



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

Luiza Johanna Hübner

**Efeito do favipiravir sobre o ciclo de replicação do vírus da Zika no  
*Aedes aegypti***

Florianópolis  
2024

Luiza Johanna Hübner

**Efeito do favipiravir sobre o ciclo de replicação do vírus da Zika no  
*Aedes aegypti***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Santos Mansur  
Coorientador: Prof. Dr. José Henrique Oliveira

Florianópolis

2024

Hübner, Luiza Johanna

Efeito do favipiravir sobre o ciclo de replicação do vírus da Zika no *Aedes aegypti* / Luiza Johanna Hübner ; orientador, Daniel Santos Mansur, coorientador, José Henrique Oliveira, 2024.

39 p.

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

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. *Aedes aegypti*. 3. Favipiravir. 4. Mutagênese letal. 5. Quasispécie. I. Mansur, Daniel Santos Oliveira, José Henrique . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Luiza Johanna Hübner

**Efeito do favipiravir sobre o ciclo de replicação do vírus da Zika no  
*Aedes aegypti***

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 27 de maio de 2024,  
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Daniel Santos Mansur  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Gabriela de Oliveira Paiva e Silva  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Fernando Spiller  
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 Mestra em Farmacologia.

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof. Dr. Daniel Santos Mansur  
Orientador

Florianópolis, 2024.

Dedico este trabalho a minha mãe,  
por seu meu alicerce.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço à minha mãe que acreditou em minha trajetória como bióloga e pesquisadora. Seu amor por mim e o apoio à minha carreira acadêmica foram sem precedentes. Sem você nada disso seria possível.

Agradeço também ao Alexander Floyd que me acompanhou durante todo o processo de mestrado. Obrigada pelos anos de amizade e apoio, se não fosse a força que você me deu durante o TCC eu teria desistido da pós-graduação.

Obrigada ao meu orientador e coorientador por acreditarem no meu potencial. Vocês me deram confiança para acreditar que eu conseguiria fazer um bom trabalho em tão pouco tempo.

A minhas amigas e colegas de trabalho Mariana Maraschin e Lucilene Granella, foi com vocês que eu aprendi tudo que precisava para concluir minha pesquisa. Mas além disso, foram vocês que fizeram com que eu me sentisse em família no laboratório. Obrigada pelo companheirismo, amizade, risadas, fofocas, apoio nos momentos de raiva e tristeza e, principalmente por estarem sempre por perto para ouvirem meus desabafos.

Obrigada a todos os colegas do Lidi, do Lab Zé e a todos que contribuíram com as doações de sangue para esse trabalho. Um obrigada especial para o Diego e Juliano. Ao Diego por ser um dos primeiros a me reconhecer e me ajudar. Mesmo não gostando de gente nova, ele sempre foi gentil comigo. Ao Juliano por ser meu mais velho amigo, em oito anos de amizade nós dois amadurecemos muito, e o resultado foi ótimo, saímos de uma baita vergonheira para pessoas incríveis. Sem contar que, se não fosse por você me apresentar o Lidi, eu nunca teria pensado em entrar nesse laboratório.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, à Capes, à UFSC e ao INCT pelo apoio financeiro.

“Só há duas opções nessa vida: se resignar ou se indignar.

E eu não vou me resignar nunca”

Darcy Ribeiro

## RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus* e seu principal vetor é o *Aedes aegypti*. A RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) dos flavivírus é caracterizada pela baixa fidelidade, o que induz a altas taxas de mutação durante a replicação. Essa característica, em conjunto com a rápida cinética replicativa, leva à formação de uma população viral abundante e heterogênea, denominada quasispécie. A alta diversidade das quasispécies está relacionada com a aptidão do vírus para atravessar gargalos durante a alternância entre hospedeiros humanos e artrópodes. Drogas como o favipiravir, um análogo de purinas, aumentam as taxas de erro da RdRp e induzem a extinção do vírus através do mecanismo de mutagênese letal. Incubamos o ZIKV na presença desse fármaco e utilizamos o vírus proveniente (ZIKVfav) para infectar o *Aedes aegypti*. Dessa forma, buscamos entender como fármacos mutagênicos, que alteram a composição da quasispécie, interferem com o ciclo de transmissão de arbovírus. Em 7 dias após a infecção (d.p.i.) com o ZIKVfav, titulamos o corpo todo dos mosquitos por ensaio de placa. Não observamos diferença no título viral dos infectados. Entretanto, houve 30% a menos de prevalência de infecção no grupo de mosquitos que recebeu o ZIKVfav. Em 21 d.p.i., coletamos e titulamos a saliva dos mosquitos, e não observamos diferença significativa na intensidade nem na prevalência de infecção. A partir desses dados, concluímos que as alterações geradas na quasispécie pelo favipiravir, como mutantes com menor aptidão e partículas de RNA defectivas, podem prejudicar a infecção do mosquito. Entretanto, sugerimos que, após estabelecida a infecção, o ZIKV consegue recuperar aptidão através da replicação de baixa fidelidade da RdRp.

**Palavras-chave:** Arbovírus; Flavivírus; Quasispécie; Mutagênese letal.



## ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) belongs to the *Flavivirus* genus, and its primary vector is *Aedes aegypti*. The RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of flaviviruses is characterized by low fidelity, which induces high mutation rates during replication. This feature, along with the rapid replication kinetics, leads to the formation of an abundant and heterogeneous viral population known as quasispecies. The high diversity of quasispecies is related to the virus's fitness to overcome bottlenecks during alternation between human and arthropod hosts. Drugs like favipiravir, a purine analogue, increase the error rates of RdRp and induce virus extinction through the mechanism of lethal mutagenesis. We incubated ZIKV in the presence of this drug and used the resulting virus (ZIKVfav) to infect *Aedes aegypti*. In this way, we sought to understand how mutagenic drugs, which alter the quasispecies composition, interfere with the transmission cycle of arboviruses. At 7 days post-infection (d.p.i.) with ZIKVfav, we titrated the entire body of the mosquitoes by plaque assay. We did not observe a difference in the viral titer of the infected mosquitoes. However, we obtained a 30% reduction in infection prevalence in the group of mosquitoes that received ZIKVfav. At 21 d.p.i., we collected and titrated the mosquito saliva and observed no significant difference in either the intensity or prevalence of infection. From these data, we conclude that the alterations generated in the quasispecies by favipiravir, such as less fit mutants and defective RNA particles, may impair mosquito infection. However, we suggest that once the infection is established, ZIKV can regain fitness through the low-fidelity replication of RdRp.

**Keywords:** Arbovirus; Flavivirus; Quasispecies; Lethal mutagenesis.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1	HIPÓTESE.....	16
1.2	OBJETIVOS.....	16
<b>1.2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	LINHAGENS DE CÉLULAS E VÍRUS.....	18
2.2	FAVIPIRAVIR.....	18
2.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	18
2.4	CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS.....	19
2.5	INFEÇÃO DOS MOSQUITOS.....	20
2.6	SALIVAÇÃO DOS MOSQUITOS.....	20
2.7	ENSAIO DE PLACA.....	21
2.8	EXTRAÇÃO DE RNA E QPCR.....	21
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
3.1	FAVIPIRAVIR APRESENTA EFEITO ANTIVIRAL CONTRA O ZIKV 16288 .....	23
3.2	TRATAMENTO EM CÉLULAS DE MAMÍFERO COM FAVIPIRAVIR DIMINUI A PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO NO <i>Aedes Aegypti</i> .....	24
3.3	O GRUPO DE MOSQUITOS ALIMENTADO PELO ZIKV FAVRECEBEU O DOBRO DE RNA VIRAL DURANTE A INFECÇÃO.....	27
3.4	O TRATAMENTO COM FAVIPIRAVIR NÃO INTERFERE NA DISSEMINAÇÃO DO VÍRUS ATÉ A SALIVA.....	29
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus (*arthropod-borne virus*), o que implica que seu ciclo biológico alterna entre hospedeiros vertebrados e artrópodes. O seu principal vetor é o mosquito *Aedes aegypti*, que também transmite outros vírus, como Dengue e Chikungunya (Musso e Gubler 2016). O ZIKV também pode ser transmitido da mãe para o feto durante a gravidez, transfusão de sangue e contato sexual (WHO, 2022). A maioria das pessoas infectadas com o ZIKV não apresenta sintomas, entretanto, a doença está associada a casos de microcefalia em fetos durante a gravidez (Araújo et al. 2018). Desde 2007, surtos da doença são registrados na África, Ásia e América, e em 2015 ocorreu uma grande epidemia no Brasil. Até o momento não há vacinas ou tratamentos antivirais específicos e clinicamente aprovados para tratar pessoas infectadas e doentes. O controle do mosquito vetor é a única estratégia reconhecidamente eficaz para conter epidemias de Zika (WHO, 2022).

O ZIKV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Os flavivírus são vírus envelopados que possuem genoma de RNA de fita simples de senso positiva e cap1. Por isso, a fita desses vírus funciona como um RNA mensageiro, e ao entrar no citoplasma é traduzida em uma poliproteína única, que é clivada e processada em proteínas estruturais e não estruturais. As três proteínas estruturais geradas, C, prM e E, irão compor a partícula viral, enquanto as proteínas não estruturais - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 - serão responsáveis pela replicação do RNA, montagem da partícula viral e evasão da resposta imune do hospedeiro (Chambers et al. 1990; Santos 2015; Wang et al. 2017).

A proteína NS5 é a mais conservada dentro do gênero *Flavivirus*, e apresenta funções importantes para a replicação viral. A porção N-terminal da proteína possui atividade metiltransferase e guanililtransferase, e está envolvida com a adição do Cap na extremidade 5' do RNA viral recém sintetizado. O Cap é uma estrutura de RNA importante para promover a ligação ao ribossomo durante a tradução (Egloff et al. 2002; Issur et al. 2009).

A porção C-terminal da NS5 apresenta função de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e promove a síntese de RNA de novo, processo em que o vírus utiliza suas próprias proteínas para a replicação (Tan et al. 1996). A RdRp possui sua estrutura em formato de “mão direita”, constituída de três subdomínios:

dedos, palma e polegar. A interação dos dedos com o polegar forma canais, em que se localiza o sítio da polimerase. No canal central a fita de RNA molde se liga e ocorre sua replicação, no canal NTP, é onde os nucleotídeos entram (Zhao et al. 2017).

Durante a tradução, o genoma dos flavivírus se encontra na forma linear, e após quantidades suficientes de NS5 serem expressas, essa proteína se liga à estrutura do RNA em forma de alça, presente na extremidade 5', denominada stem loop A (SLA), que está próxima ao Cap. Após a ligação, a NS5 recruta proteínas virais e do hospedeiro, que irão promover a circularização do RNA, dessa forma, os ribossomos não conseguem se acoplar à fita para realizar a tradução, e o genoma fica livre para a NS5 iniciar o processo de replicação (Fajardo et al. 2020; Sanford et al. 2019). Com o RNA circularizado, a NS5 migra para a extremidade 3' e sua porção RdRp inicia a cópia do genoma, que ocorre no sentido 3'-5'. Nesse processo, é utilizado o mesmo RNA de senso positivo que serviu de molde para a síntese proteica, e o RNA complementar de sentido negativo que será gerado servirá de molde para a transcrição das novas fitas de senso positivo (Knipe e Howley 2013; Santos 2015; Zhao et al. 2017).

A RdRp dos vírus de RNA tem baixa fidelidade e carece de mecanismos de correção de erros. Isso resulta em altas taxas de mutação, de aproximadamente  $10^{-4}$  modificações por nucleotídeo copiado, o que, para os flavivírus, equivale a um mutante por ciclo de replicação (Bordería, Rozen-Gagnon, e Vignuzzi 2016; Drake 1993; Jin et al. 2011). Essa característica em conjunto com a rápida cinética replicativa, gera uma população numerosa e heterogênea, que é chamada de quasispécie viral. As quasispécies são um conjunto diverso de variantes genéticas de um vírus que compõem as populações virais e que são a unidade de seleção natural (Domingo e Holland 1997).

A diversidade das quasispécies é definida pela taxa em que mutações ocorrem e a frequência de diferentes mutantes na população. Essa característica é importante para a adaptação do vírus a diferentes ambientes, pois confere variabilidade adaptativa. Quando exposta a alterações ambientais, variantes virais podem ser eliminadas ou se tornarem dominantes na população, a depender da pressão seletiva do meio. Isso faz com que a composição da quasispécie varie muito entre diferentes tipos de células (McWilliam Leitch e McLauchlan 2013). Além disso, as variantes podem estabelecer interações de cooperação, que auxiliam na

adaptação a diferentes tecidos e na evasão do sistema imune do hospedeiro. Um poliovírus com uma RdRp de maior fidelidade, e que gera uma quasispécie menos diversa, perde a capacidade de infectar o sistema nervoso e provoca uma doença mais branda em animais (Vignuzzi et al. 2006). Dessa forma, maior diversidade da quasispécie está relacionada à melhor aptidão do vírus, enquanto menor diversidade pode ser prejudicial (Domingo, García-Crespo, e Perales 2021; Domingo e Holland 1997; Domingo, Sheldon, e Perales 2012).

Como um arbovírus, o ZIKV enfrenta diversos gargalos populacionais durante seu ciclo de transmissão entre hospedeiros humanos e artrópodes. O efeito gargalo ocorre quando uma população é drasticamente reduzida, resultando em perda de diversidade genética. No mosquito, o primeiro gargalo ocorre quando apenas algumas partículas virais, ingeridas com o sangue contaminado, conseguem infectar e se replicar nas células epiteliais do intestino médio (Forrester et al. 2012). O gargalo seguinte envolve a passagem do vírus do epitélio para a hemolinfa, de onde conseguem atingir e infectar outros tecidos do mosquito. Para isso, é necessário atravessar a lâmina basal, que possui poros menores que a maioria dos arbovírus (Houk 1981). Entretanto, após a ingestão do sangue ocorrem danos ao tecido e a distensão do intestino, o que aumenta os poros da lâmina basal e pode permitir a passagem dos vírus (Cui et al. 2019; Dong et al. 2017). Após atingir a hemolinfa, o vírus consegue se disseminar e infectar outros tecidos do mosquito, até chegar às glândulas salivares, onde pode ser secretado com a saliva para completar seu ciclo de transmissão (Franz et al. 2015).

Para cada tecido infectado, o arbovírus enfrenta um gargalo diferente, gerado tanto por barreiras físicas quanto pelo sistema imune do mosquito. Como os arbovírus são vírus de RNA, eles são capazes de superar esses gargalos e recuperar sua diversidade genética por meio da replicação rápida e de baixa fidelidade da RdRp. Essa capacidade de recuperar diversidade permite que os arbovírus atravessem diferentes gargalos e se disseminem por hospedeiros distintos (Weaver et al. 2021).

Os arbovírus precisam enfrentar barreiras impostas pelo sistema imune de hospedeiros mamíferos e artrópodes. Em mosquitos, a resposta imune antiviral mais significativa decorre da produção dos RNAs de interferência (RNAi). Os RNAi provocam o silenciamento pós-transcricional de genes, através da degradação de RNAs complementares, impedindo sua tradução. Após a infecção, os vírus de RNA

acabam formando moléculas de RNA de fita dupla (*double-stranded RNA* (dsRNA)). Isso ocorre, por exemplo, quando o RNA de flavivírus é circularizado para dar início à replicação (Villordo, Alvarez, e Gamarnik 2010). O dsRNA é estranho à célula do artrópode, e é reconhecido como um padrão molecular associado a patógenos (PAMP) pela enzima Dicer-2 (Dcr-2) (Poirier et al. 2018). Em conjunto com a proteína R2D2, a Dcr-2 cliva o dsRNA em RNAs interferentes induzidos por vírus (*viral small interfering RNA* (viRNAs)). Os viRNA são carregados pela proteína Argonata-2 (Ago-2) até o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde são utilizados como guia para direcionar a destruição de RNAs virais complementares. O viRNA irá se ligar à fita de RNA viral complementar que será clivado pela Ago-2 (Rückert et al. 2014).

Além de gerar diversidade viral, a baixa fidelidade da RdRp dos flavivírus também é responsável por formar partículas de genomas virais defectivos (Li et al. 2011; Poirier et al. 2015). Essas partículas podem prejudicar a infecção ao competir com RNAs intactos por recursos celulares e virais utilizados na tradução e replicação. Genomas defectivos são replicados pelas proteínas do vírus no lugar das partículas infecciosas, o que pode reduzir a aptidão da quasispécie. Eles também são reconhecidos pela Dcr-2 e estimulam a atividade antiviral do sistema imune dos mosquitos (Rezelj, Levi, e Vignuzzi 2018; Vignuzzi e López 2019). Entretanto, partículas defectivas também estão relacionadas com a persistência da infecção em artrópodes, por saturar o RISC e a via do RNAi. Dessa forma, genomas virais defectivos protegem as partículas infecciosas ao servirem como iscas para o sistema imune do mosquito (Poirier et al. 2018; Schnettler et al. 2012).

Interferir com as taxas de mutação da RdRp possui efeito deletério sobre a população viral. Aumentar a taxa de mutação pode gerar muitas partículas defectivas e prejudicar a capacidade de replicação do vírus. Enquanto taxas de mutação reduzidas podem diminuir a diversidade populacional e prejudicar a aptidão da quasispécie. Tanto aumentar, como diminuir a fidelidade da RdRp em variantes de diferentes arbovírus, gerou uma quasispécie que infecta menos o mosquito vetor (Van Slyke et al. 2015; Warmbrod et al. 2019). Isso sugere que a RdRp atua dentro de um limiar ideal de fidelidade de replicação, que foi selecionado durante a evolução dos vírus de RNA (Domingo, Sheldon, e Perales 2012; Manrubia et al. 2005).

Devido à importância de níveis ideais de mutação para o desenvolvimento da infecção, a RdRp se tornou um importante alvo farmacológico. Aumentar as taxas de mutação leva ao aumento exacerbado de partículas defectivas, o que prejudica a replicação e leva à extinção do vírus através do processo de mutagênese letal (Domingo, García-Crespo, e Perales 2021; Domingo, Sheldon, e Perales 2012). Os mutagênicos que podem interagir de forma específica com a RdRp, são os análogos de nucleotídeos. Eles entram no canal NTP e são incorporados pela RdRp na fita de RNA em replicação, no lugar dos nucleotídeos padrão, e assim induzem a erros e mutações. Por se associarem apenas à RdRp, e não a outras polimerases, os análogos de nucleotídeos apresentam pouca toxicidade para o hospedeiro (Perales, Martín, e Domingo 2011). Entretanto, ao induzir mutações, os análogos de nucleotídeos podem influenciar na evolução do vírus e criar variantes que se espalham na população. Isso foi observado em SARS-CoV 2 com o uso do molnupiravir, um análogo de pirimidinas, e as consequências ainda são desconhecidas (Sanderson e Ruis 2023).

O Favipiravir é um pró-fármaco análogo de purinas, que antagoniza a ação da RdRp. Em células de mamíferos, o Favipiravir é convertido em Favipiravir-RTP, sua forma ativa, que é reconhecido pela RdRp e incorporado à fita de RNA em formação, o que leva ao término de extensão da cadeia (Perales, Martín, e Domingo 2011; Furuta, Komeno, e Nakamura 2017). Dessa forma, o Favipiravir consegue induzir a erros e levar à extinção por mutagênese letal de vírus de RNA, o que reduz a carga viral no indivíduo e possibilita que o sistema imune reprima a infecção (Baranovich et al. 2013). O favipiravir apresentou efeito antiviral sobre diferentes cepas de ZIKV tanto *in vitro* quanto em macacos, o que são resultados favoráveis ao seu uso em humanos (Kim et al. 2018; Marlin et al. 2022).

Em 2014, no Japão, o uso do favipiravir foi aprovado contra Influenza, em concentrações de 1600 mg ao dia. Sua biodisponibilidade em humanos é de 97,6% e, após dose oral, a concentração plasmática atinge o pico em cerca de duas horas, e apresenta meia vida de eliminação de duas a cinco horas (Hayden e Shindo 2019). A principal enzima envolvida no metabolismo do Favipiravir-RTP é a aldeído oxidase, que gera o metabólito inativo T705M1, que é hidroxilado e eliminado através do rim (LHLW, 2014).

Devido a suas propriedades farmacológicas e ao seu potencial farmacêutico, decidimos utilizar o Favipiravir para entender aspectos chave da interação entre o

*Aedes aegypti* e o ZIKV. Avaliamos qual o impacto do aumento na taxa de erros da RdRp pode gerar sobre a diversidade viral e a gênese de partículas defectivas. Queremos entender também como estas alterações influenciam na passagem do vírus por gargalos imunológicos e anatômicos durante a infecção no mosquito. É possível que fármacos que induzam mutagênese gerem quasispécies que possuam melhor aptidão no artrópode. Isso representaria um potencial problema para o uso desses compostos no combate a infecções por arbovírus. Portanto, entender a consequência desse tratamento farmacológico na população viral que infectará o hospedeiro mosquito, que não é o alvo da terapia antiviral, é importante para compreender mais amplamente a influência do favipiravir sobre o ciclo biológico do vírus no hospedeiro invertebrado. Por isso, utilizamos o favipiravir para avaliar como alterações nas quasispécies virais de ZIKV no hospedeiro vertebrado interferem na dinâmica de infecção de ZIKV no *Aedes aegypti*.

## 1.1 HIPÓTESE

A exposição do ZIKV ao favipiravir em células de mamíferos prejudica a infecção do *Aedes aegypti*.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a taxa de infecção em *Aedes aegypti* causada por uma população do ZIKV que foi exposta ao favipiravir em células de mamíferos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Expor o ZIKV ao favipiravir em células Vero e avaliar o impacto do fármaco sobre a síntese de partículas infecciosas e RNA viral.
- Avaliar a taxa de infecção do *Aedes aegypti* pelo ZIKV que foi exposto ao favipiravir.



- Analisar a disseminação do ZIKV exposto ao favipiravir *Aedes aegypti* até a saliva.

## 2 MÉTODOS

### 2.1 LINHAGENS DE CÉLULAS E VÍRUS

Células de mamífero da linhagem Vero (ATCC®, CCL-81™) foram cultivadas a 37° com 5% CO<sub>2</sub> em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. As células de *Aedes albopictus* da linhagem C6/36 (ATCC® CRL-1660™) foram cultivadas a 28°C em meio Leibovitz's L-15, suplementado com 5% SFB, 1% de penicilina/estreptomicina e 0,26 % de triptose. Todas as células testaram negativo para contaminação por mycoplasma.

O lote de ZIKV, cepa ZV BR 2016/16288 (Strottmann et al. 2019), foi produzido em células C6/36, em infecção de MOI 0,01. A quantificação do título viral foi feita por ensaio de placa em células Vero e calculada em unidades formadoras de placas (PFU/ml).

### 2.2 FAVIPIRAVIR

O favipiravir (Cayman, T-705, CAS: 259793-96-9) foi diluído na concentração estoque de 50.000 uM, em 0,8% de dimetilsulfóxido (DMSO), e armazenado a -20 °C por, no máximo, um mês. Para a realizar os experimentos, a alíquota congelada do fármaco foi diluída em DMEM (1% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina), até a concentração de 400 uM.

### 2.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O favipiravir é um pró-fármaco e sua conversão para a forma ativa ocorre dentro da célula, através da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (Naesens et al. 2013), que não possui ortólogo em *Aedes aegypti*. Portanto, optamos por incubar primeiro o ZIKV com favipiravir em células Vero, o que possibilita sua conversão para a forma ativa, para depois infectar o mosquito. Dessa forma, também reproduzimos o que aconteceria no ciclo natural de transmissão, em que o mosquito irá ingerir o sangue humano contendo o vírus já exposto ao fármaco.

Células Vero eram plaqueadas na confluência de 70% a 80% em meio DMEM (1% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina), e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas, para aderir. No dia seguinte, as células eram incubadas com 400 uM de favipiravir por duas horas antes da infecção com o ZIKV 16288 em MOI 1 (*Multiplicity of Infection*). Após uma hora, o sobrenadante contendo o vírus era removido e substituído por meio contendo 400 uM de favipiravir (Bassi et al. 2018). Passadas 32 horas, o sobrenadante das células era coletado e armazenado a -80°C, para depois ser utilizado nos experimentos de infecção dos mosquitos (Fig. 1). Como controle do experimento, o mesmo procedimento foi realizado com DMSO no lugar do favipiravir. A titulação do vírus foi feita por ensaio de placa em células Vero ou C6/36 e calculada em PFU/ml ou FFU/ml.

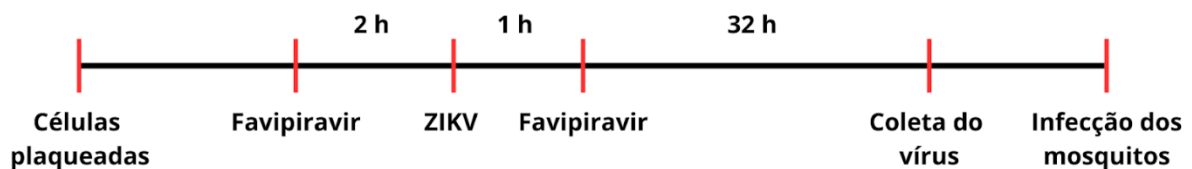


Figura 1: Imagem representativa do desenho experimental.

## 2.4 CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS

Todos os experimentos de infecção de *Aedes aegypti* foram realizados com fêmeas da linhagem *Red Eyes* (Oliveira et al. 2017). A eclosão das larvas a partir de uma fita de ovos estoque era feita em bandejas de plástico com água filtrada. Após 7 dias da eclosão, as larvas atingem a fase de pupa e são coletadas e colocadas em gaiolas, onde, em cerca de 24 horas, emergem em mosquitos. A alimentação dos adultos era feita com uma solução de sacarose 10% em água e oferecida *ad libitum*, e as larvas eram alimentadas com ração de cachorro comercial triturada. O insetário era mantido em ciclos de fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, 70% a 80% de umidade relativa e temperatura entre 26°C e 29°C.

## 2.5 INFECÇÃO DOS MOSQUITOS

Mosquitos com idade entre 5 e 10 dias eram separados em dois grupos, um que receberia o ZIKVfav e outro o ZIKVdms0, e deixados em jejum de sacarose por 10 a 18 horas. Ambos os grupos recebem a mesma quantidade de vírus em PFU/ml, que era diluído em meio DMEM (5% SFB e 1% penicilina/estreptomicina), e depois misturado com lavado de hemácias na proporção de 1:1. O sangue utilizado nos experimentos era coletado de voluntários humanos (autorização do CEUA nº 89894417.8.0000.0121), centrifugado para remoção do soro e ressuspenso em PBS (*Phosphate buffered saline*). Esse processo de lavagem era repetido duas vezes, para remoção de contaminantes do sistema imune humano. Após as lavagens, ATP pH 7,4 na concentração final de 1mM era adicionado à mistura como fagoestimulante.

A mistura de sangue e vírus era mantida aquecida a 37°C e oferecida aos mosquitos por cerca de uma hora, através de um alimentador artificial com uma membrana de parafilm acoplada. Esse processo ocorria dentro de um insetário de nível de biossegurança 2. Após a alimentação, os mosquitos eram anestesiados pelo frio e as fêmeas totalmente ingurgitadas eram separadas e alojadas em incubadora climatizada tipo B.O.D. entre 26°C e 28°C, com umidade acima de 60%.

## 2.6 SALIVAÇÃO DOS MOSQUITOS

A saliva dos mosquitos era coletada 21 dias após a infecção (d.p.i.). Os animais eram mantidos em jejum seco por 10 a 18 horas, depois eram anestesiados pelo frio e tinham suas asas e pernas removidas. A probóscide era encaixada em uma ponteira de pipeta contendo 5ul de SFB com 10% de sacarose. Os mosquitos eram deixados para salivar por 30 minutos, e após isso, o conteúdo da ponteira era misturado em 200ul de DMEM (5% SFB e 1% penicilina/estreptomicina), e armazenado a -80°C. A titulação do vírus na saliva foi feita através de ensaio de placa em células Vero e calculada em FFU/ml.

## 2.7 ENSAIO DE PLACA

Células Vero ou C6/36 eram semeadas em placas de 24 poços e deixadas para aderir por 18 a 24 horas. Para a titulação dos mosquitos, era feito um homogenato do seu corpo todo em 200ul de DMEM (5% SFB e 1% penicilina/estreptomicina). As amostras eram diluídas de forma seriada, em fator 10, aplicadas na placa e incubadas a 37° com 5% CO<sub>2</sub>. Após uma hora, as amostras eram removidas e o poço era coberto com meio semi sólido (DMEM 1% SFB e 1% penicilina/estreptomicina, com 3,2% de carboximetilcelulose). Depois de quatro dias, a titulação era revelada através da adição de cristal violeta (PFU/ml) ou pelo anticorpo 4G2 (FFU/ml). Para a titulação realizada em C6/36, o tempo de incubação foi de sete dias.

## 2.8 EXTRAÇÃO DE RNA E QPCR

A extração de RNA do sobrenadante de cultura de células das amostras de ZIKVfav ou ZIKVdms0 foram feitas através do Purelink Viral RNA/DNA Mini Kit (Cat. No. 12280050), e a de mosquitos com o reagente TRIzol® (Invitrogen), ambas conforme as orientações do fabricante. Para os mosquitos, a síntese de cDNA foi feita com 1 ug de RNA e para as amostras de ZIKVfav e ZIKVdms0, foram utilizados 40 ng de RNA, pois o rendimento das extrações era menor. Utilizamos a enzima M-MLV (LiDI/UFSC) para produzir o cDNA, segundo protocolo testado e estabelecido pelo laboratório. O qPCR foi feito com o Kit GoTaq® (Promega), com o corante SybrGreen, a partir da diluição em 1/5 ou 1/10 do cDNA, conforme instruções do fabricante. Os primers utilizados nesse processo estão na Tabela 1.

Gene	Primer Foward	Primer Reverse
60S	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA	TCATCAGCACCTCCAGCT
ZIKV 5'UTR	TGTGTGAATCAGACTGCGACA	AACCTGTTGATACTGTTGCTAGC
ZIKV NS5	GCGTCATGGTGGCGAATAACCTT GGATTCTTGAACGAGGA	GCGTCATGGTGGCGAATAAAGAG CTTCATTCTCCAGATCAA
MNV	CACGCCACCGATCTGTTCTG	GCGCTGCGCCATCACTC

Tabela 1: Lista de primers utilizados para análise da expressão gênica por qPCR. 5'UTR (Granello, dados não publicados. NS5 (Patricio et al. 2022).

Para comparar a expressão dos genes, utilizamos o método  $\Delta\Delta C_t$  (Livak e Schmittgen 2001). Como controle endógeno para ZIKVfav e ZIKVdms0, misturamos 1ul de Norovírus murino (MNV), em  $10^{11}$  PFU/ml, às amostras antes da extração de RNA. O gene endógeno de *Aedes aegypti* usado nas reações de qPCR foi o AAEL003396, "*Aedes aegypti* 60S ribosomal protein L32", também conhecido como RPL32 ou rp49 (Oliveira et al. 2017).

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

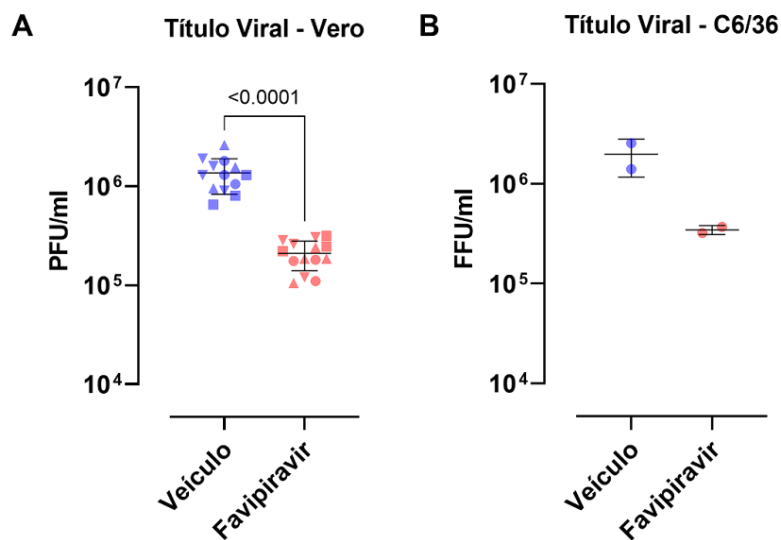
As análises estatísticas foram feitas no *GraphPad Prism 9.0* (GraphPad Software Inc. San Diego, Califórnia, EUA), e tiveram como objetivo principal avaliar diferenças na prevalência de infecção e na carga viral dos mosquitos infectados com ZIKVfav e ZIKVdms0. O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar a prevalência de infecção. Para avaliar o título viral dos mosquitos infectados, os dados passaram pelo Teste de Shapiro-Wilk, e em sua maioria não apresentaram distribuição normal. Com base nisso, foi feita a análise não-paramétrica de Mann-Whitney.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 FAVIPIRAVIR APRESENTA EFEITO ANTIVIRAL CONTRA O ZIKV 16288

Para produzir os lotes de ZIKVfav e ZIKVdmsso utilizados na infecção do *Aedes aegypti*, incubamos o ZIKV 16288 com 400 uM de favipiravir em células Vero por 32 horas. Esse processo foi repetido quatro vezes, uma para teste e as outras três para produzir os lotes de ZIKVfav utilizados em experimentos de infecção.

Observamos que o favipiravir foi eficiente em reduzir a replicação do ZIKV em quase 1 log, tanto na titulação obtida em células Vero (Fig. 2 A) quanto em C6/36 (Fig. 2 B), o que demonstra que o fenótipo é espécie independente. Ao analisar a expressão do gene da NS5 em dois lotes diferentes de ZIKVfav (Fig. 2 C), constatamos que a redução de seis a oito vezes na quantidade de RNA viral, nas amostras tratadas com favipiravir, é proporcional à redução da quantidade de partículas infectivas. Os dados obtidos reproduzem o fenótipo de mutagênese letal do trabalho de Bassi et al. (2018), em que houve a redução do título viral das linhagens PRVABC59 e MR766 de ZIKV (MOI 0,1) em Vero, após 32 horas na presença de 400 uM de favipiravir.



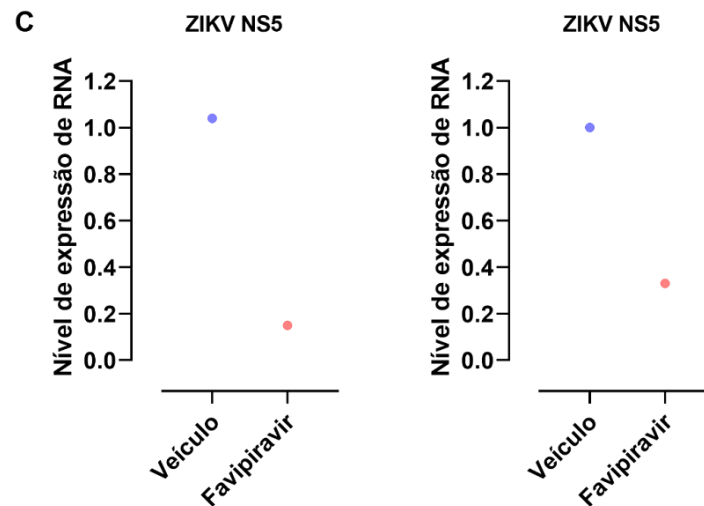


Figura 2: Título viral do ZIKV 16288 incubado por 32 horas em células Vero na presença de 400  $\mu$ M de favipiravir. (A) Título viral por ensaio de placa em Vero (PFU/ml). Cada ponto representa o título viral de uma alíquota de vírus. (B) Título viral por ensaio de foco em C6/36 (FFU/ml). (C) Nível de expressão de RNA de NS5 em dois lotes de vírus diferentes. As linhas representam a Média  $\pm$  SD das amostras. Como os dados apresentaram distribuição normal, a análise estatística foi feita através do teste t não pareado.

O método utilizado foi eficaz para produzir os lotes de vírus. A concentração de favipiravir foi suficiente para diminuir a replicação, mas ainda assim, manter o título do vírus alto o suficiente para viabilizar seu uso na infecção do mosquito.

### 3.2 TRATAMENTO EM CÉLULAS DE MAMÍFERO COM FAVIPIRAVIR DIMINUI A PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO NO *Aedes aegypti*

Para testar se as alterações induzidas pelo favipiravir interferem na dinâmica de infecção, utilizamos o ZIKVfav para infectar o *Aedes aegypti*. Sete dias após a infecção, coletamos os mosquitos e seu título viral foi quantificado em PFU/mosquito, através de ensaio de placa. Nos quatro experimentos de infecção realizados, utilizamos três lotes diferentes de ZIKVfav. Os resultados obtidos seguiram a mesma tendência, independente do lote de vírus, e por isso foram compilados. Também testamos qPCR para avaliar a carga viral (Fig. 3 A e B). Nisso, obtivemos resultados semelhantes aos do ensaio de placa. No entanto optamos por manter a titulação por PFU como método principal, pois a análise por qPCR pode superestimar a infectividade do vírus (Tesla et al. 2018).



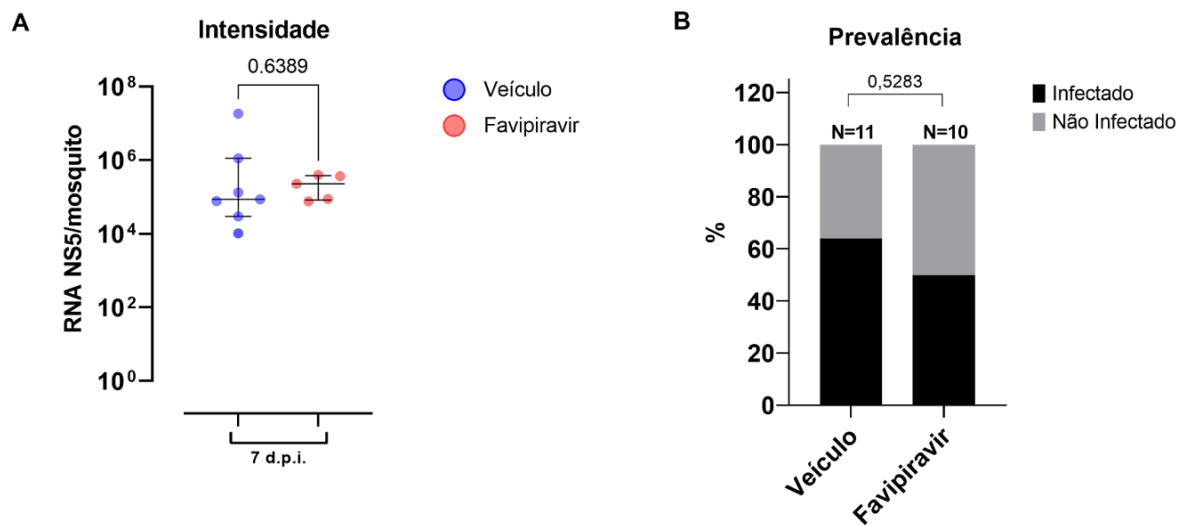


Figura 3: Resultados da titulação por qPCR de mosquitos infectados com ZIKVfav ou ZIKVdms0 em 7 d.p.i. O gene viral utilizado para análise foi NS5. (A) Cada ponto representa o nível de expressão de NS5 apenas dos mosquitos infectados. As barras indicam a mediana e as linhas o intervalo interquartil. (B) Porcentagem de mosquitos infectados por ZIKVfav ou ZIKVdms0. Em A foi utilizado o teste de Mann Whitney e em B chi-quadrado.

Em um panorama geral da infecção (Fig. 4 A), comparamos a carga viral de todos os mosquitos que foram titulados. Como controle, quantificamos o input da mistura de sangue e vírus que foi oferecida na alimentação para os mosquitos. Isso garante que ambos os grupos receberam a mesma quantidade de ZIKVfav ou ZIKVdms0 em PFU/ml. Para avaliar a intensidade da infecção, relacionamos o título viral apenas dos mosquitos infectados em cada grupo (Fig. 4 B). O objetivo é analisar se, depois que a infecção ocorreu, o vírus mantém a capacidade de replicação. Nesse caso, não observamos diferença entre os grupos tratados e não tratados com favipiravir.

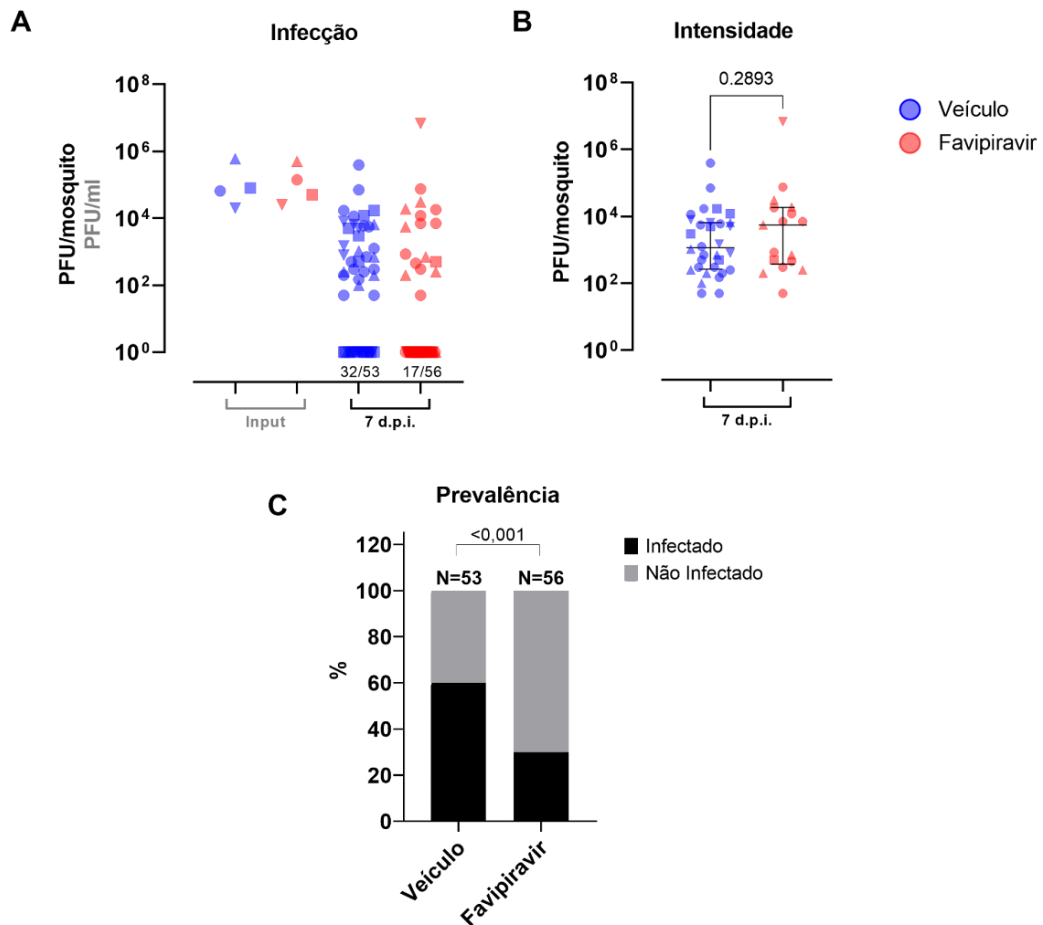


Figura 4.: Resultados da titulação por ensaio de placa de mosquitos infectados com ZIKVfav ou ZIKVdms em 7 d.p.i. (A) Resultados da titulação dos mosquitos e input. O input representa a carga viral no sangue oferecido aos mosquitos (B) Título viral apenas dos mosquitos infectados. (C) Porcentagem de mosquitos infectados por ZIKVfav ou ZIKVdms. Cada ponto representa o título viral do corpo todo de um mosquito. As barras indicam a mediana e as linhas o intervalo interquartil. Em B foi utilizado o teste de Mann Whitney e em C chi-quadrado.

Esses resultados sugerem que as alterações geradas pelo favipiravir não prejudicam a capacidade do ZIKV de replicar nas células do mosquito, pois o título viral dos infectados não difere entre os grupos. Isso pode ter ocorrido pois mesmo após atravessar um gargalo populacional na infecção do intestino do mosquito, os flavivírus conseguem recuperar sua aptidão, graças ao ganho de diversidade gerado pela replicação de baixa fidelidade da RdRp (Grubaugh et al. 2016; Sim et al. 2015; Lequime et al. 2016). Esse fenômeno é propiciado em células de insetos pois a via do RNAi gera uma pressão seletiva que favorece a diversificação do genoma viral como mecanismo de escape. Isso pode ser observado em um estudo que

demonstrou menor diversidade viral do West Nile Virus em células de *drosophila* com a via do RNAi silenciada (Brackney et al. 2015).

Quando comparamos a prevalência de infecção (Fig. 4 C), notamos 30% a menos de mosquitos infectados no grupo que recebeu o ZIKVfav em relação ao que recebeu o ZIKVdms. Isso indica que as alterações induzidas pelo favipiravir prejudicaram a capacidade de infecção do ZIKV. Como um análogo de purinas, o favipiravir aumenta o índice de mutações na quasispécie e induz maior frequência de trocas de G para A e C para U (Bassi et al. 2018). Em um estudo que utilizou o West Nile Virus, uma população viral com mais mutantes, gerada por uma variante com replicação de menor fidelidade, teve infectividade prejudicada no *Culex quinquefasciatus* (Van Slyke et al. 2015). Esses dados sugerem que a diferença na prevalência de infecção pode ser devido ao aumento no número de mutantes letais, gerado pela interação do favipiravir com a RdRp. Entretanto, ainda é necessário realizarmos o sequenciamento do ZIKVfav e do ZIKVdms, para avaliar se houve o aumento da proporção de mutantes.

Esses resultados demonstram que as alterações causadas pelo favipiravir na quasispécie podem ter gerado mutantes que possuem capacidade de infecção prejudicada. Também pode ser que partículas defectivas ou de RNA subgenômico estejam hiperestimulando a via do RNAi. Isso é evidenciado pela menor prevalência de infecção dos mosquitos alimentados pelo ZIKVfav.

### 3.3 O GRUPO DE MOSQUITOS ALIMENTADO PELO ZIKVFAV RECEBEU O DOBRO DE RNA VIRAL DURANTE A INFECÇÃO

Durante a infecção dos mosquitos com ZIKVfav ou ZIKVdms, nós normalizamos para ambos os grupos a mesma concentração de partículas infecciosas em PFU/ml. As alíquotas de ZIKVfav possuíam um título viral menor, e por isso, era necessário um volume maior desse vírus na alimentação dos mosquitos que o ZIKVdms. Isso implica que um grupo de mosquitos poderia estar recebendo mais RNA viral que o outro. Por isso, coletamos o input de vírus de duas infecções para análise da expressão dos fragmentos virais de 5'UTR e NS5 por qPCR. A partir disso, confirmamos que ambos os grupos de mosquitos foram alimentados com a mesma quantia de vírus em PFU/ml, entretanto no grupo que recebeu o ZIKVfav havia o dobro de RNA viral em comparação ao controle (Fig. 5 A e B).

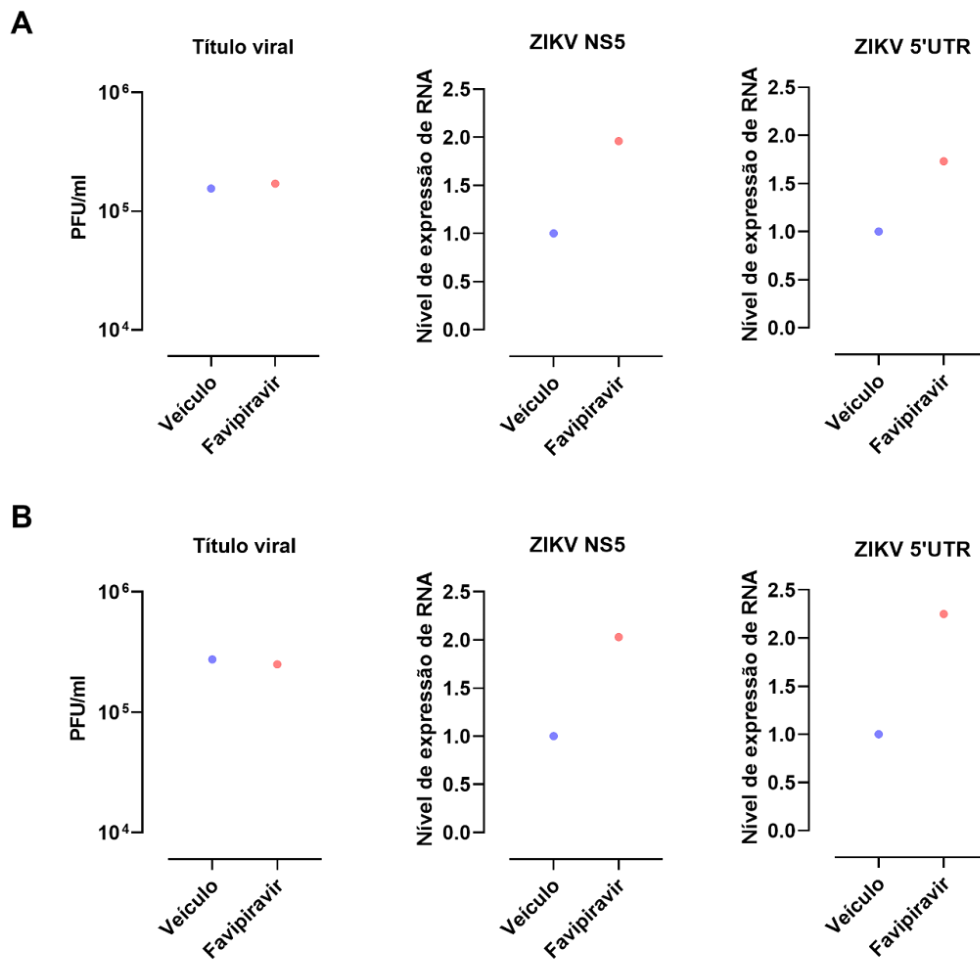


Figura 5: Análise por ensaio de placa (PFU/ml) e qPCR do input do vírus que foi oferecido através da alimentação para os mosquitos em dois dias diferentes (A e B). No qPCR foi analisada a expressão dos fragmentos virais 5'UTR e NS5.

A partir desses resultados, confirmamos que na tentativa de normalizar a alimentação dos dois grupos de mosquitos através de PFU/ml, geramos uma diferença na quantidade de RNA viral. Essa discrepância pode ser responsável pela diferença na prevalência de infecção em 7 d.p.i. Em dengue, se observou que a maior proporção de RNA viral em comparação com a quantidade de partículas infectivas, pode prejudicar a infecção do vírus em células C6/36 (Li et al. 2011; Brackney et al. 2015). Entretanto, existem diversos tipos de RNA's subgenômicos, e mesmo que alguns deles favoreçam a persistência da infecção pelo ZIKV (Slonchak et al. 2020), há outros que podem reduzir a aptidão do vírus. Sequências específicas de RNA já se mostraram prejudiciais tanto *in vitro*, ao dificultar a infecção de Dengue em C6/36, quanto *in vivo*, ao inibir a disseminação do Chikungunya no *Aedes*

*aegypti* (Wang et al. 2020; Levi et al. 2021). O mecanismo por trás disso ainda é desconhecido, mas estudos *in vitro* mostraram que RNA's subgenômicos podem se ligar a proteínas virais, como NS3 e NS5, e prejudicar a replicação. Também é possível que isso aconteça através da estimulação do sistema imune da célula pelos RNA's subgenômicos (Wang et al. 2020; Levi et al. 2021).

A diferença na prevalência de infecção observada em 7 d.p.i, pode ser devido ao grupo de mosquitos que se alimentou do ZIKVfav ter recebido mais RNA viral. Uma hipótese que levantamos é que os RNA's subgenômicos podem ser reconhecidos por Dcr-2 e assim servir de molde para a degradação de partículas infectivas. Dessa forma, a hiperativação da via do RNAi poderia estar prejudicando a infecção.

#### 3.4 O TRATAMENTO COM FAVIPIRAVIR NÃO INTERFERE NA DISSEMINAÇÃO DO VÍRUS ATÉ A SALIVA

Para dar continuidade ao seu ciclo de replicação, o ZIKV precisa atingir a saliva do mosquito para ser transmitido ao hospedeiro humano. Dessa forma, decidimos avaliar se as alterações geradas pelo tratamento com favipiravir também interferem com a capacidade do ZIKV de se disseminar pelo corpo do *Aedes aegypti*. Para isso, coletamos a saliva de mosquitos infectados em 21 d.p.i. (Fig. 6 A), esse tempo é necessário para possibilitar que o vírus chegue até a saliva. O título viral foi quantificado através da formação de focos, utilizando o anticorpo 4G2 (FFU/ml), pois é considerada mais confiável, visto que em algumas amostras o vírus não formou placas de lise, o que impossibilita quantificar através de cristal violeta (PFU/ml).

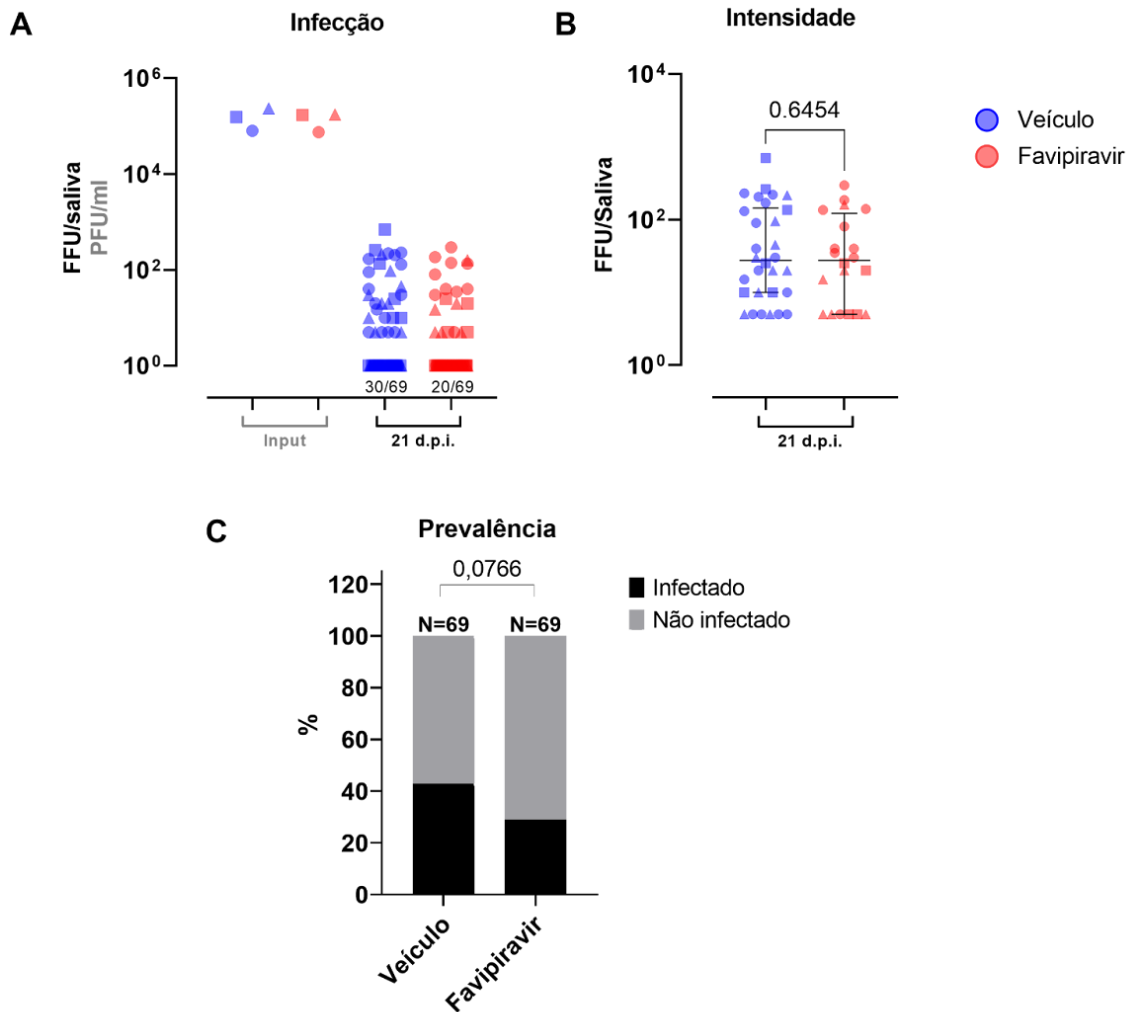


Figura 6.: Resultados da titulação por ensaio de placa da saliva de mosquitos infectados com ZIKVfav ou ZIKVdmso em 21 d.p.i. (A) Resultados da titulação da saliva e input. (B) Título viral apenas das salivas infectadas. (C) Porcentagem de mosquitos infectados por ZIKVfav ou ZIKVdmso. Cada ponto representa o título viral da saliva de um mosquito. As barras indicam a mediana e as linhas o intervalo interquartil. Em B foi utilizado o teste de Mann Whitney e em C chi-quadrado.

Os resultados obtidos seguiram tendência semelhante ao que foi observado na titulação do corpo todo em 7 d.p.i. Dos mosquitos infectados, não observamos diferença no título viral da saliva (Fig. 6 B). Na prevalência de infecção, apesar de não haver diferenças significativas, observamos tendência semelhante à observada no corpo todo em 7 d.p.i., com o grupo que recebeu o ZIKVfav com menos mosquitos infectados (Fig. 6 C).

O aumento na prevalência de infecção do ZIKV no mosquito, com o passar dos dias, é um fenômeno já observado na literatura (Roundy et al. 2017). É provável que isso ocorra pois, com o tempo, o vírus que infectou a célula consegue replicar e

restabelecer diversidade, e assim passa a ser detectável através de ensaio de placa ou qPCR (Poirier e Vignuzzi 2017). Estudos de análise da quasispécie do West Nile Virus no *Culex taeniopus*, mostram que a diversidade é mais alta no final da infecção, entre 12 e 19 dias, do que no começo, entre o dia 1 e 4 (Patterson et al. 2018), o que demonstra que o vírus consegue recuperar aptidão.

É possível que não tenhamos encontrado diferença significativa na prevalência de infecção na saliva em 21 d.p.i. por questões experimentais. A salivação é uma técnica de difícil execução, e há estudos que mostram que ela pode subestimar a transmissão do vírus pelo mosquito (Gloria-Soria, Brackney, e Armstrong 2022). Ainda existe uma desconexão entre a quantidade de vírus nos tecidos e na saliva, o que mostra que processos estocásticos podem influenciar o quanto de vírus que se dissemina até a glândula salivar. Em tecidos diferentes existem ambientes celulares independentes, que possuem fatores diversos que influenciam na replicação do vírus (Novelo et al. 2019). De qualquer modo, o favipiravir parece não interferir na disseminação do vírus pelo mosquito, pois não há diferença no título viral entre os infectados.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que o favipiravir é um fármaco que não irá favorecer a disseminação do ZIKV, pois prejudica sua capacidade de infecção no mosquito. Porém, mais testes são necessários, como avaliar a virulência do vírus presente na saliva do mosquito. O favipiravir é eficiente em reduzir o número de partículas infecciosas e a quantidade de RNA viral do ZIKV em células. Ao inibir a replicação, o uso desse fármaco também pode interromper a disseminação do ZIKV e reduzir o título viral no sangue das pessoas infectadas e dificultar que mais mosquitos se infectem. Desse modo, o uso do fármaco pode ser uma forma de controlar a disseminação do ZIKV.

A partir do uso do favipiravir, sugerimos que sua interação com a RdRp gerou uma quasispécie que possui pior desempenho na infecção do mosquito. Pretendemos realizar a análise de sequenciamento dessa população viral, pois é importante identificar se os prejuízos na infecção do vírus foram devido ao aumento de partículas defectivas ou por algum mutante específico que possui menor aptidão. Para os mosquitos infectados, em que o ZIKVfav conseguiu superar o gargalo da infecção, os dados sugerem que o vírus consegue restabelecer a quasispécie e superar as alterações causadas pelo favipiravir, pois não encontramos diferença no título viral no corpo todo nem na saliva. Com isso, nossos dados corroboram a afirmação de que variações nas taxas de mutação da RdRp reduzem a aptidão do vírus.

Além do sequenciamento da quasispécie do ZIKVfav, também pretendemos testar a hipótese de que a hiperativação da via do RNAi por RNA's subgenômicos leva à diferença na prevalência de infecção dos mosquitos. Para isso, planejamos separar partículas infecciosas do RNA incompleto do ZIKVfav e do ZIKVdms, através de gradiente de sacarose. Dessa forma, evitamos a influência de partículas subgenômicas na infecção. Também pretendemos silenciar a proteína Ago-2 nos mosquitos, um componente importante da via do RNAi, e repetir os experimentos de infecção para observar se obtemos o mesmo fenótipo de diferença na prevalência de mosquitos infectados. Através desses experimentos, teremos informações importantes sobre como RNA viral e partículas infectivas interagem com o sistema imune do mosquito durante a infecção.



## REFERÊNCIAS

- Araújo, T. V. B., R. A. A. Ximenes, D. B. Miranda-Filho, W. V. Souza, W. V. Montarroyos, A. P. L. Melo, S. Valongueiro, et al. 2018. "Association between Microcephaly, Zika Virus Infection, and Other Risk Factors in Brazil: Final Report of a Case-Control Study." **The Lancet Infectious Diseases** 18: 328-336.
- Baranovich, T., S. Wong, J. Armstrong, H. Marjuki, R. J. Webby, R. G. Webster e E. A. Govorkova. 2013. "T-705 (favipiravir) Induces Lethal Mutagenesis in Influenza A H1N1 Viruses in Vitro." **Journal of Virology** 87: 3741-3751.
- Bassi, M. R., R. N. Sempere, P. Meyn, C. Polacek e A. Arias. 2018. "Extinction of Zika Virus and Usutu Virus by Lethal Mutagenesis Reveals Different Patterns of Sensitivity to Three Mutagenic Drugs." **Antimicrobial Agents e Chemotherapy** 62: 1-15.
- Bordería, A. V., K. Rozen-Gagnon e M. Vignuzzi. 2016. "Fidelity Variants and RNA Quasispecies." **Current Topics in Microbiology and Immunology** 392: 303-322.
- Brackney, D. E., E. E. Schirtzinger, T. D. Harrison, G. D. Ebel e K. A. Hanley. 2015. "Modulation of Flavivirus Population Diversity by RNA Interference." **Journal of Virology** 89: 4035-4039.
- Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler e C. M. Rice. 1990. "Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication." **Annual Review of Microbiology** 44: 649-688.
- Cui, Y., D. G. Grant, J. Lin, X. Yu e A. W. E. Franz. 2019. "Zika Virus Dissemination from the Midgut of *Aedes* Facilitated by Bloodmeal-Mediated Structural Modification of the Midgut Basal Lamina." **Viruses** 11: 1-18.
- Domingo, E., C. García-Crespo e C. Perales. 2021. "Historical Perspective on the Discovery of the Quasispecies Concept." **Annual Review of Virology** 8: 51-72.

Domingo, E., e J. J. Holland. 1997. RNA Virus Mutations and Fitness for Survival. **Annual Reviews** 51:151-178.

Domingo, E., J. Sheldon e C. Perales. 2012. "Viral Quasispecies Evolution." **Microbiology and Molecular Biology Reviews**: MMBR 76: 159-216.

Dong, S., V. Balaraman, A. M. Kantor, J. Lin, D. G. Grant, N. L. Held e A. W. E. Franz. 2017. "Chikungunya Virus Dissemination from the Midgut of *Aedes Aegypti* Is Associated with Temporal Basal Lamina Degradation during Bloodmeal Digestion." **PLoS Neglected Tropical Diseases** 11: 1-26.

Egloff, M., D. Benarroch, B. Selisko, J. Romette e B. Canard. 2002. "An RNA Cap (nucleoside-2'-O-)-Methyltransferase in the Flavivirus RNA Polymerase NS5: Crystal Structure and Functional Characterization." **The EMBO Journal** 21: 2757-2768.

Fajardo, T., T. J. Sanford, H. V. Mears, A. Jasper, S. Storrie, D. S. Mansur e T. R. Sweeney. 2020. "The Flavivirus Polymerase NS5 Regulates Translation of Viral Genomic RNA." **Nucleic Acids Research** 48: 5081-5093.

Forrester, N. L., M. Guerbois, R. L. Seymour, H. Spratt e S. C. Weaver. 2012. "Vector-Borne Transmission Imposes a Severe Bottleneck on an RNA Virus Population." **PLoS Pathogens** 8: 1-11.

Franz, A. W. E., A. M. Kantor, A. L. Passarelli e R. J. Clem. 2015. "Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes." **Viruses** 7: 3741-3767.

Furuta, Y., T. Komeno e T. Nakamura. 2017. "Favipiravir (T-705), a Broad Spectrum Inhibitor of Viral RNA Polymerase." *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 93: 449-463.

Gloria-Soria, A., D. E. Brackney e P. M. Armstrong. 2022. "Saliva Collection via Capillary Method May Underestimate Arboviral Transmission by Mosquitoes." **Parasites & Vectors** 15: 1-9.

Hayden, F. G., e N. Shindo. 2019. "Influenza Virus Polymerase Inhibitors in Clinical Development." **Current Opinion in Infectious Diseases** 32: 176-186.

Houk, E. J., J. L. Hardy, R. E. Chiles. 1981. "Permeability of the midgut basal lamina in the mosquito, *Culex tarsalis* Coquillett (Insecta, Diptera)" **Acta Tropica** 38: 163-171.

Issur, M., B. J. Geiss, I. Bougie, F. Picard-Jean, S. Despins, J. Mayette, S. E. Hobdey e M. Bisailon. 2009. "The Flavivirus NS5 Protein Is a True RNA Guanylyltransferase That Catalyzes a Two-Step Reaction to Form the RNA Cap Structure." **RNA** 15: 2340-2350.

Jin, Z., J. Deval, K. A. Johnson e D. C. Swinney. 2011. "Characterization of the Elongation Complex of Dengue Virus RNA Polymerase: Assembly, Kinetics of Nucleotide Incorporation, and Fidelity." **The Journal of Biological Chemistry** 286: 2067-2077.

Knipe, D. M., e P. Howley. 2013. **Fields Virology**. Lippincott Williams & Wilkins.

Levi, L. I., V. V. Rezelj, A. Henrion-Lacritick, D. Erazo, J. Boussier, T. Vallet, V. Bernhauerová, et al. 2021. "Defective Viral Genomes from Chikungunya Virus Are Broad-Spectrum Antivirals and Prevent Virus Dissemination in Mosquitoes." **PLoS Pathogens** 17: 1-19.

Li, D., W. B. Lott, K. Lowry, A. Jones, H. M. Thu e J. Aaskov. 2011. "Defective Interfering Viral Particles in Acute Dengue Infections." **PloS One** 6: 1-12.

Livak, K. J., e T. D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." **Methods** 25: 402-408.

Manrubia, S. C., C. Escarmís, E. Domingo e E. Lázaro. 2005. "High Mutation Rates, Bottlenecks, and Robustness of RNA Viral Quasispecies." **Gene** 347: 273-282.

McWilliam, L. E. C. e J. McLauchlan. 2013. "Determining the Cellular Diversity of Hepatitis C Virus Quasispecies by Single-Cell Viral Sequencing." **Journal of Virology** 87: 12648-12655.

Ministry of Health, Labour and Welfare (LHLW). Report on the Deliberation Results: Avigan Tablet 200 mg. **LHLW** 2014. Disponível em: <https://www.pmda.go.jp/files/000210319.pdf>. Acesso em 05/05/2024.

Acesso em: 10/05/24.

Musso, D., e D. J. Gubler. 2016. "Zika Virus." **Clinical Microbiology Reviews** 29: 487-524.

Naesens, L., L. W. Guddat, D. T. Keough, A. B. P. Kuilenburg, J. Meijer, J. V. Voorde e J. Balzarini. 2013. "Role of Human Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase in Activation of the Antiviral Agent T-705 (favipiravir)." **Molecular Pharmacology** 84: 615-629.

Novelo, M., M. D. Hall, D. Pak, P. R. Young, E. C. Holmes e E. A. McGraw. 2019. "Intra-Host Growth Kinetics of Dengue Virus in the Mosquito *Aedes Aegypti*." **PLoS Pathogens** 15: 1-19.

Oliveira, J. H. M., O. A. C. Talyuli, R. L. S. Goncalves, G. O. Paiva-Silva, M. H. F. Sorgine, P. H. Alvarenga e P. L. Oliveira. 2017. "Catalase Protects *Aedes Aegypti* from Oxidative Stress and Increases Midgut Infection Prevalence of Dengue but Not Zika." **PLoS Neglected Tropical Diseases** 11: 1-13.

O. Santos, N. Suely. 2015. **Virologia humana** (3a. ed.).

Patricio, D. O., G. B. M. Dias, L. W. Granella, B. Trigg, H. C. Teague, D. Bittencourt, A. Báfica, A. Zanotto-Filho, B. Ferguson e D. S. Mansur. 2022. "DNA-PKcs Restricts Spreading and Is Required for Effective Antiviral Response." **Frontiers in Immunology** 13: 1-10.

Patterson, E. I., K. Khanipov, M. M. Rojas, T. F. Kautz, D. Rockx-Brouwer, G. Golovko, L. Albayrak, Y. Fofanov e N. L. Forrester. 2018. "Mosquito Bottlenecks Alter Viral Mutant Swarm in a Tissue and Time-Dependent Manner with Contraction and Expansion of Variant Positions and Diversity." **Virus Evolution** 4: 1-11.

Perales, C., V. Martín e E. Domingo. 2011. "Lethal Mutagenesis of Viruses." **Current Opinion in Virology** 1: 419-422.

Poirier, E. Z., B. Goic, L. Tomé-Poderti, L. Frangeul, J. Boussier, V. Gausson, H. Blanc, et al. 2018. "Dicer-2-Dependent Generation of Viral DNA from Defective Genomes of RNA Viruses Modulates Antiviral Immunity in Insects." **Cell Host & Microbe** 23: 1-21.

Poirier, E. Z., B. C. Mounce, K. Rozen-Gagnon, P. J. Hooikaas, K. A. Stapleford, G. Moratorio e M. Vignuzzi. 2015. "Low-Fidelity Polymerases of Alphaviruses Recombine at Higher Rates To Overproduce Defective Interfering Particles." **Journal of Virology** 90: 2446-2454.

Poirier, E. Z., e M. Vignuzzi. 2017. "Virus Population Dynamics during Infection." **Current Opinion in Virology** 23: 82-87.

Rezelj, V. V., L. I. Levi e M. Vignuzzi. 2018. "The Defective Component of Viral Populations." **Current Opinion in Virology** 33: 74-80.

Roundy, C. M., S. R. Azar, S. L. Rossi, J. H. Huang, G. Leal, R. Yun, I. Fernandez-Salas, et al. 2017. "Variation in *Aedes Aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission." **Emerging Infectious Diseases** 23: 625-632.

Rückert, C., L. Bell-Sakyi, J. K. Fazakerley e R. Fragkoudis. 2014. "Antiviral Responses of Arthropod Vectors: An Update on Recent Advances." **Virusdisease** 25: 249-260.

Sanderson, T., e C. Ruis. 2023. "A molnupiravir-associated mutational signature in global SARS-CoV-2 genomes" **Nature** 623: 594-600.

Sanford, T. J., H. V. Mears, T. Fajardo, N. Locker e T. R. Sweeney. 2019. "Circularization of Flavivirus Genomic RNA Inhibits de Novo Translation Initiation." **Nucleic Acids Research** 47: 9789-9802.

Schnettler, E., M. G. Sterken, J. Y. Leung, S. W. Metz, C. Geertsema, R. W. Goldbach, J. M. Vlak, A. Kohl, A. A. Khromykh e G. P. Pijlman. 2012. "Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells." **Journal of Virology** 86: 13486-13500.

Slonchak, A., L. E. Hugo, M. E. Freney, S. Hall-Mendelin, A. A. Amarilla, F. J. Torres, Y. X. Setoh, et al. 2020. "Zika Virus Noncoding RNA Suppresses Apoptosis and Is Required for Virus Transmission by Mosquitoes." **Nature Communications** 11: 1-14.

Strottmann, D. M., C. Zanluca, A. L. P. Mosimann, A. C. Koishi, N. C. Auwerter, H. Faoro, A. H. D. Cataneo, et al. 2019. "Genetic and Biological Characterisation of Zika Virus Isolates from Different Brazilian Regions." **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz** 114: 1-11.

Tan, B. H., J. Fu, R. J. Sugrue, E. H. Yap, Y. C. Chan, e Y. H. Tan. 1996. "Recombinant Dengue Type 1 Virus NS5 Protein Expressed in Escherichia Coli Exhibits RNA-Dependent RNA Polymerase Activity." **Virology** 216: 317-325.

Tesla, B., L. R. Demakovsky, H. S. Packiam, E. A. Mordecai, A. D. Rodríguez, M. H. Bonds, M. A. Brindley e C. C. Murdock. 2018. "Estimating the Effects of Variation in Viremia on Mosquito Susceptibility, Infectiousness, and R0 of Zika in *Aedes Aegypti*." **PLoS Neglected Tropical Diseases** 12: 1-19.

Van Slyke, G. A., J. J. Arnold, A. J. Lugo, S. B. Griesemer, I. M. Moustafa, L. D. Kramer, C. E. Cameron e A. T. Ciota. 2015. "Sequence-Specific Fidelity Alterations Associated with West Nile Virus Attenuation in Mosquitoes." **PLoS Pathogens** 11: 1-21.

Vignuzzi, M., e C. B. López. 2019. "Defective Viral Genomes Are Key Drivers of the Virus-Host Interaction." **Nature Microbiology** 4: 1075-1087.

Vignuzzi, M., J. K. Stone, J. J. Arnold, C. E. Cameron e R. Andino. 2006. "Quasispecies Diversity Determines Pathogenesis through Cooperative Interactions in a Viral Population." **Nature** 439: 344-348.

Villordo, S. M., D. E. Alvarez e A. V. Gamarnik. 2010. "A Balance between Circular and Linear Forms of the Dengue Virus Genome Is Crucial for Viral Replication." **RNA** 16: 2325-2335.

Wang, A., S. Thurmond, L. Islas, K. Hui e R. Hai. 2017. "Zika Virus Genome Biology and Molecular Pathogenesis." **Emerging Microbes & Infections** 6: 1-6.

Wang, S., K. W. K. Chan, K. B. Naripogu, C. M. D. Swarbrick, J. Aaskov e S. G. Vasudevan. 2020. "Subgenomic RNA from Dengue Virus Type 2 Suppresses Replication of Dengue Virus Genomes and Interacts with Virus-Encoded NS3 and NS5 Proteins." **ACS Infectious Diseases** 6: 436-346.

Warmbrod, K. L., E. I. Patterson, T. F. Kautz, A. Stanton, D. Rockx-Brouwer, B. K. Kalveram, K. Khanipov, S. Thangamani, Y. Fofanov e N. L. Forrester. 2019. "Viral RNA-Dependent RNA Polymerase Mutants Display an Altered Mutation Spectrum Resulting in Attenuation in Both Mosquito and Vertebrate Hosts." **PLoS Pathogens** 15: 1-20.

Weaver, S. C., N. L. Forrester, J. Liu e N. Vasilakis. 2021. "Population Bottlenecks and Founder Effects: Implications for Mosquito-Borne Arboviral Emergence." **Nature Reviews. Microbiology** 19: 184-195.

World Health Organization (WHO). **Zika Virus**. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus?gclid=CjwKCAjwxr2iBhBJEiwAdXECw5csE9Yk9\\_ETBrc-x6W2b-34\\_K5ye\\_FwtDysloUphS0nXOBRReixbMhoCJw0QAvD\\_BwE](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus?gclid=CjwKCAjwxr2iBhBJEiwAdXECw5csE9Yk9_ETBrc-x6W2b-34_K5ye_FwtDysloUphS0nXOBRReixbMhoCJw0QAvD_BwE).

Acesso em: 01/05/24.

Zhao, B., G. Yi, F. Du, Y. Chuang, R. C. Vaughan, B. Sankaran, C. C. Kao e P. Li. 2017. "Structure and Function of the Zika Virus Full-Length NS5 Protein." **Nature Communications** 8: 1-9.