

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Yuri Mouzinho Ramos Tanaka

**Investigação da dinâmica de interação e internalização do vírus Zika em
células de inseto**

Recife

2022

Yuri Mouzinho Ramos Tanaka

Investigação da dinâmica de interação e internalização do vírus Zika em células de inseto

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

Coorientadoras: Dra. Regina Celia Bressan e Dra. Duschinka Guedes

RECIFE

2022

Título do trabalho em inglês: Investigation of the dynamics of interaction and internalization of the Zika virus in insect cells.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Código de Financiamento 001.

T161

Tanaka, Yuri Mouzinho Ramos.

Investigação da dinâmica de interação e internalização do vírus Zika em células de inseto / Yuri Mouzinho Ramos Tanaka. -- 2022.

71 p. : il.color.

Orientadora: Tatiany Patrícia Romão.

Coorientadores: Regina Celia Bressan e Duschinka Ribeiro Guedes.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em

Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto

CDU 614

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239 Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Yuri Mouzinho Ramos Tanaka

Investigação da dinâmica de interação e internalização do vírus Zika em células de inseto

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 28 de fevereiro 2022

BANCA EXAMINADORA

Dr. Christian Robson de Souza Reis

Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Danielle Maria Nascimento Moura

Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

TANAKA, Yuri Mouzinho Ramos. **Investigação da dinâmica de interação e internalização do vírus Zika em células de inseto**. 2022. Dissertação. (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Os estudos voltados para entender a biologia da infecção causada pelo Zika vírus (ZIKV) em diferentes tecidos e espécies de mosquitos ainda são escassos. Para infectar uma célula hospedeira e iniciar a sua replicação, o vírus precisa ser internalizado no compartimento intracelular. O processo consiste em uma série intrincada de eventos altamente dinâmicos, fortemente coordenados, incluindo, entre outros, a ligação do vírus às células, o tráfico intracelular e a entrega da informação genética do vírus. A falta de conhecimentos sobre os mecanismos associados à biologia da infecção do mosquito vetor pelo ZIKV, incentivaram o presente estudo que investigou de forma comparativa a infecção do ZIKV em duas linhagens celulares de inseto com perfis distintos de suscetibilidade e permissibilidade à progressão do ciclo de infecção viral, a suscetível C6/36 (de *Aedes albopictus*) e a não suscetível Sf9 (de *Spodoptera frugiperda*). Desta forma, o objetivo central deste projeto foi caracterizar fatores moleculares e ultraestruturais determinantes para a internalização do vírus Zika PE243 em linhagens celulares de inseto, através da investigação da cinética de infecção viral, da avaliação ultraestrutural e do perfil transcriptômico de células C6/36 e Sf9 em resposta à infecção. A cinética de replicação viral foi avaliada por RT-qPCR e o monitoramento da internalização viral, bem como investigar possíveis alterações ultraestruturais induzidas pela infecção, foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). As variações na expressão de genes envolvidos em vias metabólicas associadas à progressão do ciclo de infecção e patogênese viral foram investigadas através de RNAseq em equipamento Illumina® MiSeq System. As análises da cinética de replicação nas células C6/36 e Sf9 evidenciaram que o ciclo de replicação viral após a infecção do ZIKV em Sf9 não progride, contrastando com a linhagem C6/36 cujo número de cópias de RNA viral progride significativamente em 48hpi (Cq de 24) e para Sf9 (Cq de 28) sem progressão de sinal de infecção independente do *time point*. Entretanto, através de microscopia MET e MEV foi demonstrado pela primeira vez alterações induzidas pela exposição do ZIKV na célula Sf9, como desorganização de membranas de retículo endoplasmático formando estruturas semelhantes a autofagossomos em ambas linhagens celulares, assim como a formação de corpos multivesiculares. Os resultados iniciais do sequenciamento forneceram informações gerais sobre a qualidade dos reads para as futuras análises. Os conhecimentos gerados contribuirão de forma significativa no entendimento da biologia da infecção do ZIKV em seus hospedeiros invertebrados.

Palavras chaves: vírus Zika; replicação viral; Células Sf9

ABSTRACT

TANAKA, Yuri Mouzinho Ramos. **Investigation of the dynamics of interaction and internalization of the Zika virus in insect cells.** 2022. Dissertação. (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Studies aimed at understanding the biology of infection caused by the Zika virus (ZIKV) in different tissues and species of mosquitoes are still scarce. To infect a host cell and initiate its replication, the virus needs to be internalized into the intracellular compartment. The process consists of an intricate series of highly exciting, tightly coordinated events, including but not limited to virus attachment to cells, intracellular trafficking, and delivery of the virus's genetic information. The lack of knowledge about the controls associated with the biology of the mosquito vector infection by ZIKV encouraged the present study, which comparatively investigated the ZIKV infection in two insect cell lines with different profiles of susceptibility and permissibility to the progression of the infection cycle viral, the susceptible C6/36 (from *Aedes albopictus*) and the non-susceptible Sf9 (from *Spodoptera frugiperda*). Thus, the main objective of this project was to characterize molecular and ultrastructural factors that determine the internalization of the Zika virus PE243 in insect cell lines, through the investigation of viral infection kinetics, evaluation of the ultrastructural and transcriptomic profile of C6/36 and Sf9 in response to infection. The viral replication kinetics was evaluated by RT-qPCR and the monitoring of the viral internalization structure, as well as investigating possible ultranal changes induced by the infection, were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Variations in the expression of genes involved in metabolic pathways associated with the progression of the infection cycle and viral pathogenesis were investigated using RNAseq in the Illumina MiSeq System equipment. Analysis of the replication kinetics in C636 and Sf9 cells showed that the viral replication cycle after ZIKV infection in Sf9 does not progress, in contrast to the C6/36 lineage, whose number of viral RNA copies significantly progresses in 48hpi (Cq of 24) and for Sf9 (Cq of 28) with no infection signal progression regardless of time point. However, TEM and SEM microscopy demonstrated for the first time changes induced by exposure to ZIKV in the Sf9 cell, such as disorganization of endoplasmic reticulum membranes forming structures similar to autophagosomes in both cell lines, as well as the formation of multivesicular bodies. The initial sequencing results provide general information about the quality of the reads for future analyses. The knowledge generated will significantly contribute to the understanding of the biology of ZIKV infection in its invertebrate hosts.

Keywords: Zika vírus; viral replication; Sf9 cells

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Ciclo de transmissão do ZIKV | 15 |
| Figura 2 - | Árvore filogenética de isolados do ZIKV | 16 |
| Figura 3 - | Organização genômica, estrutural e processamento da poliproteína do ZIKA | 18 |
| Figura 4 - | Ciclo de replicação dos <i>Flavivírus</i> | 26 |
| Figura 5 - | Fluxograma experimental | 34 |
| Figura 6 - | Avaliação do efeito citopático em Sf9 (<i>Spodoptera frugiperda</i>) e C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>) | 45 |
| Figura 7 - | Microscopia eletrônica de varredura de Sf9 e C6/36 exposta ao ZIKV | 47 |
| Figura 8 - | Microscopia eletrônica das células C6/36 e Sf9 expostas ao ZIKV | 50 |
| Figura 9 - | Imunodeteção do vírus Zika presente em sobrenadante e/ou sedimento de células C6/36 com 72hpi. | 51 |
| Figura 10 - | Migração eletroforética em gel de agarose 1% de extração de RNAs totais de Sf9 | 52 |
| Figura 11 - | Migração eletroforética em gel de agarose 1% de fragmentação e síntese de cDNA | 53 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Cinética de replicação do vírus Zika por Cq em células Sf9 (<i>Spodoptera frugiperda</i>) e C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>) | 43 |
| Gráfico 2 - Cinética de replicação do vírus Zika por números de cópias de RNA viral em células Sf9 (<i>Spodoptera frugiperda</i>) e C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>) | 44 |
| Gráfico 3 - Contagem de sequência pela ferramenta FastQC | 55 |
| Gráfico 4 - Histograma de qualidade de sequência em cada posição de base | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------|--|
| ATCC | <i>American Type Collection</i> |
| ACACA | Acetil-coA carboxilase 1 |
| A549 | Células epiteliais basais alveolares humanas adenocarcinômicas |
| CCR5 | Receptor de quimiocinas C tipo 5 |
| C6/36 | Células de macerados total de larva de <i>Aedes albopictus</i> |
| CEP152 | Proteína centrossomal 152 |
| CEP131 | Proteína centrossomal 131 |
| DAPI | 4,6-diamidino-2-fenilindol |
| DENV | Vírus Dengue |
| EEEV | Vírus da Encefalite Equina Oriental |
| FASN | Ácido graxo sintase |
| G.A | Glutaraldeído |
| GRK2 | Receptor quinase 2 acoplado à proteína G |
| gRNA | Ácido ribonucleico genômico |
| HFF-1 | Célula de fibroblasto de prepúcio humano |
| HIV-1 | Vírus da imunodeficiência humana 1 |
| HEK 293T | Células de rim embrionárias humanas |
| IAM/FIOCRUZ | Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ |
| JEV | Vírus da Encefalite Japonesa |
| L2X | Laemmli |

| | |
|---------|---|
| LY6E | Antígeno linfocitário 6 membro da família E |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MET | Microscopia Eletrônica de transmissão |
| MTs | Microtúbulos |
| MTOCs | Centros organizados de microtúbulos |
| MOI | Multiplicidade de infecção |
| MCOLN2 | Mucolipina 2 |
| ORV | Organela de replicação viral |
| OROV | Vírus Oropouche |
| prM | Proteína precursora de membrana |
| PVs | Pacotes de vesículas |
| PBS | Tampão Fosfato Salina |
| RE | Retículo endoplasmático |
| RSV | Vírus do sarcoma de Rous |
| RT-qPCR | Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa Quantitativa em Tempo Real |
| Sf9 | Célula de Lepidóptero <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SGB | Síndrome de <i>Guillain-Barré</i> |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TAM | <i>Tyro3, Axl e Mertk</i> |
| TIM | Células mieloides infiltrantes de tumor |
| TBP | Meio de cultura fosfato triptose |

| | |
|----------|----------------------------------|
| V-ATPase | Adenosinatrifosfatase vacuolar |
| VAPs | <i>Viral attachment proteins</i> |
| WNV | Vírus do Oeste do Nilo |
| YFV | Vírus da Febre Amarela |
| ZIKV | Vírus Zika |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 ARBOVIROSES TRANSMITIDAS POR MOSQUITOS | 14 |
| 2.2 VÍRUS ZIKA | 15 |
| 2.2.1 Filogenia, organização genômica e estrutural | 15 |
| 2.3 MECANISMOS DE INTERAÇÃO DOS <i>FLAVIVÍRUS</i> COM SEU HOSPEDEIRO INVERTEBRADO | 19 |
| 2.3.1 Infecção viral em mosquitos | 19 |
| 2.3.2 Fatores celulares para interação e internalização viral | 20 |
| 2.3.3 Alterações celulares mediante à infecção viral | 22 |
| 2.3.4 Ciclo de replicação viral | 24 |
| 2.4 COMPETÊNCIA VETORIAL DE INSETO | 26 |
| 2.5 LINHAGEM CELULAR C6/36 (1967) DE <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> , Skuse (1894). | 27 |
| 2.6 LINHAGEM CELULAR SF9 (CRL-1711) DE <i>Spodoptera frugiperda</i> | 28 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 30 |
| 4 PERGUNTA CONDUTORA | 31 |
| 5 HIPÓTESE | 32 |
| 6 OBJETIVOS | 33 |
| 6.1 OBJETIVO GERAL | 33 |
| 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| 7 METODOLOGIA | 34 |
| 7.1 CULTURA DE CÉLULAS E VÍRUS | 34 |
| 7.2 CINÉTICA DE REPLICAÇÃO POR RT-qPCR | 35 |
| 7.2.1 Ensaio de infecção em célula C6/36 e Sf9 | 35 |
| 7.2.2 Extração de RNA por TRizol | 36 |
| 7.2.3 Detecção do vírus Zika por RT-qPCR | 36 |
| 7.3 IMUNODETECÇÃO DO ZIKV POR <i>WESTERN-BLOTTING</i> | 38 |

| | |
|--|----|
| 7.4 AVALIAÇÃO DE EFEITO CITOPÁTICO | 39 |
| 7.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) E VARREDURA (MEV) | 39 |
| 7.5.1 Ensaios de cinética de interação e internalização viral | 39 |
| 7.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) | 39 |
| 7.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 39 |
| 7.6 EXTRAÇÃO DE RNA, BIBLIOTECAS DE CDNA E RNAseq | 40 |
| 7.7 ANÁLISE DOS DADOS DO RNAseq | 41 |
| 8 RESULTADOS | 43 |
| 8.1 ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPLICAÇÃO VIRAL POR RT-QPCR | 43 |
| 8.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOPÁTICOS | 44 |
| 8.2.1 Efeitos citopáticos em Sf9 (<i>Spodoptera frugiperda</i>) e C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>) | 44 |
| 8.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE SF9 E C6/36 INFECTADAS COM ZIKV | 46 |
| 8.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE SF9 E C6/36 INFECTADAS COM ZIKV | 48 |
| 8.5 IMUNODETECÇÃO DO ZIKV NOS CULTIVOS CELULARES | 51 |
| 8.6 RNAseq DOS CULTIVOS CELULARES DE SF9 SUBMETIDOS AOS ENSAIOS DE INFECÇÃO COM ZIKV | 52 |
| 8.6.1 Preparação das bibliotecas de cDNA de Sf9 | 52 |
| 8.7 ANÁLISES POR BIOINFORMÁTICA APÓS O SEQUENCIAMENTO | 54 |
| 8.7.1 Relatórios MultiQC | 54 |
| 8.7.2 Contagem de sequência por FastQC | 54 |
| 8.7.3 Histograma de qualidade das sequências | 55 |
| 9 DISCUSSÃO | 57 |
| 10 CONCLUSÕES | 61 |
| REFERÊNCIAS | 63 |

1 INTRODUÇÃO

Diversos fatores são responsáveis pela reemergência e expansão das arboviroses, os quais podemos destacar a capacidade de evolução e adaptação viral, densidade populacional de vetores, ciclos ecológicos, mudanças climáticas, deslocamento por viagens e migração humana e determinantes genéticos, epigenéticos e imunológicos dos hospedeiros. O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus reemergente do gênero *Flavivírus*, família Flaviviridae de grande importância médica sendo transmitido por mosquitos (Diptera: Culicidae) pertencentes ao gênero *Aedes*. A família Flaviviridae inclui outros vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus), como o vírus da Dengue (DENV), o vírus do Oeste do Nilo (WNV), o da Encefalite Japonesa (JEV), o vírus da febre amarela (YFV) e a Encefalite St. Louis. No Brasil, a principal espécie de mosquito implicada na transmissão vetorial do ZIKV é o *Aedes aegypti*.

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 em amostras de soro de macaco *Rhesus* na floresta de Zika no leste da África, Uganda, e em 1948 a presença do vírus foi detectada no mosquito *Aedes africanus*. Poucos casos de infecção em humanos foram relatados até 2007, quando ocorreu um surto de Zika nas ilhas YAP, Micronésia. No entanto, estudos de vigilância entomológica e virológica já vinham demonstrando a circulação do ZIKV na África e Ásia. A linhagem asiática do vírus Zika foi introduzida no Brasil em meados de 2013 e afetou milhares de pessoas. No entanto, a infecção por ZIKV só ganhou destaque mundial após a epidemia causada no Brasil em 2015, resultando em comorbidades como a síndrome de Guillain–Barré (SGB), encefalomielite disseminada aguda, meningite e Síndrome Congênita do Vírus Zika com aumento dos números de casos de microcefalia entre outras dismorfias craniofaciais em neonatos.

Quanto a constituição genômica e estrutural, o ZIKV é um vírus envelopado, esférico, de aproximadamente 50 nm de diâmetro, com genoma não segmentado consistindo de RNA fita simples de polaridade positiva contendo 10.794 nucleotídeos de comprimento. Como em outros *Flavivírus*, é flanqueado pelas regiões não codificadoras 5' e 3' NCR (*Noncoding region*) e por um quadro aberto de leitura único que codifica para a poliproteína: 5'- C- prM- E- NS1- NS2A- NS2B- NS3-NS4A- NS4B- NS5- 3'. Esta poliproteína é clivada nas três proteínas estruturais (C-122aa, prM-

178aa e E-500aa) e não estruturais (NS1-342aa, NS2A-226aa, NS2B-130aa, NS3-617aa, NS4A-127aa, NS4B-252aa, NS5-902aa), as quais sabidamente estão envolvidas no ciclo de infecção viral.

Os mecanismos de interação dos *Flavivírus* com o seu hospedeiro invertebrado ainda não são compreendidos. Em mosquitos, o processo da infecção começa quando a fêmea do vetor realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado virêmico. A adsorção do vírus à superfície celular e a interação com receptores específicos inicia os eventos que levam à fusão e internalização por endocitose. Para vírus que internalizam por fusão na superfície da célula, o envolvimento do receptor pode iniciar os rearranjos moleculares que levam à internalização. Para vírus que se fundem intracelularmente, a ligação deve resultar na absorção de vírions em vesículas endocíticas. Ultrapassar a membrana plasmática é a principal barreira à infecção pelo vírus. Muitas células possuem um citoesqueleto cortical altamente desenvolvido e permissivo a invasão viral. O ciclo de replicação é acompanhado por alterações celulares marcantes induzidos pelos vírus como por exemplo alterações de membranas intracelulares, cisternas do retículo endoplasmático (RE) dilatadas, numerosas vesículas dentro do RE, túbulos e matrizes para-cristalinas. A ultraestrutura de células infectadas por *Flavivírus* foi previamente estudada e alterações morfológicas já foram observadas. Porém, a compreensão do processo inicial da infecção do ZIKV em células de insetos é ainda pouco compreendida.

Sendo assim, este projeto teve por objetivo caracterizar a biologia da infecção viral do ZIKV em linhagens celulares de inseto C6/36 (*Ae. Albopictus*) e Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), a nível molecular através da análise da cinética de infecção viral e transcriptômica, e a nível celular através da avaliação ultraestrutural das linhagens celulares em resposta à infecção. Esperamos com nossos resultados identificar fatores moleculares e celulares determinantes para o sucesso da infecção e que estes possam ser utilizados para potencialmente melhorar ou diminuir a capacidade do mosquito de se infectar com o vírus. Além do mais, novos conhecimentos podem ser agregados para um melhor entendimento da biologia do vírus no inseto vetor.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARBOVIROSES TRANSMITIDAS POR MOSQUITOS

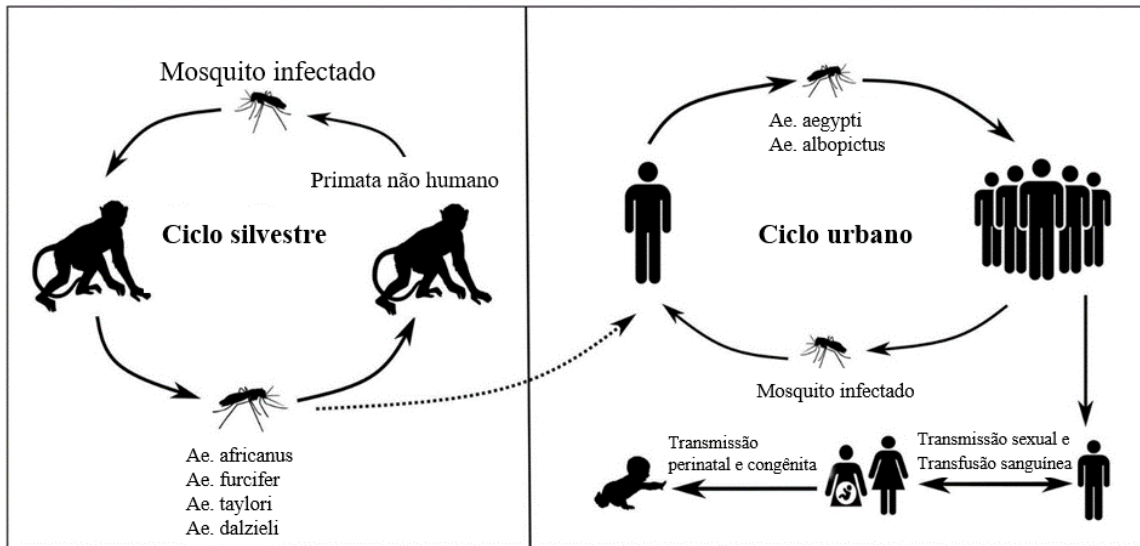
Os arbovírus, transmitidos por artrópodes hematófagos para hospedeiros vertebrados suscetíveis, têm sido uma ameaça significativa à saúde pública em todo o mundo nas últimas décadas (USHIJIMA et al., 2021). Os arbovírus de maior importância médica que recentemente causaram e ainda causam epidemias, pertencem a três famílias distintas: 1- *Flaviviridae* que incluem os vírus da febre amarela (YFV), vírus do Oeste do Nilo (WNV), vírus da dengue (DENV), vírus da encefalite japonesa (JEV) e vírus Zika (ZIKV); 2- *Togaviridae* que inclui o vírus Chikungunya (CHIKV) e 3- *Bunyaviridae* com o vírus do Oropouche (OROV) (VASCONCELOS et al., 2011; CLETON et al., 2012; KETKAR; HERMAN et al., 2019; WANG et al., 2017).

Fatores ecológicos têm sido abordados para explicar o aumento do número de infecções ativas pelo ZIKV em humanos em função da maior transmissão por mosquitos do gênero *Aedes*. Com a expansão geográfica dos habitats dos insetos vetores e com o impacto crescente nas populações suscetíveis, os arbovírus tornaram-se patógenos emergentes ou reemergentes com ciclos de transmissão complexos e tropismo de duplo hospedeiro: eles têm a capacidade de infectar e replicar em hospedeiros vertebrados (como pássaros ou mamíferos) e vetores hematófagos artrópodes (como mosquitos ou carrapatos) (WEAVER et al., 2004; MCMILLAN et al., 2020). A maioria dos arbovírus que causam surtos zoonóticos dependem de espécies de animais não humanos como reservatórios da doença (ciclo de manutenção) (MUSSO et al., 2016).

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em amostras de soro de macacos Rhesus na floresta de Zika localizado em Uganda em 1947 como parte de um estudo de vigilância da febre amarela (DICK et al., 1952). Já a identificação do vírus em mosquito se deu em 1948 a partir do *Aedes africanus* (SEMPALA et al., 1983; BERTHET et al., 2014). Em 1954, foi isolado em humanos na Nigéria (HAYES et al., 2009). Há relatos de 14 casos leves e esporádicos entre os anos de 1960 e 1980 (DUFFY et al., 2009). No entanto, a partir do ano de 2007 se configurou um dos principais desafios de Saúde Pública mundial devido a epidemia de Zika, com relatos de 49 casos confirmados e 59 casos suspeitos na Ilha YAP, com posterior disseminação para fora da África e

Ásia causando o surto de microcefalia neonatal em 2015 no Brasil (CAO-LORMEAU et al., 2013; LANCIOTTI et al., 2008).

Figura 1. Ciclo de transmissão do ZIKV



Fonte: Adaptada de Sharma et al., 2020.

Legenda. Ciclo de transmissão do Vírus Zika. O ZIKV é encontrado na natureza estabelecendo o ciclo enzoótico ou silvestre que ocorre entre mosquitos e primatas. Os humanos são hospedeiros acidentais que participam do ciclo de transmissão urbana, podendo carregar o vírus e tornando-se reservatórios e amplificadores da transmissão humano-mosquito-humano do ZIKV. A forma de transmissão de maior importância é a forma vetorial, mas também pode ser por meios não vetoriais, incluindo transmissão sexual, materno fetal e transfusional.

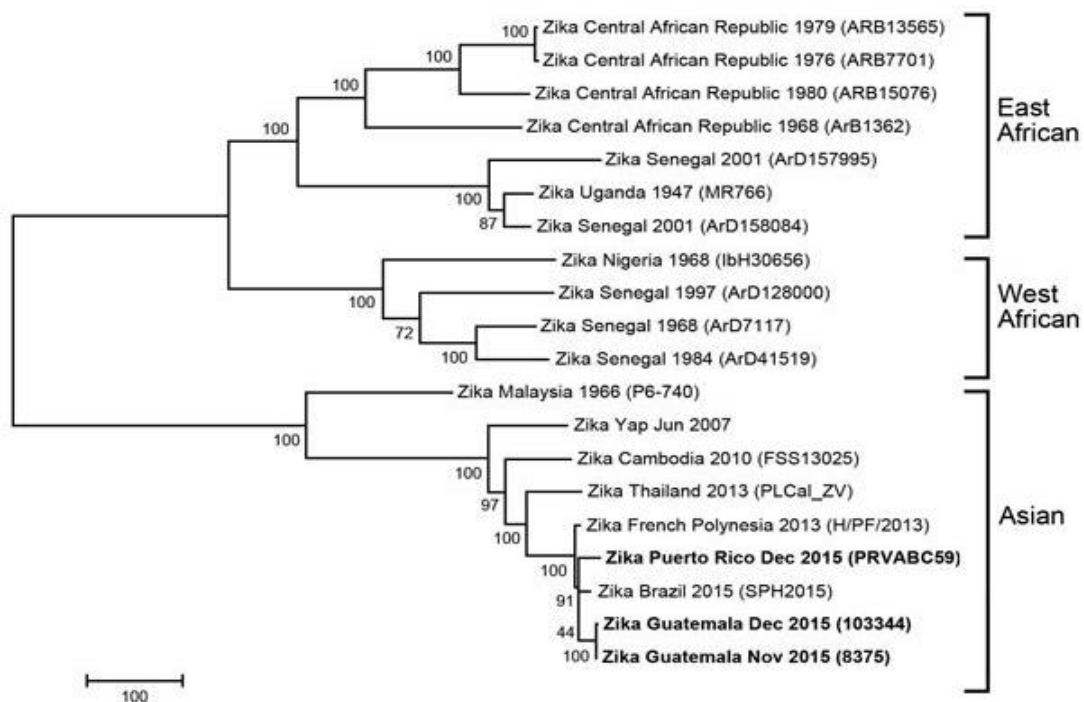
2.2 VÍRUS ZIKA

2.2.1 Filogenia, organização genômica e estrutural

A classificação inicial dos arbovírus se deu de acordo com critérios sorológicos (classificação antigênica). No entanto, atualmente uma nova classificação taxonômica é usada através de bases moleculares taxonômicas. Desta forma, o gênero *Flavivirus* foi classificado em agrupamentos de clusters, espécies e clados (WESTAWAY et al., 1985). A família *Flaviviridae* é dividida em quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* e *Pegivirus*. No gênero *Flavivirus* estão incluídas mais de 53 espécies consideradas arbovírus. Destacam-se neste grupo os vírus: Dengue, Encefalite de Saint Louis, Rocio, Oeste do Nilo, Cacipacore, Ilheus, Bussuquara, Iguape e Zika (LINDENBACH et al., 2007; LOPES et al., 2014).

O ZIKV está agrupado no sorogrupo *Spondweni* e a partir do sequenciamento da região gênica que codifica a proteína NS5 revelou três subclados distintos do vírus Zika: Leste Africano (cepa da Uganda), Oeste Africano (cepas do Senegal) e asiático (cepa ZIKV 2007 YAP) (LANCIOTTI et al., 2008). A linhagem Africana foi dividida em dois grupos: linhagem Leste Africana e linhagem Oeste Africana (HADDOW et al., 2014; LANCIOTTI et al., 2008). A partir de estudos filogenéticos, Faye et al. (2014) sugeriu que as cepas Africanas fossem classificadas em dois grupos: Uganda (cepa protótipo ZIKV MR 766) e o grupo da Nigéria; as cepas ZIKV 2007 da Micronésia e da Malásia constituíram o clado asiático. Já os vírus que foram isolados inicialmente na Costa do Marfim e no Senegal foram encontrados em ambos os clusters africanos (FAYE et al., 2014).

Figura 2: Árvore filogenética do ZIKV de isolados da Guatemala e Porto Rico em 2015.



Fonte: Lanciotti et al., 2015.

Legenda: Os genomas do vírus Zika de isolados da Guatemala e Porto Rico foram comparados com outros genomas completos do ZIKV dispostos no *GenBank*. A construção da árvore filogenética foi obtida por métodos de agrupamentos de vizinhos (*bootstrapped* 1.000 vezes) usando seqüências de genoma completo. A barra da escala indica o número de substituições de nucleotídeos por local, o ano de identificação e o código da cepa no *GenBank* para os vírus usados na construção da árvore. Após a construção da árvore é possível notar duas linhagens distintas: Asiática e Africana.

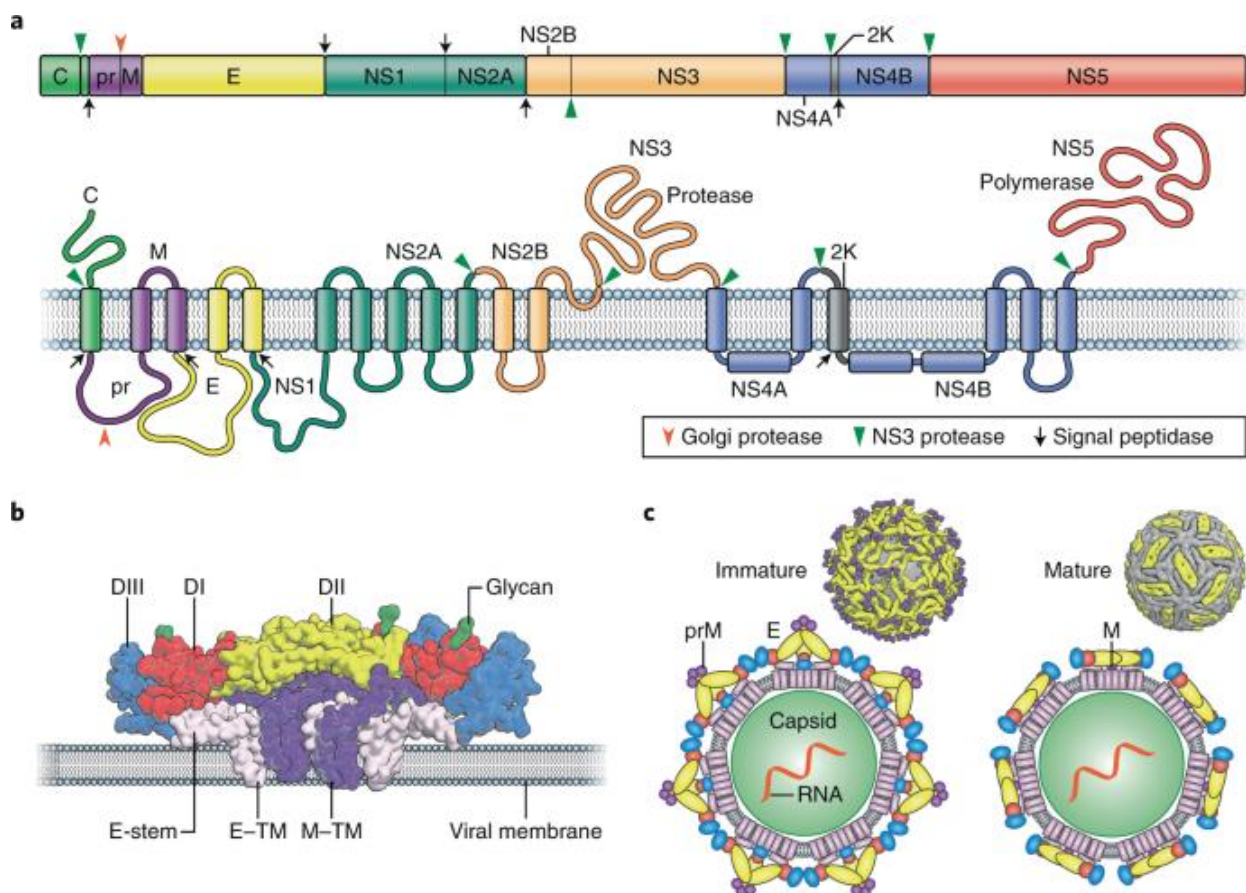
O ZIKV, assim como em outros *Flavivírus*, é um vírus de RNA de fita simples de sentido positivo [ssRNA (+)] com um genoma de 10.794 kb (KUNO et al., 2007; LINDEBACH et al., 2007; LIU et al., 2019). o RNA genômico (gRNA) do ZIKV é flanqueado por duas regiões não codificadoras 5' NCR e 3' NCR (*Noncoding region*) e por um quadro aberto de leitura único (ORF) que codifica para sua poliproteína: 5'-C- prM- E- NS1- NS2A- NS2B- NS3-NS4A- NS4B- NS5- 3' (CI & LIU, 2020; FAYE et al., 2014). Esta poliproteína é processada por proteases virais e do hospedeiro em três proteínas estruturais (C-122aa, prM-178aa e E-500aa) e em proteínas não estruturais (NS1-342aa, NS2A-226aa, NS2B-130aa, NS3-617aa, NS4A-127aa, NS4B-252aa, NS5-902aa) que sabidamente estão envolvidas no ciclo de infecção viral (KUNO & CHANG, 2007) e são responsáveis por modificações das funções celulares e resposta imune do hospedeiro (SIROHI et al., 2016).

A região amino terminal do genoma do ZIKV codifica três proteínas que formam a estrutura viral: capsídeo (C), membrana (M, a proteína prM é precursora de membrana) e envelope (E) que constituem a partícula viral. O restante do genoma codifica sete proteínas não estruturais que são essenciais para a replicação viral (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LINDENBACH & RICE, 2003). As funções das proteínas não estruturais do ZIKV estão parcialmente compreendidas, mas seu papel nas várias fases de replicação viral e montagem e maturação do vírion, já foi demonstrado. (GRANT et al., 2016).

A proteína NS5 é a maior e mais conservada das proteínas virais entre os *Flavivírus*, sendo composta por cerca de 900 aminoácidos. Esta proteína funciona como uma metiltransferase, guanililtransferase e RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) essenciais para a replicação viral (BUKREJEWSKA et al., 2017; LESCAR et al., 2012). Já a proteína NS2A está envolvida na degradação lisossomal e autofagossômica nas células hospedeiras (YOON et al., 2017). A NS3 é a segunda maior proteína codificada pelo vírus cuja função estão relacionadas com atividades de proteases e helicase atuando, em conjunto com a proteína NS2B, como um cofator para as proteases (ZHANG et al., 2016). Outras proteínas não estruturais dos *Flavivírus* são antagonistas da produção e/ou sinalização de interferon do hospedeiro e determinam a patogênese viral (MIORIN et al., 2017).

A proteína C (~122aa) do capsídeo dos *Flavivirus* está envolvida com o empacotamento do genoma viral, formando o cerne icosaédrico do nucleocapsídeo, enquanto o envelope viral contém as proteínas M e E. A proteína prM (178aa) funciona como uma chaperona e está envolvida no dobramento apropriado e montagem da proteína E. O transporte do vírion imaturo ocorre através do complexo Golgi onde a proteína prM é clivada pela protease furina na rede *trans*-Golgi para posteriormente ocorrer a maturação viral (PRASAD et al., 2017). A glicoproteína E (53 kDa) dos *Flavivirus* é responsável por uma ampla variedade de atividades biológicas tais como a interação com receptores de superfície celular, fusão de membranas, internalização viral e em parte na virulência do vírus (FONTES-GARFIAS et al., 2017; ALLISON et al., 2001; REY et al., 2017).

Figura 3: Organização do genômica, estrutural e processamento da poliproteína do ZIKA



Fonte: Pierson et al., 2020.

Legenda: Ciclo de replicação dos *Flavivirus*. (a) Os *Flavivirus* de [ssRNA (+)] codificam uma poliproteína que é traduzida no retículo endoplasmático (RE) dentro de cisternas, neste ambiente, esta poliproteína é clivada por proteases virais e das células hospedeiras resultando em 10 proteínas funcionais: 3 são estruturais (C, prM e E) e 7 não estruturais. (b) A proteína E do Envelope viral possui 3 domínios. Um

domínio está associado à membrana viral por uma haste e dois domínios transmembrana antiparalelos. Os domínios I, II e III estão em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. A proteína M é indicada em roxo. (c) Também pode-se observar formas imaturas do vírus na esquerda e formas maduras a direita.

2.3 MECANISMOS DE INTERAÇÃO DOS *FLAVIVÍRUS* COM O HOSPEDEIRO INVERTEBRADO

2.3.1 Infecção viral em mosquitos

Em mosquitos, o processo de infecção começa quando a fêmea do vetor realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado virêmico (SMITH., 2012). Apenas a presença do *Flavivírus* no sangue do hospedeiro não é suficiente para assegurar a infecção no mosquito. Outros fatores ambientais e biológicos como a resposta imune inata do hospedeiro invertebrado, assim como o microbioma desses insetos, influenciam na susceptibilidade à infecção (RODRÍGUEZ-RUANO et al., 2020; NETO et al., 2018). A adsorção do vírus à superfície celular é mediada por VAPs - *viral attachment proteins* e pela interação com receptores celulares específicos, iniciando eventos que levam à fusão e internalização mediada por endocitose. Para vírus que sofrem fusão na superfície da célula, o envolvimento do receptor pode iniciar os rearranjos moleculares que levam à internalização. Para vírus que se fundem intracelularmente, a ligação deve resultar na internalização dos vírions em vesículas endocíticas (LI et al., 2016).

A passagem pela membrana celular é a principal barreira de entrada do vírus e muitas células possuem um citoesqueleto cortical altamente desenvolvido que restringe a atividade viral (KLASSE et al., 1998). O primeiro passo na infecção viral de um mosquito é a infecção de suas células epiteliais intestinais. A passagem desta 1ª barreira de infecção intestinal depende da ligação do vírus ao receptor celular, internalização e replicação viral. Após o bem-sucedido estabelecimento da infecção viral nas células intestinais do mosquito, para passar a 2ª barreira de escape intestinal, os vírions infecciosos gerados devem atravessar a lâmina basal, disseminar-se pela hemocele estabelecendo a infecção em órgãos secundários. A passagem através da última barreira potencial (barreira de transmissão) resulta em uma infecção bem-sucedida da glândula salivar e subsequente escape do lúmen da glândula salivar onde o vírus torna-se apto para infectar os hospedeiros vertebrados (BLACK et al., 2002). A replicação dos *Flavivírus* é acompanhada por eventos importantes em estruturas

celulares que podem ser alteradas ou reorganizadas em resposta à infecção viral (OFFERDAHLL et al., 2012; BARRETO-VIEIRA et al., 2017; CALDAS et al., 2020).

2.3.2 Fatores celulares para interação e internalização viral

De maneira geral, os vírus codificam apenas alguns genes essenciais para a sua replicação dependendo estritamente da maquinaria celular da célula hospedeira para completar seu ciclo de replicação. As células respondem à invasão viral através da ativação de vias antivirais. Portanto, inúmeros fatores do hospedeiro são essenciais para garantir a progressão ou limitar a infecção viral e, portanto, o conhecimento sobre a biologia da infecção causada por diversos *Flavivirus* em seu hospedeiro vertebrado e invertebrado podem trazer informações sobre novos alvos para terapias ou alternativas biotecnológicas para bloqueio da transmissão vetorial (CORDERO-RIVERA et al., 2021).

A entrada do vírus Zika em uma célula hospedeira depende da fixação do vírus à superfície celular, onde receptores ou fatores apropriados como proteínas, carboidratos, glicoproteínas, lipídeos, lipoproteínas ou complexos permitem a entrada do vírus. (CORTESE et al., 2017; MADIGAN et al., 2010). Os eventos que ocorrem durante a infecção do ZIKV (BRPE243/2015) em células de insetos não estão esclarecidos. E um largo número de moléculas envolvidas em diferentes etapas no curso natural de uma infecção viral tem sido descritas como candidatas a receptor em diferentes tipos celulares. Além do mais, as alterações morfológicas induzidas pela infecção viral apresentam aspectos distintos em células de vertebrados e invertebrados (ROTT et al., 1995; BARRETO-VIEIRA et al., 2017; CALDAS et al., 2020).

Para ter acesso ao citoplasma da célula hospedeira os *Flavivirus* precisam de fatores de fixação para fusão celular e escape dos fatores inatos de proteção celular (ZAKARIA et al., 2018). O primeiro passo da infecção por *Flavivirus* começa com a associação da glicoproteína E com fatores de fixação das células hospedeiras. Para vírus como DENV, YFV, WNV e JEV resíduos de heparan sulfato funcionam como fatores críticos de ligação à célula hospedeira. (LIU et al., 2004). No entanto, o ZIKV não depende deste grupamento para ter acesso à célula (TAN et al., 2017), mas utiliza

as integrinas como ligante durante sua entrada (WANG et al., 2020). Isso demonstra que o mecanismo de entrada é bastante complexo e pode envolver múltiplas interações de receptores e correceptores para a internalização viral (MILLER et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2019). Receptores de tirosina quinases da subfamília TAM, que consiste em três membros, Tyro3, Axl e Mertk, tem sido implicado na ligação de diversos *Flavivírus*. Estudos prévios apontaram a associação de Axl na internalização do ZIKV em células HEK293T sendo a expressão desta proteína também relacionada à interação viral e progressão da infecção em linhagens de células A549 e HFF1 (CORDERO-RIVERA et al., 2021; LIU et al., 2016).

Além dos receptores celulares dos hospedeiros na formação do complexo de ligação vírus/célula e na progressão do ciclo viral, os *Flavivírus* podem utilizar lipídios para uma gama de variedades de funções durante a infecção (MACKENZIE et al., 2007; HEATON et al., 2010). Um ponto chave nesta fusão são lipídios presentes nas membranas das células do hospedeiro. Em células de inseto C6/36 (*Aedes albopictus*), por exemplo, foi demonstrado que a homeostase de fosfolipídios, é desordenada durante a replicação do DENV (PERERA et al., 2012). Neste caso o DENV requer a expressão das enzimas Acetil-CoA carboxilase 1 (ACACA) e Ácido graxo sintase (FASN), que catalisam reações na via biossintética de ácidos graxos, convertendo a acetil-CoA em malonil-CoA e geram palmitoil-CoA (TONG L., 2005; LEE et al., 2003; ROTHWELL et al., 2009; HEATON et al., 2010). Os lipídios que se destacam são as ceramidas que sabidamente estão envolvidas na curvatura de membrana e os esfingolipídios sendo cruciais na regulação do ciclo celular, estes são perturbados durante a infecção por *Flavivírus* (PERERA et al., 2012).

Após a interação, ocorre a internalização viral através da via endocítica podendo ser classificada como endocitose mediada por receptor dependente de clatrina (EMC) (comumente utilizado pelos *Flavivírus*) ou endocitose independente de clatrin (não-EMC) (ACOSTA & MOSSO et al., 2008). A iniciação da etapa da endocitose mediada por clatrina envolve a montagem de um revestimento de clatrina em torno de uma invaginação da membrana. As proteínas do domínio BAR FCHO1/2, ESP15, EPS15R, complexo AP2 e intersectinas, funcionam como iniciadores da endocitose em células de mamíferos (KAKSONEN et al., 2018; CARRO et al., 2020). Também são necessários componentes celulares adicionais para a internalização como o receptor de quinase 2 acoplado à proteína G (GRK2) e receptor de quimiocina

CCR5 (et al., 2015; SHIINA et al., 2001). A ribonuclease K é essencial para o funcionamento da V-ATPase no início da endocitose atuando em sinergismo com o fator LY6E promovendo acidificação do endossomo tardio, tornando assim, o ambiente propício para infecção viral, como demonstrado para DENV, WNV e ZIKV (PERREIRA et al., 2015). Sabe-se também que o DENV-2 e DENV-3 podem infectar células Vero por meio de mecanismos dependente de dinamina sem participação da clatrina, além de usar receptores TIM e TAM para célula 293T (ACOSTA et al., 2009; MEERTENS et al., 2012). O fator mucolipina-2 (MCOLN2), assim como o complexo LY6E/RNASEK, é responsável pelo tráfego vesicular viral e subsequentemente pelo escape endossomal (HACKETT et al., 2015).

2.3.3 Alterações celulares frente à infecção viral

Após a internalização do vírus na célula hospedeira, os *Flavivírus*, incluindo o ZIKV, localizam-se espacialmente em vesículas. Análises ultraestruturais por tomografia eletrônica e por microscopia eletrônica de transmissão de viroplasmas induzidos por *Flavivírus* revelaram que estas vesículas se reorganizam no retículo endoplasmático (RE) para formar um viroplasma que são denominados de pacotes de vesículas (PVs). Os PVs supostamente funcionam como local de replicação do RNA viral e montagem de partículas virais (PAUL et al., 2013).

Essa separação espacial também permite uma maior concentração de metabólitos essenciais para a replicação do RNA viral servindo como proteção contra nucleases da célula hospedeira e proteção contra a imunidade inata do hospedeiro (ROMERO-BREY et al., 2016; CORTESE et al., 2017; MOHD ROPIDI et al., 2020; RAJAH et al., 2020). Porém a descrição do viroplasma de ZIKV não apresentou uma estrutura contendo uma membrana delimitadora e a resolução dos mecanismos para a formação deste compartimento ainda não foi totalmente compreendida (BUCHWALTER et al., 2021). Entretanto, estudos conduzidos por Barreto-Vieira et al. (2017) demonstrou pela primeira vez estruturas semelhantes a viroplasma em células C6/36 infectadas com uma cepa brasileira do ZIKV (BARRETO-VIEIRA et al., 2017).

No decorrer da replicação do ZIKV e de outros *Flavivírus*, a membrana do RE direciona-se ao lúmen para formar invaginações que detêm poros voltados para o

citoplasma. Essas estruturas são críticas para o processamento e liberação do RNA viral na superfície do RE, e também tem função de guiar a montagem completa do vírus nos sítios de brotamento do RE que contêm as proteínas estruturais virais (ROMERO-BREY et al., 2014). A replicação viral é citosólica e o rearranjo no RE do hospedeiro, permite a formação de uma estrutura tipo organela de replicação viral (ORV) (CALDAS et al., 2020). Além do remodelamento do RE, estudos anteriores evidenciaram a formação de autofagossomas induzidos pela infecção do ZIKV em células de mamífero e de inseto (ZHANG et al., 2016; BARRETO-VIEIRA et al., 2017). A autofagia digestiva é um processo de defesa inata da célula, cuja função é remover organelas danificadas e agregados de metabólitos não essenciais, assim, mantendo a homeostase celular. No entanto, autofagia secretora pode causar expulsão ou secreção de partículas virais como o DENV e JEV (ZHANG et al., 2016; SHARMA et al., 2014; BARRETO-VIEIRA et al., 2017).

Um achado ainda não esclarecido nas células suscetíveis infectadas por *Flavivírus*, incluindo o ZIKV, é a formação de membranas convolutas (MC) que consistem em uma rede de membranas estruturadas em pequenos feixes de RE liso associados a organelas de replicação e mitocôndrias. Essas estruturas foram observadas por Junjhon et al. (2014) e Welsch et al. (2009), em células de mamíferos, mas não de inseto (WELSCH et al., 2009; GILLESPIE et al., 2010; VAN DEN ELSEN et al., 2021). As MCs são locais enriquecidos de proteínas virais, em especial a NS3 e NS2b, onde acredita-se ocorrer o processamento e maturação de poliproteínas ou armazenamento de proteínas ou lipídios celulares. Um estudo conduzido por Chatel-Chaix et al., 2016, mostrou a ligação da proteína não estrutural NS4b em MC como responsáveis por alterações na morfologia mitocondrial e de sua associação íntima com as membranas do RE (CHATEL-CHAIX et al., 2016). Essa associação pode dificultar a resposta inata das células através do bloqueio de interferon, gerando assim um microambiente favorável à replicação viral (VAN DEN ELSEN et al., 2021).

Os microtúbulos (MTs) e os centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) estabelecem as funções estruturais e de tráfego celular. Na infecção por ZIKV estes elementos do citoesqueleto da célula hospedeira mostraram-se essenciais para a organização do viroplasma impactando na produção de novas partículas virais ativas (CORTESE et al., 2017; BUCHWALTER et al., 2021). Estudos mostraram que drogas

que despolimerizam ou inibem a formação dos MTs afetaram significativamente o tráfego de partículas do ZIKV para o RE (WHELAN et al., 2021).

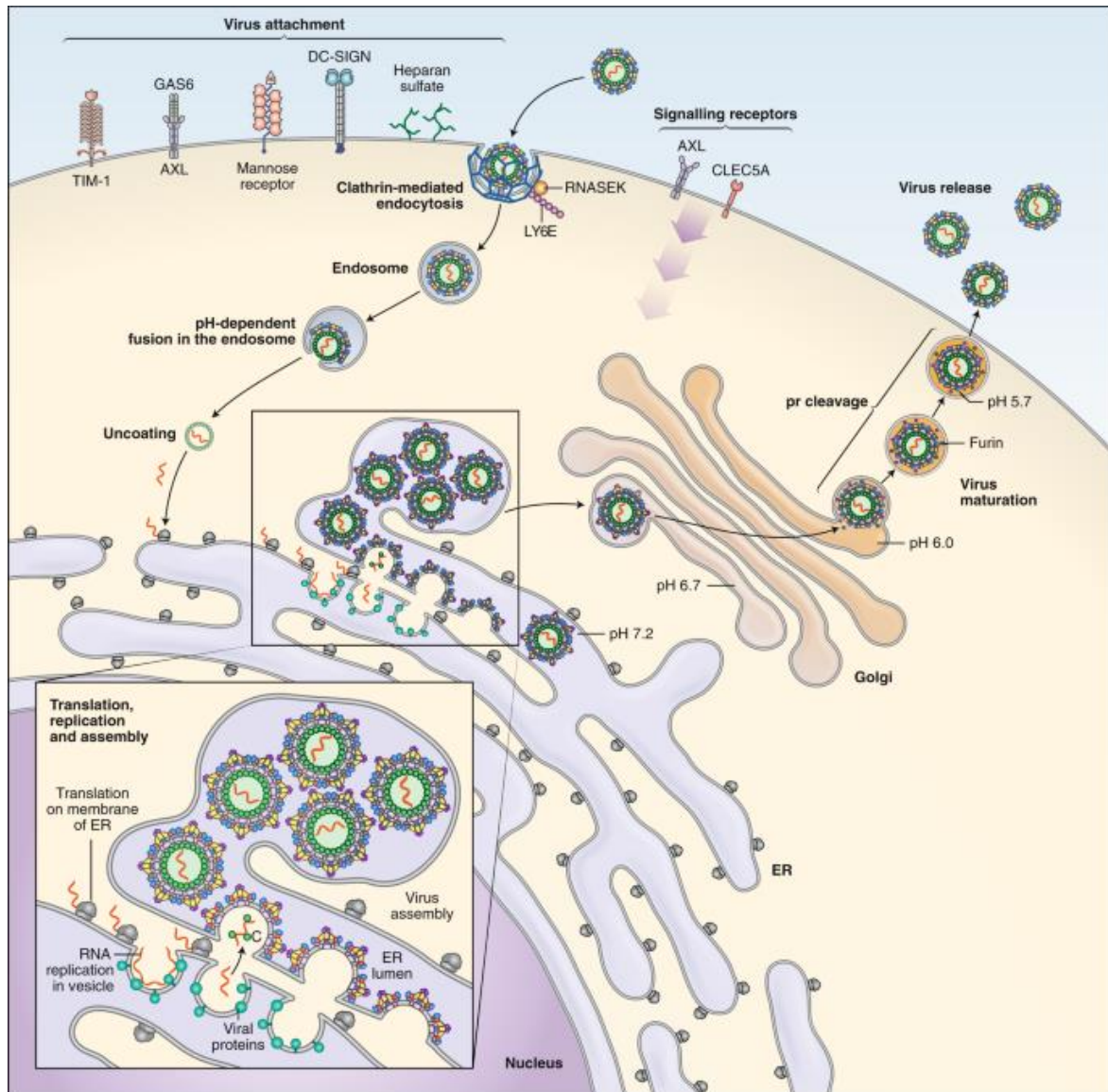
O centrossomo é uma das organelas citoplasmáticas que atua como centro organizador de microtúbulos, sendo um regulador crítico da progressão do ciclo celular (WEN et al., 2019). Sabe-se que a infecção causada pelo vírus Zika resulta em alterações no centrossomo com redução nos níveis de proteínas centrossomais como a CEP152 ligada a MCPH/SCKL, PCM1 e CEP131 no centrossomo das células hospedeiras (GABRIEL et al., 2017). O ZIKV também contribui com a modificação da estrutura do centríolo e a organização geral do material pericentriolar (MARTHIENS et al., 2013; GABRIEL et al., 2017). No entanto, apesar do ZIKV afetar o centrossomo, a montagem de MT não é afetada de forma drástica e os centríolos permanecem intactos durante a infecção. Além disso, tem sido observada a associação íntima da estrutura centriolar com o viroplasma do ZIKV (BUCHWALTER et al., 2021). Presume-se que a morfogênese causada pela infecção do ZIKV apresente mecanismos conservados em diferentes tipos celulares. No entanto, a existência de diferentes vias de infecção pressupõe diferentes alterações ultraestruturais e moleculares em células de mamíferos e insetos. Não obstante, a compreensão dos aspectos da biologia celular durante o ciclo de infecção do ZIKV em insetos é crucial para preencher as lacunas existentes e projetar novas alternativas de contenção da doença.

2.3.4 Ciclo de replicação viral

Como dito anteriormente, o ciclo replicativo de um *Flavivírus* em células hospedeiras promove alterações drásticas no retículo endoplasmático (RE), mitocôndrias e citoesqueleto (CHATEL-CHAIX et al., 2016). Além da reorganização estrutural de autofagossomos, de filamentos intermediários e de microtúbulos (TEO e CHU et al., 2013). No entanto, para que ocorra o sucesso da infecção, as células-alvo devem fornecer um ambiente favorável para a replicação produtiva destes patógenos. Brevemente, a replicação viral depende de seis etapas: 1- Ligação do vírus a superfície da célula hospedeira e entrada do vírus mediada por receptores e/ou via endossomal (CRILL & ROEHRIG., 2001), 2- Fusão induzida por pH ácido do envelope viral com compartimento endossomal do hospedeiro, onde ocorre a desestruturação do capsídeo, liberação do genoma viral no citoplasma e tradução de poliproteínas

(ALLISON et al., 2001; MODIS et al., 2004; VAN DER SCHAAR et al., 2008), 3- Montagem de partículas virais na superfície do Retículo Endoplasmático (MACKENZIE & WESTAWAY, 2001), 4- Tráfico de vírions imaturos e partículas prM/E para o Complexo de Golgi e maturação mediada por glicosilações, 5- Rearranjos conformacionais de proteínas de superfície prM/E do vírion mediado por pH ácido e clivagem da prM mediada por proteases do tipo furina dentro da rede *trans*-Golgi (LI et al., 2008; I MEI YU et al., 2008; JUNJHON et al., 2010) e 6- Secreção de vírus maduros e de peptídeos prM dissociados (MUKHOPADHYAY et al., 2005; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

Figura 4: Ciclo de replicação dos *Flavivírus*



Fonte: Pierson et al., 2020.

Legenda: Assim como outros *Flavivírus*, o ZIKV infecta células de mamíferos por meio de interações de proteínas virais com proteínas de superfícies da célula hospedeira, como lecitinas do tipo C e A (CLECA) as quais podem iniciar vias críticas de sinalização que modulam a resposta imune do hospedeiro. O processo de internalização é mediado, principalmente por clatrina, e outros fatores como a RNASEK. Uma vez ligados às células, a fusão ocorre nos compartimentos de baixo pH do meio endossomal e catalisada por mudanças conformacionais na proteína E, logo a replicação assimétrica do gRNA viral ocorre em conjunto com várias proteínas não estruturais dentro de pacotes de vesículas para proteção dos produtos gerados, assim fugindo do aparato imunológico inato do hospedeiro. As partículas virais ligam-se ao RE e trafegam para região intra-reticular. A maturação dos vírions ocorre nos compartimentos ácidos do Golgi pela clivagem da prM por proteases tipo furina e liberação do vírus maduro.

2.4 COMPETÊNCIA VETORIAL DE INSETOS

A competência vetorial é a habilidade de uma espécie de inseto em transmitir biologicamente um agente infeccioso. Em mosquito, apenas a presença do vírus não é suficiente para assegurar uma infecção completa e não é factível que ele seja taxado a priori como um vetor do vírus. Para que um inseto seja considerado um vetor competente, deve-se demonstrar a sua capacidade de transmissão para hospedeiros suscetíveis (MUSSO et al., 2016). A primeira evidência de que os mosquitos poderiam ser vetores de patógenos humanos foi descrita através de estudos de transmissão de larvas de filárias por Patrick Manson (MANSON et al., 1878).

Desde de 1952 o estudo sobre a capacidade de insetos vetores em transmitir o ZIKV vem sendo estudado. No entanto, o primeiro estudo de competência vetorial que demonstrou a capacidade do mosquito *Ae. aegypti* em transmitir o vírus Zika ocorreu em 1956 (BOORMAN et al., 1956). Diversas outras espécies de mosquitos foram potencialmente implicadas na transmissão do ZIKV, como as espécies: *Anopheles coustani*, *Anopheles gambiae*, *Ae. albopictus*, *Ae. camptorhynchus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. notoscriptus*, *Ae. vittatus*, *Ae. vexans*, *Culex perfuscus*, *C. quinquefasciatus* e *Mansonia uniformis* (EPELBOIN et al., 2017; GUEDES et al., 2017, ELIZONDO-QUIROGA et al., 2018).

As espécies de mosquitos com maior probabilidade de perpetuar a transmissão de um arbovírus aos hospedeiros humanos são aqueles que: 1 – o mosquito se alimenta de sangue de hospedeiros sentinelas ou reservatórios, 2 – são competentes para transmitir o vírus, 3- possui uma densidade populacional superior a densidade populacional de várias outras espécies de mosquitos e 4 – são comumente encontrados infectados por proximidade espacial e temporal aos hospedeiros virais selvagens (BARNETT et al., 1960; MCMILLAN et al., 2020). Devido à necessidade biológica dos arbovírus de se replicar em diferentes hospedeiros, criam múltiplas oportunidades para interações em diversos hospedeiros suscetíveis. Essas interações entre hospedeiros vertebrados, vetores e vírus podem ocorrer em vários níveis e, em última instância, impactam os padrões de transmissibilidade e infecção (HUANG et al., 2019).

2.5 LINHAGEM CELULAR C6/36 (1967) DE *Aedes (Stegomyia) albopictus*, SKUSE (1894).

A linhagem celular de inseto C6/36 é derivada de larvas de *Aedes albopictus* (ATCC CRL-1660) estabelecida em 1967 a partir de larvas de *Ae. albopictus* recém eclodidas de ancestralidade não especificada (SINGH et al 1967). O mosquito tigre asiático, *Ae. albopictus*, pertencente ao subgênero *Stegomyia*, tem origem no Sudeste Asiático (Índia); distribuição em áreas de clima temperado e tropical. É encontrado principalmente em ambientes silvestres como matas e plantações, meio rural, urbano e sub-urbanos sendo considerado uma das espécies de insetos mais invasoras do mundo (CONSOLI; OLIVEIRA et al, 1992; PORRETTA et al., 2012). O *Ae. Albopictus* é um vetor competente de muitos arbovírus, incluindo o vírus da dengue (DENV), vírus Chikungunya, vírus da encefalite equina oriental (EEEV) e vírus Zika (ZIKV) (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016).

Esta linhagem oferece uma plataforma crítica no estudo sobre a biologia e virologia em células de insetos e é comumente utilizada para detecção, isolamento e propagação de arbovírus (WALKER et al, 2014). A seleção do subclone C6/36 se deu pelo rendimento de vírus obtidos a partir desta linhagem em ensaios de infecção, por conter um cariótipo diplóide com $2n$, por ser não tumorigênica e por ser permissível a uma ampla gama de arbovírus, e parcialmente devido à falta de uma resposta funcional de RNAi, disponível no *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, EUA) (MILLER et al., 2018).

A cultura celular de C6/36 tem um curto tempo de duplicação e é de fácil manipulação sendo permissiva à infecção por diversos arbovírus transmitidos por insetos, como os membros das famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Bunyaviridae*. Estudos *in vitro* em linhagens celulares de insetos são usados para fornecer conhecimentos acerca de potenciais espécies de mosquito em transmitir patógenos como arbovírus emergentes (MILLER et al., 2018) além de serem usadas para amplificar os títulos de arbovírus necessários para experimentos em laboratórios, estudos de isolamento viral a partir de mosquitos selvagens e determinar a eficácia de novos compostos, como inseticidas e agentes de biocontrole (ACOSTA et al., 2011; BAKONYI et al., 2005).

2.6 LINHAGEM CELULAR SF9 (CRL-1711) DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

A linhagem celular Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (Sf) é um clone isolado obtido a partir da linhagem Sf21 (IPLB-Sf-21-AE) oriunda do tecido ovariano de pupa do lepidóptero Sf e são comumente utilizadas para expressão heteróloga de proteínas e para a fabricação de vacinas virais expressas por baculovírus (VAUGHN et al., 1977). Uma vez que esses insetos possuem uma filogenia distante dos humanos, o uso de linhagens celulares derivadas de insetos, como a Sf9, são consideradas mais seguras quando comparada com o uso de modelos de células de mamífero para a fabricação de insumos biológicos ou imunobiológicos (HAILUN et al., 2014).

A linhagem Sf9 foi obtida e caracterizada pela *American Type Culture Collection* (ATCC; número de catálogo CRL-1711). O uso dessa linhagem secundária de Sf levou à descoberta de infecções persistentes de vírus de RNA (LI et al, 2007; IWANAGA et al., 2012; HASHIMOTO et al., 2017). A Sf9 também foi utilizada para ensaios de infectividade de diversos vírus, dentre eles alguns *Flavivírus* como o vírus da encefalite japonesa (JEV) no qual a infecção ocorre de forma produtiva e persistente (FU et al., 1996; KIM et al., 2004) e o vírus da encefalite de St Louis (SLE), no qual as células Sf9 infectadas expressaram antígenos virais do SLE e as partículas virais intracelulares foram detectadas por microscopia eletrônica de transmissão (ZHANG et al., 1993).

Estudos já mostraram que os vírus da febre amarela, DENV-1 e DENV-2 podem replicar em células Sf9 em níveis extremamente baixos (ZHANG et al., 1994). Alguns *Alphavírus* como o Vírus da encefalomielite equina oriental (EEE) e *Bunyavirus* como o vírus do Gumbo limbo (GLV) exibem perfis distintos de suscetibilidade à infecção em células Sf9 (ZHANG et al., 1993). No entanto, o efeito da exposição do vírus Zika, suscetibilidade a infecção e o perfil transcriptômico de células de *Spodoptera frugiperda* nunca foram analisados.

3 JUSTIFICATIVA

Os estudos voltados para entender a biologia da infecção causada pelo ZIKV em diferentes tecidos e espécies de mosquitos ainda são escassos. Para invadir a célula hospedeira e iniciar a sua replicação, o vírus precisa penetrar no compartimento intracelular para formar o complexo de replicação viral. O processo consiste em uma série intrincada de eventos altamente dinâmicos, fortemente coordenados, incluindo, entre outros, a ligação do vírus às células, o tráfico intracelular e a entrega da informação genética do vírus. A falta de conhecimentos sobre os mecanismos associados à infecção do mosquito vetor pelo ZIKV, incentivaram a presente proposta que visa investigar de forma comparativa a dinâmica de interação e internalização do vírus Zika em células de inseto.

A avaliação comparativa do ciclo de infecção viral do ZIKV em duas linhagens celulares de inseto, a C6/36 (linhagem celular de *Ae. albopictus* susceptível à infecção viral e utilizada para detecção, propagação e análise de arbovírus) e a Sf9 (linhagem celular do inseto *Spodoptera frugiperda* não permissiva à replicação viral) demonstraram informações importantes sobre a cinética de replicação viral, dinâmica de interação e internalização, variações ultraestruturais e de expressão gênica. Todos os esforços voltados para dissecar as interações moleculares entre o ZIKV são uma tentativa de entender as mudanças que ocorrem após a infecção e que serão úteis na identificação de moléculas que podem potencialmente aumentar ou suprimir a habilidade do vetor de se infectar e ou transmitir o vírus. Os conhecimentos científicos gerados são aplicáveis para o desenvolvimento de novas ferramentas e técnicas que visem futuramente o bloqueio da transmissão vetorial do vírus Zika em mosquitos vetores.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Existem semelhanças ou diferenças na dinâmica de replicação viral, citoarquitetura e expressão de genes determinantes para a interação e internalização do vírus Zika em linhagens celulares de inseto C6/36 (*Aedes albopictus*) e Sf9 (*Spodoptera frugiperda*)?

5 HIPÓTESE

Existem variações na cinética de replicação viral, ultraestruturais e na expressão de genes (*up ou down*) que ocorrem após a infecção do vírus Zika em células de insetos distintas que são determinantes para interação e internalização viral.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fatores moleculares e estruturais determinantes para interação e internalização do vírus Zika em linhagens de células de inseto, através da investigação comparativa da cinética de replicação, ultraestrutural e do perfil transcriptômico de células C6/36 e Sf9 em resposta à infecção viral.

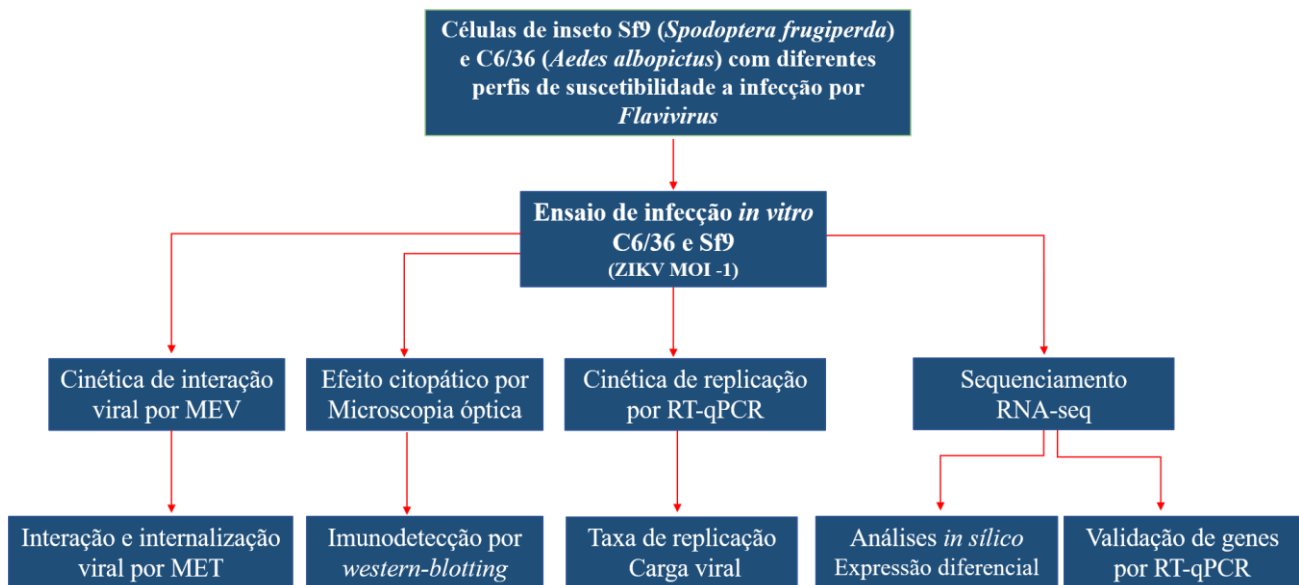
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Avaliar a cinética de replicação do vírus Zika nas linhagens celulares C6/36 e Sf9;
- 2- Caracterizar a dinâmica de interação e internalização do vírus Zika nas diferentes linhagens celulares C6/36 e Sf9;
- 3 - Avaliar o perfil transcriptômico das linhagens celulares C6/36 e/ou Sf9 em resposta à infecção pelo vírus Zika.

7 METODOLOGIA

Diferentes técnicas e abordagens estão sendo aplicadas e padronizadas neste projeto para avaliar o perfil de susceptibilidade das células Sf9 e C6/36 à infecção pelo ZIKV. Além de caracterizar genes que possam estar envolvidos no processo de infecção em células de insetos. Os principais métodos a serem utilizados são descritos sucintamente na figura 5.

Figura 5. Fluxograma experimental.



Fonte: próprio autor

7.1 CULTURA DE CÉLULAS E VÍRUS

As linhagens celulares utilizadas neste estudo são: C6/36 oriundas de macerados totais de larvas de *Aedes albopictus* (CRL-1660; ATCC) cultivadas em meio de crescimento Leibowitz (L-15) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) 2-5% (Gibco®), TBP-pó (*Tryptose Fosfate Broth*), L- Glutamina, aminoácidos não-essenciais, penicilina e estreptomicina (Gibco®), e Sf9 oriundas de tecido ovariano de pupa do lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (CRL-1711; ATCC) cultivadas em meio Sf900 (Gibco®), com Soro Fetal Bovino (SFB) 5% e suplementado com os antibióticos gentamicina (Gibco®) nas concentrações finais especificadas segundo

recomendações do fabricante. O repique celular foi realizado em fase de confluência segundo o manual *Insect Cell Lines: Growth and Maintenance of Insect Cell Lines®* (Invitrogen). Ambas as linhagens celulares foram cultivadas em sistema de monocamada aderente em frascos de cultura e foram mantidos em estufa a 27°C no laboratório de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (IAM/FIOCRUZ).

A linhagem de vírus Zika do Brasil (BRPE243/2015) utilizada nos ensaios de infecção *in vitro* de células de inseto foi concedida pelo Laboratório de Virologia e Terapia experimental do IAM/ FIOCRUZ-PE. Essa cepa foi denominada ZIKV/H cepa sapiens/Brasil/PE243/2015, de acordo com a nomenclatura descrita por Scheuermann (2016), e foi totalmente caracterizada (número de acesso KX197192.1). Os estoques virais foram produzidos inicialmente em células VERO (CCL81; ATCC) cujo título viral foi calculado por meio de ensaio de placa em células VERO e atingiu 10^7 unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL) e posteriormente propagado em célula C6/36 para obtenção de um novo estoque viral e armazenado em nitrogênio líquido.

Os ensaios de infecção viral nas células C6/36 e Sf9 foram realizados em triplicata segundo protocolo descrito em BARRETO-VIEIRA et al (2017) usando multiplicidade de infecção (MOI) de 1. As linhagens celulares também foram avaliadas quanto à produção de progenia viral do ZIKV em C6/36 e Sf9 através de quantificação do RNA viral por meio de RT-qPCR a partir da extração de RNA total do sobrenadante de cultivo celular em diferentes momentos de infecção (24h, 48h, 72h, 96h e 120h). Os cultivos celulares também foram testados quanto a contaminação por *Mycoplasma* sp. através de PCR adaptada para as condições do Laboratório (TIMENETSKY et al., 2006)

7.2 CINÉTICA DE REPLICAÇÃO VIRAL POR RT-QPCR

7.2.1 Ensaio de infecção em célula C6/36 e Sf9

As linhagens celulares de C6/36 e Sf9 foram infectadas com MOI (multiplicidade de infecção - a taxa de vírus por célula) de 1 ($1,5 \times 10^5$ de célula para $1,5 \times 10^6$ de vírus) no qual 1mL do vírus Zika foi inoculado nos cultivos celulares por 1 hora (etapa de adsorção) e incubado a 27°C na estufa e a cada 20 minutos foi

realizada uma leve homogeneização dos cultivos. Após esse tempo, o vírus foi retirado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS (*Phosphate buffer Saline*) pH 7,4 1X estéril sob leve agitação por 2 minutos em temperatura ambiente, em seguida foi adicionado 5mL de meio de cultura para cada respectiva célula, L-15 2% para C6/36 e Sf900 para Sf9, em seguida as células foram mantidas a 27°C na estufa e acompanhadas até o 5 dpi/120hpi.

7.2.2 Extração de RNA por TRizol

Depois da infecção MOI 1 das linhagens celulares C6/36 e Sf9 (24h até 120hpi), as células em monocamadas foram soltas mecanicamente e centrifugadas a 1.200g por 10 minutos e em seguida foi retirado o sobrenadante para um microtubo livre de DNase/RNase de 1,5 mL e armazenado a -80°C até o momento da extração de RNA. O método TRizol (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) foi utilizado para extração de RNA total de acordo com as instruções do fabricante com as seguintes modificações. O sobrenadante do cultivo das células infectadas e não infectadas (controle negativo) (100 µL) foi misturado com 200 µL de TRizol, homogeneizado por vórtex por 15 segundos e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 100 µL de clorofórmio e homogeneizado mecanicamente por 15 segundos. A mistura foi então incubada em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa de cada amostra foi removida e transferida para um novo tubo contendo 250 µL de isopropanol 100%. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos e depois centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido por inversão e o pellet de RNA foi lavado com 300 µL de etanol 75%. As amostras foram homogeneizadas brevemente e depois centrifugadas a 7500g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA foi então seco a 37°C em estufa por 15 minutos. O sedimento de RNA foi ressuscitado em 30 µL de água livre de RNase. Após a ressuspensão do RNA, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria em NanoDrop 2000™ (Thermo Fischer Scientific) e armazenadas imediatamente a -80°C.

7.2.3 Detecção do vírus Zika por RT-qPCR

A detecção do ZIKV nas linhagens celulares foi realizada por RT-qPCR (Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa quantitativa em tempo real) pelo sistema QuantStudio® 5 System (Thermo Fischer Scientific) usando o Kit QuantiNova Probe RT Kit PCR (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os ensaios da cinética de replicação viral por RT-qPCR foram realizadas em duplicatas para quantificar a carga viral do ZIKV em 24, 48, 72, 96 e 120 hpi de ambas linhagens celulares.

A reação da qPCR foi realizada em um volume final adaptado de 10 µL contendo 3,5 µL de RNA extraído, 1 x QuantiNova Probe RT-PCR Master Mix, 0,1 µL do QuantiNova Probe RT Mix, 0,1 de referência passiva ROX, 100 µM de cada primer (estoque) e 25 µM da sonda (estoque). Os primers, a sonda e as condições de PCR foram descritas pela primeira vez em Lanciotti et al., e cada amostra foi testada em duplicata, assim como para os controles da reação e da extração de RNA. O ciclo de RT-qPCR incluiu um único ciclo de transcrição reversa a 45°C por 15 minutos, seguido de 95°C por 5 minutos para a inativação da enzima transcriptase reversa e ativação da DNA polimerase e, em seguida, a reação passa por 45 ciclos de 5 segundos a 95°C e 45 segundos a 60°C. As células C6/36 infectadas foram utilizadas como controle positivo dos ensaios de infecção viral realizados nas células Sf9 que aparentam ser refratárias à infecção pelo ZIKV, visto que esta linhagem, até então, não se mostrou susceptível à infecção por diversos *Flavivírus* (ZHANG., et al. 1994). Para cada ensaio, foi utilizado em ambas as linhagens, células não infectadas, ou seja, não exposta ao vírus que serviu de controle negativo e as reações de RT-qPCR sem RNA representaram os controles negativos da reação. A quantidade de RNA viral em cada amostra foi estimada comparando os valores do limite do ciclo (Ct) com a curva padrão para cada ensaio RT-qPCR. A curva padrão consistia em diferentes diluições de RNA de ZIKV BRPE243/2015 previamente titulado.

Tabela 1: *Primers* utilizados na amplificação da região NS5 do ZIKV e Sonda 5-FAM como corante repórter (Lanciotti et al., 2008).

| Primer | Referência | Sequência |
|--------|---------------|---|
| 1 | ZIKV 1086 | 5'- CCGCTGCCCAACACAAG - 3' |
| 2 | ZIKV 1162c | 5'- CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT - 3' |
| Sonda | ZIKV 1107-FAM | 5'- (FAM)AGCCTACCTTGACAAGCAGTCA GCACTCAA(MGB) - 3' |

Legenda: *Primers* 1 forward e 2 reverse para o alvo NS5 do Vírus Zika e Sonda Zika 5-FAM conjugado com corante repórter.

7.3 IMUNODETECÇÃO DO ZIKV POR *WESTERN BLOTTING*

Paralelamente, a infecção das células Sf9 e C6/36 também foi avaliada por ensaios de imunodeteção do tipo *Western blotting*, utilizando anticorpo comercial 4G2 “*Mouse Anti-Flavivirus Envelope Protein Antibody 4G2*” (Native Antigen) na diluição de 1:5000. Desta forma, foi possível detectar a presença do vírus nas células infectadas. Onde cada cultivo celular (24h-120hpi) foram centrifugadas e separado o sobrenadante e sedimento celular. O sobrenadante foi precipitado com ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich) a fim de precipitar proteínas virais no sobrenadantes dos cultivos e o sedimento celular foi imediatamente fervido em tampão L2X e 5 mL foram submetidas a uma separação eletroforética por SDS-PAGE 10% em gel unidimensional e transferido para uma membrana de nitrocelulose (ECL® ou Protan®, GE Healthcare) para posterior imunodeteção. Neste procedimento a membrana foi bloqueada com leite desnatado (Molico®) a 5% em tampão TBS-T 1X (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%) por 1 hora em temperatura ambiente sob leve agitação e posteriormente lavada em tampão TBS-T. Em seguida foi utilizado anticorpo primário 4G2 (1:5000) no qual ficou incubando por 1 hora. Após esse tempo, a membrana foi lavada uma vez por 15 minutos e duas vezes por 5 minutos em TBS-T e incubada com anticorpo secundário anti IgG de coelho ou camundongo conjugados à peroxidase (1:5000). A membrana foi lavada uma vez por

15 minutos e quatro vezes por 5 minutos em TBS-T e a imunodeteção foi visualizada através do sistema de quimioluminescência (Luminata Forte®, Millipore) e detectado utilizando o equipamento de quimioluminescência iBright 1000.

7.4 AVALIAÇÃO DE EFEITO CITOPÁTICO

Para avaliar o perfil de infecção e verificar se há presença de efeito citopático ou alterações na monocamada do cultivo celular induzido pelo ZIKV, as células C6/36 e Sf9 infectadas foram visualizadas em diferentes momentos do ciclo de infecção (24h, 48h, 72h, 96h e 120h) através de microscópio óptico invertido.

7.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E TRANSMISSÃO (MET)

7.5.1 Ensaios de cinética de interação e internalização

Para monitorar a interação e internalização do ZIKV nas células, bem como investigar possíveis alterações ultraestruturais induzidas pelo vírus, às células foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e imunofluorescência indireta.

7.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os ensaios de cinética de interação e internalização ZIKV em linhagens celulares de inseto foram conduzidas segundo Lozach., et al. (2010) e Barreto-Vieira., et al. (2017), com algumas modificações. Os cultivos celulares de C6/36 e Sf9 em placas de 6 poços, foram previamente preparadas expondo a temperatura de 4°C por 15 minutos e em seguida foram inoculadas com ZIKV (MOI de 1) à 4°C por 15 minutos (para verificar a possível ligação ao receptor de membrana e evitar a endocitose do complexo ZIKV- receptor). As células foram lavadas 2 vezes com PBS (*Phosphate buffer Saline*) 100 mM e fixadas com 2,5% de Glutaraldeído (G.A) em cacodilato de sódio (T. caco) 0,1M pH 7,2 por 2 horas. Após a fixação as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em Tetróxido de ósmio 1% + ferricianeto de potássio 0,8%+ cloreto de cálcio 5mM diluídos em Tampão caco 1M por 1 hora no escuro. Em

seguida as amostras foram lavadas 2 vezes em T.caco 0.1M. e 1x em água destilada. Após esta etapa as células foram submetidas a contrastação *in bloc* em acetato de uranila 2,5% por 30 minutos no escuro seguida por 3 lavagens com água destilada. As amostras foram então desidratadas em séries crescentes de acetona (30%, 50% e 70%, 90% em água destilada) por 15 minutos cada etapa seguida de 3 banhos em acetona 100% durante 20 minutos cada. Na etapa seguinte, as amostras foram infiltradas com acetona e resina epóxi (epoxídica) em diferentes concentrações (2:1 a 4°C, 1:1 em temperatura ambiente, 1:2 a 4°C e resina pura a 4°C. Na etapa de emblocamento as amostras foram incluídas em resina em formas de silicone e colocadas para polimerização em estufa a 60°C, durante 48 horas. Cortes ultrafinos de 60-90nm foram realizados em ultramicrótomo e coletados em grades de cobre de 300 mesh uranila a 7% em metanol, por 50 minutos e em citrato de chumbo por 10 minutos. As amostras foram então visualização em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 Spirit BioTWIN – FEI, operado a 80 KV.

7.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para MEV, as células Sf9 e C6/36 foram cultivadas em lamínulas em placas de 12 poços, previamente exposta a uma temperatura de 4°C por 15 minutos e em seguida foram inoculadas com ZIKV (MOI de 1) à 4°C por 15 minutos e logo foram fixadas com 2,5% de Glutaraldeído (G.A) em cacodilato de sódio (T. caco) 0,1M pH 7,2 e pós-fixadas com Tetróxido de ósmio com ferricianeto de potássio 0,8% em T.caco 1M por 1 hora e desidratadas em série crescente de etanol. Em seguida, as lamínulas foram secas em ponto crítico em CO₂ e metalizadas. As amostras foram observadas usando microscópio eletrônico de varredura JSM-5600.

7.6 EXTRAÇÃO DE RNA, BIBLIOTECAS DE CDNA E RNAseq

Os RNAs totais de cultivos celulares em triplicata de C6/36 e Sf9 expostas e não expostas à infecção pelo ZIKV MOI 1 no momento do ciclo viral de 48hpi foram extraídos através do Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade e a qualidade dos RNAs extraídos foram avaliadas por espectrofotometria em NanoDrop 2000™ (Thermo Fischer Scientific) e utilizando o

Qubit® RNA HS assay Kit em aparelho Fluorômetro Qubit 2.0. A integridade das amostras de RNAs foram também avaliadas através da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As bibliotecas de cDNA do tipo *paired-end* dos RNAs totais das linhagens celulares de inseto foi preparada utilizando o kit de preparação de amostras *TruSeq Stranded mRNA Library Prep®* (Illumina) seguindo as instruções do fabricante. As etapas para preparação das bibliotecas de cDNA foram as seguintes: 1. isolamento de mRNA através de cauda poli-A e fragmentação e síntese de cDNA; 2. purificação dos cDNAs dupla-fita e reparo das extremidades e adição de adeninas na extremidade 3'; 3. ligação de adaptadores para o sequenciamento. A geração de clusters, sequenciamento e análises dos dados de cada biblioteca de cDNA foi realizada em equipamento Illumina® MiSeq System seguindo as intruções do fabricante (MiSeq® System User Guide) e disponível no Núcleo de Plataforma Tecnológicas/FIOCRUZ (NPT, IAM-FIOCRUZ).

7.7 ANÁLISE DOS DADOS DO RNAseq

As análises dos perfis de transcrição diferencial e o mapeamento de *reads* de interesse foram conduzidos em colaboração com a equipe da plataforma de bioinformática do IAM, sob a liderança do Dr. Antônio Mauro Rezende. A análise computacional consistiu em avaliar a qualidade das leituras das sequências obtidas aplicando-se a ferramenta FastQC (bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc). A filtragem de bases de baixa qualidade foi realizada através da ferramenta Trimmomatic versão 0.36 (BOLGER; LOHSE & USADEL, 2014) cujos parâmetros são definidos de acordo com resultados anteriores. As leituras filtradas para cada amostra foram mapeadas utilizando-se a ferramenta STAR aligner versão 2.5.3 (DOBIN et al., 2013) contra o genoma de referência disponível em GenBank código: 10985. A análise da expressão diferencial dos genes será realizada utilizando o pacote R DESeq2 (LOVE; HUBER & ANDERS, 2014). Para a análise funcional de enriquecimento dos genes que serão selecionados com valor absoluto de log₂FoldChange igual ou maior que 1 e com p-valor corrigido abaixo de 0.05, utilizaremos o STRINGdb (FRANCESCHINI et al., 2013) e o Pathview, que são pacotes de análise implementados no ambiente de programação R (LUO & BROUWER, 2013). O primeiro vai atribuir a ontologia dos genes (GO) (<http://www.geneontology.org/>), e os

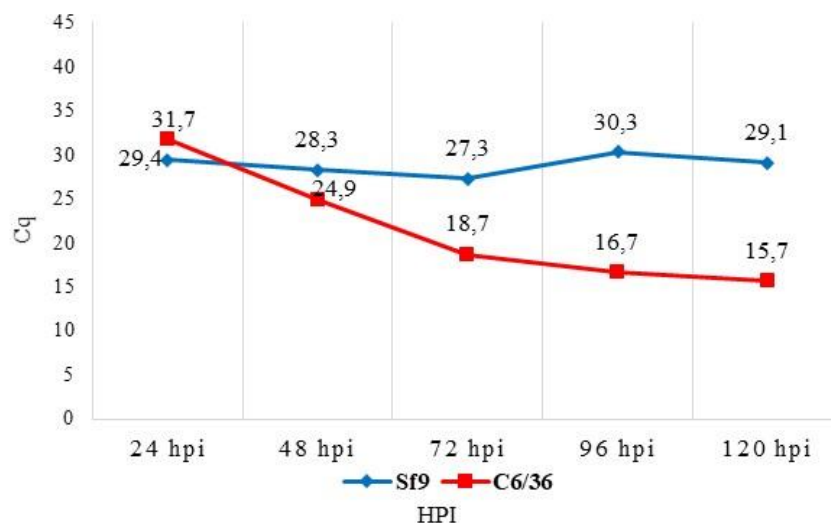
termos das vias da base de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>). O segundo pacote, Pathview, será utilizado para mapear os genes diferencialmente expressos (DEGs) e suas medidas de expressão diferencial para as vias KEGG enriquecidas.

8 RESULTADOS

8.1 ANÁLISE DA CINÉTICA DE REPLICAÇÃO VIRAL POR RT-qPCR

A RT-qPCR foi usada para avaliar comparativamente e quantificar a carga de RNA viral do ZIKV presente nas células em diferentes momentos durante o ciclo de infecção viral (24h, 48h, 72h, 96h e 120hpi). Em geral, o perfil de carga viral utilizando a média do valor do Ct *mean* em Sf9 não variou estatisticamente no decorrer da infecção (Gráfico 1). O perfil de positividade quantificado pelo Ct em Sf9 foi de 29,4 (Sf9 24hpi), 28,3 (Sf9 48hpi), 27,3 (Sf9 72hpi), 30,3 (Sf9 96hpi) e 29,1 (Sf9 120hpi) (Gráfico 1). Quando avaliado pelo número de cópias de RNA viral em Sf9, há um decaimento no número de cópias em 96hpi, logo em seguida em 120hpi ocorre um pequeno aumento do número de cópias como podemos ver no gráfico 2. Já os Cts da célula C6/36 foram 31,7 (C6/36 24hpi), 24,9 (C6/36 48hpi), 18,7 (C6/36 72hpi), 16,7 (C6/36 96hpi) e 15,7 (C6/36 120hpi) (Gráfico 1). Os parâmetros de qualidade da reação foram estimados pelo Y-Intercept de 57,344, R de 0,995, Slope de -3,203 e eficiência de 105,214. Os controles negativos da reação foram indeterminados e uma curva padrão do transcrito do vírus Zika foi diluído em 5 pontos para quantificação.

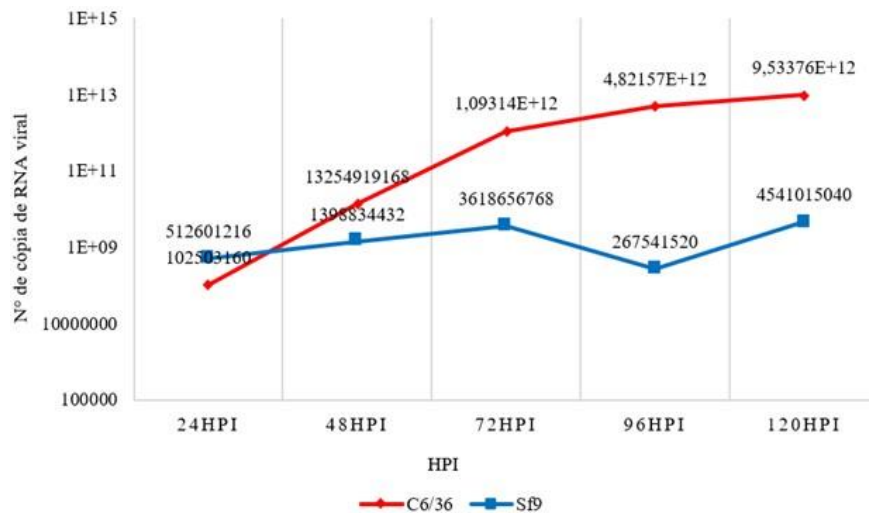
Gráfico 1. Cinética de replicação do ZIKV por Cq (ciclo de quantificação) correspondente a cada HPI (hora após infecção) nas células Sf9 (24hpi, 48hpi, 72hpi, 96hpi e 120hpi) e C6/36 (24hpi, 48hpi, 72hpi, 96hpi e 120hpi).



Legenda: Cinética de replicação do ZIKV (vírus Zika) MOI 1 por Cq (ciclo de quantificação) correspondente a cada HPI (hora após infecção) nas células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) em azul

(24hpi, 48hpi, 72hpi, 96hpi e 120hpi) e C6/36 (*Aedes albopictus*) em vermelho (24hpi, 48hpi, 72hpi, 96hpi e 120hpi). Eixo Y corresponde ao nº de amplificação e X corresponde a hora após infecção.

Gráfico 2. Cinética de replicação do ZIKV MOI 1 por números de cópias de RNA viral correspondente a cada HPI (hora após infecção) nas células Sf9 (24hpi, 48hpi, 72hpi, 96hpi e 120hpi) e C6/36 (24hpi, 48hpi, 72hpi, 96hpi e 120hpi)



Legenda: Cinética de replicação do ZIKV (vírus Zika) MOI 1 por número de cópias de RNA viral correspondente a cada HPI (hora após infecção) nas células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) em azul (24hpi, 48hpi, 72hpi, 96hpi e 120hpi) e C6/36 (*Aedes albopictus*) em vermelho (24hpi, 48hpi, 72hpi, 96hpi e 120hpi). Eixo Y corresponde ao nº de amplificação e X corresponde a hora após infecção.

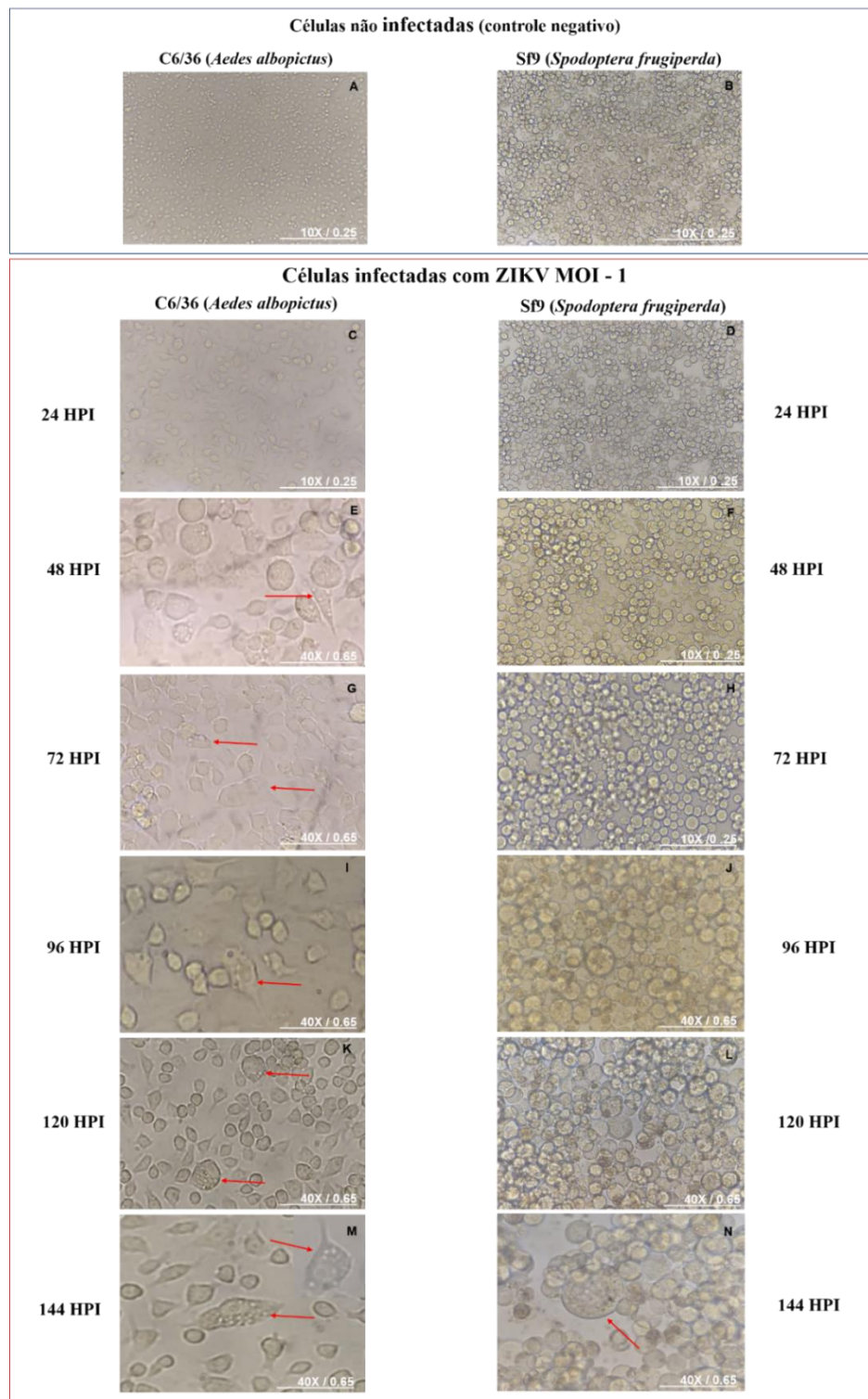
8.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOPÁTICOS

8.2.1 Efeitos citopáticos em Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) e C6/36 (*Aedes albopictus*)

Para avaliar a capacidade do ZIKV em infectar e causar efeitos citopáticos em células Sf9, estas foram monitoradas por microscópio óptico invertido nos tempos estabelecidos (entre 24-144hpi). Como esperado, não foram observadas alterações nas células não infectadas (controle). Em contraste, nas células inoculadas com ZIKV foi possível observar a presença de gigantismo celular a partir de 120hpi e um número elevado de células dispersas no sobrenadante. No entanto, a incubação desta linhagem com o vírus não teve impacto no crescimento celular. Já as células C6/36 infectadas apresentaram efeitos citopáticos evidentes a partir de 48hpi e mais expressivamente entre 120-144hpi. Foi possível visualizar inúmeros vacúolos citoplasmáticos e células gigantes com diferentes morfologias. Também foi possível

observar uma grande quantidade de células no sobrenadante da cultura e aumento de morte celular entre as células aderidas na monocamada. O crescimento celular foi discretamente afetado quando comparado com as células controles (Figura 6A).

Figura 6: Visualização por microscópio óptico invertido do cultivo celular de C6/36 e Sf9 infectada e não infectada pelo ZIKV (24h-144hpi).

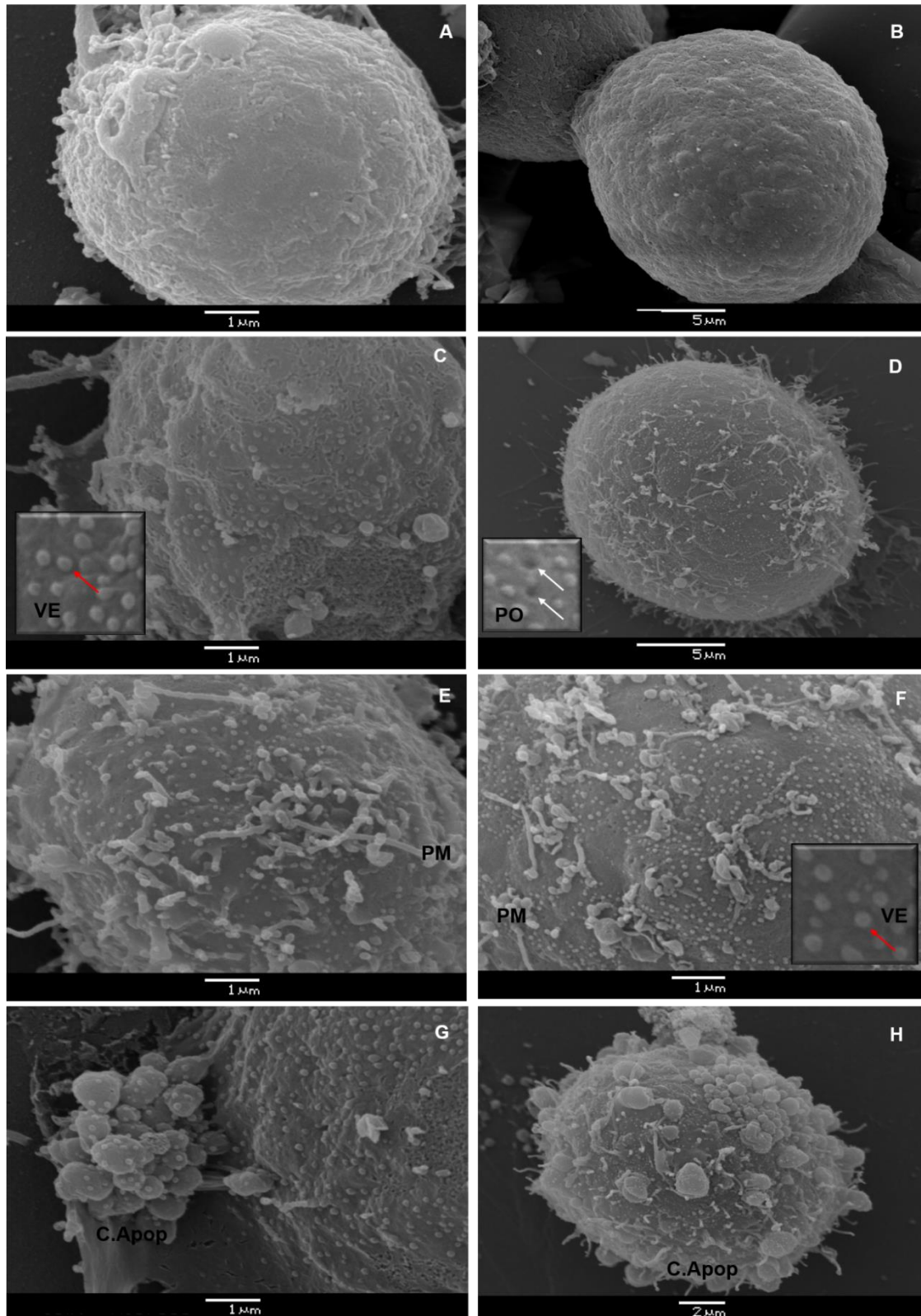


Legenda: Avaliação de efeito citopático de C6/36 e Sf9 infectadas com ZIKV MOI-1 em diferentes momentos de infecção. (A-B) células não infectadas (controle negativo). (C) C6/36 infectada com 24hpi e (D) Sf9 infectada com 24hpi, ambas células sem alterações visíveis. (E) C6/36 com 48hpi apresentando poucas células com alterações morfológicas e vacúolos citoplasmáticos (seta vermelha). (F) Sf9 com 48hpi sem nenhuma alteração. (G) C6/36 com 72hpi apresentando um crescente número de células com vacúolos citoplasmáticos (seta vermelha). (H) Sf9 com 72hpi não apresentou nenhuma mudança. (I) C6/36 com 96hpi apresentando lise celular sugestivo de morte celular e alterações citomorfológicas. (J) Sf9 com 96hpi sem alterações celulares. (K) C6/36 com 120hpi apresentando células gigantes com vacúolos citoplasmáticos (seta vermelha). (L) Sf9 com 120hpi sem alterações visíveis, no entanto, apresentando células soltas no sobrenadante (M) C6/36 com 144hpi apresentando inúmeras células com vacúolos (seta vermelha) e presenças de detritos celulares na monocamada do cultivo. (N) Sf9 com 144hpi exibindo gigantismo celular.

8.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE SF9 E C6/36 INFECTADAS COM ZIKV

A análise ultraestrutural por MEV da superfície das células Sf9 exposta ao vírus Zika PE243 (Figura 7), foi realizada pela primeira vez neste estudo. Ambas as linhagens celulares a Sf9 e a C6/36 não expostas ao vírus Zika PE243, apresentam, morfologia arredondada, membrana plasmática de aspecto liso e com poucas projeções de membrana (Figuras 7 A-D). Este perfil é substancialmente alterado quando estas células foram expostas ao vírus. Quando comparadas as células não infectadas, diversas estruturas esféricas pequenas foram evidenciadas sobre a superfície das células C6/36 e Sf9 expostas ao vírus (Figura 7G, seta vermelha). Já foi relatado que durante a infecção por vírus de RNA, como o vírus influenza, ocorre um aumento no número de projeções de superfície em células epiteliais humanas infectadas (KOLESNIKOVA et al., 2013), o que corrobora com os achados para Sf9 exposta ao Zika. Tendo em vista a falta de uniformidade de tamanho destas estruturas, não nos foi possível afirmar de forma irrefutável se essas estruturas correspondem a partícula viral ou a vesículas extracelulares de células de inseto. Um estudo detalhado através de imunocitoquímica, com marcação específica para proteínas virais, poderá ajudar a elucidar esta questão. Por outro lado, as alterações morfológicas drásticas observadas nas células expostas ao vírus, são indicativas de seu efeito citopático, como observado por microscopia óptica. Entre estas alterações, as mais proeminentes foram a presença de vesículas maiores semelhantes a corpos apoptóticos, além de aumento na quantidade de projeções e de ondulações da membrana plasmática. Cabe ressaltar, que nas condições de temperatura utilizadas (4°C, 15 min) o vírus é capaz de se ligar a ligantes na superfície das células, mas sua internalização por endocitose é impedida.

Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura de C6/36 e Sf9 exposta ao ZIKV MOI 1.



Legenda: Efeito da exposição do vírus Zika MOI-1 em células C6/36 e Sf9 com 15 minutos de adsorção a 4°C. (A) C6/36 não exposta ao vírus (controle negativo) membrana celular possuindo um aspecto uniforme. (B) Sf9 não exposta ao vírus (controle negativo) contendo suas projeções de membrana mais compactadas sem estruturas esféricas sobre a superfície celular. (C) Detalhe da célula C6/36 exibindo

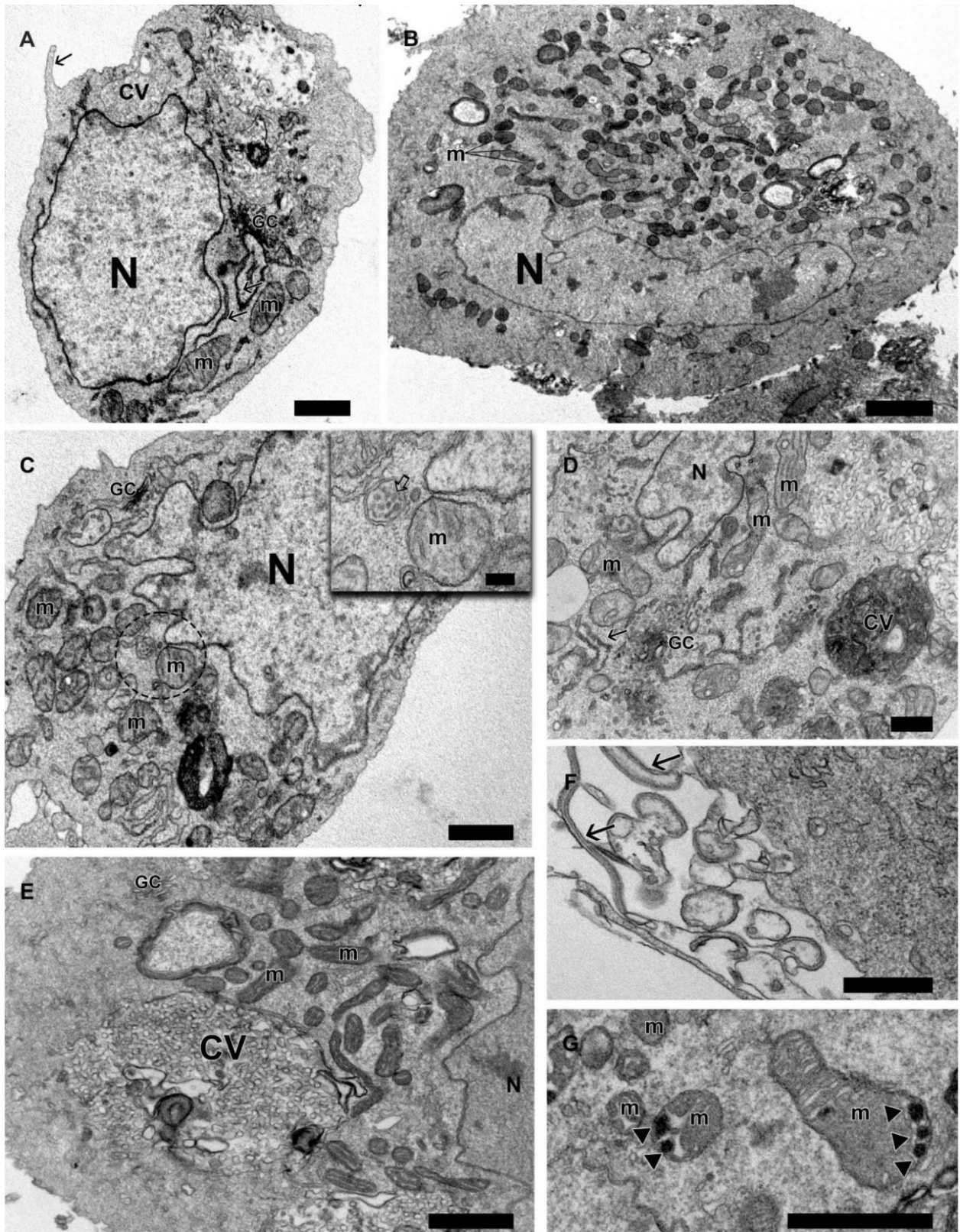
estruturas semelhantes a vesículas extracelulares. (D) Sf9 exposta ao vírus mostrando suas projeções de membrana. Detalhe para dois poros (setas brancas) na membrana celular. (E) C6/36 exposta ao vírus e (F) Sf9 exposta ao vírus mostrando estruturas semelhantes a vesículas extracelulares. (G) C6/36 exposta ao vírus mostrando estruturas em “cachos” típico de processos apoptóticos. (H) Sf9 exposta ao vírus exibindo alterações de superfícies semelhantes a corpos apoptóticos. (VE) Vesículas extracelulares. (PM) projeções de membrana. (C. Apop) Corpos apoptóticos. (PO) poro de superfície de membrana celular. (A, C, G e F) escala de 1 μm , (B e D) escala de 5 μm e (H) escala de 2 μm .

8.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE SF9 E C6/36 INFECTADAS COM ZIKV

Com intuito de traçar um perfil dos estágios iniciais de infecção com ZIKV nas duas linhagens de células de inseto, bem como identificar possíveis alterações morfológicas induzidas pela exposição ao vírus, Sf9 e C6/36 não expostas (controle negativo) ou expostas ao vírus à 4°C por 15 minutos, foram processadas para MET (Figura 8). Sob estas condições, a fluidez da membrana plasmática é substancialmente reduzida inibindo os processos endocíticos. Células C6/36 controles não expostas ao vírus possuem núcleo excêntrico proeminente e irregular com cromatina frouxamente dispersa no nucleoplasma e pequenos *clusters* de heterocromatina associadas ao envelope nuclear. Estas células ainda apresentam um número variável de mitocôndria com cristas tubulares, perfis de retículo endoplasmático escassos distribuídos pelo citoplasma. Um a três conjuntos de cisternas do Complexo de Golgi bem como vacúolos contendo perfis membranares e vesículas no seu interior também puderam ser observados. A membrana plasmática é irregular e projeções semelhantes a filopódios são comumente encontradas (Figura 8A). Células controles de Sf9 (Figura 8B) possuem características morfológicas e organelas bastante semelhantes a C6/36, com um grande núcleo excêntrico apresentando cromatina frouxa de aspecto granular e pequenos grupamentos de heterocromatina. Por outro lado, estas células possuem mitocôndrias menores e mais numerosas do que a C6/36. Corpos multivesiculares também são observados nestas células. Nas células C6/36 expostas ao vírus em baixa temperatura não foi possível observar a presença de partículas virais na superfície das células. No entanto, alterações intracelulares foram observadas em relação ao controle, e poucas partículas semelhantes ao vírus puderam ser identificadas em compartimentos intracelulares (Figura 8C, *inset*). Tais resultados, aparentemente controversos podem ser devido a um aumento accidental da temperatura, causando a endocitose das

partículas virais. Nestas condições de temperatura, também não foram observadas partículas virais nem na superfície e nem em compartimentos intracelulares em nossas amostras de Sf9 (Figuras E-G). No entanto em ambas as linhagens foi possível identificar algumas alterações morfológicas relevantes as quais podem ser indicativas da presença do ZIKV (Figuras 8C-G). Entre estas alterações foi possível observar na C6/36 um aumento no número de estruturas semelhantes a autofagossomas e corpos multivesiculares, aumento no tamanho e número das mitocôndrias e um aumento no número de vesículas associadas ao complexo de Golgi. Um aumento no número de perfis de retículo bem como um discreto inchaço de suas cisternas também pode ser observado (Figuras C-D). Na Sf9 alterações como aumento de estruturas semelhantes a autofagossomas foram mais consideráveis quando comparado com as células C6/36. Também foi possível observar um aumento na atividade exocítica (Figura 8F) com o brotamento de vesículas de tamanho variável na superfície de Sf9 (Figuras E-G). Embora depósitos de cálcio sejam comumente vistos em mitocôndrias de células de eucariotos, nas células Sf9 expostas ao ZIKV estes grânulos eram maiores e mais eletrondensos, indicando uma maior concentração de cálcio mitocondrial, nestas células. (Figura 8G).

Figura 8 – Microscopia eletrônica das células C6/36 e Sf9 expostas ao ZIKV.



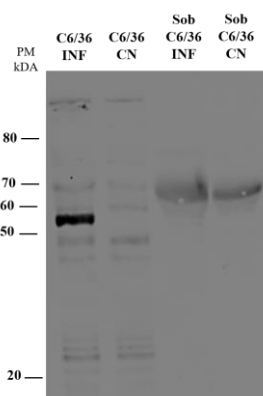
Legenda: (A) Detalhe de uma célula C6/36 controle, apresentando núcleo excêntrico (N), diversas mitocôndrias dispersas no citoplasma (m) e a presença de corpos multivesiculares (CV). Um complexo

de Golgi (CG) pouco desenvolvido também pode ser visualizado, barra – 1 μm . (B) Detalhe de uma célula Sf9 com núcleo excêntrico (N) e um grande número de mitocôndrias dispersas no citoplasma, barra - 2 μm . (C-D) Células C6/36 expostas ao ZIKV à 4°C por 15 minutos, barra – 1 μm . (C) Detalhe de uma célula apresentando partículas semelhantes a vírus (seta, *inset*) em compartimentos intracelulares, próximos as mitocôndrias (m). Note a presença de invaginações do envelope do núcleo (N). (D) Aspecto geral de uma célula C6/36, mostrando mitocôndrias alongadas, um grande número de vesículas associadas ao CG (GC). Note a presença de um corpo multivesicular (CV). (E-G) Células Sf9 expostas ao ZIKV à 4 °C por 15 minutos. Detalhe de uma célula apresentando inúmeras mitocôndrias (m) e grandes corpos multivesiculares. Grandes estruturas circundadas por membrana e contendo figuras mielínicas no seu interior também são observadas. Detalhe em grande aumento da membrana plasmática de uma célula Sf9 mostrando intensa atividade exocítica e filopodios (seta), barra – 1 μm . (G) Detalhe em grande aumento de mitocôndrias apresentando grandes depósitos eletrodensos, provavelmente constituídos por cálcio, no seu interior, barra 1 μm .

8.5 IMUNODETECÇÃO DO ZIKV PRESENTE NOS CULTIVOS CELULARES

A técnica de *Western blotting* foi realizada utilizando o anticorpo policlonal Anti-envelope de *Flavivírus* que visou detectar a expressão da proteína E do envelope viral de Zika de ~54 kDa em ambas as células expostas à infecção com ZIKV, e estas foram comparadas com os cultivos de células não infectadas. Apenas a linhagem C6/36 exposta à infecção com ZIKV (72hpi) apresentou uma banda característica da proteína E de ~54kDa, indicando que neste momento poderia estar ocorrendo expressão da proteína E viral na célula. A expressão da proteína E viral não foi detectada na célula Sf9 exposta ao vírus em 72hpi (dados não mostrados). A banda entre 60-70kDa detectada foi inespecífica pois apareceu nos controles sem infecção.

Figura 10: Imunodeteção do vírus Zika presente em sobrenadante e/ou sedimento de células C6/36 com 72hpi.



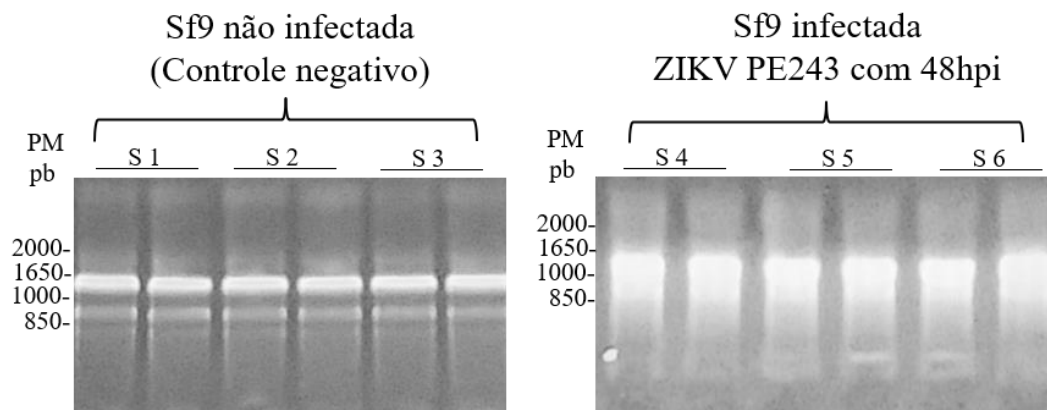
Legenda: Imunodeteção por *Western-blotting* com o anticorpo anti-envelope flaviviral (4G2). O sobrenadante do cultivo celular foi precipitado com TCA e o sedimento celular foi lisado com L2X com 72hpi com seus respectivos controles. As amostras foram submetidas a separação eletroforética em gel SDS-PAGE 10% e transferida para uma membrana de nitrocelulose no qual foi imunodetectada. PM: BenchMark™ Protein Ladder - Thermo Fisher Scientific; kDa: kilodalton. C6/36 INF: célula infectada; C6/36 CN: célula controle negativo; Sob: sobrenadante do cultivo celular.

8.6 RNAseq DOS CULTIVOS CELULARES DE SF9 SUBMETIDOS AOS ENSAIOS DE INFECÇÃO COM ZIKV

8.6.1 Preparação das bibliotecas de cDNA de Sf9

As células Sf9 infectadas e não infectadas com 48hpi foram submetidas a extração de RNA total em triplicata com o Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) e a qualidade e quantidade dos RNAs extraídos foram avaliados qualitativamente por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Figura 27) e quantificadas por espectrofotometria em NanoDrop 2000™ (Thermo Fischer Scientific) e utilizando o *Qubit® RNA HS assay Kit* em aparelho Fluorômetro Qubit 2.0 (Tabela 2). Os RNAs extraídos das células controles foram avaliados por RT-qPCR a fim de eliminar qualquer possibilidade de contaminação viral. Em seguida, as amostras foram processadas para preparação de biblioteca de cDNA através do kit *TruSeq Stranded mRNA Library Prep®* (Illumina).

Figura 11: Migração eletroforética em gel de agarose a 1% dos RNAs totais extraídos de Sf9 infectada e não infectada.



Legenda: Migração eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo: PM: Peso molecular em pares de bases, S1, S2 e S3: Extração de RNA total de célula Sf9 não infectada (controle negativo) com 48h de cultivo. S4, S5 e S6: Extração de RNA total de célula Sf9 infectada com ZIKV PE243 com 48hpi.

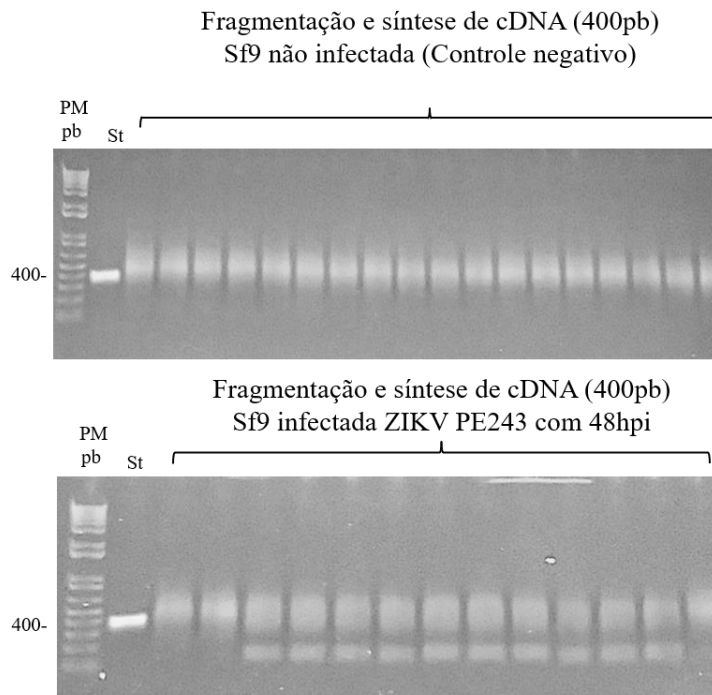
Tabela 2: Quantificação de RNA pelo kit *Qubit® RNA HS assay Kit* em aparelho Fluorômetro Qubit 2.0

| Sf9 não infectada (Controle negativo) | | | Sf9 infectada ZIKV PE243 com 48hpi | | |
|--|-----------------|---------------|---------------------------------------|------------------|---------------|
| Amostra | RNA diluído | Valor corrido | Amostra | RNA diluído | Valor corrido |
| Sf9 CN 1.3 | 55 ng/μL (12X) | 660 ng/μL | Sf9 INF 1.2 | 34 ng/μL (15) | 510 ng/μL |
| Sf9 CN 2.2 | 100 ng/μL (10X) | 1000 ng/μL | Sf9 INF 2.3 | 52 ng/μL (15X) | 780 ng/μL |
| Sf9 CN 3.2 | 74 ng/μL (10X) | 740 ng/μL | Sf9 INF 3.3 | 31,4 ng/μL (15X) | 471 ng/μL |

Legenda: Quantificação dos RNAs extraídos de células não infectadas e infectadas com 48hpi pelo kit *Qubit® RNA HS assay Kit* em aparelho Fluorômetro Qubit 2.0.

As etapas para preparação das bibliotecas de cDNA consistiu em: 1. Isolamento de mRNA através de cauda poli-A ligando com as *beads* magnéticas contendo poli-T, fragmentação em até 400pb e síntese de cDNA (Figura 28); 2. Purificação dos cDNAs dupla-fita e reparo das extremidades e adição de adeninas na extremidade 3'; 3. Ligação de adaptadores para o sequenciamento.

Figura 12: Migração eletroforética em gel de agarose a 1% da fragmentação e síntese de cDNA.



Legenda: Migração eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio: PM: Peso molecular em pares de bases, St: stander de 400 pares de bases utilizado na qPCR para a quantificação das amostras.

8.7 ANÁLISES POR BIOINFORMÁTICA APÓS O SEQUENCIAMENTO

8.7.1 Relatórios MultiQC

Os dados gerados após o sequenciamento pelo sequenciador de última geração Miseq (Illumina) foram avaliadas pela ferramenta MultiQC versão 1.7.

Tabela 3: Estatísticas gerais dos reads após o sequenciamento.

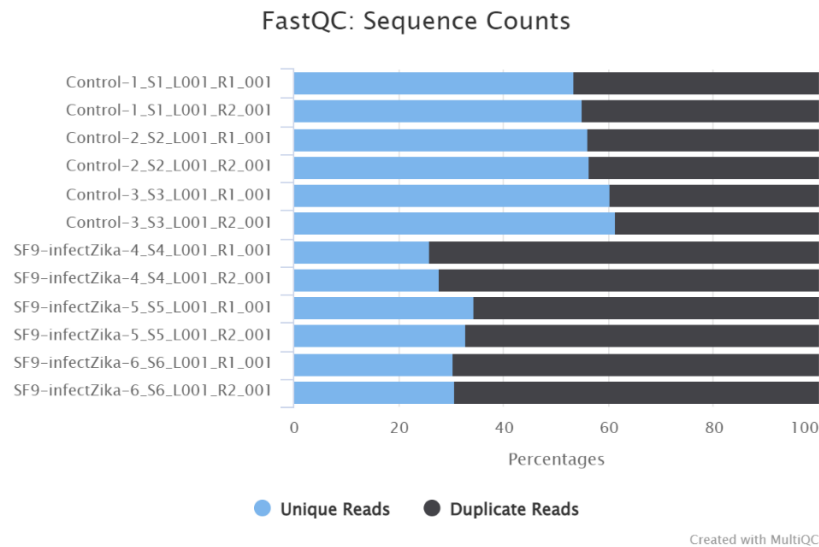
| Sample Name | % Dups | % GC | M Seqs |
|---------------------------------|--------|------|--------|
| Control-1_S1_L001_R1_001 | 46.6% | 42% | 3.6 |
| Control-1_S1_L001_R2_001 | 44.9% | 39% | 3.6 |
| Control-2_S2_L001_R1_001 | 43.9% | 43% | 3.9 |
| Control-2_S2_L001_R2_001 | 43.6% | 41% | 3.9 |
| Control-3_S3_L001_R1_001 | 39.8% | 42% | 2.1 |
| Control-3_S3_L001_R2_001 | 38.5% | 39% | 2.1 |
| SF9-infectZika-4_S4_L001_R1_001 | 74.0% | 46% | 3.3 |
| SF9-infectZika-4_S4_L001_R2_001 | 72.1% | 43% | 3.3 |
| SF9-infectZika-5_S5_L001_R1_001 | 65.7% | 47% | 2.7 |
| SF9-infectZika-5_S5_L001_R2_001 | 67.1% | 44% | 2.7 |
| SF9-infectZika-6_S6_L001_R1_001 | 69.7% | 46% | 3.2 |
| SF9-infectZika-6_S6_L001_R2_001 | 69.3% | 43% | 3.2 |

Legenda: Nome das amostras Sf9 controle e infectada. % Dups: porcentagens de leituras duplicadas, % GC: média de conteúdo de guanina e citosina, M Seqs: total de sequências (milhões).

8.7.2 Contagem de sequência por FastQC

As sequências passaram por um controle de qualidade através da ferramenta FastQC. O (gráfico 3) mostra o número total de leituras obtidas no qual se dividem em leituras exclusivas (em azul) e leituras duplicadas (em preto). A análise para obter uma boa impressão dos níveis de duplicação em cada arquivo se baseia nas primeiras 100.000 sequências para cada amostra. No entanto, todo comprimento do arquivo é rastreado para fornecer uma contagem representativa do nível geral de duplicação. A partir desta análise, podemos observar que o número de sequências exclusivas (azul) foi mais acentuada nas réplicas biológicas controles (não exposta ao vírus) e que difere consideravelmente nas células expostas ao vírus, no qual foi observado um número elevado de sequências repetidas (preto), sendo indicativo de aumento na expressão de moléculas de mRNAs em resposta à exposição viral.

Gráfico 3: Contagem de sequências em porcentagem pela ferramenta FastQc



Legenda: Estimativas de leituras duplicadas através da ferramenta FastQC para cada amostra. O eixo Y representa o nome das amostras e o eixo X representa o número de reads em milhões. Em azul indica as sequências exclusivas e em preto indica as sequências repetidas.

8.7.3. Histograma de qualidade das sequências

O valor médio de qualidade dos *reads* (gráfico 4) mostra quanto maior a pontuação (em verde), melhor a chamada de base. No qual podemos observar que as amostras de Sf9 (controle e infectada) obtiveram uma boa qualidade atingindo a pontuação máxima.

Gráfico 4: Histograma de qualidade para cada amostra sequenciada exibindo o valor médio de qualidade em cada posição de base na leitura.



Legenda: Histograma de qualidade para cada sequência. O eixo Y no gráfico mostra as pontuações de qualidade. As amostras sequenciadas obtiveram uma boa pontuação (score de 40) Quanto mais próximo da cor verde, melhor é a pontuação. O eixo X mostra a posição da sequência.

Até o presente momento, outras análises transcriptômicas mais aprofundadas com os dados do *RNAseq* de Sf9 infectadas com ZIKV após 48hpi versus a mesma linhagem não exposta ao vírus estão em processamento, o que nos trará novas informações a nível de expressão de genes (*up* and *down-regulated*) e vias metabólicas ativadas ou não em resposta à infecção.

9 DISCUSSÃO

Entender o processo de infecção do vírus Zika no seu mosquito vetor é um desafio para o controle da transmissão vetorial. A primeira barreira que garante o sucesso da infecção é o encontro do vírus (interação e internalização) com suas células hospedeiras. Estas células, devem abrigar uma série de moléculas responsáveis por assegurar o ciclo completo da infecção. Os estudos voltados para entender a biologia da infecção causado pelo vírus Zika já foi amplamente estudado em células de mamíferos (CHAN., et al., 2016). No entanto, novos conhecimentos moleculares de replicação viral e de citomorfologia estrutural são necessários para o entendimento do ciclo de infecção do ZIKV em células de insetos, bem como a dinâmica que determinará o destino das partículas virais durante os passos iniciais da infecção.

Buscamos entender como funciona a dinâmica infectiva de duas linhagens de células de inseto frente ao vírus Zika. Usamos o modelo celular de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) que apresenta diferentes perfis de suscetibilidade a infecção para vários *Flavivirus*, como demonstrado no estudo conduzido por Zhang et al., (1996), no qual a célula Sf9 pode se infectar frente aos vírus DENV-1, DENV-2 e o vírus da febre amarela, no entanto, a replicação viral ocorre em níveis extremamente baixos. Em contrapartida, o vírus da encefalite de St. Louis e o vírus da encefalite japonesa podem infectar estas células de forma produtiva e persistente (ZHANG et al., 1994; KIM et al., 2004). O perfil de infecção e suscetibilidade de Sf9 para o vírus Zika nunca foi analisado. Já a linhagem celular de *Aedes albopictus* (C6/36) é suscetível à infecção pelo ZIKV sendo um modelo amplamente utilizado em estudos de infecção viral e oferece um suporte adequado para a replicação do vírus (MILLER., et al, 2018). Nessas células, os nossos dados experimentais foram coerentes e mostraram uma replicação crescente (replicação produtiva - aumento logarítmico de ≥ 2 na carga viral média) ao longo do tempo analisado. Em contraste, as células Sf9 foram menos permissivas à progressão da infecção pelo ZIKV, uma vez que não houve variações estatísticas de Cq consideráveis ao longo do ciclo. Porém o Cq inicial (24hpi) apresentado pelas células Sf9 foram semelhantes ao apresentado pelas células C636 que pode ser um indicativo de presença de ZIKV remanescente, não removido durante as lavagens celulares e que ficou fortemente ligado a superfície celular.

Para avaliar a interação ou os efeitos da exposição ZIKV/célula de inseto, investigamos o processo inicial da infecção em células Sf9 e C6/36 por microscopia eletrônica de varredura (MEV). No qual, as células foram mantidas a 4° por 15 minutos antes da adsorção e mais 15 minutos durante a adsorção viral para bloqueio da endocitose. Em nossos achados, observamos partículas esféricas semelhantes a vesículas extracelulares na membrana de ambas as linhagens celulares infectadas, e pela primeira vez, foi demonstrado o efeito da exposição do vírus Zika PE243 na superfície celular de Sf9, assim como um rearranjo acentuado no citoesqueleto das projeções de membrana. Estudos topográficos de infecção viral avaliados por MEV foram realizados para o ZIKV em células de mamíferos por Caldas et al., (2020) no qual as estruturas esféricas de superfícies foram atribuídas a partícula viral aderidas na membrana celular. O mesmo achado serviu para os vírus do sarcoma de Rous (RSV) e vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em célula Sf9 (JOHNSON et al., 2001). Assim como para o coronavírus (SARS-CoV) em célula Vero E6 (ML-NG et al., 2004). Com base nesses achados relatados na literatura, sugerimos que essas estruturas esféricas na superfície de Sf9 e C6/36 são as partículas do Vírus Zika aderidas à membrana celular, no entanto, são necessárias mais análises para afirmar se de fato essas estruturas esféricas correspondem as partículas virais ou são projeções de vesículas extracelulares em resposta a exposição pelo ZIKV.

No presente estudo, as células C6/36 (*Aedes albopictus*) foram permissivas à infecção pelo vírus Zika através dos ensaios de cinética de replicação por RT-qPCR, assim como demonstrado nos estudos de Barreto-Vieira., et al. (2017) e Caldas., et al. (2020). Apesar da permissibilidade à infecção, nestas células, devido as condições experimentais em baixa temperatura (4°C), não foi possível visualizar a presença de partículas virais na superfície celular. No entanto, alterações intracelulares puderam ser observadas nas células infectadas em relação ao controle não infectado, alterações das quais foi possível observar um aumento no número de estruturas semelhantes a autofagossomas e corpos multivesiculares, o que corrobora com estudos anteriores de Barreto-Vieira., et al. (2017) e Hamel., et al. (2015). A presença de vesículas autofagossômicas é um indicativo de autofagia, e estas podem aumentar a replicação viral, sugerindo que a maquinaria autofágica desempenha um papel favorável na replicação de alguns *Flavivirus* como demonstrado por Jackson., et al. (2015); Heaton., et al. (2011) e Sharma., et al., (2014). Autofagossomas foram

observados em células de mamíferos infectadas com ZIKV no qual a inibição da autofagia induzida por drogas (3-metiladenina) reduziu drasticamente o número de partículas virais nas células de fibroblastos infectadas (HAMEL., et al., 2015). No presente estudo, foi possível observar um aumento no tamanho e número das mitocôndrias e um aumento no número de vesículas associadas ao complexo de Golgi. Também puderam ser observados um acentuado aumento no número de perfis de retículo bem como um discreto inchaço de suas cisternas (Figura 8C-D), estas mesmas alterações também foram descritas por Offerdahl., et al. (2017); Cortese et al., (2017) e Mohd Ropidi., et al., (2020). Algumas partículas semelhantes ao vírus puderam ser observadas em compartimentos intracelulares associadas ao retículo endoplasmático.

Já a linhagem celular Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) exposta ao ZIKV-PE243 apresentou alterações ultraestruturais como aumento de estruturas semelhantes a autofagossomas, que foram mais acentuadas quando comparado com as células C6/36. Também foi possível observar um aumento na atividade exocítica (Figura 8F) com o brotamento de vesículas de tamanho variável na superfície de Sf9 (Figuras 8E-G). Embora depósitos de cálcio sejam comumente vistos em mitocôndrias de células de eucariotos (CALVO-RODRIGUEZ., et al.; WANG., et al., 2020), nas células Sf9 expostas ao ZIKV estes grânulos eram maiores e mais eletrondensos, indicando uma maior concentração de cálcio mitocondrial nestas células (Figura 8G). Células de invertebrados e vertebrados infectadas por *Flavivírus* sofrem modificações do retículo endoplasmático (RE) para formar complexos de replicação viral (HAMEL et al., 2015; MOHD ROPIDI et al., 2020). Notavelmente, no presente estudo foi possível observar um aumento de reorganização de membrana proveniente do RE na formação de corpos multivesiculares e processos autofágicos que foram expressivamente acentuados pela exposição ao vírus Zika. É importante ressaltar que as análises de MET em Sf9 foram realizadas com apenas 15 minutos de adsorção a 4°C com intuito de verificar partículas virais ligadas à membrana celular. Nesta condição de temperatura, infelizmente não conseguimos observar partículas virais na superfície celular e nem em compartimentos intracelulares em Sf9. Novas condições experimentais precisam ser testadas (Tempo de exposição e temperatura) nos próximos ensaios de infecção de Sf9 pelo ZIKV a fim de esclarecer questões de ligação e internalização viral nesta célula de inseto.

Apesar dos resultados de MEV e MET exibirem uma alteração visível decorrente da exposição do ZIKV em Sf9, não foi possível afirmar categoricamente que houve internalização viral por MET, isso pode ter sido pela condição experimental de bloqueio endocítico e a falta de uma marcação específica para o ZIKV ou pela não permissibilidade celular à invasão viral, esta última até certo ponto, corrobora com as análises de cinética de replicação por RT-qPCR, no qual as células Sf9 infectadas não exibem uma progressão do ciclo de replicação viral, no entanto, o perfil do Cq durante os *time points* de infecção permaneceu positivo, mas sem a progressão do ciclo de replicação viral, o que sugere uma possível ligação viral. Em contrapartida, as células C6/36 são permissivas a infecção e mostram uma alta taxa de replicação viral.

Ensaio por *Western blotting* foram realizados a fim de identificar bandas proteicas virais através da imunodeteção com anticorpo 4G2 a partir das células e do sobrenadante do cultivo celular. Para célula Sf9, não foi identificada nenhuma banda específica, sugerindo que não ocorre a produção da proteína do envelope viral, logo, não há replicação viral. Para a C6/36 foi possível observar uma diferença nítida no perfil de bandas, onde foi detectada a presença de uma banda entre 50-60kDa, sugerindo ser fortemente proteína do Envelope viral (~54kDa) ficando expressivamente mais acentuada a partir de 72hpi, o que corrobora com o estudo de Chan et al., (2016).

Para o RNAseq, escolhemos o tempo de 48 horas para realizar o sequenciamento em C6/36 e Sf9, uma vez que, a taxa de replicação do ZIKV na célula C6/36 acentua-se a partir deste momento. Em contrapartida, em Sf9 nesse mesmo tempo de exposição viral, a carga viral não evolui e atenua-se nos posteriores tempos analisados. A partir dessa perspectiva, o presente estudo visou comparar, em ambas linhagens celulares com seus respectivos controles, a expressão de genes diferencialmente expressos (*up* e *down*) frente a exposição viral com 48h. Os dados gerais de qualidade das sequências foram avaliados para Sf9 (Gráfico 3-4). É importante citar que as estimativas de leituras duplicadas realizadas pela ferramenta FastQC mostrou um aumento significativo de leituras repetidas em Sf9 expostas ao ZIKV quando comparada com as células controles não expostas ao ZIKV. Isso pode estar relacionado com uma alta taxa de expressão de algum tipo de molécula de mRNA estimulada pela exposição viral. No entanto, estas são análises iniciais de qualidade das sequências obtidas e novas análises estão sendo executadas. O

sequenciamento de C6/36 com 48hpi ainda não foi realizada, todavia, os dados de Sf9 exposta ao vírus Zika comparada com a célula não exposta (controle), nos trará novas informações transcriptômicas a respeito da resposta celular à exposição viral que é inédito.

A padronização de um modelo experimental eficaz *in vitro* no estudo de interação vírus/célula de inseto é crítico para o desenvolvimento de futuras pesquisas que visem o bloqueio da transmissão vetorial, assim como compreender a biologia da infecção causada por qualquer patógeno viral de importância entomológica. Nesse sentido, o presente estudo abordou alguns aspectos básicos e inéditos na literatura sobre a biologia da infecção do ZIKV, bem como a dinâmica de interação e replicação viral em células C6/36 e Sf9 analisadas comparativamente sob vários aspectos biológicos.

10 CONCLUSÕES

- a) O ciclo de replicação do vírus Zika na linhagem celular Sf9 não ocorre de forma progressiva quando comparada com a célula C6/36;
- b) A produção da proteína do Envelope viral (E) só foi possível ser identificada na célula C6/36 exposta ao vírus;
- c) Os ensaios de MEV e MET possibilitaram a visualização de alterações topográficas e ultraestruturais em ambas as linhagens celulares expostas ao ZIKV. No entanto, são necessárias mais análises para verificar uma possível internalização viral.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, E. G., CASTILLA, V., DAMONTE, E. B. Infectious dengue-1 virus entry into mosquito C6/36 cells. **Virus research**, 160 (1-2), 173–179, 2011.
- ACOSTA, E.G., CASTILLA, V., DAMONTE, E. B. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **J Gen Virol**. 89:474-484, 2008.
- ACOSTA, E. G., CASTILLA, V, DAMONTE, E. B., Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. **Cell Microbiol**, 2009.
- ALLISON, T.J., et al. Structure of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. **Nature**, [s.l.], v. 411, n. 6839, p.820-824, jun. 2001.
- BARNETT, H. The incrimination of arthropods as disease vectors. **Proc 11th Intl Congr Entomol**. 2: 341–5, 1960.
- BARRETO-VIEIRA, D. F., JÁCOME, F. C., DA SILVA, M., CALDAS, G. C., DE FILIPPIS, A., DE SEQUEIRA, P. C., DE SOUZA, E. M., ANDRADE, A. A., MANSO, P., TRINDADE, G. F., LIMA, S., & BARTH, O. M. Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. **PloS one**, 2017.
- BERTHET, N., NAKOUNÉ, E., KAMGANG, B., SELEKON, B., DESCORPS-DECLÈRE, S., GESSAIN, A., & KAZANJI, M. Caracterização molecular de três flavivírus Zika obtidos de mosquitos silvestres na República Centro-Africana. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2014.
- BOORMAN, J.P., PORTERFIELD, J.S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. **Soc Trop Med Hyg**. 50(3):238-42, 1956.
- BAKONYI, T., HUBÁLEK, Z., RUDOLF, I., & NOWOTNY, N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. **Emerging infectious diseases**, 11(2), 225–231, 2005.
- BUKREJEWSKA, M., DEREWENDA, U., RADWANSKA, M., ENGEL, D.A., DEREWENDA, Z.S. Crystal structures of the methyltransferase and helicase from the ZIKA 1947 MR766 Uganda strain. **Acta Crystallogr D Struct Biol**, 2017.
- BUCHWALTER, R. A., OGDEN, S. C., YORK, S. B., SUN, L., ZHENG, C., HAMMACK, C., CHENG, Y., CHEN, J. V., CONE, A. S., MECKES, D. G., JR, TANG, H., & MEGRAW, T. L. Coordination of Zika Virus Infection and Viroplasm Organization by Microtubules and Microtubule-Organizing Centers. **Cells**, 2021.
- BLACK, W.C. BENNETT, K.E. GORROCHÓTEGUI-ESCALANTE, N. BARILLAS-MURY, C. V. FERNÁNDEZ-SALAS, I. DE CRILL, W.D. ROEHRIG, J.T. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. **J. Virol**, 2001.
- CALDAS, L. A., AZEVEDO, R. C., DA SILVA, J. L., & DE SOUZA, W. (2020). Microscopy analysis of Zika virus morphogenesis in mammalian cells. **Scientific reports**, 2020.

CAO-LORMEAU, V.M., ROCHE, C., TEISSIER, A., et al. Vírus Zika, Polinésia Francesa, Pacífico Sul, 2013. **Emerg Infect Dis**. 1084-1086, 2014.

CARRO, S. D., & CHERRY, S. Beyond the Surface: Endocytosis of Mosquito-Borne **Flaviviruses**. **Viruses**, 2020.

CALVO-RODRIGUEZ., et al. Aumento dos níveis de cálcio mitocondrial associados à morte neuronal em um modelo de camundongo da doença de Alzheimer”. **Comunicações da natureza** vol. 11,1 2146. 1 de maio. 2020.

CI, Y., LIU, Z.Y., ZHANG, N.N., et al. Zika NS1-induced ER remodeling is essential for viral replication. **J Cell Biol**, 2020.

CORTESE, M., GOELLNER, S., ACOSTA, E. G., NEUFELDT, C. J., OLEKSIUK, O., LAMPE, M., et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. **Cell reports**, 2017.

CONSOLI, R. A., OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. [s.l.]: **Editora FIOCRUZ**, 1992.

CLETON, N., et al. Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal Of Clinical Virology**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.191-203, nov. 2012.

CRILL, W. D., & ROEHRIG, J. T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **Journal of virology**, 2001.

CORDERO-RIVERA, C. D., DE JESÚS-GONZÁLEZ, L. A., OSUNA-RAMOS, J. F., PALACIOS-RÁPALO, S., et al. The importance of viral and cellular factors on flavivirus entry. **Current Opinion in Virology**, 49, 164–175, 2021.

CHOUIN-CARNEIRO, T., VEGA-RUA, A., VAZEILLE, M., YEBAKIMA, A., GIROD, R., GOINDIN, D., et al. Suscetibilidades Diferenciais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* das Américas ao vírus Zika. **PLoS Negl Trop Dis**, 2016.

CHATEL-CHAIX, L., CORTESE, M., ROMERO-BREY, I., BENDER, S., NEUFELDT, C. J., FISCHL, W., SCATURRO, P., SCHIEBER, N., SCHWAB, Y., FISCHER, B., RUGGIERI, A., & BARTENSCHLAGER, R. Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. **Cell host & microbe**, 342–356, 2016.

DAI, L., SONG, J., LU, X., DENG, Y. Q., MUSYOKI, A. M., CHENG, H., ZHANG, Y., YUAN, Y., et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell host & microbe**, 19, 2016.

DICK, G.W.A., KITCHEN, S.F., HADDOW, A.J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.509-520, set. 1952.

DUFFY, M. R., CHEN, T. H., HANCOCK, W. T., POWERS, A. M., KOOL, J. L., LANCIOTTI, R. S., PRETRICK, M., MARFEL, M., HOLZBAUER, S., DUBRAY, C., et al Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England journal of medicine**, 360(24), 2536–2543, 2009.

EPELBOIN, Y., et al. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.1-22, 16 nov. 2017.

ELIZONDO-QUIROGA, D., et al. Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-7, 16 jan, 2018.

FAYE, O., FREIRE, C.C., IAMARINO, A., et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS Negl Trop Dis**. 2014;8(1): e2636, 2014.

FONTES-GARFIAS, C. R., SHAN, C., LUO, H., MURUATO, A. E., MEDEIROS, D., MAYS, E., XIE, X., ZOU, J., ROUNDY, C. M., WAKAMIYA, M., ROSSI, S. L., WANG, T., WEAVER, S. C., & SHI, P. Y. Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. **Cell reports**, 21(5), 1180–1190, 2017.

FU, D. W., & ZHANG, P. F. Establishment and characterization of Japanese B encephalitis virus persistent infection in the Sf9 insect cell line. **Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization**, 24(3), 225–233, 1996.

GRANT, A., PONIA, S.S., TRIPATHI, S., et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host Microbe**. 19(6):882-890, 2016.

GABRIEL, E., RAMANI, A., et al. Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. **J Cell Stem Cell**, 2017.

GUEDES, D., et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging microbes & infections** vol. 6,8 e69. 9, 2017.

HAYES, E.B. Vírus Zika fora da África. **Emerg Infect Dis**. 15 (9): 1347-1350, 2009.

HAMEL, Rodolphe et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 89, n. 17, p.8880-8896, 17 jun. 2015

HAILUN, M. et al. Identification of a Novel Rhabdovirus in *Spodoptera frugiperda* Cell Lines. **Journal Virology** vol. 88, No. 12, 2014.

HASHIMOTO, Y., MACRI, D., SRIVASTAVA, I., MCPHERSON, C., FELBERBAUM, R., POST, P., & COX, M. Complete study demonstrating the absence of rhabdovirus in a distinct Sf9 cell line. **PloS one**, 12(4), e0175633, 2017.

HACKETT, B.A., YASUNAGA, A. PANDA, D., et al. RNASEK is required for internalization of diverse acid-dependent viruses. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2015.

HEATON, N.S; RANDALL. G. Dengue vírus e autofagia. **Vírus**. 3(8):1332-41, 2011.

HUANG, Y. S., HIGGS, S., & VANLANDINGHAM, D. L. Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses. **Frontiers in microbiology**, 2019.

- IWANAGA, M., HITOTSUYAMA, T., et al. Infection study of Bombyx mori macula-like virus (BmMLV) using a BmMLV-negative cell line and an infectious cDNA clone. **Journal of virological methods**, 179(2), 316–324, 2012.
- JUNJHON, J, EDWARDS., .TJ, UTAIPAT., U., et al. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. **J Virol**, 2010.
- JACKSON, W.T., et al. Subversão da maquinaria autofagossômica celular por vírus de RNA. **PLoS Biol.** 3(5):e156, 2005.
- KETKAR, H., HERMAN, D., WANG, P. Genetic Determinants of the Re-Emergence of Arboviral Diseases. **Viruses**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.150-164, 12 fev. 2019.
- KLASSE, P.J., BRON, R., MARSH, M. Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.65-91,1998.
- KAKSONEN, M., ROUX, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2018.
- KUNO, G., CHANG, G. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives Of Virology**, [s.l.], v. 152, n. 4, p.687-696, 3 jan. 2007.
- KIM, H., LEE, S. J., PARK, J. Y., et al. Study on persistent infection of Japanese encephalitis virus Beijing-1 strain in serum-free Sf9 cell cultures. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, 42(1), 25–31, 2004.
- LANCIOTTI, R.S. et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 14, n. 8, p.1232-1239, ago. 2008.
- LANCIOTTI, R.S., LAMBERT, A.J, HOLODNIY, M., et al. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. **Emerg Infect Dis.** May;22, 2016.
- LESCAR, J., LIM, S.P & SHI, P.Y. Estrutura e função da proteína NS5 do flavivírus. **Molecular Virology and Control of Flaviviruses** 101-117, 2012.
- LINDENBACH, B.D., THIEL, H., RICE, C.M. *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. **Fields virology**. 5 th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- LINDENBACH, B. D., RICE, C. M., Molecular Biology of Flaviviruses, In: **Advances in Virus Research**, Elsevier, v. 59, 2003.
- LIU. H., CHIOU. S-S., CHEN W-j. Differential binding efficiency between the envelope protein of Japanese encephalitis virus variants and heparan sulfate on the cell surface. **J Med Virol**, 2004.
- LIU, Z. Y., SHI, W. F., & QIN., C. F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. **Nature reviews. Microbiology**, 17(3), 131–139, 2019.
- LI, Y., BASAVAPPA, M., LU, J., DONG, S., CRONKITE, D. A., PRIOR, J. T., et al. Induction and suppression of antiviral RNA interference by influenza A virus in mammalian cells. **Nature microbiology**, 2016.

- LI, L., LOK., S.-M., YU, I., M. ZHANG, Y., KUHN, R.J., CHEN, J., ROSSMANN, M.G. The *Flavivirus* Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. **Science**, 2008.
- LI, T. C., SCOTTI, P. D., MIYAMURA, T., & TAKEDA, N. Latent infection of a new alphavirus in an insect cell line. **Journal of virology**, 81(20), 10890–10896, 2007.
- LIU, S., DELALIO, L. J., ISAKSON, B. E., & WANG, T. T. AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. **Circulation research**, 2016.
- LOPES, N., NOZAWA, C., LINHARES, R. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde**. vol.5, n.3, pp.55-64, 2014.
- MACKENZIE, J. M.; WESTAWAY, E.G. Assembly and Maturation of the Flavivirus Kunjin Virus Appear to Occur in the Rough Endoplasmic Reticulum and along the Secretory Pathway, Respectively. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 75, n. 22, p.10787-10799, 15 nov. 2001.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., BROCK, T.D. **Brock Biology of Microorganisms**. 13th edition. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2010.
- MARTHIENS, V., RUJANO, M.A., et al. Centrosome amplification causes microcephaly. *Nat Cell Biol*, 2013.
- MIORIN, L., MAESTRE, A. M., FERNANDEZ-SESMA, A., & GARCÍA-SASTRE, A. Antagonism of type I interferon by flaviviruses. **Biochemical and biophysical research communications**, 492(4), 587–596, 2017.
- MILLER, J. R., KOREN, S., DILLEY, K. A., PURI, V., BROWN, D. M., HARKINS, D. M., et al. Analysis of the *Aedes albopictus* C6/36 genome provides insight into cell line utility for viral propagation. **GigaScience**, 2018.
- MODIS, Y. et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 12, p.6986-6991, 2003.
- MCMILLAN, J.R., ARMSTRONG, P.M., ANDREADIS, T.G. Padrões de composição da comunidade de mosquitos e arbovírus e índices ecológicos de risco de arbovírus no nordeste dos Estados Unidos. **PLoS Negl Trop Dis**, 2020.
- MANSON, P. texts On the development of *Filaria sanguinis hominis*, and on the mosquito considered as a nurse. **Zool. J. Linn. Soc.** 14, 304–311, 1878.
- MARQUES, R.E., GUABIRABA, R., et al. Dengue virus requires the CC-chemokine receptor CCR5 for replication and infection development. **Immunology**. 145:583-596, 2015.
- MEERTENS, L., CARNEC. X., LECOIN, M.P., et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. **Cell Host Microbe**, 2012.
- MOSSO, C., et al. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. **Virology**. 378:193-199, 2008.

- MOHD-ROPIDI, M.I., KHAZALI, A.S., et al. Endoplasmic reticulum: a focal point of Zika virus infection. **J Biomed Sci**, 2020.
- MILLER, J.L., et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog**, 2008.
- MUSSO, D., GUBLER, D.J. Vírus Zika. **ASM Journals**, Vol.29, No. 3, 2016.
- MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R. J., & ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, 3(1), 13–22, 2005.
- OFFERDAHL, D. K., DORWARD, D. W., HANSEN, B. T., & BLOOM, M. E. A three-dimensional comparison of tick-borne flavivirus infection in mammalian and tick cell lines. **PloS one**, 7(10), e47912, 2012.
- OFFERDAHL, D. K., et al. Citoarquitetura da infecção pelo vírus Zika em linhas celulares de neuroblastoma humano e *Aedes albopictus*. **Virologia**. 501, 2017.
- OLIVEIRA, L.G., PERON, J.P. Viral receptors for flaviviruses: not only gatekeepers. **J Leukoc Biol**. 106:695-701, 2019.
- PAUL, D., BARTENSCHLAGER, R. Arquitetura e biogênese de fábricas de replicação de vírus de RNA de fita positiva. **Mundo J. Virol**, 2013.
- PORRETTA, D., et al. Glacial History of a Modern Invader: Phylogeography and Species Distribution Modelling of the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 9, p.1-9, 2012.
- PIERSON, T.C., DIAMOND, M.S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nat Mic. Nat Microbiol** 5, 796–812, 2020.
- PENG, T., WANG, J.L., CHEN, W., ZHANG, J.L., et al. Entry of dengue virus serotype 2 into ECV304 cells depends on clathrin-dependent endocytosis, but not on caveola-dependent endocytosis **Canadian journal of microbiology**, 2009.
- PERREIRA, J. M., AKER, A.M., SAVIDIS, G., et al. RNASEK is a V-ATPase-associated factor required for endocytosis and the replication of rhinovirus, influenza A virus, and dengue virus. **Cell Rep**, 2015.
- RAJAH, M.M., MONEL, B., SCHWARTZ, O. The entanglement between flaviviruses and ER-shaping proteins. **PLoS Pathog**, 2020.
- HAMEL, R., et al. Biologia da infecção pelo vírus Zika em células da pele humana. **J Virol**. 89(17):8880-96, set. 2015.
- REY, F., STIASNY, K., HEINZ, F. X. Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. **Current Opinion in Virology**, [s.l.], v. 24, p.132-139, jun. 2017.
- RODRÍGUEZ-RUANO, S. M., JUHAŇÁKOVÁ, E., VÁVRA, J., & NOVÁKOVÁ, E. Methodological Insight Into Mosquito Microbiome Studies. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 10, 86, 2020.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A., VAN DER SCHAAR, H. M., DA SILVA VOORHAM, J. M., van der Ende-Metselaar, H., LEI, H. Y., WILSCHUT, J., & SMIT, J. M. Immature dengue virus: a veiled pathogen? **PLoS pathogens**, 2010.

ROTT, R., et al. Influenza Viruses, Cell Enzymes, and Pathogenicity. **American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 152, n. 42, p.16-19, out. 1995.

ROMERO-BREY, I., BARTENSCHLAGER, R. Endoplasmic Reticulum: The Favorite Intracellular Niche for Viral Replication and Assembly. **Viruses**, 2016.

REY, Félix; STIASNY, Karin; HEINZ, Franz X. Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. **Current Opinion In Virology**, [s.l.], v. 24, p.132-139, jun. 2017.

SHARMA, V., SHARMA, M., et al. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Canadian Journal of Microbiology**. **66**(2): 87-98, 2020.

SHARMA, M; BHATTACHARYYA, S., et al. A replicação do vírus da encefalite japonesa é regulada negativamente pela autofagia e ocorre em membranas contendo LC3-I e EDEM1. **Autofagia**, 2014.

SIROHI, D., CHEN, Z., SUN, L., et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**. 352(6284):467-470, 2016.

SINGH, K.R.P. Cell cultures derived from *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.) larvae. **Curr Sci**, 1967.

SEMPALA, S. Dinâmica populacional sazonal dos estágios imaturos de *Aedes africanus* (Theobald) (Diptera: Culicidae) na floresta de Zika, Uganda. **Bulletin of Entomological Research**, 73 (1), 11-18, 1983.

SENIGL, F. GRUBHOFFER, L. KOPECKY, J. Differences in Maturation of Tick-Borne Encephalitis Virus in Mammalian and Tick Cell Line, 2006.

SMITH, D.R. An update on mosquito cell expressed dengue virus receptor proteins. **Insect Mol. Biol.** 21, 1–7, 2012.

SHARMA. M., et al. Japanese encephalitis virus replication is negatively regulated by autophagy and occurs on LC3-I- and EDEM1-containing membranes. **Autophagy**, 2014.

SHIINA, T., ARAI, K., TANABE, S., et al. Clathrin box in G protein-coupled receptor kinase 2. **J Biol Chem**, 2001.

TAN, C.W., et al. Polysulfonate suramin inhibits Zika virus infection. **Antiviral Res**, 2017.

USHIJIMA, Y., ABE, H., NGUEMA ONDO, G., BIKANGUI, R., MASSINGA LOEMBÉ, M., ZADEH, VR, ESSIMENGANE, J., MBOUNA, A., BACHE, EB, AGNANDJI, ST, LELL, B., & YASUDA, J. Vigilância dos principais arbovírus patogênicos de interesse para a saúde pública no Gabão, África Central: aumento do risco de infecções pelo vírus do Nilo Ocidental e dengue. **Doenças infecciosas de BMC**, 21 (1), 265, 2021.

VASCONCELOS, H., NUNES, M.R., CASSEB, L., CARVALHO, V., et al. Epidemiologia molecular do vírus Oropouche, Brasil. **Doenças infecciosas emergentes**, 17 (5), 800–806, 2011.

- VAN DER SCHAAR, H. M., RUST, M. J., CHEN, C., VAN DER ENDE-METSELAAR, H., WILSCHUT, J., ZHUANG, X., & SMIT, J. M. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. **PLoS pathogens**, 2008.
- VAUGHN, J.L., GOODWIN, R.H., TOMPKINS, G.J., & MCCAWLEY, P. O estabelecimento de duas linhagens celulares do inseto *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). **In vitro**, 13 (4), 213–217, 1977.
- WANG, KIM, SO; LI, BING; LINHARDT, R. Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.44-68, 2017.
- WANG, S., ZHANG, Q., et al. Integrin $\alpha\beta 5$ Internalizes Zika Virus during Neural Stem Cells Infection and Provides a Promising Target for Antiviral Therapy. **Cell Rep**, 2020.
- WALKER, T., JEFFRIES, C. L., MANSFIELD, K. L., & JOHNSON, N. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. **Parasites & vectors**, 7, 382, 2014.
- WANG, P., et al. “The Role of Mitochondria in Vascular Calcification. **Journal of translational internal medicine** vol. 8,2 80-90. 30 Jun.2020.
- WESTAWAY, E. G., BRINTON, M, A., GAIDAMOVICH, S., et al. Flaviviridae. **Intervirolgy**. 24:183-192, 1985.
- WELSCH, S. MILLER, S. et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. **Cell Host & Microbe**. 5:365–375, 2009.
- WEAVER, S.C., BARRETT A.D. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nat Rev Microbiol**. Oct;2(10):789-801, 2014.
- WHELAN, J.N., PARENTI, N. A., HATTERSCHIDE, J., et al. Zika virus employs the host antiviral RNase L protein to support replication factory assembly. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2021.
- WEN, F., ARMSTRONG, N., et al. Zika virus increases mind bomb 1 levels, causing degradation of pericentriolar material 1 (PCM1) and dispersion of PCM1-containing granules from the centrosome. **The Journal of biological chemistry**, 2019.
- YOON, K.J., SONG, G., QIAN, X., et al. A NS2A codificada pelo vírus Zika interrompe a neurogênese cortical de mamíferos por meio da degradação das proteínas de junção de Adherens. **Cell Stem Cell**, 2017.
- ZAKARIA, M. K., CARLETTI. T., MARCELLO. A. Cellular Targets for the Treatment of Flavivirus Infections. **Front Cell Infect Microbiol**, Nov 12;8:398, 2018.
- ZHANG, P. F., KLUTCH, M., MULLER, J., & MARCUS-SEKURA, C. J. St Louis encephalitis virus establishes a productive, cytopathic and persistent infection of Sf9 cells. **The Journal of general virology**, 74 (Pt 8), 1703–1708, 1996.
- ZHANG, P. F., KLUTCH, M., MULLER, J., & MARCUS-SEKURA, C. J. Susceptibility of the Sf9 insect cell line to infection with adventitious viruses. **Biologicals. Journal of the International Association of Biological Standardization**, 1994.

ZHANG, Z., LI, Y., LOH, Y.R., et al. Crystal structure of unlinked NS2B-NS3 protease from Zika virus. **Science**, 2016.

ZHANG, Z. W., LI, Z., YUAN, S. The Role of Secretory Autophagy in Zika Virus Transfer through the Placental Barrier. **Front Cell Infect Microbiol.** 2016.