

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ZIKA VÍRUS: VARIABILIDADE GENÉTICA E
CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS
RESPONSÁVEIS PELA RESPOSTA IMUNE HUMORAL.**

RAFAEL RIBEIRO MOTA SOUZA

Salvador-Ba

2018

RAFAEL RIBEIRO MOTA SOUZA

**ZIKA VÍRUS: VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DAS
PROTEÍNAS VIRAIS RESPONSÁVEIS PELA RESPOSTA IMUNE HUMORAL.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologia Industrial e Imunobiológicos, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Silvia Ines Sardi

Orientadora

Salvador-BA

2018

RAFAEL RIBEIRO MOTA SOUZA

**“Zika Vírus: Variabilidade Genética e Caracterização Das
Proteínas Virais Responsáveis pela Resposta Imune
Humoral”**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 26 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

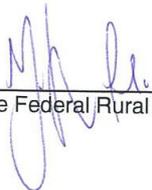
Silvia Inês Sardi – Orientadora
Doutora em Virologia pela Universidad de Buenos Aires,
UBA, Argentina.
Universidade Federal da Bahia



Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar
Doutor em Bioinformática pela Universidade Federal de Minas Gerais
UFMG, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.



Nadia Rossi de Almeida
Doutora em Ciências Veterinárias Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
UFRRJ, Brasil
Universidade Federal da Bahia



À Deus, meus familiares, e principalmente à
minha mãe, Sueli Mota, pelo amor, carinho,
incentivo, compreensão e apoio,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, o qual estou inserido, e onde encontram-se profissionais da mais alta competência e compromisso com a formação dos estudantes.

À Profa. Dra. Silvia Ines Sardi e ao Prof. Dr. Gubio Soares Campos, por me abrigarem no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências da Saúde – UFBA, pela atenção, excelente orientação e companheirismo durante esta caminhada.

Aos colegas de mestrado e doutorado, pela amizade, bom humor, empréstimo de materiais e reagentes, além da atenção especial na abdicação do próprio tempo livre para ensinar aquelas técnicas jamais feitas no Norte e Nordeste, no Brasil e no mundo, garantindo sempre os melhores resultados.

Também, às estudantes de iniciação científica do Laboratório de Virologia: Gabriela Menezes, Yara Abreu e Ramile Araújo, pelas incontáveis vezes que me ajudaram nos experimentos.

À Daniel Moura de Oliveira, pelo auxílio com o desenvolvimento do algoritmo, utilizado no trabalho, para a contagem de alterações de códon em alinhamentos de sequências de nucleotídeos.

À Thais dos Santos Rocha, pelo companheirismo, paciência e estímulo aos estudos.

Agradecimentos à FAPESB pelo financiamento do projeto, concessão de bolsas de estudo, e apoio ao desenvolvimento científico no estado da Bahia.

E minha gratidão, também, a todos que, de forma direta ou indireta, ajudaram nesse percurso.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Abreviaturas	viii
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	15
2. Revisão da literatura	16
2.1. Zika Vírus: histórico, características da infecção, microcefalia e síndrome de Guillain-Barré	16
2.2. Estrutura molecular do vírus, replicação e variabilidade.....	18
2.3. Resposta imune, reação cruzada e tecnologias de diagnóstico.....	21
3. Objetivos	24
3.1. Objetivo geral	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. Materiais e métodos	25
4.1. Desenho experimental	25
4.2. Cultura de células.....	26
4.3. Produção ZIKV e DENV4 em cultura de células	26
4.4. Concentração de ZIKV e DENV4 por ultracentrifugação.....	26
4.5. Separação de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
4.6. Determinação da antigenicidade e reação imunológica das proteínas de ZIKV e DENV4.....	27
4.6.1. Amostras de soro utilizadas nos experimentos de Western Blot.....	27
4.6.2. Elaboração da técnica de Western Blot.....	27
4.7. Análise filogenética dos Flavivírus e arbovirus.....	28
4.8. Análises da variabilidade genética da cepa de ZIKV da Bahia e detecção de mutações silenciosas.....	28
4.9. Identidade das sequências de aminoácidos das proteínas de ZIKV com outros Flavivírus e arbovírus.....	29
4.9. Localização de regiões de peptídeos singulares de ZIKV nas proteínas E e NS1.....	30

5. Resultados	31
5.1. Produção de ZIKV e DENV4 em cultura de células.....	31
5.2. Perfil de fracionamento dos vírus ZIKV e DENV4 por SDS-PAGE.....	32
5.3. Antigenicidade das proteínas virais do ZIKV e reação sorológica cruzada com DENV.....	33
5.3.1. Utilização de soros IgG anti-ZIKV.....	33
5.3.2. Utilização de soros IgG anti-DENV.....	34
5.4. Análise da identidade das sequências das proteínas de ZIKV e diferentes arbovírus.....	40
5.5. Análise filogenética das cepas de ZIKV com outros Flavivírus e arbovírus	42
5.6. Análise da variabilidade do ZIKV da Bahia, Brasil, 2016 e detecção de mutações silenciosas	43
5.7. Localização de peptídeos singulares de ZIKV nas proteínas E e NS1.....	45
6. Discussão	50
7. Conclusão	55
8. Referências Bibliográficas	56
9. Anexo	62

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADE	Aumento da infecção dependente de anticorpos (<i>Antibody dependent enhancement</i>)
C6/36	Células C6/36 (não infectadas)
C6/36+ZIKV	Células C6/36 infectadas com ZIKV
C6/36+DENV	Células C6/36 infectadas com DENV
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDS	Sequência de DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHIKV	Chikungunya Vírus
DAB	3'3' Diaminobenzidina
DENV	Vírus da Dengue
DENV1	DENV sorotipo 1
DENV2	DENV sorotipo 2
DENV3	DENV sorotipo 3
DENV4	DENV sorotipo 4
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
EMBL-EBI	Instituto Europeu de bioinformática
GCC	<i>GNU Compiler Collection</i>
HCV	Vírus da Hepatite C
hNPCs	Células progenitoras neurais corticais humanas
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ILHV	Ilheus Vírus
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
JTT	Modelo de Jones-Taylor-Thornton
MAYV	Vírus Mayaro
MSA	Alinhamento Múltiplo de Sequências (<i>Multiple alignment sequence</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	Não detectado

NS1	Proteína não estrutural 1
NS2A	Proteína não estrutural 2A
NS2B	Proteína não estrutural 2B
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4A	Proteína não estrutural 4A
NS4B	Proteína não estrutural 4B
NS5	Proteína não estrutural 5
OROV	Oropouche Vírus
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PRNT	Testes de redução por neutralização em placa
Proteína C	Proteína do capsídeo
Proteína E	Proteína do envelope
Proteína M	Proteína de membrana
prM	Proteína precursora de membrana
qRT-PCR	RT-PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
ROCV	Vírus Rocio
RT-PCR	PCR de transcrição reversa
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SLEV	São-Luis Encefalite Vírus
UFBA	Universidade Federal da Bahia
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Zika Vírus
g	Gramas
mg	Miligramas
µg	Microgramas
L	Litros
mL	Mililitros
µL	Microlitros
kb	Kilobases

kDa	Kilodaltons
M	Molar
mM	Milimolar
V	Volts
G	Gravidade
rpm	Rotações por minuto
pH	Potencial hidrogeniônico
w/v	Peso/volume
min	Minutos
h	Horas
°C	Graus celsius
%	Porcento
>	Maior que
<	Menor que

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcadores imunológicos da infecção por flavivírus-arbovírus ao longo de dias	21
Figura 2. Modelo do aumento da infecção de DENV por ADE.....	22
Figura 3. Fluxograma das atividades do projeto.....	25
Figura 4. Efeito citopático da infecção de ZIKV e DENV4 em cultura de células C6/36..	31
Figura 5. Perfil de fracionamento das proteínas de ZIKV e DENV4 em SDS-PAGE.....	32
Figura 6. Western Blot das proteínas de ZIKV detectadas com soros IgG anti-ZIKV.....	35
Figura 7. Western Blot das proteínas de DENV4 detectadas com soros IgG anti-DENV.....	36
Figura 8. Western Blot das proteínas de ZIKV detectadas com soros IgG anti-DENV.....	37
Figura 9. Western Blot das proteínas de DENV4 detectadas com soros IgG anti-ZIKV.....	38
Figura 10. Filogenia de ZIKV, Flavivírus e arbovírus.....	42
Figura 11. MSA de regiões peptídicas singulares da proteína E.....	46
Figura 12. MSA de regiões peptídicas singulares da proteína NS1.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Função das proteínas não estruturais no ciclo de replicação do ZIKV.....	19
Tabela 2. Resultados comparativos da reatividade das proteínas de ZIKV e DENV4 com soros IgG anti-ZIKV.....	39
Tabela 3. Resultados comparativos da reatividade das proteínas de ZIKV e DENV4 com soros IgG anti-DENV.....	39
Tabela 4. Variabilidade das proteínas de ZIKV em relação as proteínas de outros Flavivírus e arbovírus.....	42
Tabela 5. Análise das trocas de aminoácidos e mutações silenciosas entre ZIKV, Uganda, 2007, e ZIKV, Bahia, Brasil, 2016.....	44
Tabela 6. Identidade percentual dos peptídeos singulares de ZIKV com sequências de regiões equivalentes dos Flavivírus.....	48
Tabela 7. Peptídeos singulares das proteínas antigênicas E e NS1 de ZIKV.....	49
Anexo 1. Tabela com informações do banco de dados do NCBI sobre as sequências utilizadas neste trabalho.....	62

RESUMO

SOUZA, Rafael Ribeiro Mota. Zika Vírus: Variabilidade genética e caracterização das proteínas virais responsáveis pela resposta imune humoral.

Desde o recente surto no Brasil, o Zika Vírus (ZIKV) tem expandido território, rapidamente, alcançando regiões endêmicas de outros Flavivírus como o Vírus da Dengue (DENV). A ocorrência de reações cruzadas que tem acontecido na sorologia dos Flavivírus tem despertado demanda por antígenos e anticorpos mais específicos. Sendo assim, o presente trabalho tratou de analisar comparativamente a antigenicidade das proteínas de ZIKV e DENV, e identificar a proteínas responsáveis por reações cruzadas entre os vírus, a partir de ensaios de Western Blot com 20 soros IgG anti-ZIKV e anti-DENV. Também foram feitas análises bioinformáticas para analisar quantitativamente a similaridade do ZIKV com 14 diferentes Flavivírus e arbovírus, e então, identificar peptídeos singulares do ZIKV a partir de análise da divergência com 10 Flavivírus de maior homologia. Foi observada alta taxa de detecção das proteínas de ZIKV E, NS5 e NS1 por ambos os soros IgG anti-ZIKV e anti-DENV, com destaque a intensa sensibilidade à proteína E, pelos soros de ambos os vírus. As proteínas NS2A e prM também foram detectadas em menor taxa, e também apresentaram reconhecimento cruzado, destacando assim, que as proteínas antigênicas de ZIKV e DENV também como alvo no reconhecimento sorológico cruzado. Análise de semelhança feita entre cepas americanas e africanas de ZIKV demonstraram a ocorrência de mutações silenciosas. Em filogenia com diferentes arbovírus, ZIKV apresentou grande proximidade evolutiva ao DENV e a outros Flavivírus, e grande distância com Chikungunya, Oropouche e o vírus da Hepatite C. Análises da homologia das proteínas dos arbovírus revelaram NS5, NS3, E, e NS1 como as proteínas de ZIKV mais conservadas, enquanto que NS2A, a mais variável. O trabalho também tratou de identificar 8 regiões singulares às proteínas, antigênicas, E e NS1, de ZIKV, de modo a servir de subsídio ao desenvolvimento de novas ferramentas para a detecção sensível e mais específica do ZIKV por sorologia.

Palavras-Chave: Zika Vírus, Antigenicidade, Reações cruzadas, Variabilidade.

ABSTRACT

SOUZA, Rafael Ribeiro Mota. Zika virus: genetic variability and characterization of viral proteins responsible for the humoral immune response.

Since the recent outbreak in Brazil, Zika Virus (ZIKV) has rapidly expanded and reached endemic regions of other Flaviviruses such as Dengue Virus (DENV). The cross-reactions that occurs in Flavivirus serology has triggered the demand for more specific antigens and antibodies. Thus, the present work sought to comparatively analyze an antigenicity of the ZIKV and DENV proteins, and to identify the proteins responsible for cross-reactions between viruses, by Western Blot assays with 20 IgG anti-ZIKV and anti-DENV sera. Bioinformatic analysis were applied for the quantitative analysis of ZIKV similarity with 14 Flavivirus and arbovirus, and to identify unique ZIKV peptides from a divergence analysis with 10 higher homology Flavivirus. High detection ratio was observed in ZIKV's E protein, NS5 and NS1 by both IgG anti-ZIKV and anti-DENV. ZIKV E protein was highlighted by the high sensibility using sera from both virus. The NS2A and prM proteins were also detected at a lower rate, and also were detected by cross-reaction, concluding that antigenic proteins of ZIKV and DENV are also targets in cross-reactive detection. Analysis of similarity between the American and African ZIKV's strains demonstrated the occurrence of silent mutations. In phylogeny with different arboviruses, ZIKV showed great proximity to DENV and these with other Flavivirus. Higher phylogenetic distance was observed between Flavivirus and Chikungunya, Oropouche and Hepatite C Virus. Analysis of the homology of arbovirus proteins revealed NS5, NS3, E, and NS1 as the most conserved ZIKV proteins, whereas NS2A, the most variable. The work also dealt to identify 8 unique regions within the antigenic ZIKV proteins, E and NS1, in order to serve as a subsidy to the development of sensitive and more specific tools for ZIKV detection by serology.

Keywords: Zika Virus, Antigenicity, Cross Reactions, Variability.

1. INTRODUÇÃO

O Zika Vírus (ZIKV) é um arbovírus transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, semelhante a outros Flavivírus endêmicos de regiões tropicais, como o Vírus da Dengue (DENV) e Vírus da Febre Amarela (YFV). A infecção por ZIKV pode causar febre, erupções cutâneas, dor de cabeça, dores articulares, olhos vermelhos, dor muscular, assim como, muitas vezes a infecção pode passar despercebida ou assintomática. A similaridade do quadro sintomático da Zika com Dengue e Chikungunya, outras duas arboviroses endêmicas no Brasil, tem dificultado o diagnóstico clínico na ausência de testes laboratoriais (MOTA, et al., 2016; SHARMA & LAL, 2017).

O desenvolvimento de métodos de detecção laboratorial para distinção de arboviroses faz-se necessária para que pacientes possam receber tratamentos direcionados aos agentes infecciosos específicos, sobretudo frente às complicações severas relacionadas às infecções por DENV, ZIKV e Chikungunya Vírus (CHIKV), tais como: febre hemorrágica, microcefalia e Síndrome de Guillain–Barré, e dores articulares persistentes, respectivamente.

O principal inconveniente que apresenta o diagnóstico em arboviroses e ocorrência de reações cruzadas durante os ensaios sorológicos (LANCIOTTI, et al, 2008; HANCOCK, MARFEL, BEL, 2014). Se postula que a alta similaridade entre as proteínas dos Flavivírus, estaria correlacionada a ocorrência de reações cruzadas, dificultando o diagnóstico da infecção, portanto ressalta-se a necessidade do desenvolvimento de métodos de detecção sorológicas mais específicos. (PRIYAMVADA, et al, 2016).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Zika Vírus: histórico, características da infecção, microcefalia e síndrome de Guillain-Barré.

O Zika Vírus é um arbovírus, transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, pertencente à família *Flaviviridae*. O vírus foi isolado e identificado pela primeira vez na floresta de Zika na Uganda, isolado do sangue de macaco *rhesus* em abril de 1947. No ano seguinte, pesquisadores também conseguiram isolar o vírus em mosquitos *Aedes africanus*, na mesma região (DICK, KITCHEN, HADDOW, 1952), caracterizando o ZIKV como um arbovírus. A primeira infecção em humanos foi detectada em 1954 na Nigéria, a partir do isolamento viral do sangue de duas jovens com sintomatologia de febre, dor de cabeça, dores nas articulações (MACNAMARA, 1954). Em 1966, foram registrados os primeiros casos de infecção por ZIKV na Ásia, juntamente com o isolamento do vírus em *A. aegypti* em região urbana, na Malásia (MARCHETTE, GARCIA, RUDNICK, 1969).

No entanto, foi em 2007, no Gabão, que surgiram os primeiros surtos significativos de ZIKV, compreendido como uma virose circulante característica por causar dores e febre, muitas vezes diagnosticadas clinicamente como outras arboviroses. Foram feitas reações em cadeia da polimerase (PCR) de transcrição reversa (RT-PCR) para ZIKV a partir do soro de pacientes desses surtos e mosquitos coletados no período, detectando assim cinco amostras de soro positivo e dois *Aedes albopictus* (extração total) positivos, com todas as amostras coletadas em região urbana (GRARD, 2014). No mesmo período, em Yap, Micronésia, 108 possíveis casos, proveniente de um surto local, foram registrados e confirmados por RT-PCR dos soros e análise sorológica. Ainda referente ao surto em Yap, também foi observada a ocorrência de resultados falsos positivos por resposta cruzada ao soro de Dengue. Os testes sorológicos foram feitos por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) para anticorpos IgM de ZIKV e DENV, seguido de titulação dos anticorpos neutralizados (DUFFY, et al, 2009). Outro grande surto foi reportado na Polinésia Francesa em 2013, quando aumentaram as correlações de ocorrência da infecção por ZIKV e a síndrome de Guillain-Barré (BARONTI, et al, 2014). Em 2015 o ZIKV foi detectado no Brasil, na região nordeste, de onde rapidamente se espalhou para outras regiões das Américas (SARDI, et al 2016; CAMPOS, BANDEIRA, SARDI, 2015).

Existem duas principais teorias sobre o ingresso do ZIKV ao Brasil. Primeiramente, o vírus poderia ter sido carregado durante a Copa do Mundo de Futebol em junho/julho de 2014,

com a chegada de mais de 6 milhões de turistas internacionais (ZANLUCA, et al, 2015). No entanto, a outra teoria considera a possibilidade de ingresso durante o Campeonato Mundial de *Sprint* (canoagem), em 2014 no Rio de Janeiro, o qual contou com participação de atletas de quatro países do Pacífico com circulação do ZIKV (Polinésia Francesa, Nova Caledônia, Ilhas de Cook e Ilha de Páscoa) (MUSSO, 2015).

O quadro sintomático de um paciente adulto com infecção por ZIKV pode apresentar febre, erupções cutâneas, dor de cabeça, dores articulares, olhos vermelhos, dores musculares, assim como, muitas vezes a infecção pode passar despercebida ou assintomática. No entanto, a similaridade dos sintomas com os causados por outras arboviroses endêmicas e emergentes em regiões tropicais, como Dengue e Chikungunya, tem dificultado o diagnóstico clínico na ausência de testes laboratoriais (MOTA, et al., 2016; SHARMA & LAL, 2017).

Durante o período de 2015 e 2016 foram conduzidos estudos para correlacionar o aumento de casos de microcefalia com a infecção por ZIKV durante a gestação, tendo em vista um aumento alarmante de casos de recém-nascidos microcefalia no mesmo período de maior e expansão do ZIKV, no recente surto no Brasil (MLAKAR, et al. 2016; LAVINIA SCHULER-FACCINI, et al. 2016; BESNARD, et al, 2014).

Ensaio de infecção de células neurais e neuroesferas *in vitro* evidenciaram, por meio de imunocitoquímica e microscopia eletrônica, a relação da infecção por ZIKV em células-tronco neurais com a redução da viabilidade e crescimento celular, de forma a destacar evidências da relação de causa e efeito entre o ZIKV e a microcefalia (GARCEZ, *et al.*, 2016).

Em seguida, foram realizados estudos que quantificaram a taxa de infecção do ZIKV em cultura de células neurais em diferentes estágios de diferenciação. Foi observado em células progenitoras neurais corticais humanas (hNPCs) derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas uma taxa de 85% de infecção, enquanto que em células indiferenciadas houve 10% de infecção e neurônios maduros, 20%, três dias após a infecção com ZIKV (HENGLI TANG, *et al.* 2016).

Em abril de 2016, o Ministério da Saúde do Brasil divulgou em nota que houveram 7150 notificações de recém-nascidos com microcefalia, durante 2015. Destes, 1168 casos foram confirmados como positivos para ZIKV, 2241 suspeitas foram descartadas e outras 3741 permaneciam em investigação no período. Sendo que dentre as notificações feitas, 77,2% foram oriundas da região nordeste do país, sobretudo dos estados de Pernambuco e Bahia.

Estudos também têm correlacionado a infecção de ZIKV com outras patologias neurais como meningoencefalite (CARTEAUX, et al. 2016), mielite (MÉCHARLES, et al., 2016) e a síndrome de Guillain-Barré. A síndrome de Guillain-Barré está relacionada a danos à bainha de

mielina nos nervos periféricos pelo sistema imunológico. Os danos aos neurônios periféricos podem causar alterações temporárias e/ou crônicas na sensibilidade e fraqueza muscular (CAO-LORMEAU, et al., 2016; PAPLOSKI, et al. 2016; DOS SANTOS, et al., 2016).

2.2. Estrutura molecular do vírus, replicação e variabilidade.

O ZIKV tem como estrutura: um envelope viral, composto por bicamada lipídica e proteínas responsáveis pelo reconhecimento de receptores celulares para entrada do vírus na célula; capsídeo icosaédrico, ou seja, organizado com 20 faces geometricamente iguais; e genoma, não segmentado, de ácido ribonucleico (RNA) fita simples e sentido positivo, com cerca de 11 kb (MARANO, et al. 2016). O RNA viral do ZIKV é molde para a tradução de uma poliproteína viral, a qual é posteriormente clivada durante o ciclo de replicação, dando origem a 3 proteínas estruturais: proteína do Envelope (proteína E), proteína do Capsídeo (proteína C) e o precursor da proteína de Membrana (M) (prM), e 7 proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (CORTESE, et al., 2017), Tabela 1.

Durante a replicação, o ZIKV utiliza proteínas não estruturais ao longo das etapas do processo. A proteína NS1 é uma glicoproteína co-fator da replicação, participa interagindo com NS4A no complexo de replicação. A NS1 é translocada ao retículo endoplasmático, onde forma dímeros para auxiliar a replicação. Com o processo de brotamento de novos vírus durante a replicação, a proteína NS1 é secretada em grandes quantidades nos Flavivírus (MULLER, YOUNG, 2013; MACKENZIE, et al., 1998). Estudos também apontam o papel da NS1 como ferramenta de evasão do sistema imune através da inibição da produção de interferon na célula hospedeira humana (XIA, et al., 2018). Por outro lado, por ser uma proteína abundante e solúvel, NS1 tem sido desempenhado papel importante na ativação da resposta imune humoral aos flavivírus (SCATURRO, et al, 2015). NS2A é uma pequena proteína hidrofóbica, transmembrana, que faz parte do complexo de replicação viral e atua como antagonista a resposta imune por inibição da indução de interferon (LIU, et al. 2004). A proteína NS2B juntamente com a NS3 forma um complexo proteico de função protease viral (BRECHER, et al., 2017). Estudos recentes têm indicado o papel das proteínas NS4A e NS4B como supressores da via de sinalização Akt-mTOR, de modo em que haja regulação positiva da autofagia celular potencializando, por sua vez, o aumento da quantidade de vesículas de lisossomos e sítios de maturação das partículas virais (LIANG, et al., 2016). A proteína NS4A também faz parte do complexo de replicação (MACKENZIE, et al., 1998).

NS5 é a enzima responsável pela duplicação do genoma viral. A porção N-terminal da proteína NS5 contém metiltransferase, seguido de uma pequena região que conecta a porção RNA polimerase. A porção metiltransferase é responsável por adicionar um CAP 5' a estrutura do RNA genômico a fim de potencializar a tradução da poliproteína (ISSUR, et al. 2009; ZHAO, et al. 2017; EGLOFF, et al., 2002). A síntese de RNA ocorre no sítio de função polimerase com a adição de nucleotídeos individuais por mecanismo *de novo* de modo a confeccionar uma fita de RNA complementar sentido negativo, em seguida, a fita sintetizada é utilizada como molde para confecção de novas fitas de sentido positivo (VAN DIJK, MAKEYEV, BAMFORD, 2004; ACKERMANN & PADMANABHAN, 2001).

Tabela 1. Função das proteínas não estruturais no ciclo de replicação do ZIKV

Proteínas	Função
NS1	Complexo de replicação
NS2A	Complexo de replicação (inibidor de interferon)
NS2B	Complexo protease
NS3	Protease
NS4A	Complexo de replicação
NS4B	Ativador da autofagia celular
NS5	RNA polimerase

O ciclo de replicação, propriamente dito, tem início com a entrada do vírus na célula hospedeira por endocitose celular mediado por clatrina. Em seguida, a diminuição do pH no interior do endossomo reorganiza os dímeros de proteína E em arranjos triméricos que permitem a fusão com a membrana vesicular e a liberação do capsídeo e RNA genômico no citosol. Como a fita de RNA do ZIKV tem sentido positivo, ela pode ser diretamente utilizada na tradução da poliproteína viral, ao passo que também serve como molde para a polimerização

de uma fita sentido negativo, para posterior polimerização de novas fitas positivas. As cópias de RNA sentido positivo concentram-se no lúmen do retículo endoplasmático, onde são traduzidas e processadas proteínas para montagem da partícula viral imatura. A passagem através do Complexo de Golgi permite a maturação do vírus, por meio de acidificação do microambiente.

Por sua vez, a proteína prM desempenha papel importante na maturação do ZIKV durante a replicação. Com a produção de proteínas virais, a proteína prM forma heterodímeros com a proteína E, e se encontram ancoradas na parte interna do retículo endoplasmático. A interação da prM com a proteína E mantém a estrutura do envelope e impede a fusão de membranas, precocemente, durante a passagem por vesículas. Deste modo, o ZIKV torna-se maduro após a clivagem da proteína prM, em baixo pH, o que o torna um vírus infeccioso (FIELDS, 2006).

Por se tratar de um vírus de RNA, o ZIKV pode ser considerado altamente mutante, podendo-se esperar o surgimento de novas variantes do vírus ao longo da passagem por populações em períodos de apenas poucos anos, isso devido principalmente à deficiência de mecanismos de reparo durante a replicação do genoma viral.

Tomando como parâmetro o DENV (outro Flavivírus arbovírus), pode ser projetada a capacidade mutagênica do ZIKV. Relatos sobre a presença do DENV são reportados desde meados do século 19, com base em quadros sintomáticos relatados da doença (HUMPHREY, et al., 2016). Ainda neste período existem relatos do rápido espalhamento da doença em regiões tropicais e temperadas, em diversos países no globo terrestre. Em 1970, no Senegal, foi isolado pela primeira vez em humano o DENV-2, a partir de amostras de soro de uma garota jovem. (FRANCO, et al., 2011.). Dentre 1963–1964, houveram grandes surtos na Jamaica, Porto Rico e Venezuela, que foram relacionados, posteriormente, a infecção por DENV-3. Enquanto que, em 1981, foi isolado DENV-4 nas Ilhas do Caribe (BRATHWAITE DICK, et al., 2012). Considerando o aumento do fluxo de pessoas entre países atualmente, e a rápida expansão do ZIKV nas Américas, e o histórico do surgimento de novos sorotipos de DENV, poderia ser feita projeção do surgimento de novos sorotipos de ZIKV, caso o vírus se mantenha circulante entre as regiões endêmicas.

2.3. Resposta imune, reação cruzada e tecnologias de diagnóstico.

A resposta imune ao ZIKV acontece de forma muito semelhante a resposta ao DENV. Após a injeção de vírus na corrente sanguínea através da picada de mosquito, o vírus é endocitado e se multiplica em algumas células da resposta imune como células dendríticas. O primeiro contato do agente com o organismo hospedeiro humano é característico pela produção de imunoglobulina M (IgM) e posteriormente imunoglobulina G (IgG). Durante os 4 primeiros dias existe um pico de viremia, o qual decresce à medida que aumentam os títulos de IgM até o 14^a dia. Ao sexto dia, começa a produção de IgG e linfócitos B de memória, os quais são mantidos no organismo por longos períodos (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2011). Até o sexto dia de infecção, a proteína NS1 pode ser usada no diagnóstico sorológico (Imagem 1 A). Sendo que nos primeiros dias de infecção a detecção pode ser feita pela busca de RNA viral por RT-PCR, uma vez que ainda são baixos os títulos de anticorpos para uma abordagem sorológica. Em uma segunda infecção pelo agente viral, a resposta é característica principalmente pelos altos títulos de IgG simultaneamente a exposição. Também são mais curtos os picos de viremia, NS1 e IgM (Imagem 1 B) (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2011).

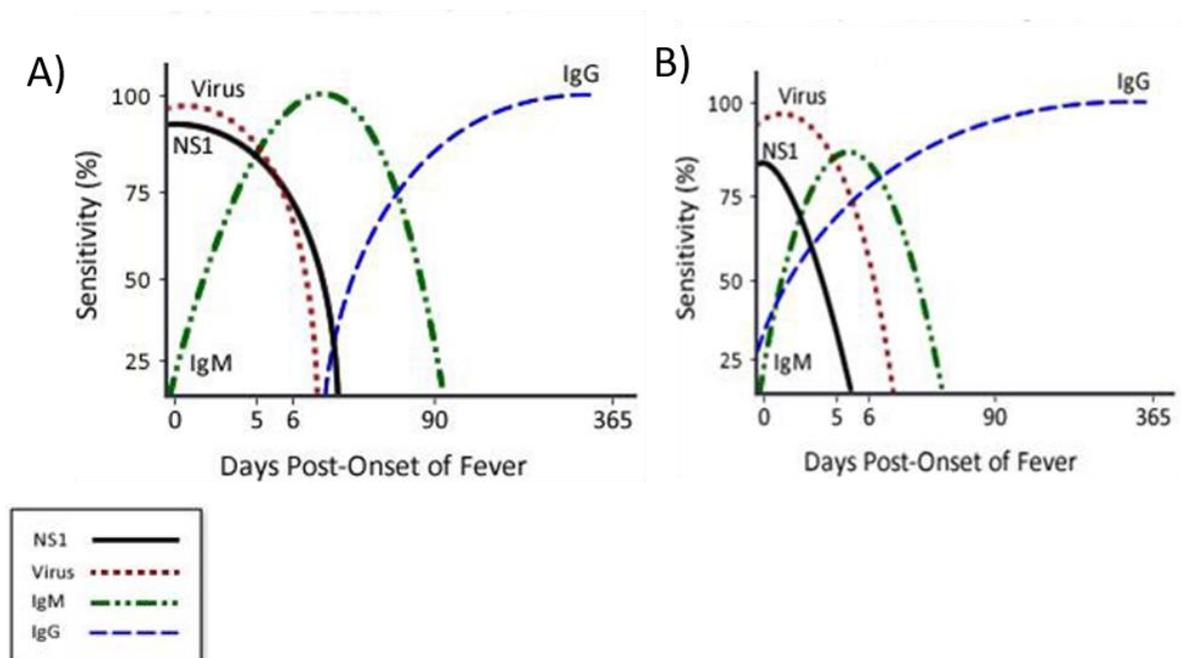


Figura 1. Marcadores imunológicos da infecção por flavivírus-arbovírus ao longo de dias. Resposta imunológica ao DENV (*Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html>). A) Gráfico apresentando marcadores de infecção primária ao DENV ao longo do tempo. B) Gráfico apresentando segunda infecção de DENV ao longo do tempo.

Estudos prévios têm evidenciado a dificuldade de distinguir por meio de ensaios imune, infecções causadas por ZIKV, DENV e YFV, sobretudo devido à ocorrência de reações sorológicas cruzadas (DUFFY, M.R., *et al*, 2009; LANCIOTTI, R.S., *et al*, 2008; HANCOCK, W.T., MARFEL, M, BEL, M. 2014).

Reações sorológicas cruzadas entre ZIKV e DENV não apenas dificultam o diagnóstico, mas também levantam preocupações quanto a possibilidade da ocorrência do aumento da infecção devido a presença prévia de anticorpos (aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE)), como ocorre em infecções recorrentes de dengue. Estudos têm demonstrado que um segundo contato com DENV pode desencadear um aumento da infecção em células mieloides (macrófagos, monócitos e células dendríticas) devido a presença de anticorpos da primeira infecção, agravando também a severidade patogênica (HALSTEAD, S. B., & O'ROURKE, E. J., 1977; FLIPSE, J., WILSCHUT, J., SMIT, J. M, 2013). No ADE, após o reconhecimento do vírus por anticorpos IgG, a porção Fc das imunoglobulinas é reconhecida por receptores na superfície de células mieloides, o que aumenta a entrada do vírus (Figura 2)

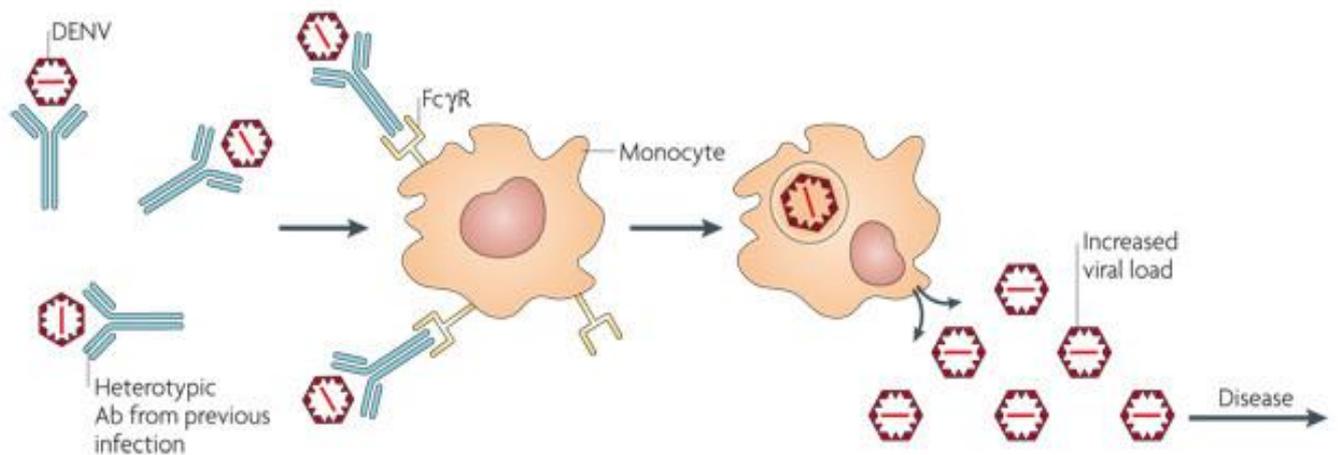


Figura 2. Modelo do aumento da infecção de DENV por ADE. O aumento da infecção viral pela presença prévia de anticorpos anti-DENV começa pelo reconhecimento do DENV por anticorpos IgG, e segue com o reconhecimento do receptor celular para com a porção Fc de IgG, resultando no aumento da infecção (WHITEHEAD, *et al.*, 2007).

Em estudo recente, foi demonstrado a reação cruzada entre ZIKV e DENV em ensaios de testes de redução por neutralização em placa (PRNT), onde anticorpos monoclonais anti-proteína E de DENV neutralizaram eficientemente o ZIKV. No entanto, também foi demonstrado que determinados títulos de anticorpos IgG anti-proteína E de DENV são capazes de aumentar a infecção em células de monócitos de linhagem U937 por ADE (PRIYAMVADA, et al, 2016).

Mais recentemente, outro estudo demonstrou a maior severidade da infecção de ZIKV pela presença previa de anticorpos anti-DENV e anti-Vírus do Oeste do Nilo (WNV), em camundongos. Os camundongos pré-imunizados apresentaram aumento da viremia, temperatura corporal, perda de peso e mortalidade, em comparação com grupo controle. Também foi evidenciado aumento da infecção tecidual na medula espinhal e testículos por imunohistoquímica (BARDINA, et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral.

Estudar o ZIKV com ênfase na variabilidade do vírus e na caracterização das proteínas virais responsáveis pela resposta imune humoral.

3.2. Objetivos específicos.

- ❖ Produção de ZIKV em cultura de células.
- ❖ Análise do perfil de fracionamento eletroforético de ZIKV e DENV4 com base no peso molecular das proteínas.
- ❖ Identificação das proteínas antigênicas de ZIKV.
- ❖ Avaliação da reatividade cruzada entre anticorpos anti-DENV e anti-ZIKV.
- ❖ Análise da homologia das sequências de ZIKV, Flavivírus e arbovírus.
- ❖ Identificação de regiões singulares das proteínas E e NS1 do ZIKV.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho experimental

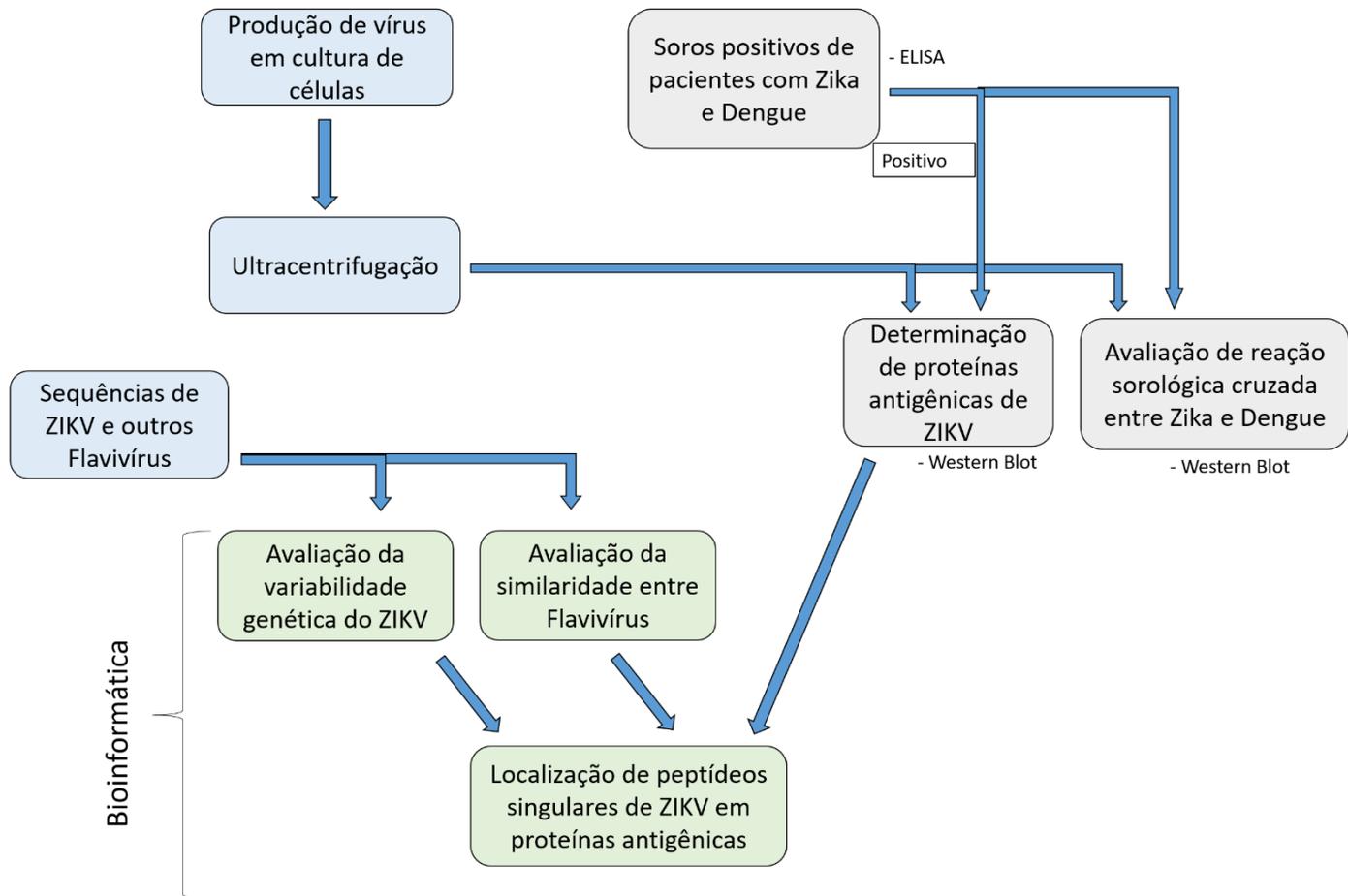


Figura 3. Fluxograma das atividades do projeto. Disposição das atividades desenvolvidas durante a realização do projeto.

4.2. Cultura de células

O cultivo de células de linhagem C6/36, proveniente de *Aedes albopictus*, em meio Leibovitz's L15 (Gibco®) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB) 10 % de caldo triptose fosfato, e incubadas a 28 °C em frascos com tampa selada.

4.3. Produção ZIKV e DENV4 em cultura de células

A produção de vírus feita em cultura de células C6/36 foi realizada utilizando cepas isoladas no Laboratório de Virologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), ZIKV (GenBank: KU940224.1) e DENV4 (GenBank: JQ513345.1). O inóculo foi incubado a 37 °C por uma hora, com homogeneização por agitação suave a cada 15 minutos, e então, foi adicionado 1 mL de meio de cultura para que as células infectadas fossem então incubadas em estufa a 28 °C por 6 dias até a observação de efeito citopático.

O estudo utilizou DENV4 em decorrência à maior distribuição epidemiológica atual no Brasil, dentre os 4 sorotipos (NUNES, et al, 2018; HERINGER, et al, 2017).

4.4. Concentração de ZIKV e DENV4 por ultracentrifugação

Nos experimentos foram utilizados vírus provenientes da ultracentrifugação de sobrenadante de células infectadas em garrafas. Para isso, as suspensões de células infectadas cultivadas foram congeladas a -20 °C e descongeladas para lise celular. O material foi então centrifugado a 10.000 G por 20 minutos à 10 °C para precipitação de restos celulares e coleta do sobrenadante. O sobrenadante foi, então, ultracentrifugado a 30.000 rpm por 2 h para que então, o *pellet* pudesse ser ressuspensão em 500 µL de tampão fosfato-salino (PBS).

4.5. Separação de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os vírus, ZIKV e DENV4, produzidos em cultura de células (Tópico 4.3.), foram fracionados em proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 %, em tampão de corrida (3 g de Tris base, 14,425 g de glicina, 1 g de Dodecil sulfato de sódio (SDS) para 1 L). Os vírus tiveram as proteínas desnaturadas em reagente de Laemmli (100 mM Tris.Cl pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 0.2 % azul de bromofenol) e fervura em banho-maria durante 3 minutos. Ao fim da corrida as proteínas foram fixadas no gel com solução fixadora (50 % metanol, 10 % ácido

acético), à temperatura ambiente e agitação por 1 hora. Em seguida o gel foi corado com solução de *coomassie blue* (0,1g de *coomassie blue* G-250, 3 mL de ácido acético em volume final de 100 mL), *overnight*. O gel então foi descorado com solução descorante (10 % metanol, 5 % ácido acético), em agitação e temperatura ambiente por 5 horas.

Foi utilizado o marcador *Prism Ultra Protein Ladder* (10 - 180 kDa), ABCAM (ab116027) para determinação do peso molecular das proteínas reveladas através do SDS-PAGE.

4.6. Determinação da antigenicidade e reação imunológica das proteínas de ZIKV e DENV4

4.6.1. Amostras de soro utilizadas nos experimentos de Western Blot

Para os ensaios de Western Blot foram utilizadas amostras de soro IgG positivo anti-ZIKV e anti-DENV, pertencentes ao acervo sorológico do Laboratório de Virologia da UFBA e provenientes do Hospital Aliança, Salvador-BA, aprovado (Resolução Nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 4583115.9.0000.0046 e parecer de número: 1421905.

Foram utilizados 10 soros positivos IgG anti-ZIKV, coletados no período de 2015, positivos para qRT-PCR, e com detecção de IgG por ELISA indireto utilizando *ELISA: Zika virus IgG, Euroimmun* (cat. EI 2668 G), segundo recomendações do fabricante.

Também foram utilizados 10 soros IgG anti-DENV, coletados no período de 2009 e 2011, com IgG detectado por ELISA utilizando *Serion ELISA classic Dengue Virus IgG and IgM* (cat. ESR 114 G, cat. ESR 114 M), segundo recomendações do fabricante.

4.6.2. Elaboração da técnica de Western Blot

Para a realização da técnica de Western Blot foi utilizada membrana de nitrocelulose Hybond-C Extra, GE Healthcare Life Sciences, 0,45 µm (cat. RPN203E). As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas do gel para membrana nitrocelulose em tampão de transferência (25mM Tris base, 192 mM glicina, 20% (w/v) metanol; pH 8,3), a 100 V por 1 hora. As membranas foram então bloqueadas com PBS-leite 5 % (leite, MOLICO®), em agitação por 1 hora, e incubadas *overnight* com soros (descritos no tópico 4.4.) diluído 1:10 em

PBS-leite 0,5 %. Após o período, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-tween 0,05 %, por 10 minutos, e incubadas com anticorpo conjugado anti-IgG humano – peroxidase (Zymax, Invitrogen), diluído 1:600 em PBS-leite 0,5%, por 1 hora e meia a 37 °C. As marcações foram reveladas após três lavagens com PBS-tween 0,05 %, por 10 minutos e uma com PBS 1X, por 10 minutos, utilizando a solução composta de 3'3' Diaminobenzidina (DAB) (10 mg/10 ml PBS 1x) e 10 µL de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com sucessivas lavagens em água destilada.

4.7. Análise filogenética do ZIKV, Flavivírus e arbovírus

A análise foi realizada empregando o método de máxima verossimilhança a partir de modelo baseado na matriz JTT (JONES, TAYLOR, THORNTON, 1992). A árvore gerada teve como base o consenso entre 1000 repetições de *bootstrap*, utilizando MEGA7. A árvore foi gerada a partir do alinhamento múltiplo de sequências (MSA) de aminoácidos das RNA polimerase virais (NS5 para os Flavivírus), usando T-coffee (EMBL-EBI).

Foram selecionados 20 sequências de arbovírus extraídas do *GenBank*, *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Anexo 1), sendo: 7 sequências de ZIKV, representando as cepas asiática e africana, 7 dos flavivírus-arbovírus mais comuns (DENV, YFV, Ilhéus vírus (ILHV), Vírus Rocio (ROCV), São-Luis Encefalite Vírus (SLEV), Vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e WNV), e outros 3 arbovírus frequentemente encontrados no Brasil: Vírus Mayaro (MAY), CHIKV e Oropouche Vírus (OROV). Também foi utilizada a sequência do Vírus da Hepatite C (HCV), um Flavivírus não arbovírus.

Para todos os vírus foram selecionadas sequências de referência, quando existente. Para MAYV e CHIKV, foram utilizadas ambas as sequências das poliproteínas estruturais e não estruturais. Quanto ao OROV, foram utilizados os segmentos grande, médio e pequeno. Informações referente as sequências utilizadas neste trabalho estão organizadas no Anexo 1.

4.8. Análises da variabilidade genética da cepa de ZIKV da Bahia e detecção de mutações silenciosas

A variabilidade genética entre a cepas de ZIKV isoladas na Bahia-Brasil (KU940224.1) e a cepa de referência, ZIKV Uganda, 2007 (NC_012532.1), foi avaliada com base na identidade das sequências de nucleotídeo e área de cobertura por meio de MSA, utilizando a ferramenta BLAST.

Para detecção de mutações entre os vírus, foram feitos e analisados MSA das sequências genômicas, das poliproteínas virais, e das proteínas de ZIKV, separadamente, utilizando T-coffee, do Instituto Europeu de bioinformática (EMBL-EBI).

As sequências genômicas alinhadas foram submetidas a contagem de alterações de códons utilizando algoritmo linguagem C++ e executado usando GCC (*GNU Compiler Collection*) na plataforma *Windows 10* (código fonte no Anexo 2). Foi realizada quantificação de alterações de códons por contagem do número de trocas de, ao menos um nucleotídeo, em trincas da região molde da tradução da poliproteína viral, respeitando o correto *frame* de leitura (considerando a troca de um a três nucleotídeos, em um mesmo códon, como uma alteração singular). A precisão do algoritmo foi confirmada realizando contagens de sequências menores. Também, as sequências de aminoácidos das poliproteínas foram verificadas utilizando o programa MEGA 7, após alinhamento com a ferramenta T-coffee (EMBL-EBI), para contar trocas de aminoácidos.

Foram considerando como semelhança entre aminoácidos a inclusão no mesmo grupo, dentre eles: de aminoácidos apolares (G, A, L, V, I, P, M, W e F), aminoácidos polares neutros (N, C, Q, S, T e Y), aminoácidos polares ácidos (D e E), e aminoácidos polares básicos (R, H e K).

4.9. Identidade das sequências de aminoácidos das proteínas de ZIKV com outros Flavivírus e arbovírus

A identidade das proteínas de ZIKV com as de diferentes Flavivírus e arbovírus, foi determinada utilizando BLAST com as sequências dos 15 vírus.

Para essa análise foram utilizadas sequências de aminoácidos das cepas de referência de ZIKV (NC_012532.1), DENV-1 (NC_001477.1), DENV-2 (NC_001474.2), DENV-3 (NC_001475.2), DENV-4 (NC_002640.1), YFV (NC_002031.1), ILHV (NC_009028.2), ROCV (AY632542.4), SLEV (NC_007580.2), JEV (NC_001437.1), WNV (NC_009942.1), HCV (NC_004102.1), MAYV (NC_003417.1), CHIKV (NC_004162.2) e OROV (NC_005776.1).

4.10. Localização de regiões de peptídeos singulares de ZIKV nas proteínas E e NS1

Foram realizados MSAs para parear sequências de aminoácidos das proteínas antigênicas: NS1 e Proteína E, provenientes da cepa de ZIKV de referência (NC_012532.1) com sequências de aminoácidos completas das poliproteínas virais de dez diferentes Flavivírus: DENV-1 (NC_001477.1), DENV-2 (NC_001474.2), DENV-3 (NC_001475.2), DENV-4 (NC_002640.1), YFV (NC_002031.1), ILHV (NC_009028.2), ROCV (AY632542.4), SLEV (NC_007580.2), JEV (NC_001437.1), WNV (NC_009942.1), para que localizar regiões de heterogenia com o uso do programa de visualização de alinhamentos, GENDOC (NICHOLAS, K.B., NICHOLAS H.B. JR., E DEERFIELD, D.W. II., 1997).

As regiões destacadas na análise supracitada, foram então, submetidas ao MSA das sequências de aminoácidos das poliproteínas de 7 diferentes cepas de ZIKV: cepas africanas (NC_012532.1 e HQ234498.2), asiáticas (KJ776791.2 e EU545988.1) e brasileiras (KU497555.1, KU940224.1, KU940228.1), para alinhamento com sequências de aminoácidos das proteínas antigênicas: NS1 e Proteína E provenientes da cepa de ZIKV de referência (NC_012532.1).

5. RESULTADOS

5.1. Produção de ZIKV e DENV4 em cultura de células.

Os vírus ZIKV e DENV4 foram cultivados cultura de célula C6/36, em garrafas, tiveram a com confirmação da infecção pela observação de efeito citopático a partir do quarto dia. O efeito citopático de ZIKV (Figura 4A) é característico pela observação da formação de grumos e morte celular evidenciada pelo desprendimento da monocamada, em comparação com o controle. Em DENV4 o efeito citopático forma grumos menores, no entanto gera maior morte celular (Figura 4B), enquanto que células não infectadas tem menor morte celular e não apresentam grumos (Figura 4C).

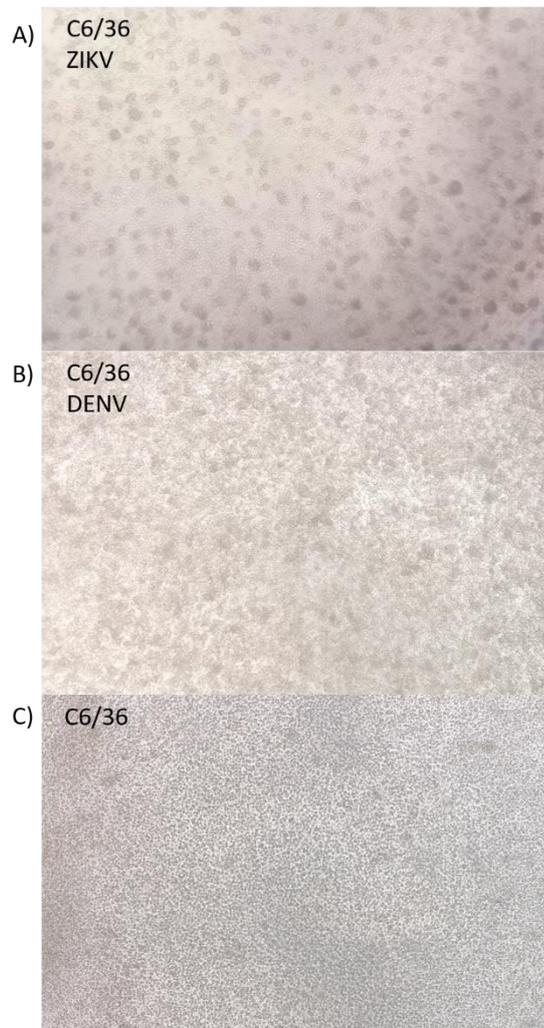


Figura 4. Efeito citopático da infecção de ZIKV e DENV4 em cultura de células C6/36. Microscopia ótica sob aumento de 100x. A) Efeito citopático do ZIKV em células C6/36, evidenciando a formação de grumos e células em suspensão. B) Efeito citopático de DENV4 em células C6/36, evidenciando, também, a formação de grumos e células em suspensão. C) Monocamada de células não infectadas.

5.2. Perfil de fracionamento dos vírus ZIKV e DENV4 por SDS-PAGE.

Foi realizado fracionamento dos vírus, ZIKV e DENV4, por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, possibilitando a localização do posicionamento de bandas proteicas com relação ao deslocamento no gel e o peso molecular. Os perfis de fracionamento de ZIKV e DENV4 em SDS-PAGE apresentaram grande semelhança, referente a um mesmo peso molecular (Figura 5). Com base na posição das proteínas e no peso molecular, as bandas reveladas foram atribuídas as proteínas E (55 kDa), NS1 (48 kDa), prM (28 kDa) e NS2A (23 kDa), em ambos os vírus.

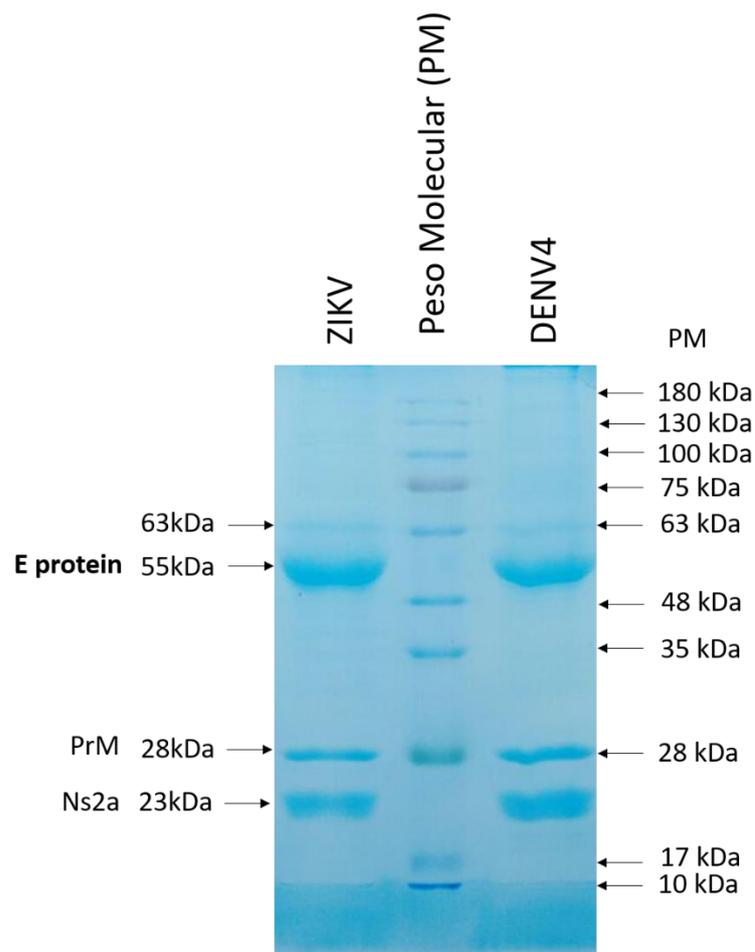


Figura 5. Perfil de fracionamento das proteínas de ZIKV e DENV4 em SDS-PAGE. Perfil de fracionamento dos vírus ZIKV e DENV4 em gel de poliacrilamida 10%, corado com *Coomassie Blue*. Setas indicam os pesos moleculares relacionados as bandas.

5.3. Antigenicidade das proteínas virais do ZIKV e reação sorológica cruzada com DENV.

A técnica de Western Blot foi realizada para avaliar a reatividade de anticorpos IgG, presente em soros IgG anti-ZIKV e IgG anti-DENV, com por proteínas de ZIKV e DENV4.

Foram testados no total 20 soros, sendo eles, 10 IgG anti-ZIKV e 10 soros IgG anti-DENV.

Caracterização da antigenicidade

5.3.1. Caracterização da reatividade das proteínas do ZIKV com soros IgG anti-ZIKV

A partir da utilizando dos 10 soros IgG anti-ZIKV para reatividade com as proteínas de ZIKV, foram detectadas as proteínas: E em 8 soros, a NS5 em 6, NS1 em 5, NS2A em 5, e a prM em apenas 2 soros (Figura 6).

Foi observado que o perfil de reatividade das proteínas virais foi semelhante entre os soros 1, 2, 4, e 9 com marcações para as proteínas NS5, E, NS1 e NS2A. Os soros 5, 6, 7 e 10 tiveram destaque pela marcação da proteína E, predominantemente, sendo que no soro 5 também foi reativo à proteína NS1 e o soro novo reativo a NS1 e NS2A (Tabela 2).

Dos 10 soros analisados, 7 apresentaram nítida visualização da reatividade sorológica (os soros 1, 2, 3, 5, 6, 9 e 10). No entanto, os soros 6 e 7 apresentaram detecção fraca da proteína E, o soro 8 detectou apenas a NS2A, e o soro 3 não foi reativo. Os resultados dos experimentos foram sintetizados na Tabela 2.

5.3.2. Caracterização da reatividade das proteínas do DENV4 com soros IgG anti-DENV

A partir da realização de ensaios de Western Blot, utilizando 10 soros IgG anti-DENV para avaliar a reatividade com as proteínas de DENV4, foram detectadas as proteínas: E em 5 soros, NS1 em 2, NS2A em 2, e prM em apenas 1 soro. NS5 não foi detectada. A intensidade das marcações foi maior nas proteínas E e NS1, nitidamente visíveis nos soros 14, 16, 17, 18 e 20. Os soros 13 e 19 não foram reativos (Figura 7). Os resultados dos experimentos foram

sintetizados na Tabela 3.

Caracterização das reações cruzadas

5.3.3. Caracterização da reatividade das proteínas do ZIKV com soros IgG anti-DENV

Em ensaio de Western Blot, para determinar a reatividade utilizando 10 soros IgG anti-DENV e proteínas de ZIKV, foram detectadas as proteínas: E em 8 soros, NS5 em 5, NS1 em 4, prM em 2 soros (com marcações fracas nos soros 11 e 12), e NS2A em apenas 1 soro (Figura 8). Também foi observado que as intensidades de marcação cruzada foram maiores nas proteínas E, NS5 e NS1 de ZIKV (Figura 8) do que nas marcações das próprias proteínas de DENV4 (Figura 7). Os resultados dos experimentos foram sintetizados na Tabela 3.

Foi observado que o perfil de reatividade às proteínas de ZIKV foi semelhante entre os soros 11 e 17, reagindo com as proteínas NS5, E e NS1 de ZIKV. No entanto, com a reatividade das proteínas E e NS1 de DENV, no soro 17, o que não se observa no soro 11 (Figura 8).

Para determinar se ocorrem reatividades sorológicas com proteínas das células C6/36, foram utilizados os soros positivos 17 e 20 (IgG anti-DENV) em Western Blot com células C6/36, não infectadas, não sendo observados reatividade específica com soros (Figura 8).

5.3.4. Caracterização da reatividade das proteínas do DENV4 com soros IgG anti-ZIKV

Partindo da utilização das 10 amostras de soros IgG anti-ZIKV para reatividade com as proteínas de DENV4, foram detectadas as proteínas: E em 3 soros, NS2A em 3, NS5 em 2 e prM em 2 soros. NS1, no entanto, não foi detectada. A intensidade das reações foi inferior à observada utilizando soro IgG anti-ZIKV com proteínas no próprio ZIKV (Figura 9). Os resultados dos experimentos foram sintetizados na Tabela 2.

Para determinar se ocorrem reatividades sorológicas com proteínas das células C6/36, foram utilizados em ensaios de Western Blot os soropositivos 9, 10 (IgG anti-ZIKV), não sendo observados reatividade específica com soros (Figura 9).

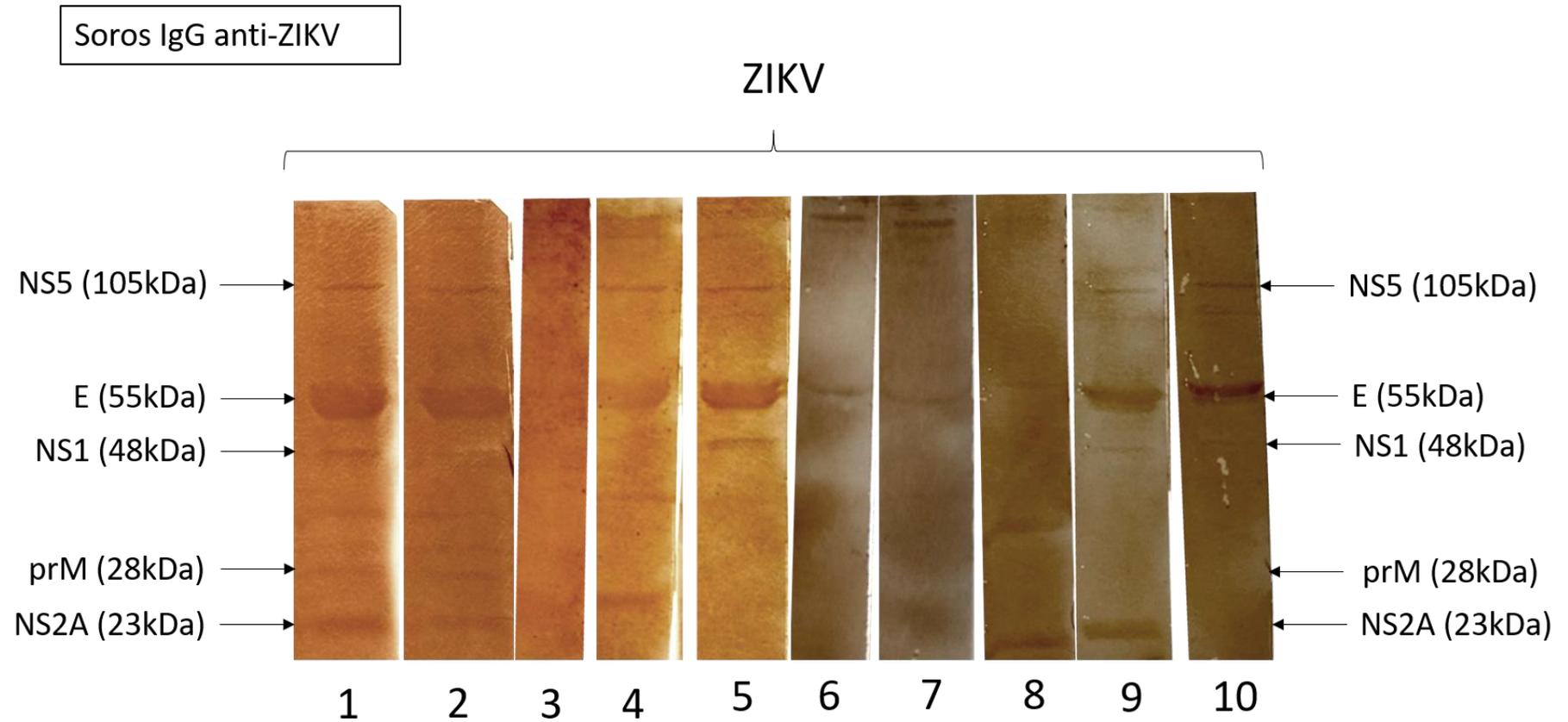


Figura 6. Western Blot das proteínas de ZIKV detectadas com soros IgG anti-ZIKV. Membranas de nitrocelulose com fracionamento proteico do ZIKV. Os pesos moleculares das proteínas reveladas fazem referência ao marcador utilizado e ao perfil de fracionamento também observado em SDS-PAGE 10%. As membranas foram reveladas com conjugado peroxidase anti-IgG humano, após incubação com soros IgG anti-ZIKV.

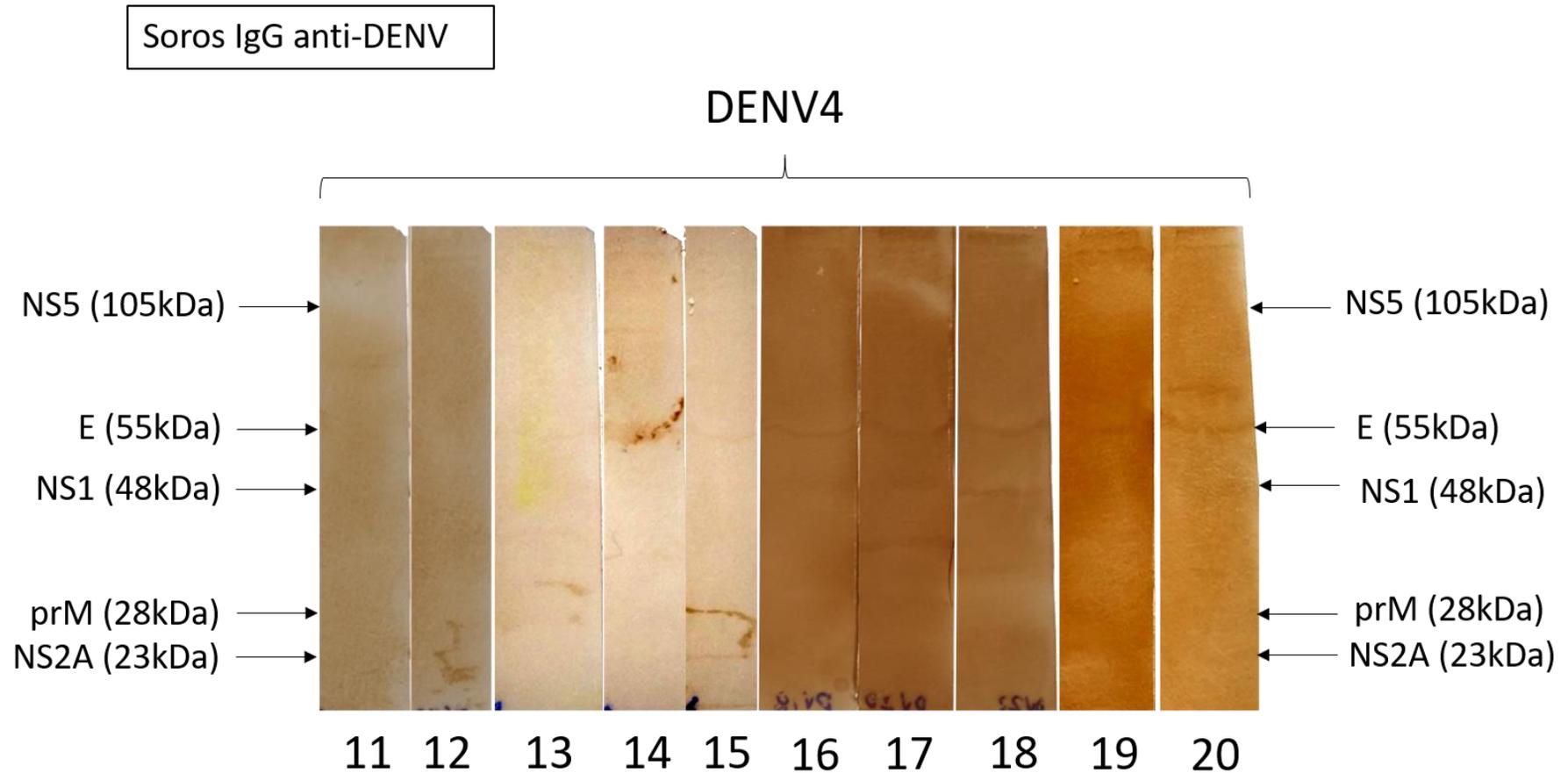


Figura 7. Western Blot das proteínas de DENV4 detectadas com soros IgG anti-DENV. Membranas de nitrocelulose com fracionamento proteico do DENV4. Os pesos moleculares das proteínas reveladas fazem referência ao marcador utilizado e ao perfil de fracionamento também observado em SDS-PAGE 10%. As membranas foram reveladas com conjugado peroxidase anti-IgG humano, após incubação com soros IgG anti-DENV.

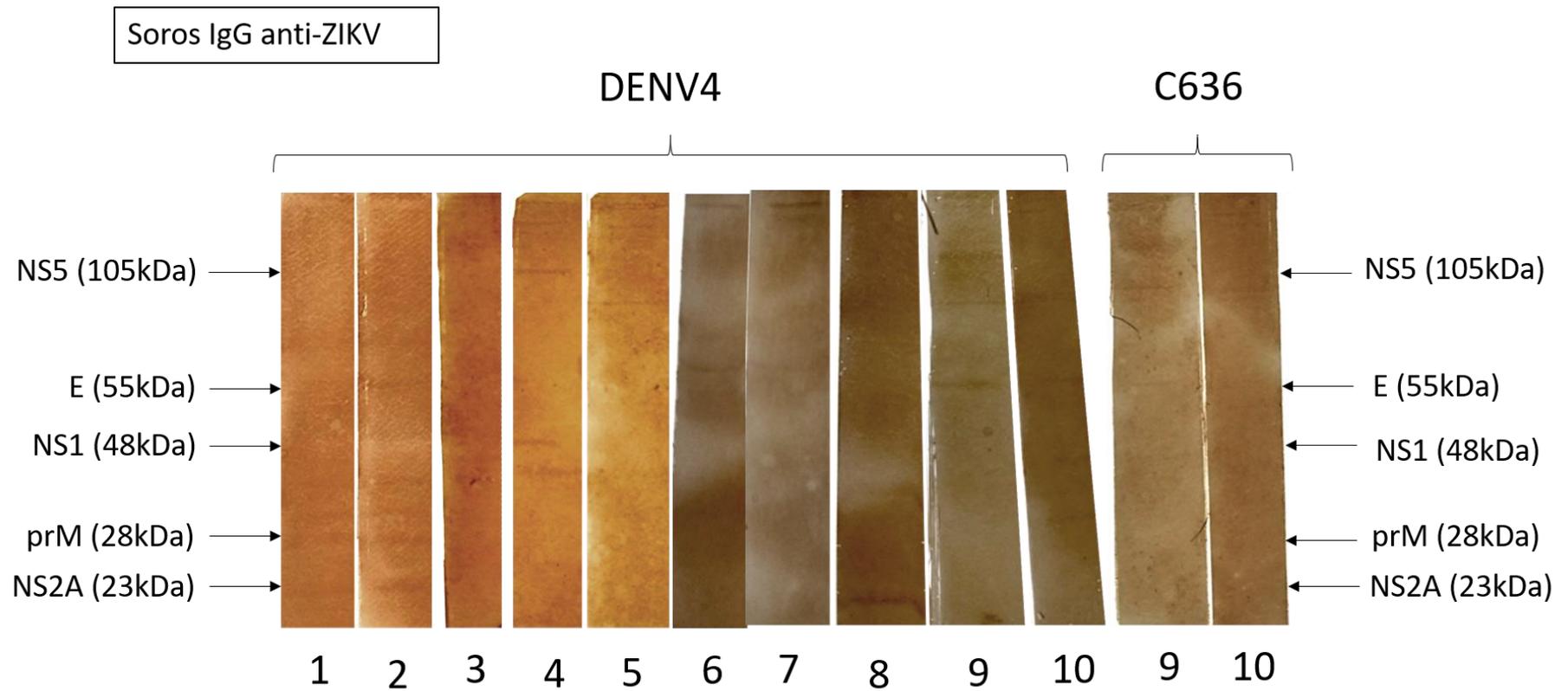


Figura 9. Western Blot das proteínas de DENV4 detectadas com soros IgG anti-ZIKV. Membranas de nitrocelulose com fracionamento proteico do ZIKV. Os pesos moleculares das proteínas reveladas fazem referência ao marcador utilizado e ao perfil de fracionamento também observado em SDS-PAGE 10%. As membranas foram reveladas com conjugado peroxidase anti-IgG humano, após incubação com soros IgG anti-DENV. Células não infectadas estão representadas como C6/36.

Tabela 2. Resultados comparativos da reatividade das proteínas de ZIKV e DENV4 com soros IgG anti-ZIKV.

Soros IgG anti-ZIKV	Reconhecimento proteico	
	ZIKV	DENV4
1	NS5, E, NS1, prM e NS2A	prM e NS2A
2	NS5, E, NS1, prM e NS2A	prM e NS2A
3	-	-
4	NS5, E, NS1, e NS2A	NS5 e NS1
5	NS5, E e NS1	-
6	E	E
7	E	-
8	prM e NS2A	NS2A
9	NS5, E, NS1, prM e NS2A	NS5 e E
10	NS5 e E	-

Tabela 3. Resultados comparativos da reatividade das proteínas de ZIKV e DENV4 com soros IgG anti-DENV.

Soros IgG anti-DENV	Reconhecimento proteico	
	ZIKV	DENV4
11	NS5, E, NS1	-
12	E, NS1, prM	-
13	-	-
14	NS5 e E	E
15	NS5 e E	NS2A
16	E	E e NS1
17	NS5, E, NS1	E e NS1
18	E e NS1	E e NS1
19	-	-
20	NS5 e E	E

5.4. Análise da identidade das sequências das proteínas de ZIKV e diferentes arbovírus

Foram analisadas por BLAST, a variabilidade de sequências das proteínas de ZIKV, dos 7 Flavivírus-arbovírus: DENV, YFV, ILHV, ROCV, SLEV, JEV, WNV, dos 2 arbovírus endêmicos no Brasil: MAYV e CHIKV, além de HCV, um Flavivírus não arbovírus (Tabela 4).

Em geral, maior identidade entre sequências foi observada nos Flavivírus-arbovírus. Dentre as proteínas dos Flavivírus-arbovírus, as que apresentaram maior valores de identidade com as proteínas de ZIKV foram, NS5, NS3, NS1 e E, com valores de identidade percentual superior a 54.4% e cobertura próxima a 100%. Enquanto que menor identidade foi observada em NS2A, inferior a 39 % de identidade de cerca de 100% de cobertura.

Os vírus MAYV, CHIKV, famílias *Togaviridae*, OROV da família *Bunyaviridae*, e HCV, um Flavivírus não-arbovírus, apresentaram menor similaridade com as sequências das proteínas de ZIKV, onde, tiveram identidade apenas em pequenas áreas de cobertura (Tabela 4).

Tabela 4. Variabilidade das proteínas de ZIKV em relação às proteínas de outros Flavivírus e arbovírus. Identidade percentual, cobertura percentual do pareamento das sequências (entre parênteses), seguido do *e-value* do pareamento das proteínas de ZIKV com as proteínas de outros Flavivírus e arbovírus. Marcação em azul destaca análises de alta similaridade entre as proteínas de ZIKV e Flavivírus-arbovírus. Marcado com rosa destaca a baixa identidade da proteína NS2A com os demais Flavivírus-arbovírus analisados. Marcado com verde destaca-se a baixa similaridade das sequências proteicas de HCV com as de ZIKV. Marcado em amarelo destaca-se a baixa similaridade das sequências proteicas de MAYV, CHIKV, OROV, com as de ZIKV. Não houve identidade quantificável nas correlações assinaladas com ND (não detectado). Os segmentos de RNA de OROV utilizados nas análises estão representados como: segmento longo (L) e segmento médio (M).

	ZIKV										
	NS5	NS3	E	NS1	NS2A	NS2B	prM	NS4A	C	NS4B	M
DENV-1	66% (99%) 0.0	66% (100%) 0.0	59% (100%) 0.0	54% (100%) 5e-141	34% (57%) 2e-15	37% (100%) 1e-28	44% (98%) 2e-49	42% (92%) 1e-31	45% (95%) 3e-24	50% (99%) 1e-79	36% (100%) 2e-15
DENV-2	66% (99%) 0.0	66% (100%) 0.0	54% (100%) 0.0	55% (100%) 1e-141	27% (98%) 2e-18	42% (95%) 2e-34	40% (98%) 6e-47	50% (98%) 1e-27	42% (81%) 1e-21	51% (99%) 4e-85	31% (100%) 5e-15
DENV-3	67% (99%) 0.0	67% (100%) 0.0	59% (100%) 0.0	56% (100%) 1e-141	28% (86%) 2e-19	38% (100%) 8e-30	43% (98%) 2e-48	41% (98%) 2e-26	49% (83%) 1e-23	52% (99%) 8e-77	35% (100%) 7e-16
DENV-4	68% (97%) 0.0	67% (100%) 0.0	57% (100%) 0.0	54% (100%) 2e-139	32% (78%) 1e-20	40% (99%) 5e-32	45% (98%) 5e-52	44% (98%) 2e-34	48% (81%) 5e-23	49% (99%) 2e-81	43% (98%) 1e-20
YFV	61% (98%) 0.0	52% (99%) 0.0	43% (99%) 5e-148	48% (100%) 7e-117	33% (86%) 8e-27	32% (100%) 5e-22	38% (98%) 2e-34	36% (98%) 2e-24	25% (84%) 0.003	33% (96%) 1e-38	41% (100%) 2e-20
ILHV	71% (98%) 0.0	69% (99%) 0.0	54% (100%) 0.0	56% (100%) 1e-143	37% (100%) 8e-40	49% (99%) 2e-37	43% (93%) 1e-46	43% (99%) 1e-31	49% (88%) 1e-21	48% (97%) 5e-66	52% (100%) 2e-24
ROCV	69% (100%) 0.0	69% (99%) 0.0	54% (100%) 0.0	57% (100%) 4e-142	35% (98%) 9e-37	49% (99%) 1e-38	51% (93%) 4e-56	41% (99%) 2e-30	51% (87%) 1e-19	47% (99%) 9e-66	60% (100%) 7e-30
SLEV	70% (99%) 0.0	68% (99%) 0.0	55% (99%) 0.0	56% (100%) 2e-141	39% (97%) 1e-40	47% (100%) 9e-37	46% (93%) 4e-47	48% (99%) 1e-35	55% (90%) 4e-32	51% (97%) 3e-68	54% (92%) 5e-26
JEV	69% (98%) 0.0	65% (99%) 0.0	55% (99%) 0.0	57% (100%) 1e-143	38% (97%) 1e-41	48% (99%) 2e-36	42% (93%) 4e-49	40% (99%) 8e-29	46% (88%) 6e-25	47% (97%) 2e-68	43% (100%) 2e-23
WNV	70% (98%) 0.0	68% (99%) 0.0	54% (99%) 0.0	56% (100%) 1e-140	37% (99%) 9e-39	49% (97%) 4e-36	46% (93%) 3e-41	43% (99%) 1e-21	49% (89%) 7e-26	46% (97%) 1e-63	47% (98%) 4e-19
HCV	38% (2%) 4.3	23% (65%) 2e-14	41% (3%) 1.5	35% (12%) 1.9	47% (7%) 3.7	31% (46%) 0.22	30% (44%) 1.7	31% (25%) 6.3	ND	48% (29%) 1.3	50% (73%) 3.3
MAYV	26% (6%) 2.1	ND	26% (9%) 2.8	43% (13%) 0.20	ND	38% (13%) 8.8	ND	27% (23%) 4.6	28% (33%) 8.4	25% (12%) 3.0	ND
CHIKV	27% (5%) 2.8	35% (7%) 0.10	30% (19%) 3.0	47% (4%) 2.6	ND	ND	36% (14%) 6.4	27% (61%) 3.1	ND	ND	ND
OROV	ND L	29% (11%) 5.7 L	ND M	28% (9%) 6.6 L	ND L	32% (13%) 5.3 L	35% (18%) 5.0 M	ND L	ND M	ND L	ND M

5.5. Análise filogenética das cepas de ZIKV com outros Flavivírus e arbovírus.

A distância evolutiva entre os arbovírus foi avaliada a partir da elaboração de uma árvore filogenética com base no MSA de aminoácidos das regiões das RNA polimerases virais (NS5 nos Flavivírus) dos mesmos 21 vírus (Figura 10). A observação das divisões cladísticas revelaram que o grupo do ZIKV está dividido em dois subgrupos: Cepas de Zika africano e das cepas brasileiras e asiáticas (*bootstrap* >70%), e que dentre o subgrupo de cepas brasileiras e asiáticas existe divisão do subgrupo com cepas da Bahia (*bootstrap*, 97%). Também foi observada grande agrupamento contendo todos os Flavivírus-arbovírus, enquanto que os arbovírus, MAYV, CHIKV e OROV, e o Flavivírus não-arbovírus, HCV, apresentaram maiores distâncias evolutivas em relação ao ZIKV e foram apresentados como grupos externos.

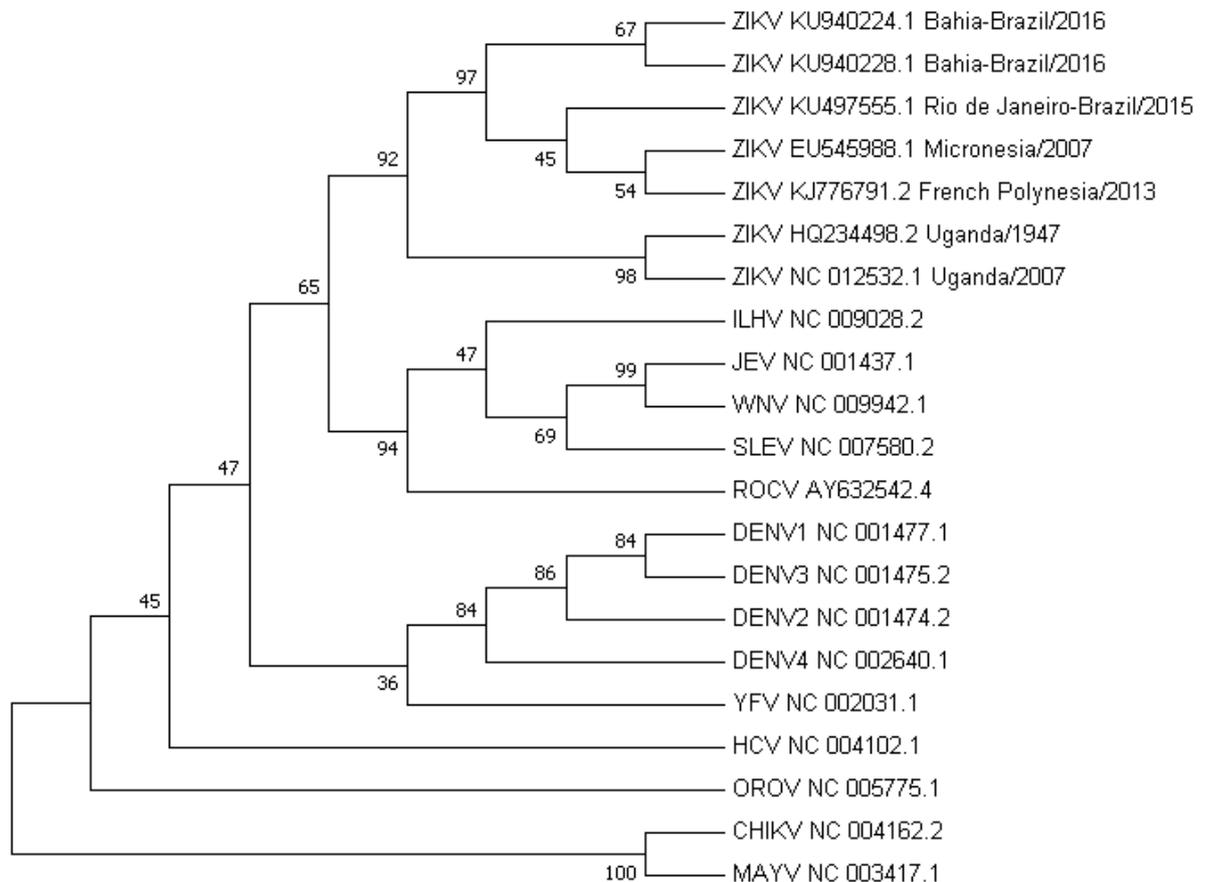


Figura 10. Filogenia de ZIKV, Flavivírus e arbovírus. Árvore filogenética de consenso cladístico. A árvore foi inferida por máxima verossimilhança baseado no modelo de Jones-Taylor-Thornton (JTT) usando MEGA 7. Divisões cladísticas foram consideradas de alta confiabilidade a partir de valores de *bootstrap* >70% (1000 réplicas feitas).

5.6. Análise da variabilidade do ZIKV da Bahia, Brasil, 2016 e detecção de mutações silenciosas.

Para avaliar a variabilidade genômica e a variabilidade das sequências de aminoácidos das poliproteínas virais dos dois isolamentos de ZIKV da Bahia, Brasil, em 2016, as sequências foram alinhadas por MSA com a sequência de referência (de Uganda, 2007).

A sequência da cepa de referência apresenta uma identidade percentual de 89 % (97 %, cobertura do alinhamento), e 0.0 de *e-value*, com ZIKV (KU940224.1). Enquanto que o percentual de identidade dentre as sequências de aminoácido das poliproteínas completas 97% (99%, cobertura), e 0.0 de *e-value*, com ZIKV (KU940224.1). Levando a conclusão de que houve maior variabilidade genômica que variabilidade das sequências de aminoácidos.

As análises de MSA das sequências de aminoácidos e nucleotídeos das proteínas de ZIKV (NC_012532.1 e KU940224.1) evidenciaram a predominância de trocas de aminoácidos por aminoácidos de características eletroquímicas semelhantes, menor incidência de trocas por aminoácidos muito eletroquimicamente distintos, e alta ocorrência de mutações silenciosas em todas as proteínas virais, onde, entre 60% e 80% das alterações de códons resultaram na tradução de um mesmo aminoácido (Tabela 5).

Tabela 5. Análise das trocas de aminoácidos e mutações silenciosas entre ZIKV, Uganda, 2007, e ZIKV, Bahia, Brasil, 2016. Contagem de alterações de aminoácidos de características semelhantes e divergentes, correlacionada ao percentual de mutações em relação tamanho da sequência de aminoácidos (entre parênteses). E contagem de alterações de códons, em cada proteína de ZIKV, a partir do MSA de sequências de nucleotídeos, e quantidade de mutações silenciosas, correlacionadas ao percentual de ocorrência em relação ao número total de códons analisados (equivalente a quantidade total da sequência de aminoácidos).

	Trocas por aminoácidos de propriedades eletroquímicas semelhantes	Trocas por aminoácidos de propriedades eletroquímicas diferentes	Quantidade total de aminoácidos analisados	Total de alterações em códon	Alterações de códon silenciosas
C	3 (2,884%)	0 (0,000%)	104	25	79 (75,961%)
prM	8 (4,761%)	1 (0,595%)	168	55	113 (67,261%)
E	9 (1,800%)	6 (1,200%)	500	173	327 (65,400%)
NS1	7 (1,988%)	2 (0,568%)	352	104	248 (70,454%)
NS2A	8 (3,539%)	1 (0,442%)	226	76	150 (66,371%)
NS2B	1 (0,769%)	1 (0,769%)	130	41	89 (68,461%)
NS3	5 (0,810%)	7 (1,134%)	617	197	420 (68,071%)
NS4A	1 (0,787%)	0 (0,000%)	127	33	94 (74,015%)
NS4B	8 (3,305%)	5 (2,006%)	242	82	160 (66,115%)
NS5	22 (2,436%)	12 (1,328%)	903	307	596 (66,002%)

5.7. Localização de peptídeos singulares de ZIKV nas proteínas E e NS1

A partir do MSA das proteínas antigênicas E e NS1 de ZIKV com diferentes Flavivírus-arbovírus, foram encontradas 8 regiões heterólogas, dentre elas, 7 pertencentes a proteína E (Figura 11A) e 1 pertencente a NS1 (Figura 12A).

As sequências peptídicas de ZIKV encontradas nas regiões heterólogas, foram então, submetidas a MSA com sequências de aminoácidos de diferentes cepas de ZIKV (incluindo americanas, asiáticas e africanas) e apresentaram alta homologia em todos os peptídeos das proteínas: E (Figura 11B) e NS1 (Figura 12B).

A identidade percentual das regiões heterólogas dos diferentes Flavivírus com os peptídeos encontrados de ZIKV foi quantificada, apresentando baixa identidade entre as sequências (Tabela 6). Em PT1 foi observada considerável identidade percentual, sobretudo com DENV4, com 50 % de identidade em 82 % de cobertura. Também foi observada similaridade no PT3, com os 4 tipos de DENV, e em PT8 em diversos Flavivírus. Os peptídeos PT4 e PT7 não apresentaram identidade com as sequências de outros Flavivírus. De modo semelhante, PT6, apresentando semelhança apenas com WNV e SLEV, com baixos valores de identidade.

Em relação a identidade dos peptídeos entre as diferentes cepas de ZIKV, foi observado 100 % de identidade da sequência completa em PT1, PT5, PT7 e PT8.

Em PT3, PT4 e PT7, foi observada uma única alteração de aminoácidos, a qual diferencia as cepas africanas das asiáticas e americanas. Enquanto que em PT2, as cepas asiáticas e americanas diferem das africanas pela inserção de 4 aminoácidos e por uma alteração pontual. As sequências dos peptídeos singulares ao ZIKV foram organizadas e apresentadas na Tabela 7.

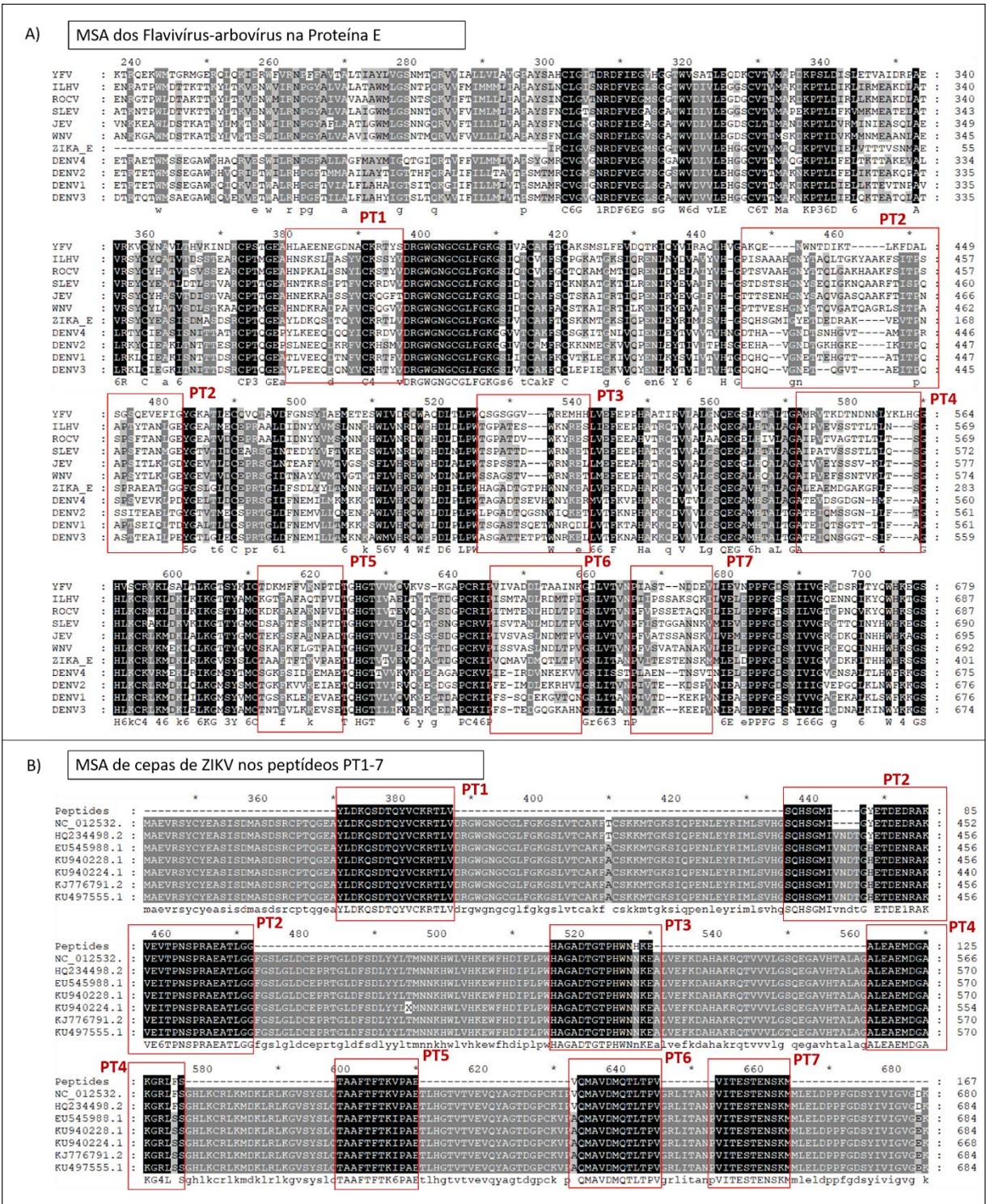


Figura 11. MSA de regiões peptídicas singulares da proteína E. A) Alinhamento das sequências da proteína E de diferentes Flavivírus-arbovírus. B) Alinhamento de diferentes cepas de ZIKV, com as mesmas regiões peptídicas destacadas anteriormente. Destaque a localização dos peptídeos PT1-7. Áreas de maior conservação estão apresentadas em tonalidades mais escuras, enquanto que, as áreas menos conservadas apresentam-se em tonalidades claras.

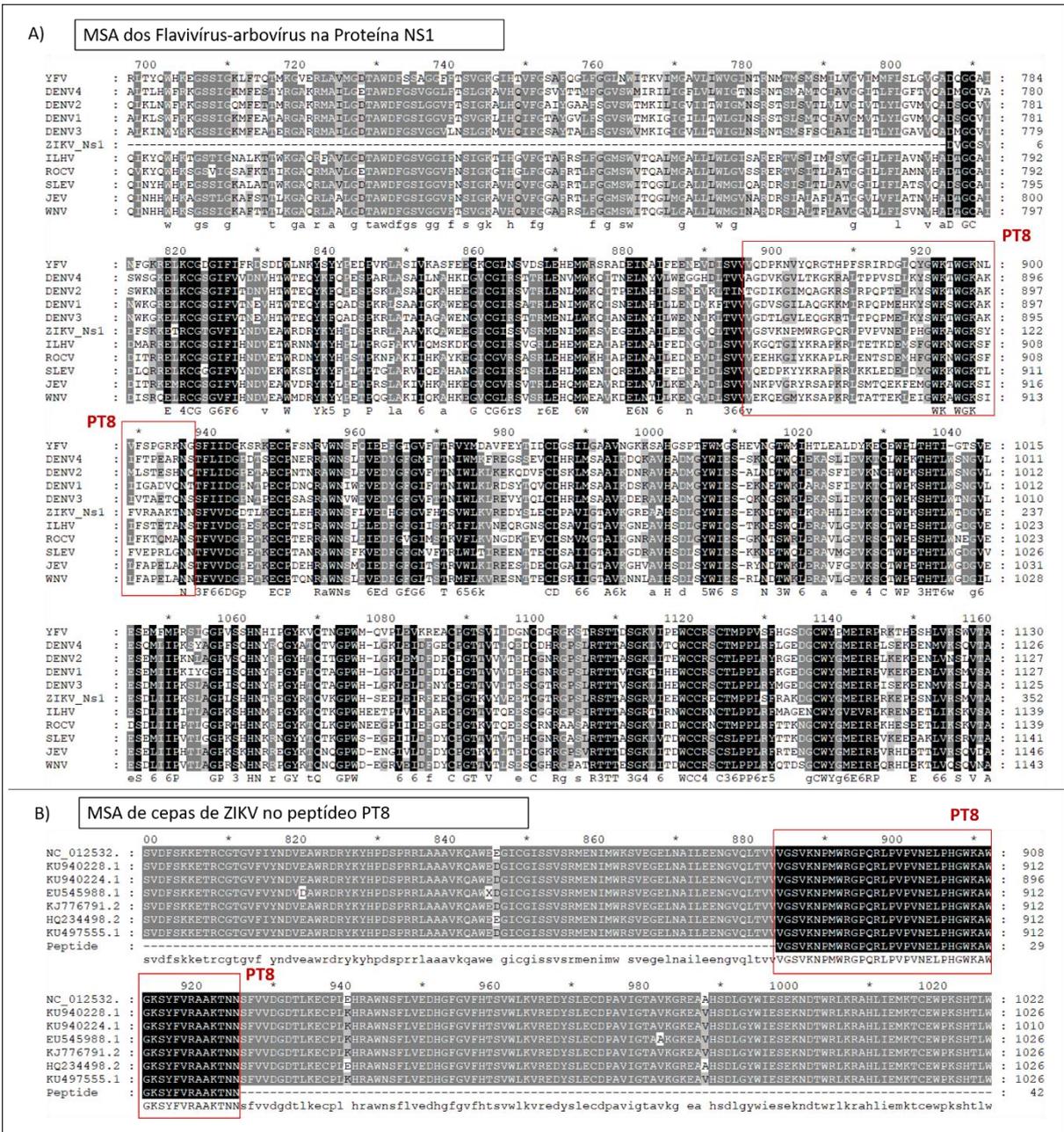


Figura 12. MSA de regiões peptídicas singulares da proteína NS1. A) Alinhamento das seqüências da proteína NS1 de diferentes Flavivírus-arbovírus. B) Alinhamento de diferentes cepas de ZIKV, na região equivalente ao peptídeo PT8. Destaque a localização do peptídeo PT8. Áreas de maior conservação estão apresentadas em tonalidades mais escuras, enquanto que, as áreas menos conservadas apresentam-se em tonalidades claras.

Tabela 6. Identidade percentual dos peptídeos singulares de ZIKV com sequências de regiões equivalentes dos Flavivírus. Identidade percentual, cobertura percentual do pareamento das sequências (entre parênteses), seguido do *e-value* do pareamento entre sequências de peptídeos singulares de ZIKV e sequências de aminoácidos das regiões equivalentes em diferentes Flavivírus. Estão assinalados com não detectado (ND) correlações onde não houve identidade quantificável.

	ZIKV							
	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7	PT8
DENV-1	64% (64%) 1e-05	42% (64%) 3e-04	100% (12%) 0.32	ND	ND	ND	ND	33% (100%) 7e-05
DENV-2	ND	ND	57% (81%) 0.004	ND	ND	ND	ND	31% (100%) 3e-06
DENV-3	83% (35%) 7e-04	ND	69% (81%) 2e-05	ND	ND	ND	ND	ND
DENV-4	50% (82%) 5e-05	38% (64%) 0.002	64% (83%) 1e-05	ND	ND	ND	ND	41% (76%) 7e-08
YFV	100% (23%) 0.008	ND	ND	ND	ND	ND	ND	36% (52%) 3e-04
ILHV	71% (41%) 0.002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	36% (78%) 1e-06
ROCV	ND	50% (54%) 6e-05	ND	ND	ND	ND	ND	36% (78%) 6e-08
SLEV	64% (64%) 1e-04	ND	ND	ND	60% (83%) 2e-04	100% (30%) 0.010	ND	48% (78%) 1e-07
JEV	55% (64%) 1e-04	53% (45%) 3e-04	ND	ND	ND	ND	ND	48% (57%) 2e-05
WNV	50% (58%) 0.008	ND	ND	ND	50% (83%) 0.12	100% (30%) 0.010	ND	44% (76%) 9e-08

Tabela 7. Peptídeos singulares das proteínas antigênicas E e NS1 de ZIKV. Apresentação da sequência de aminoácidos dos peptídeos singulares identificados por análises de MSA. A sequências escolhidas e apresentadas na tabela são comuns as cepas asiáticas e americanas.

Código	Proteína	Sequência	aa	kDa
PT1	E	YLDKQSDTQYVCKRTL	17	1,87
PT2	E	SQHSGMIVNDTGHETDENRAKVEITPNSP RAEATLGG	37	4,07
PT3	E	HAGADTGTPHWNNKEA	16	1,76
PT4	E	ALEAEMDGAKGRLSS	15	1,65
PT5	E	TAAFTFTKVP	12	1,32
PT6	E	AQMAVDMQTLTPV	13	1,43
PT7	E	PVITESTENSKM	12	1,32
PT8	NS1	VGSVKNPMWRGPQRLPVPVNELPHGWK AWGKSYFVRAAKTNN	42	4,62

6. DISCUSSÃO

Estudos da antigenicidade das proteínas virais têm um papel importante no suporte ao desenvolvimento de imunoenaios para diagnóstico e na construção de conhecimentos relacionados a resposta imunológica à patógenos. A este respeito tem sido muito estudada as características das proteínas dos Flavivírus (SARON, et al., 2018), sobretudo do DENV (PINHEIRO, et al., 2018), os quais também servem como base para compreensão das características do ZIKV.

Através da análise do perfil de fracionamento das proteínas dos vírus ZIKV e DENV4, foram observadas proteínas em pesos moleculares similares aos relatados na literatura, o que possibilitou a identificação das proteínas virais por SDS-PAGE e Western Blot. Neste trabalho foram identificadas as proteínas NS5 (105kDa), E (55kDa), prM (28kDa), NS2A (23kDa), semelhante ao descritos, em outros trabalhos, quanto ao peso molecular das proteínas NS5, 105 kDa (BOLLATI, et al., 2010), proteína E (55 kDa), e prM (28 kDa) (van der SCHAAAR, et al, 2007), NS1 (48 kDa) (SCATURRO, et al., 2015), e NS2A (25 kDa) (MACKENZIE, et al., 1998). Apesar da não detecção da proteína NS1 revelando o SDS-PAGE com *coomassie blue*, por Western Blot foi possível detecta-la na posição de 48 kDa, devido a maior sensibilidade da técnica.

Dentre estas proteínas identificadas foi observado que as mais antigênicas de ZIKV foram às proteínas E, NS1 e NS5 em vista do maior número de soros reativos para IgG anti-ZIKV testados, enquanto que as proteínas prM e NS2A tiveram sua detecção em menor quantidade de soros.

A proteína E de ZIKV teve alta reatividade com soros aqui utilizados. Esta alta reatividade coincide com estudos prévios que mostram sua capacidade imunogênica. Reforçam este achado o fato que é uma proteína glicosilada com alto número de cópias expostas na superfície do vírus (GOO, et al., 2018). A imunogenicidade da proteína E também fica evidente em estudos da soroneutralização do ZIKV por PRNT, uma vez que a entrada do vírus depende do reconhecimento da proteína E com receptores celulares. Anticorpos presentes em soros capazes de neutralizar o vírus estão associados ao reconhecimento da proteína E (PRIYAMVADA, et al, 2016).

No entanto, a alta taxa de detecção da proteína E de ZIKV por soros IgG anti-DENV, maior inclusive que da própria proteína E de DENV, ressalta o risco da ocorrência de ADE a partir de imunidade humoral prévia ao DENV. A maior virulência de ZIKV pela presença

previa de anticorpos IgG anti-DENV já foi demonstrado em experimentos *in vitro*, aumentando a infecção de ZIKV (PRIYAMVADA, et al, 2016). Assim como, ensaios de desafio com ZIKV em animais pré-imunizados com DENV ou WNV, demonstraram aumento da mortalidade, aumento da temperatura corporal, aumento da viremia e da detecção viral por imunohistoquímica (BARDINA, et al., 2017).

A reatividade dos soros com as proteínas dos Flavivírus também pode estar relacionada o período da infecção quando o soro foi coletado. Assim como observamos a maior detecção da proteína E de ZIKV por soros IgG anti-DENV, estudo recente demonstrou que na fase inicial da infecção, soros IgG anti-DENV são mais reativos com as proteínas de ZIKV do que IgG anti-ZIKV. Enquanto que na fase tardia, soros IgG anti-ZIKV são reativos com ZIKV (KOISHI, et al, 2018).

A imunogenicidade da proteína NS1 de ZIKV foi observada através da reatividade com soros IgG anti-ZIKV, o que também pode ser correlacionado aos estudos que descrevem a NS1 dos flavivírus, como proteína solúvel, de alta secreção no meio extracelular, a qual desempenha importante papel na resposta imune em Dengue (AMBROSE, SEKARAN, AZIZAN, 2017; DATTA & WATTAL, 2010).

A respeito da proteína NS5, os estudos prévios têm demonstrado sua capacidade imunogênica com o desenvolvimento e validação de ELISA para IgM e IgG anti-DENV2, usando como antígeno a NS5 (NARAYAN, et al., 2016). Assim como descrito anteriormente sobre a imunogenicidade da proteína NS5 de DENV2, também foi observada reatividade com a NS5 de ZIKV, em nossos experimentos. No entanto, em nosso estudo foi observada ausência de reatividade da proteína NS5 de DENV4 IgG anti-DENV testados. Esta observação pode ser atribuída a uma menor imunogenicidade da NS5 de DENV4.

As detecções de anticorpos para as proteínas NS2A de ZIKV e DENV4 observada neste trabalho podem ser correlacionada às suas características moleculares e localização na célula hospedeira durante a replicação. Em estudo prévio, foi analisada a estrutura da NS2A de DENV, foi demonstrado que 42 % dos aminoácidos tem carácter hidrofóbico, apresentando passagens transmembrana (XIE, et al., 2013) , o que possibilita o acúmulo dessa proteína no retículo endoplasmático, co-localizadas com as proteínas E e prM, e possibilitando a secreção em grande quantidade durante o brotamento do vírus no ciclo de replicação, semelhante ao que ocorre com a proteína NS1 (HOU, et al., 2017).

Em relação às reações cruzadas, foi possível observar a reatividade das proteínas NS5, E, NS1, prM e NS2A de DENV4 com soro IgG anti-ZIKV, e NS5, E, NS1 e prM de ZIKV com soro IgG anti-DENV. O que pode ser correlacionado a estudos prévios da neutralização de

ZIKV, por PRNT, utilizando anticorpos monoclonais IgG anti-proteína E de DENV (PRIYAMVADA, et al, 2016). Assim como, outro estudo onde o reconhecimento das proteínas E e NS1 de DENV por anticorpos monoclonais anti-ZIKV foi evidenciado por imunohistoquímica (BOLLWEG, et al., 2018).

As reações sorológicas cruzadas dentre os Flavivírus ocorrem principalmente pela alta similaridade entre as proteínas dos vírus. Ao analisar as sequências de aminoácidos das proteínas E, NS5, NS1, prM, que foram reconhecidas de forma cruzada, observou-se que apresentaram identidade de cerca de 50% para ZIKV e DENV 1-4. Porém, na proteína NS2A apesar da menor identidade observada em ZIKV com as de outros flavivírus (inferior a 34 %, entre ZIKV e DENV), também reagiu de forma cruzada com DENV4.

Para compreender melhor a similaridade entre as proteínas de ZIKV e de outros Flavivírus, também foram feitas análises de identidade em estudos prévios, com maior destaque as proteínas E e NS1 (XU, et al., 2016). No entanto, em nossos estudos também foram observadas alta identidade entre sequências das proteínas NS5 e NS3, as retratando também como proteínas conservadas entre os Flavivírus.

Analisando a identidade das sequências das proteínas de ZIKV com de outros arbovírus de CHKV, MAYV e OROV foi observada baixa similaridade, havendo identidade apenas, no pareamento de pequenas áreas de cobertura, o que as destaca como heterogêneas ao ZIKV. A diferença destes com ZIKV pode ser explicada por se tratarem de famílias diferente, onde MAYV e CHIKV pertencem a *Togaviridae*, e OROV a *Bunyaviridae*. De modo semelhante, as sequências das proteínas do HCV também apresentaram divergência com as ZIKV, também destacando-o como altamente heterólogo ao ZIKV. Essa divergência pode ser correlacionada às diferenças no padrão de infecção e na persistência do HCV, o qual tem alta replicação no tecido hepático, e está sujeito a seleção natural durante períodos prolongados, consequentemente, sujeito a geração de vírus com maiores distâncias de evolutivas (AUSTRIA, WU, 2018).

Quanto a variabilidade do ZIKV, a comparação entre as sequências genômicas de ZIKV isoladas na Bahia mostram diferença significativa à cepa africana isolada em 2007, o que destaca a variabilidade do vírus para a cepa do recém-surto brasileiro em 2015 (CAMPOS, BANDEIRA, SARDI, 2015). No entanto, comparando as análises genômicas e das sequências de aminoácidos foi observada alta ocorrência de mutações silenciosas e baixa taxa de troca de aminoácidos com características divergentes.

A observação da preservação sequencial das proteínas, faz referência a manutenção da estrutura e função das proteínas. Em estudo semelhante, avaliando a similaridade das proteínas

E, NS1, NS3 e NS5 de diferentes cepas de ZIKV, a conservação das proteínas foi relacionada a importância funcional que elas desempenham. A proteína E como responsável pelo reconhecimento com receptores celulares para infecção da célula hospedeira, a NS1 como parte do complexo de replicação do RNA viral, a NS3 como principal proteína do complexo de protease da poliproteína viral, e a NS5 que tem função RNA polimerase, atua na replicação do genoma viral (BAEZ, et al., 2016).

A alta homologia das proteínas de ZIKV com Flavivírus também reflete em observações filogenéticas. Primeiramente, a confecção da árvore filogenética ratificou achados de publicações prévias que suportam a hipótese de que as cepas brasileiras de ZIKV derivam das cepas asiáticas (MURADUZZAMAN, et al, 2017). Em estudo filogenético com 44 diferentes cepas de ZIKV, de diferentes regiões, também foram observados agrupamentos que distinguem as cepas africanas e das cepas asiáticas e sul americanas (SARDI, et al 2016).

Também foi observado, com o estudo filogenético, a divisão cladística entre as cepas isoladas na Bahia, Brasil, e as cepas asiáticas e americanas. Foi demonstrado a proximidade evolutiva das cepas de ZIKV com os demais Flavivírus-arbovírus: DENV1-4, ROCV, YFV, ILHV, WNV, JEV.

A elevada proximidade evolutiva entre todos os Flavivírus-arbovírus, incluindo o ZIKV, reforça a probabilidade de reações cruzadas entre estes. O que desperta atenção, sobretudo, tendo em vista a coexistência de diferentes Flavivírus em regiões endêmicas como a América-latina, Ásia, África e Oceania (REIS, et al., 2017).

A identificação das proteínas antigênicas de ZIKV, e a correlação das reações cruzadas com a similaridade entre as proteínas de ZIKV e outros Flavivírus, realça a necessidade de serem encontrados novos peptídeos antigênicos e específicos ao ZIKV. A localização de sequências de aminoácidos exclusivos de ZIKV em proteínas antigênicas também levanta a possibilidade da utilização na detecção diferencial do ZIKV. Deste modo, foram localizados 8 peptídeos singulares derivados das proteínas antigênicas: E e NS1 de ZIKV.

Dentre os 8 peptídeos singulares, destacam-se os PT4 e PT7 por não apresentarem identidade percentual com nenhum dos Flavivírus analisados. Os peptídeos PT2 e PT8 destacam-se pelo maior comprimento apresentado, apresentando baixos valores de identidade com outros Flavivírus.

Os baixos valores percentuais de identidade e cobertura observados nas análises de semelhança entre os peptídeos singulares de ZIKV e os diferentes Flavivírus, destacam o potencial da utilização destes na detecção diferencial do ZIKV. Enquanto que, a alta homologia dos peptídeos observada entre as diferentes cepas de ZIKV, possibilita amplitude na detecção

dos diferentes ZIKV.

Portanto, em um apanhado, neste trabalho foi possível demonstrar que as proteínas NS5, E e NS1 de ZIKV são as principais relacionadas com a ativação da resposta imune humoral, sendo que as proteínas NS5, E, NS1, prM e NS2A têm sido detectadas por reação cruzada na sorologia entre DENV e ZIKV. O trabalho também apresentou a variabilidade das cepas de ZIKV, destacando a ocorrência de reações cruzadas. Foi observada alta homogenia entre as proteínas de ZIKV e outros Flavivírus, o que pode ser correlacionado as observações das reações cruzas. Os peptídeos singulares apresentados no trabalho, destacam a utilização da bioinformática na prospecção de potenciais antígenos para o desenvolvimento ensaios diagnósticos e imunológicos, assim como já tem sido estudado quanto a aplicabilidade da proteína NS2B analisada por bioinformáticas para o desenvolvimento de ELISA (MISHRA, et al., 2018).

7. CONCLUSÕES

- 1- O estudo sorológico apontou as proteínas E, NS5 e NS1 como as mais antigênicas de ZIKV, e em menor proporção em NS2A e prM.
- 2- Reações cruzadas foram observadas nas proteínas NS5, E, NS1 e prM de ZIKV, assim como nas proteínas NS5, E, NS1, prM e NS2A de DENV4.
- 3- A maior intensidade na detecção de proteínas de ZIKV em relação a reatividade dos soros IgG anti-DENV, desperta atenção aos eventos que podem decorrer em uma infecção de ZIKV frente a imunidade prévia ao DENV no hospedeiro.
- 4- A análise de MSA mostrou a ocorrência de mutações silenciosas entre as cepas de ZIKV asiática e africana, com menores acometimentos a variabilidade das sequências proteicas.
- 5- A identidade das sequências das proteínas de ZIKV com diferentes Flavivírus e arbovírus, demonstrou a maior conservação das proteínas NS5, NS3, E e NS1, enquanto que menor conservação foi observada na proteína NS2A.
- 6- Baixa similaridade foi observada em análises das sequências de proteínas de ZIKV com as de CHIKV, MAYV, OROV e HCV, destacando estes como altamente heterólogos ao ZIKV.
- 7- Em análise filogenética destacou a divisão cladística entre as cepas isoladas na Bahia, Brasil, 2016, das demais cepas asiáticas e americanas. Além de ressaltar a proximidade evolutiva entre os Flavivírus-arbovírus.
- 8- Foram identificados 8 peptídeos singulares nas sequências das proteínas E e NS1 de ZIKV, com potencial para desenvolvimento de imunodiagnósticos, vacinas e anticorpos monoclonais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M. & PADMANABHAN, R. *De novo* synthesis of RNA by the Dengues virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature-dependence at the initiation but not the elongative phase. **J. Biol. Chem.** 276, 39926–39937, 2001.
- ANDERSON, C.R., DOWNS, W.G., HILL, A.E. Isolation of dengue virus from a human being in Trindade. **Science.** 124(3214):224-5, 1956.
- AMBROSE, J.H., SEKARAN, S.D., AZIZAN, A. Dengue Virus NS1 Protein as a Diagnostic Marker: Commercially Available ELISA and Comparison to qRT-PCR and Serological Diagnostic Assays Currently Used by the State of Florida. **J Trop Med.** 2017:8072491, 2017.
- AUSTRIA, A., WU, G.Y. Occult Hepatitis C Virus Infection: A Review. **J Clin Transl Hepatol.** Jun 28;6(2):155-160, 2018.
- BARDINA, S.V., et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting anti-flavivirus immunity. **Science.** 14;356(6334):175-180, 2017.
- BARONTI, C., et al. Complete Coding Sequence of Zika Virus from a French Polynesia Outbreak in 2013. **Genome Announcements.** 2(3):e00500-14, 2014.
- BAEZ, C.F., et al. Analysis of worldwide sequence mutations in Zika virus proteins E, NS1, NS3 and NS5 from a structural point of view. **Mol Biosyst.** 20;13(1):122-131, 2016.
- BESNARD, M., et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill.** 3;19(13). pii: 20751, 2014.
- BOLLWEG, B.C., et al. Optimization of commercially available Zika virus antibodies for use in a laboratory-developed immunohistochemical assay. **J Pathol Clin Res.** Jan; 4(1): 19–25, 2018.
- BOLLATI, M., et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. **Antiviral Res.** 87(2):125-48., 2010.
- BRATHWAITE DICK, O., et al. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 87(4):584-593, 2012.
- BRECHER, M., et al. A conformational switch high-throughput screening assay and allosteric inhibition of the flavivirus NS2B-NS3 protease. **PLoS Pathog.** 13 (5):e1006411, 2017.
- CAO-LORMEAU, V-M., et al. Guillain-Barre´ Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet,** 2016.
- CAMPOS, G. S., BANDEIRA, A., SARDI, S. I. . Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases (Print),** v. 21, p. 4, 2015.

- CARTEAUX, G., et al. Zika virus associated with meningoencephalitis. **N Engl J Med**, 2016.
- CORTESE, M., et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. **Cell Reports** 18, 2113–2123, 2017
- DATTA, S. & WATTAL, C. Dengue NS1 antigen detection: a useful tool in early diagnosis of dengue virus infection. **Indian J Med Microbiol.** 28(2):107-10, 2010.
- DICK, G.W., KITCHEN, S.F., HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 46, 509e520, 1952.
- DOS SANTOS, T., et al. Zika virus and the Guillain–Barré Syndrome – case series from seven countries. **N Engl J Med** 375(16):1598–601, 2016.
- DUFFY, M.R., et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N. Engl. J. Med.** 360, 2536e2543, 2009.
- EGLOFF, M. P., et al. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **EMBO J.** 21, 2757–2768, 2002.
- FLIPSE, J., WILSCHUT, J., SMIT, J. M. Molecular mechanisms involved in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in humans. **Traffic** 14, 25–35, 2013.
- FRANCO, L., et al. First Report of Sylvatic DENV-2-Associated Dengue Hemorrhagic Fever in West Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 5(8), e1251, 2011
- GARCEZ, P.P., et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science.** 13;352(6287):816-8, 2016.
- GOO, L., et al. The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. **Virology.** Feb;515:191-202., 2018.
- GRARD, G., et al. Zika virus in Gabon (Central Africa)e 2007: a new threat from *Aedes albopictus*? **Plos Negl. Trop. Dis.** 8, e2681, 2014.
- HALSTEAD, S. B., & O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **J. Exp. Med.** 146, 201–217, 1977.
- HANCOCK, W.T., MARFEL, M., BEL, M. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerg Infect Dis** 20:1960, 2014.
- HERINGER, M., et al. Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil: case characterization following its introduction in an endemic region. **BMC Infect Dis.** Jun 9;17(1):410, 2017.
- HENGLI TANG, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell.** pii: S1934-5909(16)00106-5, 2016.
- HOU, W., et al. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. **Gene.** Sep 10;628:117-128, 2017.

- HUMPHREY, J.M., et al. Dengue in the Middle East and North Africa: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**. Dec 7;10(12):e0005194, 2016
- ISSUR, M. et al. A proteína NS5 de flavivírus é uma verdadeira transferena de guanyilil de ARN que catalisa uma reação de dois passos para formar a estrutura de tampão de RNA . **RNA** 15 , 2340-2350, 2009.
- JONES, D.T., TAYLOR, W.R., & THORNTON, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences** 8: 275-282, 1992.
- KOISHI, A.C., et al. Development and evaluation of a novel high-throughput image-based fluorescent neutralization test for detection of Zika virus infection. **PLoS Negl Trop Dis**. Mar 15;12(3):e0006342, 2018.
- LAVINIA SCHULER-FACCINI, et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**. 29;65(3):59-62, 2016.
- LANCIOTTI, R.S., et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis** 14:1232–1239, 2008.
- LIANG, Q., et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Dereglate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**. 3;19(5):663-671, 2016.
- LIU, W. J., et al. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. **J. Virol**. 7812225-12235, 2004.
- MACKENZIE, J.M., et al. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. **Virology**. 5;245(2):203-15, 1998.
- MACNAMARA, F.N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 48, 139e145, 1954.
- MARANO, G., et al. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and Transfusion Medicine. **Blood Transfus**; 14: 95-100, 2016.
- MARCHETTE, N.J., GARCIA, R., RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 18, 411e415, 1969.
- MÉCHARLES, S., et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. **Lancet** 1481;387(10026), 2016.
- MISHRA, N., et al. Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **American Society for Microbiology**. March/April, Volume 9, Issue 2, e00095-18, 2018.

- MLAKAR, J., et al. Zika virus associated with micro-cephaly. **N Engl J Med.**, 2016
- MOTA, M.T. de O., et al. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(Suppl 1):38-50, 2016.
- MURADUZZAMAN, A.K.M. et al. Introduction of Zika Virus in Bangladesh: An impending public health threat. **Asian Pac J Trop Med.** Sep;10(9):925-928, 2017.
- MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 21, No. 10, 2015
- MULLER, D.A., YOUNG, P.R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Res.** 98(2):192-208, 2013.
- NARAYAN, R., et al. A novel indirect ELISA for diagnosis of dengue fever. **Indian J Med Res.** 2016 Jul;144(1):128-133.
- NICHOLAS, K.B., NICHOLAS H.B. JR., & DEERFIELD, D.W. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS* 4:14, 1997.
- NUNES, P.C.G., et al. 30 years of dengue fatal cases in Brazil: a laboratorial-based investigation of 1047 cases. **BMC Infect Dis.** Jul 27;18(1):346, 2018.
- PAPLOSKI, I.A.D., et al. Time lags between exanthematous illness attributed to Zika virus, Guillain–Barre´ Syndrome, and microcephaly, Salvador Brazil. **Emerg Infect Dis.** 22(8), 2016.
- PINHEIRO, T.M., et al. Viral immunogenicity determines epidemiological fitness in a cohort of DENV-1 infection in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** May 29;12(5):e0006525, 2018.
- PRIYAMVADA, L., et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 113(28):7852-7857, 2016.
- REIS, N.N., et al. Viruses vector control proposal: genus Aedes emphasis. **Braz J Infect Dis.** Jul - Aug;21(4):457-463, 2017.
- SARDI, S., et al. Co-Infections from Zika and Chikungunya Virus in Bahia, Brazil Identified by Metagenomic Next-Generation Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology (Print)**, v. 22, p. JCM.00877-16, 2016.
- SARON, W.A.A. et al. Flavivirus serocomplex cross-reactive immunity is protective by activating heterologous memory CD4 T cells. **Sci Adv.** Jul 4;4(7):eaar4297, 2018
- SCATURRO, P., et al. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. **PLoS Pathog.** 12;11(11):e1005277, 2015.
- SHARMA, A., LAL, S.K. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention.

Frontiers in Microbiology. 8:110, 2017.

SHARMA, N., et al. Epigallocatechin gallate, an active green tea compound inhibits the Zika virus entry into host cells via binding the envelope protein. **Int J Biol Macromol.** 28;104(Pt A):1046-1054, 2017.

VAN DIJK, A. A., MAKEYEV, E. V. & BAMFORD, D. Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization. **J. Gen. Virol.** 85, 1077–1093, 2004.

XIA, H. et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. **Nat Commun.** Jan 29;9(1):414, 2018.

XIE, X., et al. (2013). Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. **Journal of Virology**, 87(8), 4609–4622., 2013).

XU, X., et al. Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. **PLoS Curr.** 15;8. pii: ecurrents.outbreaks.9aa2e1fb61b0f632f58a098773008c4b, 2016.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology** 5, 518–528, 2007.

ZANLUCA, C., et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 110, 569–572, 2015.

ZHAO, B., et al. Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. **Nat Commun.** 27;8:14762, 2017.

van der SCHAAAR, H.M., et al. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. **J Virol** 81(21):12019–12028, 2007.

ABBAS, A.K., LICHTMAN, S.H., PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular.** 7ª Edição, páginas 243-268, 2011.

FIELDS, B.N., KNIPE, D.M, HOWLEY P.M. **Fields virology**, 5th ed., vol 1 & 2, Llippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA,2006.

LINDENBACH, B.D., MURRAY, C.L., THIEL, H., RICE, C.M. Flaviviridae. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. **Fields Virology, Sixth Edition - Volume I.** Wolters Kluwer, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo. Pag 712-746.

PORTAL BRASIL. Brasil tem 1.168 casos de microcefalia confirmados. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/04/brasil-tem-1-168-casos-de-microcefalia-confirmados>, acesso em 03/08/2017

Laboratory Guidance and Diagnostic Testing. CDC, disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html>

Centers for Disease Control and Prevention: Laboratory Guidance and Diagnostic Testing.
Disponível, em: <https://www.cdc.gov/dengue/clinicallab/laboratory.html>, dia 30/05/2017.

9. ANEXO

Anexo 1. Tabela com informações do banco de dados do NCBI sobre das seqüências utilizadas neste trabalho. Foram selecionadas seqüências de referência com exceção de ROCV que não a possui ainda.

Cepa	Nome do isolamento	Familia	ID de acesso	Ano	Local
ZIKV	Zika virus, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_012532.1	2007	Uganda
ZIKV	Zika virus strain H/PF/2013, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	KJ776791.2	2013	French Polynesia
ZIKV	Zika virus isolate Brazil-ZKV2015, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	KU497555.1	2015	Rio de Janeiro, Brazil
ZIKV	Zika virus isolate Bahia09, partial genome	<i>Flaviviridae</i>	KU940224.1	2016	Bahia, Brazil
ZIKV	Zika virus isolate Bahia07, partial genome	<i>Flaviviridae</i>	KU940228.1	2016	Bahia, Brazil
ZIKV	Zika virus polyprotein gene, complete cds	<i>Flaviviridae</i>	EU545988.1	2007	Micronesia
ZIKV	Zika virus isolate MR_766 polyprotein gene, partial cds	<i>Flaviviridae</i>	HQ234498.2	1947	Uganda
DENV1	Dengue virus 1, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_001477.1	1997	Micronesia
DENV2	Dengue virus 2, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_001474.2	1997	Thailand
DENV3	Dengue virus 3, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_001475.2	2003	French West Indies
DENV4	Dengue virus 4, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_002640.1	2000	Dominica
YFV	Yellow fever virus, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_002031.1	1985	USA
ILHV	Ilheus virus, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_009028.2	2005	Brazil
ROCV	Rocio virus strain SPH 34675, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	AY632542.4	2005	Brazil
SLEV	St. Louis encephalitis virus, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_007580.2	2007	USA
JEV	Japanese encephalitis virus, genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_001437.1	2015	Japan
WNV	West Nile virus lineage 1, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_009942.1	2012	USA
HCV	Hepatitis C virus genotype 1, complete genome	<i>Flaviviridae</i>	NC_004102.1	2003	USA
MAYV	Mayaro virus, complete genome	<i>Togaviridae</i>	NC_003417.1	2002	Rio de Janeiro, Brazil
CHIKV	Chikungunya virus, complete genome	<i>Togaviridae</i>	NC_004162.2	2012	Tanzania
OROV	Oropouche virus segment L, complete genome	<i>Bunyaviridae</i>	NC_005776.1	2003	São Paulo, Brazil
OROV	Oropouche virus segment M, complete sequence	<i>Bunyaviridae</i>	NC_005775.1	2004	São Paulo, Brazil
OROV	Oropouche virus segment S, complete genome	<i>Bunyaviridae</i>	NC_005777.1	2004	São Paulo, Brazil

Anexo 2: Algoritmo de contagem de códons mutantes

```

#include <stdlib.h>
#include <iostream>
#include <string>
#include <fstream>
#include <cstdio>

using namespace std;

void findast(string txt){

    int mutation=0;
    int total=0;
    string temp;
    ifstream rfile(txt,ios::out);
    bool counted=false;
    bool counted_codons=false;
    if (rfile.is_open()){
        while(getline(rfile, temp, '\0')){
            cout << temp << endl;
            for (unsigned int i=0 ; i < temp.size() ; i++){
                if ( i%3 == 0){
                    counted=false;
                    counted_codons=false;
                }
                if (temp[i] == ' ' && !counted){
                    mutation++;
                    counted= true;
                    if (!counted_codons){
                        counted_codons=true;
                        total++;
                    }
                }
                if (temp[i] == '*' && !counted_codons){
                    counted_codons=true;
                    total++;
                }
            }
        }
    }

    rfile.close();

    cout << "Number of mutations: " << mutation << endl;
    cout << "Number of codons: " << total << endl;

}

main(){
    string text="example.txt";
    findast(text);

    system("pause");
}

```

Anexo 2. Código fonte para contagem de alterações de códon. Algoritmo de contagem das alterações de códon desenvolvido em linguagem C++ e executado usando GCC na plataforma Windows 10, com precisão confirmada através da contagem de pequenas sequências.