zika virus*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Virginia Bodelão Richini Pereira

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Messias, Thiago Silva.

Investigação sorológica, molecular e filogenética do *Zika* vírus / Thiago Silva Messias. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Virgínia Bodelão Richini Pereira
Capes: 21201013

1. *Zika* vírus. 2. Diagnóstico molecular. 3. Filogenia. 4. Sorologia.

Palavras-chave: Diagnóstico Molecular; Filogenia; Sorologia; *Zika* Virus.

Dedicatória

Essa pesquisa concretiza um dos maiores sonhos da minha vida que é ser mestre na área da virologia. Os seguintes descritos foram e são essenciais para que esse sonho se concretizasse, o companheirismo de vocês é impossível de descrever fielmente, então peço desculpas pela simplicidade, dedico a realização desse sonho e missão a:

Deus que chamo orgulhosamente e com bastante frequência de Grande Cientista. Agradeço a possibilidade de tentar compreender uma parte singela de sua vasta criação. Sem o Senhor eu com toda certeza teria sucumbido as pequenas dificuldades enfrentadas. Agradeço o constante treinamento na arte da adaptação, porém mantendo meu caráter íntegro. Reconheço que ainda nada sei e tenho que melhorar a cada instante, afinal de contas isso é evolução.

Espero que não pareça arrogância de minha parte, mas dedico a uma criança de nove anos que jogando videogame teve um primeiro contato com um vírus fictício, ironia do destino o vírus T (Não que eu acredite em destino) da série de jogo Resident Evil. A partir daí passou a ser um deleite fascinante ler qualquer coisa sobre esses seres nanoscópicos. Inspirado pela história e por um vilão com sotaque inglês britânico essa criança definiu um sonho de possuir formação científica na virologia. Esse sonho foi então subestimado, ridicularizado e abafado. Essa criança foi estigmatizada como burra, pobre demais para isso e outros tipos de insultos que não vale a pena acrescentar nessa dedicatória. Imatura demais para processar essas ocorrências a criança sufocou esse sonho por muitos anos, para só na graduação redespertá-lo. Você conseguiu criança! A criança agora é um pouco menos imatura e muito mais “burra” porque a cada investigação menos se sabe sobre o objeto de estudo.

Aos meus filhos. De diferentes espécies, não que a distância filogenética faça diferença nesse caso. Coloco os nomes para homenageá-los e eternizá-los: Soni, Soly, Kika, Rhaegal, Rhaenys, Visenya, Aegon, Xexênio e Drago. Em especial dedico esse trabalho ao meu filho Bruce Wayne. Desde de mitologias milenares ao conhecimento popular de hoje é dito que os animais de “estimação” protegem seus donos de males não compreendidos pela nossa inteligência limitada e meu filho Bruce cumpriu seu papel de forma tão corajosa quanto seu nome nos remete ao Batman. Foi uma honra ser seu pai e protegido!

A minha mãe Denise agradeço tudo o que você passou para me criar. Não posso esquecer de agradecer o financiamento desse sonho que foi com muita luta e trabalho. Aos meus avós Fatima e Abel. Por sua criação fundamental para estabelecer minha força. Vó você me apresentou a Deus, esse é o maior de todos os presentes e mimos que ganhei de você. Vô a

minha paixão pela natureza nasceu e se tornou mais forte a cada vez que você me carregava nos ombros e mostrava as diferenças das árvores e animais que encontrávamos no caminho, se tento ser um bom investigador é por causa da lembrança constante desses momentos.

Aos meus irmãos. Sempre pedi irmãos a Deus, levou tempo para eu entender que laços fraternais são significantes independente de compartilhar similaridades genéticas: Daniel, nossa amizade antiga já presenciou diversas histórias fantásticas que dariam um livro, porém no contexto da realização do presente sonho lembrarei dos dias gastos na infância com os “experimentos” que realizávamos. Obrigado pelo seu sincero companheirismo; Kaique você presenciou minhas diferentes ideologias, presenciou reações de fraquezas e força e sempre esteve ao meu lado, muitas vezes me conscientizando e me dando um ombro amigo para apoiar ou uma “porrada” figurativa para despertar. Muito obrigado por compreender minhas limitações, principalmente as sociais; Yago, sei que você não é muito bom em expressar seus sentimentos, partindo de alguém que também muitas vezes foi e é mal interpretado digo que admiro seu potencial, assim como você admira o meu. Obrigado por me acolher como seu irmão. Concluo que vocês são meu reforço quando a situação é perigosa de mais. Como um apaixonado por quadrinhos que sou, faço a analogia pretenciosa de que sou o Batman quando precisa da ajuda da liga da justiça.

Aos meus pais adotivos Márcia e Osvaldo. Obrigado pelo exemplo e por sempre acreditarem em mim e me acolherem quando mais ninguém o fez. Precisaria de muito mais que cinco milhões para recompensá-los.

Para a realização desse sonho fui treinado por mestres fantásticos. Não coloquei seus devidos títulos, porque acredito que os títulos nunca mudaram a pessoa que vocês são e pretendo seguir tal exemplo. É uma honra dedicar esse trabalho a:

Narciso Vieira. O senhor me ensinou que meus sonhos são possíveis e que eu tenho capacidade para realizá-los. Obrigado por ter me aceito como seu aluno no primeiro ano de faculdade. Aquela singela revisão sobre características moleculares do *Zaire ebolavirus* foi o gatilho para o despertar do presente sonho.

Fatima Amâncio. A senhora enxergou meu potencial e me incentivou a continuar. Talvez eu não lhe dê um prêmio Nobel, porém juro sempre tentar me superar.

Gislaine Querino. A senhora me ensinou a colocar os pés no chão e que é possível fazer um ótimo trabalho mesmo limitado.

Elaine Camarinha Marcos. Abstrair se tornou uma filosofia para mim. Você me mostrou que é possível manter um caráter íntegro, por mais que adaptações sejam necessárias. E fez com que eu evidenciasse que ser diferente é minha melhor característica.

Virginia Bodelão. Você me ensinou que nenhum homem é uma ilha e que não posso e não devo carregar o mundo em minhas costas. Obrigado por me conceder essa fantástica oportunidade.

É uma honra indescritível ser treinado por vocês!

A todos meus amigos que por questão de espaço não pude citar aqui, saibam que vocês estão na minha memória e agradeço infinitamente por tê-los nessa jornada.

Encerro minha dedicatória com um rebate direto a todas as dificuldades que enfrentei para realizar esse sonho, com a seguinte frase que tiro do livro que também mudou minha vida: A Tormenta de Espadas - As Crônicas do Gelo e do Fogo:

“- Drogon – cantou em voz alta, em tom doce, todo o seu medo esquecido. – Dracarys.

O dragão negro abriu as asas e rugiu.” – George R. R. Martin

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade de fazer parte desse grupo de profissionais mestres e doutores nessa área que sou completamente suspeito de tecer elogios.

Ao Instituto Adolfo Lutz e minha Orientadora Profa. Dra. Virginia Bodelão Richini Pereira pela oportunidade de realizar essa pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento dessa pesquisa no âmbito da Chamada MCTIC/FNDCT-CNPq/ MEC-CAPES/ MS-Decit / Nº 14/2016 - Prevenção e Combate ao vírus Zika. Processo 88887.136169/2017-00. Bolsa CAPES 88887.136169/2017-00. Auxílio CAPES nº 2068/2016, processo nº 88881.130820/2016-01.

Ao Professor Dr. Cassiano Victória da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. Pela realização do geoprocessamento de amostras dessa pesquisa.

A Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais. Pelas sugestões em relação a filogenética dessa pesquisa.

A Equipe de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz: Adriana Bernadete Pinto Calero, Isabel Soares de Almeida, Lívia Carla Ramos Augusto, Maria José Gomes Marques e Milena Zambon Garcia pelo acolhimento pessoal e profissional e pela ajuda excepcional para realização desse trabalho.

“Non omnis moriar multaue pars mei Vitabit Libitinam”

Horácio, Ode III, 30. De O Livro da Mitologia, 2013.

“O destino humano está fadado a continuar sendo um jogo, porque, em momento impossível de se prever e de forma também imprevisível, a natureza revidará.”

- Mirage of health, René Dubos, 1959.

Resumo

MESSIAS, T. S. **Investigação sorológica, molecular e filogenética do Zika virus**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

O Zika virus (ZIKV) é um flavivírus transmitido por mosquito que causa Febre Zika e está associado às Malformações Congênitas e Síndrome de Guillain-Barré integrando a lista de agentes etiológicos que são um problema de saúde pública internacional. Apresentamos uma investigação sorológica e molecular do ZIKV em amostras humanas na região de Bauru do estado de São Paulo, Brasil a fim de contribuir na determinação dos primeiros casos de infecção de ZIKV nos locais do estudo. Foi realizada a investigação sorológica por técnica de imunocromatografia em 2000 amostras *Dengue virus* negativas referentes aos anos de 2014-2016, sendo 159 (7,9%) positivas para ZIKV, evidenciando que a circularização do ZIKV na região de estudo teve início em 2014. Foi investigado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa por transcrição reversa a presença de ácido ribonucleico (RNA) do ZIKV nas 159 amostras positivas a nível sorológico. Porém o RNA viral não foi detectável. Esse resultado negativo quanto a molecular a partir de soro reforça a possibilidade de aderência do ZIKV em eritrócitos. Esses achados levantam o questionamento se outros membros do gênero *Flavivirus* possuem o mesmo potencial. Para complementar os dados realizamos uma análise filogenética da espécie ZIKV. Com o propósito de geração de hipóteses referentes a sua dinâmica de distribuição no Brasil. Para tal utilizamos os bancos de dados, algoritmos e parâmetros presentes nos softwares *Virus Pathogen Resource* e MEGA7. Nossas evidências inferem que atualmente o ZIKV apresenta uma adaptação na Região Nordeste do Brasil. Considerando todas as possibilidades levantadas nessas análises, concluímos que o ZIKV possui um alto potencial de adaptação/evolução, o que por sua vez poderia gerar características patogênicas desafiadores à saúde pública.

Palavras-chave: Zika Virus, Diagnóstico Molecular, Filogenia, Sorologia.

Abstract

MESSIAS, T. S. **Serological, molecular and phylogenetic investigation of *Zika virus***. 2019. Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, Univesidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne flavivirus that causes Zika Fever and is associated with Congenital Malformations and Guillain-Barré Syndrome, which has been declared an international public health problem by the World Health Organization. We conduct a serological and molecular investigation of ZIKV in human samples in the Bauru region of the state of São Paulo, Brazil, in order to contribute to the determination of the first cases of ZIKV infection in the study sites. Serological investigation was made by immunochromatography technique performed in 2000 Dengue virus negative samples referring to the years 2014-2016, 159 (7.9%) was positive for ZIKV, evidencing that the circularization of ZIKV in the region of study began in 2014. The presence of ZIKV ribonucleic acid (RNA) in the 159 serologically positive samples was investigated by the Quantitative Reverse Polymerase Chain Reaction technique. All did not show detectable RNA. This molecular negative result from serum enhances the possibility of ZIKV adhesion in erythrocytes. These findings raise the question of whether other flaviviruses have the same potential. We also performed a phylogenetic analysis of the ZIKV species. With the purpose of generating hypotheses referring to its distribution dynamics. For this we use the databases, algorithms and parameters present in the software Virus Pathogen Resource and MEGA7. Our evidence allows us to infer that the ZIKV presents a possible adaptation in the Northeast Region of Brazil. Considering all the possibilities raised in these analyzes, we can conclude that ZIKV has a high adaptive/evolution potential, which could generate pathogenic characteristics that can be a challenging to public health.

Key word: Zika Virus, Molecular Diagnoses, Phylogeny, Serology.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Lesões escurecidas características da Doença do Mosaico do Tabaco.....	4
Figura 2 – Micrografia eletrônica do <i>Tobacco mosaic virus</i>	5
Figura 3 – Classificação Viral de Baltimore.....	11
Figura 4 – Árvore filogenética dos flavivírus com base na sequência de aminoácidos da poliproteína.....	14
Figura 5 – Ciclo de transmissão do <i>Tick-borne encephalitis virus</i> (TEBV).....	16
Figura 6 – Ciclo de transmissão do <i>Dengue virus</i>	17
Figura 7 – Micrografia eletrônica do <i>St. Louis encephalitis virus</i>	18
Figura 8 – Árvore filogenética dos Flavivírus próximos do <i>Zika virus</i> e suas linhagens.....	21
Figura 9 – Crio-microscopia eletrônica do <i>Zika virus</i>	22
Figura 10 – Óbitos por cólera na área central de Londres, setembro de 1854.....	28
Figura 1 (Artigo I) – Distribuição de <i>Zika virus</i> soropositivos de 2014-2016 na região de Bauru, São Paulo, Brasil.....	52
Figura 2 (Artigo I) – Distribuição de <i>Zika virus</i> soropositivos de 2014-2016 (Metodologia de Kernel) na região de Bauru, São Paulo, Brasil, com <i>hotspots</i> em Bauru, Lins e Jaú.....	53

Figura 3 (Artigo I) – Árvore filogenética das cepas nacionais (Brasil) da espécie <i>Zika virus</i> (ZIKV) utilizando sequências genômicas.....	55
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

aa	Aminoácidos
a.C	Antes de Cristo
<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>A. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
<i>A. africanus</i>	<i>Aedes africanus</i>
<i>A. furcifer</i>	<i>Aedes furcifer</i>
<i>A. luteocephalus</i>	<i>Aedes luteocephalus</i>
<i>A. taylori</i>	<i>Aedes taylori</i>
<i>A. vittatus</i>	<i>Aedes vittatus</i>
AHFV	<i>Alkhurma hemorrhagic fever virus</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
APOIV	<i>Apoi virus</i>
AROAV	<i>Aroa virus</i>
BAGV	<i>Bagaza virus</i>
BANV	<i>Banji virus</i>
BOUV	<i>Bouboui virus</i>
BSQV	<i>Bussuquara virus</i>
BVDV1	<i>Pestivirus A</i>
C	Proteína estrutural C
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CPCV	<i>Cacipacore virus</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
DENV-1	Dengue vírus sorotipo 1
DENV-2	Dengue vírus sorotipo 2
DENV-3	Dengue vírus sorotipo 3
DENV-4	Dengue vírus sorotipo 4
DMT	Doença do Mosaico do Tabaco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAfd	Ácido desoxirribonucleico de fita dupla ou cadeia dupla
DNAfs	Ácido desoxirribonucleico de fita simples ou cadeia simples

DNZ	Danos neurológicos induzidos pelo <i>Zika virus</i> .
DTV	<i>Deer tick virus</i>
E	Glicoproteína do envelope
EBOV	<i>Zaire ebolavirus</i>
EHV	<i>Edge Hill virus</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ENTV	<i>Entebbe bat virus</i>
F	Sexo feminino
FVTC	Flavivírus transmitido por carrapato
FVTD	Flavivírus transmitidos por vetores desconhecidos
FVTM	Flavivírus transmitido por mosquito
FZ	Febre Zika
GGEV	<i>Greek goat encephalomyelitis virus</i>
GGYV	<i>Gadgets Gully virus</i>
HeLa	Células de Henrietta Lacks
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IGUV	<i>Iguape virus</i>
<i>I. persulcatus</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>
ILHV	<i>Ilheus virus</i>
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
JUTV	<i>Jutiapa virus</i>
JUGV	<i>Jugra virus</i>
KADV	<i>Kadam virus</i>
KEDV	<i>Kedougu virus</i>
KFDV	<i>Kyasanur Forest disease virus</i>
KOKV	<i>Kokobera virus</i>
KOUV	<i>Koutango virus</i>
KSIV	<i>Karshi virus</i>
KUNV	<i>Kunjin virus</i>
LGTV	<i>Langat virus</i>
LIV	<i>Louping ill virus</i>

M	Sexo masculino
MEAV	<i>Meaban virus</i>
MMLV	<i>Montana myotis leukoencephalitis virus</i>
MODV	<i>Modoc virus</i>
MUSCLE	<i>Multiple sequence comparison by log-expectation</i>
MVEV	<i>Murray Valley encephalitis virus</i>
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2A	Proteína não estrutural 2A
NS2B	Proteína não estrutural 2B
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4A	Proteína não estrutural 4A
NS4B	Proteína não estrutural 4B
NS5	Proteína não estrutural 5
NTAV	Ntaya virus
OHFV	<i>Omsk hemorrhagic fever virus</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial de Hidrogênio
POTV	<i>Potiskum virus</i>
POWV	<i>Powssan virus</i>
PPBV	<i>Phnom Penh bat virus</i>
prM	Glicoproteína precursora de membrana
RBV	<i>Rio Bravo virus</i>
RE	Reticulo endoplasmático
RFV	<i>Royal Farm virus</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAfd	Ácido ribonucleico de fita dupla ou cadeia dupla
RNAfs+	Ácido ribonucleico de fita simples com polaridade positiva
RNAfs-	Ácido ribonucleico de fita simples com polaridade negativa
RNAi	Ácido ribonucleico interferente
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
ROCV	<i>Rocio virus</i>
RpRd	RNA polimerase RNA dependente
RPV	<i>Rinderpest morbillivirus</i>
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase por transcrição reversa
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa por transcrição reversa

SABV	<i>Saboya virus</i>
SEPV	<i>Sepik virus</i>
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SLEV	<i>St. Louis encephalitis virus</i>
SPOV	<i>Spondweni virus</i>
SREV	<i>Saumarez Reef virus</i>
SSEV	<i>Spanish sheep encephalomyelitis virus</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i>
TBEV-E	Tick-borne encephalitis virus – Subtipo Europeu
TBEV-FE	Tick-borne encephalitis virus – Subtipo do Extremo Oriente
TBEV-S	Tick-borne encephalitis virus – Subtipo Siberiano
TMUV	<i>Tembuso virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TSEV	<i>Turkish sheep encephalitis virus</i>
TYUV	<i>Tyuleniy virus</i>
UGSV	<i>Uganda S virus</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNINOVE	Universidade Nove de Julho
USA	Estados Unidos da América
USP	Universidade de São Paulo
USUV	<i>Usutu virus</i>
ViPR	<i>Virus Pathogen Resource</i>
WESSV	<i>Wesselsbron virus</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YAOV	<i>Yaounde virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
YOKV	<i>Yokose virus</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

Lista de símbolos

λ Letra grega Lambda

Φ Letra grega Phi

$\cong$ Aproximadamente

$^{\circ}\text{C}$ Graus Celsius

n° Número

$<$ Menor

$>$ Maior

$=$ Igual

$\%$ Percentual

Sumário

CAPÍTULO I.....	2
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1.1. Vírus.....	3
1.2. A Família <i>Flaviviridae</i> e o gênero <i>Flavivirus</i>	12
1.3. <i>Zika virus</i>	19
1.4. Métodos de Estudo.....	26
2. OBJETIVOS	30
3. REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO II.....	45
4. ARTIGO I.....	46
5. CONCLUSÃO.....	63

“Todos sabem que as pestes tendem a se repetir no mundo; mas de certa forma é difícil acreditar naquelas que nos caem sobre a cabeça vindas não se sabe de onde.”

- A peste, Albert Camus, 1948.

Capítulo I

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Vírus

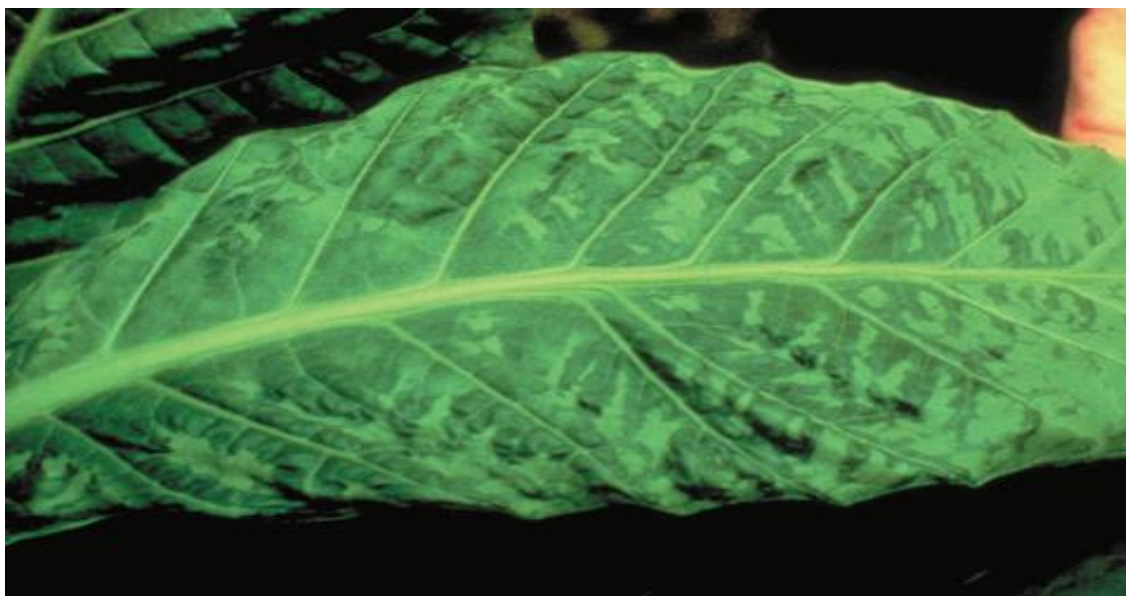
Vírus são parasitas acelulares compostos de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA), possuem um arranjo proteico que favorece economia energética de acordo com formas geométricas chamados de capsídeo. Também podem apresentar envelope glicofosfolipídico derivado de membranas da célula hospedeira (Dimmock et al., 2007; Norval, 2012; Ferreira et al., 2013). Teoricamente todos os seres vivos podem ser infectados por vírus, desde células procarióticas a eucarióticas, geralmente seguindo o padrão de infecção de espécie específica. Infecções virais ocorrem naturalmente, porém o desenvolvimento de sinais clínicos, ou seja, a doença varia de acordo com as características do hospedeiro e do vírion. Com baixa frequência ocorre infecção entre espécies (“salto” entre espécies), o que pode causar a emergência de novas doenças (Dimmock et al., 2007; Santos, 2013; Enquist e Racaniello, 2013).

Breve histórico da virologia

Por mais que haja evidências visuais de doenças causadas por vírus em artefatos datados de 4000 a.C e o fundamental desenvolvimento da vacina contra a Varíola Humana utilizando lesões da Varíola Bovina por Edward Jenner (1796), a existência desses seres começou a ser descoberta pelos experimentos de Adolf Mayer em 1882. Mayer investigou uma doença com lesões escurecidas na folha da planta do Tabaco (Doença do Mosaico do Tabaco – DMT) (Figura 1). Mayer não conseguiu isolar o patógeno utilizando um filtro de retenção de bactérias, ou seja, indo contra os postulados de Koch e então sugeriu que o agente poderia ser algum ser similar a uma enzima contagiosa. Com um experimento similar, Dmitri Iwanowski em 1892 evidenciou que o agente etiológico da DMT não era cultivável, não podia ser visualizado e era filtrável em técnicas de retenção bacteriana, porém Iwanowski negligenciou sua descoberta considerando ter errado no isolamento do agente que segundo ele possivelmente era bacteriano. Beijerinck repetiu esses experimentos em 1898 e concluiu a existência de um novo tipo de agente infeccioso nomeando-o como *contagium vivum fluidum* (fluido vivo contagioso) que

viria a ser conhecido como *virus* do latim veneno (Dimmock et al., 2007; Enquist e Racaniello, 2013).

Figura 1 – Lesões escurecidas características da Doença do Mosaico do Tabaco.

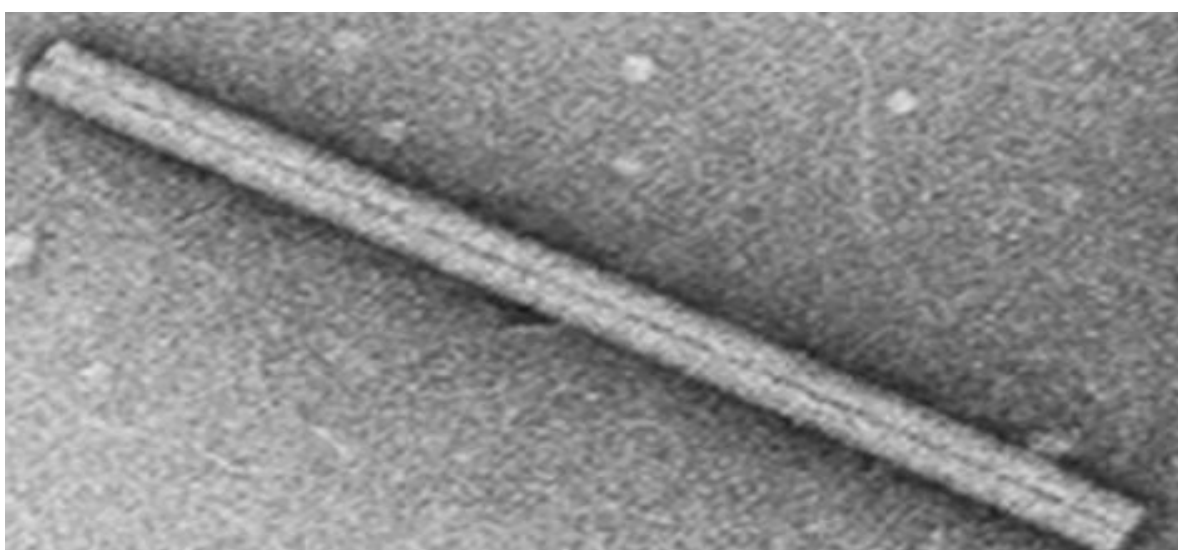


Fonte: Enquist e Racaniello, 2013.

Twort em 1915 tentou cultivar em placas de ágar o agente etiológico da Varíola Humana. Incapaz de cultivar o agente, foi observado que algo lisava as bactérias contaminantes da placa e desta forma, foi sugerido duas teorias para esse processo. I – A existência de vírus que infectavam bactérias; II – As bactérias mortas na placa secretavam alguma enzima que impedia o crescimento das demais (Dimmock et al., 2007). Também em 1915 Felix d’Herelle bacteriologista do Instituto Pasteur realizou uma investigação com plaqueamento de um surto de disenteria que afetou uma cavalaria francesa. Ao longo de sua investigação reparou que na placa forrada com colônias do bacilo *Shigella* sp. apareciam pontos circulares limpos (pontos de lise bacteriana) que chamou de *plaque*. D’Herelle fez a associação acompanhando o tempo de início de recuperação de um paciente e o surgimento dos *plaques* nas placas de cultivo bacteriano. Felix descobriu o agente viral chamando-o de bacteriófago. Esse experimento contribuiu de forma significativa para provar que os vírus eram partículas sólidas e não líquidas como a comunidade de virologistas vinham discutindo desde os experimentos realizados por Beijerinck (Enquist e Racaniello, 2013; Ferreira et al., 2013).

O fato de os vírus serem partículas sólidas foi provado também pela realização da primeira micrografia eletrônica do *Tobacco mosaic virus* (TMV) realizada por Von Borries et al. (1938) (Figura 2). Nesse mesmo período, Max Delbrück e Emory Ellis iniciaram estudos genéticos pioneiros utilizando bacteriófagos do grupo T, elucidando questões básicas de replicação dos vírus e genética celular procariótica. Essa pesquisa culminou em diversos estudos utilizando bacteriófagos (Enquist e Racaniello, 2013).

Figura 2 – Micrografia eletrônica do *Tobacco mosaic virus*.



Fonte: Enquist e Racaniello, 2013.

A partir desse ponto o campo da virologia se tornou vasto e com inúmeras possibilidades (Quadro 1), da identificação etiológica viral de doenças a elucidação de questões moleculares na evolução e manutenção de todo o nosso ecossistema (Enquist e Racaniello, 2013).

Quadro 1. Descobertas Históricas da Virologia baseado em Enquist e Racaniello, 2013	
4000 a.C	Descrição de Raiva e Poliomielite em artefatos.
1796 (Jenner)	Desenvolvimento da vacina contra a Varíola Humana.
1882 (Mayer)	Evidência de transmissibilidade da Doença do Mosaico do Tabaco.
1898 (Beijerinck)	Conceituação dos vírus como elementos contagiosos.
1898 (Loeffler e Frosch)	Descoberta do primeiro vírus animal.
1901 (Reed et al.)	Descoberta do primeiro vírus que infecta o <i>Homo sapiens</i> (<i>Yellow fever virus</i> - YFV)

1907 (Ashburn e Craig)	Descoberta do <i>Dengue virus</i> - DENV.
1913 (Steinbault et al.)	Primeiro cultivo viral em tecido.
1917 (d'Herelle)	Descoberta dos bacteriófagos e da natureza sólida dos vírus.
1931 (Woodruff e Goodpasture)	Primeira propagação de vírus em ovos de galinha embrionados.
1932 (Little e Bittner)	Primeiro vírus relacionado a tumores em mamíferos.
1934 (Schlesinger)	Evidência de bacteriófagos possuírem proteína e ácidos nucleicos.
1935 (Stanley)	Cristalização do <i>Tobacco mosaic virus</i> - TMV.
1936 (Bawden e Pirie)	Descoberta de o TMV ser composto por nucleoproteína e RNA.
1938 (Theiler)	Descoberta da vacina contra a Febre Amarela.
1938 (Von Borries et al.)	Primeira micrografia eletrônica viral do TMV.
1940 (Smithburn et al)	Descoberta do <i>West Nile virus</i> – WNV.
1943 (Luria e Delbrück)	Estudo de origens genéticas e mutações em bacteriófagos.
1946 (Delbrück)	Recombinação genética de bacteriófagos.
1947 (Luria)	Mutação e reparo de DNA de bacteriófagos.
1948 (Enders et al.)	Replicação de <i>Enterovirus</i> (<i>Enterovirus C</i> - Vírus da Poliomielite) em culturas celulares.
1948 (Sanford)	Desenvolvimento de culturas de células animais.
1952 (Hershey e Chase)	Genoma viral é constituído de ácido nucleico.
1952 (Zinder, Lederberg)	Descobrimto do processo de transdução.
1955 (Gey)	Desenvolvimento de cultura de células humanas (HeLa).
1956 (Volkin et al.)	Descobrimto do RNAm em bacteriófagos.
1956 (Watson e Crick)	Vírions são compostos por subunidades estruturais idênticas.
1956 (Schramm et al.)	RNA carrega informação genética.
1962 (Klug e Caspar)	Estudo de estruturas virais.
1964 (Brenner)	Estudo de colinearidade do gene com cadeia polipeptídica utilizando bacteriófagos.
1964 (Epstein et al.)	Descobrimto do primeiro oncovírus humano (<i>Human gammaherpesvirus 4</i> – Vírus Epstein-Barr).
1967 (McAuslan e Kates)	Polimerase associada aos vírions.
1970 (Temin e Baltimore)	Descobrimto da Transcriptase Reversa retroviral.
1971 (Darnell e Edmonds)	Poliadenilação de RNA.

1972 (Berg)	Primeira recombinação experimental de moléculas de DNA utilizando bacteriófagos.
1974 (Blattner et al.)	Uso de vetores bacteriófagos λ como tecnologia para recombinação de DNA.
1975 (Shatkin e Moss)	Descobrimiento do capeamento do RNAm.
1976 (Fiers)	Primeiro genoma viral de RNA sequenciado (bacteriófago MS2).
1977 (Sanger et al.)	Primeiros genomas virais de DNA sequenciados (bacteriófago Φ X174 e <i>Simian virus 40</i> – SV40).
1977 (Roberts e Sharp)	Descobrimiento de <i>splicing</i> de RNA utilizando Adenovírus.
1977 (Levine e Crawford)	Descobrimiento do supressor tumoral p53 utilizando o SV40.
1979 (Organização Mundial da Saúde)	Varíola Humana erradicada.
1979 (Kelly et al.)	Primeira replicação de DNA viral <i>in vitro</i> (Adenovírus, SV40).
1979 (Roeder)	Primeiro sistema <i>in vitro</i> de transcrição de RNAm (Adenovírus).
1979 (Hunter et al.)	Descobrimiento das Tirosinas Quinases.
1981 (Chambon e Khoury)	Descobrimiento de potenciadores transcricionais.
1981 (Yamamoto e Tjian)	Identificação de fatores transcricionais em mamíferos utilizando o SV40.
1981 (Shenk)	Identificação de sinais de poliadenilação.
1981 (Wiley et al.)	Estrutura do primeiro envelope viral.
1982 (Elion e Hitchings)	Desenvolvimento de antivirais.
1983 (Montagnier et al.)	Identificação do <i>Human immunodeficiency virus</i> (HIV) como agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS).
1984 (Smith e Butel)	Descobrimiento de sinalizações de localização nuclear.
1984 (Barrell et al.)	Primeiro grande genoma viral a ser sequenciado (Vírus Epstein-Barr).

1986 (Bruening e Symons)	Descobrimiento de “ribozimas em cabeça de martelo”.
1988 (Haseloff e Gerlach)	Primeira ribozima específica desenvolvida.
1988 (Wimmer e Sonenberg)	Descobrimiento de estruturas internas do ribossomo utilizando Enterovírus.
1990 (Anderson e Blaese)	Primeira terapia de gene humano com a utilização de vetor retroviral.
1991 (Miller)	Descobrimiento de proteínas virais antiapoptóticas.
1998 (Fire e Mello)	Silenciamento de genes utilizando RNA de cadeia dupla (RNAfd).
1998 (Young)	Víron vegetal utilizado para a síntese de nanopartículas.
1998 (Vance e Baulcombe)	Vírus vegetais possuem supressores de RNA interferente (RNAi).
2008-2015 (Organização Mundial da Saúde)	Planejamento de erradicação global da poliomielite.
2010 (Skalka et al.)	Genomas de vertebrados carregam genomas de vírus antigos.
2011 (Organização Mundial da Saúde Animal)	Erradicação da Peste Bovina causada pelo <i>Rinderpest morbillivirus</i> (RPV).
2014-2016 (Organização Mundial da Saúde)	Epidemia de Febre Hemorrágica do Ebola de importância em saúde pública internacional causada pelo <i>Zaire ebolavirus</i> (EBOV) no Oeste Africano.
2016 (Organização Mundial da Saúde)	Declaração de emergência em saúde pública internacional em relação a associação da infecção por <i>Zika virus</i> (ZIKV) com a microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré (SGB).

Legenda: a.C – Antes de Cristo; RNA – Ácido ribonucleico; DNA – Ácido desoxirribonucleico; HeLa – Células de Henrietta Lacks; RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro; λ – Letra grega Lambda; Φ – Letra grega Phi.

Classificação viral

Os vírus aparentam ser simples, porém sua capacidade de infectar todos os organismos da natureza refletem uma complexidade desafiadora para os estudiosos da área. Levando em consideração sua forma de replicação (parasita intracelular obrigatório), muitos taxonomistas

não consideram necessário que os vírus sejam integrados junto aos domínios Bacteria, Archaea e Eukarya dos seres vivos, utilizando o argumento de que são entidades não vivas e que os vírus são mais similares aos seus hospedeiros do que entre eles. Em contrapartida, na visão de virologistas, os vírus mesmo com suas características peculiares são tão vivos quanto qualquer outro organismo e por motivos práticos é essencial uma classificação taxonômica a parte dos domínios da vida, em vista da complexidade e diversidade dos vírus e seus hospedeiros (Condit, 2013).

Para executar essa tarefa complexa de organização e classificação viral, foi criada uma taxonomia hierárquica, não sistemática e politética que é conduzida e supervisionada pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) com os táxons e sufixos: Domínio – viria; Subdomínio – vira; Reino – virae; Subreino – virites; Filo – virocota; Subfilo – viricotina; Classe – viricetes; Ordem – virales; Subordem – virienae; Família – viridae; Subfamília – virinae; Gênero e Subgênero – virus e Espécie. A taxonomia politética do ICTV considera as seguintes características para o agrupamento dos vírus em seus respectivos táxons: morfologia; propriedades físico-químicas; constituição proteica; constituição de lipídios e carboidratos; estratégia de replicação e organização gênica; propriedades antigênicas; propriedades biológicas (hospedeiro natural, filogenética, epidemiologia e patologia) (Ferreira et al., 2013; Condit, 2013; ICTV, 2018).

Existem duas formas de escrever os táxons dentro da virologia, a formal utilizando o itálico com a primeira letra maiúscula, como por exemplo: Espécie - *Zika virus*; gênero – *Flavivirus*; família – *Flaviviridae*. E a informal: O Zika vírus é um flavivírus (Ferreira et al., 2013; ICTV, 2018). Quando o vírus já é oficialmente catalogado na lista mestra do ICTV não é permitido a tradução de táxons ou a alteração de sua abreviação (ICTV, 2018).

Biossíntese viral

Diferente dos demais organismos que se reproduzem de forma sexuada e assexuada, para ocorrer a progênie viral é necessário que uma célula suscetível e permissiva seja infectada. Quando isso é possível é permitido que além de que o genoma viral seja replicado ocorra a montagem da partícula de forma completa. Para isso o sistema de defesa intracelular e as formas de comunicação celular que desencadeiam o sistema imunológico inato e adaptativo devem ser

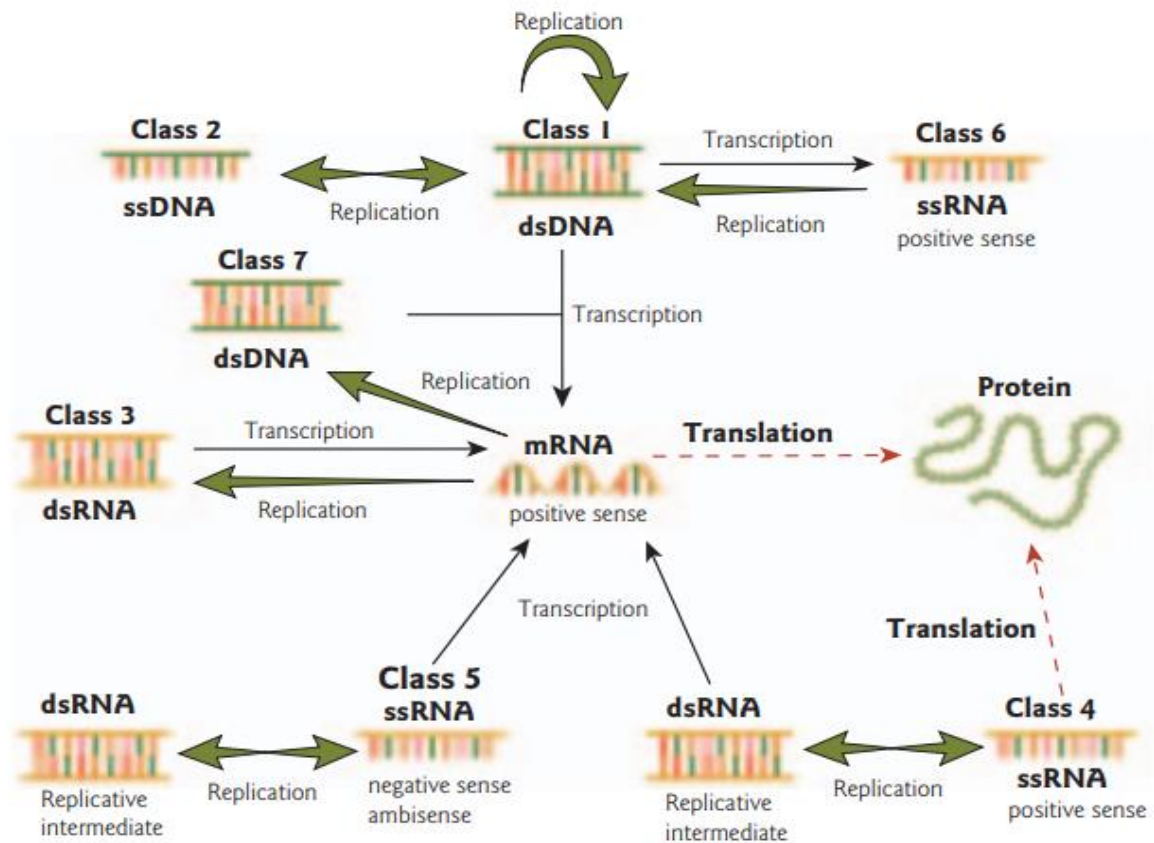
inativadas (Dimmock et al., 2007; Ferreira et al., 2013). A biossíntese viral ocorre nas seguintes etapas:

I – Adsorção: Etapa em que as proteínas de superfície viral (espículas virais) interagem de forma reversível ou irreversível com as proteínas no glicocálice celular (receptores celulares) geralmente de forma específica o que determina se a célula é suscetível ou não a infecção, definindo inicialmente o tropismo viral (Ferreira et al., 2013).

II – Internalização: Mudanças proteicas conformacionais promovem a internalização do genoma viral de formas variáveis: Pode ocorrer exposição de aminoácidos (aa) hidrofóbicos em vírus envelopados facilitando a fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular liberando o genoma viral diretamente no citoplasma; Algumas espécies são endocitadas durante a fase de adsorção, no endolisossomo a fusão do envelope com a membrana da vesícula endocítica ocorre geralmente de forma dependente de pH (Potencial de Hidrogênio) ácido liberando o genoma no citoplasma (Ferreira et al., 2013).

III – Replicação: Existe uma classificação criada por Baltimore que divide os vírus em sete classes de acordo com sua constituição genética e estratégia básica de replicação: 1 – Vírus constituído de DNAfd (Ácido desoxirribonucleico de fita dupla); 2 – DNAfs (Ácido desoxirribonucleico de fita simples); 3 – RNAfd (Ácido ribonucleico de fita dupla); 4 – RNAfs+ (Ácido ribonucleico de fita simples com polaridade positiva) de contexto importante nesse trabalho, essa classe de vírus possui seu genoma com alta similaridade ao RNAm (Ácido ribonucleico mensageiro) celular o que facilita sua replicação. É necessário antes que a tradução do genoma viral ocorra que a RpRd (RNA polimerase RNA dependente) viral sintetize uma fita complementar ao genoma para a manutenção da replicação genômica e de proteínas estruturais e não estruturais; 5 – RNAfs- (Ácido ribonucleico de fita simples com polaridade negativa); 6 – RNAfs com intermediário de DNA e 7 – DNAfd com intermediário de RNA. Independente da estratégia de replicação o produto final deve ser um RNAm que traduza as informações contidas no genoma viral para a síntese de proteínas estruturais e não estruturais (Figura 3) (Dimmock et al., 2007; Ferreira et al., 2013).

Figura 3 – Classificação Viral de Baltimore.



Independente da classe viral (*Class*) o produto final deve ser o RNAm (*mRNA*) que é traduzido em proteínas (*Protein*) estruturais e não estruturais para que o vírus prossiga com suas demais etapas de biossíntese.

Fonte: Dimmock et al., 2007.

IV – Automontagem e maturação: Os vírions começam a ser montados e maturados em locais específicos de cada espécie quando a síntese de proteínas estruturais e não estruturais atingem o nível adequado (Ferreira et al., 2013).

V – Brotamento: Processo de saída dos vírions. Nos vírus que possuem envelope eles o adquirem na membrana citoplasmática ou em demais estruturas com bicamada fosfolipídica. A forma de saída dos vírus envelopados pode ocorrer via brotamento da região extracelular da membrana citoplasmática ou via exocitose não sendo necessário a lise celular na maioria dos casos. Para vírus que não são constituídos de envelope a lise celular geralmente é necessária (Ferreira et al., 2013).

1.2. A família *Flaviviridae* e o gênero *Flavivirus*

Pesquisas filogenéticas indicam que a possível origem desses vírus se deu há 100.000 anos (Pettersson e Fiz-Palacios, 2014). Sua origem pode ser corroborada com o histórico apresentado por Ferreira et al. (2013) de que a doença Febre Amarela possivelmente pode estar associada ao surgimento da lenda do *Holandês Voador* que segundo as histórias é um navio fantasma que navega contra o vento, essa possibilidade faz sentido levando em consideração que o indivíduo com Febre Amarela por conta da febre alta pode apresentar delírios o que na época dizimava tripulações. Uma das hipóteses prováveis sugere que a Febre Amarela e a Febre Dengue chegaram nas américas no século XVII com o comércio escravista, tais doenças foram importantes na história para determinar o estabelecimento de colônias na África e na América. Documentos históricos dão grande destaque a Febre Amarela como responsável por milhares de mortes de soldados colonizadores o que de forma direta influenciava os domínios de território (McNell, 2016).

Walter Reed em 1901 demonstrou que a Febre Amarela poderia ser transmitida utilizando soros filtrados de pacientes doentes, seus achados também apontavam que os mosquitos carregavam o vírus. O *Yellow fever virus* – YFV (Vírus da febre amarela) seria então o primeiro vírus humano descoberto (Lindenbach et al., 2013). O YFV é o primeiro representante da família *Flaviviridae* com quatro gêneros descritos: *Flavivirus* do latim *flavus* - amarelo, *Hepacivirus* do grego hepar ou hepatos – fígado, *Pegivirus* do inglês *persistent GB virus* – vírus GB persistente e *Pestivirus* do latim *pestis* – peste. Quanto ao número de espécies, a família totaliza 89 espécies oficiais e 12 espécies ainda não classificadas (Lindenbach et al., 2013; ICTV, 2018; ViPR, 2018).

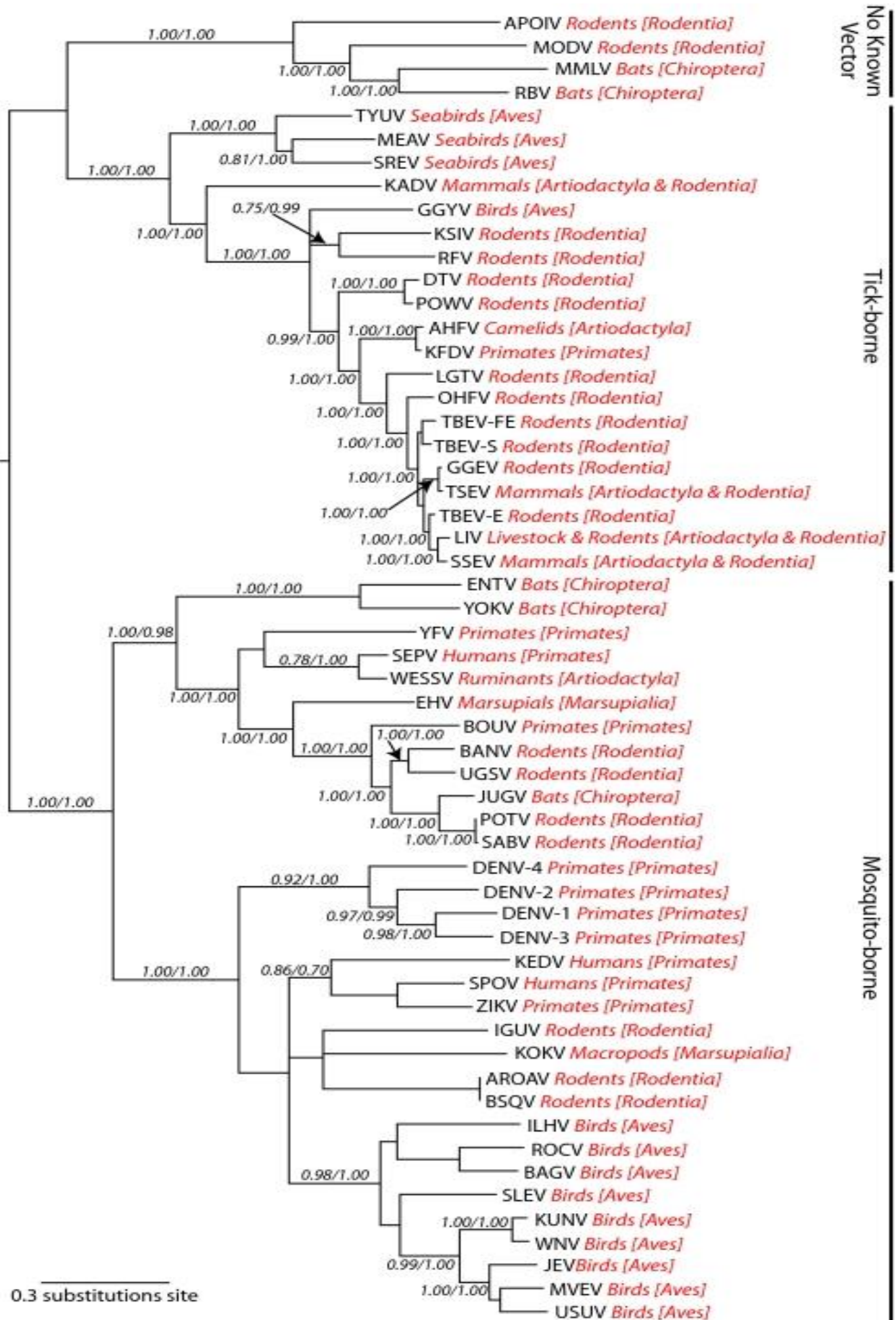
O gênero *Flavivirus* possui 53 espécies (ICTV, 2018), a maioria são transmitidos por artrópodes o que os definem como arbovírus (*arthropod-borne virus*), causando de forma variável desde sintomas febris e articulares a encefalites e febres hemorrágicas. Dentro desse gênero se encontram agentes etiológicos de grande importância a saúde pública humana (Lindenbach et al., 2013; CDC, 2014; CDC, 2018a, 2018b; WHO, 2018a) como por exemplo: *Yellow fever virus* – agente etiológico da Febre Amarela que em 15% dos casos pode evoluir para a forma grave da doença com mortalidade de 50%; *Dengue virus* (DENV) – causa Febre Dengue que pode variar de sintomas brandos a Síndrome de Choque da Dengue (choque

hipovolêmico) e/ou Dengue Hemorrágica (Romanos, 2013); *West Nile virus* (WNV) – patógeno causador da Febre do Oeste do Nilo onde aproximadamente 80% dos casos são assintomáticos, dos 20% os sintomas são semelhantes as demais arboviroses podendo apresentar sintomas neurológicos como meningite, encefalite e variadas manifestações oculares. Nos casos neuroinvasivos pode ocorrer sequelas nos sistemas motores e cognitivos (Pierson e Diamond, 2013). E o *Zika virus* (ZIKV) foco do presente trabalho.

Características

Inferências apontam o surgimento dos flavivírus há aproximadamente 10.000 anos no Velho Mundo desde a última era do gelo (Gould et al., 2003). Estes estão distribuídos de forma global, sendo responsáveis por variadas endemias e epidemias de difícil controle, em vista que suas características de emergência, reemergência e manutenção no ambiente são dinâmicas (Mackenzie et al., 2004). Esses vírus são divididos em três grupos filogenéticos: FVTC - flavivírus transmitido por carrapato, FVTM – flavivírus transmitido por mosquito e os FVTD – flavivírus transmitidos por vetores desconhecidos (Figura 4) (Kitchen et al., 2011). Por causa dessa característica de transmissão vetorial por insetos, os flavivírus se diferenciam dos demais gêneros que integram a família *Flaviviridae*. Considerando essa característica diferencial, é sugerido que os flavivírus tenham evoluído de um ancestral que não era transmitido de forma vetorial, teoria essa suportada por análises filogenéticas da proteína viral não estrutural 5 (Gould et al., 2001).

Figura 4 – Árvore filogenética dos flavivírus com base na sequência de aminoácidos da poliproteína.



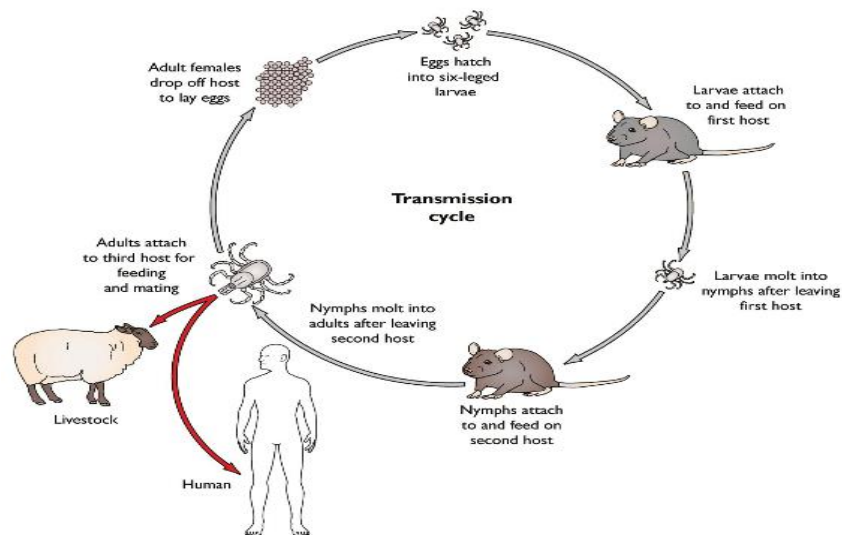
Árvore filogenética (Máxima verossimilhança) dos flavivírus com base nas sequências de aminoácidos das poliproteínas. Grupos: flavivírus transmitidos por vetores desconhecidos (*No Known Vector*), flavivírus transmitido por carrapato (*tick-borne*) e flavivírus transmitido por mosquito (*mosquito-borne*). Flavivírus: APOIV – *Apoi virus*, MODV – *Modoc virus*, MMLV – *Montana myotis leukoencephalitis virus*, RBV – *Rio Bravo virus*, TYUV – *Tyuleny virus*, MEAV – *Meaban virus*, SREV – *Saumarez Reef virus*, KADV – *Kadam virus*, GGYV – *Gadgets Gully virus*, KSIV – *Karshi virus*, RFV – *Royal Farm virus*, DTV – *Deer tick virus*, POWV – *Powssan virus*, AHFV – *Alkhurma hemorrhagic fever virus*, KFDV – *Kyasanur Forest disease virus*, LGTV – *Langat virus*, OHFV – *Omsk hemorrhagic fever virus*, TBEV-FE – *Tick-borne encephalitis virus – Subtipo do Extremo Oriente*, TBEV-S – *Tick-borne encephalitis virus – Subtipo Siberiano*, GGEV – *Greek goat encephalomyelitis virus*, TSEV – *Turkish sheep encephalitis virus*, TBEV-E – *Tick-borne encephalitis virus – Subtipo Europeu*, LIV – *Louping ill virus*, SSEV – *Spanish sheep encephalomyelitis virus*, ENTV – *Entebbe bat virus*, YOKV – *Yokose virus*, YFV – *Yellow fever virus*, SEPV – *Sepik virus*, WESSV – *Wesselsbron virus*, EHV – *Edge Hill virus*, BOUV – *Bouboui virus*, BANV – *Banji virus*, UGSV – *Uganda S virus*, JUGV – *Jugra virus*, POTV – *Potiskum virus*, SABV – *Saboya virus*, DENV-4 – *Dengue virus sorotipo 4*, DENV-2 – *Dengue virus sorotipo 2*, DENV-1 – *Dengue virus sorotipo 1*, DENV-3 – *Dengue virus sorotipo 3*, KEDV – *Kedougu virus*, SPOV – *Spondweni virus*, ZIKV – *Zika virus*, IGUV – *Iguape virus*, KOKV – *Kokobera virus*, AROAV – *Aroa virus*, BSQV – *Bussuquara virus*, ILHV – *Ilheus virus*, ROCV – *Rocio virus*, BAGV – *Bagaza virus*, SLEV – *St. Louis encephalitis virus*, KUNV – *Kunjin virus*, WNV – *West Nile virus*, JEV – *Japanese encephalitis virus*, MVEV – *Murray Valley encephalitis virus*, USUV – *Usutu virus*. Hospedeiros associados até 2011: *rodents* (roedores), *bats* (morcegos), *seabirds* (aves marinhas), *mammals* (mamíferos), *birds* (aves), *camelids* (camelídeos), *primates* (primatas), *livestock* (animais de fazenda), *ruminants* (ruminantes), *marsupials* (marsupiais), *humans* (humanos), *macropods* (marsupiais herbívoros – ex: canguru)

Fonte: Kitchen et al., 2011.

Para exemplificação de um FVTC temos o *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV) com distribuição na China, Japão, Rússia e países norte europeus. O TBEV causa sintomas diversos em um terço dos infectados variando de síndromes febris a meningoencefalites (30% de mortalidade) (Kaiser, 2008; Mansfield et al., 2009; Pierson e Diamond, 2013). A infecção por TBEV foi descrita primeiramente em 1931 na Áustria em um surto sazonal de meningoencefalite e posteriormente associada a transmissão pelo carrapato *Ixodes persulcatus* (*I. persulcatus*) em 1939 (Schneider, 1931; Zilber, 1939). Atualmente milhares de casos são registrados anualmente (CDC, 2018c). O ciclo da doença é mantido pela transmissão do TBEV majoritariamente pelo carrapato *I. persulcatus* que se alimenta de hospedeiros vertebrados, sendo o *Homo sapiens* (*H. sapiens*) um hospedeiro ocasional (Figura 5). Os casos ocorrem de forma sazonal entre março e novembro (Kaiser, 2008). No hospedeiro vertebrado também ocorre a replicação viral em tecido dérmico na ausência de viremia o que propicia a infecção

de carrapatos e permite a transmissão pelo leite em humanos e demais animais (Pogodina, 1960; Labuda et al., 1996).

Figura 5 – Ciclo de transmissão do *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV).



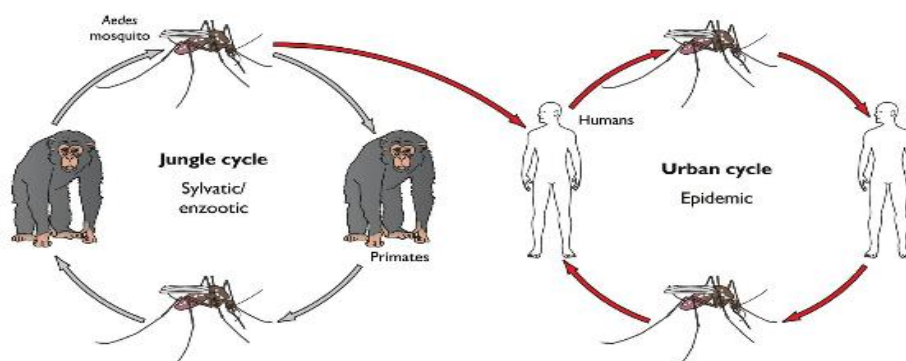
A infecção dos hospedeiros invertebrados e vertebrados pelo TBEV ocorre durante as seguintes etapas: Ovos se chocam em larvas de seis patas (*Eggs hatch into six-legged larvae*); Larvas entram em contato e se alimentam do primeiro hospedeiro (*Larvae attach to and feed on first host*); Larvas se modificam para ninfas (*Larvae molt into nymphs after leaving first host*); Ninfas entram em contato e se alimentam de um segundo hospedeiro (*Nymphs attach to and feed on second host*); Ninfas se modificam para a forma adulta (*Nymphs molt into adults after leaving second host*); Formas adultas entram em contato com o terceiro hospedeiro para alimentação e cópula (*Adults attach to a third host for feeding and mating*); Saída do hospedeiro para colocar ovos (*drop off host to lay eggs*).

Fonte: Pierson e Diamond, 2013.

Um exemplo dos FVTMs é o conhecido *Dengue virus* que hoje possui distribuição ampla no globo afetando de forma endêmica no mínimo 100 países (CDC, 2014). Relatos de sintomatologia *Dengue-like* datam do primeiro milênio na China, porém oficialmente o primeiro relato similar a uma epidemia de Febre Dengue foi publicado por Benjamin Rush, médico que presenciou o surto em 1780 na Filadélfia (Rush, 1789; Pierson e Diamond, 2013). O ciclo natural de vida do DENV é mantido pelo contato mosquito *Aedes* e primatas (Figura 6). Após o mosquito transmitir o DENV pelo repasto sanguíneo o hospedeiro pode apresentar desde, infecção assintomática ($\cong 50\%$ dos casos), Febre Dengue com um espectro de sinais

clínicos característicos de febre e mialgia (podendo variar com sintomas similares a outras doenças causadas por vírus como gripes, resfriados e outras arboviroses), até o desenvolvimento de sintomas graves como a Febre Hemorrágica da Dengue e a Síndrome do Choque Dengue caracterizados por hemorragias e hipovolemia capilar (Balmaseda et al., 2006; Pierson e Diamond, 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorra de 50 a 100 milhões de infecções todos os anos, incluído meio milhão de casos de Febre Hemorrágica da Dengue com aproximadamente 22 mil óbitos (WHO, 2018a).

Figura 6 – Ciclo de transmissão do *Dengue virus*.



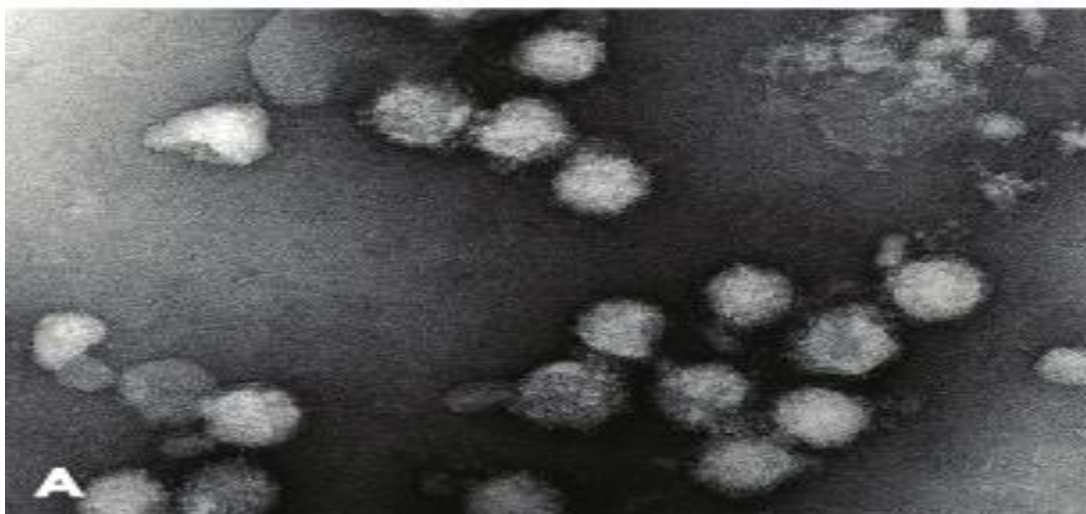
A infecção por *Dengue virus* é mantida por dois ciclos: O silvestre (*Jungle cycle*) onde o hospedeiro invertebrado geralmente é o mosquito *Aedes albopictus* e o hospedeiro vertebrado primatas não humanos; O urbano (*Urban cycle*) em que o mosquito é o *Aedes aegypti* e o hospedeiro vertebrado o ser humano.

Fonte: Pierson e Diamond, 2013.

Quanto aos FVTDs seu primeiro integrante foi o *Rio Bravo virus* (RBV) descoberto em 1954 a partir do isolamento viral em uma glândula salivar do morcego *Tadarida brasiliensis mexicana* na Califórnia (Sulkin et al., 1966). Os FVTDs não são associados como agentes etiológicos de doenças humanas, porém alguns casos isolados foram relatados envolvendo infecções por acidentes laboratoriais por *Apoi virus* (APOIV) com sintomas clássicos de arbovirose como febre, artralgia e mialgia. E de meningite causada por *Modoc virus* (MODV) em uma criança que entrou em contato com um rato doente (Blitvich e Firth, 2017).

Os vírions da família *Flaviviridae* possuem morfologia esférica com aproximadamente 50nm de diâmetro circundados por um envelope lipídico (Figura 7) (Zhang et al., 2003).

Figura 7 – Micrografia eletrônica do *St. Louis encephalitis virus*.



Micrografia eletrônica do *St. Louis encephalitis virus* corado negativamente com molibdato de amônio.

Fonte: Murphy, 1980.

Os genomas dos flavivírus são classificados na classe 4 da escala de Baltimore constituídos de RNAs⁺ de 10-11kb. Seu terminal 5' possui um nucleotídeo metilado cap para estabilização no início da tradução e inativar as defesas antivirais. O terminal 3' pode iniciar formação de estrutura genômica em *loop* (estrutura em laço) (Furuichi e Shatkin, 2000; Clarke et al., 2015). Esse genoma é traduzido em uma poliproteína posteriormente clivada por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (*Non Structural* – NS: 1,2a, 2b, 3, 4a, 4b e 5) (Rice et al., 1985; Clarke et al., 2015).

Os flavivírus geralmente são viscerotrópicos possuindo como sitio inicial de infecção a derme por conta da transmissão efetuada pela alimentação sanguínea do artrópode. As células inicialmente infectadas são os queratinócitos e células dendríticas (Marovich et al., 2001; Lim et al., 2011). A quantidade de vírions transmitida pelo artrópode é desconhecida, porém utilizando o parâmetro de unidades formadoras de *plaques* o valor varia de 10^3 a 10^5 (Schneider et al., 2006). Proteínas presentes na saliva do inseto suprimem o sistema de defesa inato do hospedeiro aumentando a replicação viral no local de infecção e direcionando os vírus ao linfonodo mais próximo (Brown et al., 2007; Schneider e Higgs, 2008). Dos linfonodos os vírus se disseminam via sistema linfático e intravascular, no sistema circulatório podem infectar células sanguíneas e tecidos viscerais, resultando em disseminação e viremia (Lindenbach et al., 2013). O tempo de presença de flavivírus circulantes em soro é curto refletindo a ação rápida

do hospedeiro na remoção desses vírions pelos órgãos viscerais e por conta da rápida aderência de vírions nos eritrócitos (Jahrling et al., 1983; Rios et al., 2007). A capacidade dos flavivírus de serem neuroinvasivos é relacionada a capacidade neurotrópica, duração de viremia, fatores de virulência e condições do sistema de defesa do hospedeiro, sendo todas essas características variáveis de determinantes genéticos virais e do hospedeiro que precisam ser melhores investigados (Beasley et al., 2002; Lindenbach et al., 2013).

1.3. *Zika virus*

O ZIKV foi descrito pela primeira vez em abril de 1947 durante um estudo sobre vetores responsáveis pelo ciclo silvestre de YFV em um macaco Rhesus na floresta Zika em Uganda. Originalmente utilizados como sentinelas para uma pesquisa de YFV da Fundação Rockefeller, um dos macacos, Rhesus (nº 766), apresentou febre de 39,7°C. No terceiro dia de sinais clínicos o sangue foi coletado e inoculado de forma subcutânea em outro macaco Rhesus (nº 771) que não apresentou nenhuma febre, mas quando inoculado de forma intracerebral e intraperitoneal em cobaias ficaram doentes após 10 dias. Os estudos foram conduzidos a partir do soro do primata em cobaias, sendo descartados outros vírus, como o YFV e DENV (Dick, Kitchen e Haddow, 1952). Além disso, o vírus foi isolado no inseto *Aedes africanus* (Dick e Haddow, 1952).

A descoberta do novo vírus, batizado em homenagem à floresta onde foi isolado, foi pouco acompanhada pela comunidade científica. Em 1954, durante um surto de icterícia na Nigéria por exposição ocupacional ao ZIKV, ele foi isolado de humanos e detectado anticorpos no soro em duas pessoas (Macnamara, 1954). Ao longo das últimas décadas do século XX, casos esporádicos foram relatados em estudos sorológicos conduzidos em comunidades de diferentes áreas da África e Ásia (Macnamara, 1954; Marchette et al., 1969; Hayes, 2009), sobretudo em pequenos surtos que ocorreram na Indonésia (Olson et al., 1981), Nigéria (Adekolu-John e Fagbami, 1983), Uganda (Rodhain et al., 1989) e Senegal (Monlun et al., 1993).

Em abril de 2007, na Ilha Yap, da Micronésia, houve um aumento de relatos de casos de uma doença caracterizada por apresentar eritema, conjuntivite, artralgia e febre. Inicialmente, era sugestivo de Febre Dengue, sendo que as amostras de pacientes em estágio agudo da doença foram enviadas ao *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) dos

Estados Unidos (Fort Collins, CO), e após análises laboratoriais, retornaram positivas para ZIKV e sua transmissão foi vetorizada principalmente pelo inseto *Aedes hensilli* (Lanciotti et al., 2008; Duffy et al., 2009). Acredita-se que mais de 70% da população da ilha tenha sido infectada pelo vírus na época do surto, porém sem nenhum caso de hospitalização, manifestações hemorrágicas ou óbito, sendo considerado o primeiro surto desde sua identificação na década de 1940 (Duffy et al., 2009).

Em outubro de 2013, três pacientes da Polinésia Francesa apresentaram febre ($<38^{\circ}\text{C}$), artralgia, dor de cabeça e eritema. Dois deles apresentaram conjuntivite e um tornozelos inchados e úlceras, mas não foi possível isolar o vírus. Quando um quarto paciente relatou os mesmos sintomas foi possível detectar o RNA do ZIKV por Reação em Cadeia da Polimerase utilizando transcrição reversa (RT-PCR) confirmando o início da epidemia (Cao-Lormeau et al., 2014; Roth et al., 2014). O surto teve duração de 21 semanas e foram analisados 855 pacientes com sintomas e 392 casos positivos confirmados laboratorialmente, porém acredita-se que mais de 30 mil pessoas foram infectadas (Faria et al., 2016; Maharajan et al., 2016; WHO, 2018b). Estima-se que 11% da população procurou cuidados médicos e casos de SGB surgiram e foram correlacionados com o surto de ZIKV (Musso et al., 2018).

No final de 2013, na Nova Caledônia, foi confirmado o primeiro caso de ZIKV, sendo este importado da Polinésia Francesa e o primeiro caso autóctone da região no início de 2014. A Nova Caledônia possuía 3 arboviroses circulando concomitantemente: ZIKV, Dengue vírus sorotipo 1 e Dengue vírus sorotipo 3. Além disso, foram descritos dois casos com coinfeção de ZIKV e DENV e ambos com febre, artralgia, mialgia, astenia, dor de cabeça e somente um com conjuntivite, dor retro orbitária, náuseas, diarreia, eritema e prurido maculopapular difuso (Dupont-Rouzeyrol et al., 2015).

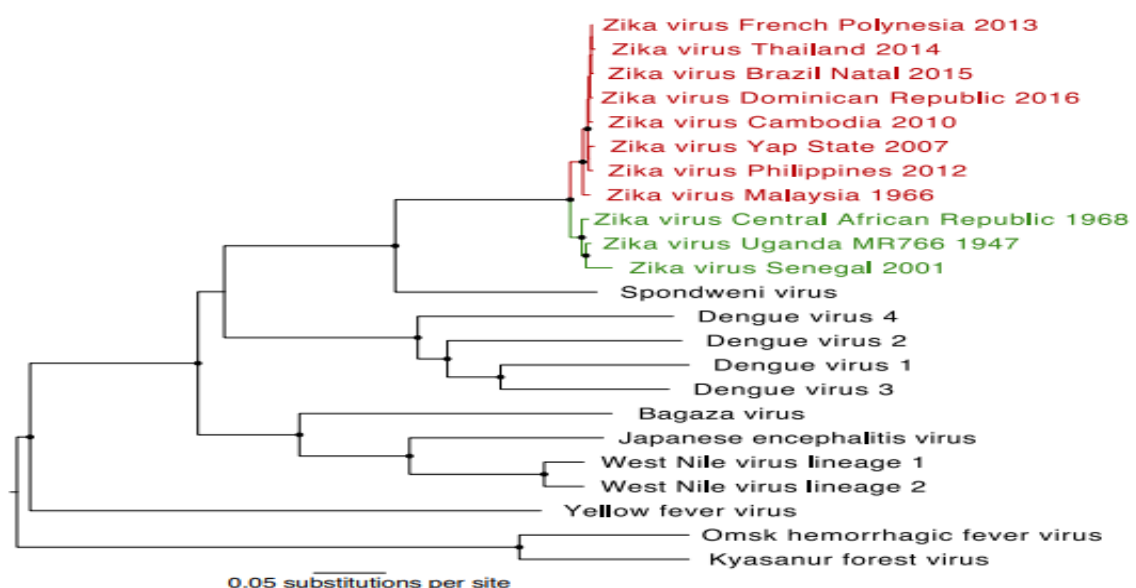
A rápida dispersão do vírus por esses locais se deve, principalmente, ao grande fluxo de pessoas que viajam entre esses países. Somado ao fato da presença do inseto transmissor nesses ambientes, e também de pessoas infectadas, isso pode facilmente resultar na disseminação da doença em novos locais, instalando-se novos surtos. O grande fluxo de turistas que o Brasil recebeu nos últimos anos, principalmente para recepção de grandes eventos, pode ter sido responsável pela entrada do ZIKV no país. Primeiramente, os surtos foram ligados ao aumento do fluxo de estrangeiros que vieram ao Brasil para a Copa do Mundo de Futebol em 2014 e o campeonato de canoagem no Rio de Janeiro (Musso, 2015).

Entretanto, apenas em março de 2015 em Camaçari, Bahia, foram analisados 24 pacientes do Hospital da Santa Helena que possuíam diagnóstico presuntivo de doença viral aguda. Submetidos ao RT-PCR por pesquisadores da Universidade Federal da Bahia, foram confirmados 7 (29,2%) casos de ZIKV. Realizada a análise filogenética, a sequência obtida pertenceu a linhagem asiática e demonstrou 99% de similaridade com a sequência da cepa isolada de ZIKV na Polinésia Francesa (Campos et al., 2015). Também em março, foram enviadas 21 amostras do serviço de saúde pública da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, para o Instituto Oswaldo Cruz no Paraná e confirmou a presença do ZIKV em 7 amostras sendo considerado o primeiro caso autóctone no país (Zanluca et al., 2015).

Com a chegada do vírus no Brasil no começo de 2015 e depois da associação com Malformações Congênitas e SGB foi declarado como um problema de saúde pública internacional pela OMS se difundindo em menos de um ano para toda América (Metsky et al., 2017).

O *Zika virus* é uma espécie viral membro do gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae* (ICTV, 2018). Próximo filogeneticamente de outros membros conhecidos do gênero como o DENV, JEV, WNV e YFV. O ZIKV possui duas linhagens evolutivas, a africana com vírions isolados na África e a Asiática com vírions isolados a partir da África, Ásia, Oceania e América (Figura 8) (Barzon et al., 2016).

Figura 8 – Árvore filogenética dos Flavivírus próximos do *Zika virus* e suas linhagens.

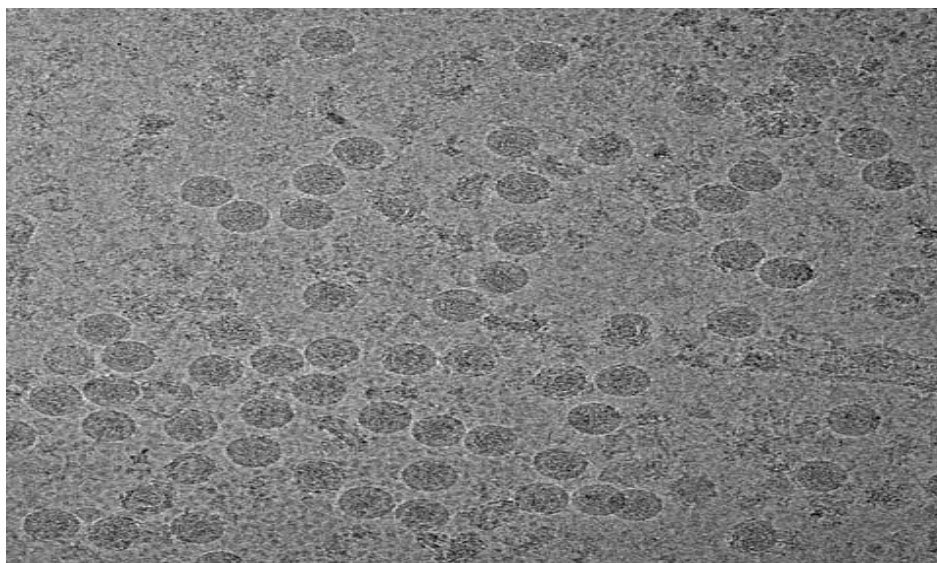


Árvore filogenética de Flavivírus próximos evolutivamente do *Zika virus* (ZIKV) utilizando como base a sequência de aminoácidos proveniente da poliproteína. É evidenciado também as duas linhagens do ZIKV em Verde – linhagem africana e Vermelho – linhagem asiática. Para análise foi utilizado o algoritmo de Neighbor-Joining.

Fonte: Barzon et al., 2016.

Como os demais flavivírus o ZIKV possui morfologia icosaédrica (Figura 9) com envelope, nucleocapsídeo e genoma de ácido ribonucleico de polaridade positiva, onde no terminal 3' é capeado e no 5' contém uma cauda poliadenilada com função de replicação genômica em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Seu genoma é traduzido em uma poliproteína que é clivada por proteases celulares e virais em proteínas estruturais e não estruturais (Zhu et al., 2016).

Figura 9 – Crio-microscopia eletrônica do *Zika virus*.



Fonte: Microscopy and Analysis, 2018.

Proteínas Estruturais:

Proteína E – Composta por 500 aminoácidos com três domínios proteicos. Sua função é adsorção e fusão do vírion na membrana citoplasmática e consequente desnudamento pós fusão na membrana no endossomo tardio mediado por pH (Kostyuchenko et al., 2016);

Proteína Precursora de Membrana – Possui três domínios, um central e os outros dois nos terminais N e C, sendo o último um terminal transmembrana. A clivagem dessa proteína pela enzima furina celular está associada a maturação de partículas virais (Pierson e Diamond, 2013). Diferenças evidenciadas a nível proteico entre as duas linhagens de ZIKV hipotetizam que essa proteína está associada à virulência e consequentemente por isso a linhagem asiática estaria envolvida com surtos significantes a saúde pública (Wang et al., 2016);

Proteína C – A proteína C é necessária para compor o capsídeo viral, possuindo para interação molecular um domínio para ácidos ribonucleicos e um domínio para membrana e envelope (Ma et al., 2004).

Proteínas não estruturais:

Proteína NS1 – É essencial para a replicação, evasão e maturação viral. A NS1 do ZIKV é similar a dos outros flavivírus, porém com diferenças eletroestáticas que podem estar envolvidas com virulência e patogênese (Brown et al., 2016);

Proteína NS2A – Integrante do complexo de replicação, sendo uma proteína transmembrana em associação com o RE (Xie et al., 2013);

Proteína NS2B – Outra proteína transmembrana que serve como sistema de ancoragem no RE para que ocorra interação entre outras proteínas virais como a NS2B-NS3 (Bollati et al., 2010);

Proteína NS3 – Possui função de protease da poliproteína traduzida a partir do genoma viral a interações com o RNA viral no processo de montagem de vírions. Diferente de outros flavivírus a NS3 do ZIKV forma um homodímero forte e a estrutura proteica de helicase com função de desenrolamento de RNA que aparenta ser monomérica, enquanto no DENV se apresenta em forma dimérica (Bollati et al., 2010; Lei et al., 2016; Tian et al., 2016);

Proteína NS4A e NS4B – Sua função de rearranjo de membranas fosfolipídicas é essencial na composição e manutenção do complexo de replicação viral (Nemesio et al., 2012);

Proteína NS5 – A mais conservada proteína dos flavivírus responsável pela síntese e replicação de RNA viral (Klema et al., 2016).

A biossíntese do ZIKV de forma básica ocorre como os modelos intensamente estudados dos integrantes do gênero *Flavivirus*, já que o mesmo integra essa classificação (ICTV, 2018). Mais estudos são necessários para inferir e evidenciar possíveis alterações na forma de biossíntese.

O ZIKV pode ser transmitido de forma vetorial, já que o mesmo é um FVTM e também de forma não vetorial:

Transmissão de forma vetorial: O principal gênero de mosquitos relacionados a transmissão do ZIKV é o *Aedes*, onde ocorre o ciclo silvestre e urbano corriqueiramente observado em FVTMs (Figura 6). No continente africano já foram isolados ZIKV nas seguintes espécies do gênero *Aedes*: *A. africanus*, *A. furcifer*, *A. vittatus*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, *A. albopictus* e outros (Dick et al., 1952; Diallo et al., 2014). Nos demais continentes o principal vetor associado e o mais eficiente é o *A. aegypti* (Marchette et al., 1969; Di Luca et al., 2016). No surto ocorrido na ilha de Yap não houve a identificação de ZIKV em mosquitos, porém a grande prevalência do *Aedes (stregomya) hensilli* fez com que o mesmo seja associado a endemia (Ledermann et al., 2014). No surto da Polinésia Francesa ocorrido em 2013 o *A. aegypti* e o *Aedes polynesiensis* provavelmente serviram de vetores para a transmissão local do ZIKV (Cao-Lormeau et al., 2014). E nas Américas o *A. aegypti* e o *A. albopictus* são responsáveis pela transmissão vetorial (Wang et al., 2016). Porém nos Estados Unidos foi investigado que o *Aedes* spp. não é um vetor eficiente (Chouin-Carneiro et al., 2016), sugerindo um fator adaptativo de manutenção via transmissão não vetorial (Beaver et al., 2018). Guedes et al. (2017) demonstraram que o gênero *Aedes* não é o único que pode replicar o ZIKV identificando biossíntese viral efetiva também no mosquito *Culex* spp, porém até o momento no quesito epidemiológico essa capacidade vetorial não foi evidenciada em nenhum surto.

Transmissão de forma não vetorial: Foi evidenciado que o ZIKV consegue se manter em sêmen e fluidos vaginais, tornando a via sexual uma forma de transmissão (Deckard et al., 2016). Transmissão via amamentação é uma possibilidade em vista que vírions infectantes já foram isolados de leite materno (Dupont-Rouzeyrol et al., 2016). A via de transmissão vertical é uma realidade já que foi detectado a presença de vírions em líquido amniótico, placenta e tecido fetal principalmente nervoso (Schuler-Faccini et al., 2016; Van Der Eijk et al., 2016). Como a maioria dos casos de infecção por ZIKV são assintomáticos uma rota de transmissão

recentemente identificada foi por transfusão sanguínea e transplante de órgãos provenientes de infectados (Musso et al., 2014). Também já foram identificados vírions em urina e saliva (Bonaldo et al., 2016), ainda estando em discussão o potencial de transmissibilidade.

O ZIKV causa infecção sintomática em 20% dos infectados com sintomas similares a gripes e resfriados (Duffy et al., 2009). O período de incubação varia de 3 a 7 dias. O infectado pode apresentar a Febre Zika (FZ) com sintomas comuns de arboviroses como febre, artralgia, mialgia, conjuntivite, dor de cabeça, fadiga e eritema (Musso et al., 2018). O ZIKV também foi associado a casos isolados graves como trombocitopenia (Karimi et al., 2016), meningites e encefalites (Carteaux et al., 2016). O padrão pantrópico do ZIKV torna o diagnóstico clínico dificultoso e inconclusivo, assim como o laboratorial. Foi evidenciado presença de RNA de ZIKV em sangue total até 100 dias pós infecção, em contrapartida com o soro (Mansuy et al., 2017). A presença de vírions em câmaras oculares é evidenciado pela presença de RNA detectável em secreções oculares até 30 dias, com a sintomatologia variando de uma conjuntivite a cegueira (Kodati et al., 2017). A persistência de ZIKV também no sistema reprodutor já foi evidenciada podendo atingir meses de detecção de RNA viral em sêmen (Mansuy et al., 2016), ocorrendo oligospermia e hematoespermia, o que levanta questões sobre a possibilidade de afetar a fertilidade (Joguet et al., 2017). A infecção por ZIKV está associada ao desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré caracterizada por uma inflamação aguda polineuropática que resulta em parestesia, fraqueza e dor com possível paralisia progressiva e óbito. É sugerido que essa imunopatologia seja mediada pelo sistema de defesa adaptativo em resposta ao mimetismo molecular desencadeado por antígenos do ZIKV (Parra et al., 2016; dos Santos et al., 2016; Pierson e Diamond, 2018).

A placenta humana é hemocorial para nutrição, troca gasosa e excreção para o desenvolvimento e crescimento fetal. O sinciotrofoblasto é uma estrutura celular composta por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais que também servem de barreira física e imunológica defendendo o feto de agentes microbianos. Trofoblastos isolados nos primeiros estágios de gravidez apontam alto tropismo e replicação de ZIKV (Sheridan et al., 2017), o que não é observado em trofoblastos isolados em estágios tardios de gravidez, refletindo a maturidade celular talvez como um fator protetivo (Bayer et al., 2016). Foi evidenciado a infecção de macrófagos fetais sugerindo a via de infecção transplacentária (Martines et al., 2016). Os danos neurológicos induzidos pelo ZIKV (DNZ) foram observados em milhares de casos (Delaney et al., 2018). O ZIKV apresenta tropismo por células neurais progenitoras, evidenciando por consequência desse tropismo proliferação e diferenciação celular reduzida,

além de inflamação e lise (Tang et al., 2016). No Brasil, em uma série de casos com 182 mulheres grávidas sintomáticas, 42% dos fetos apresentavam DNZ no primeiro trimestre de gestação (Brasil et al., 2016). Casos de microcefalia aumentaram na Polinésia Francesa, apontado por um estudo retrospectivo no período de surto de ZIKV (Cauchemez et al., 2016). Nos Estados Unidos 5% dos fetos infectados apresentaram alguma malformação independente do trimestre gestacional (Shapiro-Mendoza et al., 2017). O cérebro de fetos com DNZ apresentam hipoplasia de cerebelo, hipoplasia de tronco cerebral, defeitos de mielinização, calcificações, malformações corticais e ventriculomegalia, sendo a semiologia variável de microcefalia (crescimento anormal da cabeça – ocasionada geralmente por malformações cerebrais) a morte cerebral (Brasil et al., 2016). Ainda permanecem várias incógnitas em relação a capacidade patológica do ZIKV, como qual a distribuição geográfica de DNZ? Qual o período de maior risco para as gestantes infectadas? Existe o risco de DNZ em casos de infecção assintomáticas? Entre outras questões (Pierson e Diamond, 2018).

1.4. Métodos de Estudo

Diagnóstico laboratorial e ZIKV

O estudo da distribuição e de determinantes da ocorrência de doenças em populações e sua aplicação em problemas de saúde, aliados aos avanços tecnológicos e as recentes ferramentas em biologia molecular, proporcionaram uma melhor investigação de surtos de doenças infecciosas, epidemias, dinâmica de transmissão, identificação de fatores de risco, patogênese e vigilância (Riley e Blanton, 2018).

A epidemia atual de ZIKV resultou em um aumento de solicitações aos laboratórios e institutos para realizar o diagnóstico o mais rapidamente. Devido a sua semelhança com outros *Flavivirus*, tanto clínica como epidemiológica, o diagnóstico de ZIKV é desafiador, já que o método laboratorial precisa apresentar testes de alta especificidade, em vista que, no caso do Brasil com a circulação simultânea de diversos *Flavivirus*, o método precisa ser preciso o suficiente para discriminar corretamente o agente causador da doença. O teste necessita ser sensível, visto que as amostras biológicas podem ser coletadas em momentos diferentes e isso implica em variações da carga viral que, se for baixa, poderá ocorrer um falso-negativo. O isolamento viral é considerado uma técnica padrão-ouro para o diagnóstico e essencial para

determinar as características genotípicas e fenotípicas do vírus, mas tem a desvantagem de ser demorada e apresentar uma baixa sensibilidade (Faye et al., 2013). Testes sorológicos por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) podem ser utilizados na busca por Imunoglobulina M (IgM) anti-ZIKV, para amostras coletadas depois de quatro dias do início dos sintomas. Contudo, testes sorológicos podem apresentar reação cruzada com outros *Flavivirus*, o que o torna um método menos específico (Maharajan et al., 2016) que além de complicar o diagnóstico, levanta a hipótese sobre as implicações biológicas dessa reação cruzada em relação a proteção, virulência, imunopatologia e o diagnóstico (Priyamvada et al., 2016).

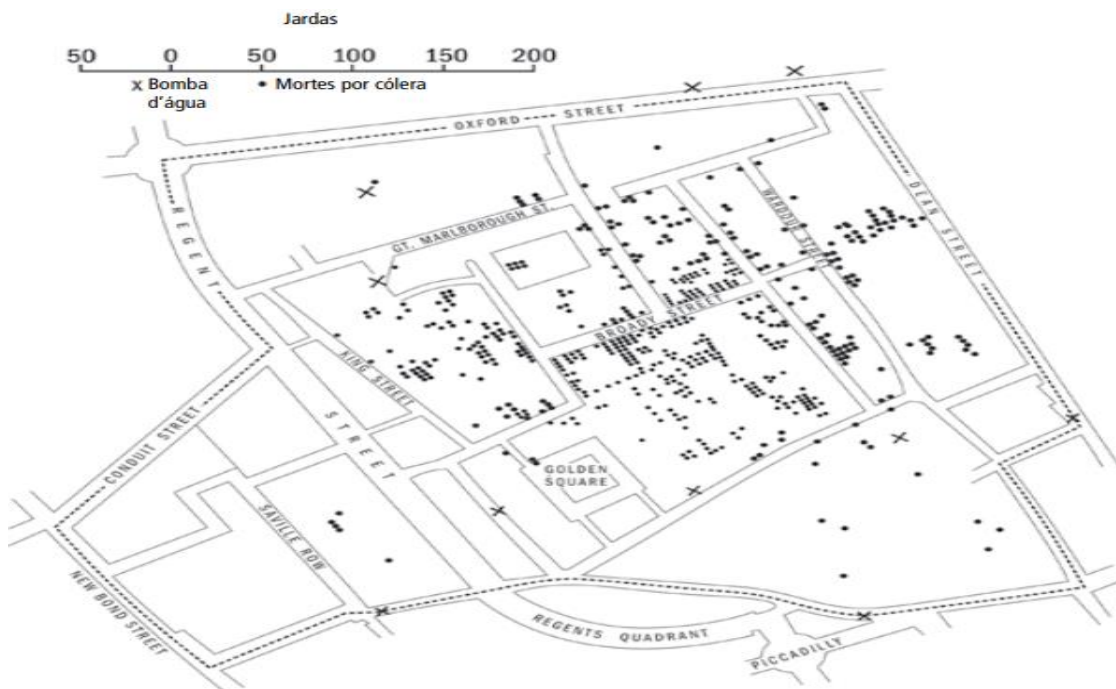
A detecção molecular do RNA viral realizada por transcriptase reversa em reação em cadeia da polimerase é um bom método para diagnóstico laboratorial, em vista que mesmo baixas quantidades do vírus na amostra poderão ser amplificadas, sendo uma técnica rápida, com baixo risco de contaminação e facilidade na padronização. A PCR em tempo real com uma sonda marcada com o fluorocromo, fornece a capacidade da análise quantitativa na amostra em tempo real (Musso e Gubler, 2016). *Primers* e *probes* específicos para ZIKV estão sendo desenvolvidos e cada um deles para uma determinada região do genoma, por exemplo, para o gene que codifica o envelope, junção entre membrana e envelope, envelope parcial e as proteínas não estruturais NS5 e NS1 (Lanciotti et al., 2008; Faye et al., 2013; Pyke et al., 2014; Balm et al., 2012). Por utilizar *primers* e *probes* que amplificam regiões conhecidas do vírus, o método apresenta alta especificidade e sensibilidade, podendo ser utilizado em amostras de pacientes com até sete dias após o início dos sintomas (Maharajan et al., 2016).

A região de Bauru iniciou as investigações para ZIKV em novembro de 2015 somente em amostras Dengue-NS1 negativas, de pacientes que atendiam à definição de caso de Febre Zika, ou seja, que apresentassem exantema maculopapular pruriginoso acompanhado de dois ou mais dos seguintes sinais e sintomas: febre ou hiperemia conjuntival sem secreção, prurido, poliartralgia ou edema periarticular. Com exceção das gestantes a confirmação de um caso autóctone de infecção por ZIKV já é suficiente para considerar que o município tem a transmissão, e, portanto, não seria necessário continuar investigando laboratorialmente a ocorrência de outros casos, que é confirmado por clínico-epidemiológico.

Geoprocessamento

O geoprocessamento é a utilização de softwares para análise e ilustração espacial do objeto de estudo passível de ser referenciado (Magalhães, 2012). Um exemplo clássico para representar a importância epidemiológica do geoprocessamento é a pesquisa desenvolvida pelo médico higienista John Snow que pelo mapeamento de casos de Cólera foi possível associar a sua distribuição com as bombas d'água, responsáveis pela disseminação do *Vibrio cholerae* (Figura 10) (Gilbert, 1958).

Figura 10 – Óbitos por cólera na área central de Londres, setembro de 1854.



Fonte: Gilbert, 1958.

Um mapa pode apresentar dentro de suas variáveis: tempo, temperatura, distribuição e concentração do objeto de estudo, podendo compará-los quando possível com outros fatores em busca de possíveis padrões (Magalhães, 2012). Um método estatístico frequente para essas técnicas é o de *Kernel* (núcleo) que estima curvas de densidade considerando a distância a partir do ponto georreferenciado. O geoprocessamento gera novos dados e contribui com o aspecto

social, ambiental e epidemiológico de doenças (Barcellos e Bastos, 1996; Andrade e Szwarcwald, 2001).

Bioinformática

A bioinformática é uma área de pesquisa que utiliza a análise computacional dos sistemas biológicos (genoma, transcriptoma, proteômica, metabolômica) que seriam inviáveis para as demais metodologias científicas, considerando a quantidade de dados. As competências da bioinformática abrangem as seguintes temáticas: Alinhamento de sequências; Dinâmica molecular; Filogenia; Modelagem comparativa; Predição de função gênica e Arelamento molecular (Farias et al., 2012; Verli, 2014). Essa área de pesquisa produz resultados significantes como as demais áreas de estudo, como por exemplo: O trabalho de Sheuermann et al. (2017) que utilizando ferramentas da área de bioinformática desenvolveram um sistema de análise de efetividade molecular no contexto de testes vacinais; Zhang et al. (2016) identificaram por análises de sequencias alterações genéticas em Enterovírus que podem estar associadas ao aumento de neurovirulência em um surto ocorrido em 2014; Caracterização de resposta do hospedeiro frente a infecções virais por Aeevermann et al. (2014); Messias et al. (2018) analisou cepas de ZIKV provenientes de casos de microcefalia, aonde a análise de sequências evidenciou mutações não sinônimas em regiões genômicas que se referem a proteína E de importância na adsorção do vírion.

Justificativa

A realização da investigação do *Zika virus* em amostras humanas na região de Bauru do estado de São Paulo, Brasil, contribuiu com dados sorológicos, moleculares e filogenéticos que são fundamentais na determinação dos primeiros casos de *Zika virus* nos locais do estudo, bem como no melhor entendimento sobre o agente etiológico e consequentemente melhores estratégias de controle e prevenção.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar em soro humano a presença do *Zika virus* por meio de técnicas de virologia molecular e imunocromatografia na região de Bauru do estado de São Paulo, Brasil.

Objetivos específicos

- Investigar de forma sorológica e georreferencial o *Zika virus* em amostras humanas.
- Investigar a presença de ácido ribonucleico do *Zika virus* em amostras de soro humano.
- Realizar análise de bioinformática referente a filogenética nacional do *Zika virus*.

3. REFERÊNCIAS

- Adekolu-John EO, Fagbami AH. Arthropod-borne virus antibodies in sera of residents of Kainji Lake Basin, Nigeria 1980. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77(2): 149-51.
- Aevermann BD, Pickett BE, Kumar S, et al. A comprehensive collection of systems biology data characterizing the host response to viral infection. *Scientific Data.* 2014; 1: 140033.
- Andrade CLT, Szwarcwald CL. Análise espacial da mortalidade neonatal precoce no Município do Rio de Janeiro, 1995-1996. *Cadernos de Saúde Pública.* 2001; 17(5): 1199-1210.
- Balm MN, Lee CK, Lee HK, et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *J Med Virol.* 2012; 84(9): 1501-5.
- Balmaseda A, Hammond SN, Tellez Y, et al. High seroprevalence of antibodies against dengue virus in a prospective study of schoolchildren in Managua, Nicaragua. *Trop Med Int Health.* 2006; 11(6): 935–942.
- Barcellos C, Bastos FI. Geoprocessamento, ambiente e saúde: uma união possível? *Cadernos de Saúde Pública.* 1996; 3(12): 389-397.
- Barzon L, Trevisan M, Sinigaglia A, et al. Zika virus: from pathogenesis to disease control. *FEMS Microbiology Letters.* 2016; 363: fnw202.
- Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, et al. Type III interferons produced by human placental trophoblasts confer protection against Zika virus infection. *Cell Host Microbe.* 2016; 19: 705–712.
- Beasley DW, Li L, Suderman MT, et al. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. *Virology.* 2002; 296(1): 17–23.

Beaver JT, Lelutiu N, Habib R, et al. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Front Immunol.* 2018; 9: 1640.

Blitvich BJ, Firth AE. A Review of Flaviviruses that Have No Known Arthropod Vector. *Viruses.* 2017; 9(6): 154.

Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 2010; 87(2): 125-48.

Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(6): e0004816.

Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med.* 2016; 375: 2321–2334.

Brown AN, Kent KA, Bennett CJ, et al. Tissue tropism and neuroinvasion of West Nile virus do not differ for two mouse strains with diferente survival rates. *Virology.* 2007; 368(2) :422–430.

Brown WC, Akey DL, Konwerski JR, et al. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nat Struct Mol Biol.* 2016; 23: 865–7.

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

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20: 1085–6.

Carteaux G, Maquart M, Bedet A, et al. Zika virus associated with meningoencephalitis. *N Engl J Med.* 2016; 374: 1595–1596.

Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *Lancet*. 2016; 387: 2125–2132.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [Internet]. Atlanta: United States; 2014 [cited 2018 dez 17]. Available from: <https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [Internet]. Atlanta: United States; 2018a [cited 2018 dez 19]. Available from: <https://www.cdc.gov/westnile/>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [Internet]. Atlanta: United States; 2018b [cited 2018 dez 19]. Available from: <https://www.cdc.gov/yellowfever/>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [Internet]. Atlanta: United States; 2018c [cited 2018 dez 17]. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/diseases/tickborne-encephalitis>

Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(3): e0004543.

Clarke BD, Roby JA, Slonchak A, et al. Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Res*. 2015; 206: 53-61.

Condit RC. Principles of Virology. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 21-51.

Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus—Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016; 65(14): 372-4.

Delaney A, Mai C, Smoots A, et al. Population-Based surveillance of birth defects potentially related to Zika virus infection — 15 States and U.S. Territories, 2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2018; 67: 91–96.

Di Luca M, Severini F, Toma L, et al. Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Euro Surveill*. 2016; 21(18): pii=30223.

Diallo D, Amadou AS, Cheikh TD, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS One*. 2014; 9(10): e109442.

Dick GW, Haddow AJ. Uganda S virus; a hitherto unrecorded virus isolated from mosquitoes in Uganda. I. Isolation and pathogenicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952; 46: 600–18.

Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952; 46: 509–20.

Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN. *Introduction to Modern Virology*. 6th ed. Blackwell Publishing; 2007.

dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, et al. Zika virus and the Guillain–Barré Syndrome — case series from seven countries. *N Engl J Med*. 2016; 375: 1598–1601.

Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009; 360: 2536–43.

Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, et al. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet*. 2016; 387(10023): 1051.

Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(2): 381-2.

Enquist LW, Racaniello VR. *Virology: From Contagium Fluidum to Virome*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1-20.

Faria NR, Kraemer M, Souza R, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*. 2016; 352(6283): 345-349.

Farias AQP, Chacon PFS, Silva NRR. A bioinformática como ferramenta de formação de recursos humanos no ifrn. *Holos*. 2012; 6(28).

Faye O, Diallo D, Diallo M, et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. *Virology Journal*. 2013; 10: 311.

Ferreira DF, Costa LJ, Cavaleiro NP, et al. Propriedades Gerais dos Vírus, Estratégias de Replicação dos Vírus e Arquitetura dos Vírus. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução à Virologia Humana*. 2th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 1-39.

Furuichi Y, Shatkin AJ. Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv Virus Res*. 2000; 55: 135–184.

Gilbert EW. Pioneer maps of health and disease in England. *Geog J*. 1958; 124: 172-183.

Gould EA, de Lamballerie X, Zanotto PM, et al. Evolution, epidemiology, and dispersal of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Adv Virus Res*. 2001; 57:71–103.

Gould EA, de Lamballerie X, Zanotto PM, et al. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv Virus Res*. 2003; 59:277–314.

Guedes DR, Paiva MH, Donato MM. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microbes Infect*. 2017; 6(8): e69.

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

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet]. Birmingham; 2018 [cited 2018 dez 17]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

Jahrling PB, Hesse RA, Anderson AO, et al. Opsonization of alphaviruses in hamsters. *J Med Virol*. 1983; 12(1): 1–16.

Joguet G, Mansuy JM, Matusali G, et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17: 1200–1208.

Kaiser R. Tick-borne encephalitis. *Infect Dis Clin North Am*. 2008; 22(3): 561–575.

Karimi O, Goorhuis A, Schinkel J, et al. Thrombocytopenia and subcutaneous bleedings in a patient with Zika virus infection. *Lancet*. 2016; 387: 939–940.

Kitchen A, Shackelton LA, Holmes EC. Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108(1): 238–243.

Klema J, Ye V, Hindupur M, et al. Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. *PLOS Pathogens*. 2016; 12: e1005451.

Kodati S, Tara N, Palmore MD, et al. Bilateral posterior uveitis associated with Zika virus infection. *Lancet*. 2017; 389: 125–126.

Kostyuchenko VA, Lim EX, Zhang S, et al. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*. 2016; 533: 425–8.

Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, et al. Importance of localized skin infection in tick borne encephalitis virus transmission. *Virology*. 1996; 219(2): 357–366.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008; 1232-9.

Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, et al. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(10): e3188.

Lei J, Hansen G, Nitsche C, et al. Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science*. 2016; 353 (6298):503-505.

Lim PY, Behr MJ, Chadwick CM. Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo. *J Virol*. 2011; 85(10): 5197–5201.

Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, et al. Flaviviridae. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 712-746.

Ma L, Jones CT, Groesch TD, et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 3414–9.

Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*. 2004; 10(12): 98–S109.

Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1954; 48: 139–45.

Magalhães GB. O uso do geoprocessamento e da estatística nos estudos ecológicos em epidemiologia: o caso da dengue em 2008 na região metropolitana de fortaleza. *Hygeia*. 2012; 8(15): 63-77.

Maharajan MK, Ranjan A, Chu JF, et al. Zika Virus Infection: Current Concerns and Perspectives. 2016; 51(3): 383-394.

Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, et al. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol*. 2009; 90(8): 1781–1794.

Mansuy JM, Mengelle C, Pasquier C, et al. Zika virus in semen and spermatozoa. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16: 1106–1107.

Mansuy JM, Suberbielle E, Chapuy-Regaud S, et al. Zika Virus infection and prolonged viremia in whole-blood specimens. *Emerg Infect Dis*. 2017; 2: 863–865.

Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1969; 18(3): 411-415.

Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2001; 6(3): 219–224.

Martines RB, Bhatnagar J, de Oliveira Ramos AM, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet*. 2016; 388: 898–904.

McNeill J. *Aedes Rides Again: Mosquitoes and Flaviviruses in the Americas*. *Am J Public Health*. 2016; 106(4):596-7.

Messias TS, Silva KCP, Richini-Pereira VB. Presença de mutações em cepas de Zika vírus associadas a microcefalia: Uma análise in silico. In: Faculdade de Ciências – Campus Bauru. I Congresso de Biologia. UNESP 2018: Abr 25-27; Bauru, Brasil. Bauru: Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências; 2018. p. 263-265.

Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*. 2017; 546(7658): 411-415.

Microscopy and Analysis [Internet]. 2016 [Cited 2018 dez 19]. Available from: <https://microscopy-analysis.com/editorials/editorial-listings/zika-virus-exposed>

Monlun E, Zeller H, Le Guenno B, et al. Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal. *Bull Soc Pathol Exot*. 1993; 86(1): 21-8.

Murphy FA. Togavirus morphology and morphogenesis. In: Schlesinger RW. *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. Academic Press: New York. 1980: 241–316.

Musso D, Bossin H, Mallet HP, et al. Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18:172–182.

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

Musso D, Nhan T, Robin E, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014 . *Euro Surveill.* 2014; 19(14): 20761.

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

Nemesio H, Palomares-Jerez F, Villalaín J. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: Membranotropic regions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2012; 1818 (11): 2818-2830.

Norval M. Virus-cell interactions. In: Greenwood D, Barer M, Slack R, et al. *Medical Microbiology A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, immunity, laboratory investigation and control.* 18th ed. Elsevier; 2012: p. 82-96.

Olson JG, Ksiazek TG, Gubler DJ, et al. A survey for arboviral antibodies in sera of humans and animals in Lombok, Republic of Indonesia. *Annals of Tropical Medicine e Parasitology.* 1981; 131-137.

Parra B, Lizarazo J, Jiménez-Arango JA, et al. Guillain–Barré syndrome associated with Zika virus infection in Colombia. *N Engl J Med.* 2016; 375: 1513–1523.

Pettersson JH, Fiz-Palacios O. Dating the origin of the genus *Flavivirus* in the light of Beringian biogeography. *J Gen Virol.* 2014; 95: 1969–1982.

Pierson TC, Diamond MS. Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology.* 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 747-794.

Pierson TC, Diamond MS. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature.* 2018; 560: 573–581.

Pogodina VV. An experimental study on the pathogenesis of tick-borne encephalitis following alimentary infection. Part 1. The dynamics of distribution of the virus in white mice infected by the enteral route. *Vopr Virusol.* 1960; 5: 272–279.

Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2016; 113(28): 7852–7.

Pyke AT, Daly MT, Cameron JN, et al. Imported zika virus infection from the cook islands into australia, 2014. *PLoS Curr.* 2014; 6.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science.* 1985; 229(4715): 11523–11531.

Riley L, Blanton R. Advances in Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Definitions, Approaches, and Scope of the Field. *Microbiol Spectrum.* 2018; 6(6).

Rios M, Daniel S, Chancey C, et al. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(2): 181–186.

Rodhain F, Gonzalez JP, Mercier E, et al. Arbovirus infections and viral haemorrhagic fevers in Uganda: a serological survey in Karamoja district, 1984. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989; 83(6): 851–4.

Romanos MTV. Febre Amarela e Dengue. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução à Virologia Humana.* 2th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 399–409.

Roth A, Mercier A, Lepers C, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Euro Surveill.* 2014; 16:19(41). pii: 20929.

Rush AB. An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. *Medical Enquiries Observations.* 1789; 104–117.

Santos NSO. Evolução e Emergências das Viroses. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. Introdução à Virologia Humana. 2th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 503-509.

Scheuermann RH, Sinkovits RS, Schenkelberg T et al. A bioinformatics roadmap for the human vaccines project. *Expert Rev Vaccines*. 2017; 2017: 1322752.

Schneider BS, Higgs S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008; 102(5): 400–408.

Schneider BS, Soong L, Girard YA, et al. Potentiation of West Nile encephalitis by mosquito feeding. *Viral Immunol*. 2006; 19(1): 74–82.

Schneider H. An acute epidemic of serosal meningitis. *Wien Klin Wochenschr*. 1931; 44: 350–352.

Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016; 65: 59–62.

Shapiro-Mendoza CK, Rice ME, Galang RR, et al. Pregnancy outcomes after maternal Zika virus infection during pregnancy — U.S. Territories, January 1, 2016–April 25, 2017. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2017; 66: 615–621.

Sheridan MA, et al. Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114: 1587–1596.

Sulkin SE, Sims RA, Allen R. Isolation of St. Louis encephalitis virus from bats (*Tadarida b. mexicana*) in Texas. *Science*. 1966; 152: 223–225.

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

Tian H, Ji X, Yang X. Structural basis of Zika virus helicase in recognizing its substrates. *Protein Cell*. 2016; 7(8): 562-70.

Van Der Eijk AA, van Genderen PJ, Verdijk RM, et al. Miscarriage Associated with Zika Virus Infection. *N Engl J Med*. 2016; 375(10): 1002-4.

Verli H. *Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular*. 1th ed. São Paulo: SBBq; 2014. p. 282.

Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR). United State; 2018 [cited 2018 dez 17]. Available from: <https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=flavi>

Wang L, Valderramos SG, Wu A, et al. From mosquitos to humans: genetic evolution of Zika virus. *Cell Host Microbe*. 2016; 19: 561–5.

World Health Organization (WHO) [Internet]. 2018a. [cited 2018 dez 17]. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/epidemic-focus/flavivirus-epidemics/en/>

World Health Organization (WHO) [Internet]. 2018b. [cited 2018 dez 19]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>

Xie X, Gayen S, Kang C, et al. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *J Virol*. 2013; 87(8): 4609-22.

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

Zhang W, Chipman PR, Corver J, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature structural biology*. 2003; 10(11): 907-912.

Zhang Y, Cao J, Zhang S, et al. Genetic changes found in a distinct clade of Enterovirus D68 associated with paralysis during the 2014 outbreak. *Virus Evolution*. 2016; 2: vew015.

Zhu Z, Chan JF-W, Tee K-M, et al. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerg Microbes Infect.* 2016; 5: e22.

Zilber L. Spring-summer tick-borne encephalitis. *Arkhiv Niol Nauk.* 1939; 56: 255–261.

“É tão grande a capacidade de adaptação e a versatilidade dos microorganismos, comparados aos seres humanos e outros organismos tidos como “Superiores”, que eles sem dúvida continuarão a colonizar e alterar a superfície da Terra logo depois que nós e os resto de nossos coabitantes deixarmos a cena para sempre. Os micróbios, e não os macróbios, dominam o mundo.”

- Bernard Dixon, 1994

Capítulo II

4. ARTIGO I:

Investigação sorológica e molecular do *Zika virus*

Thiago Silva Messias^a, Jéssica Soares Gomes Acosta^b, Kaique Cesar de Paula Silva^{c,d}, Cassiano Victória^e, Débora Oliveira Losnak^a, Laís Anversa^f, Luciana da Silva Ruiz Menezes^f, Virginia Bodelão Richini Pereira^{a,f,*}.

^a Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

^b Faculdades de Ciências – Unesp – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, São Paulo, Brasil.

^c Hospital de Reabilitação em Anomalias Craniofaciais – USP – Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil

^d Diretoria da Saúde III – UNINOVE – Universidade Nove de Julho, Bauru, São Paulo, Brasil.

^e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil.

^f Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais Bauru, São Paulo, Brasil.

***Autor correspondente:** Virginia Bodelão Richini Pereira.

E-mail: virichini@yahoo.com.br.

Contribuição de autoria baseado nas regras do CRediT

Conceitualização – Thiago Silva Messias, Kaique Cesar de Paula Silva e Virginia Bodelão Richini Pereira.

Metodologia – Thiago Silva Messias e Virginia Bodelão Richini Pereira.

Validação – Virginia Bodelão Richini Pereira.

Análise formal (estatística e geoprocessamento) – Kaique Cesar de Paula Silva e Cassiano Victória.

Investigação – Thiago Silva Messias, Jéssica Soares Gomes Acosta e Kaique Cesar de Paula Silva.

Manipulação de dados – Thiago Silva Messias e Kaique Cesar de Paula Silva.

Preparo do Original – Thiago Silva Messias e Virginia Bodelão Richini Pereira.

Preparo do Original em Inglês – Thiago Silva Messias e Jéssica Soares Gomes Acosta.

Revisão Ortográfica – Kaique Cesar de Paula Silva, Jéssica Soares Gomes Acosta, Débora Oliveira Losnak, Laís Anversa, Luciana da Silva Ruiz Menezes e Virginia Bodelão Richini Pereira.

Supervisão e Coordenação – Virginia Bodelão Richini Pereira.

Pontos Principais:

- Presença de resultados soro positivos ZIKV na região de estudo em 2014-2016.
- Resultados negativos de RNA viral em soro, corroborando com aderência em hemácias.
- Possibilidade de adaptação de transmissibilidade e evasão viral.
- Inferência de melhor adaptação do *Zika virus* na Região Nordeste do Brasil.

Periódico: *Acta Tropica*

Resumo

Foi investigado de forma sorológica e molecular o *Zika virus* (ZIKV) em amostras humanas na região de Bauru do estado de São Paulo, Brasil a fim de contribuir na determinação dos primeiros casos de infecção de ZIKV nos locais do estudo. Foi realizada a investigação sorológica por técnica de imunocromatografia em 2000 amostras *Dengue virus* negativas referentes aos anos de 2014-2016, sendo 159 (7,9%) positivas para ZIKV, evidenciando que a circularização do ZIKV na região de estudo teve início em 2014. Foi investigado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa por transcrição reversa (RT-qPCR) a presença de ácido ribonucleico (RNA) do ZIKV nas 159 amostras positivas a nível sorológico. Todas não evidenciaram RNA viral. Esse resultado negativo quanto a molecular a partir de soro reforça a possibilidade de aderência do ZIKV em eritrócitos, corroborando com sua capacidade adaptativa transmissiva por transfusão sanguínea e transplante de órgãos. Utilizando os bancos de dados, algoritmos e parâmetros presentes nos softwares *Virus Pathogen Resource* (ViPR) e

MEGA7 foi analisado e inferido por estudo filogenético que o ZIKV apresenta uma possível adaptação na Região Nordeste do Brasil. Considerando todas as evidências podemos concluir que o *Zika virus* possui um alto potencial de adaptação/evolução, o que por sua vez poderia gerar características patogênicas desafiadoras a saúde pública.

Palavras-chave: Zika Virus, Diagnóstico Molecular, Sorologia, Filogenia, Mapa Geográfico.

Introdução

O *Zika virus* (ZIKV) foi descoberto em 1947 por Alexander Haddow e George Dick em um primata não humano na floresta Zika localizada na Uganda (Dick e Haddow, 1952; Dick et al., 1952). Ocorrendo o primeiro caso humano de Febre Zika (FZ) na Nigéria em 1954 (Macnamara, 1954). Após longo período desde seu descobrimento iniciou um surto na ilha Yap na Micronésia em 2007 infectando mais de 70% dos residentes (Duffy et al., 2009). Seis anos depois se espalhou para diversas ilhas da Oceania a partir da Polinésia Francesa (Cao-Lormeau et al., 2014; Tognarelli et al., 2016). Com a confirmação do primeiro caso autóctone no Brasil no começo de 2015 e depois da associação com Malformações Congênitas e Síndrome de Guillain-Barré (SGB) foi declarado como um problema de saúde pública internacional pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2016; Metsky et al., 2017).

O ZIKV é uma espécie viral membro do gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae* (ICTV, 2018). Próximo filogeneticamente de outros membros conhecidos do gênero como o *Dengue virus* (DENV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV) e *Yellow fever virus* (YFV). O ZIKV possui duas linhagens evolutivas, a africana com vírions isolados na África e a Asiática com vírions isolados a partir da África, Ásia, Oceania e América (Barzon et al., 2016). Como os demais flavivírus o ZIKV possui morfologia icosaédrica com envelope, nucleocapsídeo e genoma de ácido ribonucleico de polaridade positiva, onde no terminal 3' é capeado e no 5' contém uma cauda poliadenilada. Seu genoma é traduzido em uma poliproteína que é clivada por proteases celulares e virais em proteínas estruturais (E, prM e C) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Zhu et al., 2016).

O ZIKV pode ser transmitido de forma vetorial, o principal vetor associado e o mais eficiente é o *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) (Marchette et al., 1969; Di Luca et al., 2016). E também de forma não vetorial: sexual (Deckard et al., 2016), amamentação (Dupont-Rouzeyrol et al.,

2016), transfusão sanguínea e transplante de órgãos (Musso et al., 2014) e congênita (Schuler-Faccini et al., 2016; Van der Eijk et al., 2016).

O ZIKV causa infecção sintomática em 20% dos infectados com sintomas similares a gripes e resfriados (Duffy et al., 2009). O período de incubação varia de 3 a 7 dias. O infectado pode apresentar a Febre Zika com sintomas comuns de arboviroses como febre, artralgia, mialgia, conjuntivite, dor de cabeça, fadiga e eritema (Musso et al., 2018). O padrão pantrópico do ZIKV torna o diagnóstico clínico dificultoso e inconclusivo, assim como o laboratorial (Mansuy et al., 2017). A infecção por ZIKV está associada ao desenvolvimento de quadros agudos autoimune como a SGB e polirradiculoneuropatia. É sugerido que essa imunopatologia seja mediada pelo sistema de defesa adaptativo em resposta ao mimetismo molecular desencadeado por antígenos do ZIKV (Parra et al., 2016; dos Santos et al., 2016; Pierson e Diamond, 2018). Foi evidenciado a infecção de macrófagos fetais sugerindo a via de infecção transplacentária (Martines et al., 2016). Os danos neurológicos induzidos pelo ZIKV foram observados em milhares de casos (Delaney et al., 2018). O ZIKV apresenta tropismo por células neurais progenitoras, evidenciando por consequência proliferação e diferenciação celular reduzida, além de inflamação e lise (Tang et al., 2016). O cérebro de fetos com DNZ podem apresentar hipoplasia de cerebelo, hipoplasia de tronco cerebral, defeitos de mielinização, calcificações, malformações corticais e ventriculomegalia, sendo a semiologia variável de microcefalia (diminuição do diâmetro cefálico – ocasionada por malformações cerebrais) a morte cerebral (Brasil et al., 2016).

Considerando a importância apresentada, nesse trabalho foi investigado de forma sorológica e molecular o *Zika virus* em amostras humanas na região de Bauru do estado de São Paulo, Brasil a fim de contribuir na determinação dos primeiros casos de infecção de *Zika virus* nos locais do estudo. O que possibilita melhor entendimento sobre o agente etiológico e consequentemente melhores estratégias de controle e prevenção.

Materiais e Métodos

Investigação Sorológica

Foram utilizadas 2000 amostras de soro humano (CEP nº 2.420.216) no período de 2014-2016 proveniente de 38 municípios da região de Bauru do estado de São Paulo, Brasil sobe suspeita semiológica de Febre Dengue, considerando o critério de inclusão de amostras

com resultados laboratoriais não reagentes para NS1 e imunoglobulina M (IgM) específicos para DENV e posteriormente foram congeladas a -70°C. Essas amostras foram testadas a nível sorológico (imunoglobulinas G e M) utilizando o Teste Rápido Zika IgG/IgM Combo Bahiafarma que utiliza do princípio metodológico de imunocromatografia com os seguintes valores de desempenho: IgG – 94% de sensibilidade e 93% de especificidade; IgM – 94% de sensibilidade e 94% de especificidade (BAHIAFARMA, 2016). Antes do início dos testes sorológicos para ZIKV foram utilizadas cepas de DENV para verificar a possibilidade de reações cruzadas, estando os resultados satisfatórios (não houve resultados reagentes cruzados) deu-se início a investigação sorológica utilizando o kit conforme instruções do fabricante.

Análise Espacial

A análise espacial foi realizada nas amostras ZIKV soro positivas. As coordenadas das amostras humanas foram obtidas por meio de acesso ao endereço da amostra via dados secundários. Foi utilizado como sistema de projeção a Universal Transversa de Mercator e como datum planimétrico o sistema SIRGAS2000. Após a geocodificação, a camada de pontos foi exportada para processamento no software ArcGIS 10.1 – ESRI. Gerando mapas com a distribuição dos ZIKV soro positivos no período 2014-2016 e sazonalidade. A estatística empregada foi o método de Kernel.

Investigação Molecular

As amostras reagentes sorológicas para ZIKV foram testadas a nível molecular para detecção de ácido ribonucleico (RNA) viral. Foi utilizado para a extração o kit Purelink Viral RNA/DNA Mini kit (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Para a RT-qPCR foi utilizado o GoTaq Probe 1-Step RT-PCR system (Promega) com a quantidade de reação a 10µL (*Master Mix* 2x – 4µL; *CXR* - 1µL; Água ultra pura – 1,3µL; *Primer Forward* – 0,5µL; *Primer Reverse* – 0,5µL; *Probe* – 0,5µL; *Goscript* – 0,2µL; RNA amostral - 2µL) no perfil de ciclagem de 50°C – 10 minutos, 95°C – 15 minutos, 40 ciclos de 95°C a 15 segundos seguidos de 60°C – 1 minuto no termociclador QuantStudio® 5 Real-Time PCR system da Thermo Fisher Scientific. Os marcadores para ZIKV foram os de Lanciotti et al. (2008) (*Forward* 5' – CCGCTGCCCAACACAAG – 3'; *Reverse* 5' – CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT – 3'; *Probe* FAM 5' AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA – 3') e Faye et al. (2013)

(*Forward* 5' - AARTACACATACCARAACAAAGTGGT - 3'; *Reverse* 5' - TCCRCTCCCYCTYTGGTCTTG - 3'; *Probe* FAM 5' - CTYAGACCAGCTGAAR - 3'). Como controle endógeno experimental foi utilizado a RNaseP CDC (2009) (*Forward* 5' - AGATTTGGACCTGCGAGCG - 3'; *Reverse* 5' - GAGCGGCTGTCTCCACAAGT - 3'; *Probe* FAM 5' - TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG - 3') que amplifica a presença de RNA referente ao gene RNaseP humano e indica material genético de qualidade, significando funcionalidade do kit de extração de RNA utilizado.

Investigação Filogenética

Foi recuperado utilizando o *ViPR – Genome Search e Gene/Protein Search* genomas de variantes nacionais (Brasil) da espécie *Zika vírus*. Esses genomas foram armazenados e manipulados com o *ViPR – My Workbench*. O alinhamento foi realizado com o *ViPR - MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation)* (Pickett et al., 2011), com o parâmetro *Uclust* (Edgar, 2010). Para a análise filogenética foi utilizado o *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets* (Kumar et al., 2016) com o algoritmo de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) e Máxima Verossimilhança Composta (Tamura et al., 2004). Foi utilizado como genoma externo o vírus YFV (MF405338).

Resultados e Discussão

O total amostral foi de 342, 757 e 901 referentes aos anos de 2014, 2015 e 2016 respectivamente. Dessas 2000 amostras testadas, 8 (2,3%) das 342 amostras do ano de 2014 tiveram o resultado reagente para anticorpos específicos contra ZIKV, o que evidencia a presença do ZIKV já no ano de 2014 nas cidades de Bauru, Pederneiras, Lins, Promissão e Lençóis Paulista, discordando da informação de emergência no Brasil em 2015 (WHO, 2016; Metsky et al., 2017). As amostras que evidenciam de forma indireta (sorológica) a circulação do ZIKV em 2014 foram coletadas no inverno (21 de Junho – 22 de Setembro) (USP, 2018), corroborando com as análises filogenéticas de Faria et al. (2016) que demonstraram a possibilidade da chegada do ZIKV no Brasil a aproximadamente 12 meses antes do primeiro caso registrado em Maio de 2015. Das 757 amostras de 2015, 28 (3,6%) foram positivas das cidades de Agudos, Balbinos, Bariri, Bauru, Boraceia, Brotas, Jaú, Lins, Lucianópolis, Pederneiras, Piratininga, Promissão, Reginópolis e Torrinha. Enquanto das 901 do ano de 2016,

123 (13,6%) positivaram dos municípios de Agudos, Barra Bonita, Bauru, Boraceia, Brotas, Cafelândia, Dois Córregos, Getulina, Guaiçara, Iacanga, Igarapu do Tietê, Itapuí, Jaú, Lençóis Paulista, Lins, Macatuba, Mineiros do Tietê, Pederneiras, Pirajuí, Piratininga, Promissão e Reginópolis. Do total de 2000 amostras, 159 (7,9%) positivaram (Figura 1, Figura 2), destas: 40 apresentaram resultado reagente para IgG que significa status sorológico de infecção passada; 106 reagentes para IgM e 13 reagentes para ambas imunoglobulinas indicando infecção recente e/ou presente (Tabela 1) (Storch e Wang, 2013).

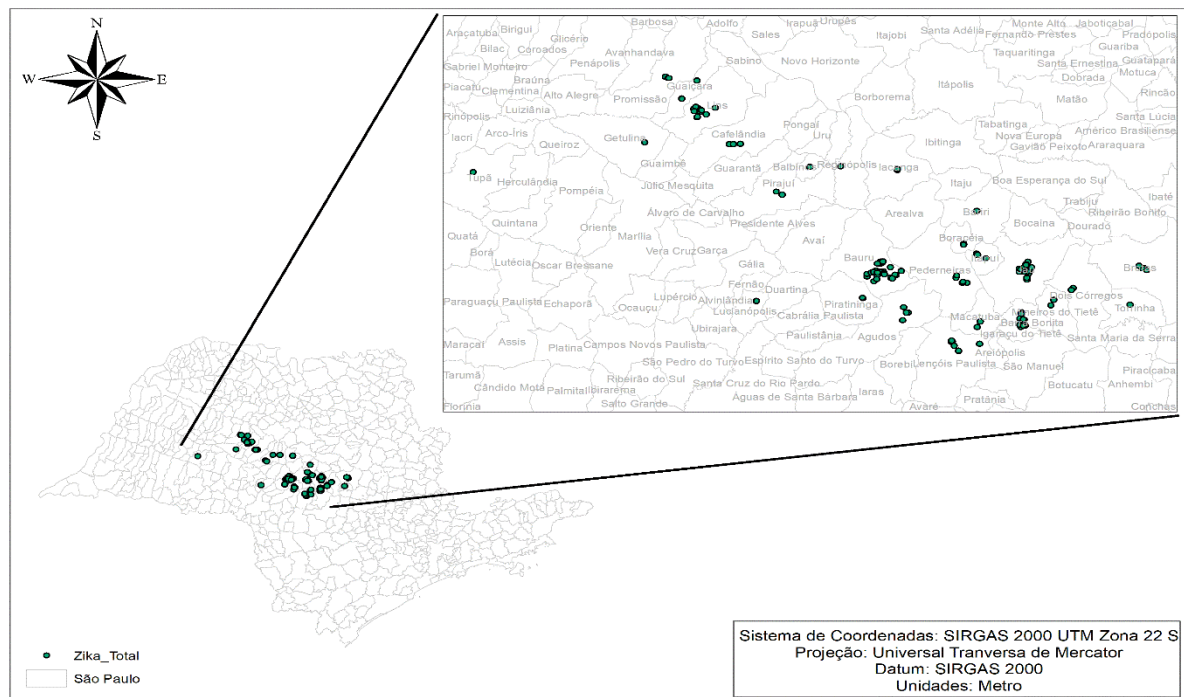


Fig. 1. Distribuição de *Zika virus* soro positivos de 2014-2016 na região de Bauru, São Paulo, Brasil.

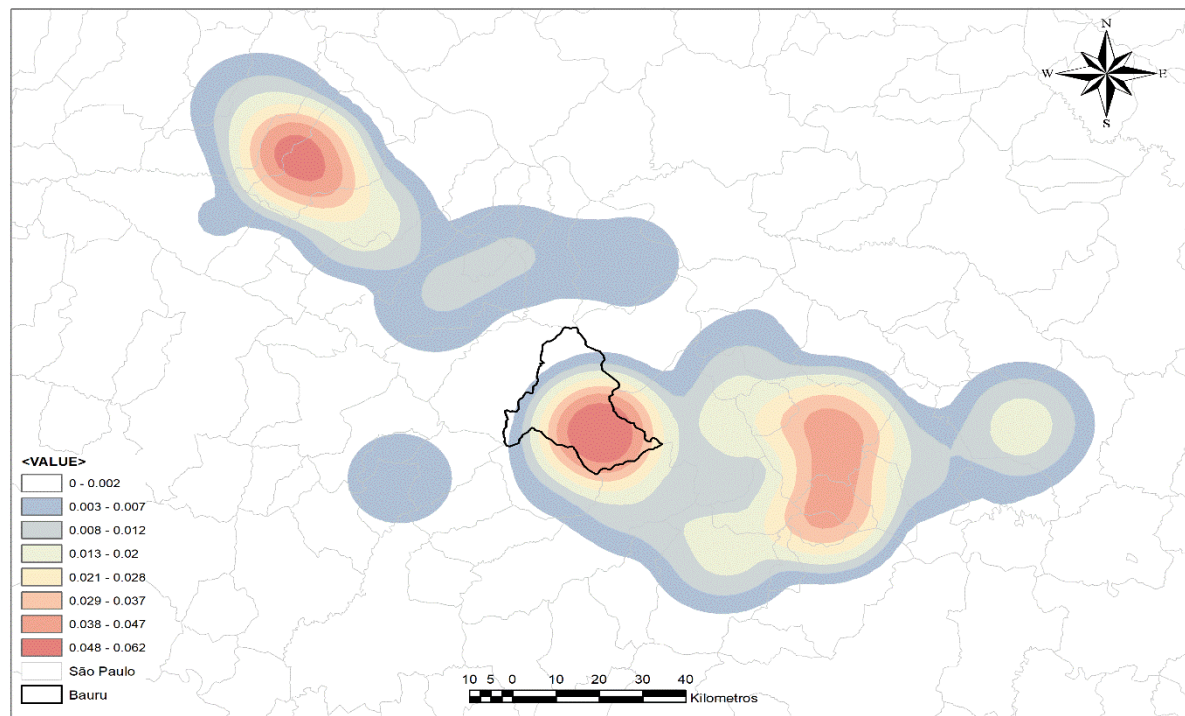


Fig. 2. Distribuição de *Zika virus* soro positivos de 2014-2016 (Metodologia de Kernel) na região de Bauru, São Paulo, Brasil, com hotspots em Bauru, Lins e Jaú.

Tabela 1. Caracterização de Sexo, Idade e Sazonalidade de amostras humanas positivas na sorologia para *Zika virus*.

	IgG		IgM		IgG/IgM		Total	P- Value
	nº	%	nº	%	nº	%		
Sexo								
M	15	20,5	52	71,2	6	8,2	73	0,99
F	25	29,0	54	62,8	7	8,2	86	
Idade								
0-12	5	22,7	16	72,7	1	4,5	22	1,00
13-18	3	13,0	16	69,6	4	17,4	23	
19-35	13	21,3	43	70,5	5	8,2	61	
36-60	14	31,8	27	61,4	3	6,8	44	
61>	5	55,6	4	44,4	0	0	9	
Sazonalidade								
Outono	9	36,0	16	64,0	0	0	25	1,00
Inverno	6	33,3	10	55,6	2	11,1	18	
Primavera	3	18,8	12	75,0	1	6,3	16	
Verão	22	22,0	68	68,0	10	10,0	100	

IgM – Imunoglobulina M, IgG – Imunoglobulina G, M – Masculino, F – feminino.

Os dados foram analisados por estatística descritiva e comparados por meio do teste em amostras não paramétricas Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi definido para um erro alfa de 5%.

Foi prevalente o grupo de idade de 19-35 não sendo estatisticamente significativo ($p=1,00$). Sobre a sazonalidade ($p=1,00$) prevaleceu o período de Verão (~ Dezembro - Março) (USP, 2018). Essa é a estação de maior reprodução do mosquito *A. aegypti*, por causa da temperatura e chuva aumentando seus criadouros (Nasir et al., 2017). Por meio desses resultados progressivos dos aumentos de casos de infecção ao longo dos anos de 2014 a 2016 é evidenciado a circulação efetiva do ZIKV na região estudada. Também é possível estabelecer um padrão inicial de transmissibilidade vetorial similar aos demais flavivírus transmitidos por mosquito, onde a principal medida de controle é impedir a manutenção dos criadouros do vetor *A. aegypti*. O fato de apenas 7,9% de 2000 amostras de pacientes sintomáticos (*Dengue-like*) positivarem na sorologia para ZIKV sugere que os outros 92,1% estejam infectados por agentes etiológicos desconhecidos ou se conhecidos negligenciados. Considerando a inespecificidade de sintomas das arboviroses (Musso et al., 2018) e dos vírus serem os organismos mais abundantes do planeta (AAM, 2014) as chances de termos mais agentes etiológicos virais circulantes na região de estudo é alta. Essa possibilidade evidencia a necessidade de maiores estudos na área.

As 159 amostras reagentes sorológicas para ZIKV foram testadas a nível molecular para a detecção de ácido ribonucleico (RNA) viral. Os marcadores para ZIKV foram os de Lanciotti et al. (2008) e Faye et al. (2013) desenvolvidos para amplificar regiões específicas da NS5, a região genômica mais conservada dos flavivírus (Klema et al., 2016). O conjunto de marcadores Lanciotti et al. (2008) apresentou eficácia na amplificação de RNA viral do controle positivo ($Ct = <38$). O conjunto Faye et al. (2013) não demonstrou a mesma eficácia. Apresentando problemas de padronização durante os experimentos, provavelmente por que o conjunto de marcadores são mais próximos da linhagem africana do ZIKV, por esse motivo foi escolhido, todavia como uma das limitações desse estudo o controle positivo que utilizamos é da linhagem asiática do ZIKV.

Não foi evidenciado RNA detectável do ZIKV nas amostras positivas a nível sorológico, mesmo nas que indicavam infecção recente e/ou presente (IgM reagentes). Essa dificuldade no isolamento de RNA do ZIKV corrobora com a dificuldade de diagnóstico laboratorial apresentada por Mansuy et al. (2017) que apresentam a presença de RNA detectável em sangue total de infectados até 100 dias, o que não acontece com amostras de soro. Essa característica

também foi observada em experimentos de Reação em Cadeia da Polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) realizados por Lustig et al. (2016) com a adição de que a carga viral cai rapidamente após o surgimento de imunoglobulinas. Nesse trabalho existe a limitação de que apenas amostras sorológicas foram coletadas a partir do segundo dia do surgimento de sinais clínicos, esse período é protocolizado para o diagnóstico laboratorial de DENV, sendo a detecção de NS1 até 3 dias pós início dos sintomas e IgM a partir de 6 dias do aparecimento dos sintomas. Como as amostras da presente investigação possuem esse perfil e considerando o relato de rápida queda da carga viral sorológica é compreensível a não detecção de RNA de ZIKV. Fora do táxon de espécie *Zika virus* essa característica também foi observada em infecções por WNV (Lanteri et al., 2014). Essa característica sugestiva de aderência em eritrócitos corrobora com sua capacidade adaptativa transmissiva por transfusão sanguínea e transplante de órgãos. Também deve ser considerado que essa característica pode estar associada a estratégia de evasão viral o que consequentemente aumentaria sua disseminação para outros tecidos pós viremia. Podemos concluir que o ZIKV é desafiador no estudo molecular, levantando questões se os outros flavivírus possuem o mesmo potencial.

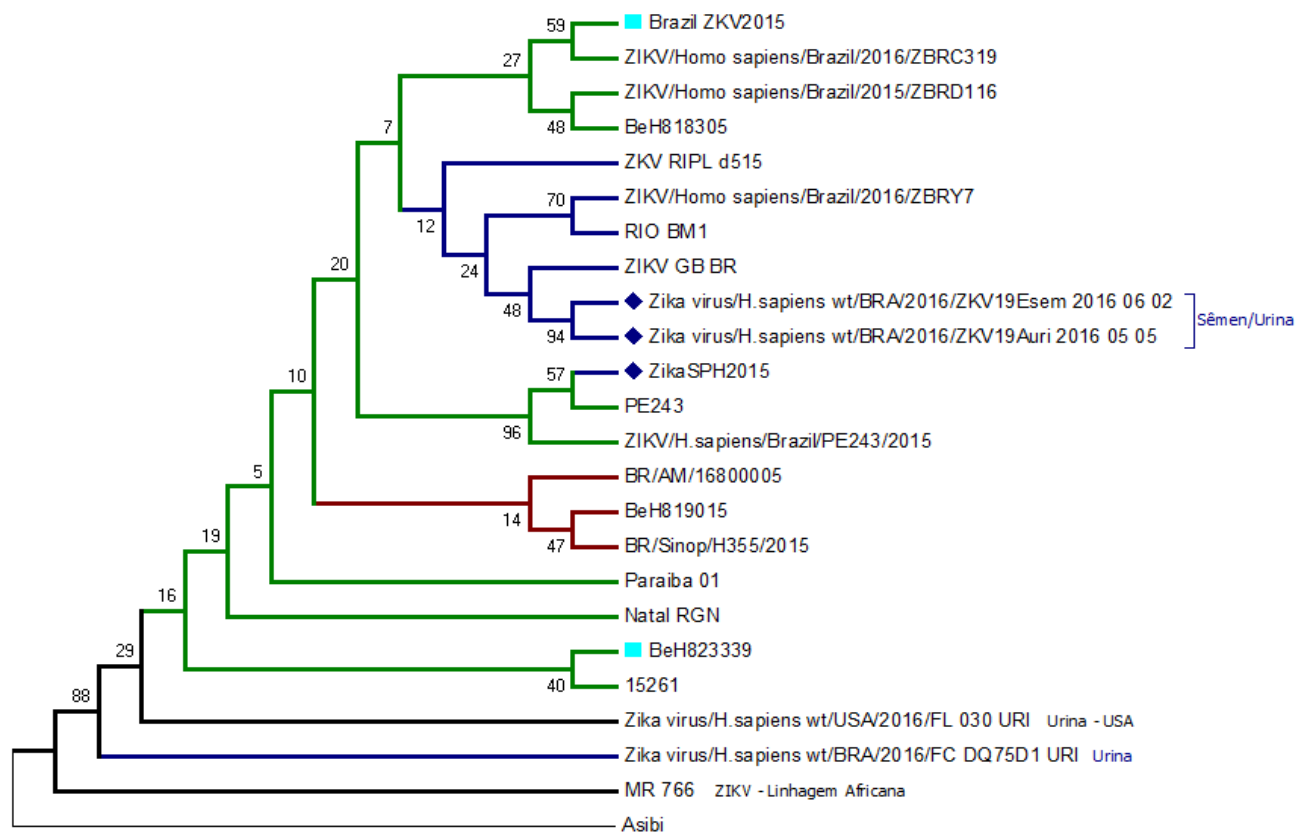


Fig. 3. Árvore filogenética das cepas nacionais (Brasil) da espécie *Zika virus* (ZIKV) utilizando sequências genômicas. Azul – Região Sudeste, Bordô – Região Norte, Verde – Região Nordeste. Losango – Cepa de ZIKV do estado de São Paulo, Quadrado azul claro – Cepa de ZIKV do Brasil associada a microcefalia, Asibi – *Outgroup* Controle externo *Yellow fever virus*, MR 766 – Controle interno de ZIKV linhagem africana, USA – Cepa ZIKV dos Estados Unidos para inferência de adaptação de transmissão.

A análise filogenética de cepas ZIKV a nível nacional (Fig. 3) evidência que as variantes circulantes no país são da linhagem asiática corroborando com os achados de Faria et al. (2016). As cepas nacionais estão distribuídas em linhagens da Região Sudeste, Norte e Nordeste, sendo a última a mais prevalente, o que sugere uma melhor adaptação do vírus na região.

Durante o experimento filogenético notamos um possível agrupamento de cepas isoladas do sexo masculino a partir de urina e sêmen da Região Sudeste. Considerando que poderia ser o caso de uma adaptação para transmissão sexual acrescentamos uma cepa de ZIKV dos Estados Unidos remetendo aos trabalhos de Chouin-Carneiro et al. (2016) e Beaver et al. (2018) que sugerem um fator adaptativo de manutenção via transmissão não vetorial. As cepas ZKV19Auri e ZKV19Esem permaneceram próximas compartilhando o mesmo ancestral. A cepa FC-DQ75D1 compartilha o ancestral com uma cepa que se divergiu na variante dos Estados Unidos isolada de urina. Esse teste realizado sugere que a variante norte americana pode ter surgido a partir da cepa brasileira e corrobora com o potencial adaptativo do ZIKV.

Portanto considerando todas as possibilidades levantadas nessas análises filogenéticas, podemos concluir que o *Zika virus* possui um alto potencial de adaptação/ evolução, o que por sua vez poderia gerar características patogênicas imprevisíveis a saúde pública.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Financiamento

Financiamento - Edital Chamada MCTI/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit/Nº 14/2016 – Prevenção e Combate ao vírus Zika do programa CAPES Plano Nacional de

Enfrentamento ao *Aedes Aegypti* e à Microcefalia. Processo CNPq nº: 440476/2016-0, CAPES nº2068/2016, Processo n. 88881.130820/2016-01.

Referências

American Academy of Microbiology (AAM). Viruses Throughout Life & Time: Friends, Foes, Change Agents, July 2014 [Internet]. 2014. [cited 2018 nov 15]. Available from: <https://www.asm.org/index.php/colloquium-reports/item/4526-viruses-throughout-life-time-friends-foes-change-agents>

Barzon L, Trevisan M, Sinigaglia A, Lavezzo E, Palù G. Zika virus: from pathogenesis to disease control. *FEMS Microbiology Letters*. 2016; 363: fnw202.

Beaver JT, Lelutiu N, Habib R, et al. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Front Immunol*. 2018; 9: 1640.

Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016; 375: 2321–2334.

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20: 1085–6.

Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(3): e0004543.

Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, Smith JC, Woldai S, Hennessey M, et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus--Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016; 65(14): 372-4.

Delaney, A, Mai C, Smoots, A, Cragan, J, Ellington, S, Langlois, P, Breidenbach, R, et al. Population-Based surveillance of birth defects potentially related to Zika virus infection — 15 States and U.S. Territories, 2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2018; 67: 91–96.

Di Luca Marco, Severini F, Toma L, Boccolini D, Romi R, Remoli ME, et al. Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Euro Surveill*. 2016; 21(18): pii=30223.

Dick GW, Haddow AJ. Uganda S virus; a hitherto unrecorded virus isolated from mosquitoes in Uganda. I. Isolation and pathogenicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952; 46: 600–18.

Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952; 46: 509–20.

dos Santos, T, Rodriguez, A, Almiron, M, Sanhueza, A, Ramon, P, de Oliveira, W, et al. Zika virus and the Guillain–Barré Syndrome — case series from seven countries. *N Engl J Med*. 2016; 375: 1598–1601.

Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009; 360: 2536–43.

Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet*. 2016; 387(10023): 1051.

Faria NR, Kraemer, M., Souza, R., Cunha, M., Hill, S., Theze, J., et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*. 2016; 352(6283): 345–349.

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

Fundação Baiana de Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico, Fornecimento e Distribuição de Medicamentos – BAHIAFARMA. Teste Rápido Zika IgG / IgM Combo Bahiafarma. Bahia. 2016.

Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas – Universidade de São Paulo. Início das Estações do Ano (2005-2020) [Internet]. 2018. [cited 2018 nov 15]. Available from: <http://www.iag.usp.br/astrologia/inicio-das-estacoes-do-ano>

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet]. Birmingham. 2018 [cited 2018 ago 8]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

Klema J, Ye V, Hindupur M, Mengyi Ye, Aditya H, Tadahisa T, Keerthi G, Radhakrishnan P, et al. (2016). Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. *PLOS Pathogens*. 2016; 12: e1005451.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008; 12:1232-9.

Lanteri MC, Lee TH, Wen L, Kaidarova Z, Bravo MD, Kiely NE, et al. West Nile virus nucleic acid persistence in whole blood months after clearance in plasma: implication for transfusion and transplantation safety. *Transfusion*. 2014; 54(12): 3232-41.

Lustig Y, Mendelson E, Paran N, Melamed S, Schwartz E. Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after symptom onset, Israel, December 2015 to April 2016. *Euro Surveill*. 2016; 21(26).

Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1954; 48: 139–45.

Mansuy JM, Suberbielle E, Chapuy-Regaud S, Mengelle C, Bujan L, Marchou B, et al. Zika Virus infection and prolonged viremia in whole-blood specimens. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23: 863–865.

Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1969; 18(3): 411-415.

Martines RB, Bhatnagar J, de Oliveira Ramos AM, Davi HP, Iglesias SD, Kanamura CT, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet*. 2016; 388: 898–904.

Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, West K, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*. 2017; 546(7658): 411-415.

Musso D, Bossin H, Mallet HP, Besnard M, Broult J, Baudouin L, et al. Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18:172–182.

Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014 . *Euro Surveill*. 2014; 19(14): pii=20761.

Nasir S, Jabeen F, Abbas S, Nasir I, Debboun M. Effect of Climatic Conditions and Water Bodies on Population Dynamics of the Dengue Vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Arthropod Borne Dis*. 2017; 11(1): 50-59.

Parra B, Lizarazo J, Jiménez-Arango JA, Zea-Vera AF, González-Manrique G, Vargas J, et al. Guillain–Barré syndrome associated with Zika virus infection in Colombia. *N Engl J Med*. 2016; 375: 1513–1523.

Pierson TC, Diamond MS. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature*. 2018; 560: 573–581.

Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016; 65: 59–62.

Storch GA, Wang D. Diagnostic Virology. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2013. p. 414-451.

Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell*. 2016; 18: 587–590.

Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol*. 2016 Mar;161(3):665-8.

Van der Eijk AA, van Genderen PJ, Verdijk RM, Reusken CB, Mögling R, van Kampen JJ, et al. Miscarriage Associated with Zika Virus Infection. *N Engl J Med*. 2016; 375(10): 1002-4.

World Health Organization (WHO) [Internet]. 2016. [cited 2016 jun 10]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>

World Health Organization (WHO). CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1). Emergencies preparedness, response. 2009.

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

“Ao observar a natureza, é de maior importância ter sempre em mente, e nunca esquecer, que cada ser orgânico está sempre lutando com toda força pelo seu aumento; que cada um vive dessa luta em algum período da sua vida; que a destruição severa cai de maneira inevitável tanto sobre os jovens quanto sobre os idosos durante cada geração em intervalos recorrentes. Clareie qualquer checagem, mitigue a destruição, nem que seja apenas um pouco, e o número de espécies aumentará quase instantaneamente.”

- A origem das espécies, Charles Darwin, 1859

5. Conclusão

O *Zika virus* está presente na região de Bauru do estado de São Paulo, Brasil desde o ano de 2014. Porém seu percentual de soro positividade das amostras analisadas não chegou a 10%. Significando talvez uma adaptação fraca em nossa região que possui outros arbovírus circulantes. Considerando a clínica inespecífica de arbovírus (*Dengue-like*) das amostras analisadas e o status negativo para DENV e ZIKV, questionamos a possibilidade de a presença de outros agentes etiológicos desconhecidos e/ou negligenciados estarem circulantes na região de estudo.

Não foi possível isolar o RNA do ZIKV. Esse resultado negativo quanto a molecular a partir de soro reforça a possibilidade de aderência do ZIKV em eritrócitos. Caso essa teoria seja válida o soro não seria a amostra adequada para o diagnóstico molecular. Ainda dentro da possibilidade de aderência em hemácias essa estratégia favoreceria evasão viral e facilidade em alcançar diferentes tecidos, o que por sua vez considerando o potencial de mutação de vírus constituídos de RNA, abriria novas possibilidades adaptativas de transmissão e patogênese. Também deve ser considerado algum erro no desenho experimental molecular, podendo causar falsos negativos. Quanto a filogenética inferimos que nos dias de hoje o ZIKV apresenta uma possível adaptação na Região Nordeste do Brasil.

Considerando todas as possibilidades levantadas com as evidências nessas análises, podemos concluir que o ZIKV possui um alto potencial de adaptação/evolução, o que por sua vez poderia gerar características patogênicas desafiadores. Em um sistema de saúde que não é do tipo prevencionista essa possibilidade se tornaria um risco à saúde pública.