

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Programa de Doutorado em Ciências – Cooperação entre Instituto Oswaldo Cruz e Instituto

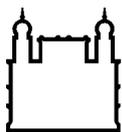
Leônidas e Maria Deane

EVOLUÇÃO *IN VITRO* DO VÍRUS ZIKA E SEU IMPACTO SOBRE A APTIDÃO VIRAL EM DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS – *IN VITRO* E *IN VIVO*

Valdinete Alves do Nascimento

Manaus - AM

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Programa de Doutorado em Ciências – Cooperação entre o Instituto Oswaldo Cruz e Instituto
o Leônidas e Maria Deane

Valdinete Alves do Nascimento

**Evolução *in vitro* do vírus Zika e seu impacto sobre a aptidão viral em diferentes modelos
biológicos – *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biologia Celular e
Molecular

Orientador: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca

Manaus - AM

2021

Alves do Nascimento, Valdinete.

Evolução *in vitro* do vírus Zika e seu impacto sobre a aptidão viral em diferentes modelos biológicos - *in vitro* e *in vivo* / Valdinete Alves do Nascimento. - Rio de Janeiro, 2021.

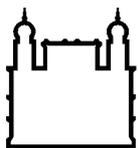
122 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Felipe Gomes Naveca.

Bibliografia: f. 89-107

1. Vírus Zika. 2. Evolução. 3. Aptidão viral. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Programa de Doutorado em Ciências – Cooperação entre Instituto Oswaldo Cruz e Instituto
Leônidas e Maria Deane

VALDINETE ALVES DO NASCIMENTO

EVOLUÇÃO *IN VITRO* DO VÍRUS ZIKA E SEU IMPACTO SOBRE A APTIDÃO VIRAL EM DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS - *IN VITRO* E *IN VIVO*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca

Aprovada em: 29/11/2021

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Ana Maria Bispo de Filippis – IOC/FIOCRUZ – Presidente da banca

Prof. Dr. Gonzalo Jose Bello Bentancor – IOC/FIOCRUZ - Revisor da tese

Prof. Dr. Roberto Dias Lins Neto - IAM/FIOCRUZ

Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes - INPA

Prof. Dr. Deusilene Souza Vieira Dallacqua – FIOCRUZ-RO

Manaus, 29 de novembro de 2021

Dedico esta conquista, com muito amor, aos meus pais Ivanete e Aldi que sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos e são minha maior fonte de inspiração na vida.

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho encerro mais um ciclo da minha vida. Foi um período de muita luta, diversas experiências, imenso aprendizado, muitas alegrias, lágrimas derramadas e acima de tudo um momento de crescimento pessoal e profissional. Posso dizer que foi também uma das fases mais desafiadoras da minha vida, que começou durante a emergência do vírus Zika e foi finalizada em meio a trágica pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-2 que geraram diversos desafios para a pesquisa e os sistemas de saúde, além de serem causas de muita dor.

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido saúde e forças para finalizar este trabalho. Minha fé em muitos momentos foi o que me segurou e me permitiu seguir em frente. Grata a Ele por todo o amor que tem por mim.

Agradeço a minha família. Minha mãe Ivanete e meu pai Aldi que decidiram sair do interior do Amazonas e vieram morar em Manaus ao saber que esperavam um bebê, na esperança de que este bebê, no caso eu, pudesse ter mais oportunidades na vida e sempre batalharam duro para criar eu e meu irmão e para que nós tivéssemos uma boa formação. Que sempre me apoiaram, incentivaram e deram todo o amor necessário. Ao meu esposo, Tiago, por todo o cuidado, amor, incentivo, torcida sincera, compreensão e apoio oferecido em todos os momentos. Ao meu irmão Valdenir, pelo amor, torcida e apoio incondicional. Ao meu sobrinho/filho Marcos, pelo carinho, amor e abraços essenciais que deixavam os momentos difíceis mais leves. E aos meus lindos avós Walter a Maria por todo o amor e torcida. Vocês são minha base. Sem vocês esse caminho teria sido muito mais árduo e certamente eu não teria chegado até aqui. Amo todos vocês.

Ao meu orientador e amigo, Dr. Felipe Naveca, que me recebeu em seu laboratório no ano de 2009 como aluna de iniciação científica e desde então iniciou-se uma grande parceria para a vida. Sou grata por ter encontrado uma pessoa incrível e um profissional tão exemplar. Agradeço por todos os ensinamentos e por sempre acreditar no meu potencial. Por me incentivar a ser a cada dia melhor e por todos os desafios a mim oferecidos que foram essenciais para o meu crescimento. Seu apoio e incentivos foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Guardo uma admiração e carinho enormes por você.

À equipe do laboratório de virologia. Débora e Karina que atuaram na realização das passagens do vírus em cultura de células e realizaram muitas extrações com Trizol juntamente com a Maju. Ao Victor pela contribuição com o sequenciamento. Matilde e Fernanda por toda a ajuda fundamental com as demais atividades do laboratório. Sou grata pelo carinho e dedicação de todos. Não posso deixar de falar da parceria durante os momentos mais complicados que passamos no decorrer da pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-2. Além dos

membros da equipe acima citados, incluo aqui o nosso orientador, Felipe Naveca, André, Luciana, Michgele, Marineide, Agatha e George. Cada um se doou ao máximo. Foram noites e noites viradas no laboratório, trabalho intenso, muitas lágrimas derramadas e muita experiência adquirida. Vivemos momentos muito difíceis, tivemos perdas irreparáveis, mas seguimos lutando, e com isso pudemos ajudar a sociedade e apoiar uma ao outro em um momento tão complicado. Deixo aqui meu agradecimento e homenagem (*In memoriam* Felipe Ribeiro Naveca, Priscila Medeiros, Vera Lúcia e Klinger Araújo).

À equipe do laboratório de entomologia. Dra. Claudia Rios, Keillen Monick e Jordam William, sem os quais eu não teria conseguido realizar a parte *in vivo* deste trabalho. A dedicação de vocês e empenho em me ajudar foi incrível. Sou muito grata por todos os esforços e pelo apoio fundamental.

À Michele e Rejane, que sempre atenderam as minhas solicitações de material e todos os pedidos que eu fazia no laboratório. Até data de lavagem e manutenção das salas foi modificada por conta dos meus experimentos. O carinho e disposição de vocês em me ajudar fez toda a diferença.

Ao Yury pelo apoio na realização dos experimentos de citometria.

Aos colegas da turma de doutorado: André, Victor, Túlio, Marla, Paula, Edilene, Yury, Antônio, Josy e Thayana pelos momentos compartilhados principalmente durante a realização das disciplinas. Em especial ao Victor e André que também são do grupo da virologia e compartilhamos diversos momentos no laboratório principalmente durante a pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-2. Marla, Túlio, Edilene e Emanuelle com os quais, muitas vezes durante os encontros nos corredores da instituição ou por mensagens trocávamos experiências, medos, angústias e um tentava ajudar o outro com palavras de apoio. Essa convivência ajudou bastante.

A todos os professores pelo conhecimento repassado durante as disciplinas.

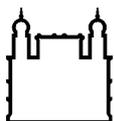
Ao CNPq, processo 440856/2016-7, pelo financiamento da pesquisa e ao Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCURZ/AM pela bolsa concedida.

Às minhas amigas, Fran, Priscila, Érica, Sanmya e Gi, pela torcida sincera, apoio, incentivo, preocupação e por sempre acreditarem no meu potencial. Agradeço ainda pelas orações e por muitas vezes terem me feito sorrir quando eu me via em momentos de tribulação. Estou acabando amigas! Obrigada por tudo.

A todos que sempre torceram por mim e que direta ou indiretamente colaboraram para essa conquista.

“Os dias correm, somem e com o tempo não vão voltar. Só há uma chance para viver. Não perca a força e o sonho, não deixe nunca de acreditar que tudo vai acontecer”

Rosa de Saron



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVOLUÇÃO *IN VITRO* DO VÍRUS ZIKA E SEU IMPACTO SOBRE A APTIDÃO VIRAL EM DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS - *in vitro* e *in vivo*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Valdinete Alves do Nascimento

As infecções ocasionadas por arbovírus representam sérios problemas de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais do planeta. No Brasil, além da circulação dos diferentes sorotipos do vírus dengue, no ano de 2015 houve a emergência do vírus (ZIKV), que representou um grande desafio para a saúde pública do país. Este vírus pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, sendo, portanto, um vírus de genoma RNA fita simples e de polaridade positiva. É de conhecimento científico que os vírus de genoma RNA possuem altas taxas de variação em suas sequências, relacionadas à falta de atividade de correção da RNA polimerase e a alta taxa de replicação viral. Estas variações podem resultar no acúmulo de mutações que culminem na seleção de uma variante atenuada ou potencialmente mais virulenta. Estudos realizados com a linhagem Asiática demonstraram que durante os últimos 50 anos o ZIKV vem acumulando importantes mutações em seu genoma, além de possíveis eventos de recombinação no envelope e NS5. Foi verificado ainda que amostras isoladas no Brasil possuem em média 18 mutações quando comparadas com amostras isoladas de epidemias em outros países. Considerando a necessidade de uma maior compreensão dos mecanismos relacionados ao processo evolutivo do ZIKV e o fato de sua replicação ser propensa a erros, podendo introduzir continuamente no ambiente novas variantes virais, este trabalho teve como objetivo avaliar a evolução *in vitro* do vírus Zika e seu impacto sobre a aptidão viral em diferentes modelos biológicos. Foram realizadas duas séries de 40 passagens subsequentes do ZIKV em células oriundas de *Aedes albopictus* (C6/36) e *Aedes aegypti* (Aag-2). Ao término do processo de evolução em cada linhagem celular foi obtido o genoma viral da passagem inicial e das passagens múltiplas de cinco até a passagem 40, utilizando a abordagem de sequenciamento de alto rendimento com a tecnologia Illumina. Realizou-se também ensaios para verificar o impacto do processo de evolução sobre a aptidão viral em modelos *in vitro*, com as células C6/36 e Aag-2, bem como *in vivo* com os mosquitos *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*. No vírus evoluído em C6/36 foram detectadas duas mutações sinônimas na sequência consenso de P40_C6/36, sendo uma na NS1 (T > C) e a outra na NS3 (A > G). Além disso detectou-se 13 sítios variáveis, sendo três mutações sinônimas e 10 não sinônimas, por meio da chamada de variantes, nas regiões codificantes para as proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3 e NS5. Já no vírus evoluído em Aag-2 foi detectada uma substituição não sinônima na sequência consenso da região codificante para NS5, quanto as variantes minoritárias, foram detectados apenas dois sítios variáveis. Os experimentos *in vitro* mostraram que o processo de adaptação favoreceu a aptidão viral na linhagem em que o vírus foi evoluído, com maiores cargas virais em diferentes tempos avaliados em experimentos de cinética de infecção. Todavia, os testes *in vivo* não apresentaram resultados claros apontando a necessidade da realização de novos experimentos. Com os dados obtidos neste estudo espera-se contribuir com o aumento do conhecimento relacionado ao processo evolutivo do ZIKV.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IN VITRO EVOLUTION OF THE ZIKA VIRUS AND ITS IMPACT ON VIRAL FITNESS IN DIFFERENT BIOLOGICAL MODELS - *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Abstract

PhD THESIS

Valdinete Alves do Nascimento

Infections by arboviruses represent serious public health problems in tropical and subtropical regions of the planet. In Brazil, in addition to the circulation of different dengue virus serotypes, in 2015 there was the emergence of the virus (ZIKV), which represented a major challenge for public health in the country. This virus belongs to the Flaviviridae family, Flavivirus genus, being, therefore, a single-stranded RNA genome virus with positive polarity. It is scientific knowledge that RNA genome viruses have high rates of variation in their sequences, related to the lack of RNA polymerase correction activity and the high rate of viral replication. These variations can result in the accumulation of mutations that culminate in the selection of an attenuated or potentially more virulent variant. Studies carried out with the Asian strain have shown that during the last 50 years ZIKV has been accumulating important mutations in its genome, in addition to possible recombination events in the envelope and NS5. It was also found that samples isolated in Brazil have an average of 18 mutations when compared with samples isolated from epidemics in other countries. Considering the need for a better understanding of ZIKV evolutionary process-related mechanisms and the fact that its replication is error-prone and may continuously introduce new viral variants into the environment, this study aimed to evaluate the Zika virus *in vitro* evolution and its impact on viral fitness in different biological models. Two series of 40 subsequent passages of ZIKV were performed in cells from *Aedes albopictus* (C6/36) and *Aedes aegypti* (Aag-2). At the end of the evolution process in each cell line, the viral genome was obtained from the initial passage and from multiple passages from five to passage 40, using the high-throughput sequencing approach with Illumina technology. Tests were also carried out to verify the impact of the evolution process on viral fitness *in vitro* models, with C6/36 and Aag-2 cells and *in vivo* with *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes. In the virus evolved in C6/36, two synonymous mutations were detected in the consensus sequence of P40_C6/36, one in NS1 (T > C) and the other in NS3 (A > G). In addition, 13 variable sites were detected, being three synonymous and 10 non-synonymous mutations, through the so-called variants, in the coding regions for the NS1, NS2A, NS2B, NS3, and NS5 proteins. In the virus evolved in Aag-2, a non-synonymous substitution was detected in the consensus sequence of the coding region for NS5, as for the minority variants, only two variable sites were detected. The *in vitro* experiments showed that the adaptation process favored viral fitness in the strain in which the virus was evolved, with higher viral loads at different times evaluated in infection kinetics experiments. However, *in vivo* tests did not show clear results showing the need for further experiments. With obtained data in this study, we expect to contribute to increasing knowledge related to the evolutionary ZIKV process.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Regiões da Ásia e da África com registro de isolamento do vírus Zika tanto de vetores quanto de amostras humanas ou sorologia sugestiva de circulação do ZIKV, antes da primeira grande epidemia de 2007.....	2
Figura 2: Emergência do ZIKV no Pacífico e Américas.....	4
Figura 3: Distribuição dos casos suspeitos e confirmados de Zika por semana epidemiológica e sub-regiões nas Américas, durante o período de 2015-2017.....	5
Figura 4: Criomicroscopia eletrônica com reconstrução de imagens tridimensionais de partículas virais de flavivírus (dengue).....	7
Figura 5: Principais ciclos de transmissão do ZIKV.....	8
Figura 6: Formas de transmissão não vetoriais.....	8
Figura 7: Organização genômica dos flavivírus.....	9
Figura 8: Ciclo de replicação dos flavivírus.....	14
Figura 9: Taxa de evolução viral.....	15
Figura 10: Sistemas utilizados para os estudos de aptidão viral.....	19
Fluxograma 1: Etapas do desenvolvimento do projeto.....	22
Figura 11: Monocamada das linhagens de células utilizadas no trabalho.....	24
Figura 12: Esquema do processo de adaptação do vírus Zika em cultura de células.....	25
Figura 13: Esquema dos iniciadores para amplificação do genoma completo do vírus Zika.....	28
Figura 14: Representação esquemática do experimento de avaliação do fitness in vitro.....	37
Figura 15: Sistema de alimentação artificial.....	39
Figura 16: Representação esquemática do experimento de fitness in vivo no qual os mosquitos foram processados inteiros.....	40
Figura 17: Representação esquemática do experimento de fitness in vivo, no qual os mosquitos foram dissecados.....	41
Figura 15: Eletroforese dos testes de temperaturas para obtenção dos nove amplicons.....	46
Figura 16: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 391.....	55
Figura 17: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 410.....	56
Figura 18: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 446.....	56
Figura 19: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 502.....	57
Figura 20: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 554.....	57
Figura 21: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 587.....	58
Figura 22: Modelo tridimensional da proteína NS5 com mutação no aminoácido 77.....	59
Figura 23: Modelo tridimensional da proteína NS5 com mutação no aminoácido 267.....	59
Figura 24: Modelo tridimensional da proteína NS5 com mutação no aminoácido 767.....	60
Figura 25: Controles negativos do experimento de citometria.....	61

Figura 26: Leitura das células infectas no experimento de citometria de fluxo.....	62
Figura 27: Monocamadas de células C6/36 e Aag-2 dos testes para definição da quantidade ideal para placas de 24 poços.....	64
Figura 28: Médias dos Cts do experimento de cinética viral em células C6/36 infectadas com o vírus adaptado em C6/36.....	65
Figura 29: Expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no fitness em C6/36.....	66
Figura 30: Médias dos Cts do experimento de cinética viral em células Aag-2 infectadas com o vírus adaptado em C6/36.....	67
Figura 31: Expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no fitness em Aag-2.....	67
Figura 32: Comparação da expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no fitness em C6/36 e em Aag-2.....	68
Figura 33: Médias dos Cts do experimento de cinética viral em células Aag-2 infectadas com o vírus adaptado em Aag-2.....	69
Figura 34: Expressão relativa de P2_Aag-2 e P40_Aag-2 no fitness em Aag-2.....	70
Figura 35: Médias dos Cts do experimento de cinética viral em células C6/36 infectadas com o vírus adaptado em Aag-2.....	70
Figura 36: Expressão relativa de P2_Aag-2 e P40_Aag-2 no fitness em C6/36.....	71
Figura 37: Comparação da expressão relativa de P2_Aag-2 e P40_Aag-2 no fitness em Aag-2 e em C6/36.....	72
Figura 38: Fitness em <i>Ae. Albopictus</i> (8 pi) infectados com o vírus adaptado em células C6/36.....	73
Figura 39: Fitness em <i>Ae. Albopictus</i> (14P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36.....	73
Figura 40: Expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no fitness em <i>Ae. albopictus</i>	73
Figura 41: Fitness em <i>Ae. Aegypti</i> (8P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36.....	74
Figura 42: Fitness em <i>Ae. Aegypti</i> (14P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36.....	74
Figura 43: Expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no fitness em <i>Ae. aegypti</i>	75
Figura 44: Fitness em glândula salivar de <i>Ae. Aegypti</i> (8P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36.....	75
Figura 45: Fitness em glândula salivar de <i>Ae. Aegypti</i> (14P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36.....	76
Figura 46: Fitness em intestino de <i>Ae. Aegypti</i> (8P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36.....	76
Figura 47: Fitness em intestino de <i>Ae. Aegypti</i> (14P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36.....	77
Figura 48: Comparação da expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no fitness em glândula salivar e intestino de <i>Ae. aegypti</i>	77
Figura 49: Fitness em <i>Aedes aegypti</i> versus <i>Aedes albopictus</i> infectados com P40_Aag-2....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados na amplificação do genoma completo do vírus Zika para a estratégia de sequenciamento capilar.....	29
Tabela 2: Iniciadores utilizados na amplificação do genoma completo do vírus Zika a partir do sobrenadante de células Aag-2 para sequenciamento de alto rendimento.....	30
Tabela 3: Iniciadores utilizados para a amplificação do genoma completo do vírus Zika a partir do sobrenadante de células C6/36 para sequenciamento de alta demanda.....	30
Tabela 4: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento capilar.....	32
Tabela 5: Conjuntos de iniciadores e sondas utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.....	42
Tabela 6: Amostras positivas para ZIKV isoladas em células C6/36.....	44
Tabela 7: Resultados da reação de RT-PCR em tempo real do acompanhamento dos inóculos a cada cinco passagens.....	45
Tabela 8: Métricas obtidas no sequenciamento das passagens do vírus em células C6/36.....	47
Tabela 9: Sítios variáveis detectados no genoma do ZIKV adaptado em células C6/36.....	49
Tabela 10: Métricas obtidas no sequenciamento das passagens do vírus em células Aag-2.....	51
Tabela 11: Sítios variáveis detectados no genoma do ZIKV adaptado em células Aag-2.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Zika - Histórico	1
1.2 Contexto epidemiológico	2
1.3 Agente Etiológico.....	6
1.4 Organização genômica	9
1.4.1 Proteínas Estruturais	10
1.4.2 Proteínas não estruturais	11
1.5 Replicação viral.....	13
1.6 Evolução viral	14
1.6.1 Evolução do vírus Zika	17
1.7 Aptidão Viral.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Considerações éticas	23
3.2 Amostra utilizada no estudo.....	23
3.3 Manutenção de culturas celulares	23
3.4 Passagens do vírus em células C6/36 e células Aag-2.....	24
3.5 Extração de ácido ribonucléico (RNA)	25
3.6 Produção de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).....	26
3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	27
3.8 Purificação dos produtos de PCR por Polietilenoglicol (PEG).....	30
3.9 Sequenciamento capilar.....	31
3.10 Sequenciamento de alto rendimento – Plataforma Illumina	33
3.11 Montagem e análise das sequências	33
3.12 Modelagem molecular comparativa de proteínas.....	34
3.13 Titulação viral	35
3.14 Análise da aptidão viral.....	36
3.14.1 Testes <i>in vitro</i>	36
3.14.2 Testes <i>in vivo</i>	38
3.15 RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) para detecção do vírus Zika	42
3.16 Análise dos dados.....	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Adaptação em culturas de células	44
4.2 Sequenciamento nucleotídico.....	45
4.2.1 Sequenciamento do vírus adaptado em células C6/36.....	46
4.2.2 Sequenciamento do vírus adaptado em células Aag-2.....	51
4.3 Modelagem molecular comparativa	54

4.3.1 Modelagem molecular comparativa - Passagens do vírus em células C6/36	54
4.3.1.1 NS3	54
4.3.1.2 NS5	58
4.3.2 Modelagem molecular comparativa - Passagens do vírus em células Aag-2	60
4.4 Avaliação do Fitness viral	61
4.4.1 Experimento de <i>fitness in vitro</i>	63
4.4.1.1 Vírus adaptado em células C6/36	65
4.4.1.2 Vírus adaptado em células Aag-2	68
4.4.2 Experimentos de <i>fitness in vivo</i>	72
4.4.2.1 Vírus adaptado em C6/36	72
4.4.2.2 Vírus adaptado em Aag-2	78
5 DISCUSSÃO	80
6 CONCLUSÕES	88
7 REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Zika - Histórico

O vírus Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez no ano de 1947 na floresta de Zika em Uganda (figura 1), a partir de amostras coletadas de um macaco Rhesus sentinela durante uma pesquisa que tinha como principal foco o vírus da febre amarela (YFV). Em janeiro do ano seguinte, o vírus foi novamente isolado de um pool de mosquitos *Aedes africanus* na mesma localização do primeiro isolamento (1).

Apesar de ter sido isolado inicialmente em 1947, os primeiros relatos de infecção humana datam de 1952 por meio de pesquisas sorológicas realizadas em Uganda, mas nada se sabia até então sobre as manifestações clínicas e nenhum isolamento viral a partir de amostras humanas havia sido descrito (2). O primeiro relato de isolamento do vírus a partir de amostras humanas foi publicado em 1954 sendo três casos de pacientes febris na Nigéria (3), entretanto estudos posteriores mostraram que o vírus descrito neste trabalho de 1954 não era o ZIKV e sim o *Spondweni virus* (4,5), tal relato encontra-se também no catálogo de arbovírus e outros vírus zoonóticos do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC/EUA) (6) (<https://wwwn.cdc.gov/arbocat/VirusDetails.aspx?ID=536>).

Em 1964 foi publicado um dos primeiros artigos demonstrando o isolamento do vírus Zika a partir de amostras humanas. O espécime foi o soro de um trabalhador que evoluiu com febre, dor de cabeça e outros sintomas no período em que desenvolvia atividades com novas cepas do ZIKV isolado de *Aedes africanus*. Além disso, este trabalho relata todo o curso clínico da doença comprovando que o vírus além de infectar o homem, era capaz de ocasionar doença no mesmo (7).

Desde a sua descoberta até o ano de 2007, quando foi registrado o primeiro grande surto ocasionado pelo ZIKV, este vírus permaneceu circulando e sendo isolado de diferentes vetores em regiões da Ásia e da África, sendo responsável por casos esporádicos de infecção em humanos nestas mesmas regiões (figura 1) (8–13).

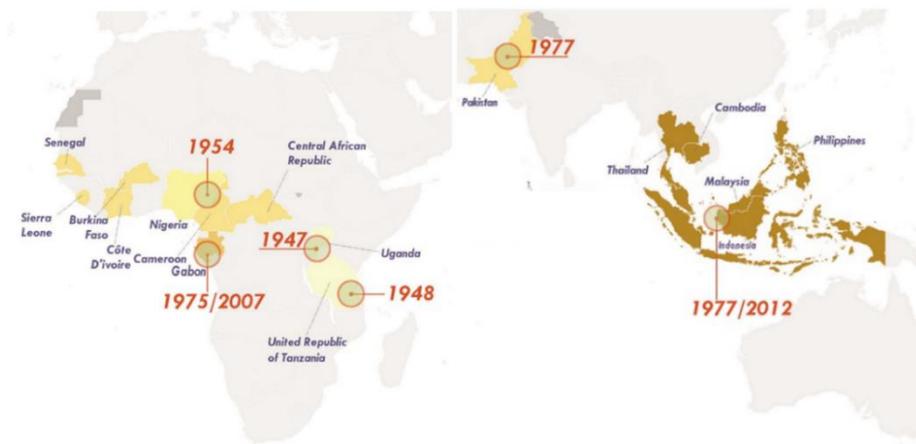


Figura 1: Regiões da Ásia e da África com registro de isolamento do vírus Zika tanto de vetores quanto de amostras humanas ou sorologia sugestiva de circulação do ZIKV, antes da primeira grande epidemia de 2007. Fonte da Imagem: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-history-of-zika-virus>. Acesso em: 07/06/2021.

1.2 Contexto epidemiológico

A primeira vez que o ZIKV foi reportado fora da África e da Ásia foi no ano de 2007 (figura 2), quando médicos da ilha Yap, Micronésia, observaram o surto de uma doença na qual os pacientes apresentavam febre, erupção cutânea, conjuntivite, artrite e artralgia. Três amostras coletadas de pacientes que exibiam estes sintomas apresentaram resultado sorológico positivo, com a detecção de anticorpos da classe IgM para o vírus dengue (DENV), entretanto os profissionais de saúde relataram que essa doença apresentava características clínicas distintas da dengue. Em junho do mesmo ano, amostras de soro de pacientes coletados na fase aguda da doença foram enviadas ao laboratório de referência de arbovírus do CDC/EUA e do total de 71 amostras, dez apresentaram resultado de RT-PCR positivo para o ZIKV (14).

Além disso, foram identificados 185 casos suspeitos, dos quais 49 foram confirmados laboratorialmente. Ademais, os autores realizaram uma pesquisa domiciliar, durante a qual obtiveram 557 amostras de soro dos quais 414 apresentaram resultado IgM positivo. A partir destes dados, os estudiosos concluíram que 73% da população residente na Ilha Yap foi infectada durante o surto por este agente etiológico (14), caracterizando esta como a primeira grande epidemia registrada de infecção pelo vírus Zika.

Em um outro trabalho publicado em 2008, os autores relataram que 157 amostras de moradores de Yap foram coletadas na fase aguda da doença e testadas para o ZIKV, destas, 17 foram positivas pela técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR), e o sequenciamento nucleotídico de algumas amostras, confirmou tratar-se do ZIKV (15).

Cinco anos se passaram até a ocorrência de uma nova epidemia no ano de 2013 na Polinésia Francesa (figura 2) (16), onde, de acordo com dados sorológicos cerca de 49% da população foi acometida (17), embora aproximadamente 11% tenham procurado os serviços de saúde (18). Dados do sequenciamento de amostras coletadas durante este surto revelaram que o vírus que estava circulando na Polinésia Francesa era semelhante ao detectado em Yap (2007) e Camboja (2010), mostrando um espalhamento da linhagem Asiática do ZIKV (16). Um estudo realizado no decorrer da epidemia revelou um incremento de casos de síndrome de Guillain-Barré (GBS). Todos os 42 pacientes diagnosticados com esta síndrome apresentavam anticorpos neutralizantes para ZIKV, mostrando que a infecção prévia por este vírus poderia desencadear quadros graves como GBS (19).

Em 2014, surtos foram registrados em Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa (Chile) com cerca de 1.400, 900 e 50 casos respectivamente (20–23). Posteriormente, o vírus foi se espalhando por outros países do Oceano Pacífico e casos foram relatados em Vanuatu, Ilhas Salomão, Somoa e Fiji (23).

No começo de 2015, pacientes residentes em Camaçari - Bahia / Brasil, apresentaram sintomas de uma doença semelhante a dengue. Foram coletadas amostras de sangue de 24 doentes e 7 tiveram resultados de RT-PCR detectável para ZIKV (24). Ainda no início do mesmo ano, casos febris foram relatados na cidade de Natal - Rio Grande do Norte e em março foram enviadas 21 amostras ao Instituto Carlos Chagas (Fiocruz Paraná), das quais 8 foram positivas para ZIKV (25), o sequenciamento nucleotídico revelou tratar-se da linhagem Asiática do ZIKV.

Em 14 de maio do mesmo ano, o laboratório de referência nacional para arboviroses no Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS) ratificou que as amostras coletadas nos estados do Rio Grande do Norte e Bahia eram positivas para o ZIKV, o que confirmou a circulação do vírus nas Américas, após os casos relatados na Ilha de Páscoa (Chile) (figura 2). (https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11959:timeline-of-emergence-of-zika-virus-in-the-americas&Itemid=41711&lang=en).



Figura 2: Emergência do ZIKV no Pacífico e Américas. A primeira grande epidemia foi registrada em Yap (2007), posteriormente na Polinésia Francesa (2013) e a chegada nas Américas com os primeiros casos sendo registrados no Brasil em 2015. Fonte da imagem: <https://www.who.int/bulletin/volumes/94/9/16-171082/en/>. Acesso em: 07/06/2021.

Após entrar nas Américas, rapidamente o vírus foi se disseminando por diversas regiões. Em dezembro de 2015, nove países já haviam confirmado a circulação autóctone do vírus: Brasil, Chile (Ilha de Páscoa), Colômbia, El Salvador, Guatemala, México, Paraguai, Suriname e Venezuela (26). Em dezembro de 2016 já eram 48 países e territórios das Américas com registro de circulação local do vírus (27) com mais de 177.000 casos autóctones confirmados (28).

No ano de 2017 nenhuma outra região das Américas confirmou casos de transmissão autóctone e a quantidade de casos suspeitos e confirmados caiu drasticamente em todos os países (figura 3), de acordo com dados do último documento de atualização epidemiológica da Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) que foi publicado em 25 de agosto de 2017 (29).

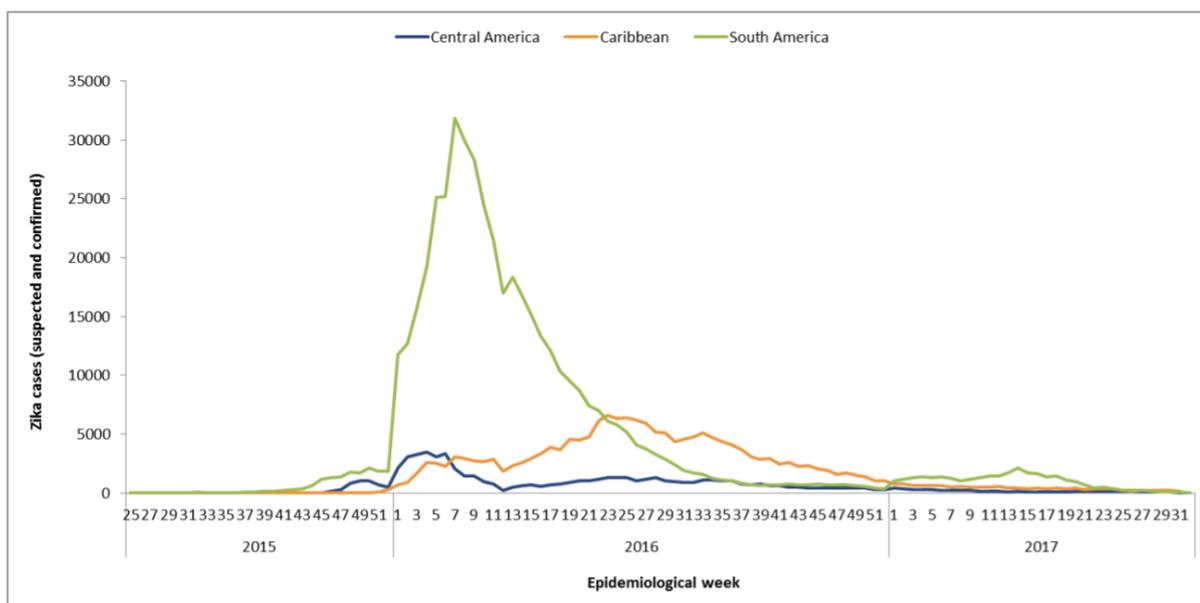


Figura 3: Distribuição dos casos suspeitos e confirmados de Zika por semana epidemiológica e sub-regiões nas Américas, durante o período de 2015-2017. Fonte: <https://www.paho.org/en/documents/25-august-2017-zika-epidemiological-update-0>.

No Brasil, desde a primeira confirmação de transmissão autóctone até a semana epidemiológica 52 de 2015, dezenove estados já haviam confirmado a transmissão local do vírus (30) totalizando 37.011 casos prováveis de doença aguda pelo ZIKV e três óbitos confirmados (31). Em julho do mesmo ano o Brasil reportou a detecção de pacientes com acometimentos neurológicos que tinham histórico de infecção prévia sugestiva de ZIKV (32). De janeiro a julho de 2015 foram registrados 121 casos de manifestações neurológicas e GBS com histórico de doença exantemática prévia, todos oriundos de estados da região Nordeste (33). De acordo com dados da OPAS, neste período, foram identificados 76 pacientes com síndromes neurológicas, dos quais 42 tiveram confirmação de GBS, e 26 tinham histórico de sintomas consistentes de infecção pelo ZIKV (32).

Em outubro do mesmo ano o Ministério da Saúde do Brasil reportou um incremento inesperado de casos de microcefalia no país. Até 17 de novembro, sete estados já haviam notificado aumento significativo nos números de casos de microcefalia, sendo eles: Pernambuco, Sergipe, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Ceará e Bahia. Em resposta a esta situação, no dia 12 de novembro de 2015 o Ministério da Saúde declarou Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (34). Em 1 de fevereiro de 2016 a OMS declarou que a associação entre os casos de ZIKA e a ocorrência de microcefalia e outras desordens neurológicas constituíam Emergência em Saúde Pública de Preocupação Internacional (35).

Nos anos de 2016 e 2017 foram notificados, respectivamente, 215.327 e 17.452 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país. Vale destacar que houve redução de incidência em quase todos os estados de 2016 para 2017, exceto em Roraima que registrou um leve aumento.

Em relação aos óbitos, foram oito em 2016, nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraíba e Maranhão e um em 2017 no estado de Rondônia (31). Nos três anos seguintes foram registrados 8.680, 10.786 e 7.387 casos prováveis respectivamente, com cinco óbitos em 2018, três em 2019 e nenhum em 2020 (36–38).

No Amazonas, o primeiro caso confirmado foi em outubro de 2015. Neste mesmo ano foram notificados 159 casos suspeitos da doença e no ano seguinte foi registrada a maior epidemia, coincidindo com o restante do país, com 6.090 casos prováveis, dos quais 95% foram em residentes em Manaus (39). Houve uma redução nos anos seguintes, com 429 casos prováveis em 2017 (31), 365 em 2018 (36) e menos de 100 em 2019 e 2020 (37,38). Apesar da redução no número de casos, o vírus continua circulando e sendo detectado em testes moleculares e sorológicos no Amazonas e em diversos estados brasileiros.

1.3 Agente Etiológico

O vírus Zika (ZIKV), espécie *Zika virus*, pertencente ao domínio *Riboviria*, Reino *Orthornavirae*, filo *Kitrinoviricota*, classe *Flasuviricetes*, ordem *Amarillovirales*, família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* que compreende 53 espécies tais como, *Dengue virus*, *Yellow fever virus* e *West Nile virus* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>. Acesso em: 13/06/2021).

Assim como os demais flavivírus, o ZIKV possui genoma RNA de fita simples e polaridade positiva. As partículas virais são esféricas e medem aproximadamente 50 nanômetros, sendo envoltas por uma membrana lipídica contendo um único capsídeo. Além da proteína C (capsídeo), os vírions maduros têm as proteínas E (envelope) e M (membrana), já as partículas imaturas possuem o precursor da proteína de membrana (prM) que é clivado durante o processo de maturação (figura 4) (40–43).

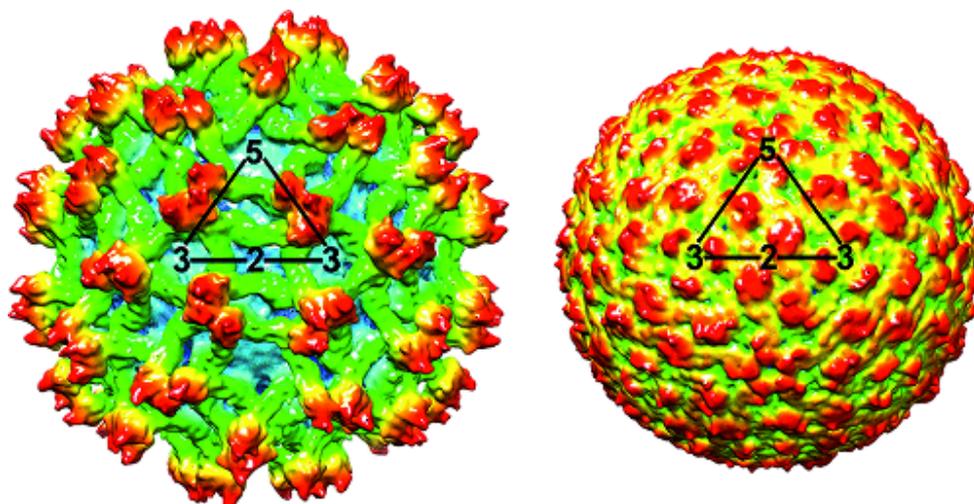


Figura 4: Criomicroscopia eletrônica com reconstrução de imagens tridimensionais de partículas virais de flavivírus (dengue). Partícula imatura a esquerda e partícula madura a direita. O triângulo está delineando a simetria icosaédrica do capsídeo. Fonte: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/258/flaviviridae-figures. (43).

São reconhecidas duas principais linhagens do ZIKV, uma Asiática e outra Africana, sendo esta última subdividida em Africana do Leste e do Oeste (15,40,44,45). Entretanto, alguns estudos sugerem que o ZIKV teve origem na África e divergiu em três linhagens principais: Africana, Asiática e Americana (46,47).

O vírus é mantido na natureza em dois principais ciclos de transmissão, um silvestre, documentado na África (1) e no Sudeste na Ásia (48), onde o vírus circula entre mosquitos *Aedes spp.* zoofílicos e primatas não humanos; e um ciclo urbano, registrado em diversas epidemias, principalmente a partir de 2007, que envolve mosquitos *Aedes spp.* antropofílicos e seres humanos (ex: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) (figura 5) (47,49,50).

Embora a principal forma de transmissão seja por meio da picada de mosquitos fêmeas infectadas com o vírus, foi documentada a transmissão por via sexual (51–53), transfusão sanguínea (54,55), e materno-fetal (56,57). Além disso, o vírus foi isolado a partir de fluidos como a urina, saliva e leite materno, representando outros potenciais mecanismos de transmissão (figura 6) (58–60).

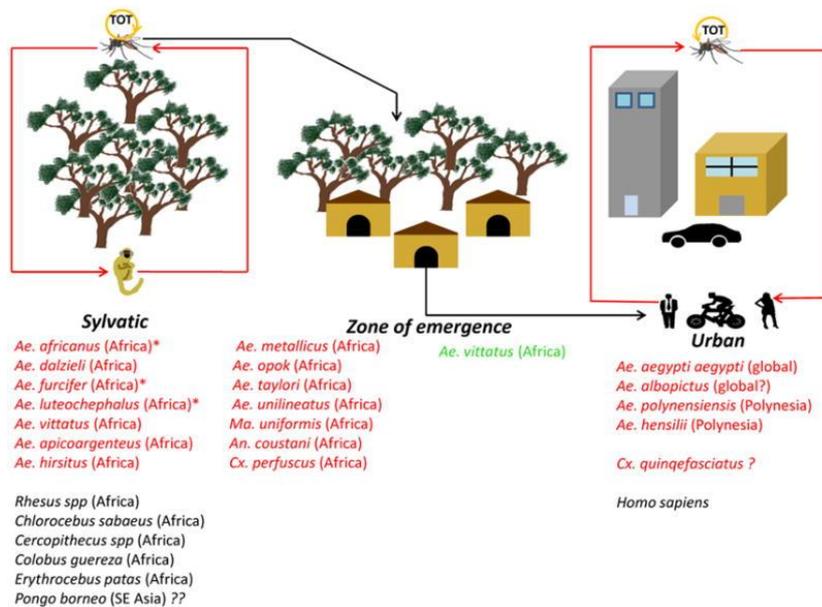


Figura 5: Principais ciclos de transmissão do ZIKV. O vírus se mantém na natureza em dois principais ciclos: urbano e silvestre. Em vermelho estão os vetores em cada ciclo e o símbolo de * marca as principais espécies. Em verde está o vetor incriminado como ponte entre os ciclos e TOT significa transmissão transovariana. Fonte: (50).

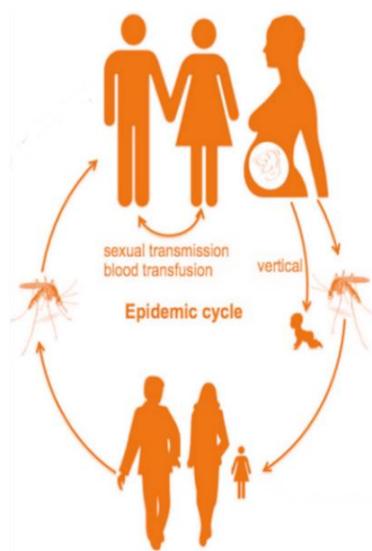


Figura 6: Formas de transmissão não vetoriais. No ciclo urbano o vírus é transmitido entre vetores e humanos, entretanto há relatos de transmissão por via sexual, transfusão sanguínea e de mãe para o feto durante a gestação. Fonte da imagem: (61).

A infecção pelo ZIKV pode ser assintomática ou gerar um quadro clínico semelhante ao de outras arboviroses, incluindo febre, mialgia, exantema, artralgia, hiperemia conjuntival e cefaleia. Entretanto, a partir das epidemias ocorridas na Polinésia Francesa e no Brasil, foi possível constatar a ocorrência de casos de microcefalia (62,63), síndrome de Guillain-Barré (19,64) e outras manifestações atípicas como, por exemplo, acometimentos cardíacos (65,66). Além da ocorrência desses casos atípicos, foram confirmados óbitos em adultos relacionados à infecção pelo ZIKV (31,36,37).

1.4 Organização genômica

O genoma do ZIKV se apresenta como um RNA de fita simples e polaridade positiva, composto por cerca de 10.700 nucleotídeos que codificam aproximadamente 3.419 aminoácidos (67). Assim como os demais flavivírus a codificação das proteínas ocorre em uma única fase de leitura aberta (*Open Reading Frame*, ORF), flanqueada por regiões terminais não traduzidas (*Untranslated regions*, UTR) 5' e 3' que apresentam papel importante na replicação e tradução do RNA viral (figura 7) (67,68).

A tradução do genoma viral produz uma única poliproteína precursora que após processo de clivagem por proteases do hospedeiro e do vírus, dá origem a dez proteínas virais, das quais, três são estruturais: C (capsídeo), prM (precursora de membrana) e E (envelope) que compõem a arquitetura da partícula viral. E sete são não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 que atuam no processo de replicação e montagem de novos vírions (figura 7) (42,68).

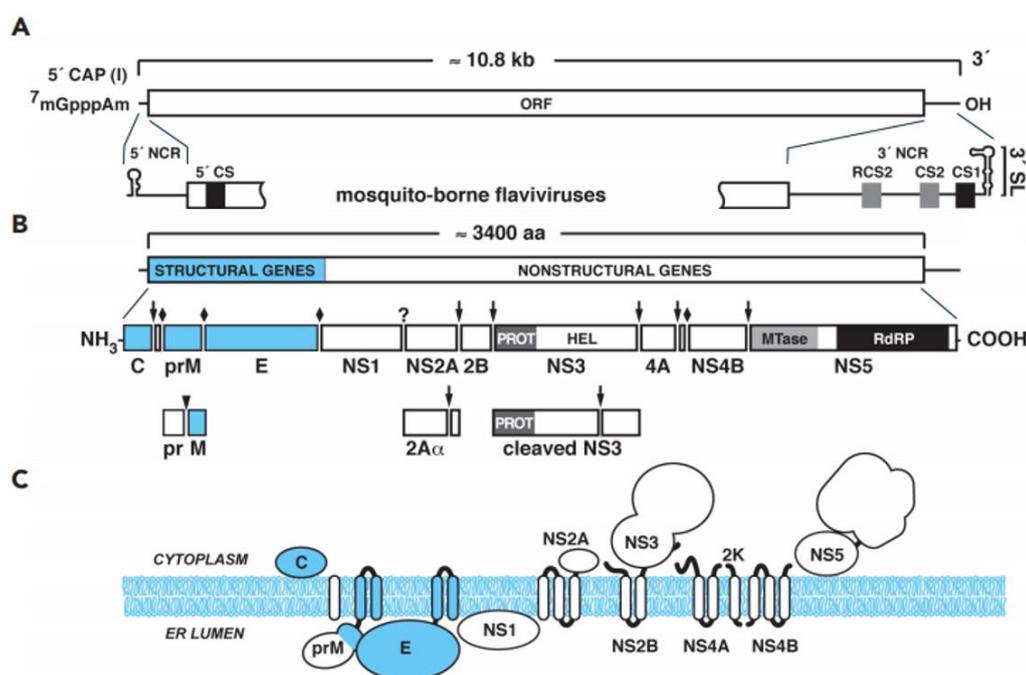


Figura 7: Organização genômica dos flavivírus. A: Representação do genoma viral tendo a região codificante flanqueada por regiões 5' e 3' não codificantes. Em destaque são representadas as estruturas em *loop* formadas nas regiões não traduzidas. B: Poliproteína e seu processamento em dez proteínas virais. São também representadas as enzimas que atuam no processo de clivagem. Em azul estão as proteínas estruturais e em branco as não estruturais. Os losangos representam os sítios de clivagem da peptidase sinal. As setas para baixo indicam os sítios de clivagem da serina protease viral. O triângulo indica o sítio de ação da Golgi protease e a interrogação indica uma protease desconhecida. C: Topologia dos produtos de clivagem da poliproteína dos flavivírus em relação a membrana do retículo endoplasmático. Fonte: (42).

A região 5'UTR possui uma estrutura cap ($m^7G5'ppp5'A$) que contribui para a estabilidade do genoma e início da tradução (42,68) embora alguns estudos tenham

demonstrado que a tradução pode acontecer por um mecanismo cap independente (69,70). Além disso, apesar de não ser uma região conservada entre os diversos flavivírus, apresenta uma estrutura secundária comum entre eles, que influencia na tradução do genoma e replicação (42,68). Outra função importante do terminal 5' consiste na complementariedade da fita negativa que serve como sítio de iniciação para a síntese da fita positiva durante a replicação do RNA (42).

A extremidade 3'UTR não possui cauda poliadenilada mas forma estruturas em loop que levam a produção de RNA subgenômico (sfRNA), essencial à patogenicidade atuando na inibição do complexo antiviral (RIG-I) e na produção de interferon e outras citocinas antivirais (71,72). Essa região é dividida em três domínios (I, II e III) que apresentam estruturas em *loop* (*stem-loop*, SL) e *hairpin* fundamentais para o empacotamento do RNA, tradução, estabilização e circularização do genoma. A região 3'UTR interage com a região 5'UTR, sendo de grande importância durante a replicação pois cria um molde para a polimerase iniciar a replicação (42,73–76) Alguns estudos indicam ainda, que esta região interage com as proteínas não estruturais NS3 e NS5 (77,78).

1.4.1 Proteínas Estruturais

A proteína C tem cerca de 11kDa (kilodaltons) e se liga ao RNA viral para formar o nucleocapsídeo. Ademais, interage com proteínas celulares desempenhando papel importante durante o processo de infecção viral, modulação do metabolismo celular, apoptose e resposta imune (68,79–81). A sua estrutura forma dímeros que contém quatro α hélices (42,81,82) e uma longa alça pré- $\alpha 1$, que aparece apenas no ZIKV. Este loop pré- $\alpha 1$, contribui para uma associação mais estreita da montagem do dímero e confere uma característica hidrofóbica distinta de estruturas conhecidas dos vírus dengue e Nilo Ocidental (81).

A proteína prM tem cerca de 26kDa, e é precursora da proteína estrutural M que reveste externamente a partícula viral. Ela é translocada para dentro do retículo endoplasmático (RE) pelo domínio hidrofóbico C-terminal da proteína C. Atua como uma chaperona, promovendo a montagem da proteína do envelope viral e após clivagem da porção “pré” de M por endoproteases celulares torna a partícula viral madura (42,68,83). Mutações nesta proteína do ZIKV, têm sido associadas a ocorrência de epidemias (84,85) e a neurovirulência (86).

A proteína E possui cerca de 53kDa e se destaca por ser o principal componente proteico na superfície viral. É uma estrutura rica em folhas β , que forma homodímeros paralelos à bicamada lipídica e cada monômero é composto por três domínios: DI, DII e DIII (80,87–89).

Os três domínios contêm epítomos envolvidos na neutralização e inibição da hemaglutinação, porém, apenas o domínio II contém epítomos de reação cruzada entre os

flavivírus. Esta proteína está envolvida no processo de montagem das partículas virais e fusão da membrana. Além de conter receptores de ligação e ser o principal componente antigênico do vírus, a proteína E tem a capacidade de induzir no hospedeiro a produção de anticorpos neutralizantes (42,68,90). A proteína E do ZIKV se assemelha a de outros flavivírus, mas contém um fragmento carregado positivamente, adjacente a região do loop de fusão que pode influenciar na ligação à célula do hospedeiro (91).

O DI é um domínio não contínuo, composto por cerca de 130 resíduos de aminoácidos divididos em três segmentos, resíduos 1-51, 132-192 e 280-295, formado por folhas β com uma fita N-terminal adicional. É responsável por ligar DII a DIII e por atuar na mudança conformacional essencial durante a infecção. O *loop* 150, que compreende os resíduos 147-161, contém um potencial sítio de glicosilação N154, que é altamente flexível. Este domínio possui sítios antigênicos tipo-específicos para a ação de anticorpos não neutralizantes, entretanto, dados na literatura indicam que alguns anticorpos produzidos contra este domínio podem ter atividade neutralizante (68,91–93).

O domínio II contém aproximadamente 180 resíduos de aminoácidos divididos em dois segmentos, resíduos 52-31 e 193-279. Este domínio consiste em uma estrutura alongada, formada por α hélices, folhas β e duas alças contínuas estendidas de DI. É responsável por mediar a fusão das membranas viral e endossômica durante a infecção, por meio do *loop* de fusão formado pelos resíduos 98-109 que é hidrofóbico e altamente conservado entre os flavivírus. Além disso o DII possui epítomos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes e não-neutralizantes que reagem de forma cruzada entre os diversos flavivírus (87,91,94)

DIII é o domínio C-terminal e compreende os resíduos de aminoácidos 296-403 que exibem uma dobra semelhante a uma imunoglobulina. Está envolvido na ligação ao receptor presente na superfície das células dos hospedeiros e contém epítomos tipo e subtipo específicos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes (42,91,94).

1.4.2 Proteínas não estruturais

As proteínas não estruturais dos flavivírus desempenham funções relacionadas a replicação viral, montagem de novas partículas, evasão da resposta imune, síntese e modificação do RNA viral, além de atuarem como cofatores enzimáticos e possuírem atividade proteolítica (42,68,95).

A proteína NS1 é translocada no retículo endoplasmático e possui aproximadamente 46kDa, subdividida em três domínios: N-terminal (*β -roll*); região em anel rica em epítomos

(*Wing*) e C-terminal (*β -ladder*). Esta proteína pode ser encontrada nas formas de monômero, dímero ou ligada à membranas celulares como um hexâmero, que é a única forma secretada e pode ser encontrada no soro de pacientes durante a fase aguda da infecção. No meio intracelular esta proteína participa do processo de replicação e na forma secretada exerce função na evasão imunológica (42,96,97). Estruturas resolvidas da NS1 do ZIKV, apontam que apesar de esta manter características semelhantes às de outros flavivírus, possui característica eletrostática distinta na interface de interação com células do hospedeiro, podendo implicar na patogênese viral diferenciada (98,99).

As proteínas NS2A e NS2B possuem respectivamente 22kDa e 14kDa. A NS2A atua na replicação e montagem de novos vírions. Estudos mostram que a NS2A do ZIKV interage com a região 3'UTR recrutando o RNA viral e os complexos prM/E e NS2B/NS3 protease para o local de montagem dos vírions, orquestrando a morfogênese viral. Além disso pode atuar como antagonista de interferon inibindo a sua sinalização (42,100–102). A NS2B é essencial para o recrutamento da NS3 ao retículo endoplasmático, com a qual forma um complexo estável e atua como cofator para a serina protease NS2B/NS3. Esse complexo enzimático é fundamental para a clivagem da poliproteína viral e consequente replicação (42,103–105).

A NS3 é uma proteína de aproximadamente 70kDa que desempenha atividades relacionadas ao processamento da poliproteína e replicação do RNA. Possui dois domínios funcionais: N-terminal (resíduos 1 - 174) e C-terminal (resíduos 175 -617). O domínio N-terminal associa-se com a proteína NS2B para que a NS3 exerça a função de protease e realiza a clivagem da poliproteína viral. Já o domínio C-terminal exerce função de helicase, provavelmente estimulada pela NS5, nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e RNA 5' - trifosfatase (RTPase), essenciais à replicação viral (42,78,106,107).

As proteínas NS4A e NS4B são hidrofóbicas e possuem aproximadamente 16kDa e 27kDa respectivamente e ambas estão envolvidas nos processos da replicação viral. A NS4A interage com a NS1 durante a replicação e atua como cofator para as atividades de NTPase e helicase da NS3 (42,108). A NS4B atua durante a replicação interagindo com a NS3 e intermediários de RNAs de fita-dupla, podendo bloquear a sinalização de interferon (42,102). Para além destas funções, estas duas proteínas no ZIKV foram associadas a neurogênese defeituosa, ativação da autofagia e desregulação celular (109).

A NS5 é a maior proteína viral com aproximadamente 100kDa sendo composta por dois domínios funcionais, um C-terminal que exerce a função de RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) e um N-terminal com atividade metiltransferase (MTase) responsável pela produção da estrutura cap na região 5'UTR e por interferir na resposta imune bloqueando a indução de IFN-I e inibindo a sinalização do receptor de IFN-I (42,110,111).

1.5 Replicação viral

A replicação do ZIKV, assim como os demais flavivírus, é iniciada com a adsorção do vírus aos receptores presentes na superfície das células hospedeiras, seguida por endocitose em vesículas revestidas com proteínas do tipo clatrinadas. O vírus é internalizado no endossomo, o qual passa por um processo de acidificação que resulta na reorganização da proteína do envelope viral com a formação de trímeros, culminando na fusão com a membrana endossomal. Este processo expõe o nucleocapsídeo e o genoma viral é liberado no citoplasma (figura 8) (42,112,113).

Ao ser liberado no citoplasma, o genoma viral, por ser um RNA de polaridade positiva, funciona como um RNA mensageiro dando início ao processo de tradução da poliproteína viral por meio de ribossomos presentes na membrana do retículo endoplasmático (RE). Essa poliproteína é então clivada por proteases do hospedeiro e do vírus dando origem às dez proteínas virais que em conjunto atuam na replicação e montagem de novas partículas. Após a clivagem, a NS5 faz cópias de fita negativa que servem de molde para novos RNAs de polaridade positiva (figura 8) (42,112,114).

As novas fitas de RNA interagem com as proteínas C para formar o nucleocapsídeo, ao passo que as proteínas prM e E formam um complexo e se inserem na membrana do RE. No momento em que o nucleocapsídeo brota em direção ao lúmen do retículo endoplasmático, este adquire a bicamada lipídica derivada do RE que contém os heterodímeros das proteínas prM/E, ocorrendo a montagem de partículas virais imaturas (figura 8) (42,112,114).

Após a montagem, os vírions imaturos são transportados pela via de secreção para o complexo trans-Golgi, onde ocorre a clivagem da prM pela enzima furina, dando origem a proteína M e promovendo o rearranjo da proteína E que resulta no amadurecimento das partículas virais que se tornam infecciosas e são liberadas para o meio extracelular por exocitose (figura 8) (42,112,114).

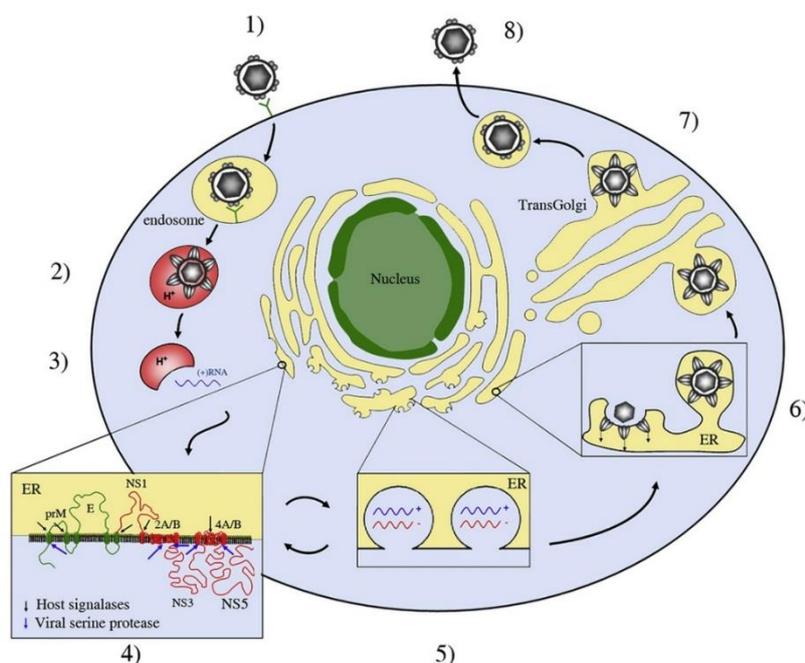


Figura 8: Ciclo de replicação dos flavivírus. (1) A entrada do vírus na célula ocorre por endocitose mediada por receptores na superfície das células do hospedeiro. (2) O vírus é internalizado no endossomo que sofre acidificação e leva a fusão do envelope viral à membrana do endossomo. (3) O capsídeo é exposto e ocorre a liberação do RNA no citoplasma. (4) Inicia-se a tradução do RNA em uma única poliproteína que é clivada por proteases do hospedeiro e do vírus. (5) O complexo de replicação é montado associado a membrana do RE e se inicia a transcrição da fita negativa que serve como molde para uma nova fita positiva. (6) A montagem das novas partículas imaturas ocorre no lúmen do RE. (7) Os vírions imaturos são transportados para o trans-Golgi onde ocorre a maturação das partículas virais. (8) As partículas virais maduras são liberadas por exocitose. Fonte da imagem: (114).

1.6 Evolução viral

Evolução viral representa uma alteração nas características genéticas dos vírus e o seu entendimento pode fornecer dados para a compreensão da diversidade viral e suas relações com o hospedeiro, além de contribuir para a explicação da emergência de doenças virais (115).

Os vírus apresentam altas taxas de evolução quando comparados a outros microrganismos, dentre os diversos fatores que contribuem para este fenômeno estão o grande tamanho populacional, o curto tempo de geração de novas partículas e as altas taxas de mutação. Vale destacar que a taxa de mutação é um importante determinante da taxa de evolução e consiste na taxa em que os erros são cometidos durante a replicação do genoma viral e não deve ser confundida com a taxa de substituição que é relacionada com a proporção em que as mutações se tornam fixas ou até mesmo presentes em todos os indivíduos de uma população. (116–118).

As maiores variações nas taxas de mutação entre os microrganismos são encontradas nos vírus que conforme com material genético são classificados, de acordo com Baltimore, em sete classes distintas: RNA de fita simples com polaridade positiva [ss (+) RNA]; RNA de fita simples com polaridade negativa [ss (-) RNA]; RNA de fita dupla (dsRNA); retrovírus (RT);

para-retrovírus (pRT); DNA de fita simples (ssDNA); e DNA de fita dupla (dsDNA) (119). Esta distinção no tipo de material genético é crucial para a diferença entre as taxas de mutação que variam entre 10^{-8} e 10^{-6} substituições por nucleotídeo por infecção celular (s / n / c) para vírus de DNA e 10^{-6} e 10^{-4} para vírus de RNA (figura 9) (117–120).

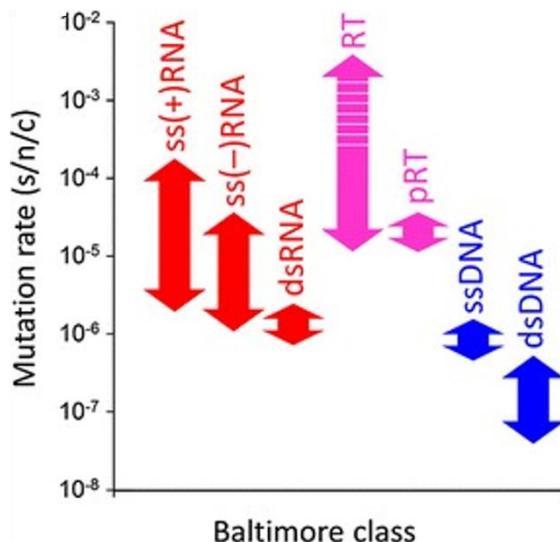


Figura 9: Taxa de evolução viral. Escala variando entre 10^{-8} e 10^{-4} de acordo com a organização e replicação do material genético. Na imagem pode-se observar, para os retrovírus (RT), uma exceção chegando à escala de 10^{-3} que é observada no HIV-1. Fonte da imagem: (119).

Os vírus de genoma DNA possuem uma polimerase viral que apresenta fidelidade em incorporar bases corretas e exerce atividade 3' exonuclease que corrige erros durante a replicação e conseqüentemente contribui para que estes tenham taxas de mutação menores. O mesmo não acontece para vírus de RNA, pois a polimerase destes não tem função de revisão/correção favorecendo a ocorrência de taxas de mutação maiores à exceção de membros da ordem *Nidovirales*, que inclui os coronavírus que apesar de possuírem genoma RNA a sua polimerase possui atividade 3' exonuclease (118,119,121,122).

Outros fatores ainda relacionados ao tipo de material genético consistem no fato de este ser fita simples ou fita dupla. Os vírus DNA fita simples, por exemplo, sofrem mutação em uma taxa mais elevada que os vírus de DNA fita dupla, e uma possível explicação reside no fato de que os genomas de fita simples são mais propensos a sofrer estresse oxidativo aumentando as taxas de erro, porém este é um fenômeno que ainda não é bem compreendido. Existe ainda uma relação entre taxa de mutação e tamanho do genoma, na qual quanto menor o genoma maior é a taxa de mutação (117,120,123).

A evolução dos vírus também envolve recursos de trocas genéticas, como a recombinação; seleção natural; interações com enzimas dos hospedeiros; e a existência de populações de 'quasispécies' que são produtos de erros de replicação e desta forma o vírus é

propagado como uma mistura de genomas, não existindo uma única sequência selvagem para um determinado vírus, contribuindo para a ocorrência de taxas de evolução mais elevadas e maior facilidade de adaptação a novos ambientes (115,119,124–127).

Essa característica de os vírus existirem como ‘quasispécies’ fornece a matéria prima para que a seleção natural possa atuar, desta forma os vírus estão constantemente sujeitos a eventos de gargalos (*bottleneck*) durante o ciclo de transmissão. Esses eventos exercem importante papel na evolução viral, ao passo que reduzem o tamanho da população e a variabilidade genética, entretanto em muitos casos esses gargalos são largos o suficiente para transmitir variantes minoritárias (128). No caso dos arbovírus esses gargalos estão presentes tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado, entretanto apesar desses gargalos e da potencial perda de aptidão os arbovírus são geneticamente mais estáveis por natureza e os gargalos podem ser superados pela rápida replicação que restabelece a população (127).

Apesar do fato de os vírus RNA apresentarem maiores taxas de mutação, algumas populações naturais, a exemplo de alguns membros da família *flaviviridae* mostram taxas de evolução menores, fato este atribuído a pressão seletiva resultante da alternância entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, conforme a hipótese “trade-off”, que diz que estes vírus apresentam capacidade de replicação adequada em ambos os hospedeiros em detrimento de uma aptidão aumentada em apenas um hospedeiro (129–132).

Estudos têm mostrado que esta alternância de hospedeiros pode realmente restringir a evolução dos arbovírus. No trabalho realizado com o vírus da encefalite equina do leste (EEEV) foi possível observar que a adaptação em uma única célula hospedeira resultou em mais mutações do que a adaptação em passagens alternadas (130). Em um outro estudo que teve como alvo o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), o vírus adaptado em mosquitos apresentou maior infectividade em mosquitos e as cepas adaptadas em vertebrados também produziram maior carga viral no sistema em que foram adaptados, com isso os autores concluíram que a alternância obrigatória entre hospedeiros limita a evolução dos arbovírus (131).

1.6.1 Evolução do vírus Zika

O ZIKV, assim como os demais vírus de genoma RNA, possui acentuada variação em suas sequências, que estão relacionadas à falta de atividade de correção da RNA polimerase e a alta taxa de replicação viral (133). Tal fato pode levar ao acúmulo de mutações que resultem no aumento da competência viral, como foi demonstrado para o vírus Chikungunya (CHIKV) (134,135).

Diferentes estudos apontam que durante os últimos 50 anos o ZIKV vem acumulando mutações em suas sequências proteicas (136), incluindo possíveis eventos de recombinação nas regiões codificantes para o envelope e NS5 (44), que possivelmente colaboraram de forma positiva para sua eficiência de replicação e fixação na natureza (136).

O genoma do vírus Zika adquiriu uma série de mutações que levaram à substituições de aminoácidos durante a evolução, quando ele se espalhou pela África, Ásia, Pacífico e Américas que podem ter cooperado para o aumento do seu potencial epidêmico (137). Ao serem comparadas cepas isoladas no sudeste da Ásia e nas Américas, foi possível observar que as cepas americanas apresentavam mutações exclusivas nas regiões NS1 (G100A; T233A; M349V; Y122H e R324W), E (S260T; V23I e V56I) e pr (S17N, M44T) (138).

Em um outro trabalho realizado com cepas pré-epidêmicas e cepas das epidemias recentes, foi demonstrado que cepas atuais possuem um sítio de glicosilação E (N154) que pode ter favorecido a patogênese viral facilitando a infecção de leucócitos (139). Além deste sítio de glicosilação, cepas asiáticas epidêmicas possuem mutações nas regiões codificantes para C (T106A), prM (V123A), NS1 (A188V, A982V) e NS5 (M3392V) que cooperaram para aumentar a aptidão viral em camundongos e mosquitos (140,141).

Dados atuais mostram que a linhagem Asiática do ZIKV apresenta também mutações nas regiões codificantes para NS1, NS2A, NS4A e NS5 que podem tê-la tornado mais apta para infectar humanos (142). Ademais, a análise de sequências genômicas de amostras brasileiras demonstrou que estas apresentam, em média, 18 mutações de nucleotídeos (136) e que possuem duas substituições de aminoácidos na proteína do envelope, quando comparadas com amostras de outras regiões (143).

Além disto, o sequenciamento de uma amostra brasileira obtida de um caso de malformação congênita, revelou 23 mutações em relação às amostras da Micronésia e cinco mutações quando comparada com amostras da Polinésia Francesa. Essas mutações resultaram em cinco substituições de resíduos de aminoácidos sendo três na NS1, uma na NS4B e uma na NS5 (62).

Uma outra mutação na prM, que resultou na troca de aminoácido de uma serina para asparagina na posição 139, também foi associada a gravidade da doença e ocorrência de

microcefalia, uma vez que exacerbou os sintomas da doença em camundongos gestantes e tornou a cepa mais infecciosa em células progenitoras neurais (NPCs) humanas e de camundongos além de levar a microcefalia mais severa em fetos de camundongos e ter induzido a maior taxa de mortalidade em camundongos neonatos (86).

A literatura nos mostra que o ZIKV vem acumulando diversas mutações em suas sequências. Este acúmulo de mutações, comum aos vírus de genoma RNA, pode fazer com que os vírus aumentem a infecciosidade e transmissibilidade, podendo apresentar patogenia diferenciada, conforme demonstrado em modelo experimental por Stapleford e colaboradores (144). Outros trabalhos mostram que a diversidade genética intra-hospedeiro é importante para a replicação viral e sucesso da infecção, o que pode levar a competição entre as cepas mutantes, sendo selecionada aquela que produza maiores títulos virais (145,146).

Conforme observado nos diversos estudos supramencionados, as cepas epidêmicas do ZIKV acumularam mutações que podem ter alterado a característica fenotípica deste agente infeccioso. Pesquisas que tem como foco o processo evolutivo dos vírus demonstram que a ocorrência de mutações no genoma viral pode resultar na adaptação a novos vetores (135), bem como podem gerar mudança conformacional de proteínas virais, alterando a ligação de anticorpos, com o conseqüente escape da reposta imune adaptativa (147) e ainda levar a infecção e replicação mais eficientes (148).

1.7 Aptidão Viral

O termo aptidão viral (*viral fitness*) refere-se à quantidade de material genético que é repassado para a próxima geração. No que se relaciona aos vírus, esse termo foi originalmente empregado para definir a capacidade de um vírus produzir progênie infecciosa em um determinado hospedeiro, e atualmente, refere-se mais especificamente a aptidão replicativa. Entretanto este conceito tem sido extrapolado para entender a capacidade de transmissão e o potencial de um vírus se tornar dominante em relação a outro no contexto natural, por meio de estudos da aptidão de transmissão e aptidão epidemiológica (149–151).

Diversos estudos de aptidão viral têm sido desenvolvidos com a utilização de vírus RNA, e em especial com aqueles relacionados a eventos de emergência de doenças como os arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV, os vírus influenza e HIV, entre outros (149,152,153).

A utilização destes vírus de genoma RNA em estudos de competência viral tem sido mais comum por estes apresentarem altas taxas de mutação, elevado tamanho populacional e possibilitarem avaliar a aptidão em um curto período, além de serem uma fonte para o estudo de diferentes estratégias replicativas. Com os dados obtidos foi revelado que a aptidão é

relevante para a patogênese e para o controle de doenças virais, além de demonstrar que a variação de aptidão em vírus que sofrem replicação propensa a erros ocorre devido a flutuação na composição das subpopulações (quasispécies) (154).

O desenvolvimento desses estudos lança mão de diferentes sistemas, sendo eles *in vivo*, *in vitro*, *in silico*, *ex vivo* ou na natureza (figura 10). Para os vírus de bactérias, insetos e plantas o sistema *in vivo* tem sido amplamente utilizado, sendo realizados em populações controladas de laboratório. Já os estudos com vírus de vertebrados utilizam-se mais do sistema *in vitro*, com o emprego de linhagem de células, mas alguns trabalhos, a exemplos dos que estudam o *fitness* de arbovírus, têm utilizado também os sistemas *in vivo*. Para vírus humanos o sistema *ex vivo*, como por exemplo a utilização de células mononucleares do sangue periféricos (PBMC) têm sido bastante utilizados (129,149,155).

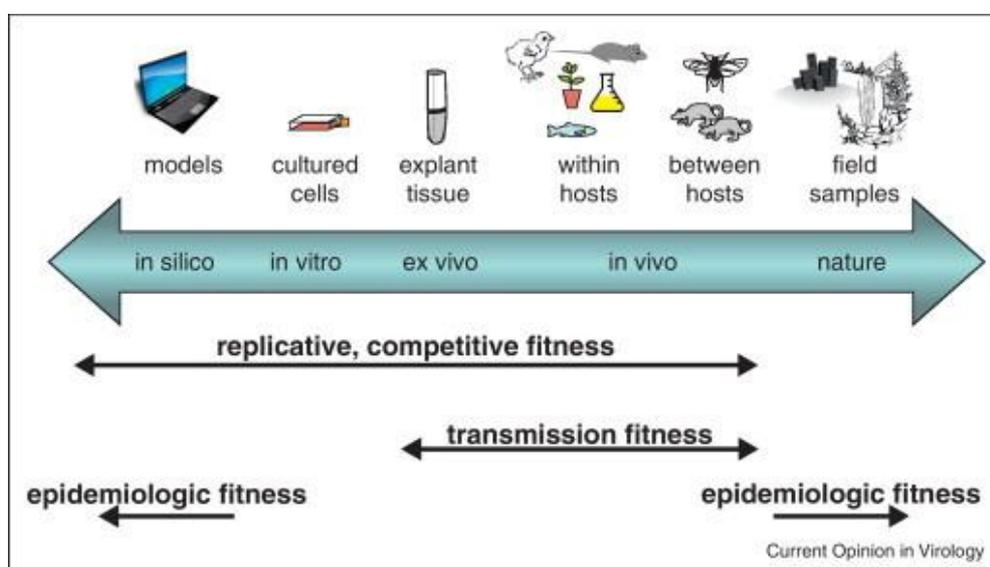


Figura 10: Sistemas utilizados para os estudos de aptidão viral. Os estudos de *fitness* replicativo são realizados principalmente em sistemas *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* e *in silico*. Os de *fitness* de transmissão empregam principalmente modelos *in vivo* e *ex vivo*. Já os de *fitness* epidemiológico usam principalmente o contexto natural e os modelos *in silico*. Fonte: (149).

Estudos realizados com flavivírus têm demonstrado que a ocorrência de mutações, mesmo que únicas, podem ser associadas ao aumento da competência viral. No caso de mutações ocorridas na proteína do envelope viral, estas poderiam melhorar a capacidade de ligação da partícula viral à superfície celular ou poderiam dificultar a ação de anticorpos neutralizantes (87,156,157).

O ZIKV, após permanecer cerca de 60 anos circulando sem causar surtos, foi responsável por grandes epidemias em 2007 e 2013 e em 2015 causou uma pandemia. Estudos sugerem que essa emergência viral foi ocasionada por mudanças genéticas que facilitaram a transmissão e a ocorrência de formas mais graves da doença. Mutações ocorridas entre os anos

de 2010 e 2013 levaram a substituição de sete resíduos de aminoácidos que contribuíram para o aumento da infectividade em mosquitos *Aedes aegypti*, supressão da resposta de interferon e ocorrência de microcefalia (86,141,158,159).

Um estudo mostrou que a mutação na posição 473 da proteína E (V473M), que precedeu a epidemia no continente americano, aumentou a replicação viral conferindo maior viremia que pode gerar infecção mais eficiente do vetor. Além disso, levou ao aumento da neurovirulência e favoreceu a transmissão materno-fetal em modelos de camundongos e primatas não humanos (152).

Um outro trabalho demonstrou que uma mutação na proteína NS2B (M1404I), resultou em maior taxa de infecção placentária e conferiu infecção fetal, porém fez com que o vírus fosse menos eficiente na transmissão por vetores (160). Mostrando de a ocorrência de mutações só é viável se for favorável tanto no hospedeiro vertebrado quanto invertebrado.

A ocorrência de mutações que impactam diretamente na aptidão viral, e o fato de os vírus existirem como um conjunto de populações que passa por diversos gargalos ao longo do processo de transmissão entre hospedeiros, pode resultar na emergência de uma variante que tenha maior sucesso replicativo e epidemiológico. Esse fato dá maior chance ao surgimento de epidemias, salto de espécies, ou até mesmo uma população que escape das vacinas existentes, ou seja resistente às drogas antivirais, o que torna essencial o entendimento do processo de aptidão viral (149–151,161).

2 OBJETIVOS

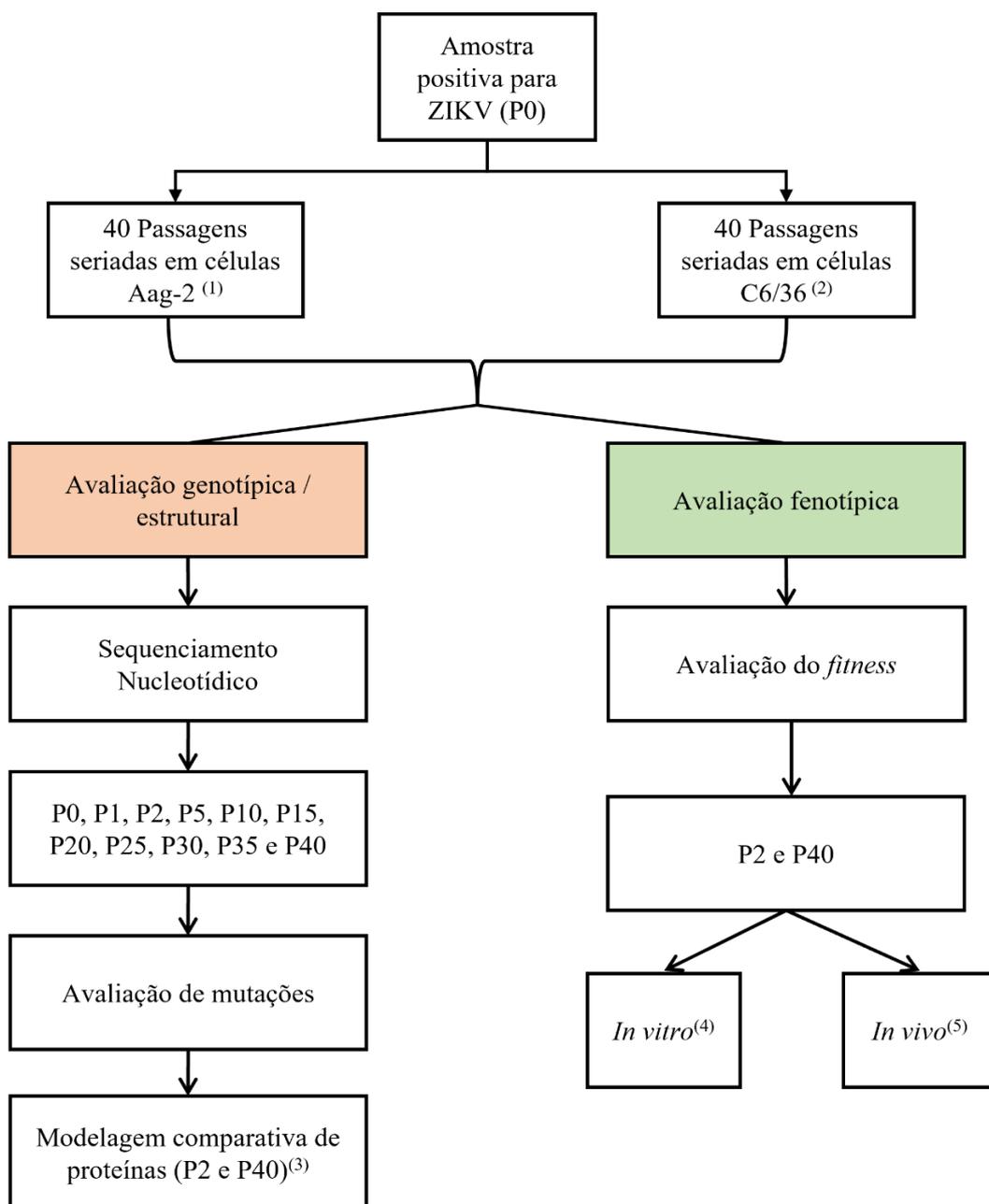
Objetivo Geral: Avaliar a evolução *in vitro* do vírus Zika e seu impacto sobre a aptidão viral em diferentes modelos biológicos – *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos Específicos

- a) Identificar as mutações ocorridas na sequência majoritária e nas subpopulações virais durante o processo de evolução viral *in vitro*;
- b) Mapear as substituições de aminoácidos na estrutura tridimensional das proteínas virais ocorridas durante o processo de evolução *in vitro*;
- c) Analisar o impacto das mutações sobre a aptidão viral em diferentes sistemas *in vitro*;
- d) Analisar o impacto das mutações sobre a aptidão viral em modelo invertebrado *in vivo*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi dividido em duas etapas. A primeira consistiu no processo de adaptação de uma amostra do vírus Zika em duas linhagens distintas de células de invertebrado, seguida da avaliação genotípica e estrutural das populações e subpopulações virais em cada sistema. A segunda etapa consistiu na avaliação fenotípica do impacto destas mutações sobre o *fitness* viral, conforme demonstrado no fluxograma abaixo e detalhado nas etapas da metodologia.



Fluxograma 1: Etapas do desenvolvimento do projeto. ⁽¹⁾ Linhagem celular de *Aedes aegypti*; ⁽²⁾ Linhagem celular de *Aedes albopictus*; ⁽³⁾ Proteínas que apresentarem substituição de resíduo de aminoácido; ⁽⁴⁾ Linhagens celulares C6/36 e Aag-2; ⁽⁵⁾ Mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

3.1 Considerações éticas

Para o desenvolvimento desta pesquisa foi utilizada uma amostra coletada no âmbito do projeto “Casos sintomáticos e assintomáticos de infecções pelo vírus Zika: estudo de características virológicas e da resposta imune em uma população da Amazônia Ocidental Brasileira”, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa sob o número CAAE 56745116.6.0000.5016.

3.2 Amostra utilizada no estudo

A amostra de plasma sanguíneo utilizada neste estudo foi coletada em abril de 2016 de uma paciente do sexo feminino, atendida no Hospital Adventista de Manaus, uma das quatro unidades sentinelas para os casos de Zika. A paciente estava no segundo dia de sintomas, apresentando exantema maculopapular, prurido e náuseas.

Após a coleta, a amostra identificada como 16110305_JFMB, foi encaminhada para o grupo de Virologia do Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia – FIOCRUZ/AM, onde foi processada para o diagnóstico do vírus Zika por técnica de RT-qPCR (15) apresentando resultado detectável com Ct de 26,8.

3.3 Manutenção de culturas celulares

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as linhagens de células de *Aedes albopictus* clone (C6/36) e *Aedes aegypti* (Aag-2) (figura 11). Ambas foram mantidas em estufa a 28°C sem atmosfera de CO₂ em frascos de cultivo celular de 25cm² (KASVI, cat. K11-1050), contendo meio de cultura Leibovitz L-15 (ThermoFisher, cat. 41300-030) para a C6/36 e meio Schneider's *Drosophila Medium* (ThermoFisher, cat. 21720-024) para a Aag-2, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (ThermoFisher, cat. 12657-029), 100 U/mL de penicilina (ThermoFisher, cat. 15240-062), 100 µg/mL de estreptomicina (ThermoFisher, cat. 15240-062) e 0,25 µg/ml de anfotericina B (ThermoFisher, cat. 15240-062).

A manutenção era realizada a cada três dias, sendo feita a troca do meio de cultura ou repique das culturas de células. O procedimento consistia na retirada do meio de cultura antigo e lavagem da monocamada com solução salina tamponada (PBS) 1X (ThermoFisher, cat. 10010-031). No caso de troca de meio, logo após a lavagem com PBS 1X, era adicionado o meio de cultura novo suplementado de antibióticos, antimicótico e SFB. Já no caso de repique, era utilizado um espalhador de células (*Cell scraper*) para soltar a monocamada, as células em excesso eram descartadas e adicionava-se o meio novo no frasco de cultivo, sendo em seguida

realizada homogeneização das células.

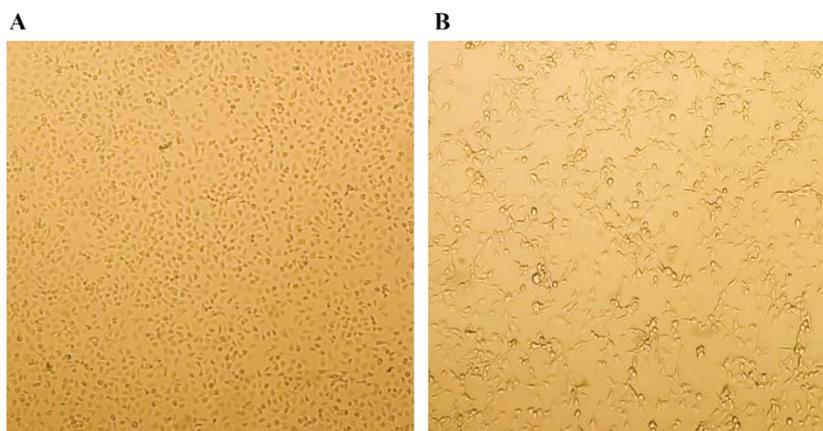


Figura 11: Monocamada das linhagens de células utilizadas no trabalho. A: células C6/36. B: Células Aag-2 (aumento 10X). Fonte: Arquivo pessoal

3.4 Passagens do vírus em células C6/36 e células Aag-2

O vírus Zika foi adaptado em dois sistemas distintos, sendo o primeiro em células C6/36 e o segundo em células Aag-2 ao longo de 40 passagens seriadas do vírus em cada linhagem de células. O processo de adaptação se iniciou a partir do plasma da amostra 16110305JFMB que foi diluído na proporção 1/10 e utilizado para realização do inóculo em C6/36 e em Aag-2, este primeiro inóculo representou a passagem 1 (P1) e foi retirado com 10 dias pós infecção (dpi).

Todo o processo de adaptação foi realizado em replicatas biológicas, ou seja, a partir do sobrenadante de P1, foram iniciadas duas séries de passagens em cada sistema de células, sendo denominadas série 1 e série 2, até chegar na passagem 40 (P40) (figura 12).

As células eram preparadas 24h antes da infecção, em frascos de 12,5 cm² (KASVI, cat. K11-1025). No dia do inóculo apresentavam uma monocamada com aproximadamente 80% de confluência. Para a realização de cada inóculo, a monocamada era inicialmente lavada com PBS 1X e o inóculo viral (1/10) diluído em PBS era adicionado. Os frascos eram então colocados na estufa a 28°C por uma hora para a adsorção viral, com leve agitação a cada 15 minutos para banhar toda a monocamada. Após o período de adsorção, a monocamada era novamente lavada com PBS 1X para retirar as partículas não adsorvidas e acrescentava-se o meio de cultura respectivo para cada célula, acrescido de 2% de SFB, antibióticos e antimicóticos, conforme descrito anteriormente.

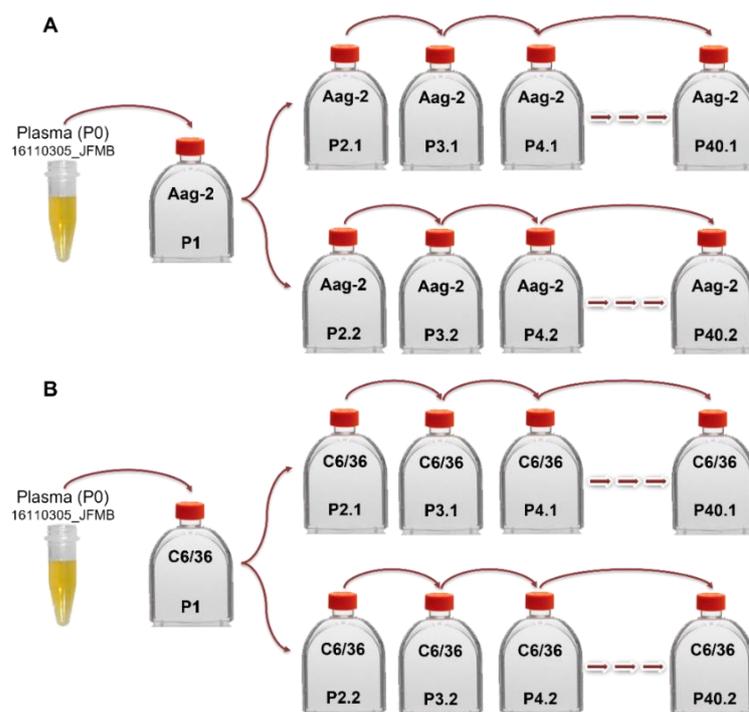


Figura 12: Esquema do processo de adaptação do vírus Zika em cultura de células. A: Séries de 40 passagens em células Aag-2. B: Séries de 40 passagens em células C6/36.

Cada inóculo permanecia por 72h. Passado esse tempo, os frascos de cultivo eram levados ao freezer -80°C onde permaneciam por 15 minutos e posteriormente eram colocados em estufa a 37°C no intuito de romper as células e liberar as partículas virais no sobrenadante. Este sobrenadante era então retirado e utilizado para realização do inóculo subsequente e o restante era transferido para criotubos contendo 10% de glicerol que eram armazenados em freezer -80°C até a utilização em experimentos posteriores.

3.5 Extração de ácido ribonucléico (RNA)

A extração de RNA viral foi realizada após as passagens iniciais e a cada cinco passagens do vírus nas linhagens de células (P1, P2.1, P2.2, P5.1, P5.2, P10.1, P10.2, P15.1, P15.2, P20.1, P20.2, P25.1, P25.2, P30.1, P30.2, P35.1, P35.2, P40.1 e P40.2) e também após os experimentos para a avaliação da competência viral *in vitro* e *in vivo* (mosquitos).

Para as extrações das passagens em cultura de células e dos experimentos de *fitness in vitro* foi realizada extração automatizada no equipamento Maxwell RSC 48 com o kit Maxwell RSC Viral TNA (Promega, cat. AS1330) seguindo as orientações do fabricante.

Resumidamente, em um microtubo de 1,5ml, devidamente identificado, foi adicionado $5\mu\text{l}$ do bacteriófago MS2 na diluição 10^{-3} , $20\mu\text{l}$ de Proteinase K, $200\mu\text{l}$ do tampão de Lise (*lysis buffer*) e $200\mu\text{l}$ da amostra. Essa mistura foi homogeneizada em vórtex e levada ao banho seco por 10 minutos a 56°C . Após a incubação, todo o volume foi transferido para o cartucho do kit

e foi iniciada a extração automatizada. Ao término da extração, todos os RNAs foram centrifugados para evitar a presença de *beads* no RNA final. Todo o volume de RNA foi transferido para um novo microtubo que posteriormente foi armazenado em freezer -80°C.

As extrações de RNA a partir dos experimentos de *fitness in vivo* foi realizada seguindo o protocolo do Trizol® Reagente (ThermoFisher, cat.15596-018). Inicialmente os mosquitos inteiros ou dissecados (glândula salivar e intestino) a depender do experimento, foram macerados individualmente em tubos de 2ml de fundo redondo contendo 250µl Trizol e 5µl de MS2 10⁻³, no equipamento *Tissuelyser* LT (Qiagen) a 50Hz por 5 minutos com a utilização de esferas de aço inoxidável. Ao término, todos eram centrifugados e o sobrenadante transferido para um microtubo de 1,5ml devidamente identificado.

Após a maceração o processo de extração do RNA era iniciado com a adição de 750µl de Trizol, seguida de incubação a temperatura ambiente por cinco minutos. Após este tempo adicionava-se 200µl de clorofórmio e aguardava-se mais 10 minutos de incubação a temperatura ambiente. Posteriormente os microtubos eram centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa era então transferida para um novo microtubo ao qual acrescentava-se 500µl de isopropanol absoluto e após uma nova incubação por 10 minutos a temperatura ambiente era realizada uma nova etapa de centrifugação a 12000g por 10 minutos a 4°C. Em seguida o isopropanol era retirado e descartado e adicionava-se 1ml de etanol 75% e seguia-se um novo passo de centrifugação, desta vez a 7500g por 5 minutos a 4°C. O etanol era então retirado e após um tempo para secar todo resíduo de etanol, o *pellet* era ressuspenso em 40 µl de água livre de nucleases e o RNA era armazenado em freezer -80°C.

3.6 Produção de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA)

A produção do cDNA foi realizada com a utilização de iniciadores randômicos e a enzima *SSIV Reverse Transcriptase* (ThermoFisher, cat. 18091050) em reações de 12µl, as quais eram preparadas com 0,6µl de iniciadores randômicos [50ng]; 0,6µl de DTT [0,1M]; 0,6µl de DNTP [10mM]; 0,6µl de inibidor de RNAses; 0,6µl da enzima *SSIV* [200U / µl]; 2,4µl de H₂O de nucleases e 4,2µl de RNA.

Inicialmente o RNA e os iniciadores randômico eram levados ao termociclador por cinco minutos a 65°C e logo em seguida eram colocados em gelo por dois minutos. Acrescentava-se então o restante do mix e os microtubos eram levados ao termociclador nas seguintes condições: 25°C por 15'/37°C por 15'/45°C por 15'/50 °C por 15'/70 °C por 15'/4°C ∞.

3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR para a amplificação do genoma completo foram realizadas para a amostra de soro e para as passagens em cultura de células (P1, P2.1, P2.2, P5.1, P5.2, P10.1, P10.2, P15.1, P15.2, P20.1, P20.2, P25.1, P25.2, P30.1, P30.2, P35.1, P35.2, P40.1 e P40.2).

A abordagem inicial previa a realização do sequenciamento capilar, sendo assim foram utilizados nove pares de iniciadores (162) que cobriam todo o genoma viral (tabela 1, figura 13).

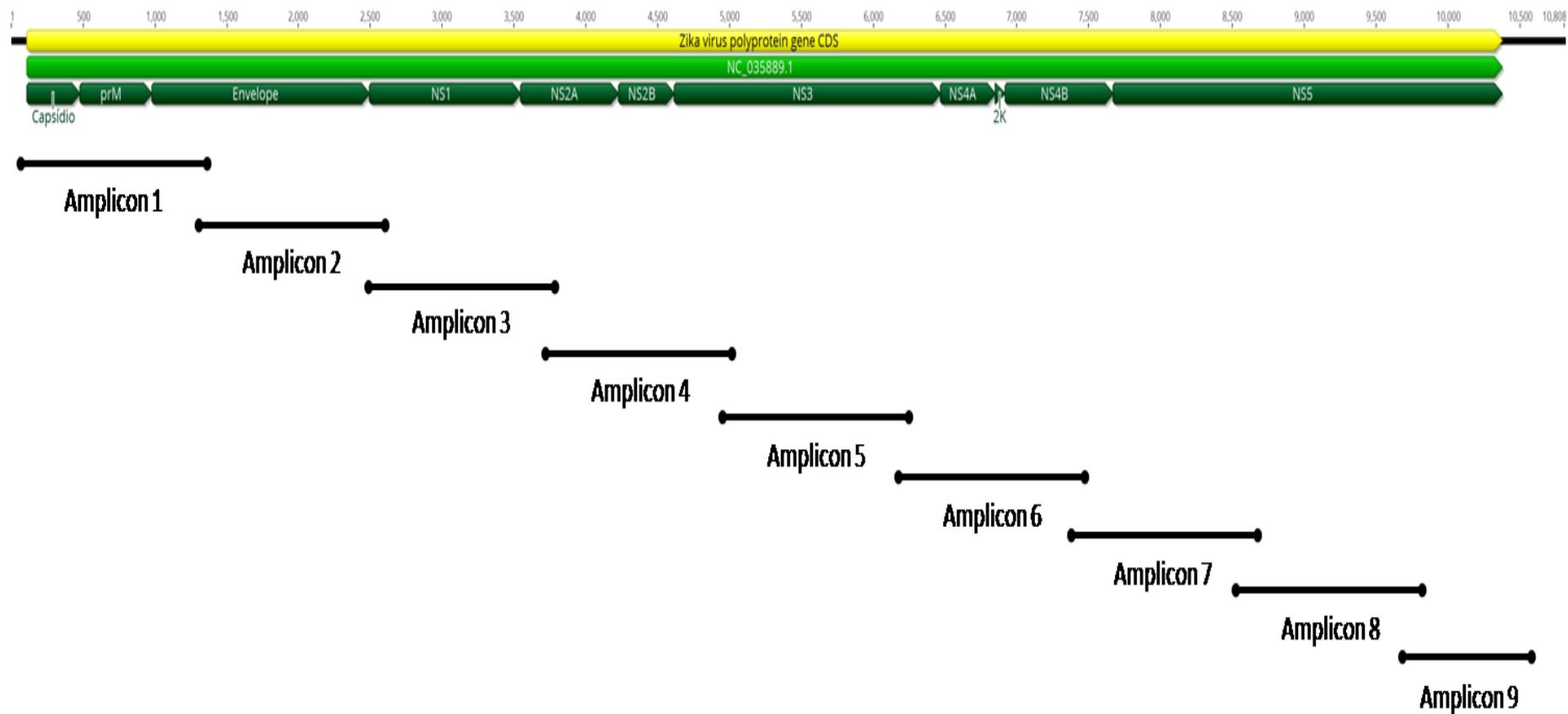


Figura 13: Esquema dos iniciadores para amplificação do genoma completo do vírus Zika. São representados os nove *amplicons* gerados na reação de PCR convencional, cobrindo todo o genoma viral com regiões parcialmente sobrepostas.

As reações foram realizadas com 1U da enzima Platinum Taq DNA polimerase e 0,2mM de DNTPs, 0,3µM de iniciadores, 1X de tampão RXN e H₂O livre de nucleases qsp 50µl. A este mix adicionava-se 2µl de cDNA e a reação era levada ao termociclador utilizando a temperatura de 65° de hibridização.

Tabela 1: Iniciadores utilizados na amplificação do genoma completo do vírus Zika para a estratégia de sequenciamento capilar. S (sentido senso). AS (sentido anti-senso). Pb (tamanho do fragmento gerado em pares de bases).

<i>Amplicon</i>	Iniciador	Sequência	Sentido	pb
<i>Amplicon 1</i>	ZIKV_400_1L	GACAGTTCGAGTTTGAAGCGAAAG	S	1388 pb
	ZIKV_400_4R	GGAGCCATGAACTGACAGCATT	AS	
<i>Amplicon 2</i>	ZIKV_400_5L	AGAACGTTAGTGGACAGAGGCT	S	1373 pb
	ZIKV_400_8R	TTGACTGCTGCTGCCAATCTAC	AS	
<i>Amplicon 3</i>	ZIKV_400_9L	GCCTTAGGGGGAGTGTGATCT	S	1341 pb
	ZIKV_400_12R	TATCAGCGCCAGATGAGCTACA	AS	
<i>Amplicon 4</i>	ZIKV_400_13L	TGGCAGTGTGGTAGCTATGAT	S	1332 pb
	ZIKV_400_16R	GCTCCAATGTCCCCATCCTTTG	AS	
<i>Amplicon 5</i>	ZIKV_400_17L	GTGGTCCATGGAAGCTAGATGC	S	1349 pb
	ZIKV_400_20R	CCTTTGCTCCGTCCTAAGCTTG	AS	
<i>Amplicon 6</i>	ZIKV_400_21L	AGAGACTGACGAAGACCATGCA	S	1370 pb
	ZIKV_400_24R	TCTCCACTTGGGGGTCAATTGT	AS	
<i>Amplicon 7</i>	ZIKV_400_25L	CCCTGACCCTAATAGTGGCCAT	S	1374 pb
	ZIKV_400_28R	GGCCTCATAGCTTCCATGGTA	AS	
<i>Amplicon 8</i>	ZIKV_400_29L	AGGATGTGAATCTCGGCTCTGG	S	1349 pb
	ZIKV_400_32R	TGTCATCCAGTTGAGGGTTT	AS	
<i>Amplicon 9</i>	ZIKV_400_33L	CAAACGAATGGCAGTCAGTGGA	S	1033 pb
	ZIKV_400_35R	ACCACTAGTCCCTCTTCTGGAG	AS	

No decorrer do projeto, com a instalação do sequenciador Illumina MiSeq no ILMD, optamos por realizar o sequenciamento de alto rendimento, o que nos permitiria analisar subpopulações virais. Para isso, redesenhamos o experimento de PCR, incluindo o desenho de 4 iniciadores (18F, 5194R, 4979F e 10595R), e trabalhamos com dois *amplicons* para os cDNAs oriundos das passagens em Aag-2 (tabela 2) e três *amplicons* para os cDNAs provenientes das passagens em C6/36 (tabela 3) cobrindo todo o genoma viral.

Neste caso as reações foram realizadas com a enzima *SuperFi II green* (ThermoFisher, cat. 12361010) e iniciadores a 0,5µM em reações de 15µl as quais acrescentava-se 0,6µl de cDNA, seguindo uma programação de 98°C por 30" / 35 ciclos: 98°C por 10" - 60°C por 10" - 72°C por 3' / 72°C por 5' / 4°C ∞.

Tabela 2: Iniciadores utilizados na amplificação do genoma completo do vírus Zika a partir do sobrenadante de células Aag-2 para sequenciamento de alto rendimento. S (sentido senso). AS (sentido anti-senso). Pb (tamanho do fragmento gerado em pares de bases).

Adaptação em células Aag-2				
Amplicon	Iniciador	Sequência	Sentido	Pb
<i>Amplicon 1</i>	ZIKV_FN_18F	AGGTTTTATTTGGATTTGGAAACGA	S	5117pb
	ZIKV_FN_5194R	TTCACGGACTATTTTCAGGAAGAAGT	AS	
<i>Amplicon 2</i>	ZIKV_400_16L	GTGGCATGAACCCAATAGCCAT	S	6127pb
	ZIKV_400_35R	ACCACTAGTCCCTCTTCTGGAG	AS	
<i>Amplicon 2 alternativo*</i>	ZIKV_FN_4979F	CTAGACAAGTGTGGGAGAGTGATAG	S	5617pb
	ZIKV_FN_10595R	ATCCACAGCTGATCTCCAGTTC	AS	

(*) Este par de iniciadores foi utilizado em situações nas quais o *amplicon 2* não funcionou.

Tabela 3: Iniciadores utilizados para a amplificação do genoma completo do vírus Zika a partir do sobrenadante de células C6/36 para sequenciamento de alta demanda. S (sentido senso). AS (sentido anti-senso). Pb (tamanho do fragmento gerado em pares de bases).

Adaptação em células C6/36				
Amplicon	Iniciador	Sequência	Sentido	Pb
<i>Amplicon 1</i>	ZIKV_FN_18F	AGGTTTTATTTGGATTTGGAAACGA	S	5117pb
	ZIKV_FN_5194R	TTCACGGACTATTTTCAGGAAGAAGT	AS	
<i>Amplicon 2</i>	ZIKV_400_16L	GTGGCATGAACCCAATAGCCAT	S	3165pb
	ZIKV_400_25R	CCTTCCATTTCTCTCCCAGGGT	AS	
<i>Amplicon 3</i>	ZIKV_400_25L	CCCTGACCCTAATAGTGGCCAT	S	3439pb
	ZIKV_FN_10595R	ATCCACAGCTGATCTCCAGTTC	AS	

3.8 Purificação dos produtos de PCR por Polietilenoglicol (PEG)

Os produtos de PCR foram submetidos a um protocolo de precipitação por PEG (163) com adaptações pelo nosso grupo de pesquisa. Inicialmente adicionava-se PEG8000 (Promega, Cat. V3011) a 20% em uma proporção 1/1 no tubo contendo o produto de PCR e seguia-se incubação a 37°C por 15 minutos.

Após o período de incubação era realizada uma centrifugação a 13.000g por 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante era descartado e adicionava-se 125µl de etanol 80%, seguindo uma nova etapa de centrifugação a 12.000g por 2 minutos com posterior descarte do sobrenadante. O microtubo era então levado ao concentrador de DNA a vácuo Mivac (Genev SP Scientific) onde permanecia por 15 minutos a uma temperatura de 37° e então o DNA era ressuspenso em água livre de nucleases e quantificado em espectrofotômetro de micro volume (Biodrop Duo - Biochrom).

3.9 Sequenciamento capilar

Os nove *amplicons*, previamente purificados, obtidos da amostra do soro 16110305_JFMB foram submetidos ao sequenciamento capilar no equipamento ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), instalado na plataforma de genômica do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazonas.

Para as reações de sequenciamento foram utilizados 54 iniciadores (162) (tabela 4) e o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, cat.: 4336917). Cada reação tinha 10µl de volume final, com 0,3µl de BigDye (0,075 X final), 0,32µM de cada primer; 1 X do tampão 5X, o produto da PCR na concentração ideal para fragmento (aproximadamente 20ng) e H₂O livre de nucleases para completar o volume.

As reações foram realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems) seguindo a programação: 96°C por 1' / 20 ciclos: 96°C por 10" - 55°C por 15" - 60°C por 2' / 10 ciclos: 96°C por 2' - 55°C por 15" - 60°C por 3' / 4°C ∞.

Após a reação de sequenciamento realizava-se uma nova etapa de purificação, desta vez com EDTA 125nM, acetato de sódio 3M e etanol (EtOH) 100%. Após um período de 15 minutos de incubação, a placa era centrifugada a 2.000g por 45 minutos a 4°C e o sobrenadante era descartado. Seguia-se etapa de lavagem com etanol 70% e centrifugação a 1.650g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante era descartado e a placa era levada ao termociclador a 65°C por cinco minutos e finalmente acrescentava-se 10µl de formamida HI-DI em cada poço da placa que seguia para sequenciamento.

Tabela 4: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento capilar. S (sentido senso). AS (sentido anti-senso).

Amplicon	Iniciador	Sequência	Sentido
<i>Amplicon 1</i>	ZIKV_400_1L	GACAGTTCGAGTTTGAAGCGAAAG	S
	ZIKV_400_1R	AGTATGCACTCCCACGTCTAGT	AS
	ZIKV_400_3L	AGATGACGTTCGATTGTTGGTGC	S
	ZIKV_400_2R	TGATTCCAACCAGGTTTGCAC	AS
	ZIKV_400_4L	TCAGGTGCATAGGAGTCAGCAA	S
	ZIKV_400_4R	GGAGCCATGAACTGACAGCATT	AS
<i>Amplicon 2</i>	ZIKV_400_5L	AGAACGTTAGTGGACAGAGGCT	S
	ZIKV_400_8R	TTGACTGCTGCTGCCAATCTAC	AS
	ZIKV_400_5R	TGTGCGTCCCTGAACTCTACCA	AS
	ZIKV_400_7L	TGAAGGGCGTGCATACTCCTT	S
	ZIKV_400_6R	CCATCTGTCCCTGCGTACTGTA	AS
	ZIKV_400_8L	GGGAGAAGAAGATCACCCACCA	S
<i>Amplicon 3</i>	ZIKV_400_9L	GCCTTAGGGGGAGTGTGATCT	S
	ZIKV_400_12R	TATCAGCGCCAGATGAGCTACA	AS
	ZIKV_400_9R	GAGTGGGCATTTCCTCAGTGTG	AS
	ZIKV_400_11L	CAGCCGTTATTGGAACAGCTGT	S
	ZIKV_400_10R	GTGGGACTTTGGCCATTCACAT	AS
	ZIKV_400_12L	CACTAAGTCCACGTGGAGGAA	S
<i>Amplicon 4</i>	ZIKV_400_13L	TGGCAGTGCTGGTAGCTATGAT	S
	ZIKV_400_16R	GCTCCAATGTCCCCATCCTTTG	AS
	ZIKV_400_13R	AGAGAGAGGAGCATAAACCCCC	AS
	ZIKV_400_15L	CCCTAGCGAAGTACTCACAGCT	S
	ZIKV_400_14R	TTTCCCATGTGATGTCACCTGC	AS
	ZIKV_400_16L	GTGGCATGAACCCAATAGCCAT	S
<i>Amplicon 5</i>	ZIKV_400_17L	GTGGTCCATGGAAGCTAGATGC	S
	ZIKV_400_20R	CCTTTGCTCCGTCCTAAGCTTG	AS
	ZIKV_400_17R	CCTCTAAGGGCCTCCTCCATTT	AS
	ZIKV_400_19L	TATGGATGAGGCCACTTCACA	S
	ZIKV_400_18R	TGGTGAGTTGGAGTCCGGAAT	AS
	ZIKV_400_20L	GGCTGGAAAACGGGTCATACAG	S
<i>Amplicon 6</i>	ZIKV_400_21L	AGAGACTGACGAAGACCATGCA	S
	ZIKV_400_24R	TCTCCACTTGGGGGTCAATTGT	AS
	ZIKV_400_21R	CTCCAAAAGCCGCTCCTCTTTT	AS
	ZIKV_400_23L	CGTCTTGATGAGGAACAAGGGC	S
	ZIKV_400_22R	ATTCTGGCTGGCTCAATTTCCG	AS
	ZIKV_400_24L	TAATGGGAAGGAGAGAGGAGGG	S
<i>Amplicon 7</i>	ZIKV_400_25L	CCCTGACCCTAATAGTGGCCAT	S
	ZIKV_400_28R	GGGCTCATAGCTTCCATGGTA	AS
	ZIKV_400_25R	CCTTCCATTTCTCTCCAGGGT	AS
	ZIKV_400_27L	AGTGCAAAGCTGAGATGGTTGG	S
	ZIKV_400_26R	ACCAGGGCCTCCTTTTGTGTAT	AS
	ZIKV_400_28L	GGTGGGGGATTGGCTTGAAAA	S
<i>Amplicon 8</i>	ZIKV_400_29L	AGGATGTGAATCTCGGCTCTGG	S
	ZIKV_400_32R	TGTCCCATCCAGTTGAGGGTTT	AS
	ZIKV_400_29R	ATGCTGCATTGCTACGAACCTT	AS
	ZIKV_400_31L	ACAAGGGGAATTTGGAAGGCC	S
	ZIKV_400_30R	TAATCCCAGCCCTTCAACACCA	AS
	ZIKV_400_32L	AAATGGAAAAAGGGCACAGGGC	S
<i>Amplicon 9</i>	ZIKV_400_33L	CAAACGAATGGCAGTCAGTGGA	S
	ZIKV_400_35R	ACCACTAGTCCCTTCTGGAG	AS
	ZIKV_400_34L	ATTTCCACAGAAGGGACCTCCG	S
	ZIKV_400_33R	ATCCACACTCTGTTCCACACCA	AS
	ZIKV_400_35L	ACCACCTGGGCTGAGAACATTA	S
	ZIKV_400_34R	TGACTAGCAGGCCTGACAACAT	AS

3.10 Sequenciamento de alto rendimento – Plataforma Illumina

A obtenção do genoma completo das passagens do vírus em cultura de células C6/36 e Aag-2 (P1, P2.1, P2.2, P5.1, P5.2, P10.1, P10.2, P15.1, P15.2, P20.1, P20.2, P25.1, P25.2, P30.1, P30.2, P35.1, P35.2, P40.1 e P40.2) deu-se por meio do sequenciamento de alta demanda, utilizando a tecnologia Illumina.

Inicialmente, por se tratar de mais de um *amplicon* para cada passagem, foi necessário fazer o pool dos *amplicons*, ou seja, unir os dois *amplicons* de cada passagem em Aag-2 e os três *amplicons* de cada passagem em C6/36. Para isso, cada *amplicon* previamente purificado por PEG foi quantificado no equipamento Qubit 2.0 com o *kit* Qubit dsDNA HS Assay (ThermoFisher, cat. Q32851) para utilização em quantidades equimolares.

O preparo das bibliotecas foi realizado com o *kit* Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina). As etapas de tagmentação enzimática, adição de adaptadores e indexes, amplificação, normalização e preparo do *pool* das bibliotecas foi realizada conforme descrito no manual do fabricante a partir de 1ng de DNA em 5µl. Antes de preparar o *pool* das bibliotecas, todas foram quantificadas utilizando o *kit* Qubit dsDNA HS Assay.

O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina) utilizando o *kit* de sequenciamento MiSeq Reagent v2 de 500 ciclos.

3.11 Montagem e análise das sequências

Os dados gerados após o sequenciamento capilar e os arquivos no formato FASTQ gerados a partir do sequenciamento Illumina foram analisados no software Geneious (versões 10.2.6 e *prime* 2021.2.1) para a montagem dos *contigs* de cada amostra e análise das sequências.

O *contig* da amostra de soro (P0) foi montado tomando como base a sequência de referência para o vírus Zika, depositada no *GenBank* sob o número de acesso NC_035889.1. Posteriormente a sequência finalizada de P1 serviu como referência para montagem das sequências das passagens do vírus em cultura de células.

Os *paired-reads* foram mapeados para a montagem dos diferentes *contigs* utilizando um workflow customizado pela nossa equipe no software *Geneious Prime* 2021.2.1. O primeiro passo consistia na remoção de adaptadores que por ventura tivessem permanecido após a geração dos arquivos FASTQ com a ferramenta *BBDuk* (*Adapter/Quality Trimming Version by Brian Bushnell*) versão 38.84, sob condições padrão, além da remoção de regiões de baixa qualidade (<QV30) em ambas as extremidades e remoção de *reads* menores que 30 bases. O segundo passo consistia na remoção das sequências dos primers usados para geração dos

amplicons, também utilizando a ferramenta *BBDuk* (tamanho de Kmer ≥ 21 ; número máximo de substituições = 3; e adaptadores parciais com tamanho de Kmer ≥ 15), seguida de nova remoção de regiões de baixa qualidade ($<QV30$) em ambas as extremidades e remoção de *reads* menores que 30 bases. Adicionamos o comando adicional *rcomp=f restrictleft=32* para garantir que fossem removidos somente as sequências de primers no início dos *reads* e no sentido senso, por se tratar de *paired-reads*.

O terceiro passo do workflow consistia na remoção de *reads* duplicados com a ferramenta *Dedupe* (*Duplicate Read Remover by Brian Bushnell*) versão 38.84, sob condições padrão (tamanho de Kmer seed = 31). O último passo do workflow consistia na montagem do *contig* propriamente dito utilizando a ferramenta *BBMap* (*DNA/RNAseq by Brian Bushnell*) versão 38.84, sob condições padrão (default) tendo como *template* a sequência consenso de P0. Ao final dessa etapa eram geradas as sequências consenso de cada uma das amostras sequenciadas.

Ainda com o software *Geneious Prime 2021.2.1* foi realizada a chamada de variantes minoritárias (*Find Variations/SNPs*), tomando como base a sequência finalizada de P1. Esta análise foi realizada de acordo com o tutorial do software, sendo consideradas as variantes que ocorressem em uma frequência mínima de 25% e com ao menos 100 vezes de cobertura.

3.12 Modelagem molecular comparativa de proteínas

Com o objetivo de identificar a posição e o contexto estrutural das mutações que resultaram em substituição de resíduo de aminoácidos, utilizamos a abordagem de modelagem comparativa de proteínas. Os modelos tridimensionais foram construídos para: 1) proteínas cujas sequências das ORFs apresentaram mutações não sinônimas nas sequências majoritárias; 2) para as proteínas cujas sequências das ORFs apresentavam mutações não sinônimas presentes nas variantes minoritárias de P40, tanto das sequências dos genomas obtidos da passagem em células C6/36 quanto em Aag-2.

As sequências nucleotídicas das passagens P1 e P40, das proteínas de interesse, foram deduzidas para a sequência de aminoácidos e os modelos foram construídos utilizando a abordagem de modelagem comparativa no servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>). Foi utilizada a abordagem automática para a busca de moldes (*templates*) e os melhores *templates* foram selecionados manualmente de acordo com a cobertura, identidade e resolução cristalográfica. Uma vez selecionados os melhores moldes, foi utilizada a abordagem automática do servidor para o alinhamento e construção dos modelos.

Os modelos gerados foram avaliados quanto a qualidade local e global pelos métodos

GMQE e QMEANDisCo Global fornecidos pelo próprio servidor do SWISS-MODEL. Além disso, avaliou-se também os parâmetros estereoquímicos por meio do gráfico de Ramachandran gerado no servidor MOLProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). Todos os modelos obtidos foram refinados no servidor online ModRefiner (<https://zhanggroup.org/ModRefiner/>) (164). Após a validação, os modelos foram salvos e manipulados utilizando o software pyMOL (TM) 2.5.2.

3.13 Titulação viral

Os vírus das passagens 2 (P2) e 40 (P40) em cada linhagem de células foram submetidos a titulação viral por citometria de fluxo para posterior utilização nos experimentos de avaliação do *fitness* viral. Inicialmente foi produzido o estoque viral de P2 e P40. Este estoque foi dividido em 20 alíquotas de 1ml contendo 10% de glicerol que permaneceram armazenadas em freezer -80°C. Uma alíquota foi utilizada para titulação e as demais permaneceram congeladas para experimentos posteriores.

A titulação viral foi realizada com base em protocolos previamente descritos (165,166). Foram inseridos controles *mock* (falso infectado) com e sem anticorpos. Todas as passagens foram tituladas em duplicata biológica e triplicata técnica. Foram utilizados 2 anticorpos, sendo um o monoclonal 4G2 anti-flavivírus em uma diluição 1:2000 e um anti-IgG de camundongo marcado com Alexa 488 na diluição 1:3000. Em todos os experimentos foi realizada a contagem e verificação da viabilidade das células com a utilização do contador automático Moxi Z (ORFLO Technologies) em cassetes tipo S.

Inicialmente as monocamadas de células C6/36 infectadas com os vírus de P2_C6/36, P40_C6/36, P2_Aag-2 e P40_Aag-2 foram lavadas duas vezes com PBS 1X e adicionou-se tripsina para soltar as células. Posteriormente foi adicionado meio de cultura suplementado com 2% de SFB e o sobrenadante contendo as células foi transferido para um tubo cônico de 50ml que foi levado à centrífuga em uma rotação de 500g por 5 minutos. Após este tempo houve uma etapa de lavagem com PBS 1X e posteriormente as células foram ressuspensas em 2ml de Cytofix (BD Biosciences, cat. 554714) sendo mantidas em banho de gelo e ao abrigo da luz por 20 minutos.

Após a incubação foram realizadas duas etapas de lavagem com Perm/wash gelado (BD Biosciences, cat. 554714) e 300.000 células de cada tubo foram transferidas para poços de placas de fundo V, sendo então adicionado 100µl do anticorpo primário 4G2 e seguiu-se etapa de incubação a 37°C por 50 minutos ao abrigo da luz.

Posteriormente foram realizadas mais duas etapas de lavagem com Perm/wash gelado e

então foi adicionado 100µl do anticorpo secundário, seguindo nova incubação a 37°C por 40 minutos ao abrigo da luz. Passado esse tempo realizou-se mais duas etapas de lavagem com Perm/wash gelado sendo as células ressuspensas em 200µl de Perm/wash.

A leitura foi realizada no citômetro de fluxo FACS Canto II instalado na plataforma de citometria do ILMD que foi programado para ler 100.000 eventos por amostra. As análises foram realizadas com a utilização dos softwares Flow Jo versão 7.6.5 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) e FCAP array (v.3.0.1). Para calcular o título viral utilizou-se a fórmula disponível nos artigos previamente publicados (165,166).

3.14 Análise da aptidão viral

Os vírus titulados de P2_C6/36, P40_C6/36, P2_Aag-2 e P40_Aag-2 foram utilizados para os experimentos de avaliação da competência viral *in vitro*, com a utilização de células C6/36 e Aag-2, e *in vivo* com ensaios realizados em mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

3.14.1 Testes in vitro

Os vírus P2_C6/36, P40_C6/36, P2_Aag-2 e P40_Aag-2 foram submetidos a testes de avaliação do *fitness* tanto em células C6/36 quanto Aag-2. Todos os experimentos foram realizados em duplicata biológica e os sobrenadantes e *pellets* de células foram retirados nos tempos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h pós infecção (figura 14).

As placas de 24 poços, contendo as células a serem utilizadas nos experimentos, foram preparadas 24h antes da infecção. No dia do inóculo as células de um poço de cada placa foram removidas com o auxílio do espalhador de células e foram contadas com o auxílio do equipamento Moxi Z. O número de células juntamente com a informação da viabilidade foi utilizado para calcular a multiplicidade de infecção (MOI). Em todos os inóculos dos experimentos de *fitness* foi utilizado um MOI de 0,1 para cada uma das amostras.

Os experimentos de *fitness* em C6/36 e em Aag-2 foram realizados em dias distintos. E as quatro amostras virais, P2_C6/36, P40_C6/36, P2_Aag-2 e P40_Aag-2, foram utilizadas para realização de inóculo em C6/36 e posteriormente em Aag-2.

As suspensões virais foram preparadas para que as quatro amostras ficassem com títulos iguais e fossem inoculadas em um MOI de 0,1. Foi adicionado 300µl de inóculo em cada poço da placa conforme layout apresentado na figura 14 e após uma hora de adsorção a monocamada foi novamente lavada com PBS 1X sendo acrescentado 1ml do meio ideal para cada célula, suplementado com 2% de SFB e antibióticos/antimicótico.

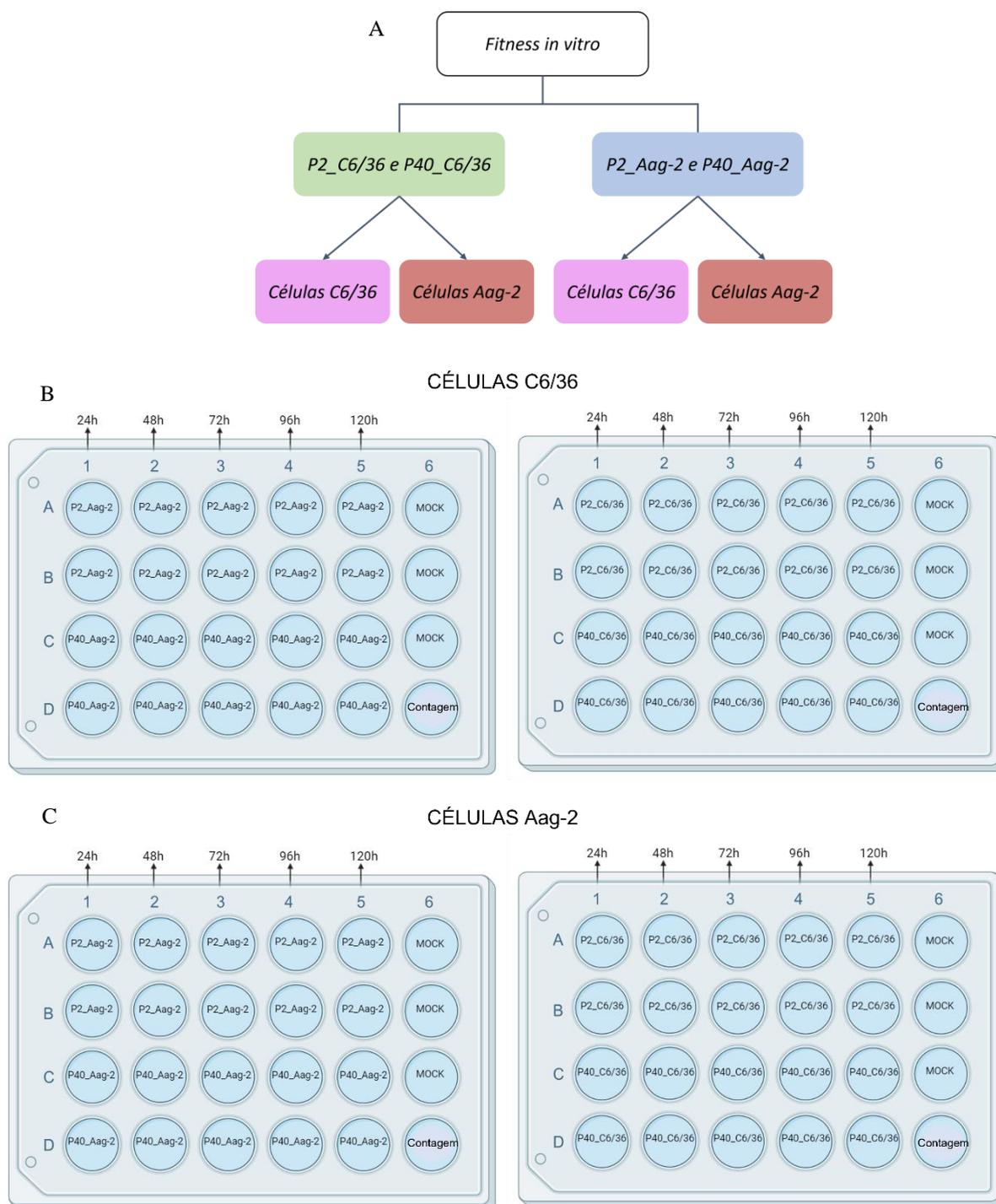


Figura 14: Representação esquemática do experimento de avaliação do fitness *in vitro*. A: Esquema dos testes de fitness *in vitro*. Na imagem B, observa-se o fitness em células C6/36, que foram inoculadas com os vírus de P2_C6/36, P40_C6/36, P2_Aag-2 e P40_Aag-2. Na imagem C, é apresentado o fitness em células Aag-2 que também foram inoculadas com os vírus de P2_C6/36, P40_C6/36, P2_Aag-2 e P40. Em ambos os experimentos (B e C) os inóculos foram feitos em duplicata biológica em cada tempo analisado. Na parte superior de cada placa estão destacados os tempos de retirada do sobrenadante e do pellet de células. Imagem criada no BioRender.com por Valdinete Nascimento.

Em cada um dos tempos predeterminados para recolhimento do sobrenadante e das células, foi inicialmente retirado o sobrenadante e colocado em criotubos, sendo um tubo para cada poço com a monocamada lavada por duas vezes com PBS 1X. Posteriormente foi utilizado

o espalhador de células para soltar a monocamada, sendo então acrescentado 1ml de meio para ressuspender as células, as quais foram recolhidas e armazenadas em criotubos devidamente identificados. Todos foram mantidos em freezer -80°C até o momento da utilização em experimentos posteriores.

3.14.2 Testes *in vivo*

Os ensaios de infecção *in vivo* foram realizados com fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* oriundas da colônia do Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia – ILMD/FIOCRUZ-AM. Os ovos de fêmeas que haviam sido testadas previamente para os arbovírus dengue, Zika, Chikungunya, Mayaro e Oropouche sendo negativas, foram colocados para eclosão sendo as larvas mantidas em bandejas de plástico contendo água, onde foram alimentadas com ração de peixe (TetraMin®) até a emergência dos adultos. Os mosquitos foram mantidos em ambiente com temperatura de 27°C e umidade relativa de 70%, sendo alimentados com sacarose 10% *ad libitum*.

Para os experimentos foram utilizadas fêmeas com 6 dias de vida que foram privadas de alimentação 24h antes da realização dos testes. A alimentação infecciosa foi preparada com os vírus das passagens P2_C6/36, P40_C6/36 e P40_Aag-2. Não foi possível realizar os testes com P2_Aag-2 por uma limitação do baixo título viral desta passagem que não permitia diluição suficiente para o experimento.

O preparo da alimentação infecciosa deu-se com a utilização de sangue humano que foi coletado em tubos BD Vacutainer® EDTA. O sangue foi centrifugado para separar o soro que foi inativado em banho seco a 56°C por 1h. Após a inativação, o soro foi novamente misturado aos outros componentes do sangue e foi adicionado o vírus com um título de 1×10^7 unidades infecciosas por ml. Foi utilizado um sistema composto por alimentadores de vidro conectados a um banho maria onde a água era mantida a 37°C e bombeada para todo o sistema (figura 15). Após a alimentação as fêmeas completamente ingurgitadas foram transferidas para gaiolas, mantidas a 27°C com 70% de umidade relativa e alimentadas com solução açucarada 10% *ad libitum*.



Figura 15: Sistema de alimentação artificial. Na imagem A pode-se observar o sistema de alimentação montado composto por alimentadores artificiais conectados ao banho maria mantido a 37°C. Na imagem B, é possível observar as fêmeas de mosquitos se alimentando. Imagens de arquivo pessoal.

Foram realizados dois experimentos distintos. O primeiro, consistiu na utilização de quatro grupos *Aedes aegypti* e quatro grupos de *Aedes albopictus*, que foram alimentados com os vírus P2_C6/36, P40_C6/36, P40_Aag-2 no título de 1×10^7 e um controle *mock*. Nos dias 8 e 14 pós infecção, 30 espécimes de cada grupo foram recolhidos e colocados inteiros, em tubos de 1,5ml, sendo submetidos a extração de material genético e a RT-PCR em tempo real (figura 16). O segundo experimento foi semelhante ao primeiro, porém nos dias 8 e 14 pós infecção, os mosquitos foram dissecados e as glândulas salivares foram colocadas em um microtubo e o intestino em outro. Esse procedimento foi realizado para 30 espécimes de cada grupo (figura 17).

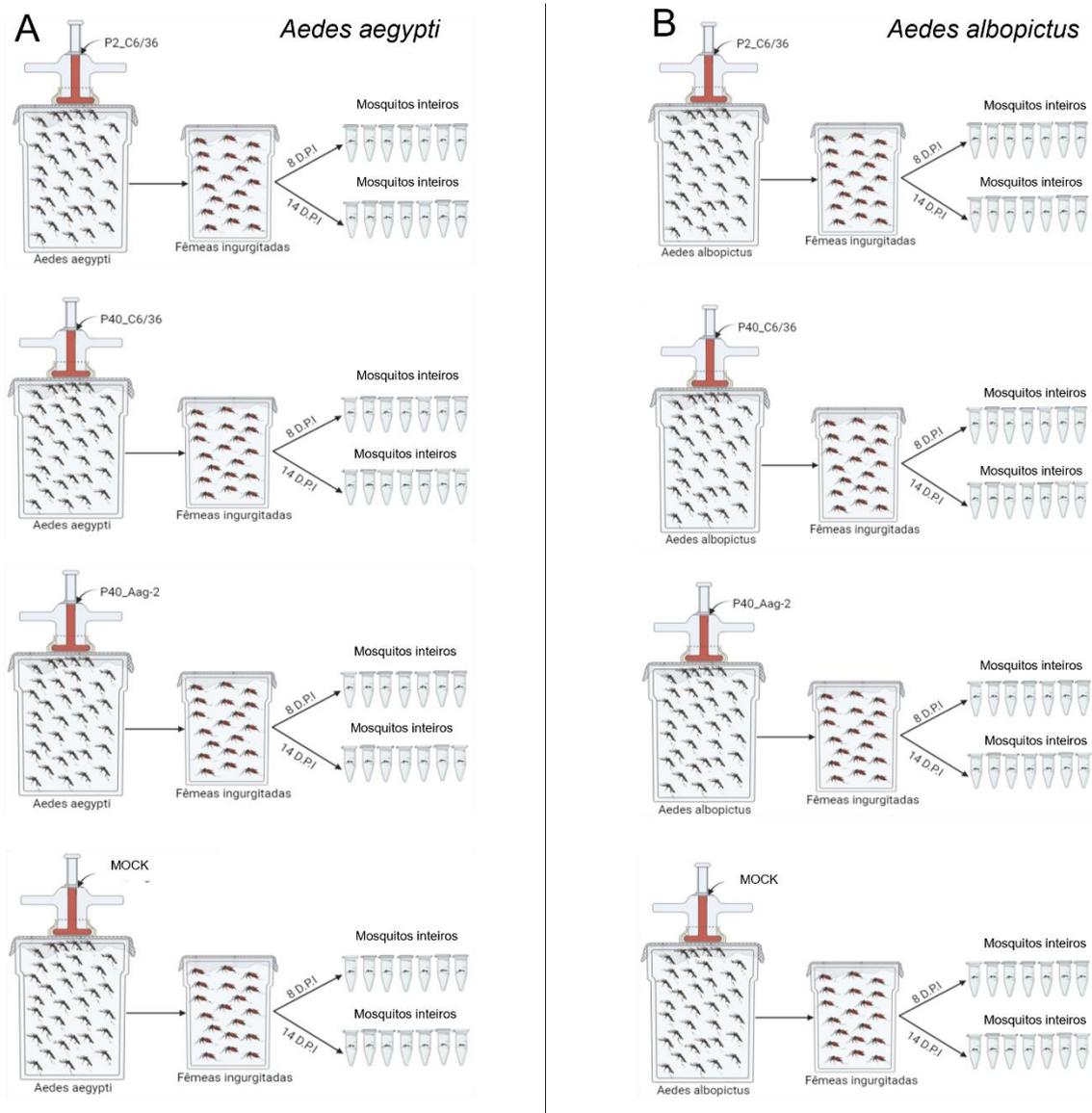


Figura 16: Representação esquemática do experimento de *fitness in vivo* no qual os mosquitos foram processados inteiros. A: Quatro grupos de mosquitos *Aedes aegypti* que foram alimentados com os vírus de P2_C6/36, P40_C6/36, P40_Aag-2 e o controle *mock*. As fêmeas ingurgitadas foram transferidas para outro pote e foram retiradas e processadas nos dias 8 e 14 pi. B: Quatro grupos de mosquitos *Aedes albopictus* que foram alimentados com os vírus de P2_C6/36, P40_C6/36, P40_Aag-2 e o controle *mock*. As fêmeas ingurgitadas foram transferidas para outro pote e foram retiradas e processadas nos dias 8 e 14 pi. Imagem criada no BioRender.com por Valdinete Nascimento.

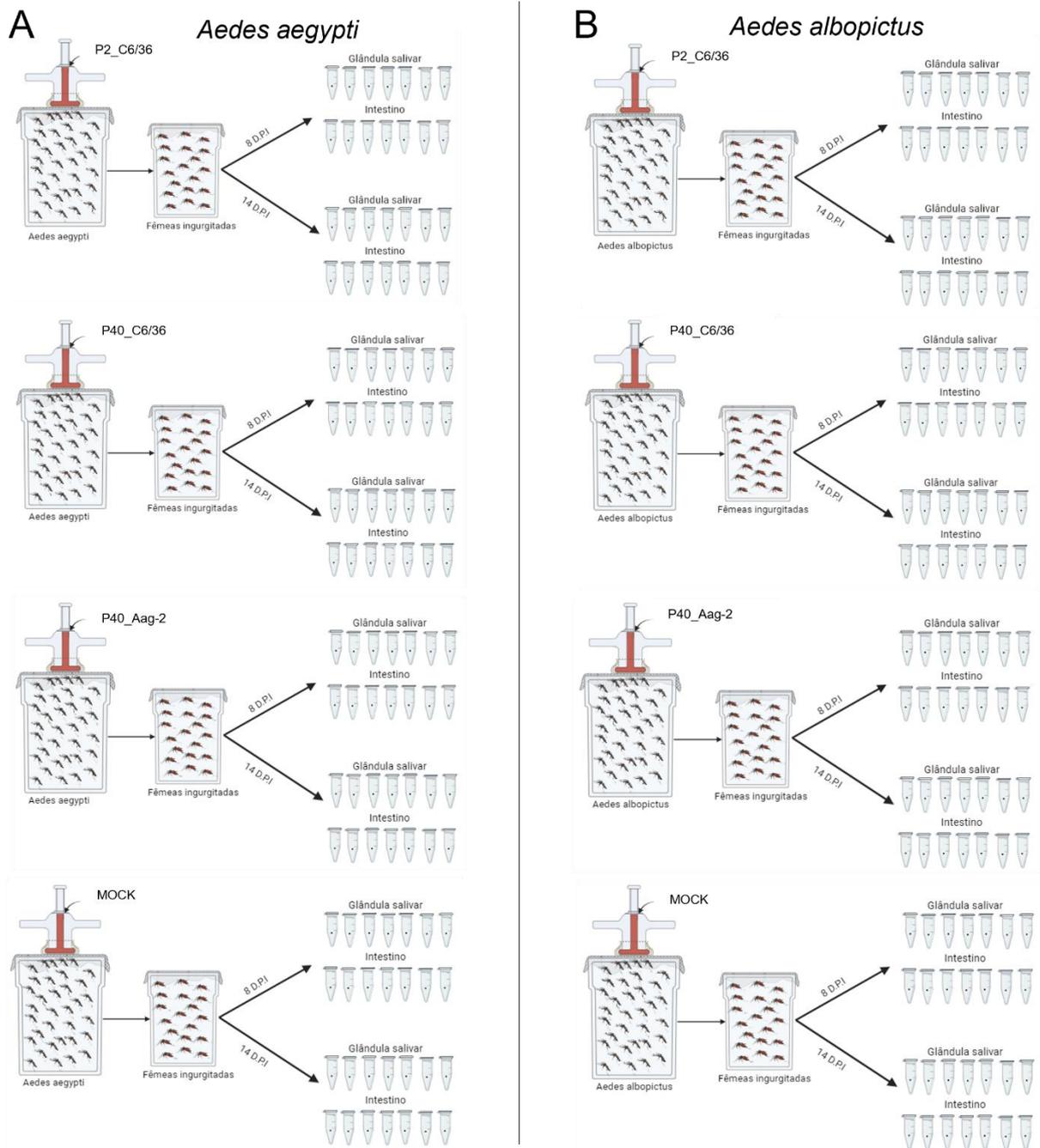


Figura 17: Representação esquemática do experimento de *fitness in vivo*, no qual os mosquitos foram dissecados. A: Quatro grupos de mosquitos *Aedes aegypti* foram alimentados com os vírus de P2_C6/36, P40_C6/36, P40_Aag-2 e o controle *mock*. As fêmeas ingurgitadas foram transferidas para outro pote e nos dias 8 e 14 pi foram dissecadas sendo as glândulas salivares colocadas em um microtubo e o intestino em outro. B: Quatro grupos de mosquitos *Aedes albopictus* foram alimentados com os vírus de P2_C6/36, P40_C6/36, P40_Aag-2 e o controle *mock*. As fêmeas ingurgitadas foram transferidas para outro pote e nos dias 8 e 14 pi foram dissecadas, sendo as glândulas salivares colocadas em um microtubo e o intestino em outro. Imagem criada no BioRender.com por Valdinete Nascimento.

A dissecação do intestino médio e das glândulas salivares foi realizada com o auxílio de estiletes estéreis e visualização em um estereomicroscópio (Leica EZ4). Ambos foram lavados por três vezes com 10 µL de PBS 1X, transferidos individualmente para microtubos de 2mL contendo 250 µL de Trizol[®] Reagente e armazenados à -80°C.

3.15 RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) para detecção do vírus Zika

Os RNAs obtidos das passagens P1, P2.1, P2.2, P5.1, P5.2, P10.1, P10.2, P15.1, P15.2, P20.1, P20.2, P25.1, P25.2, P30.1, P30.2, P35.1, P35.2, P40.1 e P40.2 em células C6/36 e Aag-2, bem como todos os RNAs procedentes dos experimentos de *fitness in vivo* e *in vitro* foram submetidos à testes de RT-PCR em tempo real para a detecção do RNA do ZIKV. Os RNAs oriundos dos experimentos de *fitness in vitro* foram processados em triplicata técnica. Os dados provenientes dos testes de *fitness* viral foram analisados por meio do método de $\Delta\Delta C_t$ tendo o MS2 e o RPS como controles endógenos (167).

As reações foram realizadas no equipamento QuantStudio[®] 5 Real-Time PCR system (ThermoFisher Scientific), utilizando o mix TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher, cat. 4444434). Foram realizadas reações multiplex para os alvos ZIKV envelope (15), MS2 (168) e RPS (169) que é uma proteína ribossomal de mosquitos e foi utilizada como controle endógeno, cujas sequencias de iniciadores e sondas são apresentadas na tabela 5. As reações foram de 10µl, todos os iniciadores ficaram em uma concentração final de 300nM e as sondas a uma concentração de 100nM.

Tabela 5: Conjuntos de iniciadores e sondas utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.

Alvo	Oligonucleotídeo	Sequência
ZIKV	ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG
	ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
	ZIKV 1107 - FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA
MS2	MS2_IC_FNF	GCGCAGAATCGCAAATACA
	MS2_IC_FNR	CAACAGTCTGGGTTGCCACTT
	MS2_IC_FNP – Quasar 705	ATCAAAGTCGAGGTGCC
RPS	RPS-17-F	CACTCCCAGGTCCGTGGTAT
	RPS-17-R	GGACACTTCCGGCACGTAGT
	RPS-17 - HEX	CAGGAGGAGGAACGTGAGCGCAG

3.16 Análise dos dados

Todos os dados das sequências obtidas foram tabulados e avaliados por estatística descritiva apresentando as variações encontradas no genoma ao longo do processo de adaptação em cultura de células. Além disso, foi realizada a chamada de variantes utilizando a ferramenta *Find Variations/SNPs* do software Geneious. Foram consideradas as variantes que possuíam no mínimo 100X de cobertura e apareciam com uma frequência mínima de 25%.

A análise de quantificação relativa utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ foi realizada no software *ThermoFisher Cloud* (versão 1.1) (<https://apps.thermofisher.com/>) utilizando um intervalo de confiança de 95% e o método estatístico Benjamin-Hochberg para ajustar os valores-p para a análise. Todos os gráficos foram editados no *GraphPad PRISM*.

Os resultados dos ensaios de PCR em tempo real dos experimentos realizados com os mosquitos foram ainda avaliados quanto a normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk disponível no *GraphPad PRISM* e assim foi aplicado o teste t de Student para o conjunto de dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Foi ainda montada uma tabela de contingência que utilizou o teste exato de Fisher bi-caudal para comparar a diferença na quantidade de mosquitos positivos e negativos de cada grupo.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos na presente pesquisa são apresentados nas seções abaixo, divididos em quatro principais tópicos. Sendo o primeiro relacionado ao processo de adaptação em culturas de células, seguido pelos tópicos de sequenciamento nucleotídico e modelagem de proteínas que são referentes às análises genotípicas e estruturais. Finalizando, é apresentado o item de avaliação do *fitness* viral, referente a etapa de avaliação fenotípica.

4.1 Adaptação em culturas de células

A escolha da amostra a ser utilizada neste trabalho deu-se a partir do levantamento do banco de dados das amostras positivas para ZIKV armazenadas no ILMD. Foram selecionadas 12 amostras, considerando o valor de Ct obtido no período do diagnóstico. Estas 12 amostras foram submetidas a tentativa de isolamento viral em células C6/36. Passados 10 dias de infecção os sobrenadantes foram recolhidos e testados por RT-qPCR no intuito de confirmar o isolamento viral.

Do total de 12 amostras submetidas ao isolamento em células C6/36, foi obtido sucesso com sete amostras (tabela 6). Destas, selecionamos a amostra 16110305_JFMB que havia sido positiva no diagnóstico para ZIKV com um Ct de 26,81 e no isolamento em células C6/36 apresentou Ct de 12,99. A escolha desta amostra deu-se ainda por conta do volume de plasma, levando em consideração a quantidade de inóculos e demais experimentos que seriam necessários no decorrer do projeto.

Tabela 6: Amostras positivas para ZIKV isoladas em células C6/36. (*) Amostra utilizada no desenvolvimento desta pesquisa.

Amostra	Ct diagnóstico	Ct #1 em células C6/36
16110005_TSA	23,61	10,2
16110031_LSO	26,77	33,47
16110063_VID	28,2	15,61
16110452_DAF	24,89	13,27
16110046_MKA	22,85	12,96
16110305_JFMB*	26,81	12,99
16110058_RCM	27,84	10,99

Uma vez selecionada a amostra deu-se início ao processo de passagens seriadas do vírus Zika, primeiro em células C6/36 e depois em células Aag-2. Foram realizadas duas séries de 40 passagens do vírus em cada uma das duas linhagens de células e não foi observado efeito

citopático. A cada 5 passagens os sobrenadantes eram testados por RT-PCR em tempo real para acompanhamento do processo (tabela 7).

Tabela 7: Resultados da reação de RT-PCR em tempo real do acompanhamento dos inóculos a cada cinco passagens.

Passagens em C6/36	Ct	Passagens em Aag-2	Ct
P1 C6/36	14,93	P1 Aag-2	26,54
P2 C6/36 série 1	14,17	P2 Aag-2 série 1	21,76
P2 C6/36 série 2	12,47	P2 Aag-2 série 2	21,34
P5 C6/36 série 1	14,75	P5 Aag-2 série 1	14,93
P5 C6/36 série 2	14,88	P5 Aag-2 série 2	14,77
P10 C6/36 série 1	14,43	P10 Aag-2 série 1	14,49
P10 C6/36 série 2	12,88	P10 Aag-2 série 2	14,56
P15 C6/36 série 1	12,07	P15 Aag-2 série 1	14,67
P15 C6/36 série 2	12,01	P15 Aag-2 série 2	13,93
P20 C6/36 série 1	13,16	P20 Aag-2 série 1	13,50
P20 C6/36 série 2	13,98	P20 Aag-2 série 2	13,98
P25 C6/36 série 1	13,83	P25 Aag-2 série 1	15,45
P25 C6/36 série 2	13,15	P25 Aag-2 série 2	14,50
P30 C6/36 série 1	12,95	P30 Aag-2 série 1	14,29
P30 C6/36 série 2	12,17	P30 Aag-2 série 2	13,57
P35 C6/36 série 1	15,14	P35 Aag-2 série 1	14,53
P35 C6/36 série 2	15,63	P35 Aag-2 série 2	14,35
P40 C6/36 série 1	14,76	P40 Aag-2 série 1	14,07
P40 C6/36 série 2	14,10	P40 Aag-2 série 2	14,97

O acompanhamento dos inóculos por PCR em tempo real permitiu observar que durante as passagens do vírus em células C6/36 o Ct detectado na PCR foi muito semelhante nas 40 passagens. Já na adaptação em células Aag-2, foi obtido um Ct mais alto nas duas primeiras passagens e posteriormente foi observado Ct semelhante até a passagem 40.

4.2 Sequenciamento nucleotídico

O genoma completo da amostra do plasma 16110305_JFMB foi obtido por sequenciamento capilar. Para isto foi necessário produzir nove amplicons que cobriam todo o genoma viral. Inicialmente realizamos testes com a finalidade de obter as melhores condições de amplificação. Foram avaliadas seis diferentes temperaturas (52°C, 55°C, 58°C, 60°C, 62°C e 65°C) de hibridização dos iniciadores e 1,5mM de MgCl₂. Ao analisar os resultados, decidimos utilizar a temperatura de 65°C para os 9 amplicons (figura 15).

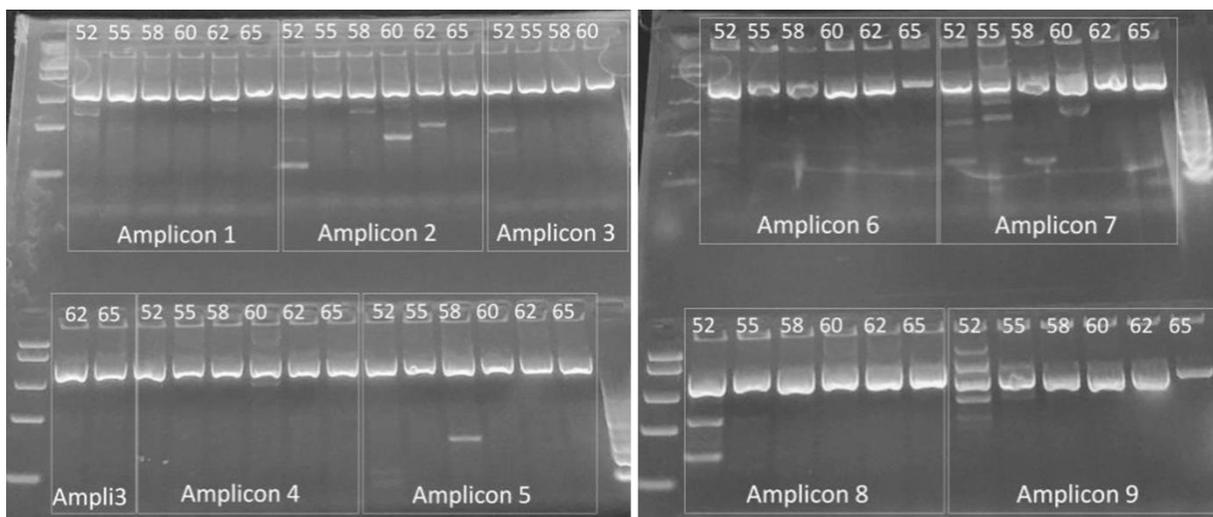


Figura 15: Eletroforese dos testes de temperaturas para obtenção dos nove amplicons.

Os nove amplicons da amostra do plasma 16110305_JFMB foram sequenciados e os eletroferogramas foram inicialmente avaliados de forma visual e posteriormente todos os dados foram analisados no software Geneious (v. 10.2.6) para alinhamento e obtenção de contigs, frente a sequência de referência para o vírus Zika, depositada no GenBank sob o número de acesso NC_035889. Esta sequência é originária de uma amostra coletada no ano de 2015, na cidade de Natal – Rio Grande do Norte/Brasil.

A análise mostrou 34 mutações em P0 quando comparada à sequência de referência, sendo duas na região codificante para o capsídeo, uma na prM, três na NS2A, duas na NS2B, uma na NS3, uma no peptídeo 2K, nove na NS4B, 11 na NS5 e três na região não codificante 3'UTR. Destas, cinco são mutações não sinônimas localizadas nas proteínas NS2A (Ileu/Phe), NS2B (Ala/Val), NS4B (Val/Ile; Ile/Thr), e NS5 (Lys/Thr). A sequência finalizada de P0 serviu como referência para a montagem de P1 C6/36 e P1_Aag-2.

4.2.1 Sequenciamento do vírus adaptado em células C6/36

Foi obtido o genoma completo (10.530 nucleotídeos ou 97,42% da sequência de referência NC_035889), das 19 passagens do vírus em células C6/36 submetidas ao sequenciamento nucleotídico (P1, P2.1, P2.2, P5.1, P5.2, P10.1, P10.2, P15.1, P15.2, P20.1, P20.2, P25.1, P25.2, P30.1, P30.2, P35.1, P35.2, P40.1 e P40.2) (tabela 8).

Tabela 8: Métricas obtidas no sequenciamento das passagens do vírus em células C6/36. ⁽¹⁾ Identificação da amostra. ⁽²⁾ Quantidade de reads que foram alinhadas no genoma de referência. ⁽³⁾ Média da Profundidade de cobertura. ⁽⁴⁾ Confiança média na chamada de bases.

⁽¹⁾ Id	Reads	⁽²⁾ Reads mapeadas	⁽³⁾ MPC	⁽⁴⁾ Qualidade Q30
P1_C6/36	262904	180487	4065	99,7
P2.1_C6/36	378718	283880	4192	99,7
P2.2_C6/36	462198	332746	4561	99,7
P5.1_C6/36	497618	365990	5266	99,7
P5.2_C6/36	329038	234082	3370	99,7
P10.1_C6/36	495072	365770	6627	99,7
P10.2_C6/36	197832	139543	1915	99,6
P15.1_C6/36	251598	185417	2539	99,6
P15.2_C6/36	601056	415178	6559	99,7
P20.1_C6/36	530062	380241	6465	99,7
P25.1_C6/36	788796	584787	10141	99,6
P25.2_C6/36	88432	66440	979	99,6
P30.1_C6/36	436766	334280	5749	99,6
P30.2_C6/36	252492	193225	2849	99,7
P35.1_C6/36	268920	204227	3040	99,7
P35.2_C6/36	613708	444389	7237	99,7
P40.1_C6/36	407230	298131	5529	99,7
P40.2_C6/36	738878	483341	10130	99,7

Todas as amostras apresentaram qualidade Q30 \geq 99,6%. A quantidade de *reads* obtidas variou entre 88.432 em P25.2_C6/36 e 788.796 em P25.1_C6/36, das quais 66.440 e 584.787 foram mapeadas, respectivamente. A menor média de profundidade de cobertura obtida foi em P25.2_C6/36 com 979X e a maior foi em P25.1_C6/36 com 10.141X.

A análise das mutações foi feita por meio da comparação com o genoma obtido na passagem 1. Só foram consideradas para esta análise as mutações ocorridas nas duas séries de cada passagem.

Inicialmente analisamos a sequência consenso, comparando P1 com P40. Por meio desta análise foram observadas duas substituições de nucleotídeos em P40. Uma substituição ocorreu na região codificante para NS1 na posição 3038, com cobertura de 1025 vezes na série 1 e de 597 vezes na série 2, sendo detectada com frequência de 63,9% e 67,2% em cada série respectivamente. Essa substituição foi uma transição mutando de uma timina para citosina e ocorreu na terceira posição do códon (GTT > GTC) sendo uma mutação sinônima. A outra substituição foi uma transição que ocorreu na posição 6227 na região codificante para NS3 com uma cobertura de 4076 vezes na série 1 e 15109 vezes na série 2, apresentando frequência de 67,6% e 63,8% em cada série. Esta foi uma mutação sinônima que ocorreu na terceira posição do códon mudando de uma adenina para guanina (AGA > AGG).

Após a análise da sequência consenso, realizamos a chamada de variantes utilizando a ferramenta disponível no software *Geneious Prime*. Todas as análises foram realizadas frente a sequência finalizada de P1. Com os dados obtidos foi possível observar a existência de cinco sítio variáveis em P1; três sítios variáveis em P2; dois sítios variáveis nas sequências das passagens P5, P10 e P15; três sítios variáveis em P25 e P30 e seis e 13 sítios variáveis respectivamente nas passagens P35 e P40 (tabela 9).

Os sítios variáveis ocorreram nos nucleotídeos 3038 (NS1), 3994 (NS2A), 4321 (NS2B), 4527 (NS2B), 5785 (NS3), 5841 (NS3), 5950 (NS3), 6117 (NS3), 6227 (NS3), 6274 (NS3), 6372 (NS3), 7897 (NS5), 8467 (NS5), 8632 (NS5), 9218 (NS5), 10521 (3'UTR), 10522 (3'UTR) e 10524 (3'UTR). Destes, quatro apareceram apenas em P1 e não foram mais detectados já na segunda passagem (4321, 10521, 10522 e 10524), além destes, o sítio variável em 8362 apareceu apenas em P2, não sendo posteriormente observado.

Por meio da chamada de variantes observamos que as mutações ocorridas na sequência consenso já existiam desde as passagens iniciais, sendo que a 6227 já aparecia em P1 com uma frequência de 36,60%, enquanto a mutação no nucleotídeo 3038 foi detectada a partir de P2 com uma frequência de cerca de 45%. Ambas as mutações se tornaram majoritárias a partir da P5 e assim permaneceram até a P40.

A análise das variantes minoritárias mostrou também que a população viral se manteve pouco variável até a passagem P30 onde foram observados no máximo 3 sítios variáveis. Essa variabilidade começou a aumentar em P35 e deu um salto em P40 onde foram observados 13 sítios variáveis dos quais sete foram detectados apenas nesta passagem (4527, 5785, 5950, 6117, 6372, 7897 e 9812).

Tabela 9: Sítios variáveis detectados no genoma do ZIKV adaptado em células C6/36. S1: Série de passagens 1. S2: Série de passagens 2. Freq. var.: Frequência das variantes detectadas. Na coluna códon, a nucleotídeo mutante está destacado em negrito para sinalizar a posição da mutação no códon.

Passagem	Tipo de polimorfismo	Sítio	Mutação	Códon	Tipo de mutação	Mudança de aminoácido	Cobertura S1	Cobertura S2	Freq. var. S1	Freq. var. S2
P.1_C6/36	SNP (transversão)	4321	C -> A	GCC -> GAC	NS	Ala -> Asp	489		28,40%	
P.1_C6/36	SNP (transição)	6227	A -> G	AGA -> AGG	S		3602		36,60%	
P.1_C6/36	SNP	10521	C -> T				3084		25,80%	
P.1_C6/36	SNP	10522	C -> A				3334		26,90%	
P.1_C6/36	SNP	10524	G -> T				3736		27,70%	
P.2_C6/36	SNP (transição)	3038	T -> C	GTT -> GTC	S		3215	4968	45,4%	46,7%
P.2_C6/36	SNP (transição)	6227	A -> G	AGA -> AGG	S		3041	4476	41,5%	43,5%
P.2_C6/36	SNP (transição)	8632	T -> C	ATA -> ACA	NS	Ile -> Thr	3884	4378	31,9%	33,6%
P.5_C6/36	SNP (transição)	3038	T -> C	GTT -> GTC	S		3909	2651	52,9%	54,0%
P.5_C6/36	SNP (transição)	6227	A -> G	AGA -> AGG	S		2998	3333	49,7%	50,7%
P.10_C6/36	SNP (transição)	3038	T -> C	GTT -> GTC	S		2362	1133	63,0%	62,1%
P.10_C6/36	SNP (transição)	6227	A -> G	AGA -> AGG	S		5230	2052	57,8%	58,1%
P.15_C6/36	SNP (transição)	3038	T -> C	GTT -> GTC	S		2135	4098	64,9%	67,3%
P.15_C6/36	SNP (transição)	6227	A -> G	AGA -> AGG	S		1917	3698	63,4%	65,0%
P.20_C6/36	SNP (transição)	3038	T -> C	GTT -> GTC	S		1656		72,6%	72,6%
P.20_C6/36	SNP (transição)	6227	A -> G	AGA -> AGG	S		4815		71,0%	71,0%
P.25_C6/36	SNP (transição)	3038	T -> C	GTT -> GTC	S		5187	841	71,3%	70,4%
P.25_C6/36	SNP (transição)	6227	A -> G	AGA -> AGG	S		8696	1732	72,6%	69,6%
P.25_C6/36	SNP (transição)	6274	T -> C	ATA -> ACA	NS	Ile -> Thr	8566	1792	30,6%	25,4%
P.30_C6/36	SNP (transição)	3038	T -> C	GTT -> GTC	S		2294	1731	64,3%	71,2%
P.30_C6/36	SNP (transição)	6227	A -> G	AGA -> AGG	S		4693	2186	66,0%	64,4%

Continuação da tabela 9

Passagem	Tipo de polimorfismo	Sítio	Mutação	Códon	Tipo de mutação	Mudança de aminoácido	Cobertura S1	Cobertura S2	Freq. var. S1	Freq. var. S2
P.30_C6/36	SNP (transição)	6274	T -> C	ATA -> ACA	NS	Ile -> Thr	4731	2322	39,2%	37,0%
P.35_C6/36	SNP (transição)	3038	T -> C	GTT -> GTC	S		1310	2874	73,7%	71,5%
P.35_C6/36	SNP (transição)	3994	T -> C	ATC -> ACC	NS	Ile -> Thr	1945	4502	31,4%	27,5%
P.35_C6/36	SNP (transição)	5841	G -> A	GAC -> AAC	NS	Asp -> Asn	2171	3974	41,0%	39,5%
P.35_C6/36	SNP (transição)	6227	A -> G	AGA -> AGG	S		3335	6755	69,5%	65,5%
P.35_C6/36	SNP (transição)	6274	T -> C	ATA -> ACA	NS	Ile -> Thr	3349	6669	32,4%	37,8%
P.35_C6/36	SNP (transição)	8467	T -> C	GTA -> GCA	NS	Val -> Ala	3545	8652	32,4%	26,5%
P.40_C6/36	SNP (transição)	3038	T -> C	GTT -> GTC	S		1025	597	63,9%	67,2%
P.40_C6/36	SNP (transição)	3994	T -> C	ATC -> ACC	NS	Ile -> Thr	2503	800	39,6%	40,9%
P.40_C6/36	SNP (transição)	4527	G -> A	GTC -> ATC	NS	Val -> Ile	5439	1801	33,3%	31,5%
P.40_C6/36	SNP (transversão)	5785	T -> A	TTT -> TAT	NS	Phe -> Tyr	2279	8361	25,8%	26,1%
P.40_C6/36	SNP (transição)	5841	G -> A	GAC -> AAC	NS	Asp -> Asn	2508	9081	36,6%	37,4%
P.40_C6/36	SNP (transversão)	5950	T -> G	ATG -> AGG	NS	Met -> Arg	2717	10908	29,5%	25,2%
P.40_C6/36	SNP (transição)	6117	G -> A	GGC -> AGC	NS	Gly -> Ser	3683	14588	30,6%	30,4%
P.40_C6/36	SNP (transição)	6227	A -> G	AGA -> AGG	S		4076	15109	67,6%	63,8%
P.40_C6/36	SNP (transição)	6274	T -> C	ATA -> ACA	NS	Ile -> Thr	4177	15113	36,7%	38,4%
P.40_C6/36	SNP (transversão)	6372	A -> C	AAA -> CAA	NS	Lys -> Gln	4198	13732	29,9%	25,6%
P.40_C6/36	SNP (transição)	7897	T -> C	GTC -> GCC	NS	Val -> Ala	2488	6750	27,0%	32,0%
P.40_C6/36	SNP (transição)	8467	T -> C	GTA -> GCA	NS	Val -> Ala	3249	8183	35,5%	36,0%
P.40_C6/36	SNP (transição)	9218	A -> G	GGA -> GGG	S		1903	5073	26,5%	31,8%

4.2.2 Sequenciamento do vírus adaptado em células Aag-2

Foi obtido também o genoma completo (10.530 nucleotídeos ou 97,42% da sequência de referência NC_035889) de todas as passagens do vírus em células Aag-2 submetidas ao sequenciamento nucleotídico (P1, P2.1, P2.2, P5.1, P5.2, P10.1, P10.2, P15.1, P15.2, P20.1, P20.2, P25.1, P25.2, P30.1, P30.2, P35.1, P35.2, P40.1 e P40.2) (tabela 10).

Tabela 10: Métricas obtidas no sequenciamento das passagens do vírus em células Aag-2. ⁽¹⁾ Identificação da amostra. ⁽²⁾ Quantidade de *reads* que foram alinhadas no genoma de referência. ⁽³⁾ Média da Profundidade de cobertura. ⁽³⁾ Confiança média na chamada de bases.

⁽¹⁾ Id	Reads	⁽²⁾ Reads mapeadas	⁽³⁾ MPC	⁽⁴⁾ Qualidade Q30
P1_Aag-2	237570	180778	2504	99,4
P2.1_Aag-2	225944	175257	2336	99,6
P5.1_Aag-2	372132	262323	3951	99,6
P5.2_Aag-2	352286	250564	3754	99,6
P10.1_Aag-2	195070	182268	2645	99,6
P10.2_Aag-2	151886	146234	2033	99,6
P15.1_Aag-2	193650	136169	2318	99,6
P15.2_Aag-2	178114	125059	1755	99,6
P20.1_Aag-2	134732	95914	1521	99,6
P20.2_Aag-2	181652	130888	2109	99,6
P25.1_Aag-2	337010	251767	3328	99,6
P25.2_Aag-2	390216	293518	3707	99,6
P30.1_Aag-2	218802	156061	2495	99,6
P30.2_Aag-2	265790	190261	2503	99,6
P35.1_Aag-2	357928	257605	4092	99,6
P35.2_Aag-2	230616	173033	3883	99,5
P40.1_Aag-2	181662	140492	2200	99,6
P40.2_Aag-2	184366	145345	2544	99,6

Todas as amostras apresentaram qualidade média Q30 \geq 99,4%. A quantidade de *reads* obtidas variou entre 134.732 em P20.1_Aag-2 e 390.216 em P25.2_Aag-2, das quais 95.914 e 293.518 foram mapeadas, respectivamente. A menor cobertura média obtida foi em P20.1_Aag-2 com 1.521X e a maior foi em P35.1_Aag-2 com 4.092X.

A avaliação das mutações foi feita por meio da comparação com o genoma obtido na passagem 1. Semelhante às análises com as passagens em C6/36, Só foram consideradas para esta análise as mutações ocorridas nas duas séries de cada passagem.

A análise da sequência consenso, comparando P1 com P40 mostrou a ocorrência de uma mutação não sinônima do tipo transição na região codificante para NS5, no nucleotídeo 9966 mudando de uma citosina para uma timina, resultando na substituição do aminoácido leucina por uma fenilalanina (Leu / Phe), ambos apolares. Foi possível observar também que em P1 na

posição 2988 existia uma mistura de bases A e G (representada por R) e na P40 foi observado a ocorrência de uma guanina.

Realizamos também a chamada de variantes que retornou à ocorrência de dois sítios variáveis ao longo de todas as passagens. O primeiro sítio variável foi detectado na posição 2988 desde a P1, com a ocorrência de uma população mista com 45% contendo uma adenina e 55% contendo uma guanina. A partir da P5 a população contendo G passou a ser predominante com uma frequência maior que 90% e assim permaneceu até a P40. O segundo sítio variável foi detectado na posição 9966 a partir de P15 com frequência de cerca de 28%. Este passou a ser majoritário nas duas séries a partir de P35 com frequências de 81,1% e 59,2% respectivamente.

Tabela 11: Sítios variáveis detectados no genoma do ZIKV adaptado em células Aag-2. S1: Série de passagens 1. S2: Série de passagens 2. Freq. var.: Frequência das variantes detectadas. Na coluna códon, a nucleotídeo mutante está destacado em negrito para sinalizar a posição da mutação no códon.

Passagem	Tipo de polimorfismo	Sítio	*Mutação	Códon	Tipo de mutação	**Mudança de aminoácido	Cobertura S1	Cobertura S2	Freq. Var. S1	Freq. Var. S2
P.1_Aag-2	SNP	2988	R -> A	RTC -> ATC	NS	X -> Ile	3048		45.0%	
P.1_Aag-2	SNP	2988	R -> G	RTC -> GTC	NS	X -> Val	3048		55.0%	
P.5_Aag-2	SNP	2988	R -> G	RTC -> GTC	NS	X -> Val	2762	2881	99.3%	99.7%
P.10_Aag-2	SNP	2988	R -> G	RTC -> GTC	NS	X -> Val	3252	2111	99.8%	99.9%
P.15_Aag-2	SNP	2988	R -> G	RTC -> GTC	NS	X -> Val	1895	1674	98.9%	99.9%
P.15_Aag-2	SNP (transição)	9966	C -> T	CTT -> TTT	NS	Leu -> Phe	1181	1370	29.9%	28.0%
P.20_Aag-2	SNP	2988	R -> G	RTC -> GTC	NS	X -> Val	1388	1460	99.1%	99.9%
P.25_Aag-2	SNP	2988	R -> G	RTC -> GTC	NS	X -> Val	2096	2574	99.5%	99.8%
P.30_Aag-2	SNP	2988	R -> G	RTC -> GTC	NS	X -> Val	1874	2452	99.9%	99.6%
P.30_Aag-2	SNP (transição)	9966	C -> T	CTT -> TTT	NS	Leu -> Phe	1730	1772	44.0%	66.9%
P.35_Aag-2	SNP	2988	R -> G	RTC -> GTC	NS	X -> Val	2112	4062	99.4%	99.5%
P.35_Aag-2	SNP (transição)	9966	C -> T	CTT -> TTT	NS	Leu -> Phe	3389	1017	81.1%	59.2%
P.40_Aag-2	SNP	2988	R -> G	RTC -> GTC	NS	X -> Val	1859	2846	99.9%	99.2%
P.40_Aag-2	SNP (transição)	9966	C -> T	CTT -> TTT	NS	Leu -> Phe	1500	972	90.9%	53.0%

*O nucleotídeo representado pela letra R na coluna de mutações, indica a ocorrência de uma população mista nesta posição, podendo neste caso ser um G ou A.

**O aminoácido representado pela letra X, indica um aminoácido indeterminado.

4.3 Modelagem molecular comparativa

A obtenção do modelo tridimensional foi realizada para as passagens P1 e P40 das proteínas que apresentaram mutação com substituição de aminoácido na sequência majoritária e nas sequências mutantes presentes nas variantes minoritárias de P40 do vírus adaptado tanto nas células C6/36, quanto em Aag-2.

4.3.1 Modelagem molecular comparativa - Passagens do vírus em células C6/36

A sequência consenso majoritária de P40 em C6/36 não apresentou mutações não sinônimas, entretanto a análise das variantes minoritárias apresentou 10 mutações que resultam na substituição de resíduos de aminoácidos, sendo uma na NS2A (3394), uma na NS2B (4527), seis na NS3 (5785, 5841, 5950, 6117, 6274 e 6372) e duas na NS5 (7897 e 8467). Foi, portanto, realizada a modelagem destas proteínas com essas substituições.

A busca por modelos para a construção da estrutura tridimensional das proteínas NS2A e NS2B não recuperou resultados satisfatórios, sendo que não foi detectado molde para NS2A e para NS2B nenhum molde detectado apresentava cobertura acima de 40%. Desta forma não foi realizada a modelagem dessas duas estruturas.

4.3.1.1 NS3

A sequência de 617 aminoácidos da proteína NS3, tanto mutante (P40) quanto selvagem (P1), foi utilizada para a obtenção do modelo tridimensional. A busca automática de possíveis modelos retornou 7.313 modelos não filtrados e o algoritmo automático do SWISS-MODEL reduziu para 50 estruturas. Foi então realizada uma análise de forma manual dos *templates* considerando a identidade, cobertura e a resolução, assim foram selecionados 10 *templates* que serviram como molde para a construção do modelo tridimensional.

Em função dos resultados dos testes de estimativa da qualidade global e por resíduo GMQE e QMEANDisCo Global, foram selecionadas três estruturas que foram avaliadas no MolProbity. Com base no resultado obtido foi escolhida a estrutura gerada utilizando como “*template*” o arquivo 5yvj.1.A, que contém as coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica da proteína NS3 do vírus dengue sorotipo 4, obtido da difração de raios-X com uma resolução de 2,51 Å. A estrutura 5yvj.1.A, serviu de molde para a obtenção de todos os modelos mutantes da NS3.

Foram obtidos sete modelos, sendo um para a proteína selvagem e outros seis para as mutações. Tais mutações ocorreram nos nucleotídeos 5785, 5841, 5950, 6117, 6274 e 6372,

posição esta em relação ao genoma completo da RefSeq NC_035889, que foram apresentadas na tabela 9. No que se refere a posição na proteína, elas estão nos aminoácidos 391 (Phe / Try), 410 (Asp / Asn), 446 (Met / Arg), 502 (Gli / Ser), 554 (Ile / Thr) e 587 (Lys / Gln) respectivamente.

A obtenção dos modelos estruturais permitiu observar a região da proteína em que estas mutações se encontram. Todas estão localizadas na região C-terminal, domínio NTPase-helicase. Sendo que as mutações nos sítios 391 (figura 16), 410 (figura 17) estão localizadas em estruturas de alfa hélice. Já as mutações 446 (figura 18), 502 (figura 19) e 554 (figura 20) estão localizadas em região de loop e a mutação 587 (figura 21) localiza-se em estrutura de folhas beta.

De todas as estruturas obtidas, apenas na mutação 391 foi possível observar uma pequena mudança conformacional na região do aminoácido mutante, que neste caso mudou de aminoácido apolar para um polar neutro. Nas demais estruturas, mesmo mudando de um aminoácido apolar para um polar como no caso da mutação 446, não foi observada mudança conformacional, o que é possível observar de forma detalhada na imagem com as estruturas alinhadas.

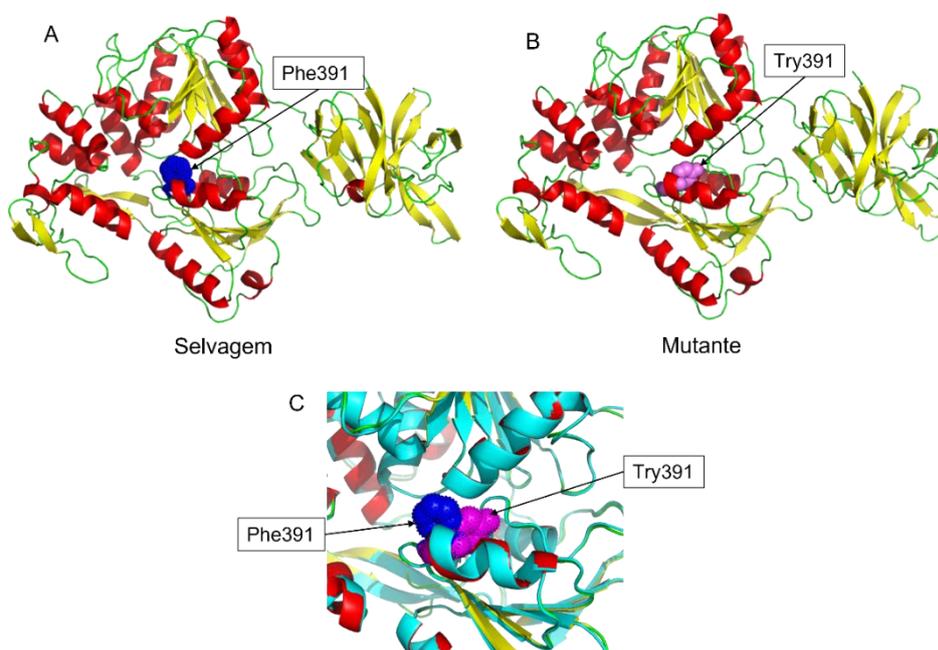


Figura 16: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 391. Em vermelho estão as alfa-hélices, em amarelo as estruturas de folhas beta e em verde as regiões de loop. (A) proteína selvagem com o sítio 391 representado na forma de esferas e destacado em azul. (B) Proteína mutante com o sítio 391 destacado em cor de rosa. (C) zoom das estruturas selvagem e mutante alinhadas, com destaque para o sítio 391.

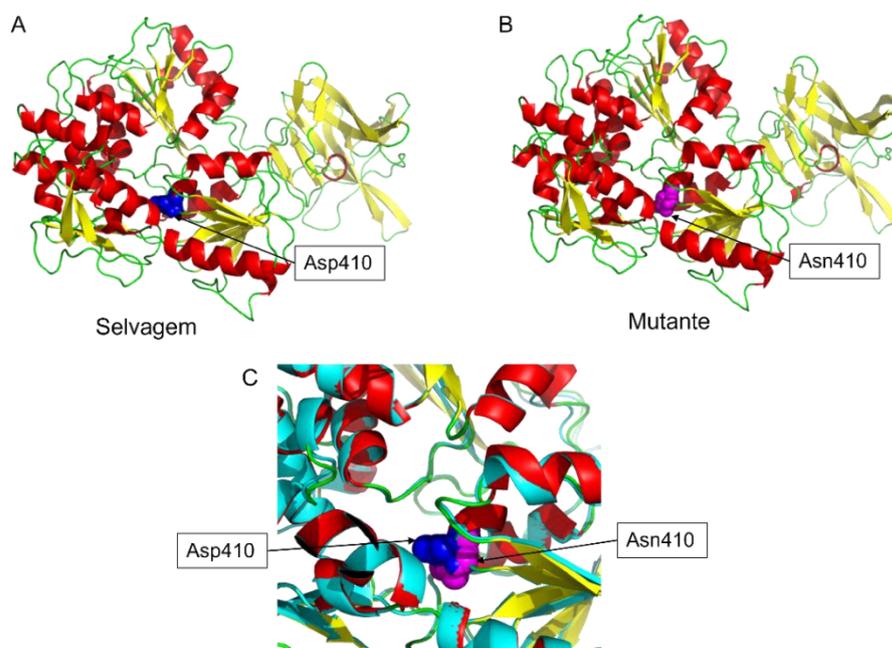


Figura 17: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 410. Em vermelho estão as alfa-hélices, em amarelo as estruturas de folhas beta e em verde as regiões de loop. (A) proteína selvagem com o sítio 410 representado na forma de esferas e destacado em azul. (B) Proteína mutante com o sítio 410 destacado em cor de rosa. (C) zoom das estruturas selvagem e mutante alinhadas, com destaque para o sítio 410.

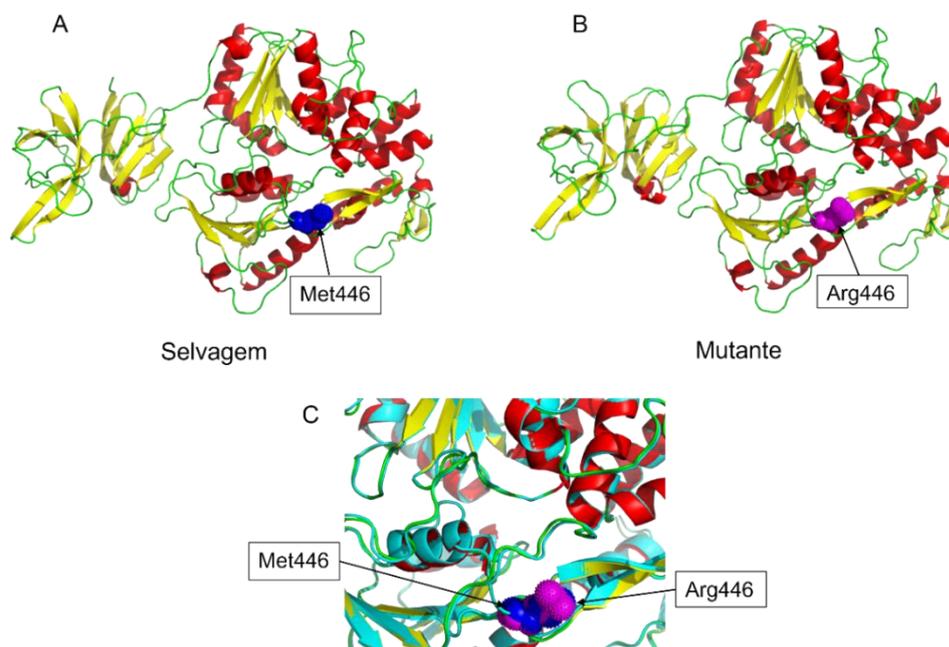


Figura 18: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 446. Em vermelho estão as alfa-hélices, em amarelo as estruturas de folhas beta e em verde as regiões de loop. (A) proteína selvagem com o sítio 446 representado na forma de esferas e destacado em azul. (B) Proteína mutante com o sítio 446 destacado em cor de rosa. (C) zoom das estruturas selvagem e mutante alinhadas, com destaque para o sítio 446.

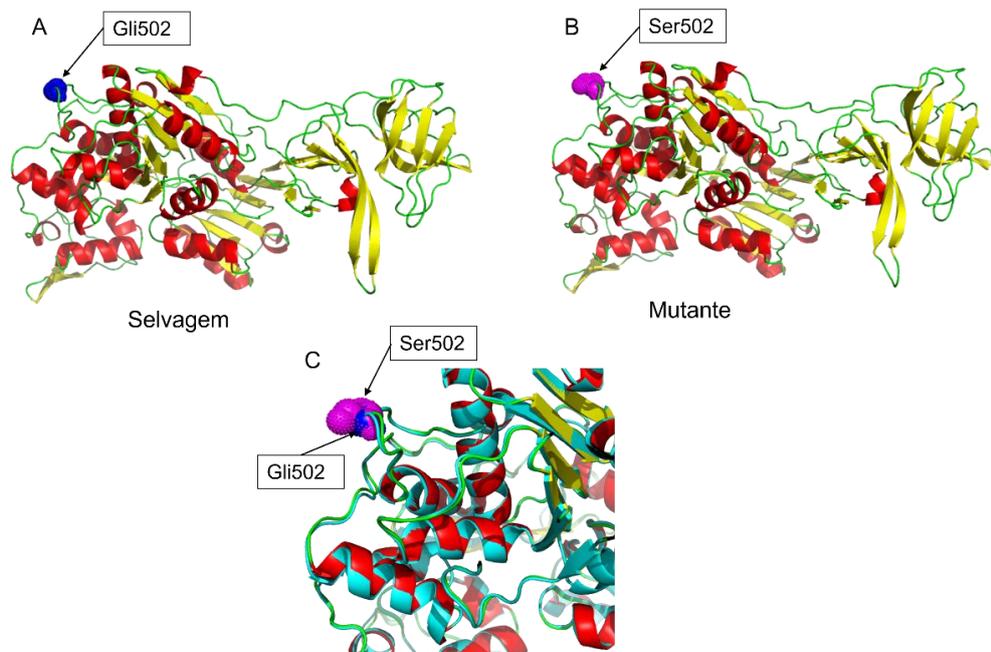


Figura 19: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 502. Em vermelho estão as alfa-hélices, em amarelo as estruturas de folhas beta e em verde as regiões de loop. (A) proteína selvagem com o sítio 502 representado na forma de esferas e destacado em azul. (B) Proteína mutante com o sítio 502 destacado em cor de rosa. (C) zoom das estruturas selvagem e mutante alinhadas, com destaque para o sítio 502.

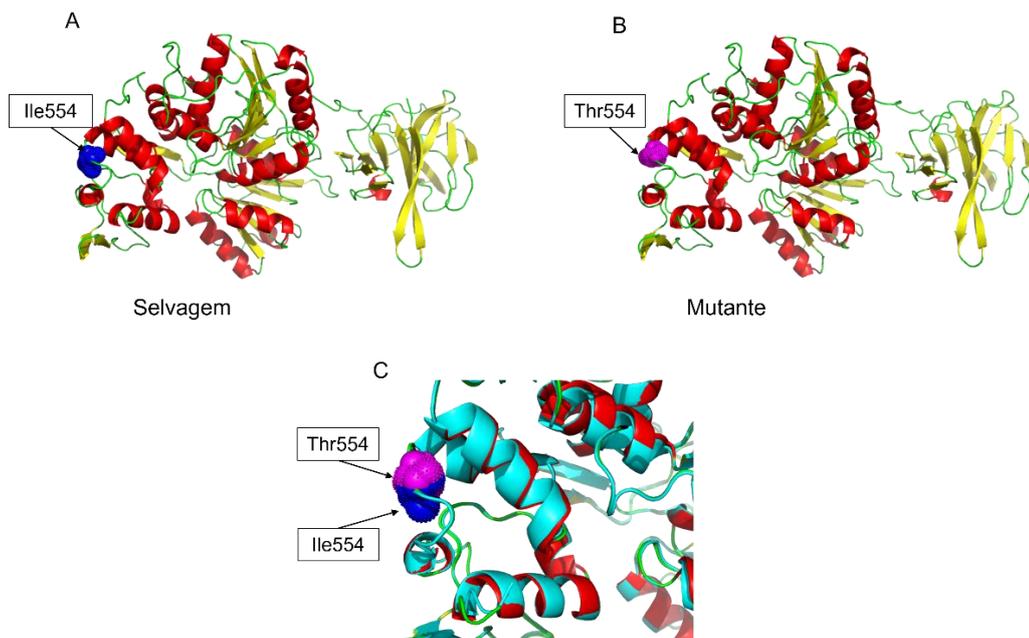


Figura 20: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 554. Em vermelho estão as alfa-hélices, em amarelo as estruturas de folhas beta e em verde as regiões de loop. (A) proteína selvagem com o sítio 554 representado na forma de esferas e destacado em azul. (B) Proteína mutante com o sítio 554 destacado em cor de rosa. (C) zoom das estruturas selvagem e mutante alinhadas, com destaque para o sítio 554

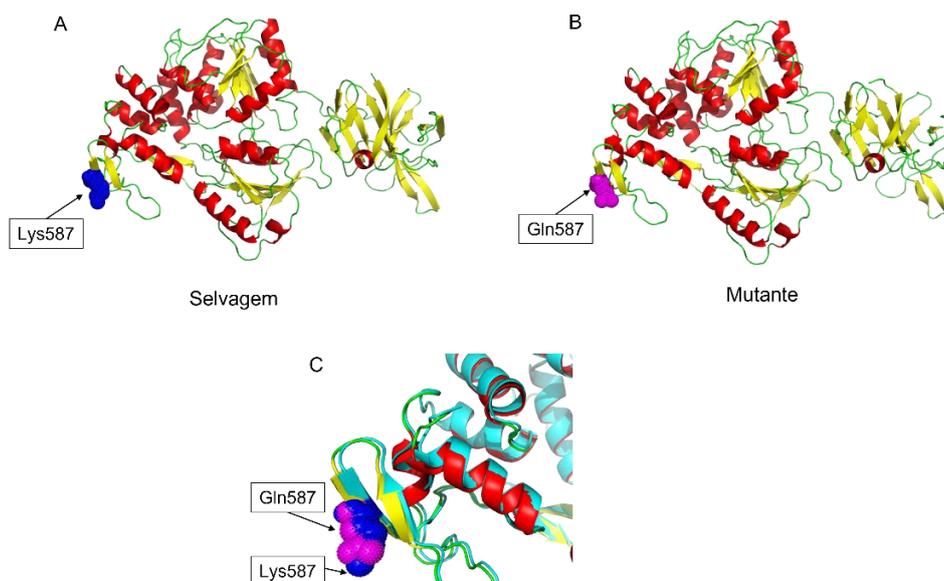


Figura 21: Modelo tridimensional da proteína NS3 com mutação no aminoácido 587. Em vermelho estão as alfa-hélices, em amarelo as estruturas de folhas beta e em verde as regiões de loop. (A) proteína selvagem com o sítio 587 representado na forma de esferas e destacado em azul. (B) Proteína mutante com o sítio 587 destacado em cor de rosa. (C) zoom das estruturas selvagem e mutante alinhadas, com destaque para o sítio 587.

4.3.1.2 NS5

As proteínas NS5 mutante (P40) e selvagem (P1) contendo 903 aminoácidos foram utilizadas para a obtenção de modelos tridimensionais. A busca automática no SWISS-MODEL detectou 1.688 moldes não filtrados e o algoritmo do software reduziu para 22 *templates*. Após esta etapa, foi realizada a análise manual considerando a identidade, cobertura e a resolução, com isso, foram selecionados 7 arquivos que serviram como molde para a obtenção das estruturas deste trabalho.

Considerando os resultados dos testes de qualidade global e local GMQE e QMEANDisCo Global, foram selecionadas duas estruturas que foram avaliadas no MolProbity e com base no resultado obtido foi escolhida a estrutura gerada utilizando como *template* o arquivo 5tmh.1.A, que foi obtido por difração de raios-X com uma resolução de 3,28 Å (170), a qual serviu de molde para a obtenção das estruturas selvagem e mutante da NS5.

Foram então obtidos três modelos, sendo dois para as proteínas mutantes e um para a proteína selvagem. As mutações ocorreram nos nucleotídeos 7897 e 8467 considerando a posição no genoma completo. Ao considerar apenas proteína NS5, elas ocorreram nos aminoácidos 77 (Val / Ala) e 267 (Val / Ala).

A obtenção dos modelos permitiu visualizar a região da proteína em que estas mutações estão localizadas. Ambas se encontram no domínio MTase, sendo a mutação 77 (figura 22) em uma estrutura de folhas beta e a mutação 267 (figura 23) na região de loop. Estas mutações não

levaram a mudança conformacional na proteína. Vale destacar que nas duas mutações a troca foi de um aminoácido apolar por outro apolar.

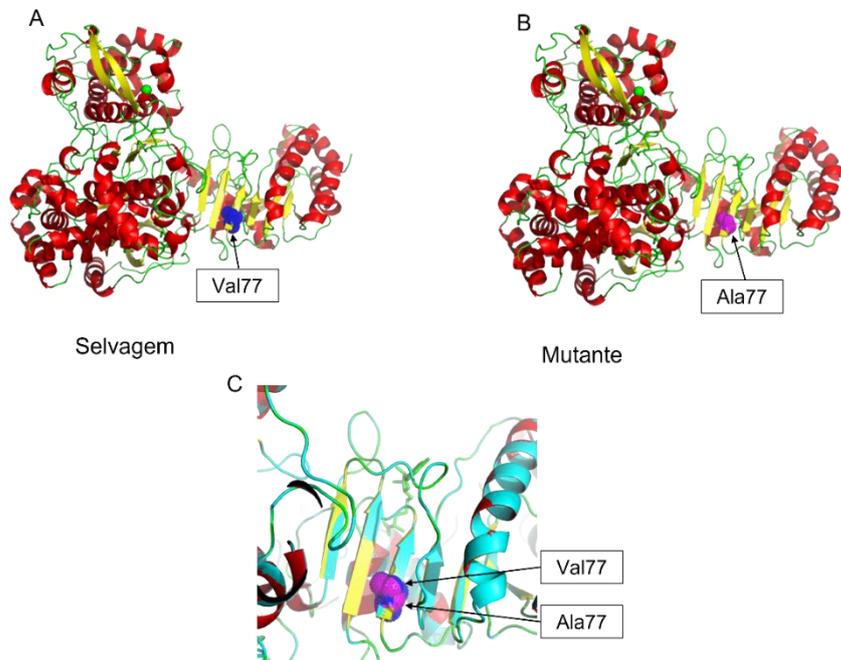


Figura 22: Modelo tridimensional da proteína NS5 com mutação no aminoácido 77. Em vermelho estão as alfa-hélices, em amarelo as estruturas de folhas beta e em verde as regiões de loop. (A) proteína selvagem com o sítio 77 representado na forma de esferas e destacado em azul. (B) Proteína mutante com o sítio 77 destacado em cor de rosa. (C) zoom das estruturas selvagem e mutante alinhadas, com destaque para o sítio 77.

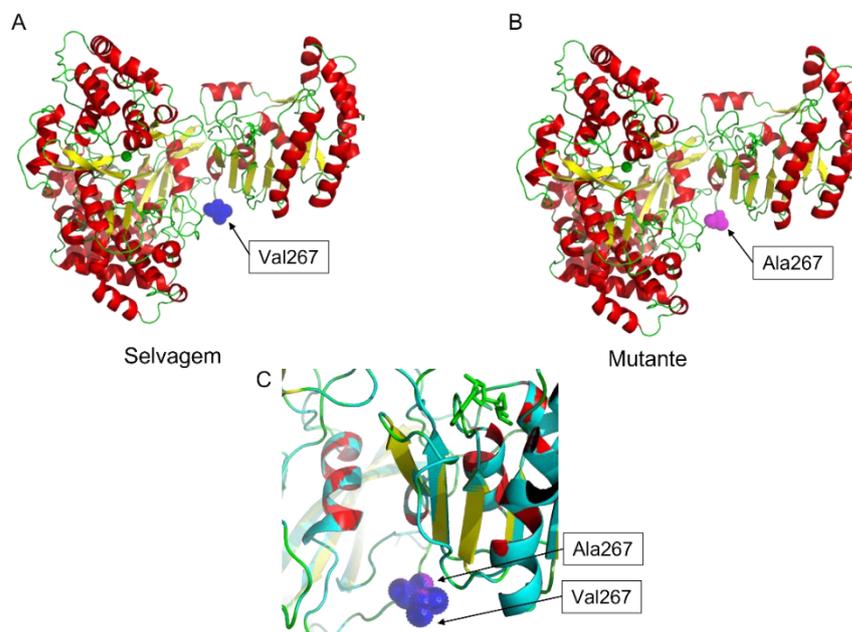


Figura 23: Modelo tridimensional da proteína NS5 com mutação no aminoácido 267. Em vermelho estão as alfa-hélices, em amarelo as estruturas de folhas beta e em verde as regiões de loop. (A) proteína selvagem com o sítio 267 representado na forma de esferas e destacado em azul. (B) Proteína mutante com o sítio 267 destacado em cor de rosa. (C) zoom das estruturas selvagem e mutante alinhadas, com destaque para o sítio 267.

4.3.2 Modelagem molecular comparativa - Passagens do vírus em células Aag-2

O vírus adaptado em células Aag-2 apresentou uma mutação na proteína NS5 que foi observada tanto na análise de variantes quanto na sequência consenso. Esta mutação ocorreu no nucleotídeo 9966 considerando o genoma completo e no aminoácido 767 (Leu / Phe), considerando a posição na NS5.

Por se tratar da NS5, o modelo para esta proteína já havia sido escolhido ao realizar a modelagem das mutações do vírus adaptado em células C6/36. Desta forma o *template* 5tmh.1.A, também foi utilizado para construção dos modelos estruturais para o vírus passado de forma seriada em células Aag-2.

Foi obtido um modelo para a proteína NS5 selvagem (P1) e um para a proteína mutante (P40). Foi possível observar que esta mutação está localizada no domínio RdRp, na região *Thumb* em uma estrutura de alfa hélice. Além disso observamos que a mutação, que resultou na troca de aminoácido apolar por outro apolar, não gerou mudança conformacional evidente na estrutura, o que pode ser visualizado detalhadamente na imagem com as estruturas alinhadas nas quais destaca-se a região mutante (figura 24).

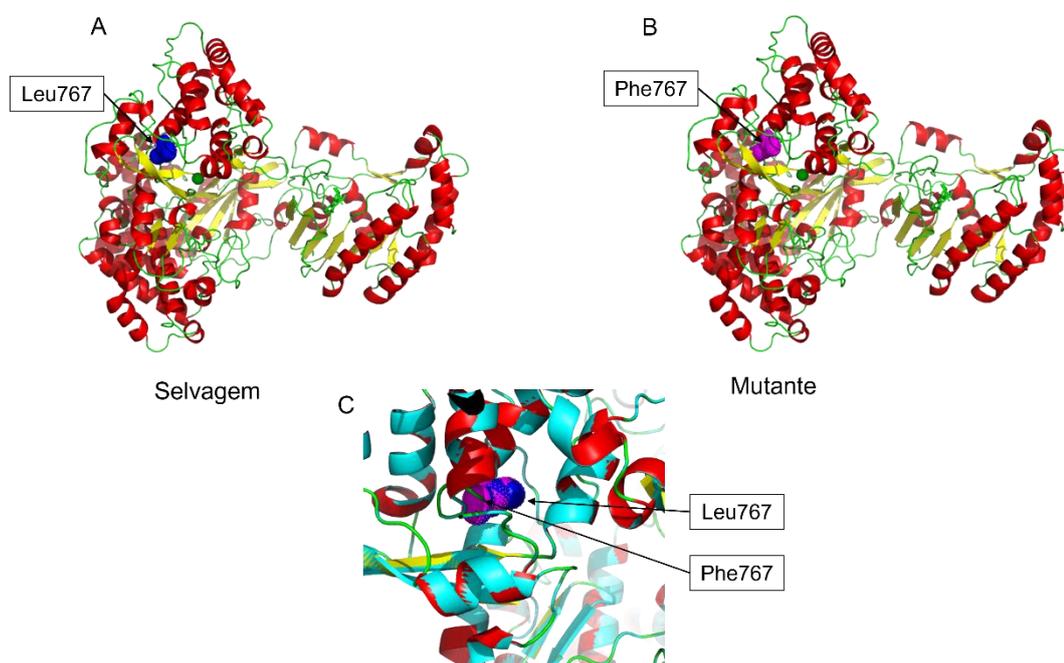


Figura 24: Modelo tridimensional da proteína NS5 com mutação no aminoácido 767. Em vermelho estão as alfa-hélices, em amarelo as estruturas de folhas beta e em verde as regiões de loop. (A) proteína selvagem com o sítio 767 representado na forma de esferas e destacado em azul. (B) Proteína mutante com o sítio 767 destacado em cor de rosa. (C) zoom das estruturas selvagem e mutante alinhadas, com destaque para o sítio 767.

4.4 Avaliação do *fitness* viral

Os vírus das passagens P2_C6/36, P40_C6/36, P2_Aag-2 e P40_Aag-2 foram utilizados nos experimentos para avaliação do impacto do processo de adaptação sobre o *fitness* viral *in vitro* e *in vivo*.

Inicialmente foi preparado o estoque viral de todas essas amostras, que foi dividido em 20 alíquotas de 1ml de cada. Uma alíquota foi utilizada para a titulação viral por citometria de fluxo e as demais ficaram armazenadas em freezer -80°C até a realização dos experimentos. Para cada experimento foi utilizada uma alíquota.

O experimento de citometria mostrou que tínhamos um perfil de células homogêneas e mais de 99% das células ficaram dentro da *gate*. Além disso foi possível ver que as células realmente estavam infectadas, tendo um perfil de fluorescência diferente entre os controles negativos (*mock*) (figura 25). As células infectadas pelo vírus P2_Aag-2 possuíam claramente um título viral inferior em relação às outras amostras, uma vez que o percentual de células marcadas foi consideravelmente menor (figura 26).

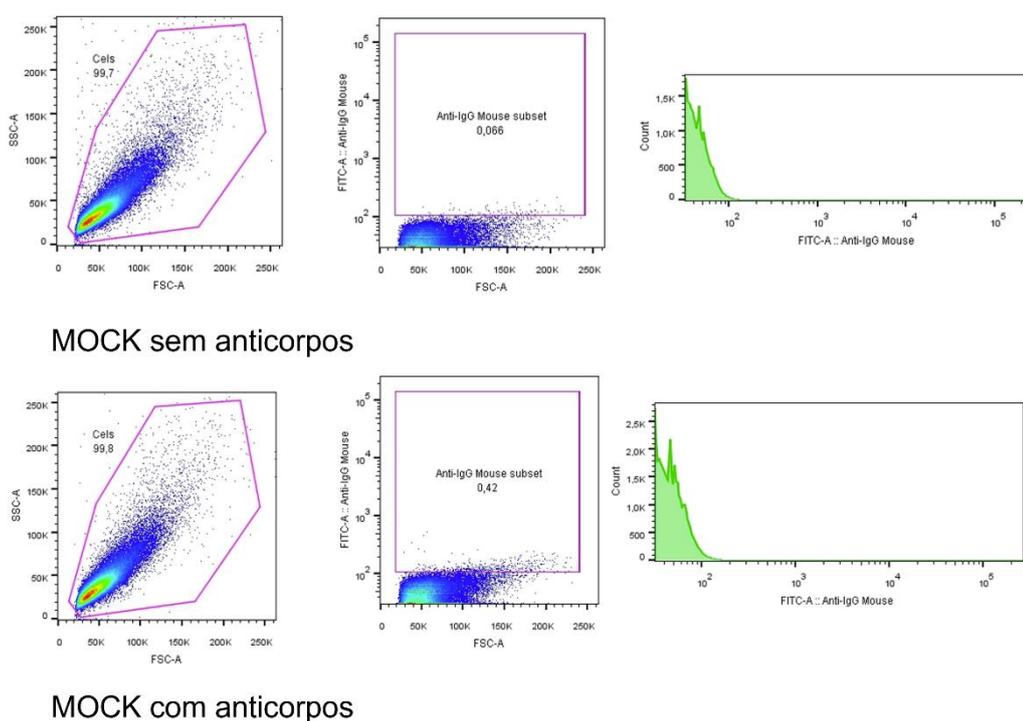


Figura 25: Controles negativos do experimento de citometria. Na imagem superior observa-se o controle *mock* sem a adição de anticorpos e na imagem inferior, temos o mesmo controle *mock* mas com a adição de anticorpos. Observamos um pequeno aumento de fluorescência nesta condição. Nas imagens a esquerda pode-se observar as *gates*, em cor de rosa, envolvendo a população de interesse. Na imagem central está apresentada a área com as células marcadas, destacada em cor de rosa. Por fim na imagem a direita está o gráfico de fluorescência.

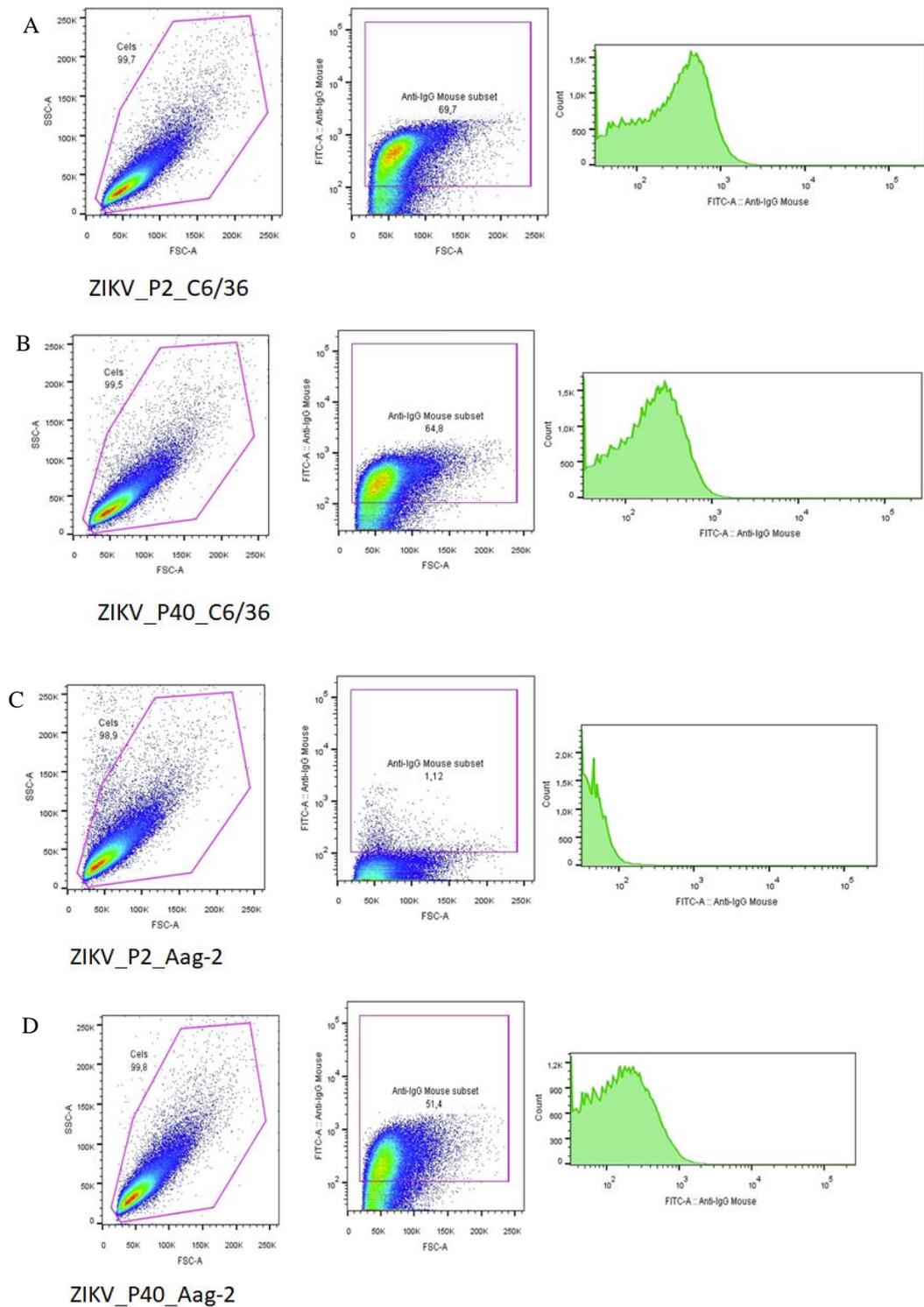


Figura 26: Leitura das células infectas no experimento de citometria de fluxo. (A) células infectadas com P2_C6/36 com um percentual de 69,7% de células marcadas nesta réplica. (B) células infectadas com P40_C6/36 com um percentual de 64,8% de células marcadas nesta réplica. (C) células infectadas com P2_Aag-2 com um percentual de 1,12% de células marcadas nesta réplica. (D) células infectadas com P40_Aag-2 com um percentual de 51,4% de células marcadas nesta réplica. Nas imagens a esquerda pode-se observar as *gates*, em cor de rosa, envolvendo a população de interesse. Na imagem central está apresentada a área com as células marcadas, destacada em cor de rosa. Por fim na imagem a direita está o gráfico de fluorescência.

A obtenção do título viral deu-se com a utilização da fórmula disponível no protocolo de Medina e colaboradores (165).

$$[(\% \text{ média de células infectadas positivas}) \times (\% \text{ média de células positivas no } \textit{mock}) \times (\text{número de células no poço}) \times (\text{fator de diluição}) / \text{volume do inóculo em ml}] = \text{Título viral (FACS IU/ml)}$$

Ao realizar os cálculos para cada passagem, utilizando a média de fluorescência das réplicas, observamos que P2_C6/36 e P40_C6/36 estavam com títulos de $2,05 \times 10^9$ FACS IU/ml e $2,20 \times 10^9$ FACS IU/ml, respectivamente. Enquanto P2_Aag-2 e P40_Aag-2 apresentavam títulos de $2,29 \times 10^7$ FACS IU/ml e $1,44 \times 10^9$ FACS IU/ml, respectivamente. Após a obtenção do título viral iniciamos os experimentos de avaliação do *fitness*.

4.4.1 Experimento de *fitness in vitro*

Inicialmente foi realizado um experimento para definir quantas células deveriam ser colocadas em cada poço da placa de 24 poços para que ela estivesse com uma monocamada aproximadamente 80% confluenta para realização do inóculo 24h após o preparo da placa. Esse teste foi realizado tanto com as células C6/36 quanto Aag-2. Foram testadas oito condições distintas, sendo elas, 100.000; 150.000; 200.000; 250.000; 300.000; 350.000; 400.000 e 450.000 células por poço, todos em triplicata (figura 27).

Após as 24h do preparo das placas, cada poço foi avaliado individualmente com a utilização de microscópio invertido para visualização das monocamadas. Para as células C6/36 foi definido o número de 300.000 células e para Aag-2 foi escolhido o valor de 250.000 células. Com esses valores definidos, foram iniciados os experimentos de *fitness in vitro*.

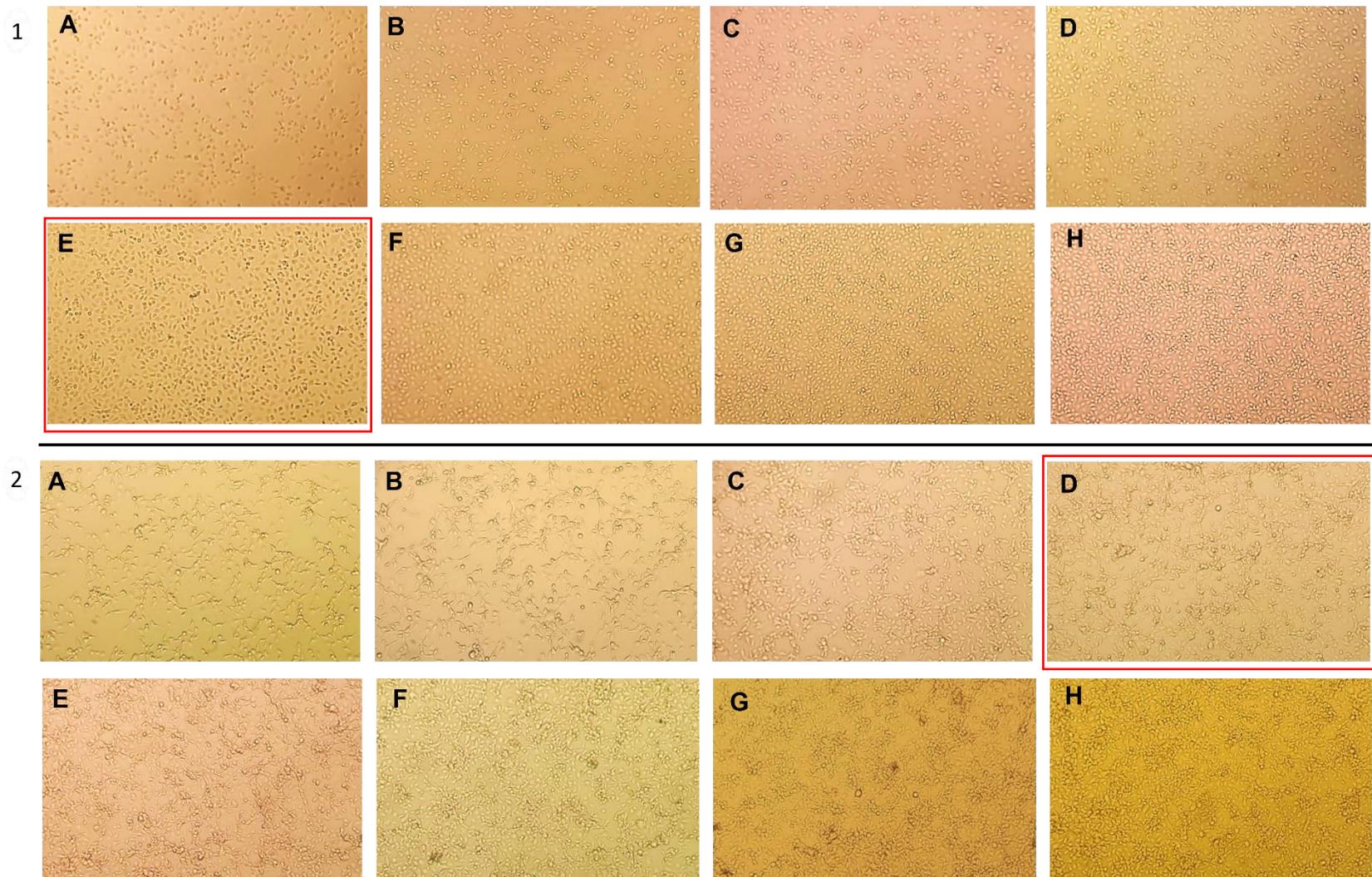


Figura 27: Monocamadas de células C6/36 e Aag-2 dos testes para definição da quantidade ideal para placas de 24 poços. (1) Células C6/36. (2) Células Aag-2. Em ambas as imagens as letras representam a quantidade de células colocadas em cada poço. (A) 100.000 células. (B) 150.000 células. (C) 200.000 células. (D) 250.000 células. (E) 300.000 células. (F) 350.000 células. (G) 400.000 células. (H) 450.000 células. Destacadas em vermelho estão as monocamadas com as quantidades de células escolhidas de cada linhagem.

4.4.1.1 Vírus adaptado em células C6/36

O vírus titulado das passagens P2_C6/36 e P40_C6/36 foram submetidos aos testes para avaliação do *fitness* viral, tanto em células C6/36 quanto em Aag-2. Todos os inóculos foram realizados com um MOI de 0.1 em duplicatas biológicas, sendo o sobrenadante e as células recolhidos a cada 24h, durante cinco dias. Ao final do experimento todos os sobrenadantes e os *pellets* celulares foram submetidos a reação de RT-PCR em tempo real para quantificação relativa do RNA viral pelo método $\Delta\Delta Ct$, utilizando como normalizadores os controles endógenos MS2 e RPS.

Ao avaliarmos o *fitness* em células C6/36 foi observado que o MS2 apresentou uma média aproximada de Ct de 25 para todas as réplicas tanto do sobrenadante quanto do *pellet* e em todos os tempos avaliados, mostrando a alta reprodutibilidade do experimento. O RPS também apresentou valores de Cts semelhantes em todas as réplicas dos *pellets*, com um Ct médio em torno de 23. Já no sobrenadante foi observada uma variação ao longo do tempo (figura 28).

Além disso os Cts para o alvo ZIKV em todas as réplicas biológicas e técnicas de todos os pontos de coleta eram reprodutíveis. Foi possível identificar que tanto no *pellet*, quanto no sobrenadante, no tempo de 24h pós infecção, o vírus de P40 tem uma carga viral maior que o de P2 e assim permanece até o tempo de 96h onde observa-se a menor média de Ct para P40 no *pellet*. Já no tempo de 120h a carga viral detectada no *pellet* das células infectadas tanto com P2 quanto com P40 praticamente se igualam com médias de Ct de 13,88 para P40 e 14,06 para P2. No sobrenadante, no tempo de 120h, também é observada uma redução da diferença de Cts entre os vírus de P2 e P40, mas P40 continua com uma média inferior (figura 28).

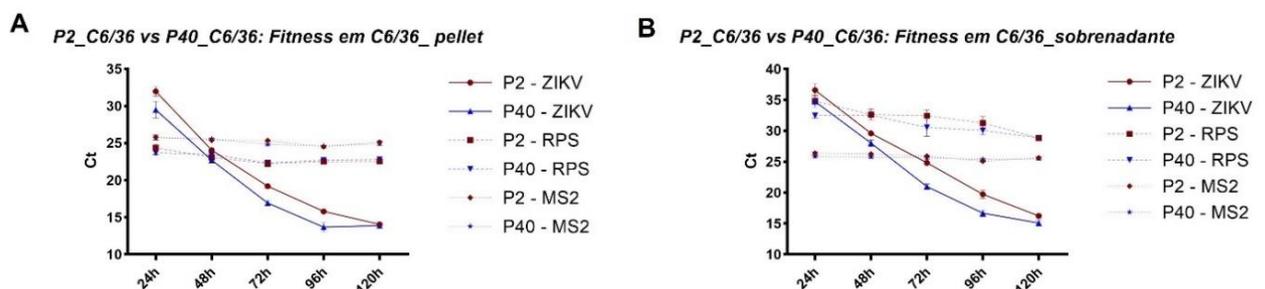


Figura 28: Médias dos Cts do experimento de cinética viral em células C6/36 infectadas com o vírus adaptado em C6/36. (A) médias de Cts detectados no *pellet* de células. (B) médias de Cts detectados no sobrenadante. Em vermelho estão representados os Cts de P2_ZIKV e seus respectivos controles endógenos. Em azul estão representados os Cts de P40_ZIKV e seus respectivos controles endógenos. A linha contínua representa o alvo ZIKV, a linha tracejada é utilizada para o RPS e a linha pontilhada para o MS2.

Para as análises de quantificação relativa, foi utilizado apenas o MS2 como controle

endógeno, uma vez que o RPS não apresentou resultados reprodutíveis nas amostras do sobrenadante.

O resultado da quantificação relativa mostrou que nos *pellets* das células infectadas com P40, nos tempos de 24h a 96h, a carga viral detectada foi maior do que nos *pellets* das células infectadas com P2, sendo as maiores diferenças detectadas nos tempos de 24h pi e 96h pi, nos quais a carga viral está 5,58 e 4,66 vezes maior, respectivamente. Já no tempo de 120h pi a carga viral de P40 passa a ser ligeiramente menor que a carga viral de P2. Em relação ao sobrenadante, em todos os tempos avaliados, a carga viral de P40 está maior que a carga viral de P2, sendo os tempos de 72h pi e 96h pi os que apresentaram maiores diferenças com 11,85 e 10,36 vezes maior. Nos demais tempos essa diferença existe, porém é bem menor, ficando cerca de duas vezes apenas, mas o que já representa o dobro da carga viral (figura 29).

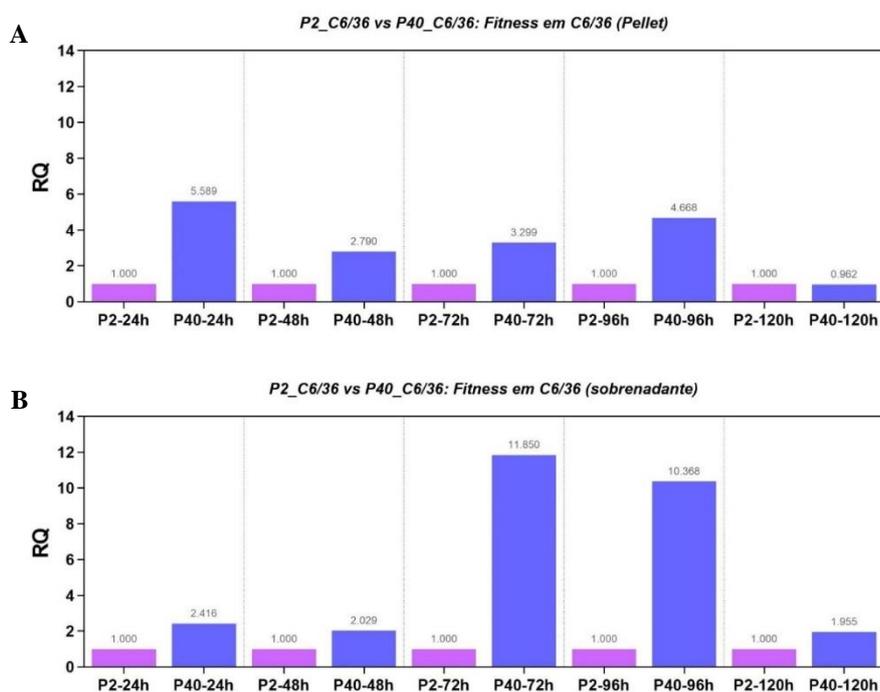


Figura 29: Expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no fitness em C6/36. A) resultado da expressão relativa no pellet de células. B) Resultado da expressão relativa no sobrenadante. Em rosa estão representados os resultados de P2 e em roxo estão os valores de P40. Os números acima das barras indicam o valor de RQ.

De maneira análoga foram realizados os experimentos para avaliar o *fitness* em células Aag-2. Semelhante ao observado nos testes de *fitness* em C6/36, o MS2 apresentou resultados reprodutíveis em todas as réplicas e os valores de RPS oscilaram no sobrenadante. Ao avaliarmos os Cts do ZIKV foi observado que no tempo de 24h pi., o valor de P40 era menor que o de P2, tanto no *pellet* quanto no sobrenadante, com médias de 27,79 para P2 e 26,80 para P40 no *pellet* e 32,66 para P2 e 31,43 para P40 no sobrenadante. Entretanto isso mudou nos demais tempos analisados quando a média de Cts se igualou em todas as condições

permanecendo assim até o tempo de 120h (figura 30).

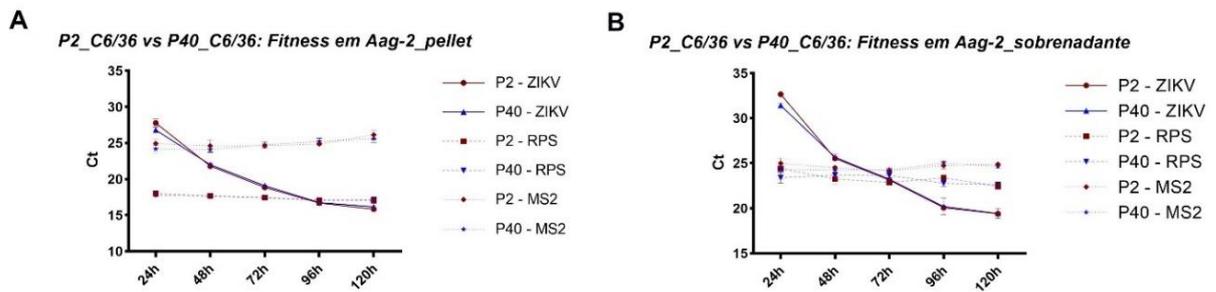


Figura 30: Médias dos Cts do experimento de cinética viral em células Aag-2 infectadas com o vírus adaptado em C6/36. (A) médias de Cts detectados no *pellet* de células. (B) médias de Cts detectados no sobrenadante. Em vermelho estão representados os Cts de P2_ZIKV e seus respectivos controles endógenos. Em azul estão representados os Cts de P40_ZIKV e seus respectivos controles endógenos. A linha contínua representa ZIKV, a linha tracejada é utilizada para o RPS e a linha pontilhada para o MS2.

Os dados obtidos dos experimentos de quantificação relativa do *fitness* em células Aag-2 mostraram que no *pellet*, apenas nos tempos de 24h e 96h, o vírus de P40 está com carga viral ligeiramente maior em relação ao vírus de P2, com valores de 1,19 e 1,27 respectivamente. Em todos os demais tempos a carga viral de P2 é maior do que a de P40, sendo que nos tempos de 48h pi. e 120h pi. a carga viral de P40 chega a ser praticamente a metade de P2. Em relação ao sobrenadante, o perfil se repete e apenas nos tempos de 24h e 96h a carga viral de P40 é maior que a de P2. E em todos os demais tempos P2 possui maior carga viral (figura 31).



Figura 31: Expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no fitness em Aag-2. A) resultado da expressão relativa no *pellet* de células. B) Resultado da expressão relativa no sobrenadante. Em rosa estão representados os resultados de P2 e em roxo estão os valores de P40. Os números acima das barras indicam o valor de RQ.

Ao compararmos os resultados da quantificação relativa dos ensaios de avaliação do *fitness* realizado em células C6/36 e em células Aag-2 infectadas com o vírus adaptado em células C6/36, foi possível identificar que o processo de adaptação em células C6/36 favoreceu a infecciosidade e replicação viral em células C6/36, uma vez que o vírus adaptado na passagem 40 (P40) foi capaz de produzir mais partículas virais nestas células e conseqüentemente liberou mais vírus no sobrenadante, chegando a ter 11 vezes mais vírus no sobrenadante ao comparar com o vírus de baixa passagem (P2). Por outro lado, essa adaptação em células C6/36 foi prejudicial para a infecção em células Aag-2, uma vez que na maior parte dos tempos avaliados neste estudo o vírus de P2 foi capaz de produzir mais partículas virais (figura 32).

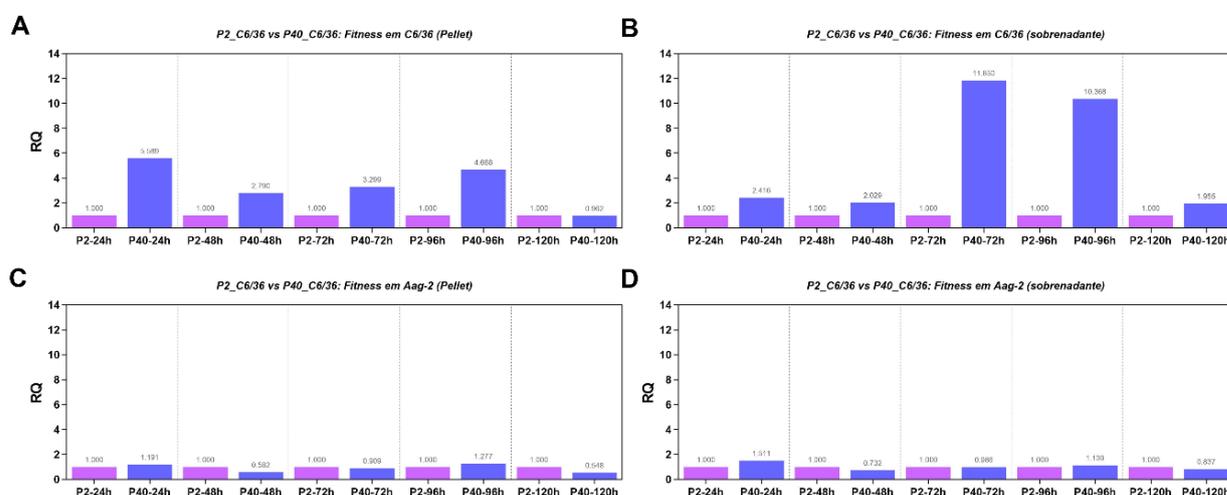


Figura 32: Comparação da expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no fitness em C6/36 e em Aag-2. A) resultado da expressão relativa do fitness em C6/36 no *pellet* de células. B) Resultado da expressão relativa do fitness em C6/36 no sobrenadante. C) resultado da expressão relativa do fitness em Aag-2 no *pellet* de células. D) resultado da expressão relativa do fitness em Aag-2 no sobrenadante. Em rosa estão representados os resultados de P2 e em roxo estão os valores de P40. Os números acima das barras indicam o valor de RQ.

4.4.1.2 Vírus adaptado em células Aag-2

De modo igual ao realizado com o vírus adaptado em células C6/36, o vírus evoluído em Aag-2 das passagens P2_Aag-2 e P40_Aag-2 foram submetidos aos testes de avaliação do *fitness* viral em células Aag-2 e C6/36 com o intuito de verificar o impacto do processo de adaptação sobre a aptidão viral. Todos os inóculos foram realizados em duplicata biológica com um MOI de 0,1, sendo os sobrenadantes e as células recolhidos a cada 24h, durante cinco dias. Ao final do experimento todas as amostras foram submetidas a quantificação relativa por RT-PCR em tempo real utilizando o método $\Delta\Delta Ct$, tendo como normalizadores os controles endógenos MS2 e RPS.

Inicialmente avaliamos o *fitness* em células Aag-2, que é o mesmo sistema no qual o vírus foi adaptado. Os dados de Ct obtidos na PCR em tempo real mostraram que o MS2 apresentou uma pequena oscilação no *pellet* nos tempos de 72h a 120h pi., contudo o RPS continuou apresentando oscilação no sobrenadante. Desta forma, semelhante ao que aconteceu com o vírus adaptado em C6/36, foi utilizado apenas o MS2 como normalizador para as análises de quantificação relativa (figura 33).

Ao analisar os Cts para ZIKV, identificamos que todas as réplicas obtiveram Cts muito semelhantes, à exceção do tempo de 24h, no sobrenadante, que apresentou uma variação de 32,20 a 36,97. Foi possível observar ainda que em todos os tempos o Ct detectado na P40 era menor que o de P2, sendo o tempo de 120h o que apresentou menor média de Ct tanto no *pellet* quanto no sobrenadante com valores de 15,38 e 18,11 respectivamente (figura 33).

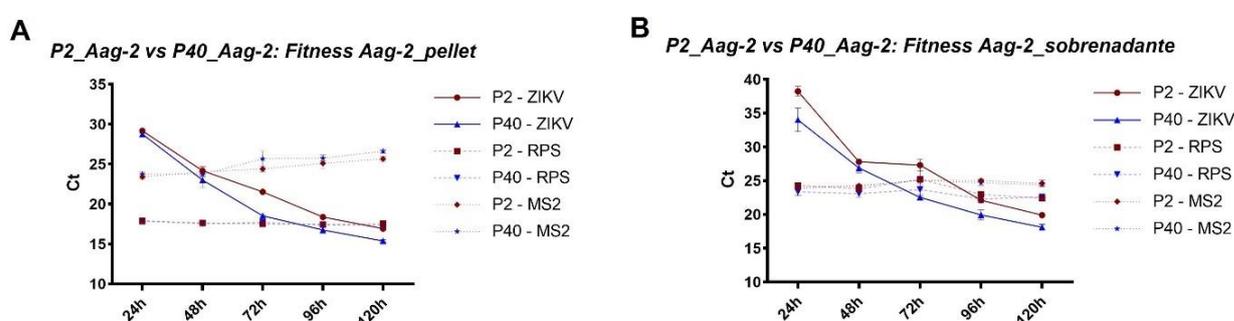


Figura 33: Médias dos Cts do experimento de cinética viral em células Aag-2 infectadas com o vírus adaptado em Aag-2. (A) médias de Cts detectados no *pellet* de células. (B) médias de Cts detectados no sobrenadante. Em vermelho estão representados os Cts de P2_ZIKV e seus respectivos controles endógenos. Em azul estão representados os Cts de P40_ZIKV e seus respectivos controles endógenos. A linha contínua representa ZIKV, a linha tracejada é utilizada para o RPS e a linha pontilhada para o MS2.

O resultado da quantificação relativa mostrou que no *pellet* o vírus de P40 está com maior carga viral em todos os tempos avaliados, sendo que no tempo de 72h há um pico de produção viral no qual a carga viral de P40 é 19,73 vezes maior que a de P2. Em relação ao sobrenadante, o mesmo perfil se repete e em todos os tempos avaliados a carga viral de P40 é maior que a de P2, sendo que já no tempo de 24h esta é 21,79 vezes maior que a de P2 e posteriormente no tempo de 72h passa a ser 23,39 vezes maior (figura 34).

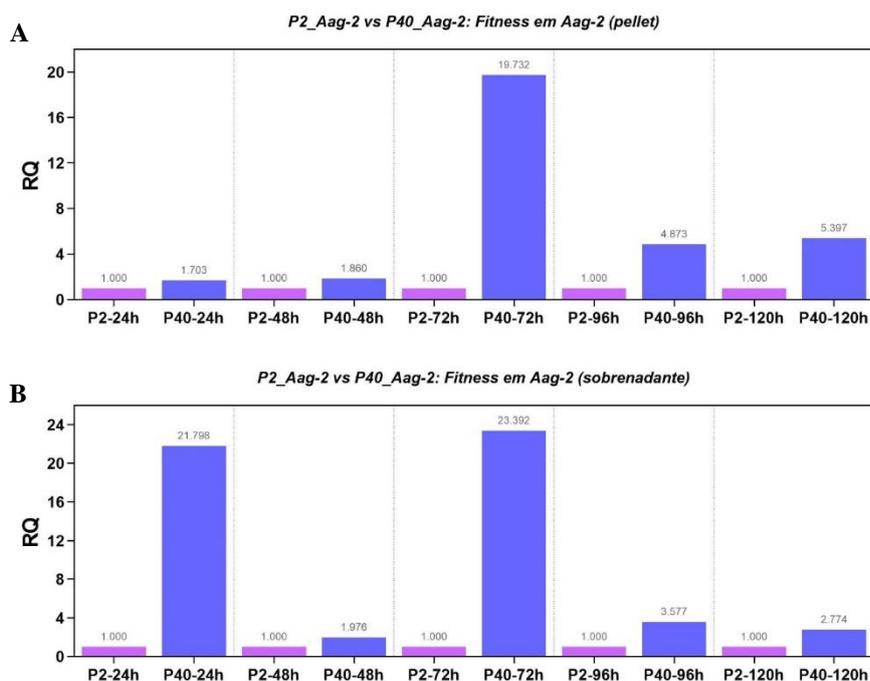


Figura 34: Expressão relativa de P2_Aag-2 e P40_Aag-2 no *fitness* em Aag-2. A) resultado da expressão relativa no *pellet* de células. B) Resultado da expressão relativa no sobrenadante. Em rosa estão representados os resultados de P2 e em roxo estão os valores de P40. Os números acima das barras indicam o valor de RQ.

Após avaliar o *fitness* em Aag-2, realizamos as mesmas análises em células C6/36. O perfil de Cts do MS2 continuou apresentando resultados reprodutíveis e o RPS permaneceu oscilando no sobrenadante. Quanto aos Cts para ZIKV no *pellet*, nos tempos iniciais de 24h e 48h a média dos valores de Cts de P2 e P40 foi semelhante, 31,49 para P2 e 31,65 para P40 em 24h, e 25,49 para P2 e 25,58 para P40 em 48h. Nos demais tempos P40 passou a apresentar Cts menores. Em relação ao sobrenadante, os Cts de P40 foram menores que os de P2 em todos os tempos avaliados (figura 35).

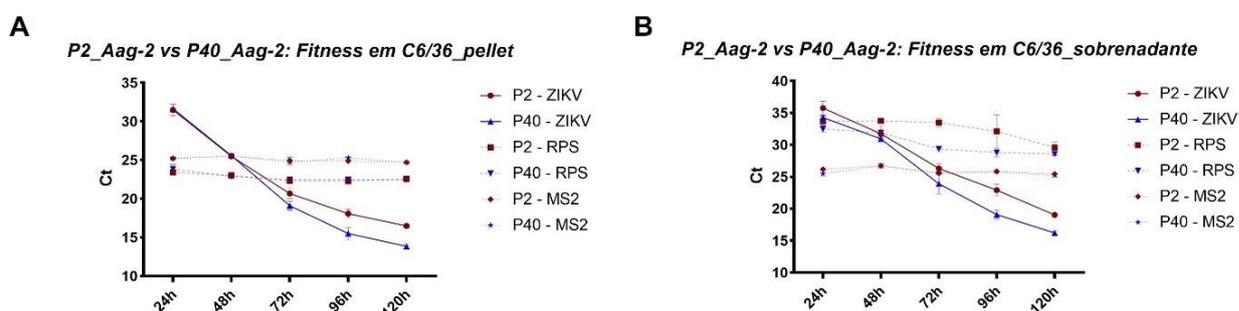


Figura 35: Médias dos Cts do experimento de cinética viral em células C6/36 infectadas com o vírus adaptado em Aag-2. (A) médias de Cts detectados no *pellet* de células. (B) médias de Cts detectados no sobrenadante. Em vermelho estão representados os Cts de P2_ZIKV e seus respectivos controles endógenos. Em azul estão representados os Cts de P40_ZIKV e seus respectivos controles endógenos. A linha contínua representa ZIKV, a linha tracejada é utilizada para o RPS e a linha pontilhada para o MS2.

Os resultados da quantificação relativa em células C6/36 mostraram que no *pellet*, a partir do tempo de 48h, a carga viral de P40 passou a ser ligeiramente maior do que a de P2, estando 1,085 vezes maior. Essa diferença começou a aumentar a partir do tempo de 72h e atingiu um pico em 96h com uma carga 7,104 vezes a mais que P2. Em relação ao sobrenadante, P40 apresentou carga viral maior em todos os tempos, sendo que nos momentos iniciais de 24h e 48h, essa diferença foi bem pequena. Todavia, no tempo de 72h houve um aumento importante sendo possível observar que P40 passou a ter carga 6,657 vezes maior que P2, com o pico atingido em 96h, no qual P40 estava 14,376 vezes maior que P2 (figura 36).

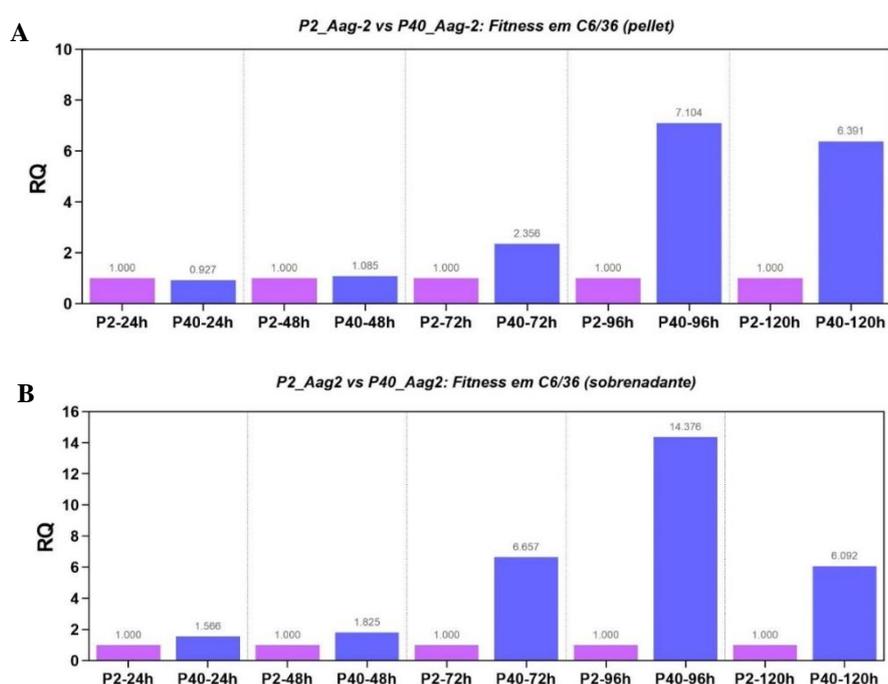


Figura 36: Expressão relativa de P2_Aag-2 e P40_Aag-2 no *fitness* em C6/36. A) resultado da expressão relativa no *pellet* de células. B) Resultado da expressão relativa no sobrenadante. Em rosa estão representados os resultados de P2 e em roxo estão os valores de P40. Os números acima das barras indicam o valor de RQ.

Ao compararmos os resultados de expressão relativa dos ensaios de avaliação do *fitness* realizado em células C6/36 e em células Aag-2 infectadas com o vírus adaptado em células Aag-2, observamos que no *fitness* em Aag-2, no *pellet*, P40 possui maior carga viral em todos os tempos avaliados atingindo um pico de produção viral em 72h com uma carga viral 19,732 vezes maior que P2. Já no *fitness* em C6/36, P40 passa a ter carga viral maior em 48h e atinge um pico de produção viral mais tardiamente, em 96h com uma diferença de 7,104 vezes. No sobrenadante de Aag-2, já no tempo de 24h a carga viral de P40 é muito maior que a de P2, enquanto no sobrenadante de C6/36 essa diferença aumenta apenas no tempo de 72h. Além disso, mesmo quando é detectado um pico de produção viral no sobrenadante das células C6/36 infectadas com o vírus de P40_Aag-2, cuja carga viral relativa é 14,37. Este valor não se

aproxima do pico de produção viral atingido no sobrenadante de células Aag-2 infectadas com a P40_Aag-2 que é de 23,39. (figura 37).

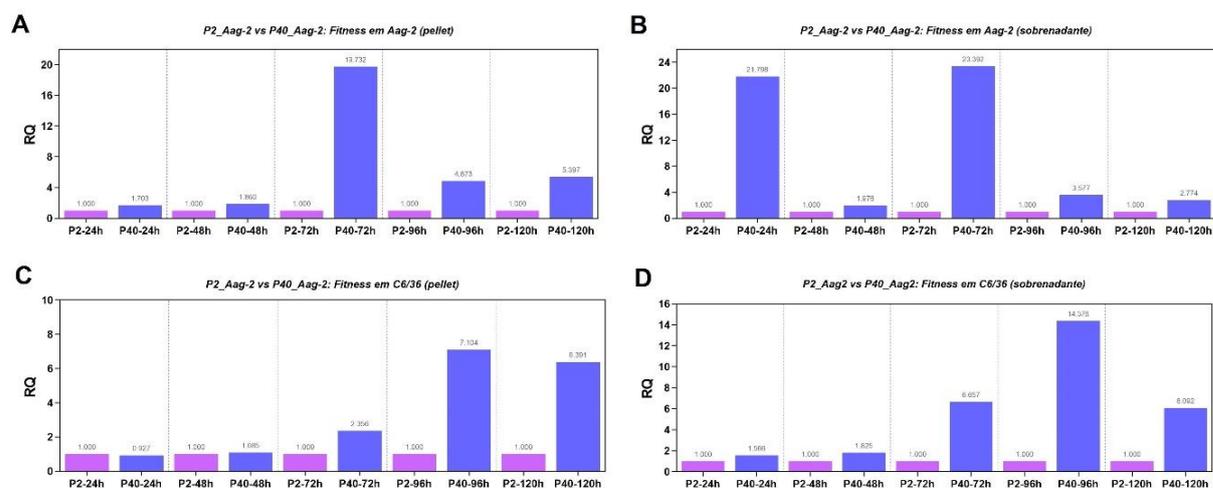


Figura 37: Comparação da expressão relativa de P2_Aag-2 e P40_Aag-2 no fitness em Aag-2 e em C6/36. A) resultado da expressão relativa do fitness em Aag-2 no *pellet* de células. B) Resultado da expressão relativa do fitness em Aag-2 no sobrenadante. C) resultado da expressão relativa do fitness em C6/36 no *pellet* de células. D) resultado da expressão relativa do fitness em C6/36 no sobrenadante. Em rosa estão representados os resultados de P2 e em roxo estão os valores de P40. Os números acima das barras indicam o valor de RQ.

4.4.2 Experimentos de *fitness in vivo*

Os experimentos foram realizados com mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no intuito de avaliar o impacto das mutações ocorridas sobre o fitness viral *in vivo*. Em um primeiro momento avaliamos os mosquitos inteiros apenas para verificar a taxa de positividade para ZIKV e depois avaliamos de forma separada a glândula salivar e o intestino a fim de mensurar o impacto sobre a taxa de infecção (intestino) e capacidade de transmissão (glândula salivar).

4.4.2.1 Vírus adaptado em C6/36

Os vírus titulados de P2_C6/36 e P40_C6/36 foram utilizados para infectar tanto os mosquitos *Aedes aegypti* quanto *Aedes albopictus* e ambos foram analisados com 8 e 14 dias pós infecção. Sendo utilizados o RPS e o MS2 como controles endógenos.

Os resultados dos testes realizados com *Ae. albopictus* inteiros mostraram que com oito dias pós infecção a mediana de Cts para ZIKV em P2 foi de 18,58 e de P40 foi 19,02, sem apresentar significância estatística (Mann-Whitney, $p = 0,2139$). Porém, ao verificar a taxa de infecção dos mosquitos, 90% (27/30) dos que foram alimentados com P2 estavam infectados contra 63,33% (19/30) dos que foram alimentados com P40, dados esse que apresentaram significância estatística com $p = 0.0303$ (teste exato de Fisher) (figura 38).

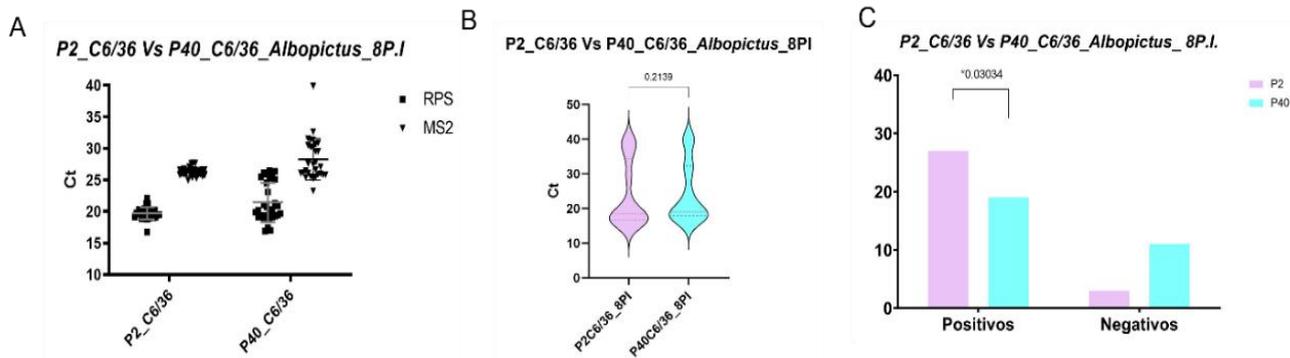


Figura 38: Fitness em *Ae. Albopictus* (8 pi) infectados com o vírus adaptado em células C6/36. A) médias dos controles endógenos MS2 (P2: 26,26 e P40: 28,26) e RPS (P2: 19,68 e P40: 21,42). B) mediana dos valores de Ct para ZIKV. Em rosa estão representados os Cts de P2 e em azul os Cts de P40. A medianas são representadas pela linha tracejada em vermelho e 1° e 3° quartis pelas linhas pontilhadas em preto. C) comparação entre a quantidade de mosquitos positivos e negativos.

Com 14 dias pós infecção a mediana de Cts para ZIKV de P40 aumentou significativamente, passando a ser de 30,96, enquanto a de P2 diminuiu e foi de 15,37 (Mann-Whitney, $p = 0,0153$). Quanto a quantidade de mosquitos infectados, os números foram semelhantes, sendo 90% (18/20) positivos entre os alimentados com P2 e 85% (17/20) para os alimentados com P40 (figura 39).

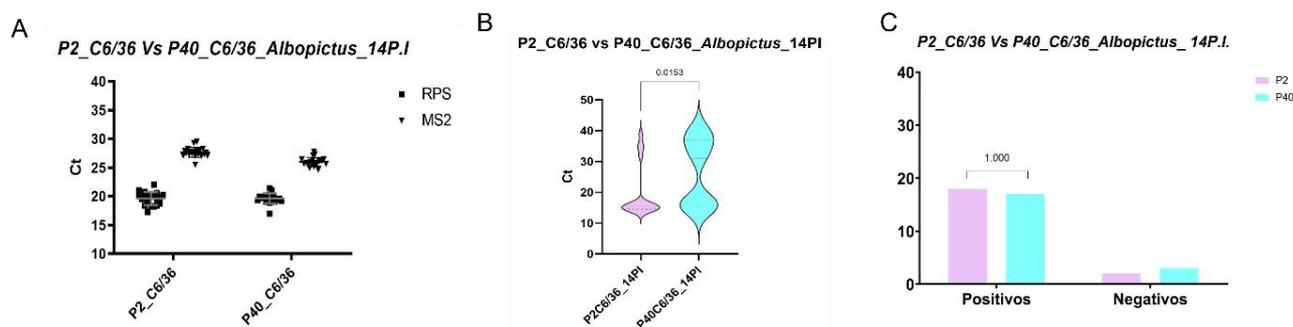


Figura 39: Fitness em *Ae. Albopictus* (14P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36. A) médias dos controles endógenos MS2 (P2: 27,65 e P40: 25,98) e RPS (P2: 19,57 e P40: 19,62). B) mediana dos valores de Ct para ZIKV. Em rosa estão representados os Cts de P2 e em azul os Cts de P40. A medianas são representadas pela linha tracejada em vermelho e 1° e 3° quartis pelas linhas pontilhadas em preto. C) comparação entre a quantidade de mosquitos positivos e negativos.

Ao avaliar a quantificação relativa foi possível notar que no tempo de 8 dias pós infecção a carga viral de P40 estava 2,026 vezes maior que a de P2. Entretanto, no tempo de 14 dias pós infecção P2 estava maior que P40 (figura 40).

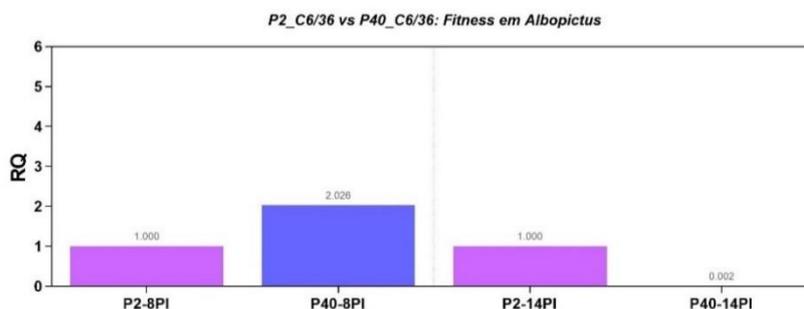


Figura 40: Expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no *fitness* em *Ae. albopictus*. Em rosa estão representados os resultados de P2 e em roxo estão os valores de P40. Os números acima das barras indicam o valor de RQ.

Analizamos também o *fitness* em *Ae. aegypti*, e com oito dias pós infecção as medianas de Cts obtidos para ZIKV de P2 e P40 foram respectivamente 16,95 e 18,60 (Mann-Whitney, $p = 0,0050$). Já com 14 dias pós infecção estas foram de 14,77 em P2 e 29,59 em P40 (Mann-Whitney, $p = 0,001$). Em ambos os períodos houve significância estatística. Já ao comparar a quantidade de mosquitos infectados, com oito dias pós infecção experimental, foram positivos 96,67% (29/30) dos alimentados com P2 e 63,33% (19/30) dos submetidos a alimentação com P40, apresentando valor de $p = 0.0025$ (teste exato de Fisher). Quando avaliamos com 14 dias, 100% (30/30) dos mosquitos alimentados tanto com P2 quanto com P40 foram positivos (figuras 41 e 42).

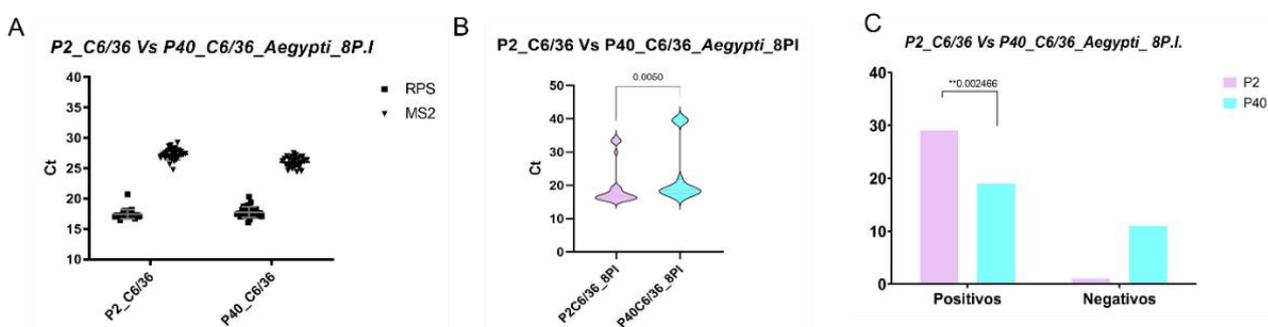


Figura 41: *Fitness* em *Ae. Aegypti* (8P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36. A) médias dos controles endógenos MS2 (P2: 27,32 e P40: 26) e RPS (P2: 17,4 e P40: 17,79). B) mediana dos valores de Ct para ZIKV. Em rosa estão representados os Cts de P2 e em azul os Cts de P40. A medianas são representadas pela linha tracejada em vermelho e 1° e 3° quartis pelas linhas pontilhadas em preto. C) comparação entre a quantidade de mosquitos positivos e negativos.

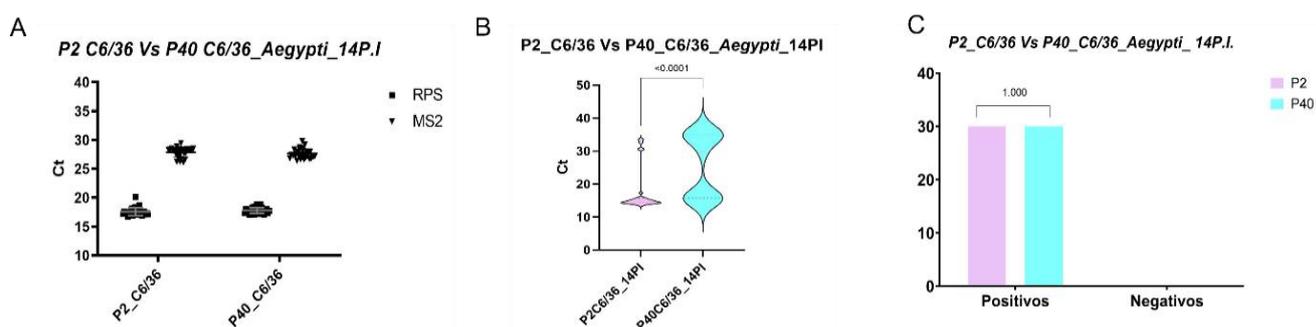


Figura 42: *Fitness* em *Ae. Aegypti* (14P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36. A) médias dos controles endógenos MS2 (P2: 27,86 e P40: 27,62) e RPS (P2: 17,58 e P40: 17,76). B) mediana dos valores de Ct para ZIKV. Em rosa estão representados os Cts de P2 e em azul os Cts de P40. A medianas são representadas pela linha tracejada em vermelho e 1° e 3° quartis pelas linhas pontilhadas em preto. C) comparação entre a quantidade de mosquitos positivos e negativos.

O resultado da quantificação mostrou que tanto no tempo de 8PI quanto no de 14PI a carga viral de P40 foi menor que a carga viral de P2 (figura 43).

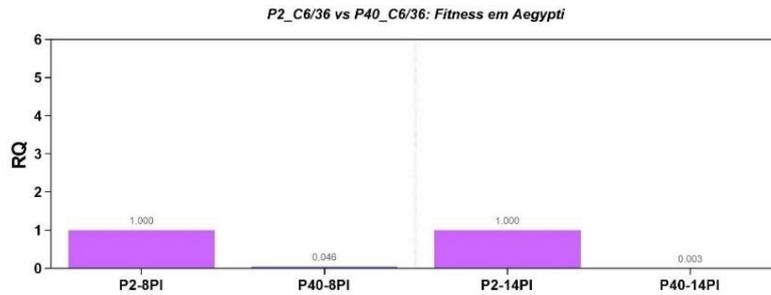


Figura 43: Expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no *fitness* em *Ae. aegypti*. Em rosa estão representados os resultados de P2 e em roxo estão os valores de P40. Os números acima das barras indicam o valor de RQ.

Após avaliar o impacto sobre a taxa positividade dos mosquitos optamos por fazer novos experimentos e dissecar a glândula salivar e o intestino para verificar se haveria diferença entre a taxa de infecção e potencial de transmissão. Os experimentos foram novamente realizados com *Ae. Aegypti* e *Ae. Albopictus*, porém o experimento com o albopictus não funcionou e todos os mosquitos foram negativos. O experimento foi repetido e novamente não obtivemos sucesso com a infecção. Desta forma seguimos apenas com o experimento com *Ae. Aegypti*.

As medianas de Cts para ZIKV obtidas das análises das glândulas salivares dos mosquitos dissecados oito dias após a infecção foram de 34,58 para os alimentados com P2 e 37,77 para os alimentados com P40 (Teste T, $p = 0,7432$). Já com 14 dias após a infecção, estas foram de 27,98 para P2 e 34 para P40 (Teste t, $p = 0,0075$). Ao examinar a positividade nas glândulas salivares, observamos que tanto com 8PI quanto com 14PI foram detectadas mais glândulas positivas entre os mosquitos infectados com P2, sendo 73% (22/30) com 8PI e 96,67% (30/30) com 14 PI contra 23,33% (7/30) e 60% (18/30) dos infectados com P40, nos tempos de 8 e 14 dias pós infecção respectivamente (figuras 44 e 45).

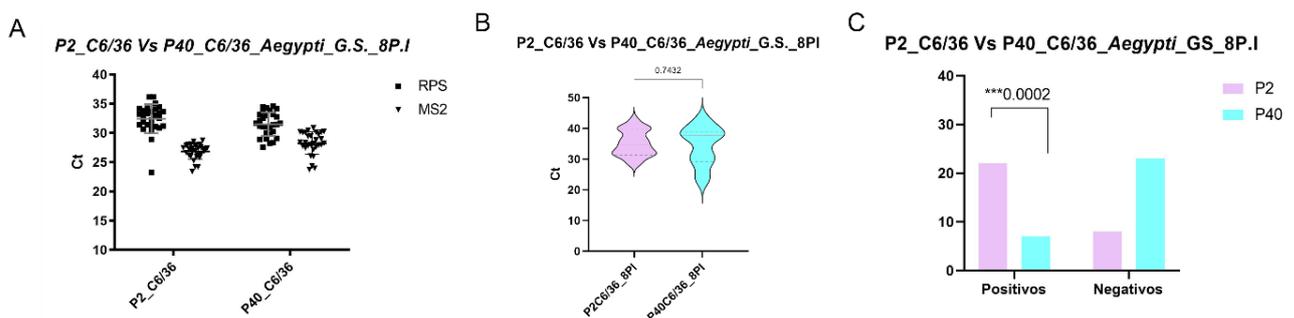


Figura 44: Fitness em glândula salivar de *Ae. Aegypti* (8P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36. A) médias dos controles endógenos MS2 (P2: 26,82 e P40: 28,26) e RPS (P2: 32,43 e P40: 31,49). B) mediana dos valores de Ct para ZIKV. Em rosa estão representados os Cts de P2 e em azul os Cts de P40. A medianas são representadas pela linha tracejada em vermelho e 1° e 3° quartis pelas linhas pontilhadas em preto. C) comparação entre a quantidade de mosquitos positivos e negativos.

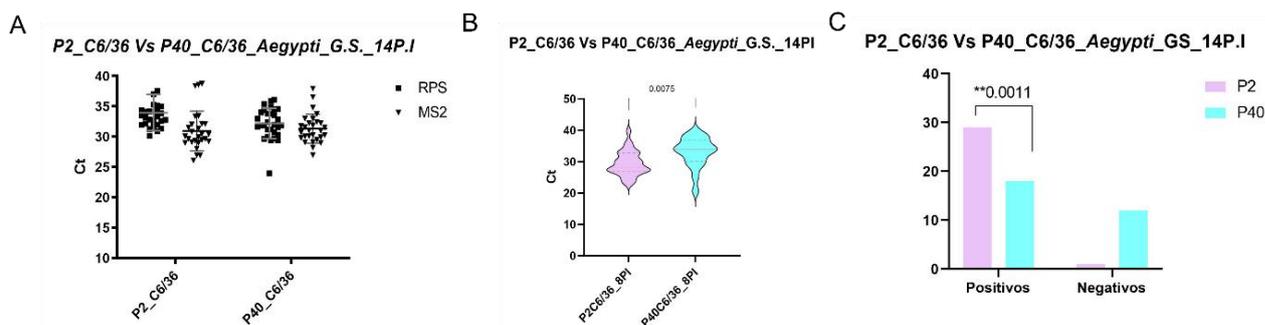


Figura 45: Fitness em glândula salivar de *Ae. Aegypti* (14P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36. A) médias dos controles endógenos MS2 (P2: 30,95 e P40: 31,34) e RPS (P2: 33,99 e P40: 31,19). B) mediana dos valores de Ct para ZIKV. Em rosa estão representados os Cts de P2 e em azul os Cts de P40. A medianas são representadas pela linha tracejada em vermelho e 1° e 3° quartis pelas linhas pontilhadas em preto. C) comparação entre a quantidade de mosquitos positivos e negativos.

Quanto aos intestinos, com oito dias pós infecção, 90% (27/30) foram positivos dentre os alimentados com P2 e 73,44% (22/30) dos alimentados com P40, e com 14 dias 100% (30/30) dos alimentados com P2 foram positivos contra 86,67% de P40 (26/30). Com medianas de 21,02 (P2) e 36,56 (P40) em 8PI (Mann-Whitney, $p < 0,001$) e 19,15 (P2) e 31,98 (P40) em 14PI (Mann-Whitney, $p < 0,001$) (figuras 46 e 47).

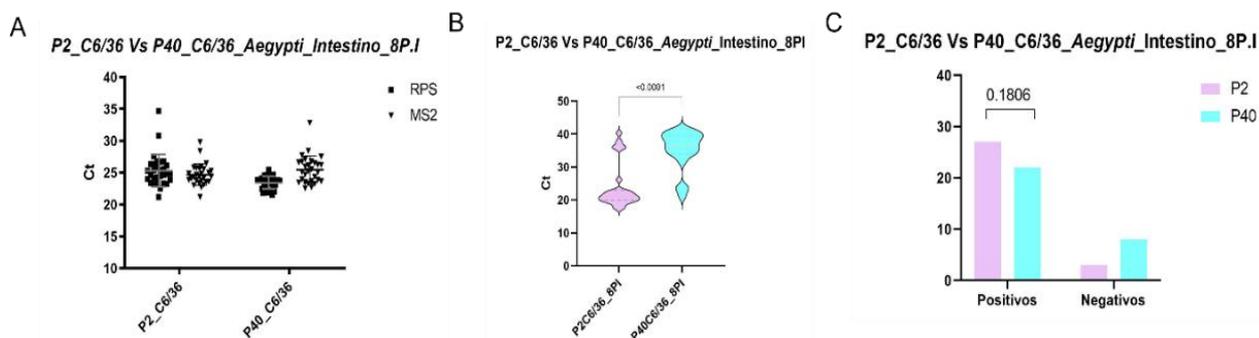


Figura 46: Fitness em intestino de *Ae. Aegypti* (8P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36. A) médias dos controles endógenos MS2 (P2: 24,71 e P40: 25,48) e RPS (P2: 25,33 e P40: 23,42). B) mediana dos valores de Ct para ZIKV. Em rosa estão representados os Cts de P2 e em azul os Cts de P40. A medianas são representadas pela linha tracejada em vermelho e 1° e 3° quartis pelas linhas pontilhadas em preto. C) comparação entre a quantidade de mosquitos positivos e negativos.

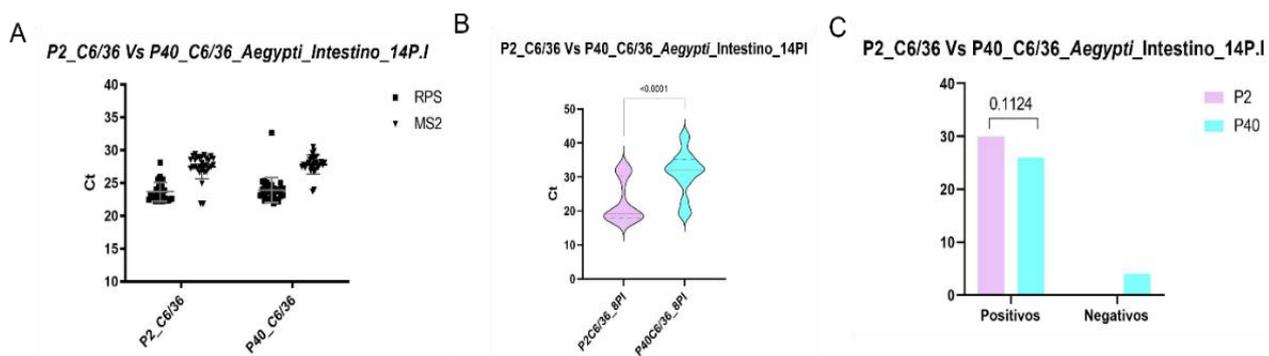


Figura 47: Fitness em intestino de *Ae. Aegypti* (14P.I) infectados com o vírus adaptado em células C6/36. A) médias dos controles endógenos MS2 (P2: 27,46 e P40: 27,80) e RPS (P2: 23,65 e P40: 23,90). B) mediana dos valores de Ct para ZIKV. Em rosa estão representados os Cts de P2 e em azul os Cts de P40. A medianas são representadas pela linha tracejada em vermelho e 1° e 3° quartis pelas linhas pontilhadas em preto. C) comparação entre a quantidade de mosquitos positivos e negativos.

Ao avaliar os resultados da expressão relativa na glândula salivar e no intestino observamos que com 8 dia após a infecção a carga viral de P40 estava maior na glândula salivar, porém no tempo de 14 dias bem como nos dois tempos, nos quais avaliamos o intestino a carga viral de P40 estava menor em relação a P2 (figura 48).

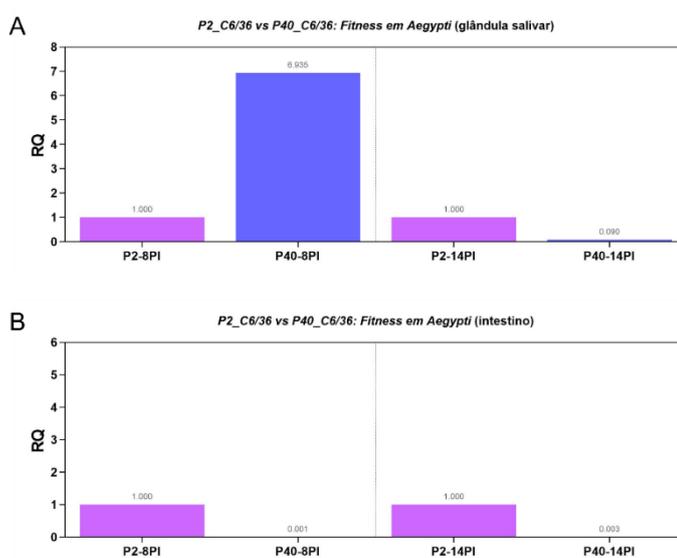


Figura 48: Comparação da expressão relativa de P2_C6/36 e P40_C6/36 no *fitness* em glândula salivar e intestino de *Ae. aegypti*. Em rosa estão representados os resultados de P2 e em roxo estão os valores de P40. Os números acima das barras indicam o valor de RQ.

4.4.2.2 Vírus adaptado em Aag-2

Para o vírus adaptado em células Aag-2 não foi possível realizar os experimentos in vivo com vírus de P2, pois os mosquitos não se alimentavam e os que ainda conseguiam se alimentar morriam logo após a ingestão da alimentação infecciosa, provavelmente pela maior concentração de glicerol em comparação às demais. Desta forma temos apenas os dados da alimentação com P40 e nos limitamos a realizar análises de comparação entre os resultados do *fitness* em *Ae. Aegypti* versus *Ae. Albopictus*.

No tempo de oito dias após a infecção 16,67% (5/30) dos *Ae. aegypti* infectados com P40_Aag-2 foram positivos para ZIKV. Dentre os *albopictus*, também alimentados com P40_Aag-2, 36,67% (11/30) foram positivos, contudo, não houve significância estatística ao comparar os dois grupos (teste exato de Fisher, $p = 0,1432$). Já no tempo de 14 dias após a infecção, 100% dos *Ae. aegypti* foram positivos, enquanto 55% dos *Ae. albopictus* foram positivos. Sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). As medianas de Cts nos *Ae. aegypti* também foram menores que as dos *Ae. albopictus*, sendo de 17,63 e 35,01 nos *Ae. aegypti*, com 8 e 14 pi. respectivamente e 31,86 e 37,29 nos *Ae. albopictus* (figura 49).

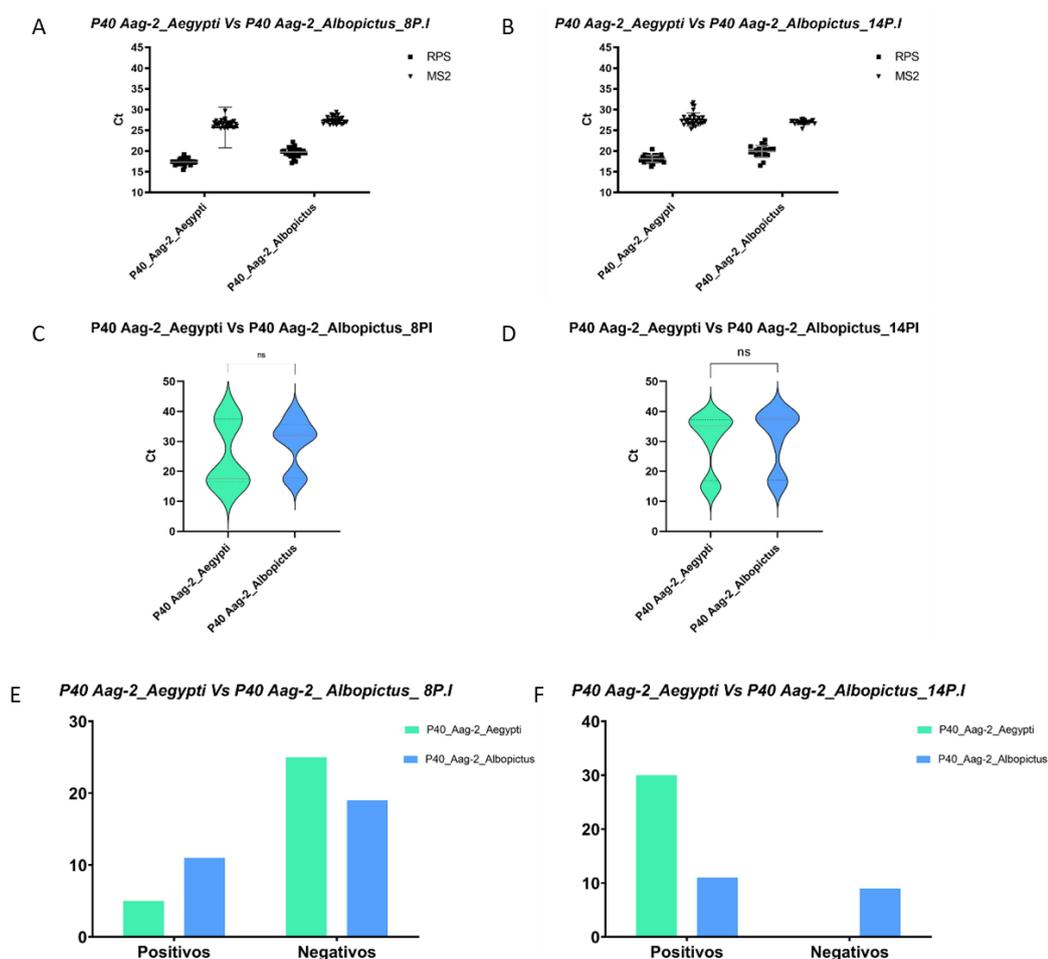


Figura 49: *Fitness* em *Aedes aegypti* versus *Aedes albopictus* infectados com P40_Aag-2. A) médias dos Cts dos controles endógenos MS2 e RPS dos mosquitos analisados com 8PI. B) médias dos Cts dos controles endógenos MS2 e RPS dos mosquitos analisados com 14PI. C) medianas dos Cts de ZIKV em aegypti e albopictus infectados com P40_Aag-2 e analisados com 8PI. Em verde estão os *Aedes aegypti* e em azul os *Aedes albopictus*. A medianas são representadas pela linha tracejada em vermelho e 1° e 3° quartis pelas linhas pontilhadas em preto. D) medianas dos Cts de ZIKV em aegypti e albopictus infectados com P40_Aag-2 e analisados com 14PI. Em verde estão os *Aedes aegypti* e em azul os *Aedes albopictus*. A medianas são representadas pela linha tracejada em vermelho e 1° e 3° quartis pelas linhas pontilhadas em preto. E) comparação entre a quantidade de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* positivos e negativos (8PI). F) comparação entre a quantidade de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* positivos e negativos (14PI)

No que se refere as glândulas salivares e intestinos, com oitos dias após a infecção, foram seis glândulas salivares positivas (6/30) e 12 intestinos (12/30), com medianas de Cts de 34,63 e 37,06 respectivamente. E com 14 dias após a infecção foram 13 glândulas e 24 intestinos positivos, com medianas de Cts de 33,09 e 36,22.

5 DISCUSSÃO

A primeira detecção do vírus Zika no Brasil ocorreu em 2015 (24) quando se disseminou rapidamente por inúmeros países, sendo responsável por infecções com quadros assintomáticos e sintomáticos, incluindo casos de má-formação fetal (35), óbitos, síndrome de Guillain-Barré e outras manifestações atípicas (33), tornando-se um agravo de saúde pública de preocupação internacional. Com isso, várias questões foram levantadas apontando a necessidade de informações sobre possíveis reservatórios animais, vetores, interação patógeno-hospedeiro, bem como sobre a evolução viral (171,172).

O ZIKV, por ser um vírus de genoma RNA, possui como característica intrínseca a este tipo de material genético uma acentuada variação em suas sequências, que está relacionada tanto a falta de atividade de correção pela RNA polimerase, quanto a alta taxa de replicação viral (133). Contudo, por se tratar de um arbovírus, está sujeito a diferentes pressões evolutivas nos distintos hospedeiros e com isso possui uma tendência a ter sequências consenso mais conservadas para se manter replicando e sendo transmitido de forma eficiente (129,132).

Desta forma, no intuito de compreender a evolução viral no hospedeiro invertebrado, avaliamos a evolução viral em dois modelos *in vitro*, sendo escolhidas as linhagens de células C6/36 e Aag-2, oriundas dos mosquitos *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* respectivamente, que são vetores epidemiologicamente importantes no ciclo de transmissão do ZIKV (47,49,50,173).

A C6/36 é uma linhagem de células aderente, oriunda do estágio larval de *Aedes albopictus* e tem sido bastante utilizada para o estudo da interação patógeno-hospedeiro de diversos arbovírus, incluindo o ZIKV (174,175). A linhagem Aag-2, também é aderente e oriunda do estágio larval, porém de *Aedes aegypti*. Apesar de esta linhagem ter sido desenvolvida em 1968, passou a ser utilizada com mais frequência a partir do ano de 1999 (176,177). Uma das principais diferenças entre estas duas linhagens, consiste no fato de que diferentemente da C6/36 a Aag-2 possui uma via RNAi funcional (176–179).

Ao longo do presente trabalho foram realizadas duas séries de 40 passagens independentes do ZIKV nas duas linhagens supracitadas. No decorrer do processo não foi observado efeito citopático (ECP), o que pode ser comum no isolamento viral em cultura de células (174,180). A ausência do ECP impossibilitou a confirmação da infecção por visualização direta das células em microscopia ótica, com isto optamos por realizar a RT-PCR em tempo real a cada cinco passagens do vírus em cada célula. Além disso, foi necessário fazer a titulação viral por citometria de fluxo.

Ao realizar o isolamento inicial do ZIKV nas células C6/36 e Aag-2, partindo da mesma amostra e na mesma diluição do soro, notou-se que a quantidade de RNA viral detectado por

meio da PCR em tempo real nas células C6/36 foi maior que a detectada nas células Aag-2, cujos Cts foram 14 e 26 respectivamente. Este resultado corrobora com os resultados obtidos por Scott e colaboradores (2010) que detectaram um crescimento mais robusto do DENV, um outro flavivírus, em células C6/36 do que em Aag-2. Estes autores atribuíram este resultado ao fato de as células C6/36 não possuírem uma via de RNAi funcional (179). Um outro estudo demonstrou que o silenciamento da via de RNAi durante a infecção por DENV-2 em *Ae. aegypti* aumentou a replicação viral, indicando seu papel no controle da replicação do vírus (181).

A via de RNAi é a principal resposta imune antiviral em mosquitos. Neste processo as fitas de RNAs virais de fita-dupla são processadas em pequenos RNAs interferentes que seguem para uma via de silenciamento direcionada para degradar os RNAs virais, reduzindo, desta forma, a replicação e disseminação viral (182). Assim, pode-se esperar que células que possuam esta via funcional, como é o caso da Aag-2, produzam títulos virais menores quando comparadas às células que não são imunocompetentes.

Ao finalizar as duas séries de 40 passagens em cada sistema de células, passou-se para a etapa de caracterização genotípica com a obtenção do genoma completo por técnica de sequenciamento de alto rendimento em plataforma Illumina MiSeq. Para a análise das mutações foram consideradas apenas aquelas que ocorreram nas duas séries de passagens em cada linhagem de célula, no intuito de excluir possíveis mutações que tenham ocorrido ao acaso ou que tenham sido inseridas por enzimas utilizadas nas etapas de produção de cDNA e PCR. Por este motivo optamos por utilizar na PCR a *Platinum SuperFi II*, que é uma enzima com fidelidade 300 vezes maior que a da *Taq* DNA polimerase convencional.

O genoma do ZIKV obtido após 40 passagens em células C6/36 apresentou duas substituições sinônimas na sequência consenso, sendo uma na região codificante para a NS1 e outra na região que codifica para a NS3. Já o vírus adaptado em Aag-2 apresentou apenas uma substituição na região que codifica para a NS5. Em outro trabalho que avaliou a adaptação de uma cepa brasileira do ZIKV de forma alternada entre células de vertebrados e invertebrado durante 10 passagens, não foi observada substituição na sequência consenso. De acordo com os autores, que realizaram sequenciamento capilar, foram detectáveis 6 mutações que apareceram como ambiguidades no eletroferograma (183). Vale ressaltar que no trabalho de Molina (2021), foram realizadas menos passagens do que no presente trabalho, fato que pode ter contribuído para que os autores não tenham observado substituições na sequência consenso.

Comparando os resultados do presente trabalho com os dados obtidos por Molina (2021), pode-se dizer que a adaptação do ZIKV em células de um único hospedeiro pode ter propiciado a ocorrência de mutações. Estudos têm mostrado que a alternância de hospedeiros pode, de fato, restringir a evolução dos arbovírus. No trabalho realizado com o vírus da

encefalite equina oriental (EEEV) foi possível observar que a adaptação em uma única célula hospedeira resultou em mais mutações do que a adaptação de forma alternada em diferentes linhagens (130).

Além de avaliar as substituições ocorridas na sequência consenso, analisou-se também as mutações presentes nas subpopulações virais. Nesta análise, alguns pontos merecem destaque. Primeiramente observou-se que o vírus adaptado em células C6/36 possui maior variabilidade que o vírus adaptado em células Aag-2. Na C6/36 foram observados 13 sítios variáveis em P40, enquanto na mesma passagem em Aag-2 foram detectados apenas dois sítios variáveis. Cabe aqui destacar que uma das principais diferenças entre as duas linhagens de células, além de serem oriundas de diferentes vetores, consiste no fato de a Aag-2 ser imunocompetente e a C6/36 ser imunodeficiente. Desta forma, o vírus isolado em Aag-2 pode ter sofrido pressão da resposta imune reduzindo a variabilidade da população viral.

Essa redução da variabilidade genética observada nas variantes minoritárias do vírus evoluído em Aag-2 ao comparar-se com o vírus evoluído em C6/36, pode representar uma desvantagem, uma vez que estudos apontam a necessidade de diversidade genética para os arbovírus no intuito de compensar a redução no número de partículas virais associadas a cada gargalo nos distintos hospedeiros (184).

A análise das variantes minoritárias permitiu identificar também que as duas substituições observadas na sequência majoritária de P40 em C6/36 já estavam presentes em frequências mais baixas na P1 e com o decorrer das passagens seriadas foram selecionadas. Este fato está relacionado a condição dos arbovírus existirem como *quasispécies*, fornecendo um *pool* continuamente reabastecido de variantes genéticas sobre os quais a seleção natural pode atuar (172) e desta forma pode emergir uma variante que seja mais adequada a determinado ambiente.

Em um trabalho anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa o vírus dengue sorotipo 4 (DENV-4), genótipo II, foi adaptado em células C6/36 por 25 passagens (185). O resultado da análise de variantes minoritárias detectou 11 sítios variáveis, ou seja, as taxas de variação foram semelhantes, mostrando um comportamento similar entre estes dois flavivírus nesta linhagem de células.

Semelhante aos resultados encontrados em outros estudos realizados com flavivírus (186), a maioria das mutações detectadas no presente trabalho são do tipo transição. Quanto a região do genoma em que ocorreram, observou-se que todas estão localizadas em regiões codificantes para proteínas não estruturais, sendo que as sequências proteicas deduzidas que mais acumularam mutações foram a NS3 e NS5, com sete e três sítios variáveis respectivamente no vírus adaptado em C6/36, e um sítio variável na região codificante para a NS5 do vírus

adaptado na Aag-2. A NS3 está entre as regiões nas quais Molina (2021) encontrou mutações. Além disso, tanto a NS3 quanto a NS5 estão entre as regiões com mais ocorrência de substituição de aminoácidos ao comparar as linhagens asiáticas pré-epidêmicas com as linhagens epidêmicas (84).

Estas proteínas possuem papel fundamental na replicação viral, assim o acúmulo de mutações pode levar a alterações na capacidade replicativa e na interação com células do hospedeiro. No vírus adaptado em C6/36, todas as mutações observadas na NS3 estão localizadas no domínio C-terminal que exerce as funções de helicase, NTPase e RTPase (42,106). Na NS5, as mutações observadas no vírus adaptado em C6/36 estão no domínio N-terminal que exerce a função de metiltransferase e no vírus adaptado em Aag-2 a mutação está no domínio C-terminal que atua como polimerase dependente de RNA (42,110).

Foram obtidos os modelos tridimensionais para estas proteínas e não observou-se mudança conformacional aparente, porém, estes modelos não foram submetidos à testes de dinâmica molecular, o que é uma limitação deste estudo, sendo assim, não foi possível estimar se as suas funções seriam alteradas. Vale ressaltar também, que para cada mutação, foi obtido um modelo, pois com a metodologia de sequenciamento utilizada neste estudo, não é possível ter certeza se as mutações estão em uma mesma fita de RNA.

Tendo-se conhecimento das substituições de nucleotídeos ocorridas na sequência consenso e das mutações observadas na chamada de variantes, os vírus foram titulados e realizou-se experimentos para verificar o impacto dessas mutações sobre a aptidão viral em modelo *in vitro* e *in vivo*. O bacteriófago MS2 foi adicionado às amostras para ser utilizado como controle endógeno e avaliar a expressão relativa. O gene RPS apresentou variabilidade nos valores de Cts obtidos dos experimentos nos sobrenadantes das células, motivo pelo qual não foi utilizado como normalizador nos experimentos. Por se tratar de um gene constitutivo de mosquitos essa variabilidade no sobrenadante era esperada, uma vez que apenas as células que iriam se despreendendo da monocamada, ou que tivessem sido rompidas poderiam fornecer material genético para ser detectado no sobrenadante.

O método utilizado para avaliar os dados dos testes de avaliação do *fitness* viral foi o $\Delta\Delta Ct$ (167), que fornece o resultado da expressão relativa por meio da comparação de grupos definidos como tratado e controle, normalizados por um controle endógeno. Este método tem sido utilizado por outros autores no trabalho com arbovírus (187,188).

Nos ensaios para a avaliação da aptidão viral em células C6/36, observou-se que os Cts das culturas infectadas com P40_C6/36 foram mais baixos que os das culturas inoculadas com P2_C6/36, tanto no *pellet* quanto no sobrenadante. Esse primeiro resultado representou um indício de maior carga viral a partir do inóculo com P40_C6/36, porém estes valores não

estavam ainda normalizados pelo controle endógeno. Ao avaliar a quantificação relativa foi possível observar que tanto no *pellet* quanto no sobrenadante, à exceção do tempo de 120h no *pellet*, a carga viral relativa de P40_C6/36 estava maior que a carga detectada em P2_C6/36.

O mesmo experimento em células Aag-2 mostrou uma média de Cts semelhantes em todos os tempos analisados e que apenas nos tempos de 24h e 96h a carga viral detectada nas células infectadas com o vírus de P40_C6/36 está ligeiramente maior que a das células infectadas com o vírus de P2_C6/36. Comparando os dados destes experimentos pode-se dizer que a evolução em células C6/36 favoreceu a replicação viral em C6/36.

Os mesmos experimentos foram realizados com os vírus adaptados em células Aag-2. Quando comparamos os ensaios realizados na mesma célula em que o vírus havia sido evoluído, ou seja, P2_Aag2 vs P40_Aag2 inoculados em células Aag-2, os valores de Cts tanto do *pellet* quanto do sobrenadante de células infectadas com o vírus de P40_Aag2 foram menores que os das células inoculadas com o vírus de P2_Aag-2 em todos os tempos. Já nas células C6/36, no *pellet*, nos tempos iniciais de 24h e 48h, P2_Aag-2 e P40_Aag-2 apresentaram Cts semelhantes, porém, nos tempos posteriores 72h, 96h e 120h, os valores de Cts das células infectadas com P40_Aag-2 foram menores que os das células infectadas com P2_Aag-2. Já no sobrenadante, os valores de Cts dos inóculos de P40_Aag-2 foram menores que os dos inóculos de P2_Aag-2 em todos os tempos avaliados.

Os dados da quantificação relativa revelaram que nos experimentos de *fitness* em Aag-2, as culturas celulares inoculadas com P40_Aag-2 estão com maior carga viral em todos os tempos avaliados, tanto no *pellet* quanto no sobrenadante, chegando a ser 19,73 vezes maior que P2_Aag-2 em 72h no *pellet*. No sobrenadante, já no tempo de 24h o inóculo de P40_Aag2 tem carga viral relativa 21,79 vezes maior que P2_Aag2 e essa diferença chega a 23,39 no tempo de 72h. Na avaliação do *fitness* em C6/36, em todos os tempos, à exceção do tempo de 24h no *pellet*, a carga viral relativa do inóculo com P40_Aag-2 também está maior que a do inóculo com P2_Aag-2, porém apenas no tempo de 72h essa diferença começa a ser mais significativa. E mesmo nos picos de detecção dos títulos virais a diferença continua sendo menor que os valores detectados no *fitness* em Aag-2. Mostrando que a adaptação em células Aag-2, mesmo não sendo prejudicial para a replicação viral em células C6/36, favoreceu a replicação na Aag-2, produzindo títulos virais mais altos já no início da infecção.

Em conjunto estes resultados sugerem que a adaptação em um único tipo de célula resultou em ganho de aptidão na célula utilizada para a realização das passagens, mesmo sendo essas duas linhagens celulares de invertebrados, sugerindo a aquisição de adaptações específicas para cada linhagem. Estes dados vão de encontro aos resultados observados por diferentes autores que estudaram a evolução de outros vírus também transmitidos por

artrópodes, tais como o vírus sindbis (SINV), EEEV e DENV, e observaram ganhos de aptidão dos vírus adaptados a uma única linhagem de células e declínio em outras linhagens (130,186,189,190).

O CHIKV fornece um exemplo, na natureza, de como mutações podem ser fundamentais para a adaptação a um novo hospedeiro. No caso do trabalho publicado por Tsetsarkin e colaboradores (2007), os autores mostram que uma mutação de base única foi decisiva para que este vírus infectasse de forma mais eficiente o vetor *Ae. albopictus*, colaborando para uma grande epidemia na Ásia (134).

Com o propósito de verificar se os resultados observados nos experimentos *in vitro* se repetiriam *in vivo*, foram realizados testes com os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Com base em um estudo anterior, utilizamos o título de 1×10^7 FACS IU/ml para preparar a alimentação artificial para os mosquitos (191).

Não foi possível realizar a infecção dos mosquitos com o vírus da P2_Aag-2, uma vez que o título viral nesta passagem foi $2,29 \times 10^7$ FACS IU/ml, consideravelmente menor que nas demais amostras cujos títulos foram de $1,44 \times 10^9$ FACS IU/ml (P40_Aag-2), $2,05 \times 10^9$ FACS IU/ml (P2_C6/30) e $2,20 \times 10^9$ FACS IU/ml (P40_C6/36). Cabe destacar que o estoque viral foi armazenado com 10% de glicerol, desta forma ao prepararmos a alimentação infecciosa, para a qual utilizou-se o título de 1×10^7 FACS IU/ml, o glicerol contido na P2_Aag-2 foi diluído em uma proporção 1/2, enquanto nas demais passagens foi realizada uma diluição 1/200. Sendo assim, a P2_Aag-2 ficou com maior concentração de glicerol que resultou na morte imediata dos mosquitos que conseguiram se alimentar.

Foi realizada a tentativa de alimentar os mosquitos com o título 2×10^6 FACS IU/ml, porém no experimento teste nenhum mosquito alimentado com esta titulação viral foi detectado positivo para ZIKV.

Inicialmente analisou-se os mosquitos inteiros e posteriormente foi realizada a avaliação da glândula salivar e intestino separadamente, objetivando verificar o impacto sobre (i) a taxa de infecção, que é indicativa da aptidão do vírus em invadir e se reproduzir nas células epiteliais do intestino do mosquito e (ii) a potencial taxa de transmissão, representada pela presença do vírus nas glândulas salivares dos insetos, indicando que o ciclo foi finalizado e o mosquito está pronto para transmitir o vírus ao realizar o repasto sanguíneo (192).

Destaca-se que os experimentos com os *Ae. albopictus* dissecados não foram realizados com sucesso. Foram realizadas duas tentativas e em ambos os testes, todas as glândulas salivares e intestinos foram negativos para ZIKV. É importante relatar que todos os experimentos de *fitness*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* foram diretamente impactados pela pandemia da COVID-19. Os experimentos *in vivo*, que dependem de uma colônia de mosquitos,

foram especialmente prejudicados pois com as restrições de circulação na instituição não foi possível manter a colônia de mosquitos de forma contínua. Então, a cada experimento era necessário iniciar uma nova colônia, o que pode ter gerado um viés nestes experimentos, pois não eram indivíduos provenientes de uma mesma geração.

Na avaliação dos mosquitos inteiros P2_C6/36 e P40_C6/36 foram utilizados para infectar tanto os mosquitos *Ae. aegypti* quanto *Ae. albopictus*. Os dados em *Ae. albopictus* mostraram que com 8 pi, 90% dos mosquitos infectados com P2_C6/36 foram positivos pra ZIKV, contra 63,3% dos infectados com P40_C6/36. Com 14 pi, também foram detectados mais mosquitos infectados com P2_C6/36 do que com a P40_C6/36, sendo 90% e 85% respectivamente. Os dados da quantificação relativa mostraram que com 8 pi, a carga viral dos mosquitos alimentados com P40_C6/36 estava maior que a dos alimentados com P2_Aag-2, porém no tempo de 14 pi a carga viral relativa dos indivíduos infectados com P2_C6/36 foi maior que a de indivíduos infectados P40_C6/30.

Esses dados mostraram que o vírus mutante (P40) evoluído em C6/36 infectou menos mosquitos *Ae. albopictus* e apresentou carga viral relativa maior em apenas um dos tempos estudados, o que difere dos experimentos *in vitro*.

Nos ensaios com *Ae. aegypti*, no tempo de 8 pi foram detectados mais mosquitos positivos dentre os que foram alimentados com P2_C6/36, sendo 96,7% contra 63,3% dos alimentados com P40_C6/36. Porém com 14 pi 100% dos mosquitos infectados com ambas as amostras foram positivos para ZIKV.

No que se refere as glândulas e intestinos dissecados, as medianas de Cts em ambos os tecidos e nos dois tempos avaliados, foram menores dentre os vírus infectados com P2_C6/36. Além disso, foram detectadas mais glândulas salivares positivas dentre os alimentados com P2_C6/36 do que dentre os alimentados com P40_C6/36, sendo 73% contra 23% com 8 pi e 96% contra 60% com 14 pi. Nos intestinos, o resultado foi semelhante e com 8 pi foram 90% positivos dos alimentados com P2_C6/36 contra 73,4 dos alimentados com P40_C6/36. Com 14 pi foram 100% dos alimentados com P2_C6/36 e 86% com P40_C6/36. A carga viral relativa de P40_C6/36 estava maior que a de P2_C6/36 apenas nas glândulas salivares de *Ae. aegypti* com 8 pi e no tempo de 14 pi, bem como nos dois tempos avaliados nos intestinos a carga viral de P2_C6/36 foi maior.

Estes dados sugerem mostram que o vírus de P2_C6/36 foi mais apto para infectar os *Ae. aegypti* do que o vírus de P40_C6/36, o que era esperado de acordo com os resultados dos experimentos *in vitro*. Entretanto, como não foram obtidos os dados deste mesmo experimento com *Ae. albopictus*, não se pode afirmar que a evolução em C6/36 favoreceu ou não a aptidão nos mosquitos *Ae. albopictus*.

Com o vírus adaptado em Aag-2, como só foi possível realizar os experimentos com a P40, foi realizada a comparação entre os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* inteiros infectados com a P40_Aag-2. As medianas em *Ae. aegypti* foram sempre menores do que as detectadas em *Ae. albopictus*. Porém apenas 16,7% dos *Ae. aegypti* foram positivos contra 36,7% dos *Ae. albopictus*. Já com 14 pi 100% dos *Ae. aegypti* foram positivos e 55% dos *Ae. albopictus*. No que se refere as glândulas salivares e intestinos, com oitos dias após a infecção, foram seis glândulas salivares positivas (6/30) e 12 intestinos (12/30), com medianas de Cts de 34,6 e 37,0 respectivamente. Enquanto com 14 dias após a infecção foram 13 glândulas e 24 intestinos positivos. Com medianas de Cts de 33,0 e 36,2.

Não foram observadas diferenças significativas nas análises de dados obtidos dos experimentos *in vivo*. No entanto, cabe destacar que possíveis vieses como o fato de ser estabelecida uma nova colônia a cada experimento ou a presença de bactérias do gênero *Wolbachia* – endossimbiontes capazes de limitar a infecção por arbovírus em mosquitos do gênero *Aedes* (169,193), podem ter prejudicado estes ensaios. Desta forma seriam necessários outros experimentos *in vivo* para poder responder melhor a esta pergunta.

6 CONCLUSÕES

- 1) Foi observada uma maior variabilidade genética no vírus evoluído em células C6/36. Este dado sugere que o modelo Aag-2 limitou a evolução *in vitro*, provavelmente pelo fato de esta linhagem de células apresentar uma via RNAi funcional.
- 2) Todas as mutações foram observadas nas proteínas não estruturais, que exercem papel fundamental durante a replicação viral, sendo que as regiões que codificam para NS3 e NS5 foram as mais propensas para a ocorrência de mutações
- 3) A obtenção dos modelos tridimensionais não mostrou a ocorrência de mudança conformacional aparente nas estruturas de proteínas mutadas, porém como os modelos não foram submetidos a testes de dinâmica molecular não é possível inferir o impacto real das mutações sobre estas proteínas.
- 4) A adaptação do vírus em uma única linhagem de células resultou no ganho de aptidão na linhagem utilizada, sugerindo que ocorra aquisição de adaptação específica para cada linhagem.
- 5) Nos modelos *in vivo* não foram observadas diferenças significativas sobre o impacto das mutações na aptidão viral. Porém, estes experimentos podem ter sido prejudicados pelo fato de não ter sido utilizada a mesma colônia de insetos em todos os experimentos. Sendo assim, experimentos futuros serão necessários para avaliar melhor a aptidão *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS

1. Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika Virus (I). Isolation and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):509–20.
2. Dick GWA. Zika Virus (II). Pathogenicity and Physical Properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):521–34.
3. 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(2).
4. Boorman JPT, Draper CC. Isolations of arboviruses in the Lagos area of Nigeria, and a survey of antibodies to them in man and animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1968;62(2):269–77.
5. Wikan N, Smith DR. First published report of Zika virus infection in people: Simpson, not MacNamara. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017;17(1):15–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30525-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30525-4)
6. Centers for Disease Control and Prevention. Arbovirus A-Z: Zika Virus. *ArboCat.* 1985. p. 1–8.
7. Simpson DIH. Zika virus infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964;58(4):335–8.
8. Haddow AJ, Williams MC, Woodall JP, Simpson DI, Goma LK. Twelve Isolations of Zika Virus From *Aedes (Stegomyia) Africanus* (Theobald) Taken in and Above a Uganda Forest. *Bull World Health Organ.* 1964;31(1961):57–69.
9. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1969 May 1;18(3):411–5. Available from: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.1969.18.411>
10. Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, et al. Arthropod-borne viral infections of man in nigeria, 1964–1970. *Ann Trop Med Parasitol.* 1975;69(1):49–64.
11. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman G, Triwibowo V. Zika virus, a cause of fever in central java, indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75(3):389–93.
12. Fagbami AH. Zika virus infections in Nigeria: Virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J Hyg (Lond).* 1979;83(2):213–9.
13. Rodhain F, Gonzalez JP, Mercier E, Helynck B, Larouze B, Hannoun C. 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.
14. 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(24):2536–43.
15. 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* [Internet]. 2008 Aug;14(8):1232–9. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287_article.htm
 16. Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2014 Jun;20(6):1084–6. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/6/14-0138_article.htm
 17. Aubry M, Teissier A, Huart M, Merceron S, Vanhomwegen J, Roche C, et al. Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2017 Apr;23(4):669–72. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/4/16-1549_article.htm
 18. Mallet H-P, Vial AL, Musso D. Bilan de l'épidémie à virus Zika survenue en Polynésie française entre octobre 2013 et mars 2014. *Bull Hebd Epidemiol*. 2016;20–21:367–73.
 19. Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* [Internet]. 2016 Apr;387(10027):1531–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616005626>
 20. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014;20(10):O595–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12707>
 21. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and zika virus infections – An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance* [Internet]. 2014;19(41):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.41.20929>
 22. 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;161(3):665–8.
 23. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2016 Jul;29(3):487–524. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00072-15>
 24. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015 Oct;21(10):1885–6. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0847_article.htm

25. Zanoluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos CND dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2015 Jun 9;110(4):569–72. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000400569&lng=en&tlng=en
26. Pan American Health Organization. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the americas. *Epidemiol Alert*. 2015;December:1–11.
27. Pan American Health Organization / World Health Organization. Zika - Epidemiological Update. *Epidemioligal Updat*. 2016;(December):1–3.
28. Pan American Health Organization / World Health Organization. Zika suspected and confirmed cases reported by countries and territories in the Americas Cumulative cases, 2015-2016. PAHO website [Internet]. 2016;(December):2016. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=37582&lang=en
29. Pan American Health Organization / World Health Organization. Zika - Epidemiological Update. *Epidemiological Update - PAHO website*. 2017. p. 1–5.
30. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. *Bol Epidemiológico*. 2016;47(3):1–10.
31. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico 47: Situação epidemiológica da infecção pelo vírus Zika no Brasil, de 2015 a 2017. *Bol Epidemiológico* [Internet]. 2018;49(47):1–12. Available from: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/12/2018-034.pdf>
32. Pan American Health Organization / World Health Organization. Neurological syndrome, congenital anomalies, and Zika virus infection. *Epidemiol Updat - PAHO website*. 2016;January(January):108.
33. Brasil. Ministério da Saúde. Evento de saúde pública relacionado aos casos de Febre do Zika [Internet]. <https://antigo.saude.gov.br/noticias/svs/19139-evento-de-saude-publica-relacionado-aos-casos-de-febre-do-zika>. 2015. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/19139-evento-de-saude-publica-relacionado-aos-casos-de-febre-do-zika>
34. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Situação epidemiológica de ocorrência de microcefalias no Brasil, 2015. *Bol Epidemiológico*.

- 2015;46(34):1–3.
35. Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2016 Sep 1;94(9):675–686C. Available from: <http://www.who.int/entity/bulletin/volumes/94/9/16-171082.pdf>
 36. Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. *Bol Epidemiológico* [Internet]. 2019;50(Nº 04 | Janeiro):1–14. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/01/2018-038.pdf>
 37. Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 01 a 52. *Bol Epidemiológico Arboviroses*. 2020;51(Nº 02 | Janeiro):1–13.
 38. Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. *Bol Epidemiológico Arboviroses* [Internet]. 2021;52(Nº 3 | Janeiro):1–31. Available from: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf
 39. FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAZONAS. Boletim Epidemiológico Arboviroses. *Bol Epidemiológico*. 2020;(Nº1-Fevereiro):1–7.
 40. Kuno G, Chang G-JJ, Tsuchiya R, Karabatsos N, Cropp B. Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. *J Virol*. 1998;72(1):73–83.
 41. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2003 Nov 5;10(11):907–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 42. Lindenbach B, Thiel H-J, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. *Fields Virol*. 2007;(5):1101–51.
 43. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Flaviviridae*. *J Gen Virol* [Internet]. 2017 Jan 1;98(1):2–3. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000672>
 44. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, Diallo M, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. Bird B, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 Jan 9;8(1):e2636. Available from:

- <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002636>
45. Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, Signor L del CC. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2016 May;22(5):933–5. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/5/16-0065_article.htm
 46. Gubler DJ, Vasilakis N, Musso D. History and Emergence of Zika Virus. *J Infect Dis* [Internet]. 2017 Dec 16;216(suppl_10):S860–7. Available from: https://academic.oup.com/jid/article/216/suppl_10/S860/4753677
 47. Gutiérrez-Bugallo G, Piedra LA, Rodriguez M, Bisset JA, Lourenço-de-Oliveira R, Weaver SC, et al. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nat Ecol Evol* [Internet]. 2019 Apr 18;3(4):561–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-019-0836-z>
 48. Wolfe ND, Kilbourn AM, Spielman A, Gubler DJ, Cropp BC, Andau M, et al. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2001 May 1;64(5):310–6. Available from: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.2001.64.310>
 49. Weaver SC. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol* [Internet]. 2013 Aug;21(8):360–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X13000541>
 50. Vasilakis N, Weaver SC. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2017 Feb;22(5):30–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>
 51. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddock AD, et al. Probable Non–Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2011 May;17(5):880–2. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/5/10-1939_article.htm
 52. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015 Feb;21(2):359–61. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/2/14-1363_article.htm
 53. 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. *Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2016 Apr 15;65(14):372–4. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6514a3.htm>
 54. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French

- Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance* [Internet]. 2014;19(14):20761. Available from: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761>
55. Magnus MM, Espósito DLA, Costa VA da, Melo PS de, Costa-Lima C, Fonseca BAL da, et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematol Transfus Cell Ther* [Internet]. 2018;40(3):250–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.01.011>
 56. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* [Internet]. 2014;19(13):20751. Available from: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751>
 57. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, De Filippis AMB. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obs Gynecol*. 2016;47:6–7.
 58. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, dos Santos AAC, Menezes LSR, da Cruz SOD, et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. Rothman AL, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Jun 24;10(6):e0004816. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004816>
 59. Du S, Liu Y, Liu J, Zhao J, Champagne C, Tong L, et al. Aedes mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 22;10(1):1324. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-09256-0>
 60. Colt S, Garcia-Casal MN, Peña-Rosas JP, Finkelstein JL, Rayco-Solon P, Weise Prinzo ZC, et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4).
 61. Pielnaa P, Al-Saadawe M, Saro A, Dama MF, Zhou M, Huang Y, et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology* [Internet]. 2020 Apr;543(February):34–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>
 62. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 2016;374(10):951–8.
 63. de Araújo TVB, Ximenes RA de A, Miranda-Filho D de B, Souza WV, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(March):328–36.

64. Leonhard SE, Halstead S, Lant SB, Militão de Albuquerque M de FP, de Brito CAA, de Albuquerque LBB, et al. Guillain-Barré syndrome during the Zika virus outbreak in Northeast Brazil: An observational cohort study. *J Neurol Sci* [Internet]. 2021 Jan;420(December 2020):117272. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X20306080>
65. Waggoner JJ, Roupheal N, Xu Y, Natrajan M, Lai L, Patel SM, et al. Pericarditis Associated With Acute Zika Virus Infection in a Returning Traveler. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2017 Apr 1;4(2):1–4. Available from: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofx103/3831307>
66. Abdalla LF, Santos JHA, Barreto RTJ, Souza EME, D'Assunção FF, Borges MA, et al. Atrial fibrillation in a patient with Zika virus infection. *Virology*. 2018;15(1):4–9.
67. Kuno G, Chang G-JJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol* [Internet]. 2007 Apr 3;152(4):687–96. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-006-0903-z>
68. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:649–88.
69. Edgil D, Polacek C, Harris E. Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *J Virol* [Internet]. 2006 Mar 15;80(6):2976–86. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.80.6.2976-2986.2006>
70. Song Y, Mugavero J, Stauff CB, Wimmer E. Dengue and Zika Virus 5' Untranslated Regions Harbor Internal Ribosomal Entry Site Functions. Shenk T, editor. *MBio* [Internet]. 2019 Apr 30;10(2):1–16. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00459-19>
71. Clarke BD, Roby JA, Slonchak A, Khromykh AA. Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Res* [Internet]. 2015;206:53–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.026>
72. Manokaran G, Finol E, Wang C, Gunaratne J, Bahl J, Ong EZ, et al. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science* (80-) [Internet]. 2015 Oct 9;350(6257):217–21. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aab3369>
73. Villordo SM, Gamarnik A V. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res* [Internet]. 2009 Feb;139(2):230–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170208002797>

74. Wang E, Weaver SC, Shope RE, Tesh RB, Watts DM, Barrett ADT. Genetic Variation in Yellow Fever Virus: Duplication in the 3' Noncoding Region of Strains from Africa. *Virology* [Internet]. 1996 Nov;225(2):274–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682296906017>
75. Shurtleff AC, Beasley DWC, Chen JJY, Ni H, Suderman MT, Wang H, et al. Genetic Variation in the 3' Non-Coding Region of Dengue Viruses. *Virology* [Internet]. 2001 Mar;281(1):75–87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682200907487>
76. Fernández-Sanlés A, Ríos-Marco P, Romero-López C, Berzal-Herranz A. Functional Information Stored in the Conserved Structural RNA Domains of Flavivirus Genomes. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Apr 3;08(APR). Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00546/full>
77. Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol* [Internet]. 1997 May;71(5):3466–73. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.71.5.3466-3473.1997>
78. Cui T, Sugrue RJ, Xu Q, Lee AKW, Chan YC, Fu J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology*. 1998;246(2):409–17.
79. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev S V., Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* [Internet]. 2002 Mar 8;108(5):717–25. Available from: http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789814513357_0037
80. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2010 Aug 6;67(16):2773–86. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-010-0357-z>
81. Shang Z, Song H, Shi Y, Qi J, Gao GF. Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. *J Mol Biol* [Internet]. 2018 Mar;430(7):948–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.02.006>
82. Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX. Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. *J Virol*. 2004;78(15):8078–84.
83. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2005 Jan;3(1):13–22. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1067>

84. Zhu Z, Chan JF-W, Tee K-M, Choi GK-Y, Lau SK-P, Woo PC-Y, 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* [Internet]. 2016 Jan 25;5(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2016.48>
85. Bos S, Viranaicken W, Turpin J, El-Kalamouni C, Roche M, Krejbich-Trotot P, et al. The structural proteins of epidemic and historical strains of Zika virus differ in their ability to initiate viral infection in human host cells. *Virology* [Internet]. 2018 Mar;516(October 2017):265–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.003>
86. Yuan L, Huang XY, Liu ZY, Zhang F, Zhu XL, Yu JY, et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* (80-). 2017;358(6365):933–6.
87. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. Vol. 375, *Nature*. 1995. p. 291–8.
88. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney M-C, Medits I, Sharma A, et al. Structural basis of potent Zika–dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature* [Internet]. 2016 Aug 4;536(7614):48–53. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature18938>
89. Heinz FX, Allison SL. Flavivirus Structure and Membrane Fusion. In: *Advances in Virus Research* [Internet]. 2003. p. 63–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352703590030>
90. Limjindaporn T, Wongwiwat W, Noisakran S, Srisawat C, Netsawang J, Puttikhunt C, et al. Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009 Feb;379(2):196–200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.070>
91. Dai L, Song J, Lu X, Deng Y-Q, Musyoki AM, Cheng H, et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016 May;19(5):696–704. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.013>
92. Lee E, Weir RC, Dalgarno L. Changes in the Dengue Virus Major Envelope Protein on Passaging and Their Localization on the Three-Dimensional Structure of the Protein. *Virology* [Internet]. 1997 Jun;232(2):281–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682297985706>

93. Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology*. 1998;246(2):317–28.
94. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2003 Jun 10;100(12):6986–91. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0832193100>
95. Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol [Internet]*. 2008 Sep 30;6(9):699–708. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
96. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1053–7.
97. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. *Viol J [Internet]*. 2016;13(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
98. Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23(5):456–8.
99. Brown WC, Akey DL, Konwerski JR, Tarrasch JT, Skinnotis G, Kuhn RJ, et al. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nat Struct Mol Biol [Internet]*. 2016 Sep 25;23(9):865–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nsmb.3268>
100. Zhang X, Xie X, Xia H, Zou J, Huang L, Popov VL, et al. Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. Horner SM, editor. *MBio [Internet]*. 2019 Oct 29;10(5):1–21. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.02375-19>
101. Zhang X, Xie X, Zou J, Xia H, Shan C, Chen X, et al. Genetic and biochemical characterizations of Zika virus NS2A protein. *Emerg Microbes Infect [Internet]*. 2019 Jan 1;8(1):585–602. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2019.1598291>
102. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2003 Nov 25;100(24):14333–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2335168100>
103. Roy A, Lim L, Srivastava S, Lu Y, Song J. Solution conformations of Zika NS2B-NS3pro and its inhibition by natural products from edible plants. *PLoS One*. 2017;12(7):1–22.

104. Xing H, Xu S, Jia F, Yang Y, Xu C, Qin C, et al. Zika NS2B is a crucial factor recruiting NS3 to the ER and activating its protease activity. *Virus Res* [Internet]. 2019 Jan;275:197793. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197793>
105. Aguilera-Pesantes D, Méndez MA. Structure and sequence based functional annotation of Zika virus NS2b protein: Computational insights. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017 Oct;492(4):659–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.035>
106. Xu S, Ci Y, Wang L, Yang Y, Zhang L, Xu C, et al. Zika virus NS3 is a canonical RNA helicase stimulated by NS5 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Sep 19;47(16):8693–707. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/47/16/8693/5541095>
107. Benarroch D, Selisko B, Locatelli GA, Maga G, Romette J-L, Canard B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology* [Internet]. 2004 Oct;328(2):208–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682204004635>
108. Kumar D, Kumar A, Bhardwaj T, Giri R. Zika virus NS4A N-Terminal region (1-48) acts as a cofactor for inducing NTPase activity of NS3 helicase but not NS3 protease. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2020;695:108631. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108631>
109. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo S-S, Lee S-A, et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2016 Nov;19(5):663–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590916302144>
110. Wang B, Thurmond S, Hai R, Song J. Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018 May 8;75(10):1723–36. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-018-2751-x>
111. Hertzog J, Dias Junior AG, Rigby RE, Donald CL, Mayer A, Sezgin E, et al. Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. *Eur J Immunol*. 2018;48(7):1120–36.
112. Hasan SS, Sevvana M, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2018;25(1):13–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>
113. Agrelli A, de Moura RR, Crovella S, Brandão LAC. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2019;69(November 2018):22–9. Available

- from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.018>
114. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2009;5(4):318–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.001>
 115. Villarreal LP. Evolution of Viruses. *Encycl Virol*. 2008;(January):174–84.
 116. Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. *Nat Rev Genet*. 2008;9(4):267–76.
 117. Sanjuán R. From Molecular Genetics to Phylodynamics: Evolutionary Relevance of Mutation Rates Across Viruses. Sherry B, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012 May 3;8(5):e1002685. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002685>
 118. Peck KM, Luring AS. Complexities of Viral Mutation Rates. Sullivan CS, editor. *J Virol* [Internet]. 2018 Jul 15;92(14). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01031-17>
 119. Sanjuán R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(23):4433–48.
 120. Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral Mutation Rates. *J Virol* [Internet]. 2010 Oct;84(19):9733–48. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00694-10>
 121. Smith EC, Sexton NR, Denison MR. Thinking outside the triangle: Replication fidelity of the largest RNA viruses. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):111–32.
 122. Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ. Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res*. 2006;117(1):17–37.
 123. Lynch M. Evolution of the mutation rate. *Trends Genet* [Internet]. 2010 Aug;26(8):345–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952510001034>
 124. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* [Internet]. 1992;66(5):3225–9. Available from: [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:population+of+different+but+closely+related+Hepatitis+C+Virus+\(+HCV+\)+Circulates+as+a+Population+of+Different+but+Closely+Related+Genomes+:+Quasispecies+Nature+of+HCV+Genome+Distribution#7%5Cnh](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:population+of+different+but+closely+related+Hepatitis+C+Virus+(+HCV+)+Circulates+as+a+Population+of+Different+but+Closely+Related+Genomes+:+Quasispecies+Nature+of+HCV+Genome+Distribution#7%5Cnh)
 125. Wang W-K, Lin S-R, Lee C-M, King C-C, Chang S-C. Dengue Type 3 Virus in Plasma Is a Population of Closely Related Genomes: Quasispecies. *J Virol* [Internet]. 2002 May;76(9):4662–5. Available from:

- <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.76.9.4662-4665.2002>
126. Holmes EC, Moya A. Is the Quasispecies Concept Relevant to RNA Viruses? *J Virol* [Internet]. 2002 Jan;76(1):460–2. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.76.1.460-462.2002>
 127. Weaver SC, Forrester NL, Liu J, Vasilakis N. Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021;19(3):184–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00482-8>
 128. McCrone JT, Lauring AS. Genetic bottlenecks in intraspecies virus transmission. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2018 Feb;28(734):20–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625717300779>
 129. Deardorff ER, Fitzpatrick KA, Jerzak GVS, Shi PY, Kramer LD, Ebel GD. West Nile virus experimental evolution in vivo and the trade-off hypothesis. *PLoS Pathog.* 2011;7(11).
 130. Weaver SC, Brault AC, Kang W, Holland JJ. Genetic and Fitness Changes Accompanying Adaptation of an Arbovirus to Vertebrate and Invertebrate Cells. *J Virol* [Internet]. 1999 May;73(5):4316–26. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.73.5.4316-4326.1999>
 131. Coffey LL, Vasilakis N, Brault AC, Powers AM, Tripet F, Weaver SC. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008 May 13;105(19):6970–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0712130105>
 132. Ciota AT, Lovelace AO, Jia Y, Davis LJ, Young DS, Kramer LD. Characterization of mosquito-adapted West Nile virus. *J Gen Virol.* 2008;89(7):1633–42.
 133. Seligman SJ. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide. *Virol J* [Internet]. 2008;5(1):27. Available from: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-5-27>
 134. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007;3(12):1895–906.
 135. Arias-Goeta C, Moutailler S, Mousson L, Zouache K, Thiberge J-M, Caro V, et al. Chikungunya virus adaptation to a mosquito vector correlates with only few point mutations in the viral envelope glycoprotein. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014 Jun;24:116–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.015>
 136. Wang L, Valderramos SG, Wu A, Ouyang S, Li C, Brasil P, et al. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell Host Microbe.* 2016;19(5):561–5.

137. Hung S-J, Huang S-W. Contributions of Genetic Evolution to Zika Virus Emergence. *Front Microbiol* [Internet]. 2021 May 6;12(May):1–7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.655065/full>
138. Kochakarn T, Kotanan N, Kumpornsin K, Loesbanluechai D, Thammasatta M, Auewarakul P, et al. Comparative genome analysis between Southeast Asian and South American Zika viruses. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9(11):1048–54.
139. Carbaugh DL, Baric RS, Lazear HM. Envelope Protein Glycosylation Mediates Zika Virus Pathogenesis. *J Virol*. 2019;93(12):1–16.
140. Liu J, Liu Y, Shan C, Nunes BT, Yun R, Haller SL, et al. Role of mutational reversions and fitness restoration in Zika virus spread to the Americas. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec 26;12(1):595. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20747-3>
141. Liu Y, Liu J, Du S, Shan C, Nie K, Zhang R, et al. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature* [Internet]. 2017;545(7655):482–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature22365>
142. Freire CC de M, Palmisano G, Braconi CT, Cugola FR, Russo FB, Beltrão-Braga PCB, et al. NS1 codon usage adaptation to humans in pandemic Zika virus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(5):1–8.
143. Giovanetti M, Milano T, Alcantara LC, Carcangiu L, Cella E, Lai A, et al. Zika Virus spreading in South America: Evolutionary analysis of emerging neutralizing resistant Phe279Ser strains. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2016 May;9(5):445–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.028>
144. Stapleford KA, Coffey LL, Lay S, Bordería A V., Duong V, Isakov O, et al. Emergence and transmission of arbovirus evolutionary intermediates with epidemic potential. *Cell Host Microbe*. 2014;15(6):706–16.
145. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol* [Internet]. 2000 Feb;8(2):74–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X99016698>
146. Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog*. 2005;1(2):0102–10.
147. Dowd KA, DeMaso CR, Pierson TC. Genotypic Differences in Dengue Virus Neutralization Are Explained by a Single Amino Acid Mutation That Modulates Virus Breathing. Dermody TS, editor. *MBio* [Internet]. 2015 Dec 31;6(6). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01559-15>
148. Silveira GF, Strottmann DM, de Borba L, Mansur DS, Zanchin NIT, Bordignon J, et al. Single point mutations in the helicase domain of the NS3 protein enhance dengue virus

- replicative capacity in human monocyte-derived dendritic cells and circumvent the type I interferon response. *Clin Exp Immunol*. 2016;183(1):114–28.
149. Wargo AR, Kurath G. Viral fitness: Definitions, measurement, and current insights. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2012;2(5):538–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2012.07.007>
 150. Domingo E. Mechanisms of viral emergence. *Vet Res*. 2010;41(6).
 151. Domingo E, Holland JJ. Rna Virus Mutations and Fitness for Survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151–78.
 152. Shan C, Xia H, Haller SL, Azar SR, Liu Y, Liu J, et al. A Zika virus envelope mutation preceding the 2015 epidemic enhances virulence and fitness for transmission. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2020 Aug 18;117(33):20190–7. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.2005722117>
 153. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, et al. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *J Virol*. 1999;73(6):4738–47.
 154. Domingo E, de Ávila AI, Gallego I, Sheldon J, Perales C. Viral fitness: History and relevance for viral pathogenesis and antiviral interventions. *Pathog Dis*. 2019;77(2).
 155. Ciota AT, Ehrbar DJ, Maticchiero AC, Van Slyke GA, Kramer LD. The evolution of virulence of West Nile virus in a mosquito vector: Implications for arbovirus adaptation and evolution. *BMC Evol Biol* [Internet]. 2013;13(1):1–12. Available from: *BMC Evolutionary Biology*
 156. Chen LK, Lin YL, Liao CL, Lin CG, Huang YL, Yeh CT, et al. Generation and characterization of organ-tropism mutants of Japanese encephalitis virus in vivo and in vitro. *Virology*. 1996;223(1):79–88.
 157. Thant KZ, Morita K, Igarashi A. Sequences of E/NS1 Gene Junction from Four Dengue-2 Viruses of Northeastern Thailand and Their Evolutionary Relationships with Other Dengue-2 Viruses. *Microbiol Immunol*. 1995;39(8):581. – 590.
 158. Pettersson JHO, Eldholm V, Seligman SJ, Lundkvist Å, Falconar AK, Gaunt MW, et al. How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? *MBio* [Internet]. 2016 May 2;7(5). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00386-18>
 159. Xia H, Luo H, Shan C, Muruato AE, Nunes BT, Medeiros DBA, et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02816-2>
 160. Lemos D, Stuart JB, Louie W, Singapuri A, Ramírez AL, Watanabe J, et al. Two Sides of a Coin: a Zika Virus Mutation Selected in Pregnant Rhesus Macaques Promotes Fetal

- Infection in Mice but at a Cost of Reduced Fitness in Nonpregnant Macaques and Diminished Transmissibility by Vectors. *J Virol*. 2020;94(24):1–20.
161. Forrester NL, Coffey LL, Weaver SC. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses*. 2014;6(10):3991–4004.
 162. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc*. 2017;12(6):1261–6.
 163. Humphreys GO, Willshaw GA, Anderson ES. A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta - Nucleic Acids Protein Synth* [Internet]. 1975 Apr;383(4):457–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005278775903184>
 164. Xu D, Zhang Y. Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-Step Atomic-Level Energy Minimization. *Biophys J* [Internet]. 2011 Nov;101(10):2525–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.10.024>
 165. Medina F, Medina JF, Colón C, Vergne E, Santiago GA, Muñoz-Jordán JL. Dengue Virus: Isolation, Propagation, Quantification, and Storage. *Curr Protoc Microbiol* [Internet]. 2012 Nov;27(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259.mc15d02s27>
 166. Lambeth CR, White LJ, Johnston RE, de Silva AM. Flow Cytometry-Based Assay for Titrating Dengue Virus. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Jul;43(7):3267–72. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.43.7.3267-3272.2005>
 167. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec;25(4):402–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>
 168. Naveca FG, Nascimento VA do, Souza VC de, Nunes BT, Rodrigues DSG, Vasconcelos PF da C. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2017 Jul;112(7):510–3. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762017000700510&lng=en&tlng=en
 169. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, et al. A Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* [Internet]. 2009 Dec;139(7):1268–78. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409015001>

170. Wang B, Tan X-F, Thurmond S, Zhang Z-M, Lin A, Hai R, et al. The structure of Zika virus NS5 reveals a conserved domain conformation. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Apr 27;8(1):14763. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms14763>
171. Vorou R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2016 Jul;48:85–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.05.014>
172. Ebel GD. Toward an Activist Agenda for Monitoring Virus Emergence. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2014 Jun;15(6):655–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.014>
173. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? Charrel R, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 Feb 6;8(2):e2681. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002681>
174. Figueiredo LTM. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* e *Rhabdoviridae*. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 1990 Mar;23(1):13–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821990000100003&lng=pt&tlng=pt
175. Barreto-Vieira DF, Jácome FC, da Silva MAN, Caldas GC, de Filippis AMB, de Sequeira PC, et al. Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. Xing Z, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Sep 12;12(9):e0184397. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0184397>
176. Barletta ABF, Silva MCLN, Sorgine MHF. Validation of *Aedes aegypti* Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasites and Vectors*. 2012;5:1–9.
177. Fredericks AC, Russell TA, Wallace LE, Davidson AD, Fernandez-Sesma A, Maringer K. *Aedes aegypti* (Aag2)-derived clonal mosquito cell lines reveal the effects of pre-existing persistent infection with the insect-specific bunyavirus Phasi Charoen-like virus on arbovirus replication. Ribeiro JMC, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2019 Nov 6;13(11):e0007346. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007346>
178. Brackney DE, Scott JC, Sagawa F, Woodward JE, Miller NA, Schilkey FD, et al. C6/36 *Aedes albopictus* Cells Have a Dysfunctional Antiviral RNA Interference Response. O’Neill SL, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2010 Oct 26;4(10):e856. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000856>
179. Scott JC, Brackney DE, Campbell CL, Bondu-Hawkins V, Hjelle B, Ebel GD, et al.

- Comparison of Dengue Virus Type 2-Specific Small RNAs from RNA Interference-Competent and –Incompetent Mosquito Cells. O’Neill SL, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2010 Oct 26;4(10):e848. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000848>
180. Travassos da Rosa A, Travassos da Rosa E, Rosa J, Dégallier N, Vasconcelos P, Rodrigues S, et al. Os Arbovírus no Brasil: Generalidades, Métodos e Técnicas de Estudo. Doc Técnico - Inst Evandro Chagas - Fundação Nac Saúde - Ministério da Saúde. 1998;2:57.
 181. Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AWE, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J, et al. Dengue Virus Type 2 Infections of *Aedes aegypti* Are Modulated by the Mosquito’s RNA Interference Pathway. Rice CM, editor. PLoS Pathog [Internet]. 2009 Feb 13;5(2):e1000299. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000299>
 182. Merklings SH, van Rij RP. Beyond RNAi: Antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. J Insect Physiol [Internet]. 2013 Feb;59(2):159–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.07.004>
 183. Molina BF. Investigação de mutações no genoma do ZIKVBR após passagens in vitro em células de hospedeiro humano e símio. Estadual Paulista - Campus de São José do Rio Preto; 2021.
 184. Manrubia SC, Escarmís C, Domingo E, Lázaro E. High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. Gene [Internet]. 2005 Mar;347(2):273–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111904007760>
 185. Nascimento VA do. MICROEVOLUÇÃO IN VITRO DO VÍRUS DENGUE, SOROTIPO-4: ESTUDO DE VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO AUMENTO DA COMPETÊNCIA VIRAL. Universidade Federal do Amazonas; 2016.
 186. Vasilakis N, Deardorff ER, Kenney JL, Rossi SL, Hanley KA, Weaver SC. Mosquitoes Put the Brake on Arbovirus Evolution: Experimental Evolution Reveals Slower Mutation Accumulation in Mosquito Than Vertebrate Cells. Andino R, editor. PLoS Pathog [Internet]. 2009 Jun 5;5(6):e1000467. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000467>
 187. Gomes AL do V. Expressão De Genes Relacionados Com a Indução Da Resposta Imune Inata Da Dengue : Implicações No Prognóstico. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães; 2011.
 188. Chang DC, Hoang LT, Mohamed Naim AN, Dong H, Schreiber MJ, Hibberd ML, et al. Evasion of early innate immune response by 2'- O -methylation of dengue genomic RNA.

- Virology [Internet]. 2016 Dec;499:259–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.09.022>
189. Greene IP, Wang E, Deardorff ER, Milleron R, Domingo E, Weaver SC. Effect of Alternating Passage on Adaptation of Sindbis Virus to Vertebrate and Invertebrate Cells. *J Virol* [Internet]. 2005 Nov 15;79(22):14253–60. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.79.22.14253-14260.2005>
 190. Cooper LA, Scott TW. Differential Evolution of Eastern Equine Encephalitis Virus Populations in Response to Host Cell Type. *Genetics* [Internet]. 2001 Apr 1;157(4):1403–12. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/157/4/1403/6048280>
 191. Pereira-Silva JW, Nascimento VA do, Belchior HCM, Almeida JF, Pessoa FAC, Naveca FG, et al. First evidence of Zika virus venereal transmission in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2018 Nov 27;113(1):56–61. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000100056&lng=en&tlng=en
 192. Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM de, Barbosa da Silva KA, Castro MG de, et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. Armstrong PM, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Sep 6;10(9):e0004993. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004993>
 193. Dutra HLC, Rocha MN, Dias FBS, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016;19(6):771–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.021>