



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

LUCILENE WILDNER GRANELLA

**Efeitos da alternância de hospedeiros no fitness do *Zika virus***

FLORIANÓPOLIS

2024

Lucilene Wildner Granella

**Efeitos da alternância de hospedeiros no *fitness* do *Zika virus***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel S. Mansur  
Coorientador: Prof. Dr. José Henrique M. C. Oliveira

Florianópolis

2024

Granella, Lucilene Wildner

Efeitos da alternância de hospedeiros no fitness do Zika virus / Lucilene Wildner Granella ; orientador, Daniel Santos Mansur, coorientador, José Henrique M. C. Oliveira, 2024.

116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Zika virus. 3. quasispécies. 4. seleção viral. 5. Aedes aegypti. I. Mansur, Daniel SantosOliveira, José Henrique M. C. . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Lucilene Wildner Granella

Efeitos da alternância de hospedeiros no *fitness* do *Zika virus*

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 16 de julho de 2024,  
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Daisy Maria Strottmann, Dr.(a)

ICC/ Fiocruz-PR

Prof. Roenick Proveti Olmo, Dr.

Institute of Molecular and Cell Biology, Strasbourg, France

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado  
adequado para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Daniel Santos Mansur, Dr.

Orientador

---

Prof. José Henrique M. C. de Oliveira, Dr.

Coorientador

Florianópolis, 2024.

Dedico este trabalho a minha mãe, irmão e marido por  
serem meus alicerces.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Santos Mansur, por ter aceitado o desafio de continuar me orientando durante o doutorado. Obrigada pelos incentivos, pela confiança, pelos conselhos, pela dedicação e, sobretudo, por todos os ensinamentos profissionais e condução deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Henrique M. C. Oliveira. Obrigada pelas conversas, desabafos, risadas, jantares, bares, discussões científicas e incentivo à ciência.

Aos Profs. Dr. André Báfica e Dr. Edroaldo Lummertz pelas discussões científicas.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Daisy Maria Strottmann, Dr. Roenick Proveti Olmo, Dr. Alfeu Zanotto Filho, Dr. Juliano Ferreira e Dr. Daniel Ferreira de Lima Neto, o meu muito obrigada pela leitura e colaboração para a finalização desse trabalho.

À minha mãe que sempre me ensinou a lutar pelos meus sonhos e nunca desistir mesmo que parecesse impossível. Mãe, obrigada por ser a melhor mãe do mundo, sem você eu nunca teria chegado até aqui. Se sou o que sou hoje, eu devo tudo a você. Te amo!

Ao meu irmão por todo apoio e companheirismo.

Ao meu colega, amigo e agora esposo, Dr. Daniel de Oliveira Patricio, vulgo "Filho". Obrigada pela ajuda discussões científicas, por ter sido meu mentor nos primeiros meses no laboratório, por ter me ensinando tanto, por ser tão paciente comigo e por ser tão maravilhoso. Nossa história começou um tanto quanto confusa naquele curso de inverno, mas como diz minha filosofia de vida: *"Everything happens for a reason, even if you do not know the reason now, you will soon enough, just give it some time"*. Nossa convivência, amizade e companheirismo só confirmaram o que eu senti no primeiro momento que te vi e como me sinto bem ao seu lado. Não tenho palavras suficientes para agradecer o quão especial você é na minha vida. Te amo!

Um obrigada especial à minha melhor amiga e colega de bancada, Dra. Mariana Maraschin, pelo apoio incondicional durante esses anos. Quem diria que aquelas conversas de WhatsApp no início da pandemia renderiam uma amizade tão linda e verdadeira, uma amizade tipo irmã. Obrigada pela ajuda nos experimentos,

companhia, risadas, por me tranquilizar em vários momentos difíceis e por ter me ensinado a trabalhar com mosquitos. Serei eternamente grata a você, Mah!

Obrigada também à Msc. Luiza Hubner, que chegou de mansinho com seus lindos olhos claros e cabelos loiros e se tornou superimportante. Agradeço muito a você e à Mah por todas as nossas conversas aleatórias ou científicas, pela companhia até tarde no laboratório, pelas pizzas e noites de bar. Sem o suporte de vocês esse trabalho não teria sido o mesmo. E não esqueçam, quero tomar um cafezinho com vocês em Paris!

A todos os integrantes do "Lab Zé" e do LiDI de 2018 até os dias atuais pelas conversas de corredor, churrascos, festas juninas, bolos, brincadeiras, bares, ensinamentos, discussões científicas e por todo o apoio que recebi de vocês. Muito obrigada por fazerem os meus dias mais alegres e por incentivarem meu crescimento pessoal e profissional.

Obrigada a todos os doadores de sangue e para todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço também a todos os meus amigos e colegas que de uma forma ou de outra estiveram presentes na minha vida e rotina durante o período de doutoramento. Muito obrigada pelas conversas, festas, bebedeiras e todos os momentos de distração, sem vocês minha vida em Florianópolis não seria a mesma.

Ao LAMEB pela disponibilização de equipamentos.

Agradeço também às agências de fomento CAPES, CNPq, Serrapilheira, INCTEM e Finep, à UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia por viabilizarem meu doutorado.

Por fim, expresso minha profunda gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha jornada acadêmica. Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental nesta etapa tão importante da minha vida.

*“Nothing in Biology makes sense, except in the light of evolution.”*  
Theodosius Dobzhansky.

## RESUMO

O *Zika virus* (ZIKV) é responsável por surtos significativos, incluindo uma epidemia em 2015 que resultou em graves problemas de saúde pública, como a Síndrome Congênita do Zika e a Síndrome de Guillain-Barré. Atualmente não existem vacinas preventivas ou tratamento específico disponível. O ZIKV é um vírus de RNA transmitido majoritariamente por mosquitos *Aedes aegypti*. A alternância entre hospedeiro humano e mosquito impõe pressões seletivas distintas que podem influenciar a evolução e o fitness viral. Portanto, compreender como os vírus se adaptam a essa transição é fundamental para entender sua emergência, diversidade e potencial epidêmico. Considerando a importância da alternância de hospedeiros, este estudo investigou seus efeitos no fitness viral do ZIKV e o impacto de RIG-I nesses processos. A hipótese testada foi que RIG-I restringe a diversificação do ZIKV durante essa alternância. Para isso, foi realizado um protocolo de seleção viral, alternando passagens do ZIKV entre células humanas (A549 WT e RIGI<sup>-/-</sup>) e de mosquito (C6/36) por 10 ciclos. Para as análises fenotípicas (fitness viral) e genotípicas (sequenciamento genômico), foram selecionadas as cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas passagens P4, P6 e P10. As análises fenotípicas foram feitas em diferentes linhagens celulares e em mosquitos *Ae. aegypti*. Nossos resultados demonstraram que a alternância de hospedeiros favorece o fitness do ZIKV, independentemente de RIG-I. No entanto, RIG-I parece restringir a diversificação do ZIKV. A cepa ZIKV-R2 exibiu títulos virais menores nas primeiras passagens, afetando o fitness viral em diferentes células e aumentando a prevalência da infecção em mosquitos *Ae. aegypti*. O sequenciamento genômico revelou mutações específicas, incluindo uma na porção C-terminal da proteína NS3, nas passagens P4 e P6 da cepa ZIKV-R2, que podem explicar as alterações observadas. Em suma, esses achados fornecem conhecimentos importantes sobre a evolução e emergência do ZIKV, podendo orientar estratégias mais eficazes de vigilância e controle viral. Este estudo contribui para uma melhor compreensão dos mecanismos de adaptação do ZIKV à alternância de hospedeiros, um aspecto crucial para prever e mitigar futuros surtos.

**Palavras-chave:** seleção viral, mutações, *Aedes aegypti*, fitness, Zika virus.

## ABSTRACT

*Zika virus* (ZIKV) is responsible for significant outbreaks, including an epidemic in 2015 that resulted in severe public health problems, such as Congenital Zika Syndrome and Guillain-Barré Syndrome. Currently, there are no preventive vaccines or specific treatments available. ZIKV is an RNA virus transmitted primarily by *Aedes aegypti* mosquitoes. The alternation between human host and mosquito imposes distinct selective pressures that can influence viral evolution and fitness. Therefore, understanding how viruses adapt to this transition is crucial for comprehending their emergence, diversity, and epidemic potential. Considering the importance of host alternation, this study investigated its effects on ZIKV viral fitness and the impact of RIG-I on these processes. The hypothesis tested was that RIG-I restricts ZIKV diversification during this alternation. To this end, a viral selection protocol was carried out, alternating ZIKV passages between human cells (A549 WT and RIGI<sup>-/-</sup>) and mosquito cells (C6/36) for 10 cycles. For phenotypic (viral fitness) and genotypic (genomic sequencing) analyses, ZIKV-R1 and ZIKV-R2 strains were selected at passages P4, P6, and P10. Phenotypic analyses were performed in different cell lines and in *Ae. aegypti* mosquitoes. Our results demonstrated that host alternation favors ZIKV fitness, regardless of RIG-I. However, RIG-I appears to restrict ZIKV diversification. The ZIKV-R2 strain exhibited lower viral titers in the early passages, affecting viral fitness in different cells and increasing the prevalence of infection in *Ae. aegypti* mosquitoes. Genomic sequencing revealed specific mutations, including one in the C-terminal portion of the NS3 protein, in passages P4 and P6 of the ZIKV-R2 strain, which may explain the observed changes. These findings provide an important understanding of ZIKV evolution and emergence, potentially guiding more effective viral surveillance and control strategies. This study contributes to a better understanding of ZIKV adaptation mechanisms to host alternation, a crucial aspect for predicting and mitigating future outbreaks.

**Keywords:** viral selection, mutations, *Aedes aegypti*, fitness, Zika virus.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do mosquito <i>Ae. aegypti</i> .....	23
Figura 2. Principais vias de sinalização antiviral de mosquitos. ....	24
Figura 3. Organização genômica e estrutura do ZIKV. ....	27
Figura 4. Replicação do ZIKV.....	32
Figura 5. Vias ativadas por receptores de RNA e por IFN-I/III. ....	34
Figura 6. Descrição esquemática de uma população de quasispécie viral. ....	37
Figura 7. Esquema representativo do protocolo de seleção de ZIKV durante múltiplas passagens em cultura celular.....	45
Figura 8. Estratégias para análise do espalhamento viral.....	51
Figura 9. Curva de replicação viral de ZIKV e viabilidade celular em células C6/36. ....	54
Figura 10. Curva de replicação viral de ZIKV e viabilidade celular em células A549 WT. ....	55
Figura 11. Expressão de IFNs e replicação viral em células A549 WT e RIGI <sup>-/-</sup> infectadas com ZIKV. ....	56
Figura 12. A alternância de hospedeiros aumenta os títulos virais de ZIKV independentemente de RIG-I. ....	59
Figura 13. Comparação dos títulos virais das cepas selecionadas em células A549 WT e ZIKV-R1 e ZIKV-R2.....	60
Figura 14. A alternância de hospedeiros não afeta o espalhamento viral das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2.....	63
Figura 15. A infecção pela cepa ZIKV-R2 em células A549 WT induz maior expressão de RNA intracelular e ativação da resposta imune antiviral. ....	65
Figura 16. A infecção pela cepa ZIKV-R2 em células HFF induz maior expressão de RNA intracelular e ativação da resposta imune antiviral. ....	67
Figura 17. A alternância de hospedeiros aumenta a prevalência de infecção da cepa ZIKV-R2 em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> . ....	69
Figura 18. A alternância de hospedeiros induz mutações pontuais nas cepas de ZIKV selecionadas. ....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Volume e densidade de células utilizadas nos experimentos para que obtenham uma confluência de 70 – 80%.	42
Tabela 2. Iniciadores utilizados na reação de qPCR.	49
Tabela 3. Células usadas neste trabalho	107
Tabela 4. Reagentes utilizados neste trabalho.	107
Tabela 5. Anticorpos usados neste trabalho	108
Tabela 6. Pool 1 de iniciadores utilizados na reação de PCR multiplex	110
Tabela 7. Pool 2 de iniciadores utilizados na reação de PCR multiplex	111
Tabela 8. Dados brutos do título viral e MOI obtidos nas passagens em células A549.	112
Tabela 9. Dados brutos do título viral e MOI obtidos nas passagens em células C6/36.	113
Tabela 10. Estatísticas do mapeamento dos reads das cepas sequenciadas.	114
Tabela 11. Substituições de nt e aa na ORF das cepas de ZIKV selecionados e sequenciados por Illumina.	115

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\lambda$	Lambda
>	Maior que
<	Menor que
“	Segundos
°C	Graus centígrados
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
4G2	Anticorpo monoclonal (IgG) para marcação específica da proteína E de flavivirus
aa	Aminoácidos
AMP	Peptídeo antimicrobiano
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Proteína de capsídeo de flavivirus
cDNA	DNA complementar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
C-terminal	Carboxi-terminal
DENV	Dengue virus
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
dsRNA	fita dupla de RNA
E	Proteína de envelope de flavivirus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
hpi	Horas pós infecção
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de Interferon alfa/beta
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ISG	Gene estimulado por interferon
kDa	Kilodalton
L-15	Meio Leibovitz
M	Proteína de membrana de flavivirus
min	minutos

mL	mililitro
Mock	Células não infectadas
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
Mtase	Metiltransferase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N/R	Vermelho neutro
NS	Proteínas não estruturais
nt	Nucleotídeo
N-terminal	Amino-terminal
NTPase	Nucleosídeo trifosfatase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase aberta de leitura
PBS	Tampão fosfato-salino
P/S	Penicilina/Estreptomicina
PE	Proteínas estruturais
PFA	Paraformaldeído
PFU	Unidade formadora de placa
prM	Proteína precursora de membrana
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RBC	Células vermelhas do sangue
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RE	Retículo endoplasmático
RIG-I	Gene induzível por ácido retinoico I
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RTPase	RNA 5' trifosfatase
SBN	Sobrenadante
SCZ	Síndrome Congênita do Zika vírus
SEM	Erro padrão da média
SFB	Soro fetal bovino
sfRNA	RNA subgenômico
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
siRNA	Pequeno RNA de interferência
SL	Stem-loop
ssRNA	Fita simples de RNA
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TA	Temperatura ambiente

TAM	Constituinte da família de receptores tirosina quinase
TIM	Constituinte da família de receptores da fosfatidilserina
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
UTR	Região não traduzida
VLP	Partícula semelhante a vírus
VSV	Vesicular stomatitis virus
WNV	West Nile virus
YFV	Yellow fever virus
ZIKV	Zika virus

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1	HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA DO ZIKV .....	18
1.2	PATOGÊNESE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO ZIKV .....	19
<b>1.2.1</b>	<b>Tratamento atual e perspectivas</b> .....	<b>20</b>
1.3	MOSQUITOS <i>AE. AEGYPTI</i> .....	20
<b>1.3.1</b>	<b>Barreiras e disseminação viral nos mosquitos</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Sistema imune dos mosquitos</b> .....	<b>23</b>
1.4	BIOLOGIA E GENÔMICA DO ZIKV .....	26
<b>1.4.1</b>	<b>Estrutura e organização genômica do ZIKV</b> .....	<b>26</b>
1.4.1.1	Proteínas estruturais .....	28
1.4.1.2	Proteínas não estruturais .....	29
<b>1.4.2</b>	<b>Replicação viral</b> .....	<b>31</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Resposta imune antiviral inata</b> .....	<b>33</b>
1.5	EVOLUÇÃO E ADAPTAÇÃO DO ZIKV .....	36
<b>1.5.1</b>	<b>Quasispécies virais</b> .....	<b>36</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Fitness viral</b> .....	<b>38</b>
<b>1.5.3</b>	<b>Pressões seletivas em diferentes hospedeiros</b> .....	<b>38</b>
1.6	JUSTIFICATIVA .....	40
1.7	HIPÓTESE .....	41
1.8	OBJETIVOS .....	41
<b>1.8.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>41</b>
<b>1.8.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>41</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
2.1	CULTIVO CELULAR .....	42
2.2	CRIAÇÃO DE MOSQUITOS <i>AE. AEGYPTI</i> .....	43
2.3	INFECÇÃO VIRAL EM CÉLULAS .....	43
<b>2.3.1</b>	<b>Preparação do vírus estoque</b> .....	<b>43</b>
2.4	ENSAIO DE PLACA DE LISE .....	44
2.5	PROTOCOLO DE SELEÇÃO DE ZIKV DURANTE MÚLTIPLAS PASSAGENS EM CULTURA CELULAR .....	44
2.6	INFECÇÃO VIRAL EM MOSQUITOS <i>AE. AEGYPTI</i> .....	45
<b>2.6.1</b>	<b>Curva de sobrevivência de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> infectados</b> .....	<b>46</b>

2.6.2	Quantificação viral dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	46
2.7	ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	47
2.7.1	Ensaio de MTT .....	47
2.7.2	Ensaio de Vermelho neutro (N/R).....	48
2.8	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA .....	48
2.8.1	Extração de RNA e síntese de cDNA (RT-PCR).....	48
2.8.2	PCR em Tempo Real (qPCR) .....	49
2.9	IMUNOFLOUORESCÊNCIA .....	50
2.10	SEQUENCIAMENTO.....	51
2.11	ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	52
3	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
3.1	PADRONIZAÇÃO DOS MODELOS DE INFECÇÃO DE ZIKV EM CÉLULAS C6/36 E A549. ....	54
3.2	A ALTERNÂNCIA DE HOSPEDEIROS AUMENTA OS TÍTULOS VIRAIS DO ZIKV INDEPENDENTEMENTE DE RIG-I. ....	57
3.3	A ALTERNÂNCIA DE HOSPEDEIROS NÃO AFETA O ESPALHAMENTO VIRAL DAS CEPAS ZIKV-R1 E ZIKV-R2.....	61
3.4	AS PASSAGENS INICIAIS DA CEPA ZIKV-R2 AUMENTAM A QUANTIDADE DE RNA INTRACELULAR E A EXPRESSÃO DE IFNS E ISGS EM CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES. ....	64
3.5	A ALTERNÂNCIA DE HOSPEDEIROS AUMENTA A PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO DA CEPA ZIKV-R2 EM MOSQUITOS <i>AE. AEGYPTI</i> .....	68
3.6	A ALTERNÂNCIA DE HOSPEDEIROS INDUZ MUTAÇÕES PONTUAIS NAS CEPAS DE ZIKV SELECIONADAS. ....	70
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>73</b>
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>85</b>
6	<b>DESAFIOS PARA A REALIZAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO</b> .....	<b>86</b>
7	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>88</b>
	<b>APÊNDICE A – Lista de Reagentes utilizados</b> .....	<b>107</b>
	<b>APÊNDICE B – Lista de Soluções utilizadas</b> .....	<b>109</b>

<b>APÊNDICE C – Iniciadores para a preparação dos pools otimizados para o sequenciamento do ZIKV.....</b>	<b>110</b>
<b>APÊNDICE D – Títulos virais e valores de MOI utilizadas em cada passagem em células A549 WT e RIGI<sup>-/-</sup> do processo de seleção viral.....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICE E – Títulos virais e valores de MOI utilizadas em cada passagem em células C6/36 do processo de seleção viral.....</b>	<b>113</b>
<b>APÊNDICE F – Estatísticas do mapeamento dos reads das cepas sequenciadas.....</b>	<b>114</b>
<b>APÊNDICE G – Substituições de nucleotídeos e aminoácidos das amostras sequenciadas neste estudo comparadas com a amostra de referência Zika vírus isolate 16288, complete genome GenBank: MF073357.1.....</b>	<b>115</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA DO ZIKV

O ZIKV (*Zika vírus*) é assim chamado, pois foi detectado pela primeira vez no soro de um macaco rhesus na Floresta Zika em Uganda em 1947 e depois em homogenatos de mosquitos *Aedes africanus* em 1948 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Por muitos anos, o ZIKV não causou doença grave em humanos e estava restrito à África e Ásia. No entanto, em 2007, esse vírus foi responsável por uma epidemia nas ilhas Yap, no Pacífico, seguido por outra na Polinésia Francesa em 2013–14 e subsequente disseminação pela Oceania (CAO-LORMEAU et al., 2014; LANCIOTTI et al., 2008). Em 2015 o ZIKV foi detectado em pacientes humanos no Brasil, causando graves problemas para a saúde pública (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; ZANLUCA et al., 2015).

Em 2016, a rápida disseminação do vírus e sua presença global levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar a epidemia do ZIKV como uma emergência de saúde pública e de preocupação internacional (WHO, 2016). O Brasil teve a maior epidemia descrita até o momento. Embora o número de casos tenha diminuído após 2016, o vírus continua se espalhando em regiões onde os mosquitos transmissores estão presentes (PAHO/WHO, 2023). Por exemplo, até a 21ª semana epidemiológica (25/05/2024) já foram confirmados 8.464 casos de infecção por ZIKV no Brasil (PAHO; WHO, 2024).

Análises filogenéticas do genoma viral revelaram que todas as linhagens do ZIKV emergiram em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952), mas foram introduzidas de forma independente em diferentes regiões do Continente Africano e Asiático (WEAVER et al., 2016; YOKOYAMA; STARMER, 2017). Isso permitiu a divisão em duas linhagens principais, a Africana, representada pela cepa viral MR766 isolada na África Ocidental em 1947; e Asiática/Americana, representada pela cepa viral P6740 isolada da Malásia em 1966 (WEAVER et al., 2016). A irradiação da cepa Asiática para o Ocidente, fez com que esta sofresse uma adaptação natural ao novo ambiente, possibilitando o aparecimento da linhagem Americana e, dentro desta, o surgimento de alguns subgrupos como as cepas brasileiras (SHARMA et al., 2019; WEAVER et al., 2016).

## 1.2 PATOGÊNESE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO ZIKV

O ZIKV pode ser transmitido por via sexual, perinatal, pós-transfusional e exposição ocupacional, o que pode ter contribuído para a rápida dispersão viral (DECKARD et al., 2016; FOY et al., 2011; GREGORY et al., 2017; VENTURI et al., 2016). Entretanto, por ser um arbovírus (transmitido por artrópodes), é majoritariamente transmitido pela forma vetorial, através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* sp. infectados (RATHER et al., 2017).

As manifestações clínicas geradas pelo ZIKV geralmente são leves e duram de 2 a 7 dias. Os sintomas incluem febre, erupções cutâneas, conjuntivite, dores musculares e articulares, mal-estar e dor de cabeça (WHO, 2022). Por isso, no Brasil, inicialmente foi notificada como uma “Síndrome semelhante à Dengue” devido à semelhança com os sintomas característicos da dengue (BARJAS-CASTRO et al., 2016; ZANLUCA et al., 2015).

O prognóstico é quase sempre benigno, não determinando a hospitalização, o que leva à subnotificação da doença na população e pode resultar em complicações graves (PETERSEN et al., 2016; PETTERSSON et al., 2018; ZANLUCA et al., 2015). Em casos mais graves pode ocorrer complicações neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré (SGB), em adultos, e Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ), em neonatos (MLAKAR et al., 2016; OEHLER et al., 2014).

A SCZ em neonatos é uma manifestação grave que, durante o surto no Brasil, provocou um grande impacto na saúde pública (POSSAS, 2016). Ela é caracterizada pela microcefalia e outras anomalias no sistema nervoso central, alterações oculares e auditivas, calcificações cerebrais e insuficiência placentária com restrição do crescimento fetal (COSTELLO et al., 2016; VENTURI et al., 2016; ZANLUCA et al., 2015). A SGB em adultos é outra manifestação clínica grave causada pelo ZIKV. (PETERSEN et al., 2016), que inicia a partir do sexto dia pós-infecção com formigamento nos membros inferiores e fraqueza muscular, podendo progredir para falência respiratória (KRAUER et al., 2017; MUSSO et al., 2015; WEAVER et al., 2016).

O diagnóstico é realizado através de métodos sorológicos e moleculares, no entanto, ele pode não ser específico (FAYE et al., 2008), uma vez que pode haver reatividade cruzada com outros Flavivírus, como o DENV e YFV (JAVED et al., 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; PETERSEN et al., 2016).

### 1.2.1 Tratamento atual e perspectivas

Atualmente, não há terapia antiviral aprovada ou vacina preventiva disponível para uso clínico contra ZIKV (HOWARD-JONES et al., 2023; MUSSO; KO; BAUD, 2019). Entretanto, existem várias candidatas em diferentes estágios de pesquisa pré-clínica e clínica, sendo desenvolvidas com diferentes tecnologias: DNA, mRNA, partículas semelhantes a vírus, vírus vivos atenuados, vírus inativados e vetores virais (PENG et al., 2024). Dentre elas, destaca-se a vacina de vírus inativado desenvolvida pelo Instituto Butantan, que demonstrou capacidade de induzir anticorpos neutralizantes em estudos iniciais. Está previsto o início dos testes pré-clínicos de segurança em agosto de 2024. Essa vacina é considerada mais segura para aplicação em gestantes, devido aos graves riscos associados à infecção pelo ZIKV durante a gravidez (BUTANTAN, 2023).

O tratamento é sintomático e de suporte, dependendo da gravidade do quadro clínico e das disfunções orgânicas (DONG; KANG; DIMOPOULOS, 2019). São utilizadas drogas como paracetamol ou dipirona para controlar febre e dores, e anti-histamínicos para o exantema. Ácido acetilsalicílico e outras drogas anti-inflamatórias, são contraindicados devido ao risco de complicações hemorrágicas. Reidratação ativa ou passiva é recomendada em casos de vômito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; SAXENA et al., 2016).

Além disso, o controle vetorial é crucial, sendo recomendada a utilização de telas em janelas, mosquiteiros, repelentes e roupas claras e longas, especialmente nas primeiras horas da manhã e no final da tarde, quando o vetor é mais ativo (GREGORY et al., 2017; PETERSEN et al., 2016). Mulheres grávidas devem redobrar os cuidados, evitando viagens desnecessárias a áreas endêmicas e relações sexuais desprotegidas (PAHO/WHO, 2023; POSSAS, 2016). Embora esses métodos não contenham epidemias, eles ajudam no controle da disseminação do vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

### 1.3 MOSQUITOS *AE. AEGYPTI*

Diversos mosquitos do gênero *Aedes* (*Ae.*) foram associados à transmissão do ZIKV para humanos, entretanto, no Brasil, é transmitido majoritariamente pelos

mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (SALAZAR et al., 2007; SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019).

O *Ae. aegypti* pertence à família *Culicidae* e ao Subgênero *Stegomyia*, e é reconhecido como o mais importante vetor de patógenos humanos em áreas urbanas devido à sua capacidade de se adaptar a vários habitats larvais (GÓMEZ et al., 2022; KRAEMER et al., 2019; POWELL, 2016). Além de transmitir ZIKV, o *A. aegypti* também transmite outros arbovírus de relevância médica, como YFV (*Yellow fever virus*) CHIKV (*Chikungunya virus*) e DENV (*Dengue virus*) (SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019). O mosquito possui hábitos diurnos e praticamente não emite som audível (KENT; SCHRIDER; MATUTE, 2024; SCOTT; TAKKEN, 2012).

Esses mosquitos são hematófagos, o que significa que se alimentam de sangue para obter os nutrientes necessários para a maturação e postura dos ovos. As fêmeas são as únicas que se alimentam de sangue, enquanto os machos se nutrem apenas de seiva vegetal (SALAZAR et al., 2007; SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019).

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* é composto por quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adultos. Os ovos são depositados em recipientes com água parada, como vasos de plantas, pneus velhos e outros reservatórios artificiais. Após a eclosão, as larvas passam por quatro estágios de desenvolvimento antes de se transformarem em pupas. As pupas não se alimentam e, após alguns dias, emergem como mosquitos adultos (CONSOLI; DE OLIVEIRA, 1994). O ciclo desses mosquitos pode variar entre 10 a 15 dias, dependendo das condições do ambiente (KRAEMER et al., 2019; SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019).

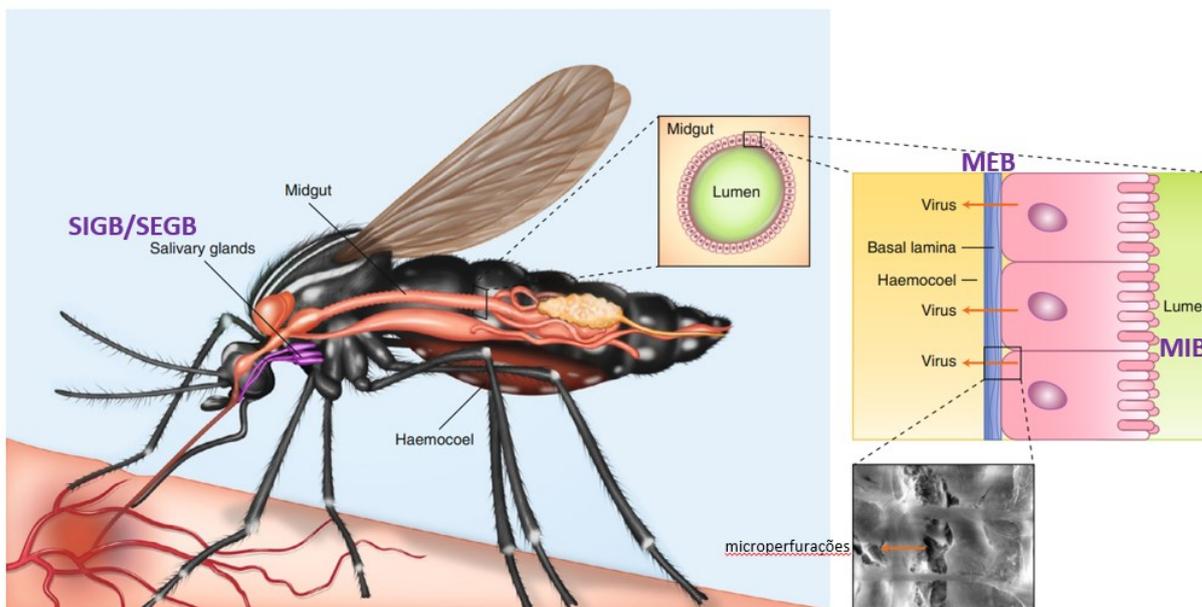
É durante o processo de alimentação sanguínea que as fêmeas dos mosquitos podem se infectar através de humanos doentes (fase febril aguda e virêmica da doença), ingerindo em torno de  $10^4$  a  $10^7$  partículas virais (DUONG et al., 2015). Uma vez ingerido pelo mosquito, o ZIKV infecta as células do epitélio do intestino médio através de receptores celulares, resultando na sua internalização através de endocitose. A infecção e replicação viral no epitélio ocorre nas primeiras 24-48 h após ingestão do sangue infectado (SALAZAR et al., 2007; SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019). Esse processo permite que, posteriormente (72-96 h) o vírus alcance a hemocele (cavidade aberta) do mosquito, resultando em uma disseminação sistêmica. A infecção e a circulação do vírus na hemocele facilitam a subsequente invasão em outros tecidos do mosquito, como o corpo gorduroso, músculos, glândulas

salivares e sistema nervoso (FRANZ et al., 2015; GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019; LEWIS et al., 2023). Uma vez infectado, o mosquito permanece infeccioso por toda a vida e tolera altos níveis de proliferação viral sem desenvolver uma patologia significativa (LAMBRECHTS; SALEH, 2019; OLIVEIRA; BAHIA; VALE, 2020).

### 1.3.1 Barreiras e disseminação viral nos mosquitos

A competência vetorial refere-se à habilidade intrínseca de uma população de mosquitos em se infectar, replicar e transmitir um patógeno após a ingestão de sangue infectado. Portanto, após o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado pelo ZIKV, o vírus encontra barreiras físicas e imunológicas, que podem limitar o estabelecimento da infecção no mosquito vetor (AZAR; WEAVER, 2020). Para ser considerado um vetor competente, o mosquito precisa superar essas barreiras (HARDY et al., 1983; LEWIS et al., 2023; WEAVER, 2020).

Inicialmente, o vírus enfrenta a barreira de infecção do intestino médio (*Midgut Infection Barrier* – MIB), que impede a infecção das células epiteliais do intestino. Caso supere essa barreira, o ZIKV deve então transpor a barreira de escape do intestino médio (*Midgut Escape Barrier* – MEB), que limita a disseminação do vírus para os tecidos secundários, como os túbulos de Malpighi, gordura corporal e ovários. Após vencer a MEB, o vírus atinge a hemolinfa e pode infectar outros tecidos, incluindo as glândulas salivares. Nesse estágio, o ZIKV enfrenta a barreira de infecção da glândula salivar (*Salivary Gland Infection Barrier* – SGIB), que impede a infecção das células epiteliais da glândula. Se o vírus superar a SGIB, ele deve transpor a barreira de escape da glândula salivar (*Salivary Gland Escape Barrier* – SGEB) (**Figura 1**) podendo ser liberado na saliva durante o repasto sanguíneo, completando o ciclo de transmissão (AZAR; WEAVER, 2019, 2020; SALAZAR et al., 2007; SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019).



**Figura 1. Anatomia do mosquito *Ae. aegypti*.**

Barreiras anatômicas que determinam a infecção de artrópodes por arbovírus. MIB - Barreira Intestinal, MEB - Barreira de escape intestinal, SEGB/SIGB - Barreiras salivares, cabeça, tórax e abdome.

Adaptado de (WEAVER, 2020).

Fatores como respostas imunológicas, microbiota intestinal, digestão sanguínea e processos apoptóticos também influenciam a competência vetorial (AYERS et al., 2021; FRANZ et al., 2015; LEE et al., 2019; LEWIS et al., 2023). Mosquitos refratários à infecção apresentam maior atividade de genes pró-apoptóticos, mantendo a renovação celular e integridade do epitélio intestinal (AYERS et al., 2021; HARDY et al., 1983). Além disso, a competência vetorial pode ser impactada por características das cepas virais, distribuição geográfica dos mosquitos e vírus, mudanças climáticas e densidade populacional de mosquitos e hospedeiros humanos (GÓMEZ et al., 2022).

### 1.3.2 Sistema imune dos mosquitos

O sistema imunológico do mosquito *Ae. aegypti* se baseia em duas principais respostas: a resposta imune celular e a humoral (LEE et al., 2019). Esses mecanismos, que estão fortemente interligados, protegem os mosquitos contra patógenos invasores, incluindo vírus (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). A defesa celular é principalmente sustentada pelas barreiras epiteliais do intestino médio e pelos hemócitos, que são responsáveis pela fagocitose, nodulação e capsulação de



(azul) é desencadeada pela ligação do Upd às proteínas Dome, levando à ativação das proteínas Hop. Isso promove a fosforilação das proteínas STAT do mosquito, que, após, são translocadas para o núcleo permitindo que a transcrição de AMPs e genes efetores ocorra. A via de RNAi (verde) é ativada quando a Dicer-2 reconhece e cliva os dsRNAs em siRNAs, permitindo que sejam carregados por proteínas AGO até o RISC, que induz um estado antiviral ao se ligar a RNAs complementares por meio do pareamento de bases, causando clivagem e degradação do RNA viral.

Fonte: GRANELLA, LW.; Não Publicado.

A via de RNAi direciona o silenciamento pós-transcricional de genes, causando a degradação do RNA alvo e impedindo a sua tradução (BIDET; GARCIA-BLANCO, 2014, 2018; QIU et al., 2020; WEAVER et al., 2016). O mecanismo de ação da via de RNAi inicia-se após a detecção de intermediários replicativos de RNA de fita dupla produzidos durante a replicação viral ou do RNA de fita dupla (dsRNA) de estruturas secundárias do vírus. Estes são reconhecidos e clivados pela endorribonuclease Dicer-2 (Dcr2) em pequenos RNAi de tamanhos que variam entre de 21 a 23 nucleotídeos (siRNAs). Os siRNAs são carregados por proteínas argonauta (AGO) formando o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O complexo siRNA-RISC induz um estado antiviral ligando-se a RNAs complementares através do emparelhamento de bases, causando clivagem e degradação do RNA viral (KINGSOLVER; HUANG; HARDY, 2013; RÜCKERT et al., 2014; SCHUSTER; MIESEN; VAN RIJ, 2019). Além de clivar os dsRNAs, a proteína Dcr2 atua também como uma helicase, desenrolando os siRNA que estão em fita dupla tornando-os em fita simples, para que se liguem ao complexo RISC. A detecção de dsRNA viral por Dcr2 também induz uma via de sinalização que ativa a proteína TRAF (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*), a qual resulta na clivagem e ativação do fator de transcrição Rel2. A Rel2 ativada induz a transcrição do peptídeo Vago, que é secretado e que subsequentemente desencadeia a sinalização da via JAK-STAT (HOFFMANN; REICHHART; HETRU, 1996; KINGSOLVER; HUANG; HARDY, 2013; XU; CHERRY, 2014).

O bloqueio da proteína Dcr2 em mosquitos do gênero *Ae.* aumenta a disseminação de ZIKV, DENV, CHIKV e *Mayaro virus* (CAMPBELL et al., 2008; MCFARLANE et al., 2014; SUCUPIRA et al., 2020; VARJAK et al., 2017). Sugere-se que a via do siRNA desempenha um papel limitado na defesa antiviral contra ZIKV no intestino médio, mas possui um papel importante na infecção disseminada desse vírus (ALONSO-PALOMARES et al., 2018). No geral, o impacto da resposta do siRNA

parece ser específica do tecido e varia com o vírus infectante (SCHUSTER; MIESEN; VAN RIJ, 2019; YADAV; DAHIYA; SEHRAWAT, 2023).

Além disso, diferentes vírus produzem fatores antagonistas de RNAi que podem alterar essa resposta (KINGSOLVER; HUANG; HARDY, 2013; OLMO et al., 2018).

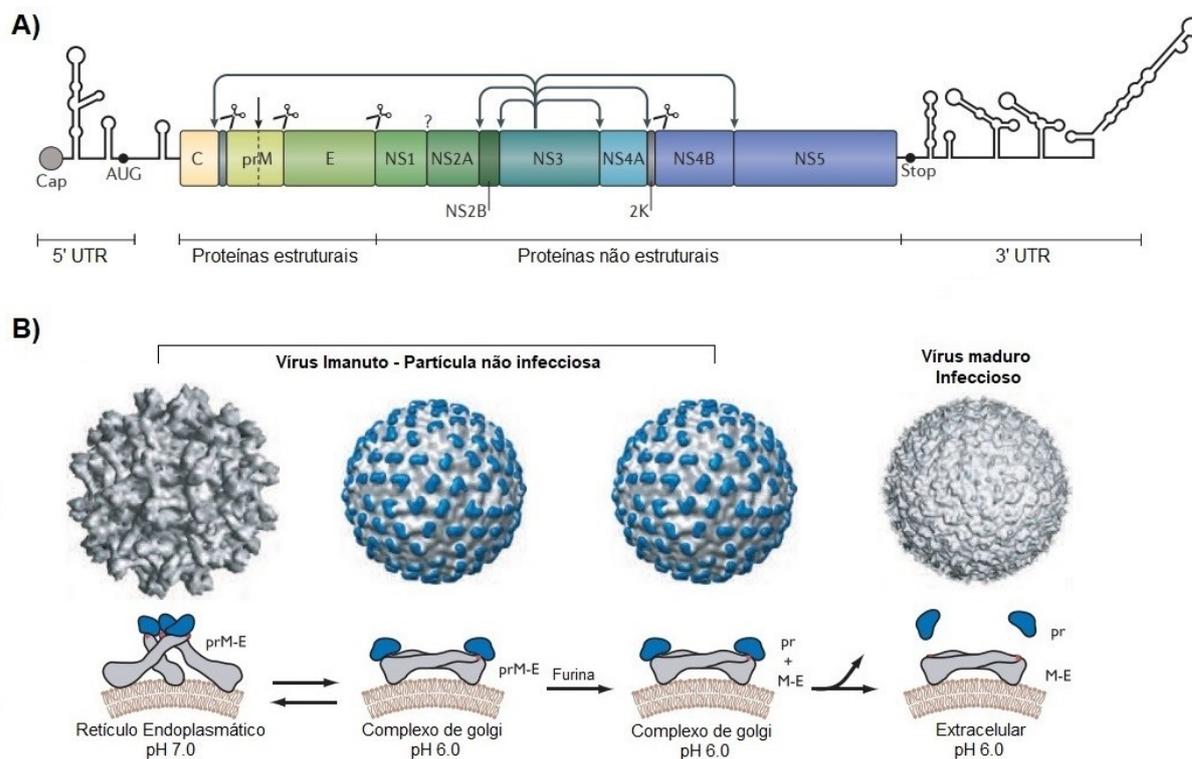
## 1.4 BIOLOGIA E GENÔMICA DO ZIKV

### 1.4.1 Estrutura e organização genômica do ZIKV

O ZIKV é um arbovírus (transmitido por artrópodes) que pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. São vírus envelopados, com genoma de RNA (ácido ribonucleico) protegidos por um capsídeo de simetria icosaédrica e diâmetro médio de 50 nm. Seu genoma é constituído por uma única fita de RNA de sentido positivo [ssRNA (+)], contendo cerca de 11000 nucleotídeos (nt), flanqueado pelas regiões não codificantes 5' UTR e 3' UTR (do inglês *untranslated regions*) que apresentam um papel importante na replicação e tradução do RNA viral (CHAMBERS et al., 1990; KUNO; CHANG, 2007; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006).

A extremidade 5' possui cerca de 100 nt e uma estrutura *cap* (**Figura 3A**) que contribui para a estabilidade do genoma no início da tradução (CHAMBERS et al., 1990). Essa região não é muito conservada entre os flavivírus, porém apresenta uma estrutura secundária comum entre eles, que pode influenciar na tradução e replicação do genoma viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006; SAXENA et al., 2016).

A região 3' possui cerca de 400 a 700 nt e não possui cauda poliadenilada (**Figura 3A**) mas forma estruturas em loop que levam à produção de RNA subgenômico (sfRNA) (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006; SHI; GAO, 2017). Estes são essenciais na patogenicidade, inibindo a ativação do estado antiviral (PETERSEN et al., 2016). Essa região é dividida em três domínios (I, II e III) que apresentam estruturas em loop e hairpin fundamentais para o empacotamento do RNA, tradução, estabilização e circularização do genoma (WEAVER et al., 2016). A região 3 e 5'UTR interagem durante a replicação, criando um molde para a polimerase (NS5) iniciar a replicação. Alguns estudos indicam ainda que esta região interage com as proteínas não estruturais NS3 e NS5 (ELSHAHAWI; HASSAN; BALASUBRAMANIAM., 2019; TAY; VASUDEVAN., 2018).



**Figura 3. Organização genômica e estrutura do ZIKV.**

(A) A ORF que codifica a poliproteína de ZIKV e as estruturas secundárias previstas 5' e 3' UTR. O genoma contém uma estrutura de *cap* tipo 1 na extremidade 5'. ✂: clivagem por peptidases; Setas: clivagem pela protease viral; ↓: clivagem pela protease furina; ?: clivagem por uma protease desconhecida. (B) Topologia de membrana de proteínas virais maduras. As partículas virais imaturas, não infecciosas sofrem um rearranjo conformacional nas glicoproteínas virais E (cinza) e precursor M (prM) (azul) dependente de pH. Partículas infecciosas maduras são formadas após a proteína furina realizar a clivagem da prM, liberando o do fragmento pr. Fonte: Adaptado de (KNIPE; HOWLEY, 2013; NEUFELDT et al., 2018)

Por ser um vírus ssRNA+, o genoma do ZIKV por si só é infeccioso. Quando liberado no citoplasma da célula hospedeira, serve tanto como RNA mensageiro para a tradução das proteínas virais quanto como molde para sua própria replicação. Portanto, o RNA viral é suficiente para desencadear todo o processo de infecção e produção de novas partículas virais (HOWLEY et al., 2024; KUNO; CHANG, 2007).

O genoma codifica uma única sequência aberta de leitura (ORF – do inglês *Open Reading Frame*), que é responsável por codificar uma longa poliproteína (**Figura 3A**) (CHAMBERS et al., 1990; KNIPE; HOWLEY, 2013). Durante a etapa de tradução, a poliproteína precursora de 3.400 aminoácidos (aa) é clivada por proteases do vírus e da célula hospedeira, originando 3 Proteínas estruturais (PE) (capsídeo (C), envelope (E) e pré-membrana ou precursora de membrana (prM) que após a clivagem torna-se (M)) e 7 não estruturais (PNS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5)

(**Figura 3A**) que são importantes na regulação da tradução e replicação viral (PETERSEN et al., 2016; SHI; GAO, 2017).

#### 1.4.1.1 *Proteínas estruturais*

A primeira proteína a ser traduzida a partir da ORF é a proteína C, que forma o capsídeo. Essa possui aproximadamente 120 aa, apresenta peso molecular de aproximadamente 11 kDa e é altamente básica por conter em sua estrutura inúmeros aminoácidos com cargas positivas (DAI et al., 2016; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006). Possui resíduos carregados que se encontram agrupados nas extremidades N- e C-terminal, separados por uma região altamente hidrofóbica. Essa região parece exercer uma importante função na montagem das partículas virais, uma vez que ela participa como um peptídeo sinal na translocação de prM para o retículo endoplasmático (RE), ou seja, deleções em sua sequência impactam negativamente na capacidade de propagação do vírus *in vitro* (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica, derivada do hospedeiro, cercada por 180 cópias de duas glicoproteínas estruturais, E e M (HOWLEY et al., 2024; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006).

A segunda proteína a ser transcrita é a proteína M, que possui cerca de 75 aa e origina-se a partir da clivagem da proteína precursora prM (~165 aa) que ocorre durante a maturação dos vírions (HOWLEY et al., 2024; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Esse processo ocorre durante a passagem do vírus pelo complexo de Golgi na célula hospedeira, onde o fragmento “pr” é removido, a proteína torna-se (M) (**Figura 3B**), permitindo que os novos vírions maduros sejam liberados por exocitose (SHI; GAO, 2017).

A glicoproteína E está presente na maior parte da superfície do vírion, possuindo aproximadamente 500 aa, peso molecular de 53 kDa e apresentando-se sob a forma de dímero, contendo em cada monômero 3 domínios: DI, DII e DIII, que participam de várias etapas do ciclo viral (SHI; GAO, 2017; SIROHI et al., 2016).

O domínio I (DI) está localizado no centro do monômero, unindo o DII e III, e desempenha um papel crucial na organização estrutural do envelope (DAI et al., 2016). O ZIKV possui um único local de glicosilação (N154) no DI da proteína E, que quando glicosilada, se torna um sítio de ligação entre o vírus e as células hospedeiras

(CARBAUGH; BARIC; LAZEAR, 2019). Além disso, o N154 se sobressai da superfície por possuir um *loop* mais longo (resíduos 145-160) em comparação com outros flavivírus, incluindo DENV. Essa região, chamada de '*loop* 150', varia tanto entre os flavivírus quanto entre as cepas de ZIKV, sugerindo que as diferenças nessa região influenciam a transmissão e na doença causada pelo vírus (SHI; GAO, 2017).

O DII contém o *loop* de fusão que é hidrofóbico e altamente conservado entre os flavivírus. É responsável por mediar a fusão das membranas virais e endossômicas durante a infecção (DAI et al., 2016; SHI; GAO, 2017). Além disso, possui epítomos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes e não-neutralizantes (HOWLEY et al., 2024).

O DIII é o domínio C-terminal e exibe uma dobra semelhante a uma imunoglobulina (DAI et al., 2016). Está envolvido na ligação ao receptor celular presente nas células dos hospedeiros (SHI; GAO, 2017). Contém epítomos tipo e subtipo específicos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes (HOWLEY et al., 2024).

#### 1.4.1.2 *Proteínas não estruturais*

Dentre as PNS, a NS1 possui aproximadamente 46 kDa, é dimérica, glicosilada e possivelmente atua no processo de replicação viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006; RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016). Acredita-se que a perda de um códon da porção gênica da NS1, possibilitou a adaptação do ZIKV aos humanos (FREIRE et al., 2018). Estudos estruturais desta proteína sugeriram seu envolvimento na patogênese do ZIKV, causando microcefalia em fetos e doenças neurológicas severas em adultos (SHI; GAO, 2017), além da modulação da infectividade de mosquitos (LIU et al., 2017).

A NS2A é uma proteína pequena (22 kDa e 226 aa), hidrofóbica e multifuncional (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006). Essa atua na replicação e empacotamento do RNA viral, bem como na secreção de partículas virais (BARNARD et al., 2021; ZHANG et al., 2019) e modulação da resposta antiviral, através da inibição da resposta dos IFN-I e -III (LIU et al., 2006). Além disso, ela pode se ligar na região 3' UTR do RNA viral, o que é crucial para a montagem do vírion (ZHANG et al., 2019).

A NS2B é relativamente pequena (14 kDa e 130 aa) e hidrofóbica (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006). Tem capacidade de associar-se ao domínio da protease C-terminal do NS3 para formar o complexo de serina-protease (NS2B-NS3)

que está envolvido na clivagem da poliproteína viral, participando ativamente do ciclo replicativo do vírus (XING et al., 2020; ZHANG et al., 2016).

A NS3 é uma das proteínas mais conservadas entre os flavivírus (XU et al., 2019). Ela possui aproximadamente 70 kDa (618 aa) e é uma proteína multifuncional com atividade de serina-protease, relacionada à região N-terminal (resíduos 1-168) e de RNA helicase (NS3<sub>hel</sub>), 5' nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e RNA 5' trifosfatase (RTPase) por sua porção C-terminal (SHI; GAO, 2017; TAY; VASUDEVAN., 2018). A atividade protease de NS3 é atribuída a um domínio catalítico tipo tripsina, localizado no terço amino-terminal da proteína que trabalha em conjunto com seu cofator NS2B (TAY; VASUDEVAN., 2018). Porém para ser uma protease funcional, o NS3 precisa interagir com a região hidrofílica do NS2B (resíduos 49–95). Sem NS2B 49-95, a NS3 é expressa como uma proteína insolúvel (ROY et al., 2017; TAY; VASUDEVAN., 2018). Este complexo NS2B-NS3 participa na clivagem das junções entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5, no interior da NS2A, NS3 e NS4A bem como entre C-prM (HOWLEY et al., 2024; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006). A NS3<sub>hel</sub>, juntamente com as atividades de NS5 RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e metiltransferase (MTase), estão envolvidos na replicação do RNA viral e na formação do cap tipo 1 (XU et al., 2019). Além disso, estudos relataram que a NS3<sub>hel</sub> é um importante fator de virulência tanto in vitro quanto in vivo (BORDIGNON et al., 2007; DE BORBA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2016).

A NS4A e NS4B são pequenas proteínas transmembranares e hidrofóbicas de aproximadamente 16 kDa e 27 kDa, respectivamente, que estão envolvidas tanto na replicação e pós-tradução da poliproteína viral como na clivagem de NS4B e NS5A (KNIPE; HOWLEY, 2013). NS4A parece não interagir com a membrana, mas funciona como cofator de NS3, regulando a atividade ATPase e, juntamente a outras proteínas virais e do hospedeiro, participa do rearranjo estrutural da membrana, considerada determinante para a patogênese do vírus (HOWLEY et al., 2024; TAY; VASUDEVAN., 2018). Já a NS4B, está envolvida na formação dos constituintes de membrana que formam o complexo de replicação viral (KNIPE; HOWLEY, 2013). Entre NS4A e NS4B, existe um peptídeo sinal chamado de 2K, que desempenha um papel regulador na síntese de RNA e morfogênese viral (JAVED et al., 2018; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006).

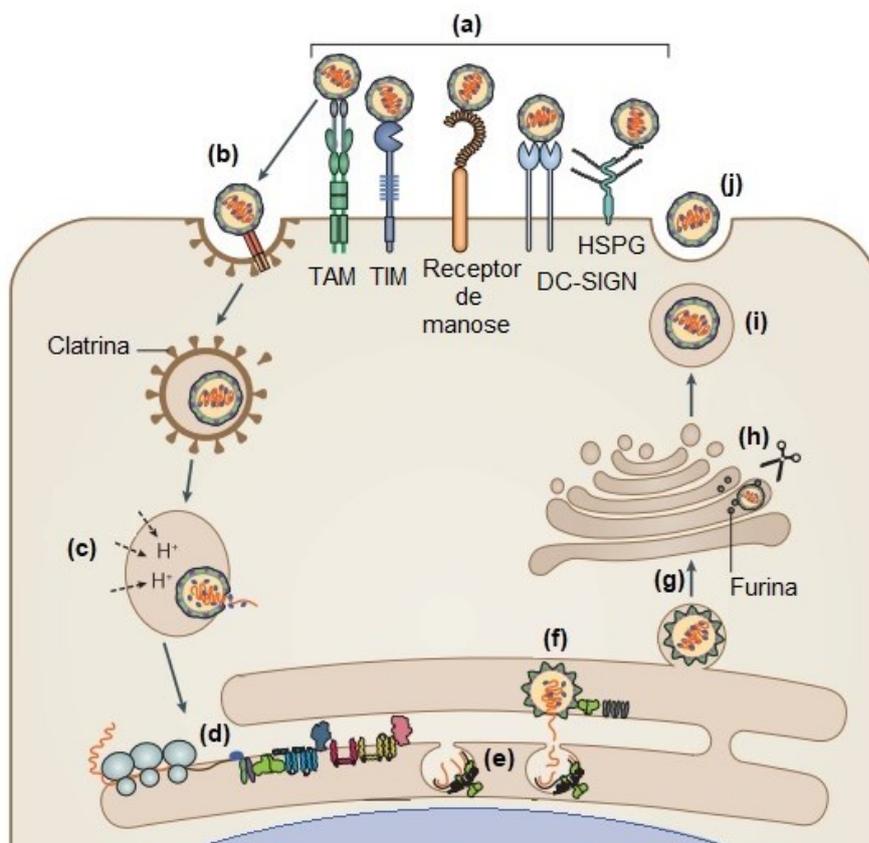
Por fim, a NS5 que é a maior PNS (103 kDa e 902 aa) do vírus, por apresentar dois domínios essenciais para a replicação do genoma viral (ZHAO et al., 2017). O

domínio N-Terminal tem atividade de MTase em dois dos quatro passos que levam a formação do cap no RNA viral. Já o outro domínio tem atividade de RdRp (HOWLEY et al., 2024). Além de ser importante para replicação viral, sobrevivência e evasão do sistema imunológico, a NS5 também forma um complexo com o NS3 e pode estimular as atividades MTPase e RTPase de NS3 (ELSHAHAWI; HASSAN; BALASUBRAMANIAM., 2019; KAPOOR et al., 1995; XU et al., 2019).

#### 1.4.2 Replicação viral

Após entrar em contato com a derme humana o ZIKV é capaz de invadir diversos tipos celulares que vão desde a camada superficial até aquelas mais profundas da pele, como os queratinócitos, fibroblastos e células dendríticas. A primeira etapa para a infecção é a interação da glicoproteína E do envelope viral com receptores específicos do hospedeiro como DC-SIGN (do inglês, *Dendritic Cell Specific*, receptores específicos de células dendríticas), receptor de manose em macrófagos, TAM (AXL, TYOR3) e TIM 1 (pertencentes a família das fosfatidilserina, que participam das vias de regulação de apoptose) (**Figura 4a**) (KNIPE; HOWLEY, 2013; STRANGE et al., 2019).

Em seguida, ocorre a endocitose mediada por clatrin, que permitem a entrada do vírus na célula através de uma vesícula derivada da membrana celular (**Figura 4b**) (JABLUNOVSKY et al., 2024; KNIPE; HOWLEY, 2013). Após, o vírus é transportado para os endossomos onde a acidificação do ambiente endossomal desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, liberando o RNA viral no citoplasma (**Figura 4c**). Em seguida, a tradução da poliproteína viral é iniciada (**Figura 4d**). O RNA genômico ssRNA<sup>+</sup> do ZIKV atua diretamente como RNA mensageiro e é traduzido pela maquinaria ribossomal da célula hospedeira em uma única poliproteína (HOWLEY et al., 2024). Posteriormente, a poliproteína viral é clivada co- e pós-traducionalmente pelas proteases virais e do hospedeiro, resultando nas PE e PNS. As proteínas resultantes participam tanto da replicação do RNA, como da montagem da progênie viral (JABLUNOVSKY et al., 2024; PIERSON; DIAMOND, 2020).



**Figura 4. Replicação do ZIKV.**

(a) Ligação da partícula viral aos receptores de superfície celular. (b) Endocitose viral via clatrina. (c) Fusão das membranas virais e celulares. (d) Tradução da poliproteína viral. (e) Sítio de replicação e multiplicação do genoma viral. (f) Sítio de montagem. (g) Transporte das partículas virais imaturas pela via secretora. (h) Maturação da partícula viral. (i) Vírus maduro. (j) Liberação da partícula viral por exocitose.

Fonte: Adaptado de (NEUFELDT et al., 2018).

A NS5 regula a tradução do RNA genômico viral ao se ligar à estrutura SLA (stem-loop A) presente na extremidade 5' do RNA, inibindo a tradução na fase de iniciação (FAJARDO et al., 2020). Essa ligação também permite que a polimerase inicie a replicação do RNA viral (**Figura 4e**) (ZHAO et al., 2017). A NS5 faz cópias de fita negativa que servem como molde para novos RNAs de polaridade positiva (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2006; ZHOU et al., 2007).

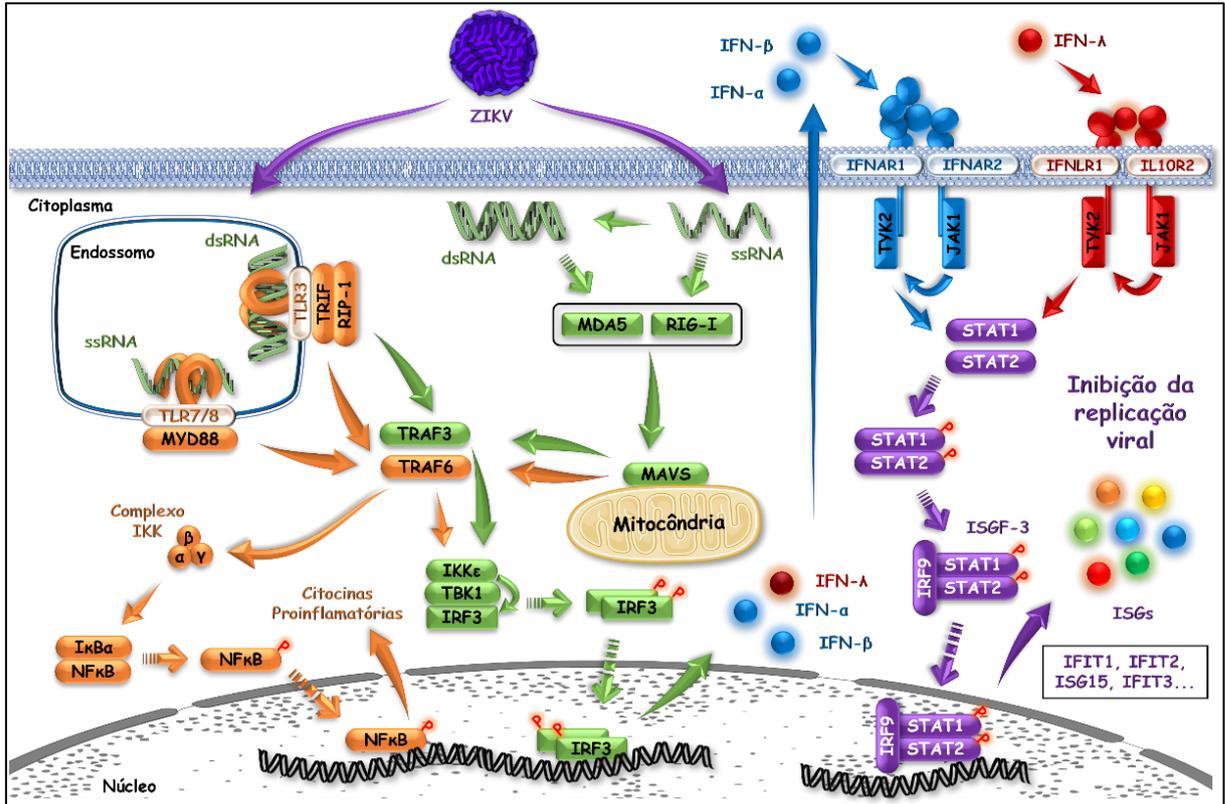
Para aumentar a eficiência da replicação do RNA os domínios RdRp e MTase da NS5 interagem entre si (POTISOPON et al., 2014; ZHAO et al., 2017). Além disso a NS3<sub>hel</sub> e o domínio RdRp da NS5, atuam em conjunto promovendo a transcrição e replicação do RNA genômico (KAPOOR et al., 1995), que em sua maioria ocorre nas vesículas de membrana induzidas por vírus (VPs) derivadas do RE e Golgi (HOWLEY et al., 2024; XU et al., 2019). Após a replicação, o RNA é exportado dos VPs para ligar-se a proteína C e formar uma partícula imatura e não infecciosa (**Figura 4f**). O

vírião ainda imaturo recebe o envelope oriundo da membrana dessa organela, e segue através de canais secretórios para o complexo de Golgi (**Figura 4g**), onde ocorre sua maturação mediada pela proteína furina (**Figura 4h**). O amadurecimento da nova progênie é marcado pela clivagem da prM, que leva a uma mudança conformacional na superfície do vírião (**Figura 4i**). Após este processo, a partícula viral é secretada para o ambiente extracelular por exocitose (**Figura 4j**) onde poderá infectar novas células, reiniciando o ciclo de transmissão e replicação viral (HOWLEY et al., 2024; SIROHI; KUHN, 2017).

### 1.4.3 Resposta imune antiviral inata

O processo de infecção e replicação do ZIKV gera a ativação da resposta imune antiviral inata e a produção de IFN do tipo I e III (IFN-I e IFN-III) em células infectadas (GÖERTZ et al., 2018; VERSTEEG; GARCÍA-SASTRE, 2010). Essa ativação é dependente dos receptores do tipo Toll (TLR) (TLR3, TLR7 e TLR8) e dos receptores do tipo RIG-I (RLR), também chamados de sensores de RNA, os quais incluem o RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) e o MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5), que detectam o RNA viral e iniciam a produção de IFNs e outras citocinas antivirais (LOO et al., 2008; PLOCIENNIKOWSKA et al., 2021; SERMAN; GACK, 2019). Salienta-se que RIG-I é considerado o principal sensor de ZIKV (SCHILLING et al., 2020).

A ativação desses receptores resulta na indução de uma cascata de sinalização que culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6), regulatórias (IL-10), e antivirais, como os IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (IFN-I) e IFN- $\lambda$  1–4 (IFN-III), além de induzirem a produção de quimiocinas (Ex.: CCL5, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11) (**Figura 5**) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; ELREFAEY et al., 2021). Esse arsenal proteico é fundamental para restringir a replicação e disseminação do vírus, recrutar e ativar a resposta antiviral de células imunes inatas no local da infecção, além de ativar a resposta imune adaptativa ao vírus (HUANG et al., 2019; RODRIGUES DE SOUSA et al., 2021).



**Figura 5. Vias ativadas por receptores de RNA e por IFN-I/III.**

Os vírus podem ser reconhecidos e ativar receptores ligados a membrana como os TLRs 3, 7-8 (laranja), ou receptores citoplasmáticos como RIG-I e MDA5 (verde). TLR3 e MDA5 detectam RNAs de fita dupla enquanto TLR 7/8 e RIG-I os RNAs de fita simples. O RNA de ZIKV é detectado por RIG-I ou TLR7/8, que ativam a proteína adaptadora MAVS e Myd88, respectivamente, estimulando o eixo TRAF3/IKK $\epsilon$ /TBK1 a fosforilarem IRF3 e IRF7. Isso permite que eles sejam translocados para o núcleo e ocorra a transcrição dos IFNs. Entretanto a ativação de Myd88 e MAVS também estimula NF- $\kappa$ B através da proteína TRAF6, que ativa o complexo IKK ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Com isso I $\kappa$ B $\alpha$  (inibidor constitutivo do fator de transcrição NF- $\kappa$ B) é fosforilado e degradado, permitindo que o NF- $\kappa$ B seja translocado para o núcleo. No núcleo ele induz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Os IFNs secretados atuam de maneira autócrina e parácrina (não ilustrado), ligam-se em seus receptores comuns (IFNAR1/IFNAR2 [azul] ou IFNLR1/IL10R2 [vermelho]) e ativam a via JAK-STAT. Após IRF9 é recrutado formando o fator ISGF-3 e permitindo sua translocação para o núcleo. O ISGF-3 liga-se na região promotora ISRE e inicia a transcrição de vários genes estimulados por IFN (ISGs). Com isso é ativando o estado antiviral na célula e consequentemente a inibição da replicação viral.

Fonte: GRANELLA, LW.; não publicado.

Os IFN-I são codificados por uma família de genes IFN- $\alpha$  estreitamente relacionados e um gene IFN- $\beta$  enquanto os IFN-III pelo IFN- $\lambda$ 1 (IL-29) e pelos IFN- $\lambda$ 2-4 (IL-28A-C). Todas as células nucleadas podem produzir IFN-I, mas nem todas respondem aos mesmos (COLDBECK-SHACKLEY; EYRE; BEARD, 2020; VERSTEEG; GARCÍA-SASTRE, 2010). Assim, os IFN-I são os primeiros gerados na maioria dos tipos de células durante infecções virais, sendo ativados em poucas horas após a infecção viral (ANK et al., 2006; ARIMOTO et al., 2018; LUNDBERG et al., 2019; VERSTEEG; GARCÍA-SASTRE, 2010). Após serem produzidos, os IFN-I e III

são secretados e atuam de maneira autócrina e parácrina (**Figura 5**), para produção de ISGs e conseqüentemente, ativam o estado antiviral das células (GÖERTZ et al., 2018; PATEL; GARCÍA-SASTRE, 2014; VERSTEEG; GARCÍA-SASTRE, 2010). Os ISGs influenciam em diversas funções celulares, incluindo processamento de RNA, estabilidade de proteínas e viabilidade celular, afetando diretamente etapas específicas do ciclo de replicação dos vírus (LESAGE et al., 2021; SCHOGGINS, 2019).

Entretanto, o ZIKV pode antagonizar e bloquear a ação do sistema imune inato (ESSER-NOBIS et al., 2019; GRANT et al., 2016; LU et al., 2023). Estudos mostraram que o ZIKV possui mecanismos de evasão que bloqueiam essas vias de sinalização e a transcrição dos ISGs, resultando na supressão do "estado antiviral" celular (ELREFAEY et al., 2021; GRANT et al., 2016; HU; FENG; HE, 2023; MUÑOZ-JORDÁN et al., 2003, 2005; SERMAN; GACK, 2019). Por exemplo, os sRNAs (*subgenomic flaviviral RNA*) podem se ligar a TRIM25 e bloquear a ubiquitinação dessa proteína, que é necessária para a ativação de RIG-I (CHIRAMEL et al., 2019; GACK et al., 2007; RAJSBAUM; GARCÍA-SASTRE; VERSTEEG, 2014); o domínio metiltransferase da proteína NS5 de ZIKV também se liga à RIG-I e reprime sua sinalização (LI et al., 2020; PATEL; GARCÍA-SASTRE, 2014); as proteínas NS1 e NS4A do vírus podem suprimir a ativação de IRF3 e NF- $\kappa$ B, os quais impedem a transcrição dos IFNs (SARRATEA et al., 2023; WU et al., 2017); NS4B, impede a fosforilação de STAT1, bloqueando a resposta dos IFN (MUÑOZ-JORDÁN et al., 2003, 2005); o domínio MTase da proteína NS5 que interage e promove a degradação proteossomal do STAT2, reprimindo a sinalização dos IFNs (GRANT et al., 2016; WANG et al., 2020). Além disso, a ativação de TLR3 pelo ZIKV estimula a produção de citocinas inflamatórias, como IL-6, que suprimem a resposta antiviral mediada por RIG-I, facilitando a replicação viral (PLOCIENNIKOWSKA et al., 2021). No entanto, o impacto da cinética de replicação do ZIKV em diferentes estágios de seu ciclo de vida na ativação da imunidade inata do hospedeiro e nas ações antivirais ainda não está totalmente compreendido (ASHOUR et al., 2009; GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016; SERMAN; GACK, 2019).

Por outro lado, um complexo proteico denominado DNA-PK, conhecido por detectar DNA citoplasmático e induzir a transcrição dos IFNs, também possui um papel importante na resposta antiviral contra infecções por ZIKV (PATRICIO et al., 2022). Também já foi demonstrado que o ZIKV pode induzir autofagia em fibroblastos,

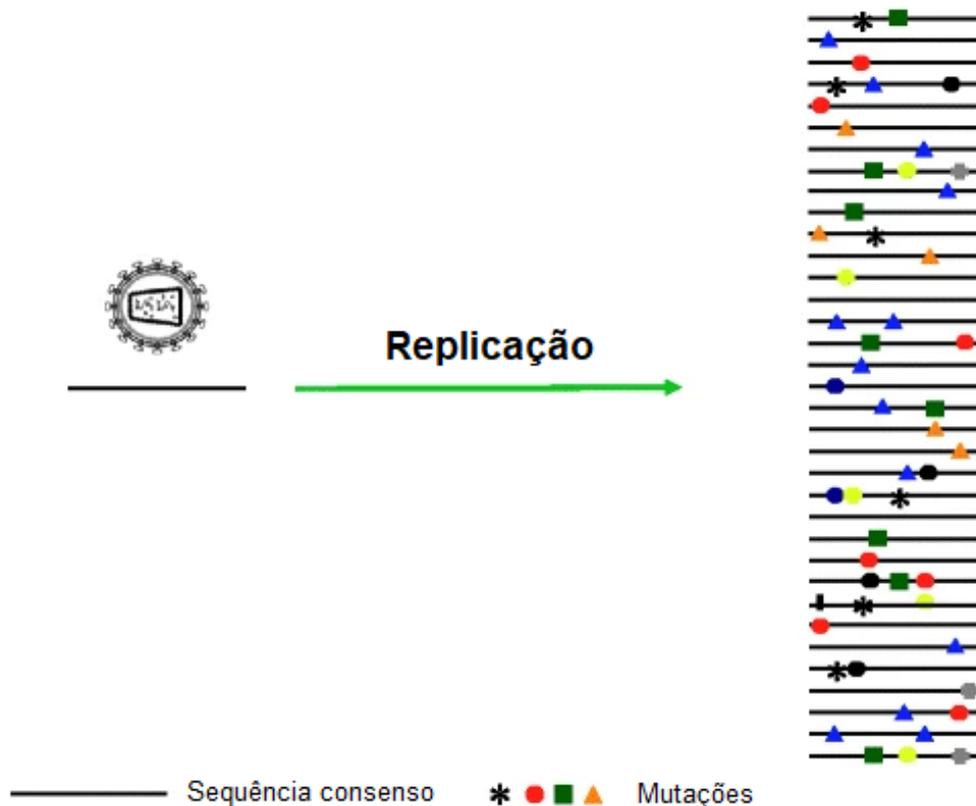
alterar a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular e apoptose, bem como de comprometer a produção de novos neurônios (HAMEL et al., 2015; LI et al., 2016; SOUZA et al., 2016).

## 1.5 EVOLUÇÃO E ADAPTAÇÃO DO ZIKV

### 1.5.1 Quasispécies virais

Quasispécie viral é definido como uma coleção de variantes, intimamente relacionadas, que cooperam entre si para produzir o fenótipo geral do vírus (DOMINGO, 1992; DOMINGO; GARCÍA-CRESPO; PERALES, 2021). A teoria de quasispécies foi formulada originalmente por Manfred Eigen, em 1971, para caracterizar a grande diversidade genotípica de uma população de vírus (EIGEN, 1971; EIGEN; SCHUSTER, 1982). O conceito de quasispécies adicionou um novo fator nas discussões evolucionistas, pois o alvo da seleção não é apenas o indivíduo mais adaptado da população, e sim toda ela, levando em conta todos os mutantes (DOMINGO et al., 1998; DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012).

As quasispécies virais são geradas pois os vírus de RNA, como o ZIKV, apresentam altas taxas mutacionais (variando de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  mutações por sítio e por replicação (ARIAS et al., 2013; BASSI et al., 2018)) devido à baixa fidelidade da RNA polimerase e pela rápida cinética replicativa (**Figura 6**) (DOMINGO et al., 1996; GRASS et al., 2022; RUÍZ-JARABO et al., 2002).



**Figura 6. Descrição esquemática de uma população de quasispécie viral.**

Um único genoma viral (sequência consenso) resulta na geração de vários mutantes. Os genomas são representados como linhas horizontais e as mutações como símbolos nas linhas.

Fonte: adaptado de (MARTÍNEZ et al., 2012)

Além disso, a frequência de erro nos vírus de RNA é muito próxima ao valor máximo compatível com a manutenção genética, afetando diretamente a viabilidade dos vírus. Sendo assim, o genoma evolui em diferentes taxas, variando de acordo com a região e a pressão a que ela está submetida (GALLEGO et al., 2018; KAUTZ; FORRESTER, 2018; VIGNUZZI et al., 2006). Demonstrações experimentais dessa teoria foram obtidas em cultura de células com vírus de várias famílias diferentes. Nessas culturas, um aumento das frequências de mutações das quasispécies virais ocorreram. Isso ocorreu em consequência de pressões químicas ou da presença de uma polimerase de menor fidelidade, resultando na diminuição da infectividade viral e patogênese *in vivo*. (ARIAS et al., 2013; CROTTY; CAMERON; ANDINO, 2001; VIGNUZZI et al., 2006; YAN et al., 2018; YUSTE et al., 1997).

### 1.5.2 Fitness viral

Fitness viral (adaptabilidade) é definido pela capacidade de um determinado genótipo (ou fenótipo) persistir em uma quasispécie viral ao longo de várias gerações (BORDERÍA et al., 2010; JOOS et al., 2005; VIGNUZZI et al., 2006). Ele pode ser classificado como fitness absoluto ou relativo (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012; RUÍZ-JARABO et al., 2002). Fitness absoluto é a razão entre o número de indivíduos presentes em uma população antes e depois de uma geração ou de determinado intervalo de tempo. Enquanto o fitness relativo pode ser quantificado por meio de experimentos de competição com um vírus de referência (DOMINGO, 1997; YUSTE et al., 1997). Desta forma o fitness aumenta de forma exponencial conforme a população viral é subcultivada em células, até atingir um platô, favorecendo os vírus com alto desempenho (DOMINGO et al., 1996, 2006).

Durante a replicação e disseminação, as populações estão sujeitas a frequentes acúmulos de mutações deletérias, causando um declínio no fitness viral (DOMINGO, 1992; DOMINGO et al., 1996; EIGEN, 2002; EIGEN; SCHUSTER, 1982). Portanto, as medidas de fitness de uma espécie ou quasispécies viral possui relação direta com a taxa de replicação média da população, uma vez que as modificações do ambiente e as limitações do tamanho da população influenciam diretamente nesse valor (MANRUBIA; DOMINGO; LÁZARO, 2010). Dessa forma, quando uma população de vírus é submetida a um processo evolutivo, é esperado que sua constituição, tanto genotípica quanto fenotípica, mude (CIOTA et al., 2007a, 2007b, 2007c).

Além disso, sabe-se que muitos vírus de RNA se replicam perto do seu limite do erro, tornando-os sensíveis a aumentos da taxa mutacional. Quando a taxa mutacional chega a seu ponto crítico, também chamado de limite de erro, a população viral entra em erro catastrófico. Esse processo retarda a extinção da população, uma vez que o genoma com maior fitness foi perdido devido às altas taxas mutacionais, os genótipos com menor fitness precisam evoluir para que não ocorra mutagênese letal (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012).

### 1.5.3 Pressões seletivas em diferentes hospedeiros

Conforme Coffey et al. (2011) e Vignuzzi et al. (2006), os principais desafios para a sobrevivência de uma espécie viral ocorrem durante as interações com

diferentes hospedeiros, exigindo um equilíbrio entre a fidelidade da replicação e a variabilidade genômica. Isso garante a transmissão do material genético e facilita a adaptação a diferentes ambientes durante a infecção (AR; KURATH, 2012; DOMINGO et al., 2019).

Nos arbovírus, essa dinâmica é observada em estudos que avaliam o fitness viral e evolução durante a alternância de hospedeiros, revelando três padrões gerais: ganhos de fitness após passagens em série em células da mesma linhagem, redução do fitness em células não adaptadas e ganhos de fitness após passagens alternadas entre células de invertebrados e vertebrados. (GREENE et al., 2005; RIEMERSMA et al., 2021; TALAVERA-AGUILAR et al., 2021; VASILAKIS et al., 2009; WEAVER et al., 2021). Por exemplo, a replicação alternada de vírus como o WNV sugere que maior replicação no vetor invertebrado pode reduzir a capacidade de replicação no hospedeiro vertebrado (CIOTA et al., 2007a, 2007b, 2007c; RIEMERSMA et al., 2021). Em contraste, estudos com VSV indicam que a evolução dos arbovírus não é restringida por ambientes celulares alternados, com populações virais sendo generalistas capazes de se replicar em diferentes ambientes celulares (NOVELLA et al., 1999).

Além disso, arbovírus que circulam entre humanos e mosquitos, como o ZIKV, precisam ser adaptados a diferentes ambientes celulares e teciduais desses hospedeiros (DOMINGO, 1992; DOMINGO; PERALES, 2019; MOSER et al., 2018). Diferenças essenciais nos processos biológicos e na bioquímica entre células humanas e de mosquitos, como glicosilação, composição da membrana, metabolismo lipídico e respostas antivirais inatas, exercem pressões seletivas sobre os vírus. Essas pressões seletivas são gargalos adaptativos que pode determinar o curso e a sintomatologia da infecção (VILLORDO; GAMARNIK, 2013). A capacidade dos arbovírus de superar esses gargalos e recuperar diversidade genética permite sua disseminação por hospedeiros distintos (GRUBAUGH et al., 2016; VIGNUZZI et al., 2006). Essas pressões seletivas favorecem o surgimento de cepas geneticamente distintas ao longo do tempo (POIRIER; VIGNUZZI, 2017).

Estudos de Jaeger et al., (2023) indicam que o ZIKV pode adquirir mutações que melhoram o fitness em hospedeiros vertebrados sem perder o fitness em mosquitos vetores. Isso corrobora a ideia de que as restrições do fitness viral variam entre células de insetos e vertebrados e são específicas para cada vírus (DOMINGO et al., 2019). Por exemplo, o ZIKV, após décadas sem causar surtos, provocou

grandes epidemias em 2007, 2013 e uma pandemia em 2015, devido a mudanças genéticas que facilitaram a transmissão e formas mais graves da doença (COÊLHO BERNARDO-MENEZES et al., 2022; FARIA et al., 2016). Mutações entre 2010 e 2013 aumentaram a infectividade em mosquitos *Ae. aegypti* (LIU et al., 2017), suprimiram a resposta de IFN (XIA et al., 2018) e causaram microcefalia (LING YUAN et al., 2017).

Por outro lado, a diversidade populacional intra-hospedeiro é crucial para os vírus (FORRESTER; COFFEY; WEAVER, 2014; WEAVER et al., 2021). Uma vez que os gargalos adaptativos são impostos, variantes virais podem ser eliminadas ou se tornarem dominantes dependendo da pressão seletiva. Da mesma forma, interações cooperativas entre variantes podem auxiliar na adaptação a diferentes tecidos e na evasão do sistema imune (FORRESTER et al., 2012; GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019). O surgimento de mutações adaptativas que melhoram o fitness viral pode otimizar a maquinaria viral, aumentando interações com fatores pró-virais do hospedeiro ou inibindo fatores antivirais (ARNAUD et al., 2011; GRASS et al., 2022; KRISHNAKUMAR et al., 2019).

## 1.6 JUSTIFICATIVA

O fitness viral do ZIKV pode ser influenciado durante as alternâncias entre hospedeiros (VILLORDO et al., 2015). Contudo, os mecanismos pelos quais esse processo ocorre, ainda permanece pouco compreendido.

Nesse contexto, as pressões seletivas impostas pelos componentes das respostas imunes dos diferentes hospedeiros podem afetar a evolução, o fitness e a variabilidade do ZIKV (FILOMATORI et al., 2017). Pensando nisso, propomos que RIG-I possa ser um filtro da diversificação do ZIKV durante a alternância de hospedeiros.

A compreensão desses processos não apenas ampliará nosso conhecimento sobre o fitness viral, mas também fornecerá conhecimentos de possíveis mutações genéticas ocorridas no ZIKV durante a alternância de hospedeiros. Além disso, identificar cepas de ZIKV com fitness alterado pode ajudar a prever futuras epidemias e orientar estratégias mais eficazes de vigilância e controle.

## 1.7 HIPÓTESE

RIG-I restringe a diversificação do ZIKV durante a alternância de hospedeiros.

## 1.8 OBJETIVOS

### 1.8.1 Objetivo geral

Investigar o impacto de RIG-I no fitness viral do ZIKV durante a alternância de hospedeiros.

### 1.8.2 Objetivos específicos

- Avaliar a evolução viral do ZIKV durante a alternância de hospedeiros;
- Analisar, em diferentes modelos celulares, o fitness das cepas de ZIKV selecionadas;
- Analisar, em mosquitos *Ae. aegypti*, o fitness das cepas de ZIKV selecionadas;
- Identificar as mutações ocorridas no genoma das cepas de ZIKV selecionadas durante a alternância de hospedeiros.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Listagens completas das células, anticorpos e demais reagentes usados neste trabalho estão descritos no **APÊNDICE A e B**.

### 2.1 CULTIVO CELULAR

Células de mamíferos das linhagens A549 (WT, RIGI<sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup>), Huh7.5 e HFF foram cultivadas em estufa úmida à 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> em meio DMEM completo 10% (DMEM 1X suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S)). A linhagem celular Vero foi cultivada sob as mesmas condições, em meio DMEM completo 5%. As células da linhagem C6/36 foram cultivadas a 28°C em meio L-15 completo (L-15 1X suplementado com 5% de SFB, 1% de P/S e 0,26 % de Triptose). Ambas as linhagens celulares foram testadas mensalmente para contaminação por micoplasma, conforme protocolo padronizado no laboratório.

Para os experimentos, as células foram semeadas e incubadas por 16 a 24h para atingir adesão completa e confluência de 70 a 80% da monocamada celular. A **Tabela 1** apresenta a densidade de células e volume de meio utilizado em cada placa.

**Tabela 1. Volume e densidade de células utilizadas nos experimentos para que obtenham uma confluência de 70 – 80%.**

Placa/ Garrafa	Volume para infecção	Volume final no poço	Célula	Densidade
<b>96 poços</b>	50 µl	200 µl	A549s	2 x10 <sup>4</sup> células/poço
			C6/36	5 x10 <sup>4</sup> células/poço
<b>24 poços</b>	200 µl	500 µl	A549s	5 x10 <sup>4</sup> células/poço
			Vero	
			HFF	
<b>12 poços</b>	400 µl	1000 µl	Huh 7.5	1 x10 <sup>5</sup> células/poço
			A549s	3,5 x10 <sup>5</sup> células/poço
<b>6 poços</b>	750 µl	2000 µl	A549s	1 x10 <sup>6</sup> células/poço
			C6/36	3 x10 <sup>7</sup> células
<b>150cm<sup>2</sup></b>	7mL	20 mL	C6/36	

## 2.2 CRIAÇÃO DE MOSQUITOS *Ae. AEGYPTI*

Mosquitos *Ae. aegypti* (cepa Red Eye) foram criados e mantidos em condições padrão conforme descrito anteriormente (MARASCHIN et al., 2023) no insetário do Laboratório de Imunologia – Lidi, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Ovos, larvas, pupas e mosquitos adultos foram mantidos em ciclos de fotoperíodos de 12h claro/escuro, 70% - 80% de umidade relativa do ar e temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . As larvas foram alimentadas com ração canina (Pedigree). Os mosquitos foram mantidos em gaiolas e alimentados com solução de sacarose 10%, embebida em algodão e oferecida “ad libitum”.

## 2.3 INFECÇÃO VIRAL EM CÉLULAS

Todas as infecções virais seguiram a mesma metodologia geral, com variação no tipo, número de células e multiplicidade de infecção (MOI), conforme indicado para cada experimento. O inóculo viral foi preparado em meio não suplementado específico para cada tipo de célula. A suspensão viral foi distribuída nos poços e incubada por 90 minutos para a adsorção dos vírus. Os volumes adicionados em cada poço variaram dependendo da placa utilizada. Após o período de adsorção, as células foram lavadas com salina para remoção de partículas virais não adsorvidas. Em seguida, o meio específico da linhagem celular foi adicionado e as células foram incubadas até o término do tempo de infecção.

Para a quantificação dos vírus derivados de células infectadas, após o término do tempo de infecção, os sobrenadantes (SBN) foram coletados e armazenados à  $-80^\circ\text{C}$  até a realização da titulação viral por placa de lise (Seção 2.4).

### 2.3.1 Preparação do vírus estoque

Células C6/36 foram semeadas em uma confluência de 80% em garrafa de 150  $\text{cm}^2$  (ver Tabela 1). As células foram infectadas com MOI 0,01 de ZIKV BR 2016/16288 (STROTTMANN et al., 2019), mantidas em meio L-15 completo à  $28^\circ\text{C}$  em estufa úmida por 5 dias. Após este período, o SBN foi coletado, centrifugado a  $460 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ , aliquoteado em microtubos e armazenados a  $-80^\circ\text{C}$ . A quantificação do título viral foi feita conforme descrito na Seção 2.4, sendo o título de

8 x 10<sup>6</sup> PFU/mL. Esse estoque viral foi denominado ZIKV-P0 e considerado o vírus parental.

## 2.4 ENSAIO DE PLACA DE LISE

A realização desta técnica permite quantificar a produção de vírus viáveis e infectivos liberados para o meio extracelular de culturas celulares.

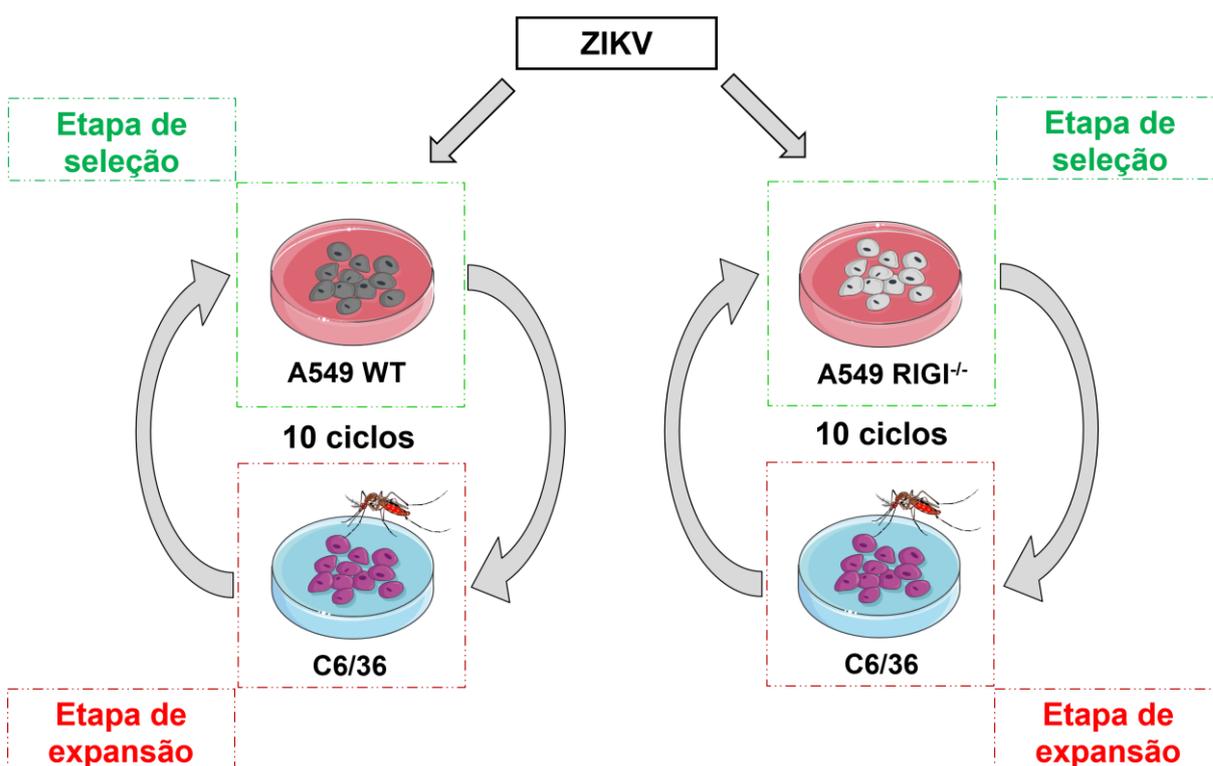
Para a realização desta técnica, células Vero foram semeadas em placa de 24 poços (ver **Tabela 1**). As amostras foram diluídas em série (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>) em meio DMEM não suplementado. Transferiu-se 200 µl de cada diluição para cada poço. Os poços controle (*mock*), receberam meio sem adição de vírus. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 90 min. Após a incubação, o meio foi removido e 750 µl de meio DMEM semissólido (meio DMEM, 1 % SFB, 1 % P/S e 1,6 % de Carboximetilcelulose de sódio) foram adicionados a cada poço. Este meio permite que a progênie viral se espalhe apenas para as células vizinhas, formando placas de lise na monocamada celular. As placas foram incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 dias. A revelação foi feita adicionando 750 µl de paraformaldeído 3% (PFA) a cada poço por 20 min a temperatura ambiente (TA), seguido por lavagem com água corrente e incubação com solução de cristal violeta (ver p. 109) por 30 min à TA. Após nova lavagem e secagem, as placas de lise foram contadas. A contagem foi feita a partir da diluição que apresente no mínimo 10 placas de lise, utilizando a fórmula de cálculo do título viral (Fórmula 1) para expressar o resultado em unidades formadoras de placas por mL (PFU/mL, do inglês, *plaque forming unit*).

$$\text{PFU / mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de PFU}}{\mu\text{L de vírus}} \cdot 10^x \text{ (fator de diluição)} \quad (1)$$

## 2.5 PROTOCOLO DE SELEÇÃO DE ZIKV DURANTE MÚLTIPLAS PASSAGENS EM CULTURA CELULAR

Células A549 WT e RIGI<sup>-/-</sup> foram semeadas em placa de 6 poços (ver **Tabela 1**), em triplicata para cada condição. O processo de seleção viral se iniciou a partir do ZIKV-P0, infectando as células com MOI 0,1 conforme Seção 2.3. Após adsorção, foram adicionados 2 mL de meio DMEM completo 10% e as células foram incubadas em estufa úmida a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48h. Após a infecção, o SBN foi

recolhido, identificado e acondicionado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O título viral foi determinado conforme Seção 2.4. Esta passagem foi chamada de P1 em A549. Células C6/36 foram então semeadas em placas de 6 poços (ver **Tabela 1**) em triplicatas para cada condição. A infecção foi feita conforme Seção 2.3, com MOI 0,01 dos vírus da P1. Após adsorção, foram adicionados 2 mL de meio L-15 completo 5%, e as células incubadas em estufa úmida a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 96h. Ao término do tempo de infecção, o SBN foi coletado, identificado e acondicionado em  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram tituladas conforme Seção 2.4, sendo esta passagem denominada P1 em C6/36. O procedimento de infecção em A549 foi repetido com o vírus da P1 em C6/36. Ao término das 48h, o SBN foi coletado e titulado, sendo esta passagem chamada de P2 em A549. A P2 em C6/36 foi feita utilizando o vírus da P2 em A549. O protocolo foi repetido até um total de 10 passagens, conforme **Figura 7**.



**Figura 7.** Esquema representativo do protocolo de seleção de ZIKV durante múltiplas passagens em cultura celular.

Fonte: Próprio autor.

## 2.6 INFECÇÃO VIRAL EM MOSQUITOS *AE. AEGYPTI*

Mosquitos fêmeas com 4 a 9 dias de vida foram separadas em gaiolas, considerando o número de grupos experimentais (ZIKV-P0, ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas

passagens P4, P6 e P10), e mantidos sem sacarose, mas com água, por 18-24h antes da infecção. Para infecção, fêmeas de *Ae. aegypti* foram alimentadas artificialmente com uma mistura contendo o vírus e células vermelhas (RBC) de sangue humano. As RBCs foram obtidas a partir de sangue de doadores humanos saudáveis (UFSC - CAAE: 89894417.8.0000.0121), em tubos contendo EDTA para preservação da morfologia celular. Após centrifugação a 400 x g por 4 min em TA, o soro foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Posteriormente, as células foram misturadas na proporção 1:1 com o vírus ( $2 \times 10^4$  PFU). ATP, na concentração final de 1mM, foi adicionado à mistura com a função de fagoestimulante. Uma alíquota de 50µl dessa mistura foi armazenada a -80°C para posterior quantificação do input viral. Em seguida, as fêmeas foram alimentadas com essa mistura utilizando um alimentador artificial de vidro com uma membrana de Parafilme, aquecido a 37°C, durante  $\pm$  1h no escuro. Em seguida, os mosquitos foram anestesiados por frio (-20°C) durante 90" e apenas as fêmeas totalmente ingurgitadas foram separadas em gaiolas. As gaiolas foram mantidas em incubadora B.O.D (do inglês, *Biochemical Oxygen Demand*), à 28°C e com acesso a uma solução de sacarose 10% embebida em algodão, fornecida "ad libitum", até o final do experimento. Todas as infecções foram realizadas em uma sala dedicada a mosquitos infectados com dupla barreira e cortina de ar.

### **2.6.1 Curva de sobrevivência de mosquitos *Ae. aegypti* infectados**

A sobrevivência foi monitorada diariamente até o 14° dia após infecção (Seção 2.6), como descrito em (MARASCHIN et al., 2023).

### **2.6.2 Quantificação viral dos mosquitos *Ae. aegypti***

Após 14 dias pós infecção (dpi), os mosquitos foram separados em microtubos e armazenados a -80°C. Para a quantificação viral, células Vero foram semeadas em placa de 24 poços (ver **Tabela 1**). No dia da titulação, as amostras foram descongeladas e passaram por um processo de descontaminação externa, que envolveu a imersão de cada mosquito em álcool 70% (1 x 45"), seguido em hipoclorito 1% (1 x 45"), outra rodada em álcool 70% (1 x 45") e, finalmente, em solução salina estéril a 0,9% (1 x 45"). Em seguida, cada mosquito foi colocado em um microtubo

contendo 200 µl de meio DMEM 1X e macerado individualmente por um vórtex manual com um pistilo estéril. O homogenato resultante foi centrifugado a 3.200 x g por 5 min a 4°C. Em seguida, o SBN foi titulado conforme Seção 2.4.

O cálculo da titulação foi realizado através da contagem do N° de PFU/poço multiplicado pela diluição em que foi contado. O valor gerado foi multiplicado por 5, uma vez que foi utilizado 1/5 do homogenato dos mosquitos para as diluições experimentais. O resultado da titulação foi expresso em PFU/mosquito.

## 2.7 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Células A549 WT e C6/36 foram semeadas em placas de 96 poços (ver Tabela 1). No dia seguinte, as células foram infectadas, conforme Seção 2.3, com MOI 0,01, 0,1 e 1 e analisadas em diferentes tempos: 0 (imediatamente após o período de adsorção do vírus), 24, 48, 72, 96 e 120h para as células A549, e 150h para células C6/36. As placas foram então incubadas em estufa húmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o cada período de infecção a viabilidade celular foi analisada utilizando os ensaios de MTT e Vermelho neutro. Em todas as placas do ensaio, foram incluídos os controles em branco (somente meio) e *mock* (células não infectadas). Ambas as condições experimentais foram feitas em quadruplicatas biológicas.

### 2.7.1 Ensaio de MTT

O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) mede a viabilidade celular com base no dano induzido nas mitocôndrias. O princípio deste método é a avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais, quantificadas pela redução do MTT (um sal de coloração amarela solúvel em água) à formazan (cristais de coloração púrpura, insolúveis em água) (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998; KOISHI et al., 2012).

Após cada tempo de infecção, o SBN foi removido e adicionados a cada poço 150 µl de MTT a uma concentração de 0,5 mg/mL em meio DMEM (para células A549) e L-15 (para células C6/36), em ambiente protegido da luz devido a fotossensibilidade do reagente. As placas foram envoltas em papel alumínio e mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 3h. Após o período de incubação, o meio foi removido e 150µl de DMSO foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan formados. Após

a total dissolução, foi realizado a leitura a 540 nm em uma leitora de ELISA BioTek ELX800.

Os dados foram obtidos em densidade óptica e normalizados seguindo a equação de viabilidade celular (Fórmula 2). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis. Protocolo adaptado de (KOISHI et al., 2012).

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\text{valor da amostra} - \text{controle branco})}{(\text{mock} - \text{controle branco})} \times 100 \quad (2)$$

### 2.7.2 Ensaio de Vermelho neutro (N/R)

O ensaio de Vermelho Neutro (N/R, do inglês, “*neutral red*”) mede a viabilidade celular com base na atividade lisossomal. Células viáveis com lisossomos funcionais retêm o N/R dentro destas estruturas (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998; KOISHI et al., 2012).

Ao término de cada tempo de infecção, o SBN foi removido e o reagente N/R a 0,33% em meio DMEM (para células A549) e L-15 (para células C6/36) foi adicionado a cada poço, seguido pela incubação por 3 h a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio foi removido e 150 µl de solução extratora (ver p. 109) foram adicionados a cada poço e incubados sob agitação até a completa dissociação do corante N/R. Posteriormente, a leitura foi realizada a 540 nm em uma leitora de ELISA BioTek ELX800. Os dados obtidos foram normalizados e a viabilidade celular foi calculada conforme descrito na Seção 2.7.1.

## 2.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

### 2.8.1 Extração de RNA e síntese de cDNA (RT-PCR)

A extração de RNA foi realizada com o reagente Trizol, de acordo com as recomendações do fabricante, e o RNA extraído foi armazenado à -80 °C até sua utilização. O RNA foi mensurado através do Nanodrop Lite (Thermo scientific®), sendo utilizados 500 ng de RNA para tratamento com DNase I, de acordo com as recomendações do fabricante. A RT-PCR foi realizada através da enzima M-MLV produzida no laboratório. Cada reação de RT-PCR continha: 4µl de RT Buffer 5X (ver

p. 109), 1,25µl de dNTP mix (10 mM), 2 µl de DTT (0,1 mM), 0,5 µl de Random Primers (100 ng/µl), 0,5 µl de M-MLV, diluídos em água ultrapura em quantidade suficiente para completar 20 µl. Após a síntese, as amostras de cDNA foram armazenadas à -20 °C.

## 2.8.2 PCR em Tempo Real (qPCR)

Todos os experimentos de qPCRs foram feitos com o kit *Gotaq qPCR Master Mix*, com adaptações às recomendações do fabricante. Cada reação continha: 5 µl de SYBR Green, 100 ou 200 nM de cada um dos iniciadores, 0,1 µl de CXR e 2 µl de cDNA (diluído 20 vezes em água ultrapura), completados com água ultrapura até atingir 10 µl. Os iniciadores usados para detecção de cada gene, bem como suas concentrações e teste de eficiência, estão listados na **Tabela 2**. Todas as reações foram preparadas em placas do tipo MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems®), e a reação foi realizada no equipamento Applied Biosystems StepOne™ PCR System.

**Tabela 2. Iniciadores utilizados na reação de qPCR.**

Gene	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Eficiência	Concentração
<i>hGAPDH</i>	Fwd	TCGGAGTCAACGGATTTGGT	94%	100nM
	Rev	TGAAGGGGTCATTGTATGGCA		
<i>hIFNL1</i>	Fwd	TTCCAAGCCCACCACAACCTG	103%	100nM
	Rev	GAGTGACTCTTCCAAGGCGT		
<i>hIFNB1</i>	Fwd	AAACTCATGAGCAGTCTGCA	99%	100nM
	Rev	AGGAGATCTTCAGTTTCCGGAGG		
<i>hISG15</i>	Fwd	TCCTGGTGAGGAATAACAAGGG	100%	100nM
	Rev	TCAGCCAGAACAGGTCGTC		
<i>hIFIT1</i>	Fwd	GCAGCCAAGTTTTACCGAAG	110%	100nM
	Rev	AGCCCTATCTGGTGATGCAG		
<i>hIFIT2</i>	Fwd	GACACGGTTAAAGTGTGGAGG	97%	100nM
	Rev	TCCAGACGGTAGCTTGCTATT		
<i>hIFIT3</i>	Fwd	AGAAAAGGTGACCTAGACAAAGC	90%	100nM
	Rev	CCTTGTAGCAGCACCCAATCT		
<b>ZIKV 3'UTR</b>	Fwd	ATGTTGTCAGGCCTGCTAGTC	90%	200nM
	Rev	TTCTTCCGTGCCATGGCGTT		
<b>ZIKV 5'UTR</b>	Fwd	TGTGTGAATCAGACTGCGACA	95%	200nM
	Rev	ACTCTCGTTTCCAAATCCAAAAT		

A transcrição do *hGAPDH* foi utilizada como controle endógeno. Os dados de *threshold*, *baseline* e *Ct* obtidos foram analisados no software StepOne™ v2.1. A

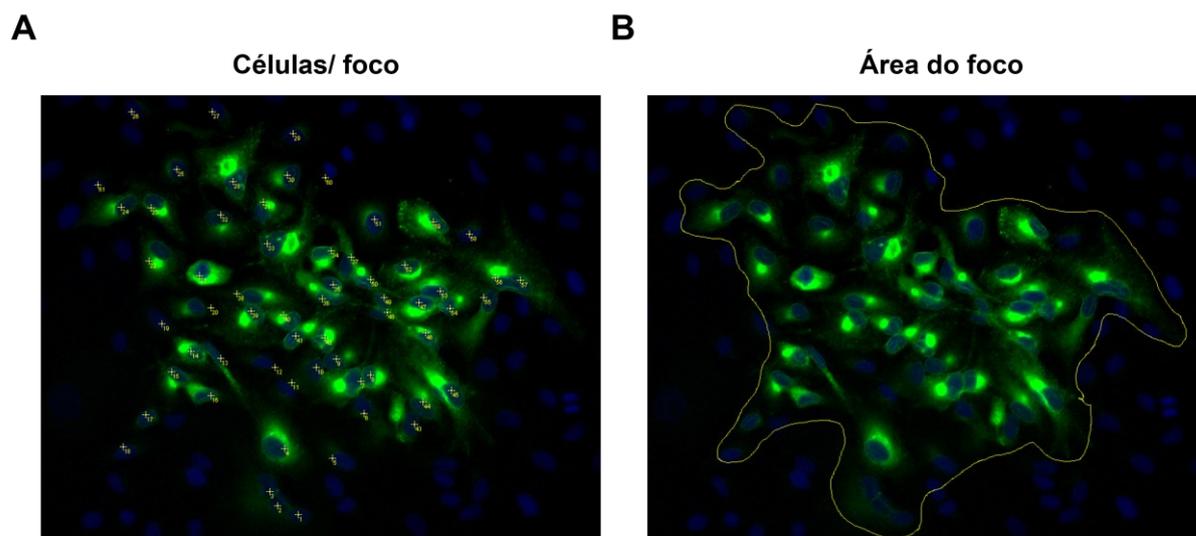
análise da expressão relativa dos genes foi realizada pelo método do  $\Delta\Delta C_T$ . Os dados foram plotados de acordo com a expressão relativa de cada gene em relação ao controle *mock* de cada experimento, ao qual foi atribuído o valor de 1.

## 2.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células foram semeadas em placas de 24 poços (ver **Tabela 1**) e infectadas com 30 PFU/poço de forma a permitir a observação de focos de infecção isolados. A incubação foi feita em meio semissólido por 36h.

Para a marcação dos focos, o meio foi removido e as células foram fixadas com PFA 3% por 20 minutos à TA. Em seguida, foi feita a permeabilização celular com 0,1% de Triton X-100 por 5 min à TA. Após isso, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e seguiram para a marcação com o anticorpo primário 4G2, diluído em PBS 1X, por 1h a 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas com o anticorpo secundário AlexaFluor 488 diluído em PBS 1X, por 1h a 37°C. Após o período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e seguiram para a marcação nuclear com 300 nM de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) por 15 min a TA. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X. As placas foram incubadas com PBS 1X à 4 °C até a visualização no microscópio invertido (Olympus IX 83). A análise e formatação das imagens foram realizadas através do software ImageJ.

Com essa técnica foi possível analisar o espalhamento viral das cepas selecionadas. Para tal, o número de células infectadas no foco e a área do foco foi mensurado conforme demonstra a **Figura 8**.



**Figura 8. Estratégias para análise do espalhamento viral**

(A) número de células no foco da infecção e (B) determinação da área do foco. Todas as fotos foram analisadas no software ImageJ. Proteína viral E (verde), núcleo marcado com DAPI (azul). Aumento 20X.

## 2.10 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento genético foi realizado em colaboração com o Dr. Tiago Gräf, pesquisador da Fiocruz – PR.

Para o sequenciamento de nova geração das passagens selecionadas, as amostras foram submetidas à extração de RNA virais com o Kit QIAamp Viral RNA Mini, de acordo com o protocolo do fabricante. Bibliotecas foram preparadas com o Kit Illumina COVIDSeq Test, conforme protocolo descrito pelo fabricante, mas utilizando-se primers de amplificação do genoma completo de ZIKV (**APÊNDICE C**), conforme descrito em (QUICK et al., 2017). Em suma, primeiramente, o cDNA foi sintetizado a partir do RNA viral e amplificado utilizando um conjunto de primers específicos para o genoma completo do ZIKV. Na etapa seguinte de tagmentação, os amplicons foram fragmentados, ligados à adaptadores e, então, amplificados novamente. Durante esta reação de amplificação, as sequências dos indexes (i5 e i7), necessárias para a identificação das amostras e geração dos clusters no sequenciamento, foram adicionadas às extremidades dos amplicons tagmentados. Posteriormente, as bibliotecas foram agrupadas, quantificadas e normalizadas. Após a etapa de desnaturação química e térmica, as bibliotecas foram submetidas ao sequenciamento na plataforma MiSeq (Illumina), utilizando o kit MiSeq Reagent Micro V2 numa configuração de 2 x 151 ciclos de amplificação e leitura dos fragmentos.

Os reads contidos nos arquivos fastq de sequenciamento foram então submetidos a um controle de qualidade e mapeamento contra o genoma NC\_035889 como referência utilizando-se o programa ViralFlow na sua configuração padrão (DEZORDI et al., 2022). As estatísticas do mapeamento dos reads das amostras selecionadas são apresentadas no **APÊNDICE F**.

Com os dados obtidos do sequenciamento, fizemos uma comparação do genoma NC\_035889 (utilizado como referência) versus MF073357.1 (genoma do ZIKV 16288/2016, nosso vírus parental). Percebemos que os genomas possuem 38 nucleotídeos diferentes, mas espalhados pelo genoma. Portanto, decidimos não reanalisar o sequenciamento com o genoma MF073357.1. Notamos que muitas mutações pontuais eram, na verdade, mutações já existentes no genoma MF073357.1, então excluimos essas alterações. Além disso, encontramos mutações comuns a todas as cepas sequenciadas, e atribuímos essas mutações ao nosso vírus parental (ZIKV-P0), uma vez que ele foi expandido em células C6/36 uma vez após o sequenciamento depositado no MF073357.1. Ao final, ficamos apenas com as mutações que não eram comuns a todas as cepas. Mutações sinônimas/ silenciosas são mostradas no **APÊNDICE G**.

## 2.11 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os resultados dos experimentos realizados *in vitro* são apresentados pela Média  $\pm$  SEM das replicatas técnicas. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por:

- Curvas de replicação do ZIKV em células A549 WT, RIGI<sup>-/-</sup> e C6/36: ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey;
- Curvas de viabilidade em células A549 WT, RIGI<sup>-/-</sup> e C6/36 infectadas com ZIKV: ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Dunnet;
- Expressão de IFNs em células A549 WT e RIGI<sup>-/-</sup> infectadas com ZIKV: ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Sidak;
- Reanalise dos dados do protocolo de seleção viral: ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste de LSD de Fisher não corrigido;

- Espalhamento viral em células A549 WT, RIGI<sup>-/-</sup>, IFNAR<sup>-/-</sup>, Huh7.5, Vero e C6/36 infectadas com as cepas de ZIKV selecionadas: ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de LSD de Fisher não corrigido;
- Quantificação viral e expressão gênica em células A549 WT e HFF infectadas com as cepas do ZIKV selecionados: ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de LSD de Fisher não corrigido.

Os resultados dos experimentos *in vivo* foram expressos pela média  $\pm$  SEM para representar o Input viral e a prevalência de mosquitos infectados, enquanto os dados da intensidade de infecção, foram expressos pela mediana com intervalo interquartil. A análise estatística entre os grupos foi avaliada por:

- Input viral: ANOVA de uma via e teste de comparações múltiplas de Tukey;
- Curva de sobrevivência: teste de Log-rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon;
- Intensidade de infecção: teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn's não corrigido;
- Prevalência da infecção: ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de LSD de Fisher não corrigido.

Nas legendas das figuras podem ser encontradas informações mais detalhadas das comparações feitas entre os grupos analisados.

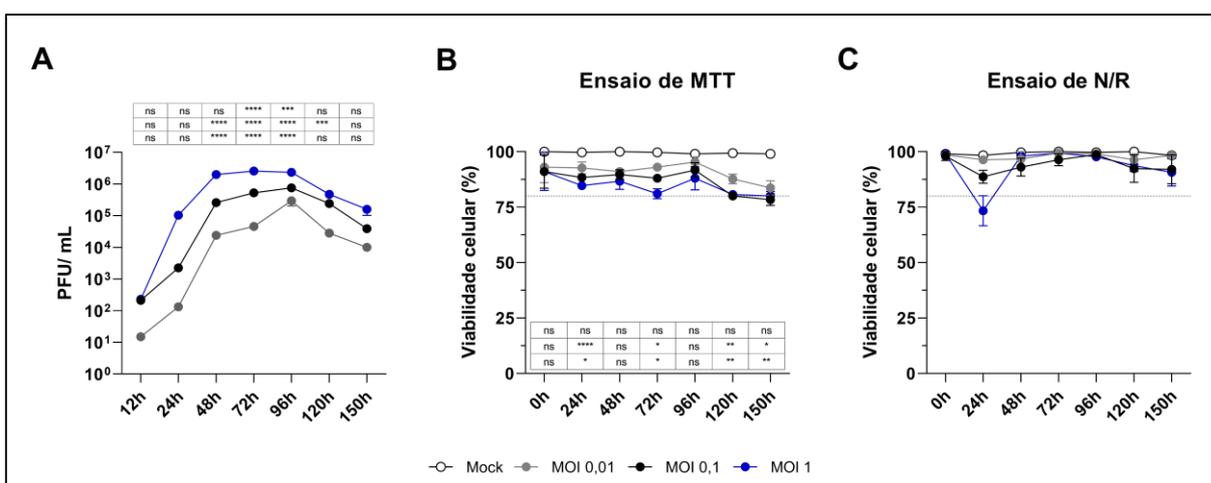
O nível de significância aceito para os testes foi de  $p < 0,05$ , sendo indicados nas legendas das figuras os graus de significância da seguinte forma: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., São Diego, Califórnia, EUA).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 PADRONIZAÇÃO DOS MODELOS DE INFECÇÃO DE ZIKV EM CÉLULAS C6/36 E A549.

A padronização dos modelos de infecção permite controlar as variáveis que podem afetar o protocolo de seleção viral (ver Seção 3.2). Para garantir uma produção viral eficiente, é fundamental manter a viabilidade das células hospedeiras, pois permite que o vírus complete o seu ciclo de replicação intracelular. Para determinar o modelo de infecção que resulta no maior pico de produção viral, mantendo a viabilidade celular acima de 80 %, células C6/36 foram infectadas por ZIKV, utilizando diferentes MOIs e tempos de infecção. A produção viral foi avaliada por ensaio de placa de lise (**Figura 9A**). Já a viabilidade celular foi mensurada pelos ensaios de MTT (**Figura 9B**) e vermelho neutro (N/R, **Figura 9C**).

Os resultados demonstram que o pico de produção viral do ZIKV em células C6/36 ocorreu em 96 hpi em ambas as MOIs analisadas. Além disso, a viabilidade das células C6/36 durante a infecção foi mantida acima de 80% por todo o tempo analisado, independente da MOI utilizada.



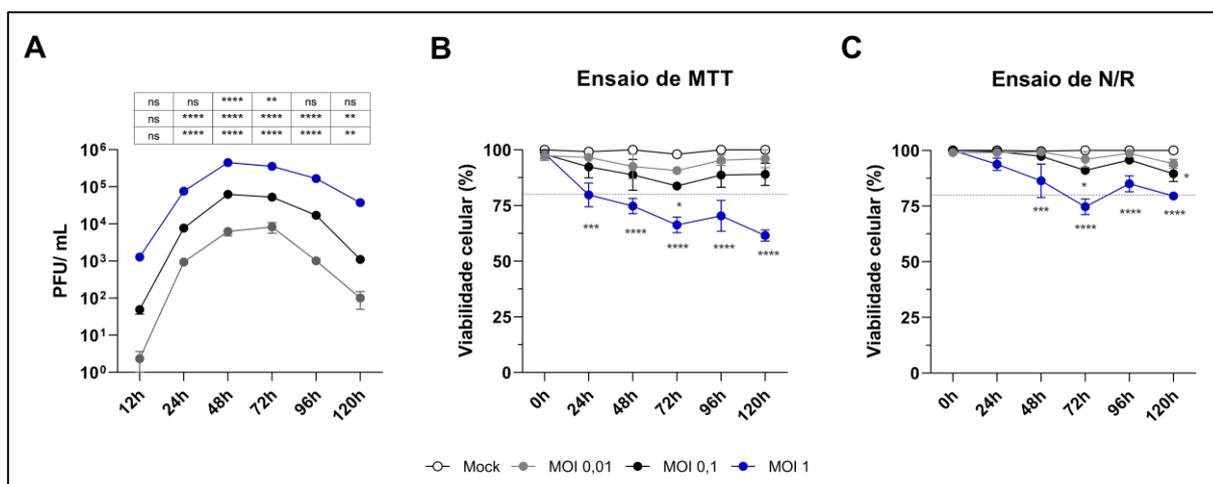
**Figura 9. Curva de replicação viral de ZIKV e viabilidade celular em células C6/36.**

Células C6/36 foram infectadas por ZIKV com diferentes MOIs em tempos de infecção. **(A)** Curva de replicação viral de ZIKV em células C6/36, avaliada por ensaio de placa de lise. **(B-C)** Curva de viabilidade de células A549 WT infectadas com ZIKV, mensurada pelos ensaios de **(B)** MTT e **(C)** Vermelho Neutro (N/R). O resultado é expresso em porcentagem relativa às células não infectadas (*Mock*). Linha tracejada representa o limite de viabilidade celular de 80%. A análise estatística da curva de replicação foi comparando as MOIs em cada tempo, enquanto a das curvas de viabilidade foi comparando todas as MOIs com o *Mock*, utilizando ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Tukey e Dunnet, respectivamente. (ns: sem diferença estatística; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ). Cada ponto representa a Média  $\pm$  SEM de triplicatas técnicas.

Diante desses resultados, o modelo de infecção escolhido que resulta no maior pico de produção viral de ZIKV, mantendo a viabilidade de células C6/36 acima de 80 % foi com MOI 0,01 por 96 hpi.

O modelo de infecção por ZIKV também foi padronizado em células A549 WT. Buscamos analisar pico de produção viral que mantém, no mínimo, 80% das células viáveis. Assim, células A549 foram infectadas por ZIKV com diferentes MOIs e tempos de infecção. A produção viral foi quantificada por ensaio de placa de lise (**Figura 10A**), e a viabilidade celular foi mensurada pelo ensaio de MTT (**Figura 10B**) e N/R (**Figura 10C**).

Os resultados demonstram que o pico de produção viral de ZIKV ocorreu em 48 hpi, independente da MOI utilizada. Além disso, a viabilidade das células A549 WT, em ambos os ensaios, se manteve acima de 80% até 120 hpi, utilizando as MOI 0,01 e 0,1. A viabilidade com MOI 1 foi mantida até 24 hpi (para o ensaio de MTT) ou 72 hpi (para o ensaio de N/R).



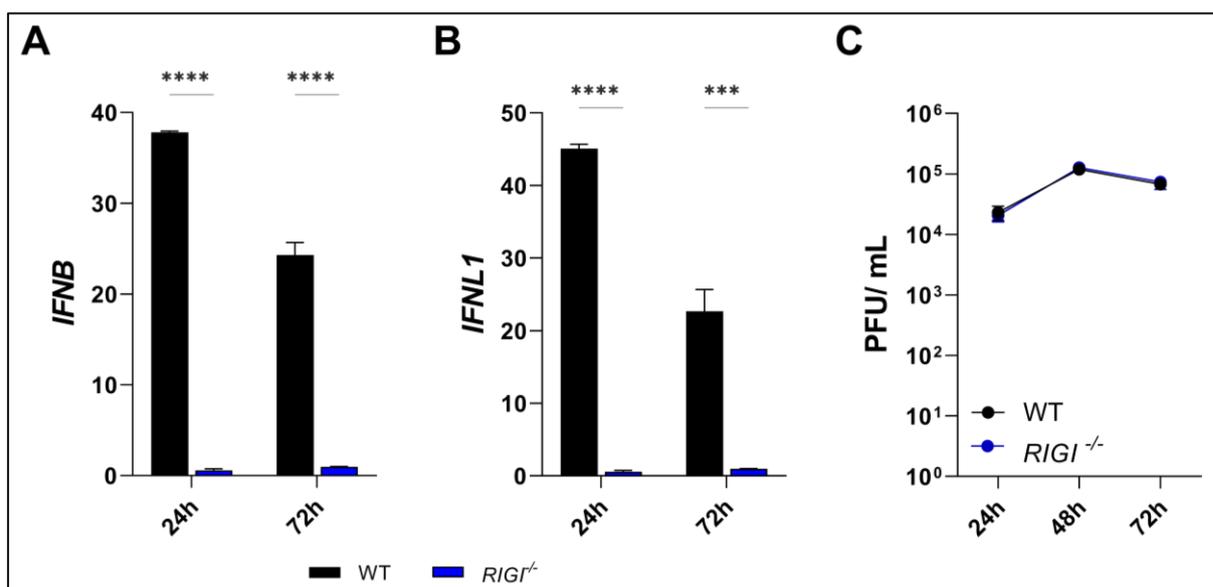
**Figura 10. Curva de replicação viral de ZIKV e viabilidade celular em células A549 WT.**

Células A549 foram infectadas por ZIKV com diferentes MOIs em tempos de infecção. **(A)** Curva de replicação viral de ZIKV em células A549 WT, avaliada por ensaio de placa de lise. **(B-C)** Curva de viabilidade de células A549 WT infectadas com ZIKV, mensurada pelos ensaios de **(B)** MTT e **(C)** Vermelho Neutro (N/R). O resultado é expresso em porcentagem relativa às células não infectadas (*Mock*). Linha tracejada representa o limite de viabilidade celular de 80%. A análise estatística da curva de replicação foi comparando as MOIs em cada tempo, enquanto a das curvas de viabilidade foi comparando todas as MOIs com o *Mock*, utilizando ANOVA de duas vias, seguida pelo teste Tukey e Dunnett, respectivamente. (ns: sem diferença estatística; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ). Cada ponto representa a Média  $\pm$  SEM de triplicatas técnicas.

Diante desses resultados, o modelo de infecção escolhido que resulta no maior pico de produção viral de ZIKV, mantendo a viabilidade de células A549 WT acima de 80 % foi com MOI 0,1 por 48 hpi.

Nós também avaliamos o modelo de infecção em células A549 *RIGI*<sup>-/-</sup>, uma vez que *RIGI* é o principal sensor citoplasmático de ZIKV (SCHILLING et al., 2020) e que o sistema imune pode ser um filtro de seleção durante a alternância de hospedeiros (FILOMATORI et al., 2017). Para confirmar que ZIKV não induz a produção de IFN-I e -III na ausência de *RIGI*, analisamos a expressão gênica de *IFNB* (Figura 11A) e *IFNL1* (Figura 11B), durante a infecção por ZIKV (MOI 0,1) por 24 e 48 h em células A549 WT e *RIGI*<sup>-/-</sup>. A expressão gênica foi realizada por qPCR. Como esperado, a infecção por ZIKV induziu a expressão de *IFNB* e *IFNL1* em células A549 WT, porém não houve indução dessas citocinas nas células A549 *RIGI*<sup>-/-</sup>.

Para confirmar se o pico de produção viral de ZIKV é semelhante entre as células A549 WT e *RIGI*<sup>-/-</sup>, foi realizado a infecção com MOI 0,1 de ZIKV por diferentes tempos e avaliado por ensaio de placa de lise (Figura 11C). Os resultados demonstram que o pico de produção viral ocorreu em 48 hpi em ambas as células analisadas. Inesperadamente, não foi observado diferença na intensidade de infecção entre as células A549 WT e *RIGI*<sup>-/-</sup>.



**Figura 11. Expressão de IFNs e replicação viral em células A549 WT e *RIGI*<sup>-/-</sup> infectadas com ZIKV.**

Células A549 WT e *RIGI*<sup>-/-</sup> infectadas por ZIKV (MOI 0,1) em diferentes tempos de infecção. Análise da expressão relativa de (A) *IFNB* e (B) *IFNL1* em células A549 WT e *RIGI*<sup>-/-</sup> infectadas por ZIKV, avaliada por qPCR. (C) Curva de replicação viral do ZIKV, determinado por ensaio de placa de lise. A expressão relativa dos genes foi calculada por  $\Delta\Delta C_T$  em relação *mock* (não infectado) e a expressão de *GAPDH* foi utilizada como controle endógeno. Valores foram expressos pela Média  $\pm$  SEM (com triplicatas técnicas). A análise estatística foi feita comparando as amostras oriundas de cada célula em cada tempo através de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Sidak. (ausência de \*: sem diferença estatística; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

Diante desses resultados concluímos que, o título viral de ZIKV em células A549 RIGI<sup>-/-</sup> não é afetado, apesar da ausência de IFN-I e -III.

Com esse conjunto de resultados foi possível padronizar os modelos de infecção por ZIKV em células C6/36, A549 WT e A549 RIGI<sup>-/-</sup>, necessários para o protocolo de seleção viral.

### 3.2 A ALTERNÂNCIA DE HOSPEDEIROS AUMENTA OS TÍTULOS VIRAIS DO ZIKV INDEPENDENTEMENTE DE RIG-I.

A alternância de hospedeiros representa um importante gargalo evolutivo, capaz de influenciar o fitness viral (DOMINGO; PERALES, 2019). Nesse contexto, RIG-I sendo o principal receptor de ZIKV (SCHILLING et al., 2020), emerge como uma pressão seletiva importante durante a transição entre hospedeiros (FILOMATORI et al., 2017; VILLORDO et al., 2015).

Para entender se RIG-I impacta no fitness do ZIKV durante a alternância de hospedeiros, foi realizado um protocolo de seleção viral, no qual células A549 WT ou RIGI<sup>-/-</sup> (hospedeiros humanos) e C6/36 (hospedeiro mosquito) foram alternadamente infectadas com o ZIKV. Esse protocolo foi dividido em duas etapas: “etapa de seleção” e “etapa de expansão”. Na etapa de seleção, onde há uma pressão seletiva no hospedeiro humano mediada por RIG-I, células A549 WT ou RIGI<sup>-/-</sup> foram primeiramente infectadas com o vírus parental, denominado “passagem zero” (ZIKV-P0), utilizando o modelo de infecção estabelecido anteriormente (MOI 0,1 por 48 h). Após o tempo de infecção, o SBN das células infectadas foi recolhido e titulado para a próxima etapa. Na etapa de expansão, onde não há interferência de citocinas antivirais, células C6/36 foram infectadas com o ZIKV oriundo do SBN das células A549 WT ou RIGI<sup>-/-</sup>, utilizando o modelo de infecção pré-estabelecido (MOI 0,01 por 96h). Após o tempo de infecção, o SBN das células infectadas foi coletado e titulado, finalizando a primeira passagem (P1). A segunda passagem inicia-se com uma nova infecção das células A549 WT ou RIGI<sup>-/-</sup>, utilizando o ZIKV oriundo do SBN das células C6/36. Esse protocolo foi realizado até finalizar 10 passagens (**Figura 12A**), utilizando triplicatas independentes.

Os títulos virais das cepas selecionadas ao longo das passagens foram quantificados por ensaio de placa de lise e plotados separadamente para as células A549 WT (**Figura 12B**); C6/36 derivado da A549 WT (**Figura 12C**); A549 RIGI<sup>-/-</sup>

(**Figura 12D**); e C6/36 derivado da A549 RIGI<sup>-/-</sup> (**Figura 12E**). Para melhor compreensão dos dados, cada replicata foi considerada como uma cepa de ZIKV e nomeadas conforme a célula que infectaram na “etapa de seleção”. Por exemplo, cepa ZIKV-W1: ZIKV selecionado em células A549 WT replicata 1; cepa ZIKV-R1: ZIKV selecionado em células A549 RIGI<sup>-/-</sup> replicata 1.

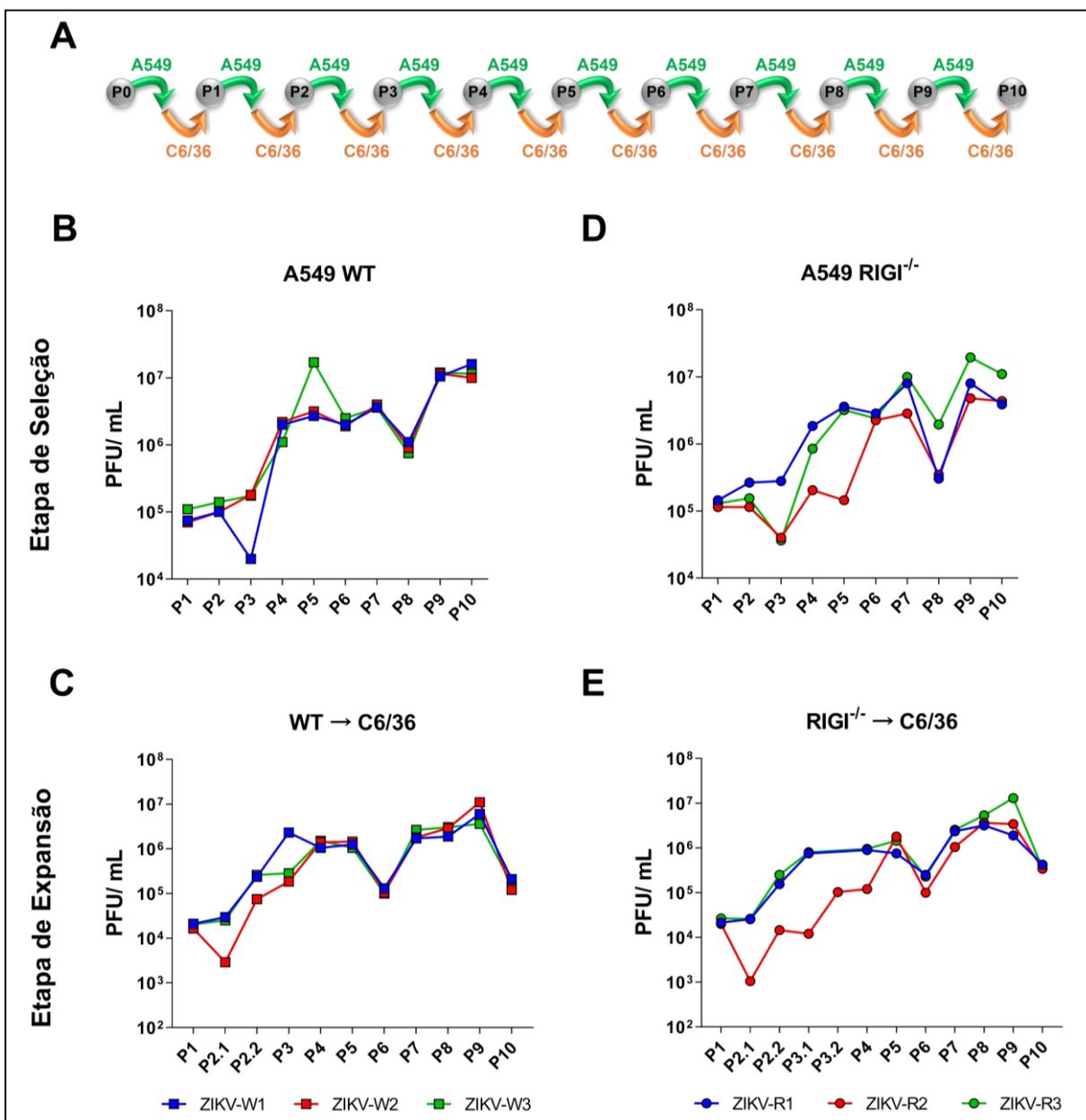
Na etapa de seleção em células A549 WT (**Figura 12B**) observou-se um aumento geral nos títulos virais no decorrer das passagens, principalmente após a P3. Além disso, foram observadas duas variações pontuais entre as cepas. A primeira variação ocorreu na P3, onde o título viral do ZIKV-W1 foi menor comparado com ZIKV-W2 e ZIKV-W3. A segunda variação ocorreu na P5, onde o ZIKV-W3 apresentou títulos virais mais elevados.

Na etapa de expansão em C6/36 com ZIKV derivado de células A549 WT (A549 WT → C6/36, **Figura 12C**), observou-se uma tendência de aumento nos títulos virais até a P9, apresentando uma diminuição na P10. Além disso, observou-se duas variações pontuais entre as replicatas. A primeira variação surgiu na P2, onde o título viral do ZIKV-W2 foi insuficiente para a próxima etapa de seleção em células A549 WT, optando-se por realizar uma nova passagem (P2.2). A segunda variação foi encontrada na P3, onde o ZIKV-W1 expressou um título viral maior em comparação com as outras replicatas.

Na etapa de seleção nas células A549 RIGI<sup>-/-</sup> (**Figura 12D**), observou-se um aumento dos títulos virais no decorrer das passagens, principalmente após a P3. No entanto, foi observado grande variabilidade entre as cepas, diferentemente do observado anteriormente nas células A549 WT. As primeiras variações surgiram na P3, onde o ZIKV-R2 e ZIKV-R3 apresentaram títulos virais menores em relação ao ZIKV-R1. Já na P4 e P5, o ZIKV-R3 recuperou seu título viral, igualando-se com o ZIKV-R1, enquanto o ZIKV-R2 continuou com títulos virais menores. Na P6, o ZIKV-R2 recuperou os seus títulos virais, mas voltou a apresentar menor infecção na P7 em comparação com as outras cepas. A partir da oitava passagem, o ZIKV-R3 manteve os títulos virais maiores até o final do protocolo de seleção.

Na etapa de expansão em C6/36 com ZIKV derivado de células A549 RIGI<sup>-/-</sup> (A549 RIGI<sup>-/-</sup> → C6/36, **Figura 12E**), notou-se um aumento nos títulos virais até a P9, seguido por uma redução na P10. O ZIKV-R2 apresentou menores títulos virais entre as cepas até a P4, necessitando de passagens adicionais (P2.2 e P3.2). Apesar das passagens adicionais, o ZIKV-R2 manteve seu título viral inferior em comparação com

as outras cepas até a P5, onde o perfil de infecção se igualou às outras cepas e permaneceram assim até a P10.



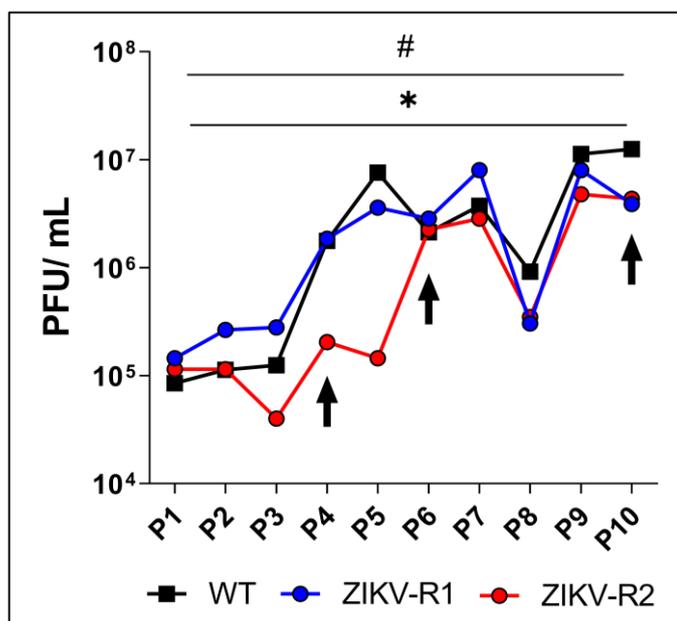
**Figura 12. A alternância de hospedeiros aumenta os títulos virais de ZIKV independentemente de RIG-I.**

(A) Fluxograma do desenho experimental representando as passagens alternadas de ZIKV entre células A549 e C6/36. (B-E) Título viral de 3 replicatas independentes das passagens alternadas entre (B) A549 WT (MOI 0,1 por 48h) e (C) C6/36 (MOI 0,01 por 96h) ou entre (D) A549 RIGI<sup>-/-</sup> (MOI 0,1 por 48h) e (E) C6/36 (MOI 0,01 por 96h). Título viral obtido por ensaio de placa de lise. Valores são expressos em Log.

De modo geral, esses resultados demonstram que a alternância de hospedeiros favorece o fitness do ZIKV, independentemente de RIG-I, aumentando os títulos virais ao longo das passagens. No entanto, o ZIKV-R2, exibiu títulos virais menores

nas primeiras passagens em comparação com as outras cepas selecionadas, sugerindo que RIG-I restringe a diversificação do ZIKV.

Com base nos resultados do protocolo de seleção viral, as cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 foram escolhidas para as análises posteriores. Na **Figura 13**, analisamos o perfil de replicação dessas cepas, ao longo das passagens e comparamos com a ZIKV-WT (média das cepas derivadas das células A549 WT). A cepa ZIKV-R2 foi escolhida devido ao seu perfil de replicação diminuído ao longo das passagens P3, P4 e P5. Por outro lado, a cepa ZIKV-R1 foi selecionada como controle, dada à sua similaridade com ZIKV-WT. As passagens P4, P6 e P10, destacadas na **Figura 13**, foram selecionadas por representarem momentos críticos na análise do perfil de replicação do ZIKV-R2. A P4 foi escolhida por ser a passagem em que se observou a maior diferença entre ZIKV-R2 e ZIKV-R1, indicando uma mudança significativa no perfil de replicação. A P6 foi selecionada por ser a passagem em que houve uma recuperação nos títulos virais da cepa ZIKV-R2. A P10 representa o final do protocolo de seleção viral, sendo crucial para a análise do impacto final das passagens no fitness viral.



**Figura 13. Comparação dos títulos virais das cepas selecionadas em células A549 WT e ZIKV-R1 e ZIKV-R2.**

Quadrados e linhas pretos indicam a média do título viral das 3 cepas selecionadas em células A549 WT no protocolo de seleção viral. Títulos virais do ZIKV-R1 (Círculos e linhas azuis) e ZIKV-R2 (círculos e linhas vermelhos) obtidos durante o protocolo de seleção viral em células A549 RIGI<sup>-/-</sup>. Título viral obtido por ensaio de placa de lise. A análise estatística foi feita comparando todos contra todos, através de ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste de LSD de Fisher não corrigido (WT vs. ZIKV-R2:  $p = 0,0455$  [#]; ZIKV-R1 vs. ZIKV-R2:  $p = 0,0453$  [\*]; WT vs. ZIKV-R1:  $p = 0,3386$ , sem diferença estatística). Flechas pretas representam as passagens escolhidas para os experimentos seguintes.

Essas cepas e passagens selecionadas permitem uma análise abrangente e detalhada sobre o impacto da alternância de hospedeiro e de RIG-I no fitness viral, fornecendo informações importantes para as próximas fases do estudo.

### 3.3 A ALTERNÂNCIA DE HOSPEDEIROS NÃO AFETA O ESPALHAMENTO VIRAL DAS CEPAS ZIKV-R1 E ZIKV-R2.

A capacidade de espalhamento do vírus para as células vizinhas é um parâmetro importante na análise do fitness viral. Portanto, o impacto da alternância de hospedeiro no fitness de ZIKV foi analisado através do espalhamento viral das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas passagens P4, P6 e P10 em diferentes células hospedeiras (A549 WT, A549 RIGI<sup>-/-</sup>, A549 IFNAR<sup>-/-</sup>, Huh7.5, Vero e C6/36) (**Figura 14**). A análise foi realizada por ensaio de imunofluorescência após 36h de incubação, utilizando 30 PFUs dos vírus em meio semissólido. A área e o número células infectadas por foco foram calculadas em relação à infecção com o vírus parental (ZIKV-P0), expresso em porcentagem.

Durante a infecção nas células A549 WT (**Figura 14A-B**), que possuem as vias de IFN-I e -III funcionais, a área e a porcentagem de células infectadas por foco foram semelhantes entre as cepas ao longo das passagens. Na P4, o ZIKV-R2 exibiu menor porcentagem de células infectadas por foco em comparação ao ZIKV-R1.

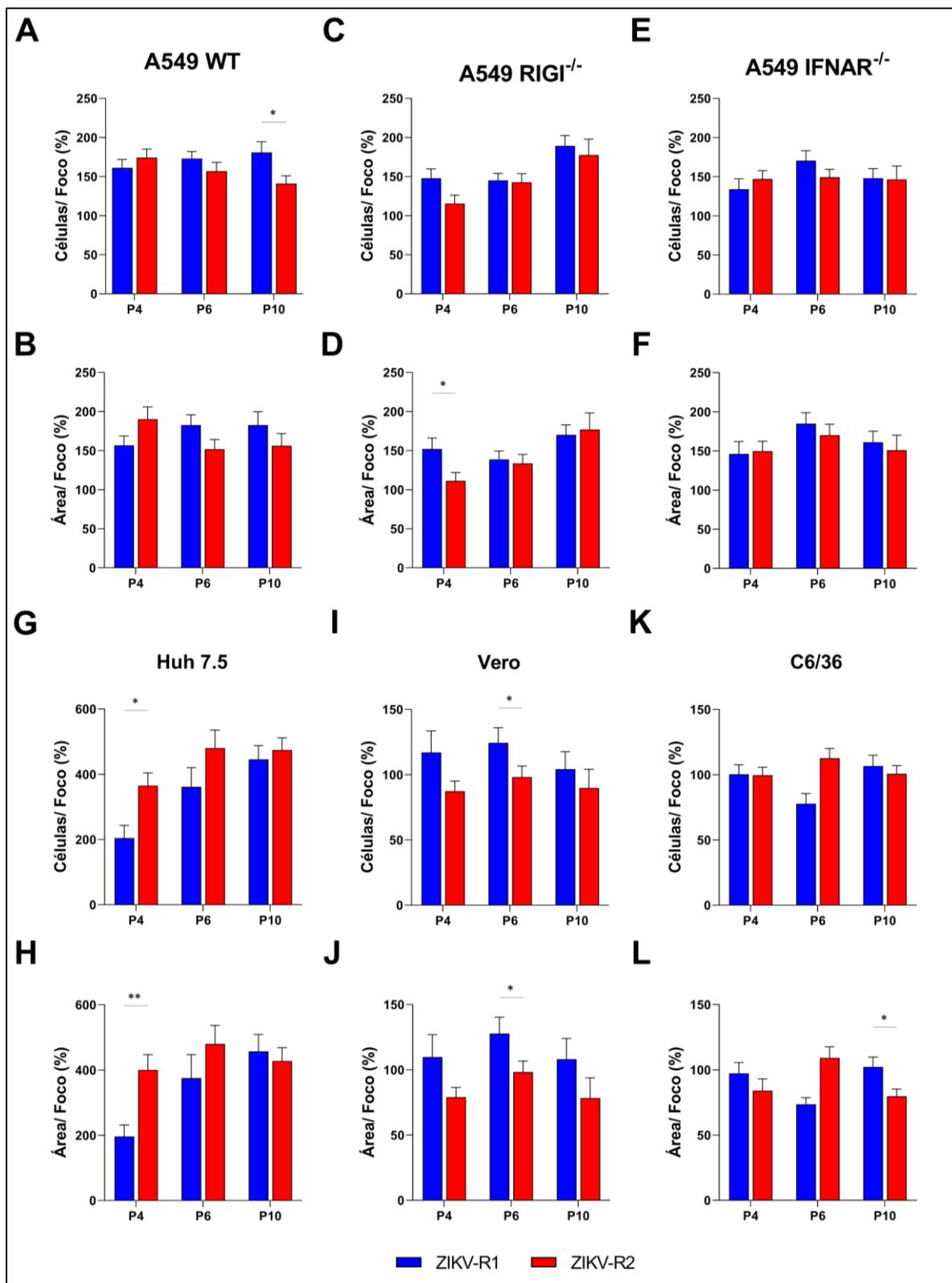
Nas células A549 RIGI<sup>-/-</sup> (**Figura 14C-D**), deficientes na expressão de IFN-I e -III, a cepa ZIKV-R2 exibiu maior área de infecção e porcentagem de células infectadas por foco. Porém, a cepa ZIKV-R1 mostrou esse aumento apenas na P10. Na P4, o ZIKV-R2 exibiu menor área e porcentagem de células infectadas por foco em comparação ao ZIKV-R1.

Nas células A549 IFNAR<sup>-/-</sup> (**Figura 14E-F**), que produzem IFN-I e -III, mas respondem apenas ao IFN-III, observou-se um fenótipo consistente na área e no número de células por foco entre as cepas e passagens.

Nas células Huh 7.5 (**Figura 14G-H**), que são células humanas que também não expressam o gene *RIGI* e conseqüentemente não produzem IFN-I e -III, a cepa ZIKV-R2 apresentou maior área e número de células infectadas por foco na P4 e P6, em comparação com ZIKV-R1.

A cepa ZIKV-R2 mostrou menor área e número de células infectadas por foco, em comparação com ZIKV-R1, nas células Vero (**Figura 14I-J**), que são derivadas de outro hospedeiro mamífero e também não expressam IFN-I.

Nas células C6/36 (**Figura 14K-L**), onde as cepas foram expandidas e que não possuem a via de RNAi funcional, o ZIKV-R2 apresentou uma maior área e número de células infectadas por foco na P6, enquanto o ZIKV-R1 exibiu um fenótipo inverso.



**Figura 14. A alternância de hospedeiros não afeta o espalhamento viral das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2.**

Análise do fitness viral através da disseminação viral via imunofluorescência. Células (A e B) A549 WT, (C e D) RIGI<sup>-/-</sup>, (E e F) IFNAR<sup>-/-</sup>, (G e H) Vero, (I e J) Huh7.5 e (K e L) C6/36 foram infectadas com 30 PFU das cepas selecionadas durante 36h. A porcentagem de células infectadas e da área do foco foi calculada em relação ao ZIKV-P0. Valores expressos pela Média  $\pm$  SEM (n=1). A análise estatística foi feita comparando ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas diferentes passagens através de ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de LSD de Fisher não corrigido (\*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

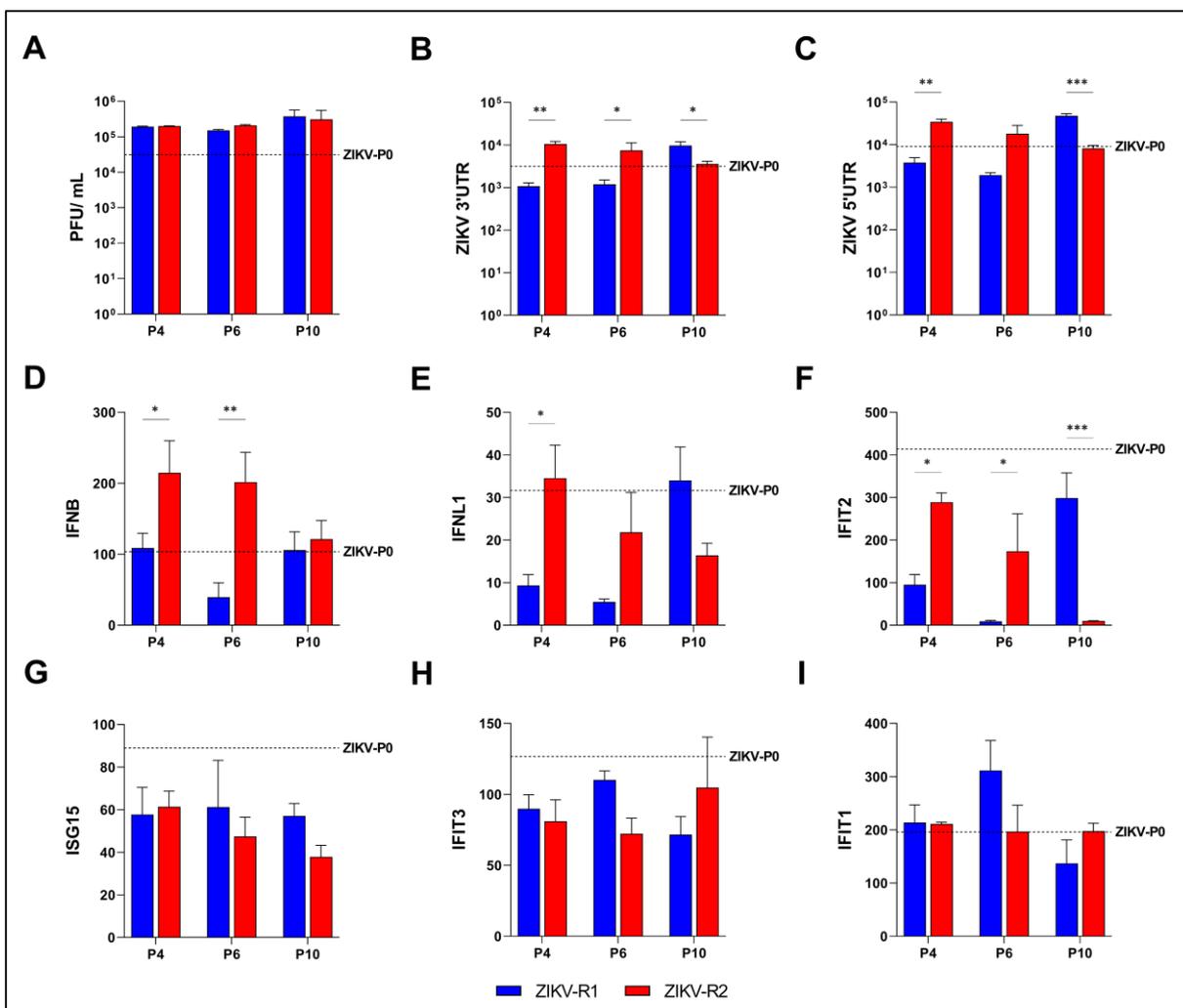
Esses resultados indicam que a alternância de hospedeiros não afetou o espalhamento viral das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas células analisadas, com exceção das células deficientes para *RIGI*.

### 3.4 AS PASSAGENS INICIAIS DA CEPA ZIKV-R2 AUMENTAM A QUANTIDADE DE RNA INTRACELULAR E A EXPRESSÃO DE IFNS E ISGS EM CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES.

A resposta antiviral das células hospedeiras é um gargalo que pode afetar o fitness viral das cepas derivadas do protocolo de seleção viral. Dessa forma, avaliamos o perfil de infecção das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas passagens P4, P6 e P10, além da ativação da resposta antiviral via IFN-I e -III em células A549 WT (**Figura 15**). As células foram infectadas utilizando MOI 0,1 por 24h. O perfil de infecção foi analisado pela quantificação de partícula viral viável no meio extracelular, através de ensaio de placa de lise, e a quantidade de RNA intracelular, através da expressão da porção 3' e 5'UTR do ZIKV, quantificado por qPCR. A ativação da resposta antiviral nas células infectadas foi determinada pela expressão gênica de *IFNB* (IFN-I), *IFNL1* (IFN-III) e dos ISGs *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3* e *ISG15*, avaliada por qPCR. Além disso, a cepa parental ZIKV-P0 foi utilizada como referência.

Na quantificação de partículas virais viáveis no meio extracelular, observamos que, independentemente das passagens, o perfil de infecção entre as cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 foi semelhante, embora ambas tenham apresentado um aumento nos títulos virais em comparação com ZIKV-P0 (**Figura 15A**). No entanto, o nível de RNA viral no meio intracelular foi maior na cepa ZIKV-R2 na P4 e P6 em comparação com o ZIKV-R1 e ZIKV-P0, invertendo o fenótipo na P10 (**Figura 15B-C**).

Na expressão dos genes relacionados à resposta de IFN-I e -III, observou-se que *IFNB* (**Figura 15D**), *IFNL1* (**Figura 15E**) e *IFIT2* (**Figura 15F**) apresentaram um perfil semelhante ao RNA de ZIKV, com a cepa ZIKV-R2 induzindo maior expressão em P4 e P6, porém menor (*IFNL1* e *IFIT2*) ou semelhante (*IFNB*) em P10. Além disso, observou-se que a expressão desses genes foi reduzida ao longo das passagens da cepa ZIKV-R2, fenótipo não observado com ZIKV-R1. A expressão dos genes *ISG15* (**Figura 15G**), *IFIT3* (**Figura 15H**) e *IFIT1* (**Figura 15I**) foi semelhante entre as cepas selecionadas. Porém, ao comparar com o ZIKV-P0, ambas as cepas apresentaram menor expressão de *ISG15* e *IFIT3*, não havendo diferença em *IFIT1*.



**Figura 15. A infecção pela cepa ZIKV-R2 em células A549 WT induz maior expressão de RNA intracelular e ativação da resposta imune antiviral.**

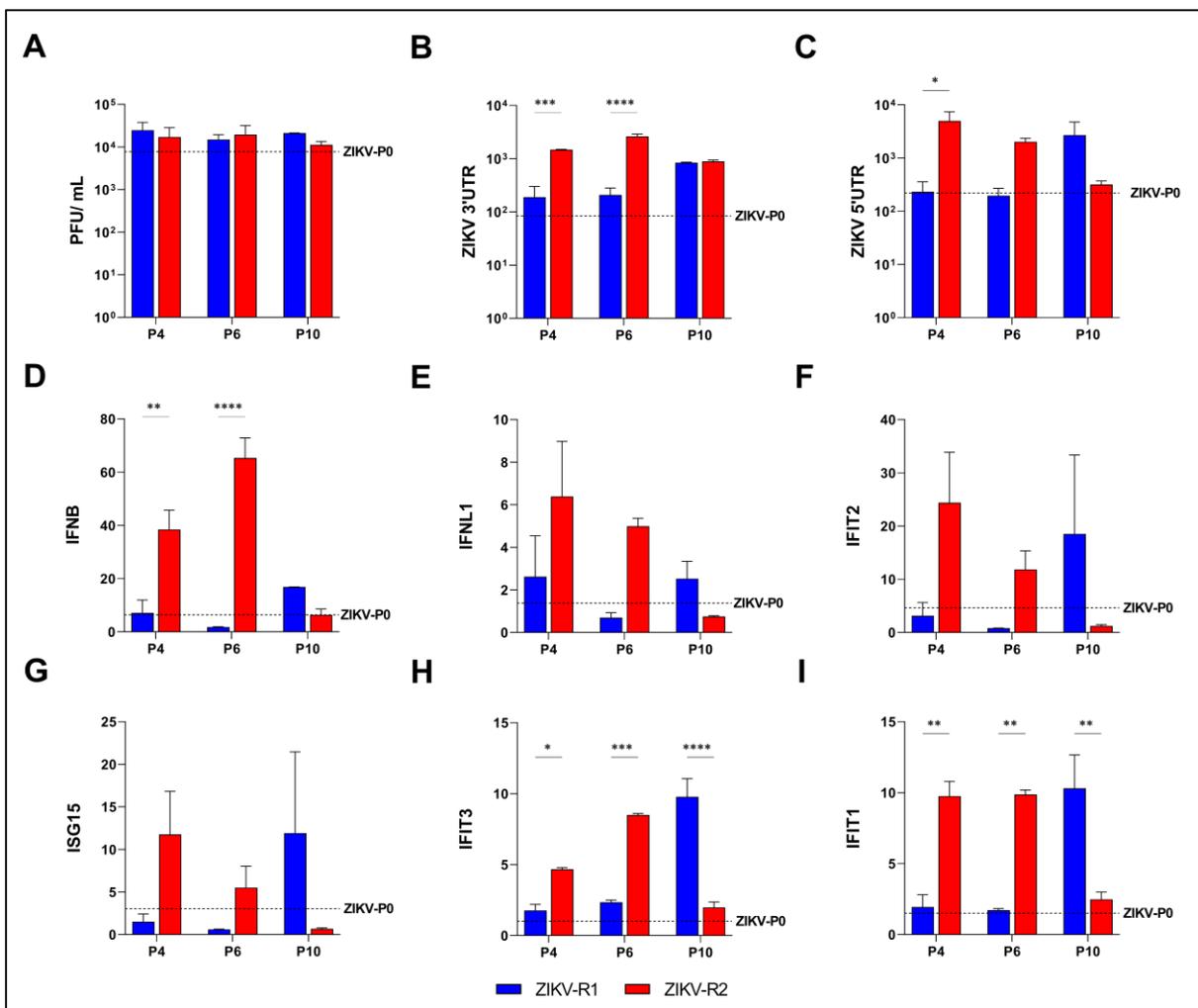
Análise da replicação viral e expressão gênica em células A549 WT infectadas com as cepas de ZIKV selecionadas. Células A549 WT infectadas com MOI 0,1 do ZIKV-R1 e ZIKV-R2 na P4, P6 e P10, e ZIKV-P0. Replicação viral extracelular mensurada pela quantificação de partículas viáveis obtidas no ensaio de placa de lise (A) Título viral. Replicação viral intracelular analisada através da expressão relativa do mRNA de (B) ZIKV 3'UTR e (C) ZIKV 5'UTR. Ativação da resposta imune antiviral mensurada através da expressão relativa do mRNA de (D) IFN $\beta$ , (E) IFN $\lambda$ 1, (F) IFIT2, (G) ISG15, (H) IFIT3 e (I) IFIT1. Expressão relativa dos genes foi calculada por  $\Delta\Delta C_T$  em relação *mock* e o mRNA de GAPDH foi utilizado como controle endógeno. A linha tracejada indica a expressão gênica ou título viral do ZIKV-P0. A análise estatística foi feita comparando ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas diferentes passagens através de ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de LSD de Fisher não corrigido (diferença estatística quando  $p \leq 0,05$ ). Valores expressos pela Média  $\pm$  SEM. Resultados representativos de dois experimentos independentes, realizados em triplicatas técnicas.

Esses resultados demonstram que a cepa ZIKV-R2 produz mais RNA intracelular nas primeiras passagens, mesmo com a indução aumentada de IFNs e ISGs, sugerindo que a alternância de hospedeiros pode influenciar o fitness viral das cepas de ZIKV.

A resposta antiviral das células HFF (fibroblastos) também foi analisada durante a infecção pelas cepas derivadas do protocolo de seleção viral, utilizando a mesma metodologia descrita para as células A549 (**Figura 16**).

Na quantificação de partículas virais viáveis no meio extracelular, observamos que o perfil de infecção entre as cepas ZIKV-R1, ZIKV-R2 e ZIKV-P0 foi semelhante, independentemente da passagem (**Figura 16A**). Em relação a quantificação do nível de RNA viral no meio intracelular, observamos maior amplificação da cepa ZIKV-R2 na P4 e P6 em comparação com o ZIKV-R1 e ZIKV-P0. Na P10, observou-se uma expressão semelhante em 3' UTR (**Figura 16B**), mas menor expressão de 5' UTR na cepa ZIKV-R2 em comparação ao ZIKV-R1 (**Figura 16C**). Ao comparar a expressão de 3' UTR do ZIKV-R2 com ZIKV-P0, observou-se maior replicação em todas as passagens, enquanto para 5' UTR, apenas na P4 e P6.

A expressão de todos os genes relacionados à resposta de IFN-I/III que foram analisados (*IFNB*, *IFNL1*, *IFIT2*, *ISG15*, *IFIT3* e *IFIT1*) apresentaram um perfil semelhante ao RNA viral (**Figura 16D-I**, respectivamente), onde a cepa ZIKV-R2 induziu maior expressão nas passagens P4 e P6, mas menor na P10 em relação com a cepa ZIKV-R1 e ZIKV-P0.



**Figura 16. A infecção pela cepa ZIKV-R2 em células HFF induz maior expressão de RNA intracelular e ativação da resposta imune antiviral.**

Análise da replicação viral e expressão gênica em células HFF infectadas com as cepas de ZIKV selecionadas. Células HFF infectadas com MOI 0,1 do ZIKV-R1 e ZIKV-R2 na P4, P6 e P10, e ZIKV-P0. Replicação viral extracelular mensurada pela quantificação de partículas viáveis obtidas no ensaio de placa de lise (A) Título viral. Replicação viral intracelular analisada através da expressão relativa do mRNA de (B) ZIKV 3'UTR e (C) ZIKV 5'UTR. Ativação da resposta imune antiviral mensurada através da expressão relativa do mRNA de (D) IFNB, (E) IFNL1, (F) IFIT2, (G) ISG15, (H) IFIT3 e (I) IFIT1. Expressão relativa dos genes foi calculada por  $\Delta\Delta C_t$  em relação *mock* e o mRNA de GAPDH foi utilizado como controle endógeno. A linha tracejada indica a expressão gênica ou título viral do ZIKV-P0. A análise estatística foi feita comparando ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas diferentes passagens através de ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de LSD de Fisher não corrigido (diferença estatística quando  $p \leq 0,05$ ). Valores expressos pela Média  $\pm$  SEM. Resultados representativos de dois experimentos independentes, realizados em triplicatas técnicas.

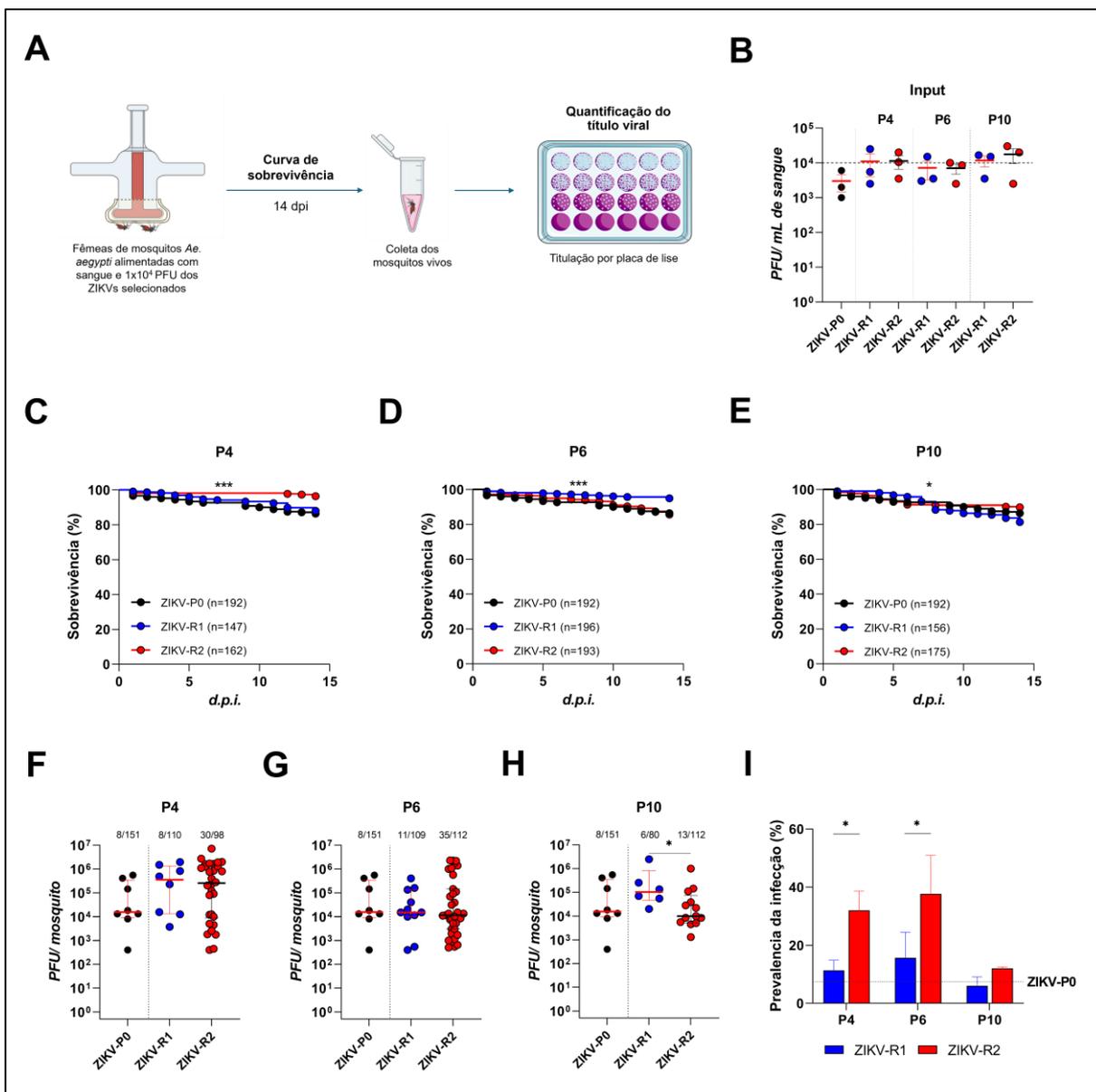
Os resultados em células HFF corroboram os achados em células A549 WT e reforçam a hipótese de que a alternância de hospedeiro alterou o fitness da cepa ZIKV-R2 ao longo das passagens.

### 3.5 A ALTERNÂNCIA DE HOSPEDEIROS AUMENTA A PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO DA CEPA ZIKV-R2 EM MOSQUITOS *Ae. AEGYPTI*

Os efeitos da alternância de hospedeiro também podem afetar o fitness dos vírus na infecção em mosquitos. Para investigar esses efeitos, avaliamos o fitness das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas passagens P4, P6 e P10 em mosquitos *Ae. aegypti* (**Figura 17**). As fêmeas dos mosquitos foram alimentadas artificialmente com RBC de sangue humano, suplementadas com  $1 \times 10^4$  PFU dos vírus e avaliadas 14 dpi. O fitness dos vírus foi avaliado pela taxa de sobrevivência diária dos mosquitos, bem como pela intensidade de infecção (perfil de replicação viral) e prevalência de infecção (número de mosquitos infectados) através do ensaio de placa de lise após 14 dias. A cepa ZIKV-P0 foi utilizada como referência.

A **Figura 17A** apresenta o esquema ilustrativo do protocolo experimental. Para garantir que os mosquitos receberam a mesma quantidade de vírus, uma alíquota da mistura RBC-vírus foi titulada por ensaio de placa de lise (**Figura 17B**). Os resultados indicam que não houve diferença nos títulos virais oferecidos para cada grupo experimental, validando assim a comparação entre as cepas virais.

Ao analisar a viabilidade dos mosquitos em cada passagem (**Figura 17C-E**), observou-se que a cepa ZIKV-R2 reduziu a mortalidade apenas na P4, enquanto a cepa ZIKV-R1 reduziu a mortalidade apenas na P6. Na P10, não se observou diferença na viabilidade dos mosquitos entre as cepas e ZIKV-P0. Em relação à intensidade de infecção em cada passagem (**Figura 17F-H**), o perfil de replicação foi similar entre as cepas. No entanto, a prevalência de infecção (**Figura 17I**) da cepa ZIKV-R2 aumentou nas passagens P4 e P6 em comparação com ZIKV-R1 e ZIKV-P0, mas na P10, a prevalência de infecção de ZIKV-R2 diminuiu para níveis semelhantes ao ZIKV-R1 e ZIKV-P0.



**Figura 17. A alternância de hospedeiros aumenta a prevalência de infecção da cepa ZIKV-R2 em mosquitos *Ae. aegypti*.**

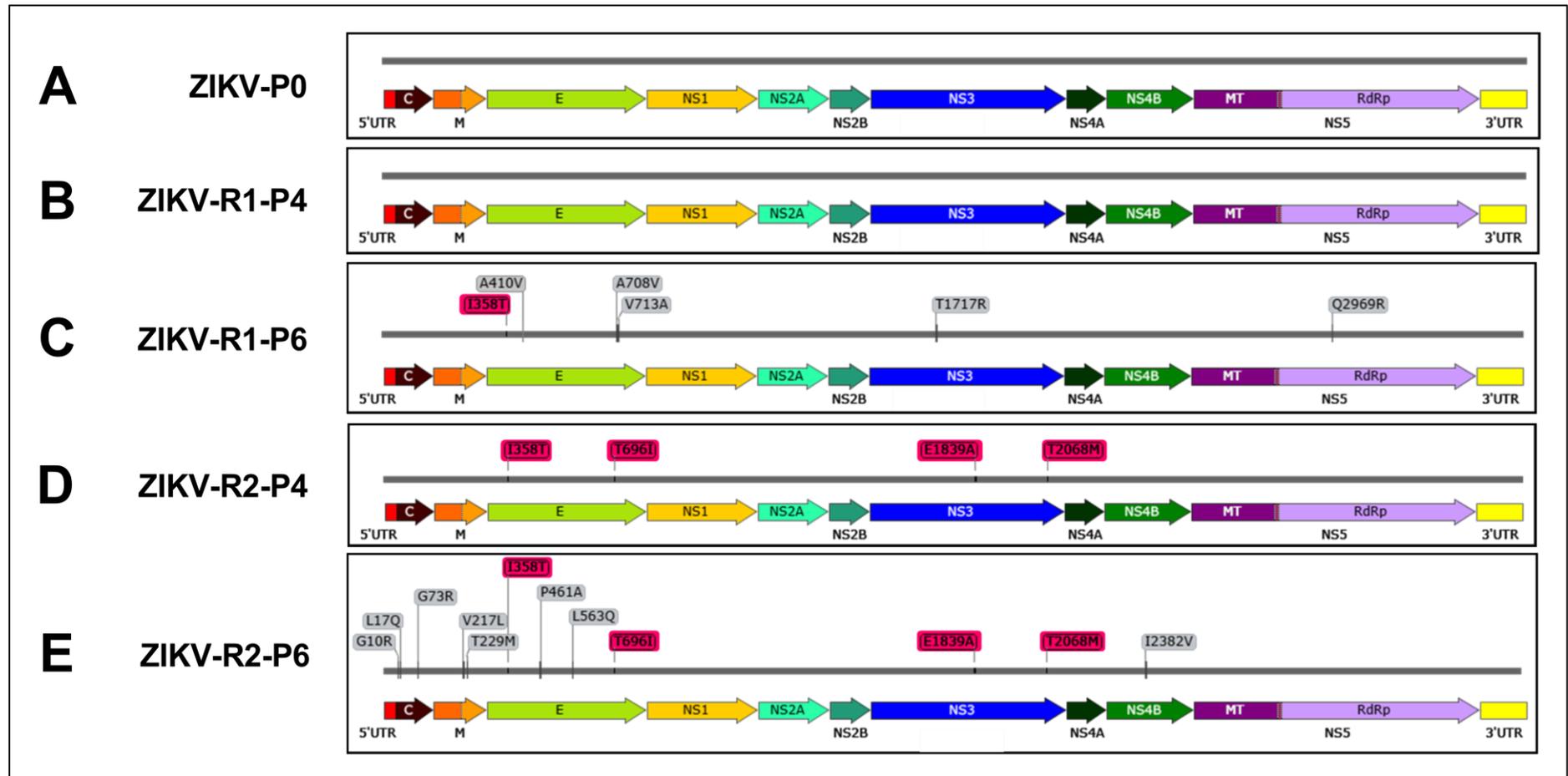
Mosquitos infectados com as cepas selecionadas de ZIKV na P4, P6 e P10 durante 14 dias. **(A)** Fluxograma do desenho experimental. **(B)** Input viral, representa a quantidade de vírus presente na alimentação oferecida aos mosquitos. **(C-D)** Curva de sobrevivência dos mosquitos infectados com as cepas selecionadas de ZIKV na P4 **(C)**, P6 **(D)** e P10 **(E)** avaliada 14 dias pós-infecção (dpi.) **(F-H)** Carga viral dos mosquitos infectados com as cepas de ZIKV selecionadas na P4 **(F)**, P6 **(G)** e P10 **(H)** 14 dpi. Cada ponto representa um mosquito individual. Título viral determinado por ensaio de placa de lise e expresso em Log de PFU/ mosquito. **(I)** Prevalência da infecção é definida como a percentagem de mosquitos positivos para os vírus (independentemente da carga viral). Valores expressos pela média  $\pm$  SEM **(B e I)** e pela mediana com intervalo interquartil **(F, G e H)** ( $n=3$ ). A análise estatística foi feita comparando **(B)** todos contra todos através de ANOVA de uma via e teste de comparações múltiplas de Tukey; **(C-D)** comparando o ZIKV-R1 com o ZIKV-R2 através do teste de Log-rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon; **(F-H)** comparando todos contra todos, através o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn's não corrigido (diferença estatística quando  $p \leq 0,05$ ) **(I)** ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de LSD de Fisher não corrigido (diferença estatística quando  $p \leq 0,05$ ). A concentração viral oferecida aos mosquitos foi de  $1,7 \times 10^4$  PFU/mL de sangue.

Os resultados indicam que a alternância de hospedeiro afetou o fitness da cepa ZIKV-R2 em mosquitos *Ae. aegypti* de maneira passagem-específica, influenciando tanto a sobrevivência dos mosquitos quanto à prevalência de infecção viral.

### 3.6 A ALTERNÂNCIA DE HOSPEDEIROS INDUZ MUTAÇÕES PONTUAIS NAS CEPAS DE ZIKV SELECIONADAS.

Os vírus de RNA possuem altas taxas de variação em seus genomas, resultado de um acúmulo de mutações que alteram o fitness, gerando variantes atenuadas ou mais virulentas. Para analisar mutações pontuais que poderiam ser responsáveis pelo aumento na prevalência de infecção da cepa ZIKV-R2 nos mosquitos, sequenciamos essa cepa, além da ZIKV-R1, nas passagens P4, P6 e P10 (**Figura 18**). A sequência localizada no GenBank (MF073357), foi utilizada como genoma de referência por ser a sequência do vírus parental (ZIKV-P0). No entanto, o sequenciamento da P10 ainda está em processamento e não pôde ser analisado.

Os resultados do sequenciamento na P4 da cepa ZIKV-R1 mostraram que não houve mutações no seu genoma. Na P6, foram observadas quatro mutações na proteína E (I358T, A410V, A708V e V713A), uma mutação na proteína NS3 (T1717R) e uma mutação na NS5 (Q2969R). Em relação à P4 da cepa ZIKV-R2, foram encontradas duas mutações na proteína E (I358T e T696I) e duas na NS3 (E1839A e T2068M). Essas quatro mutações na P4 permaneceram na P6, além de três mutações adicionais na proteína C (G10R, L17Q e G73R), duas na proteína M (V217L e T229M), duas na proteína E (P461A e L563Q) e uma na NS4B (I2382V). Comparando as duas cepas, a mutação I358T da proteína E está presente em ambas as passagens de ZIKV-R2 e na P6 de ZIKV-R1.



**Figura 18. A alternância de hospedeiros induz mutações pontuais nas cepas de ZIKV selecionadas.**

Representação esquemática das mutações não sinônimas encontradas no sequenciamento genético das cepas de ZIKV selecionadas em comparação com o ZIKV-P0. **(A)** Vírus parental (ZIKV-P0), **(B)** ZIKV-R1 na P4, **(C)** ZIKV-R1 na P6, **(D)** ZIKV-R2 na P4 e **(E)** ZIKV-R2 na P6. Mutações destacadas em rosa representam as mutações comuns entre as cepas e/ou passagens.

Os resultados do sequenciamento sugerem que mutações específicas encontradas nas passagens P4 e P6 da cepa ZIKV-R2 podem ter afetado o fitness viral, aumentando a prevalência de infecção e da resposta imune observada nas células humanas.

## 4 DISCUSSÃO

O ZIKV é um vírus de RNA que circula entre hospedeiros mamíferos e mosquitos vetores, estando sujeito a diferentes pressões seletivas nos distintos ambientes em que se replica. Por isso, é comum que durante a replicação, alterações genômicas ocorram, gerando mudanças no fitness e na infectividade viral (DOMINGO; GARCÍA-CRESPO; PERALES, 2021). Nesse contexto, a seleção viral através de passagens alternadas entre células de mosquito e humanas é uma estratégia amplamente utilizada para estudar infectividade e o fitness de arbovírus, como o ZIKV, em diferentes hospedeiros. Essa abordagem mimetiza o ciclo natural de transmissão entre vetores e hospedeiros vertebrados, permitindo a identificação de mutações adaptativas que conferem vantagens seletivas ao vírus (COFFEY; VIGNUZZI, 2011; MOLINA et al., 2023; VASILAKIS et al., 2009). Este estudo avaliou os efeitos da alternância de hospedeiro no fitness viral do ZIKV através de um protocolo de seleção viral, alternando infecções entre células A549 WT ou RIGI<sup>-/-</sup> (hospedeiros humanos) e C6/36 (hospedeiro mosquito). Demonstramos que de maneira geral, essa alternância aumenta os títulos virais ao longo das passagens, independentemente de RIG-I. Porém, a cepa ZIKV-R2 apresentou menores títulos virais nas primeiras passagens, afetando o fitness viral em diferentes células e aumentando a prevalência da infecção em mosquitos *Ae. aegypti*. Mutações pontuais observadas nas passagens P4 e P6 da cepa ZIKV-R2 podem ter impactado no aumento da prevalência de infecção dos mosquitos e na resposta imune das células humanas. Este estudo é importante para compreender a dinâmica de infecção do ZIKV nos diferentes hospedeiros, o surgimento de cepas com potencial epidêmico e para o desenvolvimento de estratégias de controle da transmissão e tratamento da infecção viral.

Com o objetivo de identificar as condições ideais para a produção viral máxima mantendo alta viabilidade celular, este estudo padronizou os modelos de infecção pelo ZIKV em três diferentes linhagens celulares: A primeira foi a C6/36, que são oriundas do estágio larval de mosquitos *Ae. albopictus* (SINGH, 1967), e são amplamente utilizadas para estudos da interação patógeno-hospedeiro de diversos arbovírus, incluindo o ZIKV (BRACKNEY et al., 2010; HITAKARUN et al., 2020; MOSER et al., 2018). A segunda linhagem foi a A549 WT, derivada de carcinoma de pulmão humano, devido à sua permissividade à infecção e por mimetizarem a primeira barreira encontrada pelos vírus ao infectar humanos (HOU et al., 2017; STROTTMANN et al.,

2019; SUDEEP; PRATIK B. VYAS; SHIL., 2019). Essas células são comumente empregadas em infecções virais *in vitro* por serem imunocompetentes, pois produzem e respondem a IFNs, além de expressarem os principais PRRs antivirais (SUDEEP; PRATIK B. VYAS; SHIL., 2019) A terceira linhagem foi a A549 RIG-I<sup>-/-</sup>, que possui a deleção do gene que codifica o principal receptor citoplasmático do ZIKV, RIG-I. Essa linhagem nos permite identificar a importância de RIG-I na seleção dos vírus ao longo do tempo.

No caso das células C6/36, utilizou-se um modelo de infecção com MOI 0,01 de ZIKV por 96h. Após esse tempo, apesar da viabilidade ainda estar alta, o título viral começa a decair. Além disso, a viabilidade acima de 80% das células C6/36 foi mantida durante todo o tempo de infecção avaliado. Esse resultado é consistente com a literatura que mostra que células de inseto, como C6/36, suportam infecções prolongadas pelo ZIKV sem perda significativa de viabilidade, o que as torna um modelo útil para estudos de infecção prolongada por ZIKV (FIGUEIREDO, 1990; MARTÍNEZ-ROJAS et al., 2020; TESLA et al., 2022). No entanto, as células C6/36 são deficientes para a via de RNAi, afetando a principal resposta imune antiviral em mosquitos, e permitindo a replicação e disseminação (BRACKNEY et al., 2010). Assim, espera-se que essas células produzam títulos virais maiores em comparação às células imunocompetentes, sendo uma vantagem ao utilizá-las em nosso estudo.

O modelo de infecção em células A549 WT foi utilizando MOI 0,1 de ZIKV por 48h, pois nessas condições tem-se o pico de replicação viral sem afetar a viabilidade celular. Alguns trabalhos apontam que o efeito citopático característico da apoptose é retardado durante a infecção com ZIKV, com efeitos típicos aparecendo 48 hpi (FRUMENCE et al., 2016; TURPIN et al., 2019). Além disso, utilizar MOIs baixas por mais tempo evita a formação excessiva de partículas defectivas. Estas podem ativar o estado antiviral das células e impedir a replicação eficiente dos vírus (LIN et al., 2022; REZELJ et al., 2021). O perfil de replicação de ZIKV observado nessas células foi semelhante nas células A549 RIG-I<sup>-/-</sup>, mesmo confirmando que a infecção não induz a expressão de *IFNB* e *IFNL1*, citocinas importantes para a indução da resposta antiviral via ISGs (SCHOGGINS, 2019). Isso sugere que apesar de RIG-I ser relevante para a detecção do ZIKV, o vírus pode ter mecanismos de evasão que permitem sua replicação eficiente (JIYAROM et al., 2023; SCHILLING et al., 2020).

O protocolo de seleção viral, alternando infecções entre células A549 WT ou RIG-I<sup>-/-</sup> (hospedeiros humanos) e C6/36 (hospedeiro mosquito), nos permitiu estudar

os efeitos da alternância de hospedeiro no fitness do ZIKV e se RIG-I impacta nesse processo. Observamos um aumento geral nos títulos virais ao longo das passagens, independentemente de RIG-I, indicando uma adaptação progressiva do ZIKV a diferentes ambientes celulares. No entanto, o perfil de replicação diferenciado da cepa ZIKV-R2 nas primeiras passagens sugerindo que RIG-I restringe a diversificação do ZIKV e que fatores específicos, como mutações pontuais, podem influenciar a replicação viral em hospedeiros imunocomprometidos. Além disso, as cepas de ZIKV selecionadas podem ter desenvolvido mecanismos para neutralizar a imunidade antiviral inata (GRASS et al., 2022). Estudos anteriores sugerem que os vírus que alternam entre hospedeiros diferentes enfrentam pressões seletivas distintas, o que pode levar à seleção de variantes virais mais adaptadas (CIOTA et al., 2007c, 2009; COFFEY; VIGNUZZI, 2011; GRASS et al., 2018, 2022).

As variações pontuais observadas entre as cepas, como os títulos virais menores do ZIKV-W1 na P3 e os títulos elevados do ZIKV-W3 na P5, destacam a importância de se considerar a variação biológica entre essas replicatas independentes, crucial para entender as dinâmicas evolutivas do vírus em diferentes condições. Estudos anteriores também relatam pequenas variações que podem levar a diferenças significativas no fitness viral ao longo do tempo (GRASS et al., 2022; RIEMERSMA et al., 2021; TALAVERA-AGUILAR et al., 2021). A diferença entre as cepas nas células A549 RIGI<sup>-/-</sup> também reflete a complexidade das interações vírus-hospedeiro e a possibilidade de diferentes trajetórias evolutivas. Os títulos crescentes observados até a P5 sugerem uma adaptação das partículas virais de menor fitness, pois é comum que durante passagens seriadas, os títulos virais atinjam um valor crítico e depois se estabilizem (ANDERSSON; HUGHES, 1996; NOVELLA et al., 1995). Segundo Eigen, esse fenômeno indica que a população pode entrar em erro catástrofe, onde as quasispécies reduzem seu fitness para evitar que mutações deletérias causem sua extinção. Uma vez que, além dos altos títulos, a taxa de mutação da população também é elevada (EIGEN, 2002; MANRUBIA; DOMINGO; LÁZARO, 2010). A queda do fitness estaria ligada ao surgimento de novas cepas por um processo aleatório, onde indivíduos com maior fitness são perdidos para que os de menor se repliquem (DOMINGO; GARCÍA-CRESPO; PERALES, 2021). No entanto, se as condições ambientais forem mantidas, uma nova fase de crescimento exponencial se inicia (WEAVER et al., 2021).

As oscilações nos títulos virais observadas durante as passagens refletem a adaptação contínua do ZIKV aos diferentes hospedeiros e ambientes celulares. Isso pode ter sido moldado pelas pressões seletivas exercidas, pelos efeitos de gargalo populacional e seleção de variantes virais mais aptas em cada passagem (GRASS et al., 2022; MOLINA et al., 2023; MOSER et al., 2018).

Para obter uma compreensão detalhada das mudanças no fitness, selecionamos as cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 para estudos *in vitro* e *in vivo* devido aos seus perfis de replicação distintos ao longo do protocolo de seleção viral. ZIKV-R2 apresentou um perfil de replicação diminuído nas primeiras passagens, enquanto ZIKV-R1 apresentou um perfil de replicação semelhante ao ZIKV-WT. A escolha das passagens P4, P6 e P10 para análises detalhadas foi fundamentada nas diferenças observadas no perfil de replicação entre as cepas selecionadas. A maior diferença na P4 sugere um impacto significativo de fatores seletivos específicos, que podem estar relacionados a mutações adaptativas ocorridas durante a infecção em células A549 RIGI<sup>-/-</sup>. O perfil de replicação semelhante entre ZIKV-R2 e ZIKV-R1 na P6 sugere uma recuperação no fitness viral de ZIKV-R2, possivelmente devido à seleção de variantes mais adaptadas ou à compensação de mutações deletérias. A literatura relata que vírus podem recuperar o fitness através de reversões ou compensações mutacionais (CALDWELL et al., 2020; JAEGER et al., 2023; RIEMERSMA et al., 2021). A análise da P10 foi crucial para entender o impacto das passagens no fitness das cepas, pois representa a fase final do protocolo de seleção viral. A manutenção do perfil de replicação semelhante entre ZIKV-R1 e ZIKV-R2 até a P10 indica que, apesar das diferenças observadas nas passagens intermediárias, ambos os vírus alcançaram um estado de equilíbrio adaptativo. Estudos sugerem que, após múltiplas passagens, os vírus podem atingir um fitness ótimo em um ambiente (COFFEY; VIGNUZZI, 2011; GRASS et al., 2022; MOSER et al., 2018; URAKI et al., 2018).

Investigamos o impacto da alternância de hospedeiros no fitness das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas passagens P4, P6 e P10, focando na capacidade de espalhamento viral em diferentes tipos de células hospedeiras. As análises foram realizadas pela área e a porcentagem de células infectadas por foco em relação à cepa referência (ZIKV-P0). Observamos que a alternância de hospedeiros pode levar à seleção de variantes virais adaptadas a ambientes específicos. A cepa ZIKV-R2, com maior fitness em condições de resposta antiviral comprometida, pode representar uma adaptação evolutiva vantajosa em certos hospedeiros, refletindo a importância

das respostas antivirais específicas de cada célula. Além da resposta imune, essas diferenças no fitness das cepas podem ser atribuídas a outros fatores das células hospedeiras como a especificidade da linhagem celular, número de passagens e variações genéticas. Esses fatores influenciam a adaptação e replicação viral, que podem resultar em variações no fitness entre diferentes linhagens celulares (HOU et al., 2017; MOSER et al., 2018; STROTTMANN et al., 2019; VICENTI et al., 2018). Nas células A549 WT, com as vias de IFN-I e -III funcionais, e nas células A549 IFNAR<sup>-/-</sup>, que produzem IFN-I e -III mas respondem apenas ao IFN-III, o fenótipo consistente entre as cepas e passagens indica que a resposta antiviral, mesmo que parcial, é suficiente nivelar as diferenças no fitness viral das cepas. Além disso, as cepas não estavam adaptadas a essas células. Já nas células A549 RIGI<sup>-/-</sup> e Huh 7.5, observamos um aumento do espalhamento viral ao longo das passagens. Isso pode ter ocorrido pois as cepas encontram um ambiente similar ao que foram adaptadas, uma vez que, essas células não possuem o gene *RIGI* e, conseqüentemente, também não produzem IFN-I e -III. Além disso, as células Huh 7.5 são altamente permissivas à infecção e suportam altos níveis de replicação viral (VICENTI et al., 2018). Em contrapartida, em células Vero e C6/36, que têm diferentes respostas antivirais, as cepas apresentaram diferentes resultados e menor capacidade de espalhamento, indicando que outros fatores além de RIG-I e IFN-I e -III podem influenciar o fitness viral. As células Vero são conhecidas por suportar altos níveis de replicação viral, enquanto nas células C6/36 os vírus têm uma taxa de replicação mais lenta e menos eficiente (HOU et al., 2017; MOSER et al., 2018). Vale ressaltar que as cepas selecionadas também passaram pela C6/36 durante o protocolo de seleção viral.

Analizamos o impacto da alternância de hospedeiros no fitness das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas passagens P4, P6 e P10 em células A549 WT e HFF. Avaliamos a quantidade de partículas virais viáveis e produção de RNA intracelular, além da expressão de genes relacionados à resposta antiviral. Observamos que a quantidade de vírus viáveis no meio extracelular foi semelhante entre as cepas selecionadas nas diferentes passagens, mas ambas apresentaram títulos virais aumentados em comparação com ZIKV-P0. Ao analisar o RNA viral intracelular, a cepa ZIKV-R2 mostrou níveis mais altos em P4 e P6, e mais baixos na P10, indicando que uma possível adaptação ocorreu ao longo das passagens e afetou a replicação viral. A diferença dos resultados na quantificação de partículas virais viáveis e de RNA intracelular demonstra que o aumento das cópias do genoma não se traduz

necessariamente em maior produção de vírus infecciosos. Estudos anteriores observaram que isso pode ocorrer devido a diferenças na montagem viral, liberação ou presença de partículas virais defeituosas (VICENTI et al., 2018; WEGER-LUCARELLI et al., 2017). Vicenti et al. (2018) observaram que, em infecções por ZIKV, um aumento nas cópias do genoma viral nem sempre resulta em um aumento proporcional na produção de vírus infecciosos, possivelmente devido à presença de partículas virais defeituosas. Weger-Lucarelli et al. (2017) relataram que diferenças na montagem e liberação viral podem explicar a discrepância entre o número de cópias do genoma e os títulos virais. Além disso, esses achados sugerem que o ZIKV-R2 pode ter acumulado partículas defectivas, denominadas DVGs (do inglês, *defective viral genomes*) e DIPs (*Defective interfering particles*) em maior proporção em relação à cepa ZIKV-R1 devido às pressões seletivas impostas no protocolo de seleção viral. Estudos anteriores demonstram que, apesar de não produzirem partículas virais infecciosas, as DVGs podem se replicar intracelularmente, porém não produzem partículas virais infecciosas (REZELJ et al., 2021; VIGNUZZI; LÓPEZ, 2019). DVGs e DIPs também são conhecidas por ativar fortemente a resposta imune inata, incluindo a produção de IFN e ISGs, como um mecanismo de defesa antiviral (FULLER; MARCUS, 1980; JOHNSTON, 1981; MARCUS; SEKELLICK, 1977; REZELJ et al., 2021). Além disso, Rezelj e colaboradores mostraram que um DVG derivado do ZIKV inibiu a replicação da partícula não-defectiva em células de mamíferos por competição de recursos celulares (REZELJ et al., 2021). Essas observações corroboram com os nossos resultados onde a cepa ZIKV-R2 nas passagens P4 e P6, além de apresentarem maiores níveis de RNA viral, também induziu maior expressão de *IFNB*, *IFNL1* e *IFIT2* em comparação com ZIKV-R1, tendo o fenótipo invertido na P10. Esse padrão sugere que ZIKV-R2 pode ter desencadeado uma resposta antiviral mais robusta nas primeiras passagens pela presença de DVGs, que não estavam presentes na P10 devido à adaptação da cepa.

A expressão semelhante observada nos genes *ISG15*, *IFIT3* e *IFIT1* sugerem que as cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 desenvolveram mecanismos distintos para modular a resposta antiviral hospedeiro. Estudos anteriores mostraram que a passagem em série de vírus pode selecionar variantes com capacidades de replicação aprimoradas ou patogenicidade alterada (BORDERÍA et al., 2015; JAEGER et al., 2023; RIEMERSMA et al., 2021; ROZEN-GAGNON et al., 2014; VAN SLYKE et al., 2015; VIGNUZZI et al., 2006). Além disso, diferentes cepas de ZIKV podem exibir níveis

variados de eficiência de replicação e indução de resposta imunológica (ÖSTERLUND et al., 2019; OU et al., 2021; STROTTMANN et al., 2019). Por exemplo, cepas de diferentes regiões geográficas induzem diferentes níveis de citocinas e ISGs em células infectadas (FRUMENCE et al., 2016; SIMONIN et al., 2016). Como citado anteriormente, as diferenças observadas em nossos resultados podem ser consequência da adaptação viral, número de passagens, alterações genéticas específicas e ao ambiente de cada linhagem celular (OLIVEIRA et al., 2023).

Na avaliação do fitness das cepas selecionadas nas diferentes passagens em mosquitos *Ae. aegypti* observamos que a cepa ZIKV-R2 reduziu a mortalidade dos mosquitos na P4 e P10, enquanto a cepa ZIKV-R1 reduziu na P6. A diminuição da mortalidade dos mosquitos indica que essas cepas podem ter adquirido adaptações que beneficiam a transmissão viral, uma vez que mosquitos com maior competência vetorial podem viver por mais tempo e disseminar o vírus com maior eficiência (AZAR; WEAVER, 2019, 2020; URAKI et al., 2018). Essa observação está alinhada com o conceito de coevolução vetor-vírus, onde os vírus evoluem para maximizar o potencial de transmissão sem comprometer gravemente a sobrevivência do vetor (GONG et al., 2018; RIEMERSMA et al., 2021; TALAVERA-AGUILAR et al., 2021). Esses resultados ressaltam a importância de se considerar os efeitos das passagens na avaliação do fitness das cepas selecionadas, assim como o observado nas análises *in vitro*. Apesar disso, uma análise por mais tempo seria importante para a robustez do resultado, nos permitindo observar a significância e a variabilidade entre as replicatas.

No perfil de replicação viral nos mosquitos *Ae. aegypti*, observamos que a intensidade de infecção foi similar entre as cepas, mas a prevalência da cepa ZIKV-R2 aumentou nas passagens P4 e P6 em comparação com ZIKV-R1, diminuindo para níveis semelhantes na P10. O aumento da prevalência da cepa ZIKV-R2 na P4 e P6 no vetor nos sugere que o vírus obteve uma adaptação positiva durante a alternância de hospedeiros. Esta adaptação pode ter ocorrido por vários fatores, incluindo maior eficiência de replicação viral, evasão da resposta imune ou aumento da estabilidade viral dentro do mosquito. Entretanto, a redução observada na P10 sugere que a alternância de hospedeiros pode ter atenuado esses efeitos ao longo de passagens.

A variação genética é um fator importante na evolução do vírus. Essa variação pode levar a alterações no fitness, como as observadas na cepa ZIKV-R2. Nesse sentido, o sequenciamento das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas passagens P4 e P6 nos forneceu informações importantes sobre as alterações genéticas que ocorreram

durante a alternância de hospedeiro. Além disso, o sequenciamento da P10 será crucial para confirmar nossa hipótese. Demonstramos que a cepa ZIKV-R1 não sofreu alterações genéticas na P4, mas observamos mutações na P6. Já a cepa ZIKV-R2, observamos mutações em ambas as passagens analisadas. Estudos anteriores utilizando arbovírus como ZIKV, DENV e WNV, mostraram que esses vírus podem sofrer alterações genéticas quando alternados entre diferentes hospedeiros, levando à seleção de cepas com melhor fitness em hospedeiros específicos, alterando a disseminação em diferentes tecidos do mosquito e aumentando a eficiência da transmissão (CIOTA et al., 2007c; LEE et al., 2011; NUNEZ-CASTILLA et al., 2020; TALAVERA-AGUILAR et al., 2021; ZHAO et al., 2012).

Os principais desafios para a sobrevivência de uma espécie viral ocorrem durante as interações com os diferentes hospedeiros, sendo então necessário o equilíbrio entre a fidelidade da replicação e a variabilidade genômica (COFFEY et al., 2011; VIGNUZZI et al., 2006). Isso garante que a transmissão da composição genética aconteça mesmo durante a construção de um reservatório de mutantes individuais, facilitando a adaptação aos diferentes ambientes encontrados durante a infecção (MANRUBIA et al., 2005).

O aumento nos títulos virais da cepa ZIKV-R1 na P4, mesmo na ausência de mutações, sugere que o vírus pode ter se adaptado ao ambiente da célula hospedeira sem alterações genéticas significativas. Na P6, a presença de mutações nos genes E, NS3 e NS5 indicam que o ZIKV-R1 também sofreu alterações genéticas significativas no protocolo de seleção viral, potencialmente contribuindo para o aumento do fitness em comparação com o ZIKV-P0. Por outro lado, o aumento no fitness viral da cepa ZIKV-R2 na P4 e P6, tanto nas células quanto nos mosquitos pode estar relacionado às mutações adquiridas durante o processo de seleção, como as observadas nas proteínas estruturais (C, M e E) e não estruturais (NS3, NS4B e NS5). Estudos anteriores demonstraram que mutações nessas proteínas podem afetar a entrada viral, a montagem das partículas virais, a interação com receptores celulares e a evasão das respostas imunes do hospedeiro, influenciando diretamente o fitness viral (COLLETTE et al., 2020; DUGGAL et al., 2019; JAEGER et al., 2023; SETOH et al., 2019; XIA et al., 2018; YOKOYAMA; STARMER, 2017; YU et al., 2021). Além disso, mutações de base única podem ser decisivas para iniciar uma epidemia, como o que aconteceu com o vírus CHINV na Ásia em 2007 (TSETSARKIN et al., 2007). Os nossos achados corroboram outros estudos que também utilizaram o ZIKV

em passagens seriadas em diferentes hospedeiros, nos quais encontraram mutações em quase todas as proteínas virais (GRASS et al., 2022; MOLINA et al., 2023; MOSER et al., 2018; TALAVERA-AGUILAR et al., 2021).

As mutações encontradas na proteína E das cepas ZIKV-R2 e ZIKV-R1 na P6 podem ter melhorado a entrada e replicação viral, uma vez que a proteína E desempenha um papel crucial na ligação viral e na fusão com células hospedeiras (COELHO BERNARDO-MENEZES et al., 2022). A presença da mutação I358T na proteína E em ambas as passagens de ZIKV-R2 e na P6 de ZIKV-R1, sugere que essa mutação pode ser importante na adaptação do vírus a novos hospedeiros. Estudos anteriores demonstraram que mutações específicas na proteína E podem aumentar a infecção viral como a N154, que afeta a glicosilação dessa proteína, levando ao aumento da replicação em células de mosquito, mas não em células humanas (CARBAUGH; BARIC; LAZEAR, 2019; GONG et al., 2018; WEN et al., 2018); a substituição S455L na proteína E, que pode aumentar a estabilidade e o dobramento das proteínas, promovendo a entrada e replicação viral (GRASS et al., 2022); e alteração no resíduos 152/156/158, que influenciam os estágios iniciais da infecção pelo ZIKV e podem ajudar o vírus a escapar das defesas do hospedeiro (CARBAUGH; BARIC; LAZEAR, 2019; GONG et al., 2018; KIM et al., 2017).

Ao comparar ZIKV-R1 e ZIKV-R2 nas diferentes passagens, observamos mutações na proteína E de ambas as cepas. Isso sugere que a essas mutações na proteína E podem ser as responsáveis por aumentar os títulos virais ao longo das passagens, mas não pelo aumento da prevalência de infecção nos mosquitos, que ocorreu apenas com a cepa ZIKV-R2. Além da proteína E, a cepa ZIKV-R2 na P4 também apresentou duas mutações na proteína NS3, a qual hipotetizamos ser a responsável pelo aumento da prevalência nos mosquitos. As mutações observadas na proteína NS3, estão localizadas no domínio C-terminal que exerce as funções de helicase, NTPase e RTPase. Essas mutações podem ter melhorado a replicação e montagem viral, aumentando a atividade dessas enzimas, levando a títulos virais mais elevados e a uma disseminação mais eficiente dentro do mosquito (GRASS et al., 2022; STROTTMANN et al., 2019). Trabalhos anteriores de evolução *in vitro* do ZIKV, detectaram mutações na proteína NS3 que foram associadas a mudanças no fitness viral, demonstrando como a seleção viral pode levar à emergência de variantes com diferentes capacidades de replicação e virulência (ALVES DO NASCIMENTO, 2021; PESSOA, 2019). Além disso, mutações específicas no domínio helicase da proteína

NS3 de DENV também alteraram a capacidade replicativa *in vitro* e *in vivo* em camundongos (DE BORBA et al., 2012). Sugerindo que essas mutações podem aumentar a ligação do dsRNA viral e modular a atividade da helicase da NS3, afetando assim a eficiência da replicação viral. Ao comparar as linhagens asiáticas pré-epidêmicas com as linhagens epidêmicas de ZIKV, observa-se que a proteína NS3, assim como a NS5, estão entre as regiões com mais ocorrência de substituição de aminoácidos (ZHU et al., 2016).

Embora as mutações na NS3 possam aumentar a replicação do ZIKV em geral, a literatura disponível não fornece uma explicação direta de como as mutações específicas da NS3 poderiam levar ao aumento da prevalência da infecção nos mosquitos, como observado neste estudo. A literatura discute como os fatores do mosquito podem influenciar a infecção pelo ZIKV. Angleró-Rodríguez et al. (2017) demonstraram que o silenciamento de genes cruciais para a replicação viral em mosquitos vetores compromete significativamente a infecção pelo ZIKV (ANGLERÓ-RODRÍGUEZ et al., 2017). Haac et al. (2015) demonstraram que a proteína de mosquitos Loquacious (Loqs) interage com a proteína NS3, sendo um fator de ligação ao dsRNA e que desempenha um papel crucial na via de RNAi em mosquitos (HAAC et al., 2015). Outros trabalhos também demonstraram que Loqs interage com a proteína NS3 e com o RNA viral, e a sua ausência reduz a replicação de DENV, ZIKV e YFV em células de mosquito, sugerindo uma função pró-viral. (BESSON et al., 2022; SHIVAPRASAD et al., 2022). A proteína Loqs2 é um parálogo de Loqs, encontrado apenas em mosquitos *Aedes*, sugerindo uma neofuncionalização dirigida por seleção positiva (ESTEVEZ-CASTRO et al., 2024). O silenciamento de Loqs2 aumenta os títulos virais de DENV e ZIKV durante a infecção sistêmica em *Ae. aegypti*, e a expressão ectópica de Loqs2 no intestino médio resulta no controle da infecção dos mesmos vírus nos mosquitos (OLMO et al., 2018). Baseado nisso, é plausível especular que Loqs é um importante fator pró-viral e que as mutações na NS3 do ZIKV-R2 tenham potencializado sua interação com Loqs2 do mosquito, aumentando sua replicação viral e a prevalência de infecção, contribuindo para os fenótipos observados. No entanto, são necessárias pesquisas mais direcionadas para testar diretamente esta hipótese.

Outra hipótese sugerida para explicar as alterações observadas na cepa ZIKV-R2, foi o surgimento de mecanismos para escapar ou suprimir as defesas imunológicas inatas do mosquito, levando a maior prevalência de infecção. O estudo

de Filomatori et al., (2017) demonstrou que as variações genômicas do DENV associadas à adaptação do mosquito estavam ligadas ao acúmulo de RNAs não codificantes específicos e ao fitness nas células humanas.

Hipotetizamos também que a cepa ZIKV-R2 pode ter aumentado o tropismo para o intestino médio dos mosquitos, melhorando sua capacidade de replicação e disseminação dentro do vetor, que resultaria no aumento da competência vetorial. O intestino médio dos mosquitos é a primeira e a mais crítica barreira anatômica durante a infecção viral. Após a ingestão do sangue infectado, o vírus deve superar a barreira do intestino médio para se replicar nas células epiteliais e, posteriormente, disseminar-se para outros tecidos, incluindo as glândulas salivares, de onde pode ser transmitido a novos hospedeiros (SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019). A presença de barreiras no intestino médio pode limitar a infecção e a disseminação do ZIKV em diferentes espécies de mosquitos (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2020; OBADIA et al., 2022; URAKI et al., 2018). Além disso, um estudo com DENV, estimou o tamanho do gargalo genético durante a infecção inicial do intestino médio dos mosquitos *Ae. aegypti*, encontrando que a infecção é iniciada por um pequeno número de genomas virais, variando de 5 a 42 (LEQUIME et al., 2016). Portanto a competência vetorial do mosquito, ou seja, sua capacidade de transmitir o vírus, não depende da quantidade de vírus que ultrapassa as barreiras, mas sim da habilidade do vírus de superar essas barreiras iniciais (AZAR; WEAVER, 2019, 2020).

Por fim, este estudo apresenta algumas limitações, como a ausência do sequenciamento genômico das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 na P10, já enviada para processamento, e a não utilização das cepas selecionadas nas células A549 WT. Além disso, análises completas da competência vetorial, como ensaios de salivação ou dissecação da glândula salivar dos mosquitos infectados forneceriam informações adicionais importantes.

Apesar dessas limitações, esse estudo fornece informações valiosas sobre como o ZIKV pode evoluir para otimizar seu fitness em diversos ambientes hospedeiros. Esses achados também ressaltam a importância de utilizar diferentes células no estudo de infecções virais. Embora as tendências gerais sejam semelhantes, os níveis específicos de replicação viral e resposta imune podem variar dependendo do tipo de célula hospedeira, destacando a importância de considerar as interações patógeno-hospedeiro. Certamente essas descobertas são relevantes para entender a dinâmica da transmissão viral e podem auxiliar no desenvolvimento de

estratégias para controlar novos surtos do ZIKV que possam surgir. Essas observações estão alinhadas com a literatura sobre a evolução e adaptação de arbovírus aos hospedeiros vetores. Estudos adicionais, como caracterização funcional da cepa ZIKV-R2, são necessários para esclarecer os mecanismos específicos que contribuem para seu melhor desempenho em mosquitos.

## 5 CONCLUSÃO

Esta tese de doutorado investigou aspectos da infecção e evolução do ZIKV em diferentes sistemas celulares e hospedeiros, fornecendo conhecimentos relevantes sobre a adaptação viral e seu impacto no fitness do vírus. As principais conclusões são:

- A alternância entre células humanas e de mosquito favoreceu o fitness do ZIKV, independentemente de RIG-I, resultando em aumento dos títulos virais ao longo das passagens.
- O fitness viral das cepas ZIKV-R1 e ZIKV-R2 é diferentemente afetado pelo tipo celular e presença de mecanismos antivirais.
- A alternância de hospedeiros afetou o fitness viral da cepa ZIKV-R2 em mosquitos *Ae. aegypti* de forma passagem-específica, influenciando a sobrevivência dos mosquitos e a prevalência da infecção viral.
- O sequenciamento genômico revelou mutações específicas, incluindo uma na porção C-terminal da proteína NS3, nas passagens P4 e P6 da cepa ZIKV-R2. Essas alterações genéticas estão potencialmente associadas a múltiplos efeitos: aumento do fitness viral, intensificação da resposta imune em células humanas e aumento da prevalência de infecção em mosquitos *Ae. aegypti*.

Em resumo, nossos resultados indicam uma adaptação viral que pode ter implicações significativas para a transmissão e patogenicidade do ZIKV. Esta pesquisa não apenas aprimora a compreensão da biologia do vírus, mas também estabelece conhecimentos para o desenvolvimento de futuras estratégias de controle e prevenção.

## 6 DESAFIOS PARA A REALIZAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO

Cabe aqui ressaltar que a presente tese de doutorado foi realizada durante um período desafiador, marcado pela pandemia de COVID-19. O início deste doutorado coincidiu com o primeiro ano da pandemia, trazendo uma série de obstáculos e contratempos que impactaram significativamente o andamento da pesquisa.

Alguns dos principais desafios enfrentados incluíram: restrições de horário e acesso aos laboratórios, limitando o tempo disponível para a condução dos experimentos; demora na chegada de reagentes; dificuldades técnicas para o estabelecimento de um clone infeccioso de ZIKV, consumindo aproximadamente um ano de esforços contínuos; problemas com o freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , comprometendo o título viral dos vírus, resultando na perda de meses de trabalho e obrigando-me a reiniciar o protocolo de seleção viral; problemas com as estufas para manter as titulações virais, resultando em titulações que não podiam ser contadas, necessitando que as mesmas fossem repetidas e, com isso, mais tempo fosse agregado.

Devido a esses contratempos e atrasos, o presente estudo foi conduzido em apenas dois anos, sendo que somente o protocolo de seleção viral levou um ano para ser concluído. Consequentemente, não foi possível realizar experimentos adicionais que poderiam ter fornecido mais robustez aos dados apresentados.

Apesar desses desafios significativos, consegui concluir esta tese de doutorado graças à perseverança, dedicação e apoio de meus orientadores, colegas e familiares. No entanto, é importante reconhecer que as circunstâncias excepcionais da pandemia de COVID-19 impuseram limitações ao escopo e à abrangência deste trabalho.

## 7 PERSPECTIVAS

Visando o término e a publicação desse trabalho, as próximas etapas consistem em:

- Realizar o sequenciamento do ZIKV-R1 e ZIKV-R2 na P10, com o objetivo de saber se as mutações presentes na P4 e P6 se mantiveram e se mais mutações surgiram;
- Analisar a competência vetorial através do ensaio de salivação dos mosquitos *Ae. aegypti* infectados com ZIKV-P0, ZIKV-R1 e ZIKV-R2, a fim de observar se essas cepas podem ser transmitidas pelo mosquito;
- Produzir um clone infeccioso de ZIKV com a mutação pontual E1839A na porção C-terminal da NS3, visando entender se essa mutação é a responsável pelos fenótipos observados;
- Realizar análises funcionais da proteína NS3 mutada; buscando entender se essa mutação pontual pode interferir na sua função de helicase;

Portanto, ao término do trabalho teremos a representação genômica de todas as cepas usadas, bem como saberemos se uma dessas mutações é a responsável pelos fenótipos encontrados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 24 fev. 2006.
- ALONSO-PALOMARES, L. A. et al. Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Intervirology**, v. 61, n. 6, p. 255–264, 1 jun. 2018.
- ALVES DO NASCIMENTO, V. **EVOLUÇÃO IN VITRO DO VÍRUS ZIKA E SEU IMPACTO SOBRE A APTIDÃO VIRAL EM DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS-IN VITRO E IN VIVO**. Manaus: Fundação Oswaldo Cruz, 2021.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Muller's ratchet decreases fitness of a DNA-based microbe. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 2, p. 906–907, 23 jan. 1996.
- ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Y. I. et al. *Aedes aegypti* molecular responses to Zika Virus: Modulation of infection by the toll and Jak/Stat immune pathways and virus host factors. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 288406, 23 out. 2017.
- ANK, N. et al. Lambda Interferon (IFN- $\lambda$ ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo. **Journal of Virology**, v. 80, n. 9, p. 4501–4509, maio 2006.
- AR, W.; KURATH, G. Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. **Current opinion in virology**, v. 2, n. 5, p. 538–545, 2012.
- ARIAS, A. et al. Molecular dissection of a viral quasispecies under mutagenic treatment: positive correlation between fitness loss and mutational load. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 817–830, 2013.
- ARIMOTO, K.-I. et al. Negative regulation of type I IFN signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 6, p. 1099–1116, 25 maio 2018.
- ARNAUD, N. et al. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 10, p. 1–17, 2011.
- ASHOUR, J. et al. NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation. **Journal of Virology**, v. 83, n. 11, p. 5408–5418, 2009.
- AYERS, J. B. et al. Clustered rapid induction of apoptosis limits ZIKV and DENV-2 proliferation in the midguts of *Aedes aegypti*. **Communications Biology** 2021 4:1, v. 4, n. 1, p. 1–9, 15 jan. 2021.
- AZAR, S. R.; WEAVER, S. C. Vector Competence: What Has Zika Virus Taught Us? **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 867, 17 set. 2019.
- AZAR, S. R.; WEAVER, S. C. Vector Competence Analyses on *Aedes aegypti* Mosquitoes using Zika Virus. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2020, n. 159, p. 1–7, 31 maio 2020.

BARJAS-CASTRO, M. L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, v. 56, n. 7, p. 1684–1688, jul. 2016.

BARNARD, T. R. et al. Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 5, p. 378–390, maio 2021.

BASSI, M. R. et al. Extinction of zika virus and usutu virus by lethal mutagenesis reveals different patterns of sensitivity to three mutagenic drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 9, 1 set. 2018.

BESSON, B. et al. Arbovirus-vector protein interactomics identifies Loquacious as a co-factor for dengue virus replication in *Aedes* mosquitoes. **PLoS Pathogens**, v. 18, n. 9, 1 set. 2022.

BIDET, K.; GARCIA-BLANCO, M. A. Flaviviral RNAs: Weapons and targets in the war between virus and host. **Biochemical Journal**, v. 462, n. 2, p. 215–230, 2014.

BIDET, K.; GARCIA-BLANCO, M. A. Flaviviral RNA Structures and Their Role in Replication and Immunity. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer Nature Singapore, 2018. v. 1062p. 45–62.

BORDERÍA, A. V. et al. Initial fitness recovery of HIV-1 is associated with quasispecies heterogeneity and can occur without modifications in the consensus sequence. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

BORDERÍA, A. V. et al. Group Selection and Contribution of Minority Variants during Virus Adaptation Determines Virus Fitness and Phenotype. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 5, p. 1–20, 5 maio 2015.

BORDIGNON, J. et al. Dengue neurovirulence in mice: Identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 10, p. 1506–1517, 1 out. 2007.

BRACKNEY, D. E. et al. C6/36 *Aedes albopictus* Cells Have a Dysfunctional Antiviral RNA Interference Response. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, p. e856, out. 2010.

BUTANTAN. **Butantan trabalha no desenvolvimento de vacina contra Zika para prevenir microcefalia em recém-nascidos**. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/butantan-trabalha-no-desenvolvimento-de-vacina-contr-zika-para-prevenir-microcefalia-em-recem-nascidos>>. Acesso em: 11 jun. 2024.

CALDWELL, H. S. et al. West Nile Virus fidelity modulates the capacity for host cycling and adaptation. **Journal of General Virology**, v. 101, n. 4, p. 410–419, 18 fev. 2020.

CAMPBELL, C. L. et al. *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 17 mar. 2008.

- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885, 1 set. 2015.
- CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1084–1086, jun. 2014.
- CARBAUGH, D. L.; BARIC, R. S.; LAZEAR, H. M. Envelope Protein Glycosylation Mediates Zika Virus Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 93, n. 12, 15 jun. 2019.
- CHAMBERS, T. J. et al. FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. **Microbiol**, v. 44, p. 649–688, 1990.
- CHENG, G. et al. Mosquito defense strategies against viral infection. **Trends in Parasitology**. v.32, n. 3, p.177-182, 2016.
- CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicology in Vitro**, v. 12, n. 3, p. 251–258, 1 jun. 1998.
- CHIRAMEL, A. I. et al. TRIM5 $\alpha$  Restricts Flavivirus Replication by Targeting the Viral Protease for Proteasomal Degradation. **Cell Reports**, v. 27, n. 11, p. 3269- 3283.e6, jun. 2019.
- CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Zika virus transmission by Brazilian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is virus dose and temperature-dependent. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 9, p. e0008527, set. 2020.
- CIOTA, A. T. et al. Cell-specific adaptation of two flaviviruses following serial passage in mosquito cell culture. **Virology**, v. 357, n. 2, p. 165–174, 20 jan. 2007a.
- CIOTA, A. T. et al. Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 3, p. 865–874, mar. 2007b.
- CIOTA, A. T. et al. Adaptation of two flaviviruses results in differences in genetic heterogeneity and virus adaptability. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2398–2406, set. 2007c.
- CIOTA, A. T. et al. Experimental passage of St. Louis encephalitis virus in vivo in mosquitoes and chickens reveals evolutionarily significant virus characteristics. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, 17 nov. 2009.
- COELHO BERNARDO-MENEZES, L. et al. An overview of Zika virus genotypes and their infectivity. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 55, 2022.
- COFFEY, C. L.; VIGNUZZI, M. Host Alternation of Chikungunya Virus Increases Fitness while Restricting Population Diversity and Adaptability to Novel Selective Pressures. **Journal of Virology**, v. 85, n. 2, p. 1025–1035, 2011.

COFFEY, L. L. et al. Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 38, p. 16038–16043, 20 out. 2011.

COLDBECK-SHACKLEY, R. C.; EYRE, N. S.; BEARD, M. R. The Molecular Interactions of ZIKV and DENV with the Type-I IFN Response. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 530, 14 set. 2020.

COLLETTE, N. M. et al. Single Amino Acid Mutations Affect Zika Virus Replication In Vitro and Virulence In Vivo. **Viruses**, v. 12, n. 11, p. 1295, 12 nov. 2020.

CONSOLI, R. A. G. B.; DE OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: SciELO, 1994.

COSTELLO, A. et al. Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 6, p. 406- 406A, 1 jun. 2016.

CROTTY, S.; CAMERON, C. E.; ANDINO, R. RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 12, p. 6895–6900, 2001.

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

DE BORBA, L. et al. Synergistic interactions between the NS3(hel) and E proteins contribute to the virulence of dengue virus type 1. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 4, p. e1624, 2012.

DECKARD, D. T. et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 14, p. 372–374, 15 abr. 2016.

DEZORDI, F. Z. et al. ViralFlow: A Versatile Automated Workflow for SARS-CoV-2 Genome Assembly, Lineage Assignment, Mutations and Intrahost Variant Detection. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 217, 1 fev. 2022.

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

DOMINGO, E. Genetic variation and quasi-species. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 2, n. 1, p. 61–63, fev. 1992.

DOMINGO, E. et al. Basic concepts in RNA virus evolution. **FASEB J.**, p. 859–64, 1996.

DOMINGO, E. Rna Virus Mutations. **Annual review of microbiology**, v. 51, p. 151–178, 1997.

DOMINGO, E. et al. Quasispecies Structure and Persistence of RNA Viruses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 8, p. 521–7, 1998.

DOMINGO, E. et al. Viruses as quasispecies: biological implications. Em: **Current topics in microbiology and immunology**. Berlin: Springer, 2006. v. 299p. 51–82.

DOMINGO, E. et al. Viral fitness: history and relevance for viral pathogenesis and antiviral interventions. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 2, 1 mar. 2019.

DOMINGO, E.; GARCÍA-CRESPO, C.; PERALES, C. Annual Review of Virology Historical Perspective on the Discovery of the Quasispecies Concept. **The Annual Review of Virology**, v. 8, p. 51–72, 2021.

DOMINGO, E.; PERALES, C. Viral quasispecies. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 10, p. e1008271, 17 out. 2019.

DOMINGO, E.; SHELDON, J.; PERALES, C. Viral Quasispecies Evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 159–216, 1 jun. 2012.

DONG, S.; KANG, S.; DIMOPOULOS, G. Identification of anti-flaviviral drugs with mosquitocidal and anti-Zika virus activity in *Aedes aegypti*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007681, 2019.

DUGGAL, N. K. et al. Mutations present in a low-passage Zika virus isolate result in attenuated pathogenesis in mice. **Virology**, v. 530, p. 19–26, 1 abr. 2019.

DUONG, V. et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 47, p. 14688–14693, 24 nov. 2015.

EIGEN, M. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. **Die Naturwissenschaften**, v. 58, n. 10, p. 465–523, 1971.

EIGEN, M. Catástrofe de erro e estratégia antiviral. **Anais da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América**, v. 99, n. 21, p. 13374–1337, 2002.

EIGEN, M.; SCHUSTER, P. Stages of emerging life--five principles of early organization. **Journal of molecular evolution**, v. 19, n. 1, p. 47–61, 1982.

ELREFAEY, A. M. E. et al. Innate Immune Antagonism of Mosquito-Borne Flaviviruses in Humans and Mosquitoes. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2116, 20 out. 2021.

ELSHAHAWI, H.; HASSAN, S. S.; BALASUBRAMANIAM., V. Importance of Zika Virus NS5 Protein for Viral Replication. **Pathogens**, v. 8, n. 169, p. 1–12, 2019.

ESPADA, C. E. et al. ISG15/USP18/STAT2 is a molecular hub regulating IFN I-mediated control of Dengue and Zika virus replication. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 784678, 7 fev. 2024.

ESSER-NOBIS, K. et al. Comparative Analysis of African and Asian Lineage-Derived Zika Virus Strains Reveals Differences in Activation of and Sensitivity to Antiviral Innate Immunity. **Journal of Virology**, v. 93, n. 13, 24 abr. 2019.

ESTEVEZ-CASTRO, C. F. et al. Neofunctionalization driven by positive selection led to the retention of the loqs2 gene encoding an Aedes specific dsRNA binding protein. **BMC Biology**, v. 22, n. 1, p. 14, 25 jan. 2024.

FAJARDO, T. et al. The flavivirus polymerase NS5 regulates translation of viral genomic RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 9, p. 5081–5093, 21 maio 2020.

FARIA, N. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 349–353, 2016.

FAYE, O. et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 96–101, 2008.

FIGUEIREDO, L. T. M. USO DE CÉLULAS DE AEDES ALBOPICTUS C6/36 NA PROPAGAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DAS FAMÍLIAS TOGAVIRIDAE, FLAVIVIRIDAE, BUNYAVIRIDAE E RHABDOVIRIDAE. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 1, p. 13–18, 1990.

FILOMATORI, C. V. et al. Dengue virus genomic variation associated with mosquito adaptation defines the pattern of viral non-coding RNAs and fitness in human cells. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 3, p. e1006265, 1 mar. 2017.

FORRESTER, N.; COFFEY, L.; WEAVER, S. Arboviral Bottlenecks and Challenges to Maintaining Diversity and Fitness during Mosquito Transmission. **Viruses**, v. 6, n. 10, p. 3991–4004, 23 out. 2014.

FORRESTER, N. L. et al. Vector-Borne Transmission Imposes a Severe Bottleneck on an RNA Virus Population. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002897, 13 set. 2012.

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

FRANZ, A. W. E. et al. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3741, 8 jul. 2015.

FREIRE, C. C. DE M. et al. NS1 codon usage adaptation to humans in pandemic Zika virus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, 1 maio 2018.

FRUMENCE, E. et al. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- $\beta$  production and apoptosis induction. **Virology**, v. 493, p. 217–226, 1 jun. 2016.

FULLER, F. J.; MARCUS, P. I. Interferon induction by viruses. IV. Sindbis virus: early passage defective-interfering particles induce interferon. **The Journal of general virology**, v. 48, n. 1, p. 63–73, 1980.

- GACK, M. U. et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. **Nature**, v. 446, n. 7138, p. 916–920, 28 abr. 2007.
- GALLEGO, I. et al. Resistance of high fitness hepatitis C virus to lethal mutagenesis. **Virology**, v. 523, n. June, p. 100–109, 2018.
- GÖERTZ, G. P. et al. Functional RNA during Zika virus infection. **Virus Research**, v. 254, p. 41–53, 2 ago. 2018.
- GÓMEZ, M. et al. Aedes aegypti and Ae. albopictus microbiome/virome: new strategies for controlling arboviral transmission? **Parasites & Vectors** **2022** **15:1**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 9 ago. 2022.
- GONG, D. et al. High-Throughput Fitness Profiling of Zika Virus E Protein Reveals Different Roles for Glycosylation during Infection of Mammalian and Mosquito Cells. **iScience**, v. 1, p. 97–111, 2018.
- GRANT, A. et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 6, p. 882–890, 8 jun. 2016.
- GRASS, V. et al. Study of the interactions of Zika virus with the antiviral responses by experimental evolution. **Virologie**, v. 22, n. 2, p. 96, 2018.
- GRASS, V. et al. Adaptation to host cell environment during experimental evolution of Zika virus. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 21 out. 2022.
- GREENE, I. P. et al. Effect of alternating passage on adaptation of sindbis virus to vertebrate and invertebrate cells. **Journal of Virology**, v. 79, n. 22, p. 14253–14260, 2005.
- GREGORY, C. J. et al. Modes of Transmission of Zika Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl\_10, p. S875–S883, 16 dez. 2017.
- GRUBAUGH, N. D. et al. Genetic Drift during Systemic Arbovirus Infection of Mosquito Vectors Leads to Decreased Relative Fitness during Host Switching. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 4, p. 481–492, abr. 2016.
- GUTIÉRREZ-BUGALLO, G. et al. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 561–569, 1 abr. 2019.
- HAAC, M. E. et al. The hub protein Iquo connects the microRNA and short interfering RNA pathways in mosquitoes. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. 3688–3700, 20 abr. 2015.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 1 set. 2015.
- HARDY, J. L. et al. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. **Annual review of entomology**, v. 28, n. Volume 28, 1983, p. 229–262, 1 jan. 1983.

HITAKARUN, A. et al. Analysis of the virus propagation profile of 14 dengue virus isolates in *Aedes albopictus* C6/36 cells. **BMC Research Notes**, v. 13, n. 1, p. 481, 12 dez. 2020.

HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. **Nature** **2003 426:6962**, v. 426, n. 6962, p. 33–38, 6 nov. 2003.

HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M.; HETRU, C. Innate immunity in higher insects. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 1, p. 8–13, 1996.

HOU, W. et al. Determination of the Cell Permissiveness Spectrum, Mode of RNA Replication, and RNA-Protein Interaction of Zika Virus. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 31 mar. 2017.

HOWARD-JONES, A. R. et al. Arthropod-Borne Flaviviruses in Pregnancy. **Microorganisms** **2023**, v. 11, n. 2, p. 433, 8 fev. 2023.

HOWLEY, P. M. et al. **Fields virology: Fundamentals**. 7. ed. Philadelphia: LIPPINCOTT/WOLTERS KLUWER HEALTH, 2024. v. 4

HU, H.; FENG, Y.; HE, M.-L. Targeting Type I Interferon Induction and Signaling: How Zika Virus Escapes from Host Innate Immunity. **International Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3015, 2023.

HUANG, B. et al. Oyster Versatile IKK $\alpha$ / $\beta$ s Are Involved in Toll-Like Receptor and RIG-I-Like Receptor Signaling for Innate Immune Response. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1826, 2019.

JABLUNOVSKY, A. ; et al. The Dynamic Landscape of Capsid Proteins and Viral RNA Interactions in Flavivirus Genome Packaging and Virus Assembly. **Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 120, 28 jan. 2024.

JAEGER, A. S. et al. Gain without pain: adaptation and increased virulence of Zika virus in vertebrate host without fitness cost in mosquito vector. **Journal of Virology**, 6 out. 2023.

JAVED, F. et al. Zika virus: what we need to know? **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 3–16, jan. 2018.

JIYAROM, B. et al. RIG-I and MDA5 are modulated by bone morphogenetic protein (BMP6) and are essential for restricting Zika virus infection in human Sertoli cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1062499, 12 jan. 2023.

JOOS, B. et al. Low Human Immunodeficiency Virus Envelope Diversity Correlates with Low In Vitro Replication Capacity and Predicts Spontaneous Control of Plasma Viremia after Treatment Interruptions. **Journal of Virology**, v. 79, n. 14, p. 9026–9037, jul. 2005.

- KAPOOR, M. et al. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 32, p. 19100–19106, 1995.
- KAUTZ, T. F.; FORRESTER, N. L. RNA Virus Fidelity Mutants: A Useful Tool for Evolutionary Biology or a Complex Challenge? **Viruses**, v. 10, n. 11, 1 nov. 2018.
- KENT, T. V.; SCHRIDER, D. R.; MATUTE, D. R. Demographic history and the efficacy of selection in the globally invasive mosquito *Aedes aegypti*. **bioRxiv**, p. 2024.03.07.584008, 12 mar. 2024.
- KIM, S. Y. et al. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. **Biochemistry**, v. 56, n. 8, p. 1151, 2 fev. 2017.
- KINGSOLVER, M. B.; HUANG, Z.; HARDY, R. W. Insect Antiviral Innate Immunity: Pathways, Effectors, and Connections. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 24, p. 4921–4936, 13 dez. 2013.
- KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **FIELDS VIROLOGY 6 Edition**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2013. v. 53
- KOISHI, A. C. et al. Screening of Dengue Virus Antiviral Activity of Marine Seaweeds by an In Situ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
- KRAEMER, M. U. G. et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 854–863, 4 mar. 2019.
- KRAUER, F. et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. **PLoS Medicine**, v. 14, n. 1, 1 jan. 2017.
- KRISHNAKUMAR, V. et al. Recent Updates on Mouse Models for Human Immunodeficiency, Influenza, and Dengue Viral Infections. **Viruses**, v. 11, n. 3, 2019.
- KUMAR, A. et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. **EMBO reports**, v. 17, n. 12, p. 1766–1775, dez. 2016.
- KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687–696, 3 abr. 2007.
- LAMBRECHTS, L.; SALEH, M. C. Manipulating Mosquito Tolerance for Arbovirus Control. **Cell Host and Microbe**, v. 26, n. 3, p. 309–313, 11 set. 2019.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, ago. 2008.

- LEE, H. C. et al. Dengue type 4 live-attenuated vaccine viruses passaged in Vero cells affect genetic stability and dengue-induced hemorrhaging in mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.
- LEE, W. S. et al. Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. **Parasites & Vectors** **2019** **12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 11 abr. 2019.
- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual review of immunology**, v. 25, p. 697–743, 2007.
- LEQUIME, S. et al. Genetic Drift, Purifying Selection and Vector Genotype Shape Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity in Mosquitoes. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 6, p. e1006111, 1 jun. 2016.
- LESAGE, S. et al. Discovery of genes that modulate flavivirus replication in an interferon-dependent manner. **bioRxiv**, p. 2021.07.20.453077, 20 jul. 2021.
- LEWIS, J. et al. Intrinsic factors driving mosquito vector competence and viral evolution: a review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1330600, 21 dez. 2023.
- LI, A. et al. NS5 Conservative Site Is Required for Zika Virus to Restrict the RIG-I Signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 14 fev. 2020.
- LI, H. et al. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. **Cell Stem Cell.**, v. 19, n. 5, p. 593–98, 2016.
- LIN, M.-H. et al. Defective Interfering Particles with Broad-Acting Antiviral Activity for Dengue, Zika, Yellow Fever, Respiratory Syncytial and SARS-CoV-2 Virus Infection. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 6, 21 dez. 2022.
- LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. Em: **Fields Virology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2006.
- LING YUAN et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 358, n. 6365, 2017.
- LIU, W. J. et al. A Single Amino Acid Substitution in the West Nile Virus Nonstructural Protein NS2A Disables Its Ability To Inhibit Alpha/Beta Interferon Induction and Attenuates Virus Virulence in Mice. **Journal of Virology**, v. 80, n. 5, p. 2396–2404, mar. 2006.
- LIU, Y. et al. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature**, v. 545, n. 7655, p. 482–486, 25 maio 2017.
- LOO, Y.-M. et al. Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. **Journal of Virology**, v. 82, n. 1, p. 335, jan. 2008.

LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 219–229, 1 mar. 2001.

LU, A. Y. et al. Viral Protein Accumulation of Zika Virus Variants Links with Regulation of Innate Immunity for Differential Control of Viral Replication, Spread, and Response to Interferon. **Journal of Virology**, 10 maio 2023.

LUNDBERG, R. et al. Zika Virus Non-Structural Protein NS5 Inhibits the RIG-I Pathway and Interferon Lambda 1 Promoter Activation by Targeting IKK Epsilon. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1–20, 2019.

MANRUBIA, S. C. et al. High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. **Gene**, v. 347, n. 2, p. 273–282, 14 mar. 2005.

MANRUBIA, S. C.; DOMINGO, E.; LÁZARO, E. Pathways to extinction: beyond the error threshold. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1548, p. 1943–1952, 27 jun. 2010.

MANZONI, T. B.; LÓPEZ, C. B. Defective (Interfering) Viral Genomes Re-Explored: Impact on Antiviral Immunity and Virus Persistence. **Future Virology**, v. 13, n. 7, p. 493–503, 1 jul. 2018.

MARASCHIN, M. et al. Exploring dose–response relationships in *Aedes aegypti* survival upon bacteria and arbovirus infection. **Journal of Insect Physiology**, v. 151, p. 104573, 1 dez. 2023.

MARCUS, P. I.; SEKELLICK, M. J. Defective interfering particles with covalently linked [+/-]RNA induce interferon. **Nature**, v. 266, n. 5605, p. 815–819, 1977.

MARTÍNEZ, M. A. et al. Quasispecies Dynamics of RNA Viruses. Em: **Viruses: Essential Agents of Life**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. v. 9789400748996p. 21–42.

MARTÍNEZ-ROJAS, P. P. et al. Participation of Extracellular Vesicles from Zika-Virus-Infected Mosquito Cells in the Modification of Naïve Cells' Behavior by Mediating Cell-to-Cell Transmission of Viral Elements. **Cells**, v. 9, n. 1, 4 jan. 2020.

MCFARLANE, M. et al. Characterization of *Aedes aegypti* Innate-Immune Pathways that Limit Chikungunya Virus Replication. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2994, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Orientações integradas de vigilância e atenção à saúde no âmbito da Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional**. Brasília,: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/publicacoes/orientacoes\\_emergencia\\_gestacao\\_infancia\\_zika.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/publicacoes/orientacoes_emergencia_gestacao_infancia_zika.pdf)>. Acesso em: 10 maio. 2024.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 10 mar. 2016.

- MOLINA, B. F. et al. African ZIKV lineage fails to sustain infectivity in an in vitro mimetic urban cycle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 1421–1431, 1 set. 2023.
- MOSER, L. A. et al. Growth and adaptation of Zika virus in mammalian and mosquito cells. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 11, p. 1–19, 2018.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.
- MUÑOZ-JORDÁN, J. L. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14333, 11 nov. 2003.
- MUÑOZ-JORDÁN, J. L. et al. Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8004, jul. 2005.
- MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.
- MUSSO, D.; KO, A. I.; BAUD, D. Zika Virus Infection — After the Pandemic. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 15, p. 1444–1457, 10 out. 2019.
- NEUFELDT, C. J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 125–142, 2018.
- NOVELLA, I. S. et al. Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. **Journal of virology**, v. 69, n. 5, p. 2869–2872, 1995.
- NOVELLA, I. S. et al. Exponential Fitness Gains of RNA Virus Populations Are Limited by Bottleneck Effects. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 1668, 1999.
- NUNEZ-CASTILLA, J. et al. Exploring Evolutionary Constraints in the Proteomes of Zika, Dengue, and Other Flaviviruses to Find Fitness-Critical Sites. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, n. 0123456789, p. 399–414, 1 maio 2020.
- OBADIA, T. et al. Zika vector competence data reveals risks of outbreaks: the contribution of the European ZIKAlliance project. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2 ago. 2022.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 9, p. 20720, 6 mar. 2014.
- OLIVEIRA, F. B. C. DE et al. ZIKV Strains Elicit Different Inflammatory and Anti-Viral Responses in Microglia Cells. **Viruses**, v. 15, n. 6, p. 1250, 26 maio 2023.

OLIVEIRA, J. H.; BAHIA, A. C.; VALE, P. F. How are arbovirus vectors able to tolerate infection? **Developmental and comparative immunology**, v. 103, 1 fev. 2020.

OLMO, R. P. et al. Control of dengue virus in the midgut of *Aedes aegypti* by ectopic expression of the dsRNA-binding protein Loqs2. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1385–1393, 29 out. 2018.

ÖSTERLUND, P. et al. Asian and African lineage Zika viruses show differential replication and innate immune responses in human dendritic cells and macrophages. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 15710, 31 out. 2019.

OU, T. P. et al. Replication variance of African and Asian lineage zika virus strains in different cell lines, mosquitoes and mice. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2021.

PAHO; WHO. **Zika - weekly report, case incidence**. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/zika-weekly-en/>>. Acesso em: 16 jun. 2024.

PAHO/WHO. **Zika - PAHO / WHO | Pan American Health Organization**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/zika#INFO>>. Acesso em: 11 maio. 2024.

PATEL, J. R.; GARCÍA-SASTRE, A. Activation and regulation of pathogen sensor RIG-I. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 5, p. 513–523, 1 out. 2014.

PATRICIO, D. DE O. et al. DNA-PKcs restricts Zika virus spreading and is required for effective antiviral response. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1042463, 13 out. 2022.

PENG, Z. Y. et al. A review on Zika vaccine development. **Pathogens and Disease**, v. 82, 7 fev. 2024.

PESSOA, K. **Evolução in vitro do vírus Zika**. Manaus: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, 2019.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016.

PETTERSSON, J. H. O. et al. Re-visiting the evolution, dispersal and epidemiology of Zika virus in Asia. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 2018.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology** 2020 5:6, v. 5, n. 6, p. 796–812, 4 maio 2020.

PLOCIENNIKOWSKA, A. et al. TLR3 Activation by Zika Virus Stimulates Inflammatory Cytokine Production Which Dampens the Antiviral Response Induced by RIG-I-Like Receptors. **Journal of Virology**, v. 95, n. 10, p. 1–24, 26 abr. 2021.

POIRIER, E. Z.; VIGNUZZI, M. Virus population dynamics during infection. **Current Opinion in Virology**, v. 23, p. 82–87, 1 abr. 2017.

POSSAS, C. Zika: what we do and do not know based on the experiences of Brazil. **Epidemiology and health**, v. 38, p. e2016023, 2016.

POTISOPON, S. et al. The methyltransferase domain of dengue virus protein NS5 ensures efficient RNA synthesis initiation and elongation by the polymerase domain. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 18, p. 11642, 10 out. 2014.

POWELL, J. R. Mosquitoes on the move. **Science**, v. 354, n. 6315, p. 971–972, 25 nov. 2016.

QIU, Y. et al. Flavivirus induces and antagonizes antiviral RNA interference in both mammals and mosquitoes. **Science Advances**, v. 6, n. 6, p. 1–15, 2020.

QUICK, J. et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. **Nature Protocols**, v. 12, n. 6, p. 1261–1276, 24 maio 2017.

RAJSBAUM, R.; GARCÍA-SASTRE, A.; VERSTEEG, G. A. TRIMmunity: The roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity. **Journal of molecular biology**, v. 426, n. 6, p. 1265, 3 mar. 2014.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2016.

RATHER, I. A. et al. ZIKA virus: An emerging worldwide threat. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–7, 2017.

REZELJ, V. V. et al. Defective viral genomes as therapeutic interfering particles against flavivirus infection in mammalian and mosquito hosts. **Nature Communications 2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 16 abr. 2021.

RIEMERSMA, K. K. et al. Rapid Evolution of Enhanced Zika Virus Virulence during Direct Vertebrate Transmission Chains. **Journal of Virology**, v. 95, n. 8, 25 mar. 2021.

RODRIGUES DE SOUSA, J. et al. The innate immune response in Zika virus infection. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 2, p. e2166, 14 mar. 2021.

ROY, A. et al. Solution conformations of Zika NS2B-NS3pro and its inhibition by natural products from edible plants. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0180632, 10 jul. 2017.

ROZEN-GAGNON, K. et al. Alphavirus Mutator Variants Present Host-Specific Defects and Attenuation in Mammalian and Insect Models. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003877, 16 jan. 2014.

RÜCKERT, C. et al. Antiviral responses of arthropod vectors: an update on recent advances. **VirusDisease**, v. 25, n. 3, p. 249–260, 2014.

- RUIZ-JARABO, C. M. et al. Duration and fitness dependence of quasispecies memory. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 3, p. 285–296, 2002.
- SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: Replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 9, 2007.
- SARRATEA, M. B. et al. Zika virus NS4B protein targets TANK-binding kinase 1 and inhibits type I interferon production. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1867, n. 12, p. 130483, 1 dez. 2023.
- SAXENA, S. K. et al. Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. **VirusDisease**, v. 27, n. 2, p. 111–115, 1 jun. 2016.
- SCHILLING, M. et al. RIG-I Plays a Dominant Role in the Induction of Transcriptional Changes in Zika Virus-Infected Cells, which Protect from Virus-Induced Cell Death. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1476, 16 jun. 2020.
- SCHOGGINS, J. W. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? **Annual Review of Virology**, v. 6, n. 1, p. 567–584, 29 set. 2019.
- SCHUSTER, S.; MIESEN, P.; VAN RIJ, R. P. Antiviral RNAi in Insects and Mammals: Parallels and Differences. **Viruses**, v. 11, n. 5, p. 448, 16 maio 2019.
- SCOTT, T. W.; TAKKEN, W. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 3, p. 114–121, mar. 2012.
- SERMAN, T. M.; GACK, M. U. Evasion of Innate and Intrinsic Antiviral Pathways by the Zika Virus. **Viruses**, v. 11, n. 10, 2019.
- SETOH, Y. X. et al. Determinants of Zika virus host tropism uncovered by deep mutational scanning. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 876–887, 18 mar. 2019.
- SHARMA, V. et al. Zika virus: An emerging challenge to public health worldwide. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 4, p. 1–12, 2019.
- SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, 1 jun. 2017.
- SHIVAPRASAD, S. et al. Loquacious modulates flaviviral RNA replication in mosquito cells. **PLoS Pathogens**, v. 18, n. 4, 1 abr. 2022.
- SILVEIRA, G. F. et al. Single point mutations in the helicase domain of the NS3 protein enhance dengue virus replicative capacity in human monocyte-derived dendritic cells and circumvent the type I interferon response. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 183, n. 1, p. 114, 1 jan. 2016.
- SIMÕES, M. L.; CARAGATA, E. P.; DIMOPOULOS, G. Diverse Host and Restriction Factors Regulate Mosquito–Pathogen Interactions. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 7, p. 603–616, 1 jul. 2018.

- SIMONIN, Y. et al. Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. **EBioMedicine**, v. 12, p. 161–169, 1 out. 2016.
- SINGH, K. R. P. Cell cultures derived from larvae of *Aedes Albopictus* (Skuse) and *Aedes Aegypti* (L.). **Source: Current Science**, v. 36, n. 19, p. 506–508, 1967.
- SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467–470, 22 abr. 2016.
- SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. S10, p. S935–S944, 2017.
- SOUZA, B. S. F. et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. **Scientific Reports**, v. 6, 23 dez. 2016.
- SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, p. 191–209, 1 jan. 2019.
- STRANGE, D. P. et al. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. **mBio**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2019.
- STROTTMANN, D. M. et al. Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates from different Brazilian regions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 7, p. e190150, 1 jul. 2019.
- SUCUPIRA, P. H. F. et al. The RNAi Pathway Is Important to Control Mayaro Virus Infection in *Aedes aegypti* but not for Wolbachia-Mediated Protection. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 871, 10 ago. 2020.
- SUDEEP, A. B.; PRATIK B. VYAS, D. P.; SHIL., P. Differential susceptibility e replication potential of Vero E6, BHK-21, RD, A-549, C636 cells e *Aedes aegypti* mosquitoes to three strains of chikungunya virus. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. June, p. 771–777, 2019.
- TALAVERA-AGUILAR, L. G. et al. Infection, dissemination, and transmission efficiencies of Zika virus in *Aedes aegypti* after serial passage in mosquito or mammalian cell lines or alternating passage in both cell types. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 261, 18 maio 2021.
- TAY, M. Y. F.; VASUDEVAN., S. G. The Transactions of NS3 and NS5 in Flaviviral RNA Replication. **Springer Nature Singapore**, v. 1062, p. 147–163, 2018.
- TESLA, B. et al. Temperate Conditions Limit Zika Virus Genome Replication. **Journal of Virology**, v. 96, n. 10, 25 maio 2022.
- TSETSARKIN, K. A. et al. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. e201, dez. 2007.

TURPIN, J. et al. The ZIKA Virus Delays Cell Death Through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1338, 29 out. 2019.

URAKI, R. et al. Altered vector competence in an experimental mosquito-mouse transmission model of Zika infection. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 3, 2018.

VAN SLYKE, G. A. et al. Sequence-Specific Fidelity Alterations Associated with West Nile Virus Attenuation in Mosquitoes. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2015.

VARJAK, M. et al. Characterization of the Zika virus induced small RNA response in *Aedes aegypti* cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. e0006010, 17 out. 2017.

VASILAKIS, N. et al. Mosquitoes Put the Brake on Arbovirus Evolution: Experimental Evolution Reveals Slower Mutation Accumulation in Mosquito Than Vertebrate Cells. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 6, p. e1000467, 5 jun. 2009.

VENTURI, G. et al. An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 8, p. 30148, 25 fev. 2016.

VERSTEEG, G. A.; GARCÍA-SASTRE, A. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 508, ago. 2010.

VICENTI, I. et al. Comparative analysis of different cell systems for Zika virus (ZIKV) propagation and evaluation of anti-ZIKV compounds in vitro. **Virus Research**, v. 244, p. 64–70, 15 jan. 2018.

VIGNUZZI, M. et al. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. **Nature**, v. 439, n. 7074, p. 344–348, 19 jan. 2006.

VIGNUZZI, M.; LÓPEZ, C. B. Defective viral genomes are key drivers of the virus–host interaction. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1075–1087, 3 jun. 2019.

VILLORDO, S. M. et al. Dengue Virus RNA Structure Specialization Facilitates Host Adaptation. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004604, 30 jan. 2015.

VILLORDO, S. M.; GAMARNIK, A. V. Differential RNA Sequence Requirement for Dengue Virus Replication in Mosquito and Mammalian Cells. **Journal of Virology**, v. 87, n. 16, p. 9365–9372, 15 ago. 2013.

WANG, B. et al. Structural basis for STAT2 suppression by flavivirus NS5. **Nature Structural and Molecular Biology**, p. 1–11, 10 ago. 2020.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, n. 3, p. 69–80, jun. 2016.

WEAVER, S. C. Incrimination of mosquito vectors. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 232–233, 2020.

WEAVER, S. C. et al. Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1–12, 11 jan. 2021.

WEGER-LUCARELLI, J. et al. Development and Characterization of Recombinant Virus Generated from a New World Zika Virus Infectious Clone. **Journal of Virology**, v. 91, n. 1, 19 jan. 2017.

WEN, D. et al. N-glycosylation of viral e protein is the determinant for vector midgut invasion by flaviviruses. **mBio**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2018.

WHO. **The history of zika virus**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-history-of-zika-virus>>. Acesso em: 9 maio. 2024.

WHO. **Zika virus**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>>. Acesso em: 10 maio. 2024.

WU, Y. et al. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the cooperation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell Discovery**, v. 3, n. 1, p. 17006, 21 mar. 2017.

XIA, H. et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 414, 2018.

XING, H. et al. Zika NS2B is a crucial factor recruiting NS3 to the ER and activating its protease activity. **Virus Research**, v. 275, p. 197793, 2020.

XU, J.; CHERRY, S. Viruses and antiviral immunity in Drosophila. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, n. 1, p. 67–84, 1 jan. 2014.

XU, S. et al. Zika virus NS3 is a canonical RNA helicase stimulated by NS5 RNA polymerase. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 16, p. 8693–8707, 19 set. 2019.

YADAV, M.; DAHIYA, N.; SEHRAWAT, N. Mosquito gene targeted RNAi studies for vector control. **Functional and Integrative Genomics**, v. 23, n. 2, p. 1–29, 1 jun. 2023.

YAN, D. et al. A Single Mutation at Position 156 in the Envelope Protein of Tembusu Virus Is Responsible for Virus Tissue Tropism and Transmissibility in Ducks. **Journal of Virology**, v. 92, n. 17, 13 jun. 2018.

YAN, Y.; HILLYER, J. F. The immune and circulatory systems are functionally integrated across insect evolution. **Science Advances**, v. 6, n. 48, p. eabb3164, 27 nov. 2020.

YOKOYAMA, S.; STARMER, W. T. Possible Roles of New Mutations Shared by Asian and American Zika Viruses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 3, p. msw270, 12 jan. 2017.

YU, X. et al. A mutation-mediated evolutionary adaptation of Zika virus in mosquito and mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 42, p. e2113015118, 19 out. 2021.

YUSTE, E. et al. Drastic Fitness Loss in Human Immunodeficiency Virus Type 1 upon Serial Bottleneck Events. **Journal of virology**, v. 73, n. 4, p. 2745–51, dez. 1997.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZHANG, X. et al. Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. **mBio**, v. 10, n. 5, p. 2375–2394, 2019.

ZHANG, Z. et al. NS2B-NS3 protease from Zika virus. **Science**, v. 354, n. 6319, p. 1597–1600, 2016.

ZHAO, B. et al. Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14762, 27 mar. 2017.

ZHAO, Y.-J. et al. Adaptability of dengue-IV virus LD34 strain in KMB17 cells and biological characteristics of adapted strain. **Chin. J. Biol.**, v. 25, n. 9, p. 1135–1138, 2012.

ZHOU, Y. et al. Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. **Journal of Virology**, v. 81, n. 8, p. 3891–3903, 15 abr. 2007.

ZHU, Z. et al. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. **Emerging Microbes and Infections**, v. 5, n. 3, p. e22, 16 mar. 2016.

## APÊNDICE A – Lista de Reagentes utilizados

Tabela 3. Células usadas neste trabalho

Linhagem celular	Tipo	Origem
A549 WT	Aderente	Células epiteliais do tipo II de adenocarcinoma alveolar humano – ATCC®, CCL-185™
A549 RIGI <sup>-/-</sup>	Aderente	Células “knockout” para o gene RIGI produzidas pela Dr. Taissa Ricciardi Jorge (PATRICIO et al., 2022).
A549 IFNAR <sup>-/-</sup>	Aderente	Células “knockout” para o gene IFNAR1 produzidas pela Dr. Adara Áurea dos Santos (ESPADA et al., 2024)
Vero	Aderente	Células epiteliais de rim de macaco verde africano – ATCC®, CCL-81™
C6/36	Semi-aderente	Células de <i>Aedes albopictus</i> clone C6/36 – ATCC®, CRL-1660™
Huh 7.5	Aderente	Células de hepatocarcinoma humano – (RRID:CVCL_7927)
HFF-1	Aderente	Fibroblasto isolado de prepúcio humano – ATCC®, SCRC-1041™

Tabela 4. Reagentes utilizados neste trabalho

Produto	Fabricante/ Fornecedor	Catálogo
Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X)	Gibco™	31600
Meio Leibovitz's L-15	Sigma	L4386
Solução penicilina/estreptomicina	Gibco™	15140122
Soro fetal bovino	Gibco™	12657029
Paraformaldeído (PFA)	Invitrogen	P6148
DAPI	Invitrogen	D1306
CMC sodium salt, medium viscosity	Sigma-Aldrich	C4888
MTT	Amresco	0793
Vermelho Neuro (N/R)		
Tripsina/EDTA 0,05%	Gibco™	25300062
Trypan blue	Gibco™	15250061
Triptose	Thermo Fisher Scientific	
Solução Salina 0,9%	Eurofarma	-
PBS	Invitrogen	P4417
Cristal violeta	Sigma®	C0775
Formamida	Fluka analytical®	47680
Cloreto de sódio	Êxodo científica®	CS09714RA
Etanol absoluto	Merck®	02856
ATP	Invitrogen	
Triton X-100	Amresco	694
Trizol	Invitrogen	15596018
DNase I - kit	Invitrogen	18068-015
Gotaq qPCR Master Mix	Promega	M3001
dNTP 100mM set	Invitrogen	10297-018
DTT	Invitrogen	15508-013

<b>Random Primers</b>	Invitrogen	58875
<b>Ração canina</b>	Pedigree	-
<b>Sacarose</b>	União	-
<b>Ácido acético</b>	Vetec	2001
<b>Tris base</b>	Promega	H5135
<b>HCl</b>	Vetec	V001
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Sigma	M1028
<b>KCl</b>		
<b>Kit QIAamp Viral RNA Mini</b>	Qiagen	52904
<b>Kit Illumina COVIDSeq Test</b>	Illumina	1000000126053
<b>Kit MiSeq Reagent Micro V2</b>	Illumina	MS-102-2002

**Tabela 5. Anticorpos usados neste trabalho**

<b>Produto</b>	<b>Fabricante/ Fornecedor</b>	<b>Catálogo</b>	<b>Diluição</b>
<b>Anti-Flavivirus E protein (4G2)</b>	ICC	-	1:100 (IF)
<b>Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488</b>	Invitrogen	A-1101	1:1000 (IF)

**APÊNDICE B – Lista de Soluções utilizadas**

## 1- Solução de cristal violeta

Cristal violeta .....	2,5 g
Formamida 40 % .....	80 mL
Cloreto de sódio .....	1,7g
Etanol absoluto .....	223 mL

## 2- Solução extratora

Ácido acético .....	1%
Etanol .....	30%

## 3- RT Buffer 5X

Tris HCl (pH 8.3) .....	250mM
KCl .....	375 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	15mM

**APÊNDICE C – Iniciadores para a preparação dos pools otimizados para o sequenciamento do ZIKV.**

**Tabela 6. Pool 1 de iniciadores utilizados na reação de PCR multiplex**

Nome	Sequência	Pool
(400_1_out_L)	GACAGTTCGAGTTTGAAGCGAAAG	
(400_1_out_R)	AGTATGCACTCCCACGTCTAGT	
(400_3_out_L)	AGATGACGTCGATTGTTGGTGC	
(400_3_out_R)	TACGGTGACACAACCTCCATGT	
(400_5_out_L)	AGAACGTTAGTGGACAGAGGCT	
(400_5_out_R)	TGTGCGTCCTTGAACCTACCA	
(400_7_out_L)	TGAAGGGCGTGTCACTCCTT	
(400_7_out_R)	CGCCTCCAAGTATCCAAAGTC	
(400_9_out_L)	GCCTTAGGGGGAGTGTGATCT	
(400_9_out_R)	GAGTGGGCATTTCCTTCAGTGTG	
(400_11_out_L)	CAGCCGTTATTGGAACAGCTGT	
(400_11_out_R)	CCTGGGCCTTATCTCCATTCCA	
(400_13_out_L)	TGGCAGTGCTGGTAGCTATGAT	
(400_13_out_R)	AGAGAGAGGAGCATAAACCCCC	
(400_15_out_L)	CCCTAGCGAAGTACTCACAGCT	
(400_15_out_R)	TACACTCCATCTGTGGTCTCCC	
(400_17_out_L)	GTGGTCCATGGAAGCTAGATGC	
(400_17_out_R)	CCTCTAAGGGCCTCCTCCATTT	
(400_19_out_L)	TATGGATGAGGCCCACTTCACA	1
(400_19_out_R)	GCCATCAAGTATGACCGGCTTT	
(400_21_out_L)	AGAGACTGACGAAGACCATGCA	
(400_21_out_R)	CTCCAAAAGCCGCTCCTCTTTT	
(400_23_out_L)	CGTCTTGATGAGGAACAAGGGC	
(400_23_out_R)	AAGTGGTCACTGCATGTTGGAC	
(400_25_out_L)	CCCTGACCCTAATAGTGGCCAT	
(400_25_out_R)	CCTTCCATTTCTCTCCAGGGT	
(400_27_out_L)	AGTGCAAAGCTGAGATGGTTGG	
(400_27_out_R)	ATGTGTAGAGTTGCGGGAGAGT	
(400_29_out_L)	AGGATGTGAATCTCGGCTCTGG	
(400_29_out_R)	ATGCTGCATTGCTACGAACCTT	
(400_31_out_L)	ACAAGGGGAATTTGAAAGGCC	
(400_31_out_R)	CGTAAGTGACAACCTTGTCCGCT	
(400_33_out_L)	CAAACGAATGGCAGTCAGTGGA	
(400_33_out_R)	ATCCACACTCTGTTCCACACCA	
(400_35_out_L)	ACCACCTGGGCTGAGAACATTA	
(400_35_out_R)	ACCACTAGTCCCTCTTCTGGAG	

L: Left ; R: Right.

Fonte: (QUICK et al., 2017)

Tabela 7. Pool 2 de iniciadores utilizados na reação de PCR multiplex

Nome	Sequência	Pool
(400_2_out_L)	AAGAAAGATCTGGCTGCCATGC	
(400_2_out_R)	TGATTCCAACCAGGTTTGCGAC	
(400_4_out_L)	TCAGGTGCATAGGAGTCAGCAA	
(400_4_out_R)	GGAGCCATGAACTGACAGCATT	
(400_6_out_L)	TTGATTGTGAACCGAGGACAGG	
(400_6_out_R)	CCATCTGTCCCTGCGTACTGTA	
(400_8_out_L)	GGGAGAAGAAGATCACCCACCA	
(400_8_out_R)	TTGACTGCTGCTGCCAATCTAC	
(400_10_out_L)	ACGGTCGTTGTGGGATCTGTAA	
(400_10_out_R)	GTGGGACTTTGGCCATTACAT	
(400_12_out_L)	CACTAAGGTCCACGTGGAGGAA	
(400_12_out_R)	TATCAGCGCCAGATGAGCTACA	
(400_14_out_L)	CAATGGTTTTGCTTTGGCCTGG	
(400_14_out_R)	TTTCCCATGTGATGTCACCTGC	
(400_16_out_L)	GTGGCATGAACCCAATAGCCAT	
(400_16_out_R)	GCTCCAATGTCCCATCCTTTG	
(400_18_out_L)	CTGTTGAGTGCTTCGAGCCTTC	
(400_18_out_R)	TGGTGAGTTGGAGTCCGGAAAT	2
(400_20_out_L)	GGCTGGAAAACGGGTCATACAG	
(400_20_out_R)	CCTTTGCTCCGTCTAAGCTTG	
(400_22_out_L)	TGGACCAGACACGGAGAGAAAA	
(400_22_out_R)	ATTCTGGCTGGCTCAATTTCCG	
(400_24_out_L)	TAATGGGAAGGAGAGAGGAGGG	
(400_24_out_R)	TCTCCACTTGGGGGTCAATTGT	
(400_26_out_L)	ACTGGAACCTCTACAGCCAC	
(400_26_out_R)	ACCAGGGCCTCCTTTTGTGTAT	
(400_28_out_L)	GGTGGGGGATTGGCTTGAAAAA	
(400_28_out_R)	GGGCCTCATAGCTTCCATGGTA	
(400_30_out_L)	AAAAGTGGACACTAGGGTGCCA	
(400_30_out_R)	TAATCCCAGCCCTTCAACACCA	
(400_32_out_L)	AAATGGAAAAAGGGCACAGGGC	
(400_32_out_R)	TGTCCCATCCAGTTGAGGGTTT	
(400_34_out_L)	ATTTCCACAGAAGGGACCTCCG	
(400_34_out_R)	TGACTAGCAGGCCTGACAACAT	

L: Left ; R: Right.

Fonte: (QUICK et al., 2017)

**APÊNDICE D – Títulos virais e valores de MOI utilizadas em cada passagem em células A549 WT e RIGI<sup>-/-</sup> do processo de seleção viral**

**Tabela 8. Dados brutos do título viral e MOI obtidos nas passagens em células A549.**

Sample		P1		P2		P3		P4		P5	
		Viral titre	MOI	Viral titre	MOI						
A549 WT	ZIKV-W1	7,5x10 <sup>4</sup>	0,11	1x10 <sup>5</sup>	0,24	2x10 <sup>5</sup>	0,10	2x10 <sup>6</sup>	0,08	2,7x10 <sup>6</sup>	0,50
	ZIKV-W2	7x10 <sup>4</sup>		1x10 <sup>5</sup>	0,08	1,8x10 <sup>5</sup>	0,08	2,2x10 <sup>6</sup>	0,08	3,15x10 <sup>6</sup>	0,58
	ZIKV-W3	1,05x10 <sup>5</sup>		1,4x10 <sup>5</sup>	0,25	1,75x10 <sup>5</sup>	0,11	1,1x10 <sup>6</sup>	0,08	1,7x10 <sup>7</sup>	0,75
A549 RIGI <sup>-/-</sup>	ZIKV-R1	1,45x10 <sup>5</sup>	0,11	2,65x10 <sup>5</sup>	0,15	2,00x10 <sup>5</sup>	0,10	1,85x10 <sup>6</sup>	0,080	3,6x10 <sup>6</sup>	0,23
	ZIKV-R2	1,15x10 <sup>5</sup>		1,15x10 <sup>5</sup>	0,23	4x10 <sup>4</sup>	0,03	2,05x10 <sup>5</sup>	0,081	1,45x10 <sup>5</sup>	0,48
	ZIKV-R3	1,3x10 <sup>5</sup>		1,55x10 <sup>5</sup>	0,16	3,65x10 <sup>4</sup>	0,08	8,5x10 <sup>5</sup>	0,125	3,2x10 <sup>6</sup>	0,46
Sample		P6		P7		P8		P9		P10	
		Viral titre	MOI	Viral titre	MOI						
A549 WT	ZIKV-W1	2x10 <sup>6</sup>	0,20	3,63x10 <sup>6</sup>	0,05	1,1x10 <sup>6</sup>	0,08	1,05x10 <sup>7</sup>	0,09	1,6x10 <sup>7</sup>	0,20
	ZIKV-W2	1,9x10 <sup>6</sup>	0,11	3,98x10 <sup>6</sup>	0,08	9x10 <sup>5</sup>	0,09	1,15x10 <sup>7</sup>	0,09	1x10 <sup>7</sup>	0,29
	ZIKV-W3	2,5x10 <sup>6</sup>	0,29	3,6x10 <sup>6</sup>	0,10	7,5x10 <sup>5</sup>	0,08	1,2x10 <sup>7</sup>	0,09	1,15x10 <sup>7</sup>	0,19
A549 RIGI <sup>-/-</sup>	ZIKV-R1	2,85x10 <sup>6</sup>	0,30	8,03x10 <sup>6</sup>	0,09	3,05x10 <sup>5</sup>	0,07	8x10 <sup>6</sup>	0,08	3,9x10 <sup>6</sup>	0,19
	ZIKV-R2	2,25x10 <sup>6</sup>	0,26	2,85x10 <sup>6</sup>	0,08	3,5x10 <sup>5</sup>	0,06	4,78x10 <sup>6</sup>	0,08	4,35x10 <sup>6</sup>	0,13
	ZIKV-R3	2,4x10 <sup>6</sup>	0,36	1x10 <sup>7</sup>	0,10	1,95x10 <sup>6</sup>	0,06	1,95x10 <sup>7</sup>	0,10	1,1x10 <sup>7</sup>	0,25

**APÊNDICE E – Títulos virais e valores de MOI utilizadas em cada passagem em células C6/36 do processo de seleção viral**

**Tabela 9. Dados brutos do título viral e MOI obtidos nas passagens em células C6/36.**

Sample		P1		P2.1		P2.2		P3.1		P3.2	
		Viral titre	MOI	Viral titre	MOI	Viral titre	MOI	Viral titre	MOI	Viral titre	MOI
A549 WT	ZIKV-W1	2,1x10 <sup>4</sup>	0,01	2,95x10 <sup>4</sup>	0,01	2,35x10 <sup>5</sup>	0,08	2,3x10 <sup>6</sup>	0,23		
	ZIKV-W2	1,65x10 <sup>4</sup>	0,01	2,9x10 <sup>3</sup>	0,01	7,5x10 <sup>4</sup>	0,01	1,85x10 <sup>5</sup>	0,01		
	ZIKV-W3	2,05x10 <sup>4</sup>	0,01	2,5x10 <sup>4</sup>	0,01	2,6x10 <sup>5</sup>	0,08	2,85x10 <sup>5</sup>	0,01		
A549 RIGI-/-	ZIKV-R1	2,15x10 <sup>4</sup>	0,002	2,55x10 <sup>4</sup>	0,01	1,55x10 <sup>5</sup>	0,04	7,5x10 <sup>5</sup>	0,06		
	ZIKV-R2	2x10 <sup>4</sup>	0,003	1,05x10 <sup>3</sup>	0,01	1,45x10 <sup>4</sup>	0,01	1,2x10 <sup>4</sup>	0,02	1,03x10 <sup>5</sup>	0,003
	ZIKV-R3	2,65x10 <sup>4</sup>	0,003	2,6x10 <sup>4</sup>	0,02	2,5x10 <sup>5</sup>	0,03	8x10 <sup>5</sup>	0,18		
Sample		P4		P5		P6		P7		P8	
		Viral titre	MOI	Viral titre	MOI	Viral titre	MOI	Viral titre	MOI	Viral titre	MOI
A549 WT	ZIKV-W1	1,05x10 <sup>6</sup>	0,06	1,25x10 <sup>6</sup>	0,06	1,3x10 <sup>5</sup>	0,02	1,7x10 <sup>6</sup>	0,01	1,88x10 <sup>6</sup>	0,03
	ZIKV-W2	1,4x10 <sup>6</sup>	0,06	1,45x10 <sup>6</sup>	0,06	1,05x10 <sup>5</sup>	0,02	1,8x10 <sup>6</sup>	0,01	2,9x10 <sup>6</sup>	0,06
	ZIKV-W3	1,5x10 <sup>6</sup>	0,05	1,05x10 <sup>6</sup>	0,05	1x10 <sup>5</sup>	0,02	2,65x10 <sup>6</sup>	0,01	3,03x10 <sup>6</sup>	0,06
A549 RIGI-/-	ZIKV-R1	9x10 <sup>5</sup>	0,05	7,5x10 <sup>5</sup>	0,05	2,5x10 <sup>5</sup>	0,05	2,35x10 <sup>6</sup>	0,06	3,18x10 <sup>6</sup>	0,05
	ZIKV-R2	1,2x10 <sup>5</sup>	0,15	1,8x10 <sup>6</sup>	0,15	1x10 <sup>5</sup>	0,07	1,05x10 <sup>6</sup>	0,08	3,63x10 <sup>6</sup>	0,03
	ZIKV-R3	9,5x10 <sup>5</sup>	0,08	1,45x10 <sup>6</sup>	0,08	2,3x10 <sup>5</sup>	0,03	2,55x10 <sup>6</sup>	0,04	5,35x10 <sup>6</sup>	0,02
Sample		P9		P10							
		Viral titre	MOI	Viral titre	MOI						
A549 WT	ZIKV-W1	6x10 <sup>6</sup>	0,02	2,1x10 <sup>5</sup>	0,01						
	ZIKV-W2	1,1x10 <sup>7</sup>	0,02	1,2x10 <sup>5</sup>	0,01						
	ZIKV-W3	3,6x10 <sup>6</sup>	0,03	1,65x10 <sup>5</sup>	0,01						
A549 RIGI-/-	ZIKV-R1	1,9x10 <sup>6</sup>	0,02	4,25x10 <sup>5</sup>	0,01						
	ZIKV-R2	3,4x10 <sup>6</sup>	0,02	3,4x10 <sup>5</sup>	0,01						
	ZIKV-R3	1,3x10 <sup>7</sup>	0,02	3,5x10 <sup>5</sup>	0,01						

**APÊNDICE F – Estatísticas do mapeamento dos reads das cepas sequenciadas.**

**Tabela 10. Estatísticas do mapeamento dos reads das cepas sequenciadas.**

<b>Cepa</b>	<b>Passagem</b>	<b>Reads totais</b>	<b>Reads mapeadas</b>	<b>Média da profundidade de sequenciamento</b>	<b>Amplitude de cobertura de sequenciamento (%)*</b>
<b>ZIKV-R1</b>	P4	103468	103410	630	97,57
	P6	115236	115217	702	97,87
<b>ZIKV-R2</b>	P4	84282	84215	512	95,49
	P6	109434	109405	671	97,74

\*Em relação ao genoma de NC\_035889

**APÊNDICE G – Substituições de nucleotídeos e aminoácidos das amostras sequenciadas neste estudo comparadas com a amostra de referência Zika vírus isolate 16288, complete genome GenBank: MF073357.1**

**Tabela 11. Substituições de nt e aa na ORF das cepas de ZIKV selecionados e sequenciados por Illumina.**

Proteína viral	ZIKV-R1		ZIKV-R2		AA antes da mutação	Posição	AA depois da mutação		
	P4	P6	P4	P6					
Capsídeo	-	-	-	<b>G135A</b>	Glicina	G	10	A	Arginina
	-	-	-	<b>T157A</b>	Leucina	L	17	Q	Glutamina
	-	-	-	<b>G324A</b>	Glicina	G	73	R	Arginina
Membrana	-	-	-	<b>G756T</b>	Valina	V	217	L	Leucina
	-	-	-	<b>C793T</b>	Treonina	T	229	M	Metionina
	-	-	<b>A803G</b>	<b>A803G</b>	Glutamina	Q	232	Q	Glutamina
Envelope	-	<b>T1115C</b>	-	-	Valina	V	336	V	Valina
	-	<b>T1180C</b>	<b>T1180C</b>	<b>T1180C</b>	Isoleucina	I	358	T	Treonina
	-	<b>C1336T</b>	-	-	Alanina	A	410	V	Valina
	-	-	-	<b>C1488G</b>	Prolina	P	461	A	Alanina
	-	-	-	<b>T1795A</b>	Leucina	L	563	Q	Glutamina
	-	-	<b>C2194T</b>	<b>C2194T</b>	Treonina	T	696	I	Isoleucina
	-	-	<b>T2228A</b>	-	Glicina	G	707	G	Glicina
	-	<b>C2230T</b>	-	-	Alanina	A	708	V	Valina
	-	<b>T2245C</b>	-	-	Valina	V	713	A	Alanina
	-	<b>T4871C</b>	-	-	Aspartato	D	1588	D	Aspartato
NS3	-	<b>C5257G</b>	-	-	Treonina	T	1717	R	Arginina
	-	-	<b>A5623C</b>	<b>A5623C</b>	Glutamato	E	1839	A	Alanina
	-	-	<b>C6310T</b>	<b>C6310T</b>	Treonina	T	2068	M	Metionina
<b>NS4B</b>	-	-	-	<b>A7251G</b>	Isoleucina	I	2382	V	Valina
<b>NS5</b>	-	<b>A9013G</b>	-	-	Glutamina	Q	2969	R	Arginina

Mutações em azul: Mutação sinônima/ silenciosa, mutação de nt sem alterar o AA da proteína.