

Marcia Duarte Barbosa da Silva

**COMPARAÇÃO DA DINÂMICA DA INFECÇÃO VIRAL DO
Zika virus ENTRE OS GENÓTIPOS AFRICANO E ASIÁTICO EM
CULTURA DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS**

Tese de apresentação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

São Paulo

2019

Marcia Duarte Barbosa da Silva

**COMPARAÇÃO DA DINÂMICA DA INFECÇÃO VIRAL DO *Zika virus* ENTRE OS
GENÓTIPOS AFRICANO E ASIÁTICO EM CULTURA DE CÉLULAS
PLACENTÁRIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Versão Revisada

Versão original encontra-se disponível na Biblioteca do Instituto de Ciências
Biomédicas da USP e Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Duarte-Barbosa, Marcia

Comparação da Dinâmica da Infecção Viral do Zika
virus entre os Genótipos Africano e Asiático em
Cultura de Células Placentárias / Marcia Duarte-
Barbosa; orientador Prof. Dr. Paolo Marinho de
Andrade Zanotto. -- São Paulo, 2019.

116 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Zika virus. 2. Cinética viral. 3. Células
placentárias. 4. BeWo. 5. HTR-8. I. Marinho de
Andrade Zanotto, Prof. Dr. Paolo, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Marcia Duarte Barbosa da Silva

Título da Tese: **COMPARAÇÃO DA DINÂMICA DA INFECÇÃO VIRAL DO
Zika virus ENTRE OS GENÓTIPOS AFRICANO E ASIÁTICO
EM CULTURAS DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS**

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a//, considerou

() Aprovada

() Reprovada

Examinador(a): Assinatura

Nome

Instituição

Presidente: Assinatura

Nome

Instituição

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai que me
acompanhou em todos
os meus passos ✨*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que proporcionaram todas as condições para que eu seguisse meus sonhos.

Ao meu irmão, tios, tias, primos e primas que sempre estiveram presentes nas alegrias e tristezas.

A Doutora Telma Alves Monezi que me ensinou tudo sobre Virologia durante o doutoramento.

Aos Professores Doutores Enrique Boccardo e Edison Luis Durigon que me acolheram durante o final do doutoramento.

Ao Professor Doutor Mário M. R. Janini e seu aluno Anderson L. Costa, ambos do Laboratório de Retrovirologia, UNIFESP, pela colaboração no projeto de doutoramento e todo ensinamento dado durante o período.

Aos alunos de Iniciação científica, Pós-graduando o e Pós-doutorado da Virologia que contribuíram para o desenvolvimento das minhas atividades.

À Comissão Organizadora do V Curso de Inverno em Microbiologia e Biologia Molecular Aplicada 2018.

A todas as amigas cultivadas pelo ICB-USP em ordem alfabética: Aline, Amandinha, Brenda, Bruna, Bruno, Cíntia, Černý Jiří, Denise, Ed, Fagner, Marcelinho, Thaís, Rafaela Bonotto, Yan, Zé Carlos e muitos outros.

Aos funcionários, técnicos e especialistas do ICB-USP.

Aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro à presente pesquisa.

EPÍGRAFE

“Deixe-me contar o segredo que me levou a alcançar meus objetivos. Minha força reside apenas na minha tenacidade”

“Let me tell you the secret that has led to achieving my goals. My strength lies solely in my tenacity.”

Louis Pasteur

RESUMO

Duarte-Barbosa, M. Comparação da dinâmica da infecção viral do *Zika virus* entre os genótipos africanos e asiáticos em culturas células placentárias 2015-2019. 116 folhas. Tese de Doutorado em Ciências pelo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Zika virus, ZIKV, foi descoberto em 1947 em Uganda durante uma pesquisa de campo sobre Febre Amarela. Porém, somente em 2016 tornou-se emergência global com o aparecimento de fetos e recém-nascidos com predominância de más formações congênitas neuronais de mães infectadas por ZIKV. Por ser única arbovirose descrita com transmissão vertical, entre mãe e feto, os mecanismos de transmissão durante a gestação são pouco conhecidos. O vírus pode ser encontrado no líquido amniótico e no feto. A placenta é uma barreira natural e eficaz contra microrganismos em geral. Porém, existe um grupo de organismos patogênicos capazes de atravessar essa barreira, infectar o feto e causar-lhes sequelas permanentes e até a sua morte ainda no útero ou durante ou após o nascimento. O ZIKV foi incluído pela Organização Mundial da Saúde no grupo de doenças infecciosas, TORCH, transmitidas durante a gravidez. A presente pesquisa visa descrever em células placentárias de primeiro trimestre de gestação, *ex vivo*, a replicação do arbovírus, e comparar o comportamento das linhagens Africana e Asiático-Brasileiro em tais células. Da linhagem Africana, até o momento desconhece sua transmissão vertical tenha causado as patologias apresentadas pela linhagem Asiático-Brasileiro. Porém, ambas são capazes de infectar células placentárias BeWo e HTR-8 em *ex vivo*. A hipótese visa testar se a linhagem Asiático-Brasileiro é mais virulento do que a Africana. Os resultados da dinâmica da cinética do ZIKV Africano apresentam ser mais virulento do que Asiático-Brasileiro. Esse, porém, permanece por mais tempo nas células de modo a sustentar a infecção por um período mais prolongado. Tal condição pode prolongar a infecção durante a gestação e conseqüentemente atravessa a barreira placentária e infectar o feto.

Palavras-chave: *Zika virus*, cinética, células placentárias, BeWo e HTR-8.

ABSTRACT

Duarte-Barbosa, M. Comparison of the dynamics of Zika virus viral infection between African and Asian genotypes in neural cell cultures 2015-2019. 116 pages. Doctor of Science Thesis from Department of Microbiology, The Institute of Biomedical Sciences of the University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2019.

Zika virus, ZIKV, was discovered in 1947 in Uganda during a field research on Yellow Fever. However, it was only in 2016 that it became a global emergency with the appearance of fetuses and newborns with a predominance of neuronal congenital malformations of mothers infected with ZIKV. As it is the only arbovirus infection described with vertical transmission, between mother and fetus, the transmission mechanisms during pregnancy are poorly understood. The virus can be found in the amniotic fluid and in the fetus. The placenta is a natural and effective barrier against microorganisms in general. However, there is a group of pathogenic organisms capable of crossing this barrier, infecting the fetus and causing permanent sequelae and even death in the womb or during or after birth. ZIKV was included by the World Health Organization in the group of infectious diseases, TORCH, transmitted during pregnancy. The present research aims to describe in placental cells of the first trimester of gestation, ex vivo, the replication of arbovirus, and to compare the behavior of African and Asian-Brazilian strains in such cells. Of the African lineage, so far it is unknown that its vertical transmission has caused the pathologies presented by the Asian-Brazilian lineage. However, both are able to infect BeWo and HTR-8 placental cells in ex vivo. The hypothesis aims to test whether the Asian-Brazilian lineage is more virulent than the African. The results of the dynamics of the African ZIKV's kinetics appear to be more virulent than Asian-Brazilian. This, however, remains in the cells for a longer time in order to sustain the infection for a longer period. Such a condition can prolong the infection during pregnancy and consequently cross the placental barrier and infect the fetus.

Keywords: *Zika virus*, kinetics, placental cells, BeWo and HTR-8.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Ciclo de transmissão das arboviroses.
- Figura 2** Morfologia do *Zika virus*.
- Figura 3** Genoma representativo do ZIKV.
- Figura 4** Ciclo de replicação do *Zika virus*.
- Figura 5** Mapa de origem e propagação do *Zika virus* de 1947 a 2016.
- Figura 6** Tropismo celular de *Zika virus*.
- Figura 7** Blastocistos de camundongo.
- Figura 8** Patogênese da infecção por *Zika virus* durante a gestação.
- Figura 9** Modelo da representação gráfica das fases do ciclo de replicação para vírus envelopado.
- Figura 10** Resultado da formação de placas da titulação de ZIKV IEC-Paraíba e MR766 baixa passagem.
- Figura 11** Resultado da formação de placas da titulação de ZIKV IEC-Paraíba (B) e MR766 baixa passagem (C).
- Imagem 1** Resultado do efeito citopático do cultivo de ZIKV-IEC-Paraíba e MR766 baixa passagem para formação dos estoques virais em células Vero (ATCC®).
- Imagens 2 a 9** Ensaio de cinética do ZIKV-IEC-Paraíba e ZIKV-MR766bp nas células HTR-8, BeWo, BeWo tratada com forskolina e Huh-7.
- Imagem 10** Imagem representativa da imunofluorescência indireta de alto conteúdo.

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

- Gráfico 1** Curva padrão de ZIKV-IEC-Paraíba.
- Gráfico 2** Curva padrão de ZIKV-MR766bp.
- Gráficos 3** Dinâmica da cinética viral das linhagens celulares HTR-8, BeWo, BeWo com forskolina e Huh-7 inoculadas com ZIK-IEC-Paraíba.
- Gráficos 4** Dinâmica da cinética viral das linhagens celulares HTR-8, BeWo, BeWo com forskolina e Huh-7 inoculadas com ZIKV-MR766 baixa passagem.
- Gráficos 5** Médias das triplicatas das cinéticas viral das linhagens celulares HTR-8, BeWo, BeWo com forskolina e Huh-7 inoculados com ZIKV-IEC-Paraíba, nos hpi de 24h, 48h e 72h.
- Gráficos 6** Médias das triplicatas das cinéticas viral das linhagens celulares BeWo, BeWo com forskolina, HTR-8 e Huh-7 inoculados com ZIKV-MR766 baixa passagem, nos hpi de 24h, 48h e 72h.
-
- Tabela 1a** Proteínas estruturais do *Zika virus*.
- Tabela 1b** Proteínas não-estruturais do *Zika virus*.
- Tabela 2** Descrição geral das células mantidas em cultura.
- Tabela 3** Valores de C_T obtido da qRT-PCR para cada fração da diluição seriada da titulação realizado em triplicata.
- Tabela 4** Tabela de conversão de valores de C_T em PFU/mL obtido da qRT-PCR para cada fração da diluição seriada da titulação realizado em triplicata do ZIKV-IEC-Paraíba.
- Tabela 5** Tabela de conversão de valores de C_T em PFU/mL obtido da qRT-PCR para cada fração da diluição seriada da titulação realizado em triplicata do ZIKV-MR766bp.
- Tabela 6** Valores de C_T obtido da qRT-PCR para cada hora após infecção hpi da cinética viral com células de Schwann.

LISTA DE ABREVIATURAS

Água DEPC: água dietil pirocarbonato

ATCC®: Coleção de Cultura Americana

AXL: receptor de tirosina quinase AXL

BMBL5: Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos edição 5

C: capsídeo

cAMP: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CAP: viral RNA capping

CHIKV: *Chikungunya virus*

CDC/NIH: Centers for Disease Control and Prevention/ National Institutes of Health

CS2: conserved sequence 2

C_T: ciclo de limiar

CTB: citotrofoblasto

DENV: *Dengue virus*

D1: Domínio 1

D2: Domínio 2

D3: Domínio 3

DAPI: marcador fluorescente 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DB: dumbbell

DNA: ácido desoxirribonucleico

dsDNA: dupla-fita de ácido desoxirribonucleico

E: envelope

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

hCG: gonadotrofina coriônica humana

HCMV: citomegalovírus humano

HCS: sistema de triagem de alto conteúdo

HPI: horas pós infecção

HSV1: *Herpes simplex virus 1*

ICTV: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

Ig: imunoglobulina

IST: Infecções Sexualmente Transmissíveis

JCRB cell bank: Coleção Japonesa de Banco de Células de Recursos Biológicos

JEV: *Japanese encephalitis virus*

mRNA: ácido ribonucleio mensageiro

NS: proteína não-estrutural

PBS: tampão fosfato salino

prM/M: pré-membrana/membrana

qRT-PCR: reação da cadeia polimerase quantitativo em tempo real com transcrição reversa

RCS2: repeated conserved sequence 2

RdRp: ácido ribonucleico dependente de ácido ribonucleico polimerase

RER: retículo endoplasmático rugoso

RNA: ácido ribonucleico

RNAi: ácido ribonucleico de interferência

SBF: soro bovino fetal

sfRNA: subgenômico flavivírus ácido ribonucleico

SGB: Síndrome de Guillain Barré

sHP: small hairpin

SLA: stem loop A

SLB: stem loop B

SPOV: *Spondweni virus*

ssRNA (+): fita simples positiva de ácido ribonucleico

ssRNA (-): fita simples negativa de ácido ribonucleico

STB: sincício trofoblasto

TAM: família do receptor tirosina quinase TAM composto por Tyro3, AXL e MER

TORCH: acrônimo **T**oxoplasmosse, **O**utros (Parvovirus B19, Varicella-zoster, Sífilis e Hepatite B), **R**ubeola, **C**itomegalovirus, **H**erpes simplex

UTR: região não traduzida

WNV: *West Nile virus*

ZIKV: *Zika virus*

ZIKV-IEC-Paraíba: *Zika virus* Instituto Evandro Chagas Paraíba

ZIKV-MR766bp: *Zika virus* MR766 baixa passagem

LISTA DE SÍMBOLOS

Células/mL	número de células por mililitro
g	grama
°C	graus Celsius
h	horas
Log ₁₀	logarítimo na base 10
®	marca registrada
μL	microlitro
mg	micrograma
mL	mililitro
MOI	multiplicidade de infecção
ng	nanograma
ng/μL	nanograma por microlitro
%	porcentagem
R ²	coeficiente de determinação
PFU/mL	unidade formadora de placa por mililitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1. Arbovírus	19
1.2. Biologia do <i>Zika virus</i>	21
1.2.1. Organização do Genoma	22
1.2.2. Ciclo de Replicação do Vírus	28
1.3. Histórico Epidemiológico	31
1.4. Transmissão e Diagnóstico	37
1.5. Tropismo do Vírus no Hospedeiro	40
1.6. Tropismo Placentário do <i>Zika virus</i>	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1. Objetivo Geral	46
2.2. Objetivos Específicos	46
2.3. Desenho Experimental	46
2.3.1. Linhagens de <i>Zika virus</i>	46
2.3.2. Titulação Viral	47
2.3.3. Culturas Celulares	48
2.3.4. Caracterização das células	48
2.3.5. Cinética Viral	49
2.3.6. Biologia Molecular	52
2.3.7. Citopatia Intracelular da Infecção Viral	54
3 RESULTADOS	55
3.1. Resultados Gerais	55
3.2. Titulação dos Isolados Virais	55
3.3. Cinética Viral	58
3.4. Curva Padrão	67
3.5. Cinética Viral	72
3.6. Cinética Viral: Células de Schwann	77
3.7. Imunofluorescência Indireta do ZIKV	77
4 CONCLUSÃO	79
5 DISCUSSÃO	81

6 BIBLIOGRAFIA	82
7 ANEXOS	92
7.1. Primeira série da Cinética Viral	92
7.2. Padronização da Curva Padrão	105

1 | INTRODUÇÃO

1.1. Arbovírus

Originalmente o termo **arbovírus**, do inglês *arthropod-borne virus*, começou a ser usado a partir de 1942 para designar viroses de animais que causam encefalite. A partir de 1966 o termo passou a ter uma definição epidemiológica para vírus transmitidos biologicamente entre artrópodes hematófagos e vertebrados, no qual o ciclo de transmissão é capaz de se manter na natureza entre artrópodes hematófagos e vertebrados, ambos susceptíveis ao vírus. As arboviroses também são consideradas uma **zoonose**, que são doenças no qual a transmissão ocorre entre animais vertebrados e o homem (WHO 1959, WHO 1967, Gubler 2001, Go *et al.* 2014).

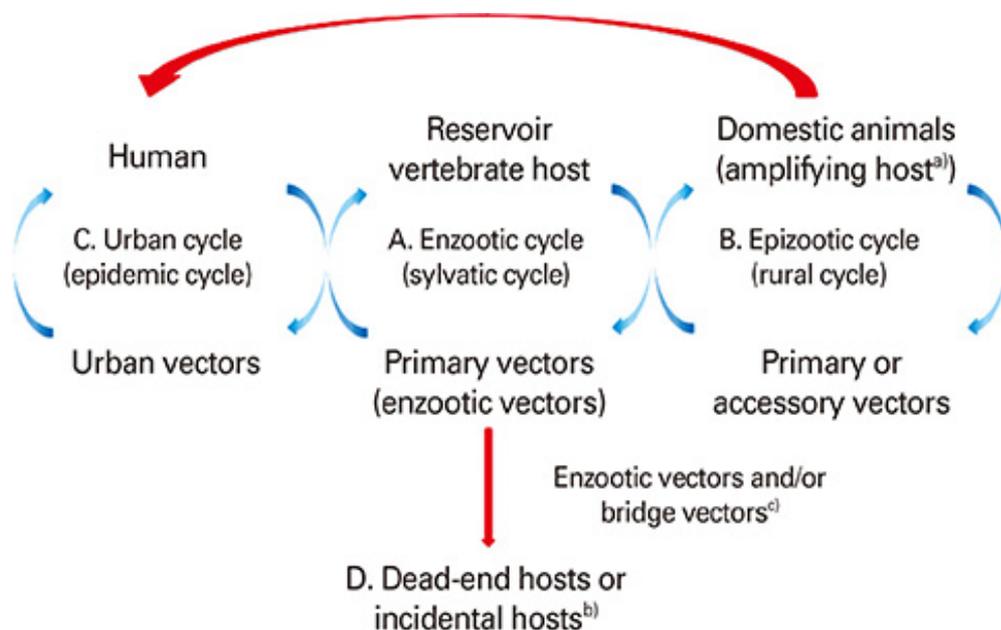
Atualmente são descritas cerca de 540 espécies de arbovírus, dos quais aproximadamente 150 estão relacionados a doenças humanas e de origem zoonótica. As famílias pertencentes a esse grupo são *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Reoviridae* (Gubler 2001, Go *et al.* 2014, Chouin-Carneiro & dos Santos 2017).

O ciclo de transmissão do arbovírus é caracterizado por um vetor, hospedeiro vertebrado reservatório e hospedeiro acidental ou final. O **vetor** das arboviroses pode ser mosquito, carrapato ou flebótomo que são artrópodes hematófagos fêmeas e transmissores dos vírus entre hospedeiro reservatório e acidental. O **hospedeiro reservatório** é o animal vertebrado susceptível aos vírus, no qual mantém a circulação do agente infeccioso na natureza, ou seja, desenvolve viremia alta o suficiente para infectar o vetor e contribuir para manutenção de sua circulação. Já o **hospedeiro acidental** ou final é o animal vertebrado susceptível ao vírus. Esse hospedeiro é exposto de forma acidental aos vírus geralmente nas áreas rurais. O hospedeiro acidental também pode apresentar sintomas de infecção, porém não desenvolve a viremia suficiente para manter o vírus em circulação (Weaver & Barrett 2004, Gubler 2001, Go *et al.* 2014).

A área de circulação dos vetores e hospedeiro pode ser subdivida em três ciclo. O **ciclo silvestre** ou enzoótico no qual o vetor e hospedeiro natural/reservatório (vertebrado selvagem) são naturais do meio. No meio silvestre o vírus circula naturalmente entre vetores e hospedeiros naturais sem causar sintomas e podem ser

reinfectados indefinidamente. O **ciclo rural** ou epizootico contém vetor primário e os hospedeiros reservatório, amplificador (vertebrado domesticado) e acidental (humano e vertebrados). A transmissão ocorre entre esses três grupos incluindo os humanos. E o **ciclo urbano** ou epidêmico caracteriza-se pela presença de vetores naturais ou em trânsito e vertebrados amplificadores ou selvagens sociáveis e humanos. Como é comum a circulação humana e de vertebrados sociáveis em tais áreas eles podem constituir tanto hospedeiros reservatórios bem como acidentais. Esta interação entre vetores e hospedeiros está representada em detalhe na Figura 1 (Weaver & Barrett 2004, Gubler 2001, Go *et al.* 2014).

Figura 1. Ciclo de transmissão das arbovirozes. (A) **Ciclo silvestre (sylvatic cycle)** a transmissão do vírus ocorre entre animais selvagens (hospedeiro vertebrado) e o vetor primário que amplifica o vírus. O hospedeiro vertebrado ou primário é o reservatório do vírus no meio silvestre e pode abrigar o vírus e reinfectar várias vezes ao longo da vida, sem apresentar nenhuma doença. (B) **Ciclo rural (rural cycle)** a transmissão do vírus ocorre através de animais domesticados e/ou animais urbanos. Tem como vetores primários artrópodes silvestres e/ou urbanos por se situarem numa faixa de transição entre o meio urbano e silvestres. Na zona rural os humanos também são potenciais hospedeiros. (C) **Ciclo epidêmico (epidemic cycle)** os seres humanos são a fonte de infecção para o mosquito devido ao alto nível de viremia. O vetor urbano mantém a circulação do vírus através da picada em que adquire e transmite o vírus. a) **Hospedeiros amplificadores (amplifying host)** podem apresentar viremia alta o suficiente de modo a permitir (re)infectar o vetor e manter o ciclo de transmissão. b) **Hospedeiro acidental (incidental hosts)** é um hospedeiro intermediário que não desenvolve viremia suficiente para manter o ciclo de transmissão. c) **Vetor-ponte (bridge vectors)** é o artrópode que adquire o vírus de um vertebrado selvagem e o transmite para os humanos ou hospedeiro secundário (Go *et al.* 2014).



A ocorrência de arboviroses se concentra na zona intertropical devido à maior diversidade de espécies e condições climáticas favoráveis. A África e a América do Sul apresentam cerca de 50% das arboviroses descritas atualmente (Gubler 2001, Cleton *et al.* 2012). Infecções por arbovirose de importância médica global estão presentes nas famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Bunyaviridae*. Os sintomas comuns geralmente podem ser descritos por doença febril de ausente a grave, exantema, síndromes neurológicas e síndromes hemorrágicas (Gubler 2001, Lopes *et al.* 2014). No Brasil as principais arbovirose endêmicas são Febre amarela, Febre do Dengue, Febre da Zika e Febre da Chikungunya. Em relação ao tratamento e prevenção, para a maior parte das arboviroses os tratamentos são com medicações relativos aos sintomas sem drogas antivirais disponíveis no mercado. As doenças da Febre Amarela, da Febre do Dengue, da Febre do Oeste do Nilo são as únicas arboviroses com vacinas disponíveis no mercado tanto para humanos como outros animais.

1.2. Biologia do *Zika virus*

Zika virus (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* com 53 espécies descritas (ITCV 2019). O grupo tem como principais arboviroses de importância médica *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV), *West Nile virus* (WNV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), entre outros.

ZIKV classifica-se no clado X no grupo de arbovírus *Flavivirus* junto com *Spondweni virus* (SPOV) (Musso & Gluber 2016). Organização do genoma é o mesmo descrito para *Flavivirus*, sendo o protótipo a linhagem ZIKV-MR766 de 1947, assim como o ciclo de replicação. A sequência completa do protótipo está no GeneBank sob o número AY632535 (Kuno & Chang 2007, Lanciotti *et al.* 2007). Existem outras sequências depositadas do ZIKV-MR766 no banco genômico do National Center for Biotechnology Information, NCBI.

Há divergências em relação à existência das linhagens de ZIKV (Gong *et al.* 2016). Ao considerar análise filogenética dos genes do Envelope e NS5, um grupo de cientistas considera a existência de duas linhagens de ZIKV, a Africana e Asiática (Haddow *et al.* 2012, Faria *et al.* 2016, Wang *et al.* 2016). E em oposição o outro grupo apresenta a existência de três linhagens do Oeste Africano, Leste Africano e Asiático

(Faye *et al.* 2014, Shen *et al.* 2016). Em um dos estudos de Faye *et al.* 2014 mostra que a origem do ZIKV do clado Africano/Asiático possivelmente compartilha um ancestral comum do Leste africano. Em relação à sorologia, Dowd e colaboradores (2016) compararam isolados de ZIKV Africanos e Asiáticos, incluindo o MR766 e Paraíba/2015 do Brasil, respectivamente. A comparação mostrou a existência de apenas um sorotipo circulante com mais 95% de similaridade entre o genótipo Africano e Asiático.

1.2.1. Organização do Genoma

ZIKV pertence ao grupo IV pela Classificação de Baltimore. O genoma de senso positivo de fita simples, ssRNA (+), contém cerca de 11 mil bases. O RNA genômico consiste de uma única janela aberta de leitura, *Open Reading Frame*, (ORF) flanqueada pelas regiões não traduzidas, *Untranslated Region* (UTR), 5'UTR e 3'UTR. Na posição 5'UTR, início do genoma, apresenta uma estrutura 5'CAP metilado. E na posição terminal, 3'UTR, ausente de cauda poli A e contém CU_{OH} e RNA *hairpin* conservado. A ORF codifica uma única poliproteína clivada por proteases viral e do hospedeiro. A clivagem resulta nas proteínas estruturais do capsídeo (C), pré-membrana/membrana (prM/M) e do envelope (E). Tais proteínas dão a morfologia do vírion esférico envelopado com cerca de 50 nm, e o nucleocapsídeo icosaédrico com cerca de 30 nm em que no seu interior encontra-se o genoma viral (Figura 2). As proteínas não-estruturais (NS) NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 são clivadas pelas proteases do vírus e do hospedeiro durante o ciclo de replicação do vírus. Os genes não-estruturais codificam as proteínas que participam do processo de transcrição, tradução e replicação de novos vírions (Chamber *et al.* 1990, Fernandez-Garcia *et al.* 2009, Mukhopadhyay *et al.* 2015, Knipe & Howley 2007, Kuno & Chang 2007, Sirohi & Kuhn 2017, Laureti *et al.* 2018) (Figura 3).

Figura 2. Morfologia do *Zika virus*. As proteínas estruturais dão a morfologia do vírion esférico envelopado com cerca de 50 nm, e o nucleocapsídeo icosaédrico com cerca de 30 nm e no seu interior encontra-se o genoma viral. Do lado esquerdo em amarelo são dímeros da proteína o Envelope (E dimer), laranja a proteína de Membrana (M protein), verde a proteína do Capsídeo (C protein) e ao centro do vírions o RNA genômico (Genomic RNA). Do lado direito apresenta a organização dímero de superfície (T=3-like organization of surface dimers) (ViralZone 2011).

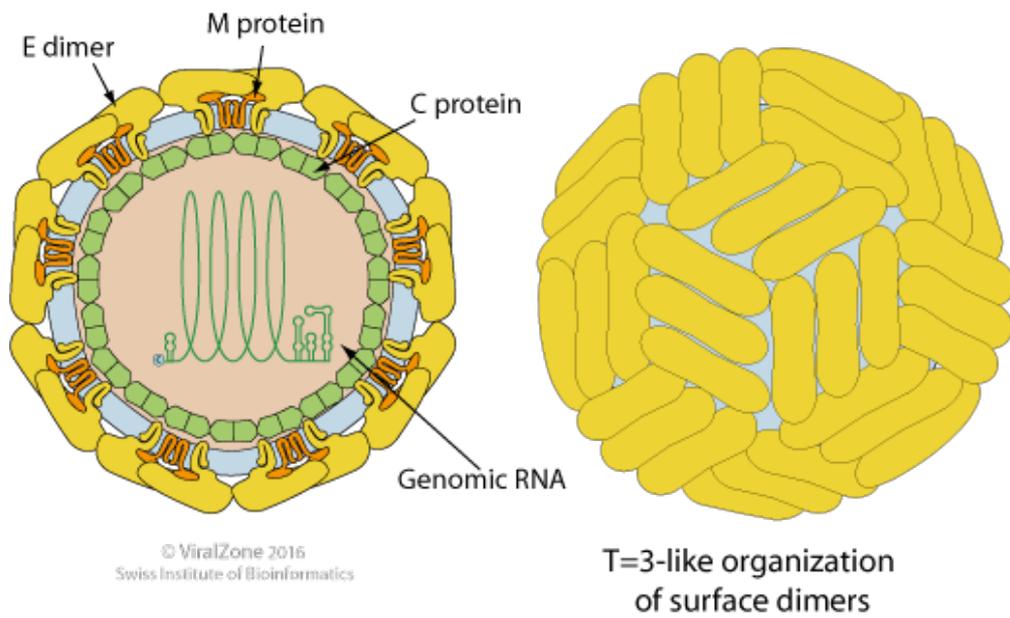
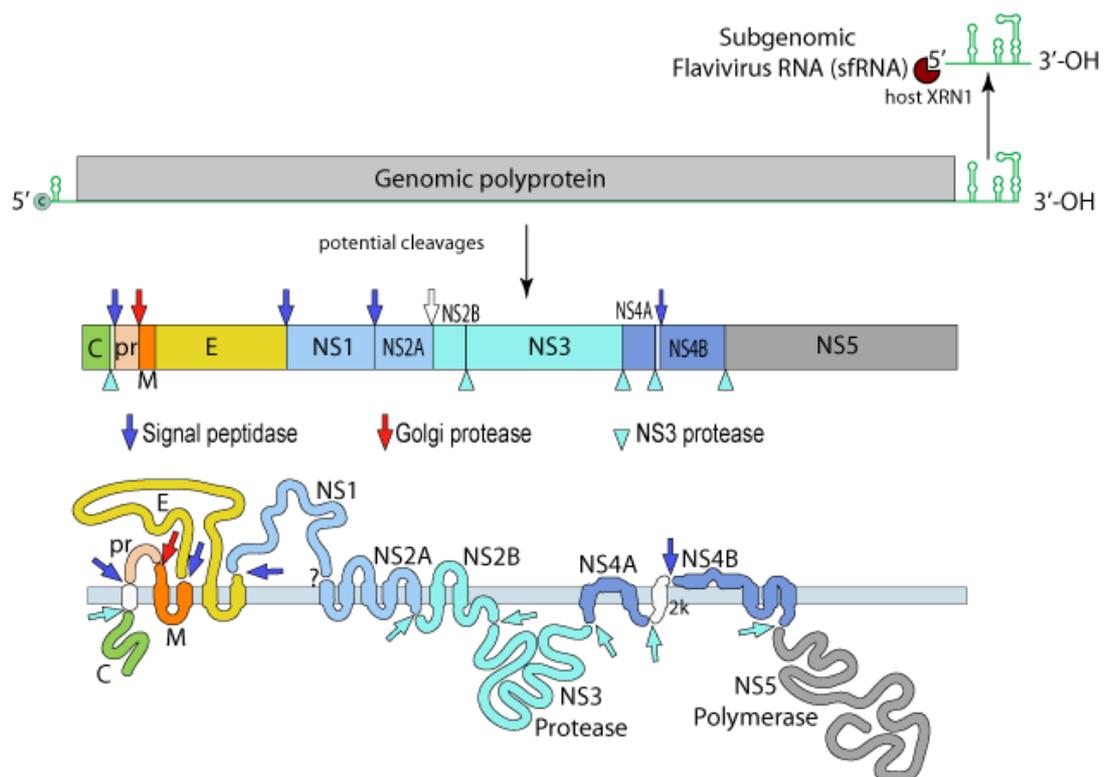


Figura 3. Genoma representativo do ZIKV. O genoma é composto por uma molécula de RNA de fita simples de polaridade positiva ssRNA(+) com cerca de 11 mil bases. O RNA genômico consiste de um único quadro de leitura, “Open Reading Frame”, ORF, flanqueada pelas regiões não traduzidas e “Untranslated Region”, UTR, 5’UTR e 3’UTR. A ORF codifica uma única poliproteína clivada em três proteínas estruturais (C, pr/M e E) e sete não-estruturais (NS) NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5. Cada seta indica o ponto de clivagem das proteases viral e do hospedeiro após a tradução. Os genes não-estruturais codificam as proteínas que participam do processo de transcrição, tradução e replicação de novos vírions. Em relação as extremidades do genoma 5’C marca o ponto de início da transcrição e proteção contra exonucleases celulares. E na porção 3’-OH, RNA subgenômico (sfRNA), tem sua origem na porção da 3’UTR e ajuda o vírus na evasão da resposta imune do hospedeiro, de modo a afetar a patogênese do vírus (ViralZone 2011).



As proteínas virais apresentam diferentes funções (Chamber *et al.* 1990, Mukhopadhyay *et al.* 2015, Guzman *et al.* 2016). As tabelas 1a estruturais e 1b não-estruturais, abaixo, apresenta as propriedades de cada proteína do genoma do vírus.

Tabela 1a. Proteínas estruturais do *Zika virus*.

Gene: Proteína	Nome	Aminoácidos	Principais Características	Principais Funções
C:C	Capsídeo	104	Proteína composta por capsômeros	Empacotamento do genoma viral compondo o nucleocapsídeo
<i>prM</i> :prM	Pré-membrana: Membrana	93prM+75M	Glicoproteína com duas hélices transmembrana	prM é precursora da proteína M participando da morfogênese do vírion e transporte
<i>E</i> :E	Envelope	504	Glicoproteína de duas hélices transmembrana, ancorada na membrana plasmática do hospedeiro	Medeia a ligação e fusão no início do processo de infecção (antígeno viral)

Tabela 1b. Proteínas não-estruturais do *Zika virus*.

Gene: Proteína	Nome	Aminoácidos	Principais Características	Principais Funções
<i>NS1:NS1</i>	Não-estrutural 1	352	Glicoproteína com uma porção hidrofílica	Participação do início da replicação do RNA viral, interage com NS4A durante o processo de replicação
<i>NS2A:NS2A</i>	Não-estrutural 2	226	Proteína hidrofóbica	Participação da replicação do RNA, montagem do vírus, interage com os componentes da replicase NS3 e NS5 e com a região 3'UTR. Atua como antagonista do interferon (IFN) e inibe sua sinalização e pode relacionar-se a virulência
<i>NS2B:NS2B</i>	Não-estrutural 2B	130	Proteína hidrofóbica	Formação do complexo estável com NS3. Atua como co-fator de NS2B-NS3 serina protease, co-fator de NS4A e clivagem autoproteolítica da junção NS2B-NS3
<i>NS3:NS3</i>	Não-estrutural 3	617	Proteína multifuncional de atividade catalítica	Enzima clivagem da poliproteína viral e atua na replicação do RNA
<i>NS4A:NS4A</i>	Não-estrutural 4A	127	Proteína hidrofóbica	Replicação do RNA viral e induz o rearranjo da membrana
<i>NS4B:NS4B</i>	Não-estrutural 4B	251	Proteína hidrofóbica	Junto com NS3 estão envolvidos na dupla fita de dsRNA viral
<i>NS5:NS5</i>	Não-estrutural 5	903	Proteína altamente conservada e multifuncional junto com a metiltransferase (MTase)	Atividade de RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) na síntese do genoma viral, MTase pode estar envolvido na modificação do 5'CAP. Atua na modulação do sistema imune ao promover a disseminação do vírus no hospedeiro.

As **regiões 5'UTR e 3'UTR**, flanqueiam as extremidades da ORF e são importantes para replicação viral (Ng *et al.* 2017). Durante o ciclo de infecção sua interação se faz necessária para o recrutamento e o correto reposicionamento da NS5 na transcrição da fita negativa de RNA, ssRNA (-). As UTRs são essenciais para tradução e replicação, além da patogênese do vetor e hospedeiro vertebrado.

5'UTR localiza-se na região anterior da ORF. Compreende a CAP, SLA (“stem loop A”) e SLB (“stem loop B”). CAP é uma estrutura importante para tradução e proteção contra as exonucleases 5' e 3' da célula hospedeira, confere estabilidade à molécula e aumenta a chance do RNA ser reconhecido pelas estruturas de tradução eucariótica, levando a uma maior produção de proteínas. E SLA e SLB participam da síntese de RNA ao interagir com NS5. 3'UTR está presente logo após o término da ORF e é altamente estruturada e com regiões conservadas e subdivide-se em três domínios (D) D1, D2 e D3.

Domínio 1 (D1) inicia-se imediatamente após o códon de parada. Dentre os três domínios, esse tem maior variação de nucleotídeos e contém duas estruturas SL. **Domínio 2 (D2)** segue logo após D1 e é moderadamente conservada. Possui duas estruturas DB (“dumbbell”), RCS2 (“repeated conserved sequences”) e CS2 (“conserved sequence”). **Domínio 3 (D3)** é o mais conservado entre os *Flavivirus*. Apresenta estruturas CS1, sHP (small hairpin) e uma porção terminal 3'SL. 3'SL é a porção mais conservada entre os *Flavivirus* e de importante função, interage com o hospedeiro e proteínas virais que modulam a síntese do RNA viral e tradução. Entre as estruturas 3'UTR há sequência de espaçadores que podem promover o dobramento apropriado e prevenir a interferência da estrutura conformacional necessária para a replicação viral ótima (Göertz *et al.* 2017, Ng *et al.* 2017).

RNA subgenômico de *Flavivirus*, **sfRNA**, apresenta uma variedade de atividades. Sua origem é na porção da 3'UTR e ajuda o vírus na evasão da resposta imune do hospedeiro, de modo a afetar a patogênese do vírus. sfRNA é produzido na região D1 da 3'UTR. Nas células, causa efeito citopático e patologia viral o que pode desempenhar algum resultado a doença. Modula a resposta do sistema imune de modo a afetar os mecanismos de RNA interferente (RNAi). Participa das vias de retorno do mRNA e na resposta do interferon tipo I. Existe algumas diferenças de atividades nos vetores e hospedeiros. Nos vetores sfRNA são abundantes e atuam

como molécula isca para mediadores de RNAi Dicer e Ago2 de modo a impedir a clivagem de moléculas de dsRNA. Alguns estudos demonstraram que a supressão mínima do RNAi resulta na diminuição da transmissão do vírus sem afetar a aptidão do mosquito (Göertz *et al.* 2017, Ng *et al.* 2017).

1.2.2. Ciclo de Replicação do Vírus

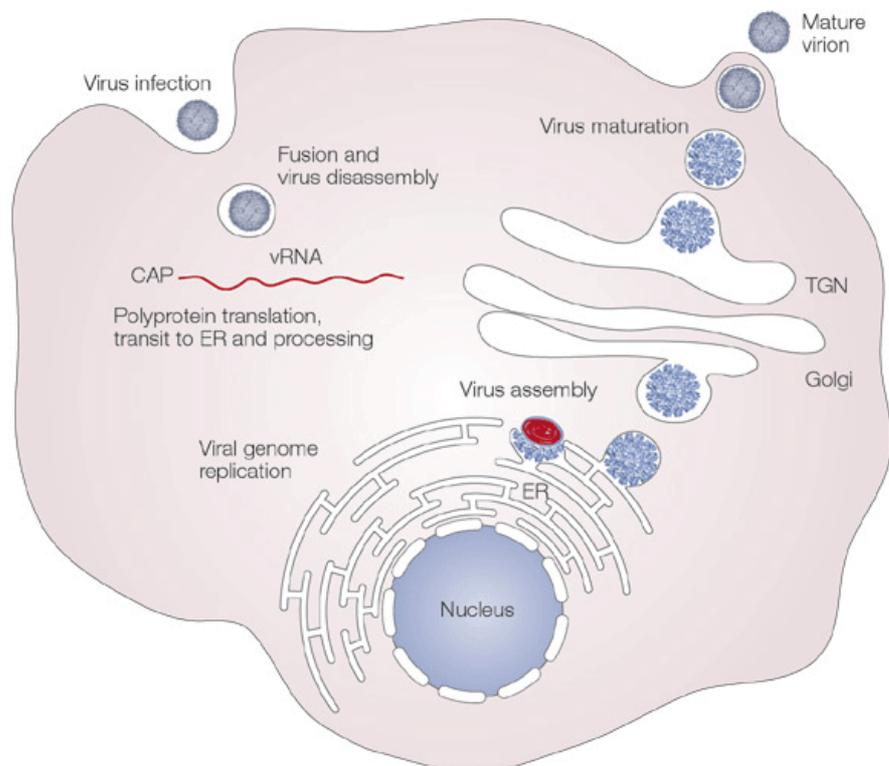
A geração de novas partículas virais maduras, os vírions, inicia-se com a presença de receptores compatíveis com os antígenos virais (Perera-Lecoin *et al.* 2014, Miorin *et al.* 2016, Mukhopadhyay *et al.* 2015, Hamel *et al.* 2016, Laureti *et al.* 2018). No grupo dos *Flavivirus*, incluindo ZIKV, há o reconhecimento de uma variedade de receptores celulares expressos em diferentes tipos celulares. Os mais bem caracterizados são DC-SIGN um tipo de receptor de lectina tipo C; receptores TIM; receptores da família TAM (TYRO3, AXL e MERTK).

A infecção inicia com os vírions, com a interação da glicoproteína E, presente na superfície da partícula viral com receptores compatíveis presentes na membrana da célula hospedeira. Após o reconhecimento dos receptores do hospedeiro e do vírion, o vírus é internalizado por endocitose mediada por clatrina. Segue-se a formação do endossomo a partir da membrana plasmática celular que contém no seu interior vírus. Uma vez no citossol, a vesícula endocítica acidifica e ocorre à mudança conformacional da proteína E que inicia a fusão entre o envelope viral com a membrana do endossoma. Nesse ponto há liberação do nucleocapsídeo no citoplasma e do genoma viral com 5'CAP. O RNA viral livre no citoplasma pode ser traduzido diretamente pela maquinaria celular e produzir uma única poliproteína. Essa, então é processada pelas proteases do hospedeiro e do vírus, e gera novas proteínas virais NS's e concomitantemente inicia a replicação do genoma no retículo endoplasmático rugoso (RER). A RdRp viral (NS5) catalisa a síntese da fita complementar negativa a partir da fita molde positiva. A ssRNA (-) é a fita molde na geração de novos genomas virais. Os novos genomas são sintetizados assimetricamente, com a ssRNA (+) sendo produzida em excesso em relação à ssRNA (-) nas membranas intracelulares.

A montagem de novos vírus ocorre na superfície do RER, quando as proteínas estruturais e novos RNA genômicos, sintetizados a partir de ssRNA (-) molde, são sintetizados no lúmen RER. Desse modo, o genoma viral tem ao menos três diferentes funções: tradução, replicação e associação com vírions nascentes, dos quais precisam estar finamente reguladas e coordenadas durante a replicação do ciclo. Ao final do processo de montagem, vírus imaturo e partículas subvirais são transportados através da rede do complexo golgiense. Os vírus imaturos são clivados pela protease furin do hospedeiro e resulta em partículas maduras. Partículas subvirais também são clivadas pela furin. Ao final, partículas virais e subvirais maduros são liberados para o meio extracelular por exocitose (Figura 4).

O sfRNA é gerado a partir da degradação incompleta 3'UTR pela exonucleases celular 5'-3' Xrn1. Tal fragmento é requerido para a patogenicidade viral e possivelmente na regulação da resposta do interferon.

Figura 4. Ciclo de replicação do *Zika virus*. A partir de uma colisão aleatória com a superfície da célula hospedeira seguido do reconhecimento do antígeno viral com o receptores celulares, inicia-se o processo de endocitose media clatrina (vírus infection). Ao redor da partícula viral forma-se o endossomo que é internalizado. Uma vez no citossol, a vesícula acidifica e ativa mudanças conformacionais no vírus, no qual fusiona o mesmo com o endossomo (fusion and virus disassembly). Há o desmonte da partícula e liberação no citossol do genoma viral. Esse por ser ssRNA (+) pode ser traduzido diretamente pelo maquinário da célula hospedeira (vRNA-CAP) e ocorre a tradução da poliproteína, essa sendo processada co e pós-traducional por proteases virais e do hospedeiro (polyprotein translation, transit to ER and processing) no retículo endoplasmático (RE). A replicação do genoma (viral genome replication) ocorre nas membranas intracelulares. E a montagem do vírus na superfície do RE, uma vez que as proteínas estruturais e o RNA genômico recém-sintetizado projetam para o lúmen do RE. Novos vírus são gerados e as partículas subvirais são transportadas através da rede do complexo golgiense (virus assembly). Os vírus imaturos são clivados pela protease furin do hospedeiro e resulta na maturação de partículas infecciosas (virus maturation). Partículas subvirais também são clivadas pela furin. Vírions maduros e partículas subvirais são liberados por exocitose (mature virion) (Mukhopadhyay *et al.* 2015).



1.3. Histórico Epidemiológico

A descoberta do *Zika virus* (ZIKV) ocorreu durante os estudos sobre Febre Amarela, no qual cientistas do grupo de pesquisa *Virus Research Institute Entebbe*, que procuravam vetores do vírus da febre amarela em primatas não-humanos em Uganda, África. (Dick *et al.* 1952, ^aDick 1952, ^bDick 1952, Dick 1953). Em abril de **1947** o ZIKV fora descoberto em um macaco sentinela Rhesus – *Macaca mulatta*, identificado como 766 durante umas das expedições de pesquisa na Floresta de Ziika. O macaco fora exposto aos vetores transmissores enquanto estava numa gaiola suspensa próxima à copa das árvores. Macaco Rhesus 766 apresentou febre de 39,7°C no segundo dia da exposição. E no terceiro dia com febre de 40°C, então, coletou amostras sanguínea. Das amostras de sangue coletadas e inoculadas por via intracerebral e intraperitonal em camundongos suíços, somente os camundongos com inculação intracerebral morreram com sinais de infecção no Sistema Nervoso Central.

Em janeiro de **1948** na mesma localidade o ZIKV foi isolado do mosquito *Aedes africanus*. O filtrado desse mosquito foi inoculado camundongos suíços e desses no macaco Rhesus 758. Do macaco Reshus extraiu o sangue e do soro sanguíneo infectado inoculou novamente em camundongos suíços. A partir de um experimento de adaptação em camundongos albino, da **linhagem 766**, houve a passagem do vírus pelo menos 157 vezes nos cérebros de camundongos. Verificou se que ao longo dessas sucessivas passagens houve diminuição do período de incubação, das manifestações com 4 dias após 70^a passagem do vírus nos camundongos. Esses apresentaram sintomas como paralisia, enfraquecimento do sistema locomotor entre outros sintomas não descritos, além de serem levados a óbito.

Uma outra linhagem de ZIKV isolado do *A. africanus* e inoculado em camundongo albino suíço, **linhagem E/1**. Os camundongos inoculados com o filtrado do mosquito apresentaram características semelhantes da linhagem 766. Houve redução no período de incubação após sucessivas passagens e a partir da 50^a passagem do vírus o tempo de incubação fora de quatro dias. Até então, houvera 115 passagem do vírus em cérebro de camundongo. Do grupo de camundongos inoculados com o soro do Rhesus 758, nas primeiras passagens em camundongos

houve as manifestações sintomáticas da infecção e óbito, porém, a sucessão da inoculação parou na 17ª passagem.

Como se pode observar, a partir das duas linhagens de ZIKV verificou-se o neurotropismo do vírus em camundongos e respectiva degeneração neural. Porém, a comparação da transmissão do vírus para humanos, até então só fora possível por meio de teste sorológico aplicado em moradores locais, alguns desses foram positivos para anticorpos contra antígenos de ZIKV.

O primeiro relato de isolado de ZIKV em humanos foi registrado por Macnamara (1954) durante um surto de icterícia na Nigéria. Do mesmo isolado, Bearcroft (1956) inoculou voluntariamente um homem adulto. Ambos os infectados (Macnamara 1954 e Bearcroft 1956) não apresentaram sintomas clínicos característicos de infecção por ZIKV, além dos testes de identificação do vírus não foram conclusivos e mostrarem maior proximidade com *Spondweni virus* (SPOV), do gênero *Flavivirus*. Boorman e Draper (1968) relataram o engano cometido por Macnamara. Desse modo, Simpson (1964) registrou o primeiro isolado de ZIKV em humanos. Esse ocorreu em Uganda em 1963, durante a coleta de mosquitos transmissores de arbovírus na Floresta de Ziika. O enfermo apresentou sintomas característicos da infecção tais como febre mediana, erupções cutâneas rosadas cobrindo a maior parte do corpo, mal-estar, dores no corpo e na cabeça. A partir do soro do paciente, camundongos albinos suíços, foram inoculados com esse material e das amostras desses camundongos comparou se o vírus com a linhagem MR766-17A da 19ª passagem (^{a,b}Dick 1952). Os testes de identificação comprovaram ser ZIKV (Wilkan e Smith 2017).

Em **1966**, na Malásia – Ásia, o ZIKV foi isolado pela primeira vez a partir de um conjunto amostral de *Aedes aegypti* coletado em área urbana (Marchette *et al.* 1969). Em **1977-1978** registrou-se o primeiro surto de transmissão do vírus em Java Central – Indonésia (Olson *et al.* 1981). Até aquele ano, a circulação do vírus em humanos na África e Ásia foi demonstrada esporadicamente por meio de testes sorológicos de indivíduos previamente infectados (Olson *et al.* 1981, Posen *et al.* 2016). A partir de uma revisão epidemiológica de ZIKV realizada por Posen *et al.* (2016) de 1947 a 2007, a presença do vírus foi observada diagnosticada em vinte e nove países da África, oito da Ásia, e um da Europa, nesse último o vírus possivelmente foi trazido por

viajantes. Nas Américas não foi encontrado indícios de sua circulação e na Oceania não foi considerado ou encontrado.

Dos 70.723 indivíduos estudados ao longo do período e nos diferentes países por onde registrou a circulação do vírus, não foi possível descrever os sintomas comuns atribuídos à infecção. E em relação às novas características clínicas atribuídas ao ZIKV não houve evidências de síndromes neurais congênitas, síndrome de Guillain-Barré e transmissão sexual. Das populações estudadas, a soroprevalência chegou à 53,3%. Da parcela da população em idade reprodutiva a infecção ocorrera entre 15 - 40%. Portanto, o vírus manteve-se em circulação por décadas na África e Ásia (Hayes 2009, Musso & Gubler 2016, Posen *et al.* 2016), com surtos localizados e mínimas consequências, diferentemente ao ocorrido entre 2015-2016 no Brasil.

Entre abril e junho de 2007 no Estado de Yap – Estados Confederados da Micronésia ocorreu uma epidemia de ZIKV associada à febre, erupção cutânea, conjuntivite e artralgia (Lanciotti *et al.* 2008). Os testes iniciais de laboratório sugeriram que poderia ser uma epidemia de DENV. Porém, após análise por PCR em tempo real de soros dos infectados realizado pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos em humanos, encontrou em cerca de 90% para infecção por ZIKV. Dessa epidemia pôde-se um estudo molecular mais apurado em relação ao ZIKV, pois no ano anterior publica-se o genoma completo do ZIKV-MR776 de 1947 (Kuno & Chang 2007).

Em relação à sorologia, verificou-se possibilidade de reação cruzada com teste realizado para DENV em humanos, particularmente se ZIKV for infecção secundária de *Flavivirus*. Porém, se for infecção primária a reação cruzada é mínima. Uma possível consequência da reação cruzada é a não detecção de surtos epidêmicos nas localidades de ocorrência de *Flavivirus* durante os 60 anos anteriores. Demonstrou-se por métodos moleculares a proximidade com SPOV. E a comparação do gene NS5 entre os diferentes isolados de ZIKV mostra que existe três subclados e estão relacionados com sua distribuição geográfica. Os subclados do Oeste africano (Senegal 1984, linhagem ZIKV-ArD41519), Leste Africano (Uganda 1947, linhagem ZIKV-MR766) e Sudoeste da Ásia e do Pacífico (Malásia 1966, linhagem ZIKV-P6-740; Micronésia, linhagem ZIKV-EC Yap) (Kuno & Chang 2007, Lanciotti *et al.* 2007, Haddow *et al.* 2012, Simonin *et al.* 2017).

Nos anos posteriores, entre **2007 a 2014**, houve surtos recorrentes de ZIKV nos países Africanos e Asiáticos, onde foi detectada sua circulação. Nos países da região do Pacífico como Polinésia Francesa, Ilha de Páscoa, Ilhas Cook, Nova Caledônia, entre outros (Ioos *et al.* 2014, Galán-Huerta *et al.* 2016, Hamel *et al.* 2016, Lessler *et al.* 2016, Musso & Gubler 2016, Petersen *et al.* 2016, ^aWeaver *et al.* 2016, ^aBaud *et al.* 2017) registraram surtos epidêmicos de ZIKV semelhantes ao ocorrido em Yap. Análises clínicas, sorológicas e moleculares confirmaram sua circulação.

Na Polinésia Francesa, durante a epidemia do ZIKV em **2013** (Cao-Lormeau *et al.* 2014, ^aMusso *et al.* 2014) houve aumento número de pacientes que desenvolveram a Síndrome de Guillain Barré (SGB) (Oehler *et al.* 2014); mães e fetos/recém-nascidos infectados; o leite materno (Besnard *et al.* 2014); transmissão por transfusão sanguínea (^bMusso *et al.* 2014); e em um estudo retrospectivo, oitos casos de recém-nascido ocorrido durante a epidemia (Cauchemez *et al.* 2015). Nos surtos anteriores eram ausentes quaisquer registros de complicações neurológicas em seres humanos (Oehler *et al.* 2013). Estudos apontam que a Polinésia Francesa pode ter sido o possível difusor do vírus para região do Pacífico e das Américas a partir do Brasil. Sendo que a introdução do ZIKV pode ter ocorrido durante as através de competições internacionais na Oceania e no Brasil no final de 2013 e no início de 2014 (^aMusso *et al.* 2014, ^dMusso 2015, Massad *et al.* 2017).

Entre o período de 2013 a 2016, *Zika virus*, disseminou-se ao redor do mundo levado por viajantes, e chegou aos países *naïve* da Europa, Ásia e Américas, além de retornar à África (Fonseca *et al.* 2014, Kutsuma *et al.* 2014, Pyke *et al.* 2014, Zammarchi *et al.* 2014, Leung *et al.* 2015, Tappe *et al.* 2015, Armstrong *et al.* 2016, Galán-Huerta *et al.* 2016, Goorhis *et al.* 2016, Korhonen *et al.* 2016, Massad *et al.* 2016, Meltzer *et al.* 2016, Musso & Gubler *et al.* 2016, Baud *et al.* 2017). Em janeiro de 2016 em decorrência da expansão do vírus e as complicações neurológicas fatais em fetos e recém-nascidos e SGB em adultos a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o *Zika virus* como emergência internacional no dia 01/02/2016 (WHO 2016) e em 18/11/2016 encerra a emergência do ZIKV (Figura 5).

Nas Américas, a epidemia do ZIKV chegou ao Brasil no final de 2014 e início de 2015. Os primeiros estados a notificarem a epidemia foram Rio Grande do Norte – RN, Pernambuco – PE, Bahia – BA e Rio de Janeiro – RJ, esse vírus foi identificado

rapidamente. Em setembro de 2015 relatórios emitidos pelo Ministério da Saúde apontaram para o aumento de recém-nascidos com microcefalia e mal formações congênitas nos estados afetados pela epidemia (Campos *et al.* 2015, Cardoso *et al.* 2015, Zanluca *et al.* 2015, ^aCalvet *et al.* 2016, Souza *et al.* 2016).

No dia 11 novembro de 2015 o Ministério da Saúde alertou a nação Brasileira para possível associação entre infecção por ZIKV e sua transmissão gestacional. A suspeita da relação entre a epidemia do ZIKV e as síndromes congênitas aumentou quando duas mães diagnosticadas com ZIKV durante a gravidez, tiveram os respectivos fetos com microcefalia e nos tecidos bem como no líquido amniótico foram detectados RNA de ZIKV. Para corroborar com a suspeita, os exames laboratoriais realizados para rubéola, toxoplasmose, sífilis, citomegalovírus e herpes viral foram negativos (Schuler-Faccini *et al.* 2016). Além do aumento crescente no número de recém-nascidos com síndromes congênitas e adultos com SGB associados aos ZIKV entre novembro de 2015 a janeiro de 2016 no Brasil (Carvalho *et al.* 2016), também se observou o avanço da epidemia para os demais estados brasileiros e para o continente Americano e o Europeu (Zhang *et al.* 2017).

1.4. Transmissão e Diagnóstico

No gênero *Aedes* existem cerca de 30 espécies de vetores competentes para ZIKV. Sendo os principais transmissores no mundo são *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Mosquitos bem adaptados ao ciclo de transmissão urbana assim como para DENV, YFV, CHIKV. O principal reservatório natural desse vírus são os primatas. O homem é considerado hospedeiro acidental, pois o vírus não completa o ciclo de transmissão. A transmissão completa do ZIKV é a mesma dos demais *Flavivirus* (Gubler 2001, Cleton *et al.* 2012, Go *et al.* 2013, Hamel *et al.* 2016, Lazear & Diamond 2016, Moore *et al.* 2017, Musso & Gubler 2016, Peerson & Diamond 2018, Petersen *et al.* 2016, Weaver *et al.* 2016). No Brasil *A. aegypti* e *A. albopictus* são os principais vetores (Marconde & Ximenes 2016, Choin-Carneiro & Santos *et al.* 2017). *Culex quinquefasciatus* e outras espécies do gênero podem ser um potencial vetor na transmissão do vírus (Aliota *et al.* 2016, Amraoui *et al.* 2016, Guedes *et al.* 2017, Guo *et al.* 2016, Huang *et al.* 2016, Lazear & Diamond 2016, Musso & Gluber 2016, Heitmann *et al.* 2017).

Em relação às demais arboviroses, o *Zika virus* pode ser transmitido por duas vias (Lazear & Diamond 2016, Musso & Gubler 2016), tendo a principal **transmissão vetorial**, é a mesma que as demais arboviroses, em que o artrópode hematófago competente é transmissor intermediário entre os hospedeiros vertebrados. E **transmissão não-vetorial**, consiste na ausência de um vetor como intermediário, ela pode ser **horizontal direta ou indireta e vertical** (ex. materno-fetal).

Na transmissão horizontal direta, o ZIKV pode ser transmitido por **via sexual** (Atkinson *et al.* 2016, ^aMansuy *et al.* 2016, ^bMansuy *et al.* 2016, Nicastrì *et al.* 2016, Oliveira *et al.* 2016, Visseaux *et al.* 2016, Musso *et al.* 2017, Spencer *et al.* 2017) e para WNV e YFV o vírus já fora detectado no sêmen (Musso & Gubler 2016). Portanto, Zika vírus é considerada uma Infecção Sexualmente Transmissível, **IST**. A transmissão do homem para mulher representa 94% dos casos e da mulher para homem 1%. Na relação homossexual masculina ocorre em 3% dos casos e da feminina não há evidências. A principal via de transmissão é vaginal, e a oral e a anal são consideradas possíveis rotas de transmissão (^eMusso *et al.* 2015, Counotte *et al.* 2018).

A transmissão vertical, **materno-fetal** é documentada para WNV, DENV e CHIKV (Musso & Gubler 2016, Martines *et al.* 2016). No caso de ZIKV essa via de transmissão tornou-se evidente após a observação de casos de síndromes congênitas ocorrida durante as epidemias no Brasil e depois nos demais países afetados, no qual grávidas e puérperas infectadas que adquiram ZIKV, a princípio, por transmissão vetorial. O leite materno é considerado como um possível meio de transmissão, em vista que partículas virais infecciosas foram isoladas do leite e detectadas por qRT-PCR (Besnard *et al.* 2014, Dupont-Rouzeyrol *et al.* 2016, Colt *et al.* 2017, Sotelo *et al.* 2017). Devido a possibilidade de transmissão do vírus durante o período gestacional (França *et al.* 2016, Schwartz 2016, Steele 2016, Vouga & Baud 2016) passou a fazer parte do grupo das doenças infecciosas gestacionais e perinatais causadas por microorganismos que podem levar a doenças congênitas em fetos e recém-nascidos, denomina **TORCH** do acrônimo **T**oxoplasmose, **O**utros (Parvovirus B19, Varicella-zoster, Sífilis e Hepatite B), **R**ubeola, **C**itomegalovirus, **H**erpes simplex (Yadav *et al.* 2014, Coyne & Lazear 2016).

Outras possíveis formas de transmissão associadas ao ZIKV, porém, com poucas evidências são transmissão não-vetorial horizontal direta por **acidente de trabalho** devido ao manuseio de material biológico infectado e por **transfusão sanguínea e transplante** (^dMusso *et al.* 2014).

Em relação aos sintomas mais associados à infecção por ZIKV são febre moderada (37,8°C a 38,5°C), prurido exantemático (urticária), dor de cabeça, dor retroorbital, conjuntivite não purulenta, vertigem, mialgia, artralgia, desordem gastrointestinal, entre outros (Brito & Cordeiro 2016, ^bCalvet *et al.* 2016, Galán-Huerta *et al.* 2016, Moore *et al.* 2017, Musso & Gubler 2016, Peerson & Diamond 2018, Song *et al.* 2017, Yopez *et al.* 2017). O período de incubação em humanos, transmissão via vetor, ocorre em torno de 3 a 14 dias (Krow-Lucal *et al.* 2017) e com sintomas similares á DENV e CHIKV Para os meios de transmissão sexual e materno-feto o período de incubação pode ser diferente. Além disso, em grávidas a resposta imunológica ao ZIKV pode ser diferente no período de gestação. Os sintomáticos representam em torno de vinte por cento da população infectada (Musso & Gluber 2016).

Nos três primeiros dias, ou seja, entre a picada do mosquito até o aparecimento dos sintomas quando do **período latente** da infecção. Nessa fase não há o

diagnóstico clínico e o sistema imunológico se torna ativo, com a produção de anticorpos do tipo imunoglobulina M (IgM) contra antígenos virais. Nessa fase é possível a detecção do vírus por métodos moleculares, *ex vivo* (cultura de células) e *in vivo* (experimentação animal). Entre o terceiro dia até o décimo quarto dia, os indivíduos infectados podem apresentar sintomas tornando possível o diagnóstico clínico, o sorológico e os métodos laboratoriais apresentados anteriores podem ser aplicados. Essa é a fase do **período sintomático ou virêmico** com cerca de 7 a 10 a viremia atinge o ponto máximo na geração de partículas virais. Nesse intervalo vírions infecciosos passam a circular na corrente sanguínea, sendo capaz infectar novos vetores e hospedeiros.

O ZIKV tem tropismo por células do sistema nervoso central e periférico, epiteliais, sistema reprodutor masculino e feminino e células do sistema imune. Da família TAM, o receptor AXL apresenta alta atividade nessas células e são potenciais receptores virais (Liu *et al.* 2016, Meertens *et al.* 2016, Nowakowski *et al.* 2016,), portanto, um importante candidato como receptor viral. Estudos mostraram que apesar de sua alta expressão em células neurais como astrócitos e microglia (Meertens *et al.* 2016) e endoteliais como as da barreira hematoencefálica (Liu *et al.* 2016), ao ocorrer a inibição de AXL há uma drástica redução de infecção pelo ZIKV. Por outro lado, Hasting e colaboradores (2017) demonstraram que apesar da expressão dos receptores da família TAM em diferentes tipos celulares como as células progenitoras neural, células endoteliais do feto, células trofoblásticas da placenta, macrófagos Hofbauer e células escamosas a entrada do ZIKV – em tais células não há necessidade de haver receptores da família TAM na rota de transmissão do vírus, pois a infecção ocorre do mesmo jeito. Porém, em células *ex vivo* de humanos que expressam AXL há redução da replicação viral.

Wells *et al.* (2016) corroboram com os resultados de Hasting e apresenta a hipótese de que a variação do tropismo pode ser explicada pela expressão diferenciada dos perfis TYRO3-AXL-MERTK que podem ser fatores de ligação de ZIKV. No modelo animal os receptores TAM divergem em relação aos humanos, esses se mostraram pouco necessários ou mesmo não requeridos para replicação durante a replicação do vírus. Por fim, existem outros candidatos para mediar à infecção por ZIKV são as lectinas tipo C (DC-SIGN), receptores fosfatidilserina, imunoglobulinas T, domínio muncin (TIM) (Hating *et al.* 2017).

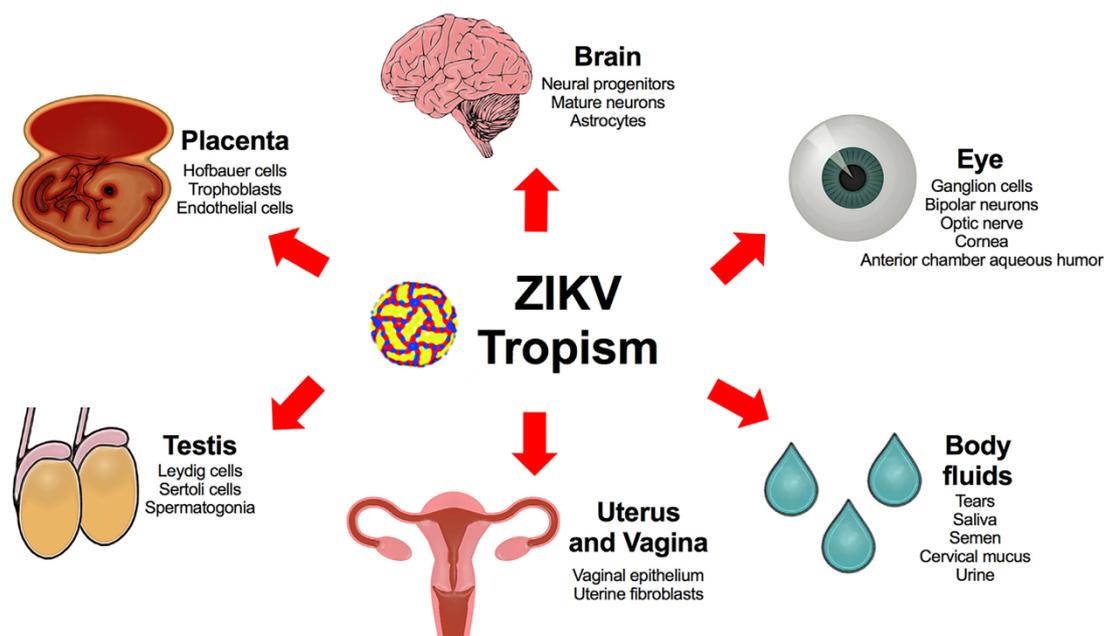
1.5. Tropismo do Vírus no Hospedeiro

O tropismo do vírus ZIKV como segue o modelo descrito para DENV (Neal 2010, Guzman *et al.* 2016, Levinson 2016, Tabata *et al.* 2016, Laureti *et al.* 2018). A transmissão do vírus para o hospedeiro inicia-se com a picada do vetor na epiderme ou direto na corrente sanguínea. ZIKV infecta os queratinócitos e células de Langerhans (células dendrítica do sistema imune) presente na pele. Uma vez que as células dendríticas estão infectadas, essas movem-se até o linfonodo e apresentam o antígeno viral de superfície para monócitos e macrófagos, ou seja, ativa a Resposta Imune Inata no hospedeiro. Porém, tais células ao invés de reconhecer e destruir as partículas virais e células infectadas, elas também se tornam infectadas e passam a replicar o vírus. Desse modo, a infecção espalha-se por todo o organismo através de outros linfonodos, além da medula óssea, baço e corrente sanguínea.

Uma vez na corrente sanguínea, o ZIKV pode infectar os demais tecidos susceptíveis ao vírus, como por exemplo o Sistema Nervoso e Reprodutor masculino e feminino (Figura 6). Devido a alta quantidade de partículas virais circulantes no sangue, o hospedeiro entra em estado virêmico. As células infectadas produzem e liberam interferons, em resposta à infecção. Os interferons são proteínas pertencentes ao grupo das citocinas e interferem na replicação viral e ativam o Sistema Imune Inato e Adaptativo. Eles também ajudam o Sistema Imune a reconhecer células infectadas e proteger as não infectadas. A febre é uma reação fisiológica em resposta à infecção viral.

A resposta adaptativa é ativada ao mesmo tempo em que a resposta inata, porém leva mais tempo para entrar em atividade. Os linfócitos B produzem anticorpos específicos aos antígenos virais, são as imunoglobulinas IgM e IgG. Essas células tem por principal função produzir anticorpos específicos que interagem com os antígenos virais com as células infectadas por vírus. E os linfócitos citotóxicos T reconhece e elimina células infectadas pelo vírus. Durante o curso da infecção, a resposta Inata e Adaptativa está ativa. A resposta Inata ativa o sistema complemento, resposta que ajuda anticorpos e leucócitos a eliminarem os vírus do organismo. A ação conjunta do Sistema Imune Inato e Adaptativo neutralizar a infecção e consequentemente leva a recuperação o enfermo.

Figura 6. Tropismo celular de *Zika virus*. Os tipos celulares presentes no Sistema Nervoso e Reprodutor em que o vírus pode ser replicar fora testado em modelos *ex vivo*, *in vivo* e verificado em amostras biológicas humanas. ZIKV infecta células placentárias como as células de Hofbauer (*ex vivo* e explante placentário humano), trofoblastos (camundongos, primatas não humanos, humanos), células endoteliais (explante placentário humano, tecido placentário de ratos). Nas células neurais como progenitoras neurais e neurônios maduros (camundongos, primatas não humanos e humanos), astrócitos humanos (*ex vivo*). Dos tecidos oculares como córnea, retina neurosensorial e nervo óptico (camundongos), humor aquoso da câmara anterior (humanos). Células do sistema reprodutivo, espermatogônias, células de Sertoli, células de Leydig (camundongo), espermatozoides (camundongo e humanos), epitélio vaginal (camundongos) e fibroblastos uterinos (camundongo e humano). O tropismo do ZIKV resulta na detecção do vírus em diferentes fluidos corporais como lágrimas (ratos e humanos), saliva (primatas não humanos e humanos), sêmen (camundongos, primatas não humanos e humanos), muco cervical (humanos), lavagem vaginal (camundongo e humano), urina (primata não humanos, humano), sangue (primata não humanos, humano) (Miner & Diamond 2017).



1.6. Tropismo Placentário do *Zika virus*

O *Zika virus* é um arbovírus neuroinvasivo que infecta células hepáticas e células dos Sistemas Nervosos Central e Periférico, Reprodutor, Imune e Tegumentar. Nos fetos e recém-nascidos causam síndromes congênitas neurais, e em adultos e raramente em crianças a Síndrome de Guillain-Barré e independe do sexo (Musso & Guble 2016). A transmissão não vetorial do ZIKV foi descrita anteriormente. A via de infecção viral materno-fetal através do útero revela que este órgão é alvo de inúmeras

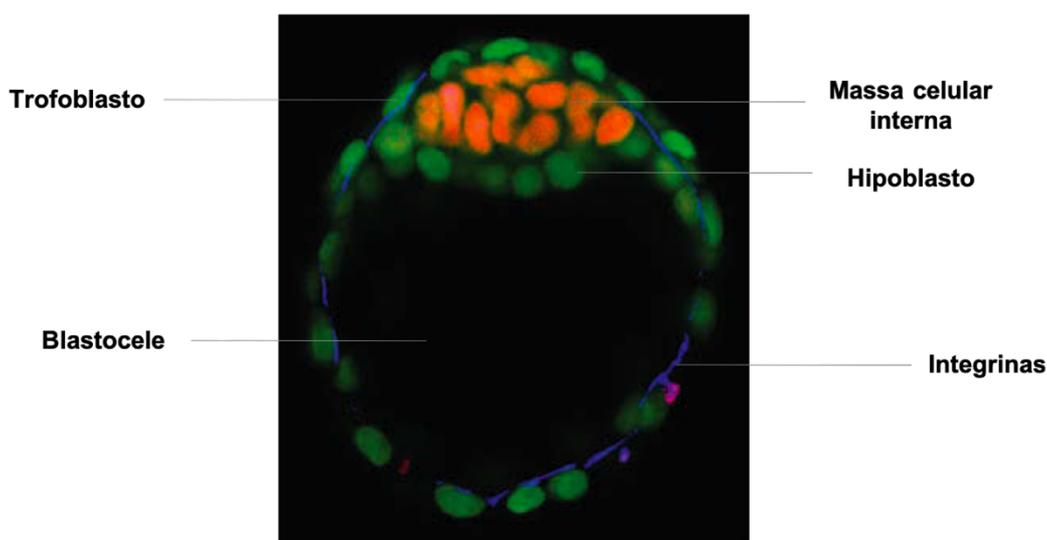
infecções virais diretas ou contínuas. O vírion pode infectar o útero através das células placentárias ou por transporte celular. Uma vez transposta essa barreira o embrião/feto torna-se vulnerável a infecção viral (Quicke *et al.* 2016).

A placenta é um órgão especializado formado durante a implantação do blastocisto no útero no sexto dia após a fecundação. Tem por função conferir proteção, nutrição e trocas gasosas durante todo o período gestacional. Dentre a função de proteção ao embrião/feto, ela é uma barreira primária eficiente materno-fetal contra microrganismos como os vírus e promove a passagem de anticorpos contra os mesmos durante a gravidez. As fases gestacionais são divididas em três etapas. O **primeiro trimestre** dura da primeira à décima terceira semana. O **segundo trimestre** estendo da décima quarta até vigésima semana. Por fim, o **terceiro trimestre** da vigésima oitava à quadragésima segunda semana.

Após a fecundação e os primeiros estágios de divisão celular, ou seja, clivagem do zigoto até o estágio de mórula, as células são denominadas de blastocistos indiferenciados, ou seja, totipotentes. Durante o estágio de mórula, inicia-se o primeiro processo de diferenciação celular que culmina na formação da **blástula** e a diferenciação em dois tipos de blastocistos: **células trofoblásticas e embrioblásticas**. No estágio de blástula as células são pluripotentes. A primeira diferenciação em células **citotrofoblasto** (CTB) – camada externa do blastocisto composto de células mononucleares de alta atividade mitótica da qual formam os **sinciotrofoblasto** (STB) – camada externa ao CTB de célula multinuclear e invasivas do epitélio endometrial e tecido conjuntivo do útero materno, local de implantação do blastocisto. Ambas as células originam os tecidos do anexo embrionários como cavidade amniótica, âmnio, vesícula umbilical, pedículo de conexão e saco coriônico durante o desenvolvimento gestacional no primeiro trimestre de gravidez. Além de produzir hormônios para manutenção da gestação, acúmulo de glicogênio e lipídeos, angiogênese (Figura 7).

Figura 7. Blastocistos de camundongo. Células marcadas com fluoróforo. As células verdes são trofoblastos e hipoblastos não diferenciados, em laranja é a massa celular interna (célula tronco embrionária) e a marcação em azul são integrinas, proteínas de adesão. Nessa fase do desenvolvimento embrionário ocorreu a primeira diferenciação celular e todas as células passam a ser pluripotentes. A cavidade do blastocisto, blastocele, está preenchida por líquido. Das células

trofoblásticas diferenciarão nas células dos tecidos extraembrionários e a massa celular interna o embrião (Gilbert & Barresi 2016).



Embrioblasto é o conjunto de células internas e polarizadas em um dos polos embrionários do blastocisto da qual origina o disco embrionário bilaminar composto pelo hipoblasto (endoderme extraembriônica) e epiblasto (embrião e ectoderme amniótica). Do epiblasto originam os três folhetos embrionários: endoderme, mesoderme e ectoderme. A definição dos sistemas no embrião e dos anexos extraembrionários ocorrem no primeiro trimestre da gestação. No segundo e terceiro trimestre desse o seu desenvolvimento.

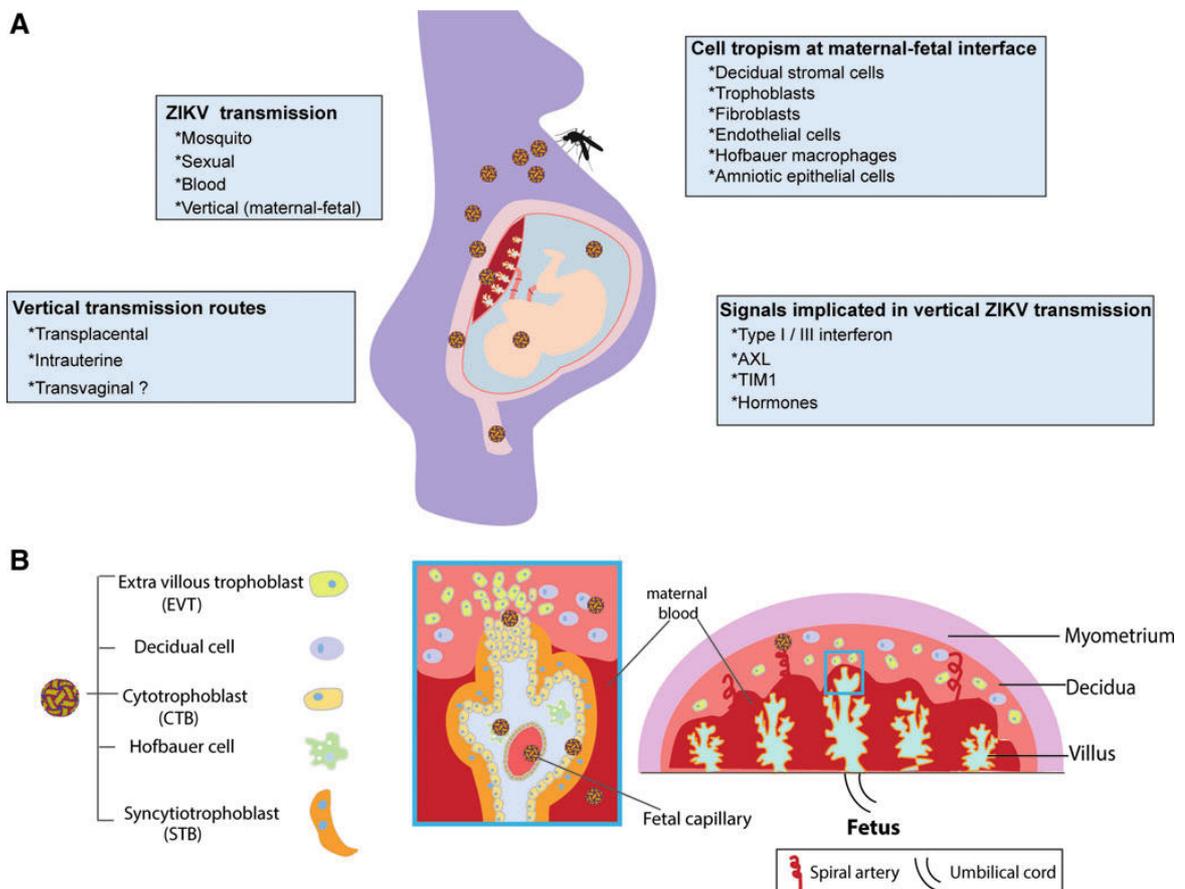
O sinciciotrofoblasto são células altamente resistentes à infecção por diversos patógenos como alguns vírus como *Herpes simplex virus 1* (HSV1), Citomegalovirus humano (HCMV), entre outros. STB da primeira fase gestacional são potencialmente resistentes a diferentes viroses. Diferentemente do citotrofoblasto e demais células são susceptíveis, ou seja antígenos virais reconhecem os receptores celulares (Sheridan *et al.* 2016, Arora *et al.* 2017), como macrófagos (células de Hofbauer), trofoblastos, células diferenciadas dos anexos embrionário (Tabata *et al.* 2016, Quicke *et al.* 2016, Sheridan *et al.* 2016, Arora *et al.* 2017, León-Juárez *et al.* 2017). Outro fator de vulnerabilidade gestacional no primeiro trimestre é que a IgG materna passa a barreira placentária para o feto a partir do segundo trimestre, quando a placenta está desenvolvida (Simister 2003, Sheridan *et al.* 2016).

Os mecanismos de transmissão do ZIKV via placenta ainda são pouco conhecidos e com algumas hipóteses (Figura 8). Porém, baseado nos estudos em

virose de transmissão via placenta e nas evidências do tropismo celular de ZIKV, as células trofoblásticas quando diferenciadas em STB e CTB podem sustentar a infecção viral no primeiro trimestre gestacional e manter a infecção até a origem dos folhetos embrionários e a neurogênese (Abidi *et al.* 2016, Arora *et al.* 2016, El Costa *et al.* 2016, León-Juárez *et al.* 2016, Meaney-Delman *et al.* 2016, Quicke *et al.* 2016, Suy *et al.* 2016, Tabata *et al.* 2016, Sheridan *et al.* 2017).

A linhagem africana não apresentou indícios de complicações neurológicas e de transmissão materno-fetal durante as epidemias registradas na literatura. Por outro lado, a linhagem asiático-brasileira mostrou-se capaz de infectar fetos durante a gestação e ser um agente neurotrópico. Desse modo, para entender os mecanismos de infecção através da barreira placentária ainda pouco conhecidos, no presente estudo, pretende-se estudar a infectividade comparativa entre as linhagens Africana e Asiático-Brasileira de *Zika virus* em células placentárias humanas BeWo e HTR-8/SVneo.

Figura 8. Patogênese da infecção por *Zika virus* durante a gestação. O item A representa a rota de transmissão e o tropismo na gravidez. A via de transmissão pode ser por vetor (mosquito), sexual, sangue (blood) e vertical (maternal-fetal). A transmissão vertical materno-fetal pode ser transplacentária, intrauterino (intrauterine) ou transvaginal (?). O tropismo celular entre mãe e embrião/feto podem infectar as células do estroma decidual, trofoblastos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos de Hofbauer, células epiteliais amnióticas. O item B apresenta as estruturas placentárias humanas e os possíveis pontos de infecção. As vilosidades coriônicas derivadas do feto (quadrado azul) são projeções na forma de árvore e revestidas por duas camadas de trofoblastos e banhadas por sangue materno. Os trofoblastos vilosos diferenciam-se em citotrofoblastos (CTB), e esses em sincitiotrofoblastos (STB). CTB são altamente proliferativos e formam uma monocamada de células polarizadas que se diferenciam em STB por fusão célula-célula. A superfície de STB é coberta por uma densa rede de microvilos ramificadas recobertos por sangue materno, medeiam nutrientes e trocas gasosas entre a mãe e o feto. Os macrófagos de Hofbauer, derivados do feto, são encontrados nos espaços intervileos. Um subconjunto de trofoblastos, denominados e trofoblastos extra-vilosos (TEV), migram das vilosidades coriônicas, invadem a parede uterina e remodelam artérias espirais maternas que facilitam o suprimento sanguíneo da placenta. O compartimento decidual também inclui células imunes maternas (macrófagos deciduais, células deciduais “natural killer”) e células estromais (Cao *et al.* 2017).



2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterização do ciclo de replicação viral em células placentárias inoculadas com as linhagens Africana e Asiático-Brasileira de *Zika vírus*.

2.2. Objetivos Específicos

- Formação de estoques virais e celulares;
- Quantificação por titulação dos estoques virais;
- Determinação da curva padrão por qRT-PCR a partir do título viral;
- Cinética viral
- Quantificação da cinética viral baseada na curva padrão titulada;
- Construção da curva de crescimento viral por hora após infecção.

2.3. Desenho Experimental

A determinação da dinâmica do crescimento viral em células placentárias exige a preparação e manutenção dos estoques virais e culturas celulares para então acompanhar a evolução da infecção e conhecer seu padrão de curva de crescimento.

2.3.1. Linhagens de *Zika vírus*

A escolha dos isolados de *Zika vírus* (ZIKV), um oriundo da África, ZIKV-MR766bp (baixa passagem) e o outro Brasileiro-Asiático, ZIKV-IEC-Paraíba advém do fato de que o segundo isolado apresenta evidências de ser capaz de transpor a barreira placentária e ser neurotrópico e o primeiro sem esse tropismo relatado.

ZIKV-IEC-Paraíba (GenBank: KX2800260). E na cepa do vírus que foi isolado em um paciente na Paraíba clinicamente diagnosticado com ZIKV no surto de 2015. Em amostras foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Pedro Vasconcelos do Instituto Evandro Chagas de Belém, Pará.

ZIKV-MR766bp (GenBank: KX421193). Essa cepa viral de baixa passagem isolada da *Macaca mulatta* em 1947 na Floresta de Ziika, em Uganda, por técnicos da Fundação Rockefeller durante um longo projeto de pesquisa sobre Febre Amarela na África. As amostras foram doadas gentilmente por Amadou A Sall do Instituto Pasteur de Dakar, Senegal.

Os cultivos dos vírus foram realizados em células Vero (ATCC®) em três etapas a fim de aumentar o número de partículas virais infectantes. A primeira consiste cultivá-los em tubos cilíndricos plásticos contendo 1mL de cultura celular. A segunda em garrafas plásticas T25 com volumes entre 5-7 mL. E por fim, em garrafas de plástico T75 com volumes entre 15-20 mL. Em todas as etapas o sobrenadante e o debris celular foram coletados conjuntamente e armazenados em criotubos, no congelador -80°C e em nitrogênio líquido. A titulação por unidade formadora de placas (PFU/mL) foi a metodologia usada para a determinação do número de partículas virais infectantes. Somente na terceira etapa foi estimado o número de vírions por mL. De acordo com o manual BMBL5 (CDC/NIH) o ZIKV é classificado para manuseio em laboratório no nível de biossegurança 2. Os estoques também foram testados para micoplasma para evitar interferência de outros microorganismos no sistema de estudo.

2.3.2. Titulação Viral

Os valores de concentração de titulação viral foram determinados por Unidades Formadoras de Placa por mL (PFU/mL). Abaixo segue a fórmula para sua determinação.

$$\text{PFU/mL} = \frac{\frac{\text{total de placas do poço 1} + \text{total de placas do poço 2}}{2}}{\text{volume de inóculo usado por poço}} \times \text{fator de diluição}$$

Em uma placa de 24 poços cultiva-se células Vero até atingir a confluência entre 80-90% e contração entre 1.10^5 a 2.10^5 células por mL. As células foram armazenadas em estufa de CO₂ à 5% com temperatura de 37°C. Uma vez a placa pronta, realizou-se uma diluição seriada de 1/10 (1 do vírus : 9 de meio) com dez diluições seguidas com volume final de 200 µL a partir do estoque viral mais meio e inocula-se os poços em duplicata na placa de 24 poços com as amostras fracionadas de 10^{-1} a 10^{-10} por poço com o volume final. Sendo que há dois poços para controle positivo e outro negativo. As placas são mantidas na estufa por no máximo duas

horas, lavar os poços com PBS e completar o volume com CMC 3,2% mais SBF à 10%. Volume final de 1 mL. As placas ficam mantidas em estufa por 4 a 6 dias para visualização das placas virais.

2.3.3. Culturas Celulares

As células usadas para propagação, manutenção e experimentação com os vírus seguiram as recomendações descritas pela ATCC® (American Type Culture Collection) e JCRB Cell Bank® (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank), com adaptações. Todas as culturas foram testadas para micoplasma de acordo com Timenetsky *et al.* 2006. O teste para micoplasma por Nested PCR para *Mollicutes* foi realizado no Laboratório de Bactérias Oportunistas do Prof. Dr. Jorge Timenetsky. E para avaliar a possibilidade de contaminação por ácidos nucleicos de ZIKV e outros vírus presente no laboratório usou iniciadores específicos de qRT-PCR.

A determinação da concentração celular por mL, necessária para determinação da Multiplicidade de Infecção (MOI) realizou-se por contagem de células na câmara de Neubauer pela equação:

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{número de células contadas}}{\text{total de quadrantes contados}} \times \text{fator de correção}^* \times 10.000$$

$$*\text{fator de correção} = \frac{\text{volume em mL de cultura de células}}{\text{volume em mL de cultura de células} + \text{volume em mL de corante}}$$

2.3.4. Caracterização das células

Tabela 2 descreve os tipos de células usada no cultivo de vírus e na cinética viral. Em resumo, para a manutenção e propagação das células usou-se meio de cultura apropriado (indicação segue o descrito no ATCC® e JCRB®) para cada tipo celular com 10% SBF à temperatura de 37°C em estufa com 5% de CO₂. O repique foi realizado com intervalo de três a quatro dias ou dependendo da velocidade de crescimento das células. Usou-se tripsina-EDTA para remoção do tapete de células, com exceção de C6/36 que remove as células do tapete por agitação mecânica.

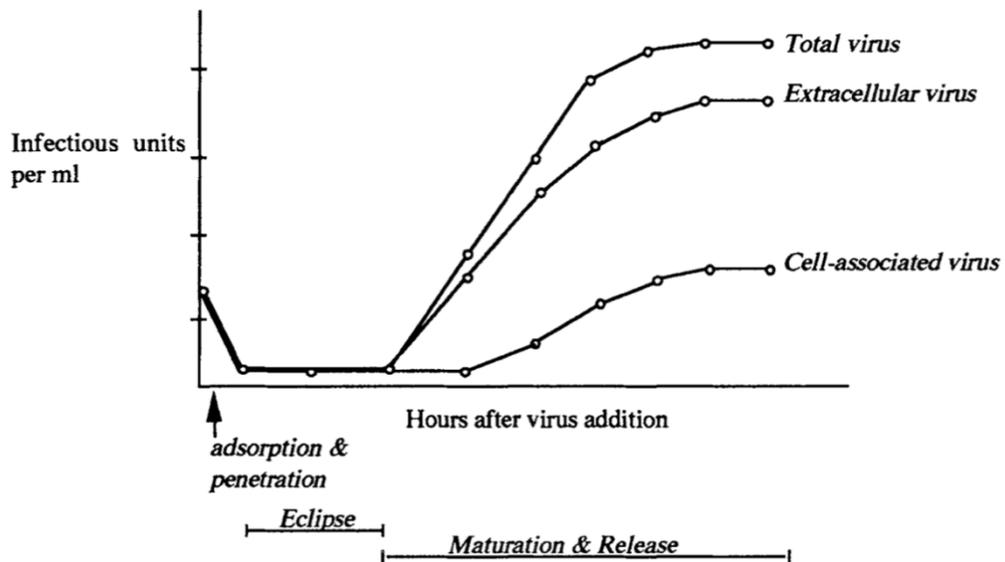
Tabela 2. Descrição geral das células mantidas em cultura.

Célula	Descrição	Morfologia	Origem	Biossegurança	Uso
Vero	Epitélio de rim do <i>Cercopithecus aethiops</i>	Epitelial	ATCC®	NB1	Propagação e titulação de vírus
C6/36	Larva do mosquito <i>Aedes albopictus</i>	Tipo fibroblasto	ATCC®	NB1	Propagação e titulação de vírus
BeWo	Coriocarcinoma de tecido placentário de <i>Homo sapiens</i> , de morfologia epitelial	Epitelial	ATCC®	NB1	Modelo experimental <i>ex vivo</i> na descrição da dinâmica viral
HTR-8/SVneo	Trofoblastos placentários de <i>Homo sapiens</i>	Tipo epitelial	ATCC®	NB2	Modelo experimental <i>ex vivo</i> na descrição da dinâmica viral
HuH-7	Hepato carcinoma de <i>Homo sapiens</i>	Tipo epitelial	JCRB Cell Bank®	NB1	Modelo experimental <i>ex vivo</i> na descrição da dinâmica viral em células não placentárias e sabidamente de tropismo do ZIKV

2.3.5. Cinética Viral

A cinética viral foi baseada nos experimentos de Hamel *et al.* 2015; Hadjichrysanthou *et al.* 2016; e Offerdahl *et al.* 2017 e no modelo de curva dinâmica de crescimento viral, Figura 9.

Figura 9. Modelo da representação gráfica das fases do ciclo de replicação para vírus envelopado pode ser representado pelo título no eixo da ordenada (infectious units per mL) por horas após infecção (hours after vírus addition) no eixo da abscissa. No eixo X pode-se observar as fases do ciclo de replicação viral: adsorção e penetração que compreende a eclipse; seguida da maturação e liberação. As curvas que representam a quantidade de vírions detectado por ponto no tempo intracelular (cell-associated vírus), extracelular (extracelular vírus) e a somatória de ambos (total vírus) (Burlison *et al.* 1992).



O MOI é determinado a partir das informações prévias: distribuição de Poisson, titulação por PFU/mL e concentração de células. Para ZIKV-MR766bp determinou MOI=1 e para ZIKV-IEC-Paraíba MOI=0,5. A concentração de células para placas de seis poços foi em média de $1,5 \times 10^6$ células/mL. Os estoques virais de aproximadamente ZIKV-MR766bp $1,7 \times 10^8$ PFU/mL e ZIKV-IEC-Paraíba de $1,5 \times 10^6$ PFU/mL. Equação do MOI:

$$\text{MOI} = \frac{\text{volume de inóculo por poço} \times \text{PFU/mL}}{\text{volume final por poço} \times \text{células/mL}}$$

A determinação das horas-pós-infecção (hpi) foi de 2h após o tempo de adsorção do vírus na estufa à 37°C e 5% de CO₂. Esse tempo marca o tempo zero de infecção. Seguido de 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h.

As células foram cultivadas, em placas de 6 poços, 24h antes de iniciar o experimento. Após esse período realizou-se a contagem de células para verificar se atingiram a concentração desejada e o tapete com confluência entre 80 - 90%. Caso contrario, foram mantidas na estufa até atingir a confluência desejada. O cultivo segue as recomendações apresentadas no protocolo do ATCC®. Antes de iniciar o experimento as células foram testadas para presença de micoplasma. Para evitar interferências, as culturas celulares e estoques virais foram mantidos sem antibióticos, antifúngicos, e não utilizou tripsina para coleta das amostras durante o experimento. Todas as hpi foram feitas em triplicatas. Os cultivos das células foram realizados em placas de seis poços com 2 mL de cultura de células. A preparação das células realizou-se com meio apropriado e 10% SBF. Após a inoculação, as culturas do meio foram mantidas com 2% de SBF.

BeWo são células corocarcinomas fusiogênicas, ou seja, formam sincício. A forskolina é um componente químico derivado da planta *Coleus forskohlii*. Esse composto promove na BeWo a formação de sincício, secreção de HCG (gonadotrofina coriônica humana), além de promover sua diferenciação morfológica e bioquímica. Há o decaimento da viabilidade celular e proliferação de células na presença de forskolina. O composto tem por principal resultado o aumento da concentração do AMP cíclico (cAMP), através da via ativa adenilato ciclase (enzima amplificadora). De modo a gerar diversos efeito biológicos intracelulares.

Devido a essas propriedades, a cinética viral para BeWo é testada na cultura celular com e sem a presença da forskolina. O protocolo de tratamento das células com forskolina fora gentilmente cedido pela Profa. Dra. Estela M. A. F. Bevilacqua do Laboratório de Estudos da Interação Materno-Fetal e Placenta, ICB-USP. A partir de uma solução estoque diluída em 1 mL DMSO (veículo) mais 4,105 mg. A solução estoque na concentração de 10 mM. Dessa solução obtêve-se a solução de uso com 10 µM ou 0,2% de DMSO. Após a inoculação de 24h das células BeWo foram cultivadas na placa de seis poços, sendo adicionado por poço 1 µL da solução de uso por mL de meio cultura suplementado com SBF à 10%. Lavou-se as células com PBS

e o meio foi trocado para obter melhora a atividade da forskolina. Retornou para estufa e manteve por 48h para iniciar o experimento de cinética como descrito abaixo.

A inoculação das células foi realizada de acordo com MOI determinado a partir do estoque viral. Inoculou-se as células e as mantiveram por 2h (adsorção) na estufa com CO₂ à 5% e a temperatura de 37°C. Após esse período lavou-se as células com PBS para retirada dos debris celulares e víriões suspensos, e completou-se com meio apropriado para cada tipo celular e com 2% de SBF. No tempo zero (2h) coletam-se as amostras e os demais hpi retornaram à estufa para serem coletados nos seus respectivos tempos. Durante o experimento coletou-se separadamente o sobrenadante (meio extracelular) das culturas celulares (meio intracelular). As amostras para cada hpi são armazenadas em microtubos de 1,5 ou 2 mL. Imediatamente foram anotados todos os dados necessários para identificação e os tubos armazenados no congelador a temperatura de -80°C.

2.3.6. Biologia Molecular

A detecção e quantificação da quantidade de RNA viral presente em cada hpi foi realizado através da qRT-PCR. E sua transformação em PFU/mL por meio da construção da curva padrão baseada na titulação apresentada anteriormente. Analisou-se a integridade do RNA extraído no Bioanalyzer, ao comparar a taxa entre a quantidade de RNA ribossomal 28S e 18S.

A extração de RNA total das amostras segue o protocolo padrão do reagente TRIzol[®] da Ambion Life Technologies, com modificações. Uma vez extraído, as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro, NanoDrop[®] e normalizadas para um valor médio de concentração de RNA de 200 ng/μL.

A construção da **curva padrão** baseou-se no resultado da titulação e quantificação por RT-PCR de cada diluição seriada. Uma vez obtidos os resultados dos C_T de cada fração da diluição e do valor da titulação realiza-se os seguintes cálculos.

Diluição Seriada. São as frações de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ da diluição seriada da titulação. **Valor da Titulação.** Valor do título obtido a partir da diluição seriada em PFU/mL. Título médio obtido do resultado da titulação para cada isolado, o qual corresponde ao valor da titulação de 10⁻¹. Do 10⁻² em diante, corresponde a divisão

da diluição anterior por dez. **PFU Extraído**. Correção do valor do título em relação ao PFU obtido. Multiplica-se por 0,25 mL o Valor da Titulação, ou seja, a quantidade em mL de amostra usada na extração de RNA total. **PFU Amplificado**. Correção do valor do título em relação ao PFU Extraído. Multiplica-se os valores pela quantidade em mL de amostra usada na qRT-PCR, PFU Extraído e o volume diluição em mL do RNA extraído. Pela equação de diluição, obtém-se os valores de PFU Amplificado a partir do volume usado na qRT-PCR de 0,005 mL; do PFU Extraído; e o volume da diluição do RNA extraído em água DEPC de 0,05 mL. Equação: (volume em mL qRT-PCR) (PFU Extraído) = (volume em mL de RNA diluído da extração) (x PFU Amplificado). **Titulação Log₁₀**. Transformação dos valores obtidos no PFU Amplificado em Log na base dez.

A construção do gráfico para determinação da Curva Padrão através da **Equação da Reta** a partir de $f(x) = -ax+b$, tem na abcissa os valores das médias dos C_T obtidos da diluição seriada e na ordenada Titulação Log₁₀. O R^2 apresenta o quanto os valores da ordenada estão próximos da equação da reta, ou seja, próximos a 1.

A **qRT-PCR** seguem o protocolo padrão aplicado para todas as análises. Os iniciadores com sondas TaqMan[®] selecionados para experimentação estão descritos em Lanciotti *et al.* 2008, e são do gene do envelope. Iniciador senso ZIKV 835 (posição 835-857) de sequencia TTG GTC ATG ATA CTG CTG CTG ATT GC. E anti-senso ZIKV 911c (posição 911-890) de sequencia CCT TCC ACA AAG TCC CTA TTG C. Reagente do mix da qRT-PCR para volume final de uma reação de 15 µL: água DEPC 3,5 µL; tampão 5,0 µL; iniciadores senso e anti-senso 0,5 µL de cada; enzima 0,5 µL; e RNA extraído 5,0 µL. O kit de reação da qRT-PCR provém da Ag Path-ID one step da Ambion Life Technologies. O ciclo de reação “one step” da qRT-PCR segue: (i) um ciclo de 45°C por 10 min – transcriptase reversa. (ii) um ciclo de 95°C por 10 min; seguido de quarenta ciclos de 95°C por 15 segundos mais 60°C por 45 segundos – corresponde ao produto do cDNA.

Os valores de C_T de cada hpi foram transformados em PFU/mL, no qual, **PFU Log₁₀** as médias das triplicatas dos C_T para cada hpi corresponderam ao valor x da equação da reta obtida, de cada isolado de ZIKV, na curva padrão. **PFU anti-Log₁₀** corresponde aos valores em PFU/mL dos C_T . **PFU Extração**. Conversão de valor do PFU anti-Log₁₀ para PFU/0,25mL do RNA extraído. Pela equação de diluição, obtém-

se os valores de PFU Extração a partir do volume usado na qRT-PCR de 0,005 mL; do PFU anti-Log₁₀; e o volume da diluição do RNA extraído em água DEPC de 0,05 mL. Equação: (volume em mL qRT-PCR) (x PFU/0,25mL) = (volume em mL de RNA extraído) (antiLog₁₀ PFU). **PFU/mL**. Obtenção do PFU Extração em 1 mL de amostra. Por regra de três, obtém-se os valores de PFU Extração a partir do volume usado na extração de RNA da amostra de 0,25 mL; do PFU Extração; e o volume de 1 mL da amostra. Equação: (volume em mL de amostra para extração) (x PFU/mL) = (volume de 1 mL da amostra) (PFU/0,25mL). O gráfico contém na abcissa hpi e na ordenada PFU/mL.

2.3.7. Citopatia Intracelular da Infecção Viral

Com o intuito de observar a progressão intracelular da replicação viral realizou a padronização do ensaio de imunofluorescência indireta pelo método de Triagem de Alto Conteúdo ou High-content screening (HCS) em placas de 384 poços. A partir da diluição seriada na fração de 1 para 50 de células, concentração celular de 1×10^4 células/mL. A distribuição das células na placa deve ser o suficiente para formação da monocamada com cerca de 80% de confluência. A placa foi mantida na estufa à 37°C com 5% de CO₂ por 24h anterior a contagem de células.

A padronização do MOI para inoculação iniciou-se com diluição seriada do estoque viral como descrito anteriormente. A primeira coluna da placa na vertical foi o controle positivo com 750 µL de estoque viral. Da segunda coluna até vigésima terceira se a diluição seriada com o volume ajustado para 675 µL de meio próprio da célula e sem SBF e 7,5 µL do volume diluído do poço anterior. As placas foram fixadas com paraformaldeído, PFA, à 4% e após 30 minutos foram corados com os marcadores imunofluorescentes descritos a seguir. As leituras das placas foram realizadas no Operetta High-Content Imaging System da Pelkin Elmer®.

Marcadores com imunofluorescentes. DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) corante fluorescente que marcou o DNA nuclear. Dos anticorpos primários, D1-4G2-4-15 é um anticorpo monoclonal. Anticorpo policloal ZIKV gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis Tadeu Moraes Figueiredo do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. Como anticorpo secundário usou Alexa Fluor® 594 da Thermo Fisher Scientific.

3 | RESULTADOS

3.1. Resultados Gerais

Da dinâmica da cinética dos isolados de ZIKV-IEC/Paraíba e ZIKV-MR766 baixa passagem foi possível quantificar a quantidade de RNA viral detectada nos meios intra e extracelulares de cada hora-pós-infecção (hpi). As culturas de células foram BeWo, BeWo tratada com forskolina, HTR-8 e Huh-7. Desse modo, obteve-se ao final oito ensaios de cinética viral: **BeWo/ZIKV-IEC-Paraíba** e **BeWo com forskolina/ZIKV-IEC-Paraíba**; **BeWo/ZIKV-MR766bp** e **BeWo com forskolina/ZIKV-MR766bp**; **HTR-8/ZIKV-IEC-Paraíba** e **HTR-8/ZIKV-MR766bp**; e **Huh-7/ZIKV-IEC-Paraíba** e **Huh-7/ZIKV-MR766bp**. Ao considerar as triplicatas, no total obteve-se 208 amostras considerando todas as células inoculadas mais controles para cada hpi, dos meios intra e extracelular. A replicata 1, com quatro cinéticas, o RNA viral foi quantificado para todos os hpi, de 2h a 144h. O total de amostras foram 112. Para as réplicas 2 e 3, com oito cinéticas, a quantificação foi realizada somente para 24h, 48h e 72h. Ao considerar ambas as réplicas, obteve-se no total 96 amostras para as mesmas considerações descritas anteriormente.

3.2. Titulação dos Isolados Virais

ZIKV IEC-Paraíba e ZIKV MR766 baixa passagem. O cultivo do vírus, para formação do estoque viral, foi realizado em células Vero como descrito no Material e Métodos. Os valores do título resultantes foram $1,5 \times 10^6$ PFU/mL ZIKV-IEC-Paraíba e $1,68 \times 10^8$ PFU/mL para as três réplicas da cinética. A imagem 1 apresentam os resultados do efeito citopático observado em microscópio óptico invertido antes da coleta do vírus. E na figura 10 apresentam os resultados das placas de titulação.

Imagem 1. Resultado do efeito citopático do cultivo de ZIKV-IEC-Paraíba (B) e MR766 baixa passagem (C) para formação dos estoques virais em células Vero (ATCC®). Imagem A são células não inoculadas (controle negativo). As imagens B e C são células inoculadas com ZIKV-IEC/Paraíba e ZIKV-MR766bp, respectivamente. O primeiro após cinco dias de cultivo e segundo com seis dias. Ambos com 90% do tapete infectado. Imagem obtida do microscópio óptico de luz invertida com aumento de 20X (200 µm) para todas as amostras.

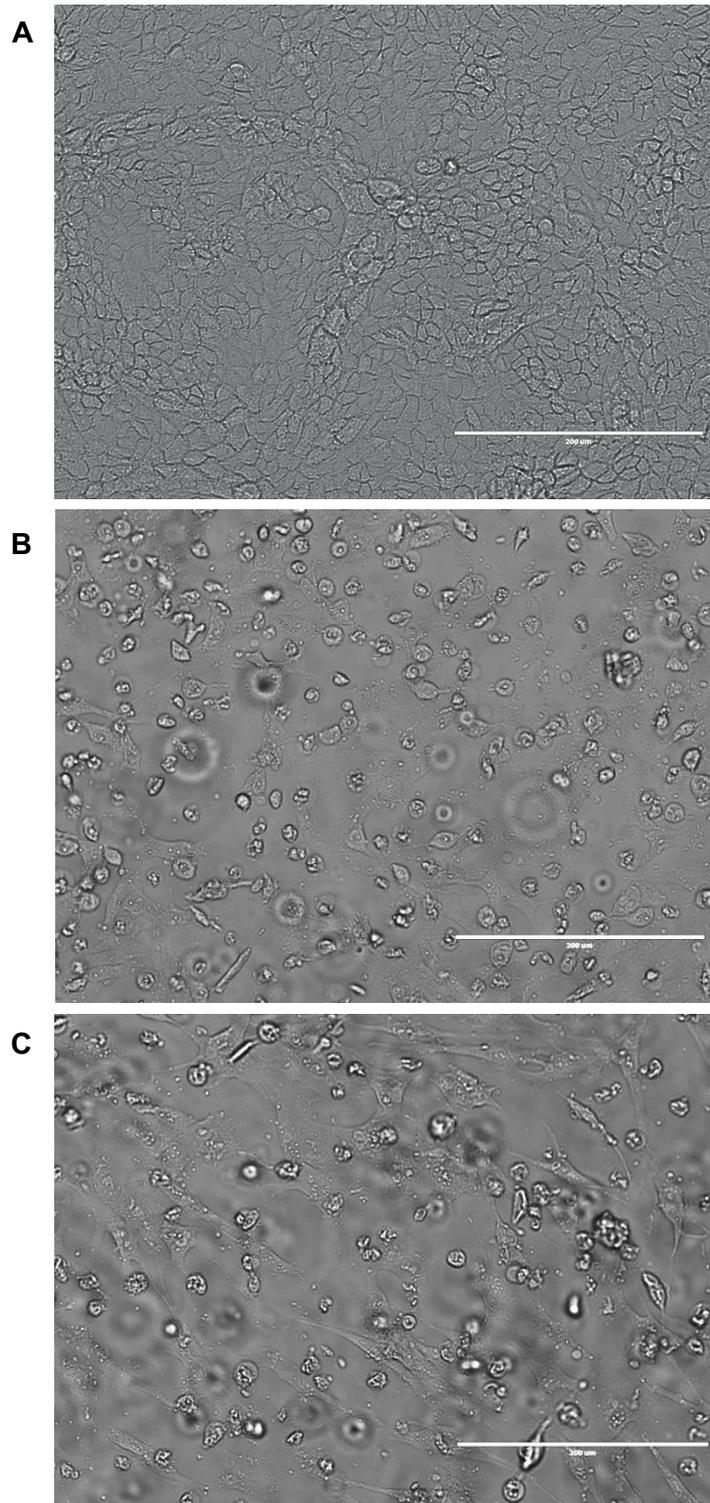
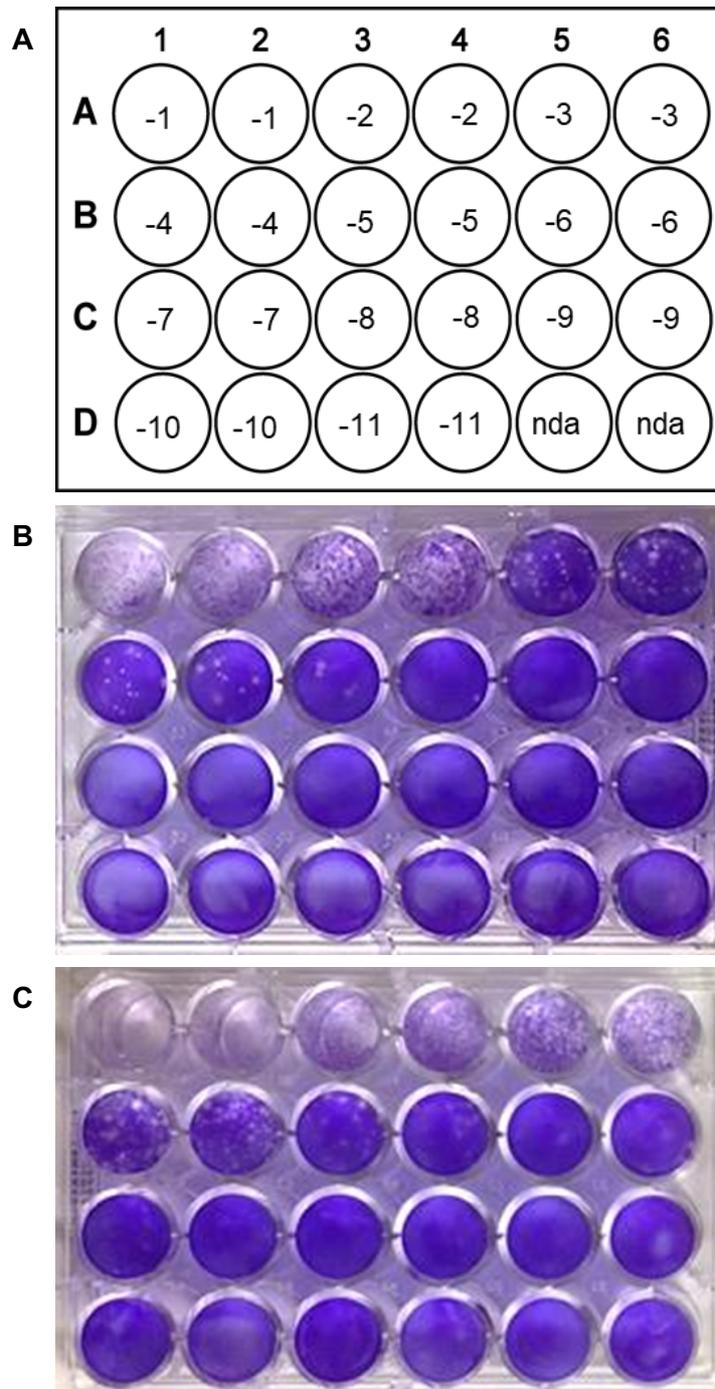


Figura 10. Resultado da formação de placas da titulação de ZIKV IEC-Paraíba (B) e MR766 baixa passagem (C). A figura (A) representa a distribuição da diluição seriada para quantificação do título. Os títulos foram obtidos em células Veras (ATCC®) inoculadas. As imagens B e C apresenta o título de a partir da contagem média do número da unidade de placas formadas nos poços 1B e 2B para imagem B e, 3B e 4B para imagem C. Os valores de títulos obtidos são $1,5 \times 10^8$ PFU/mL ZIKV-IEC-Paraíba (placa B) e $1,68 \times 10^8$ PFU/mL ZIKV-MR766bp (placa C).



3.3. Cinética Viral

Os ensaios de cinética foram realizados em triplicata. O efeito citopático observado para cada hpi pode ser visualizado na sequência de imagens das Figuras 13 a 20. A replicata 1 apresenta a curva de crescimento viral para todas hpi por PFU/mL, Figura 21. E a média da curva de crescimento para as três réplicas nos hpi de 24h, 48h e 72h, Figura 22. A quantidade de RNA viral presente extra e intracelular, descrita em C_T presente em todas as amostras em estudos estão no anexo. Para as réplicas dois e três quantificou por qRT-PCR somente os hpi de 24h, 48h e 72h.

As Imagens 2 a 9. Ensaio de cinética do ZIKV-IEC-Paraíba (1) e ZIKV-MR766bp (2) nas células HTR-8 (A) BeWo (B), BeWo tratada com forskolina (C) e Huh-7 (D). Horas-pós-infecção (hpi) de 24h, 48h e 72h. Primeira linha são os controles negativos e a segunda células inoculadas. ZIKV-IEC MOI = 0,5 e média de concentração celular para HTR-8 = $1,6 \times 10^6$ cel/mL, BeWo = $2,3 \times 10^6$ cel/mL, BeWo+forskolina = $1,7 \times 10^6$ cel/mL, HuH-7 = $0,32 \times 10^6$ cel/mL. ZIKV-MR766 MOI = 1 e média de concentração celular para HTR-8 = $1,7 \times 10^6$ cel/mL, BeWo = $3,14 \times 10^6$ cel/mL, BeWo+forskolina = $1,7 \times 10^6$ cel/mL, HuH-7 = $0,85 \times 10^6$ cel/mL. Concentração de forskolina é de $1 \mu\text{L/mL}$ de meio de cultura. Imagens com aumento de 20x ($200 \mu\text{M}$) no microscópio óptico de luz invertida EVOS fl da Thermo Fisher Scientific. As setas em vermelhos são indicações do efeito citopático.

Imagem 2_A1

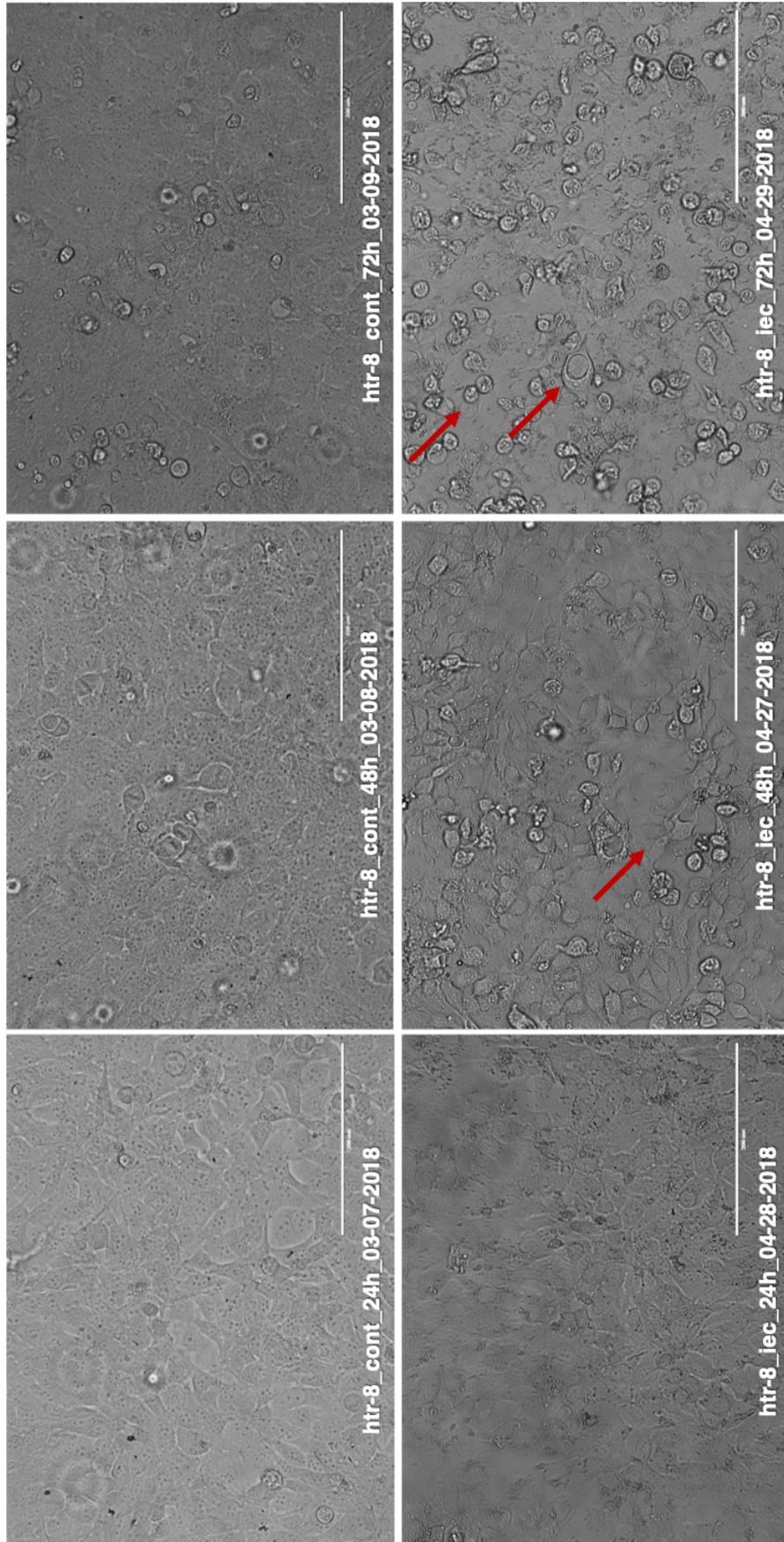


Imagem 3_B

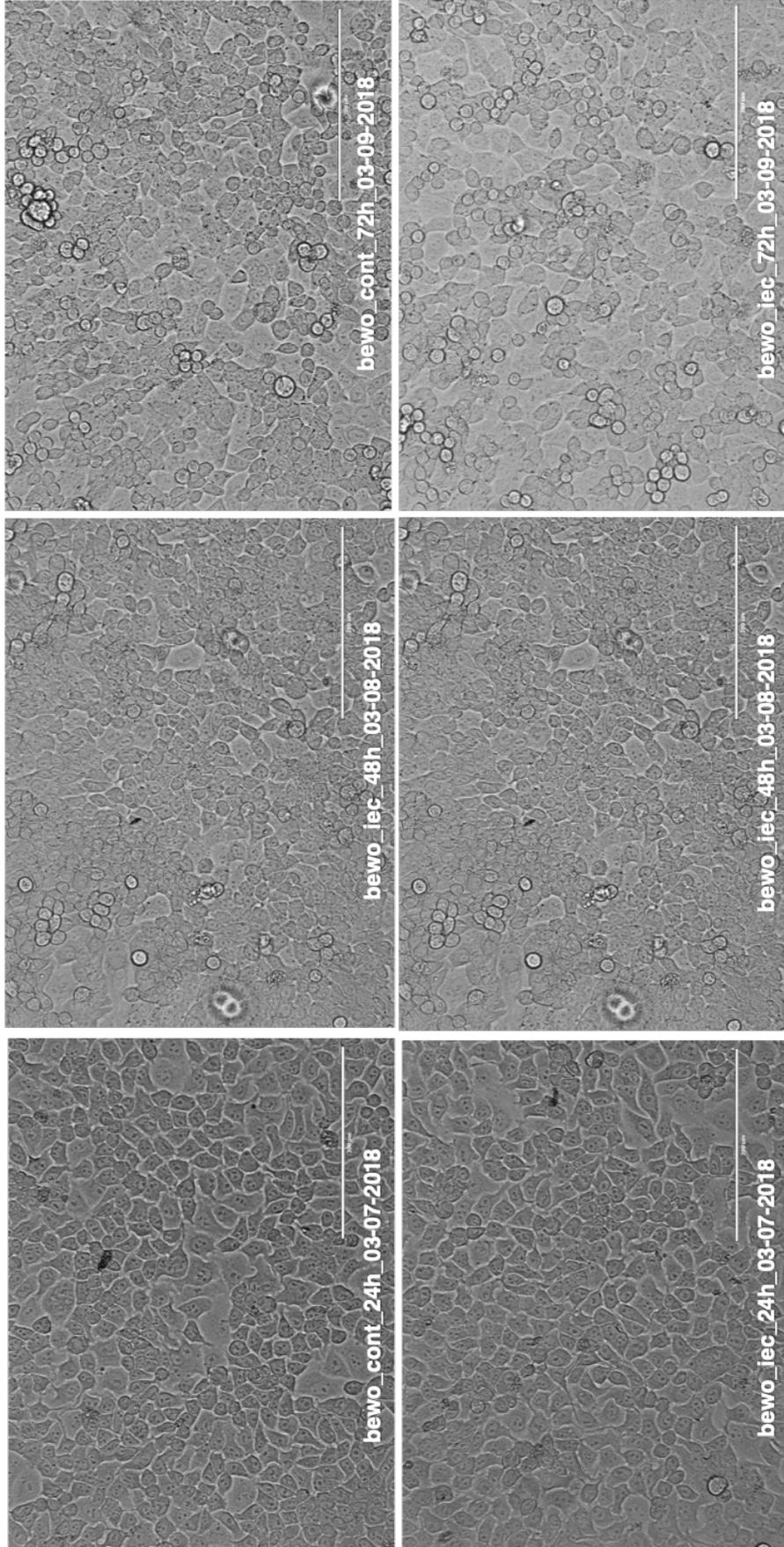


Imagem 4_C1

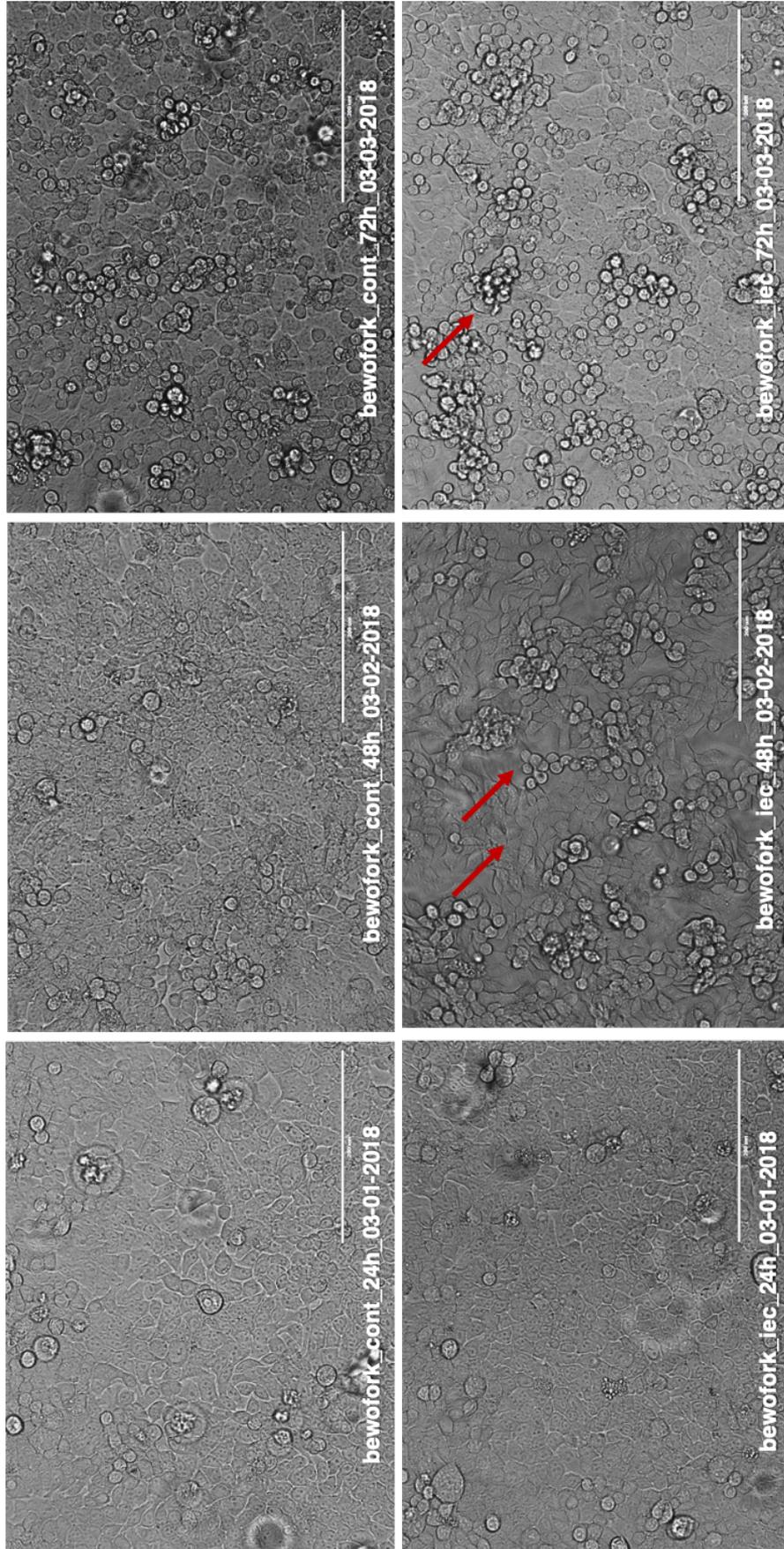


Imagem 5_D1

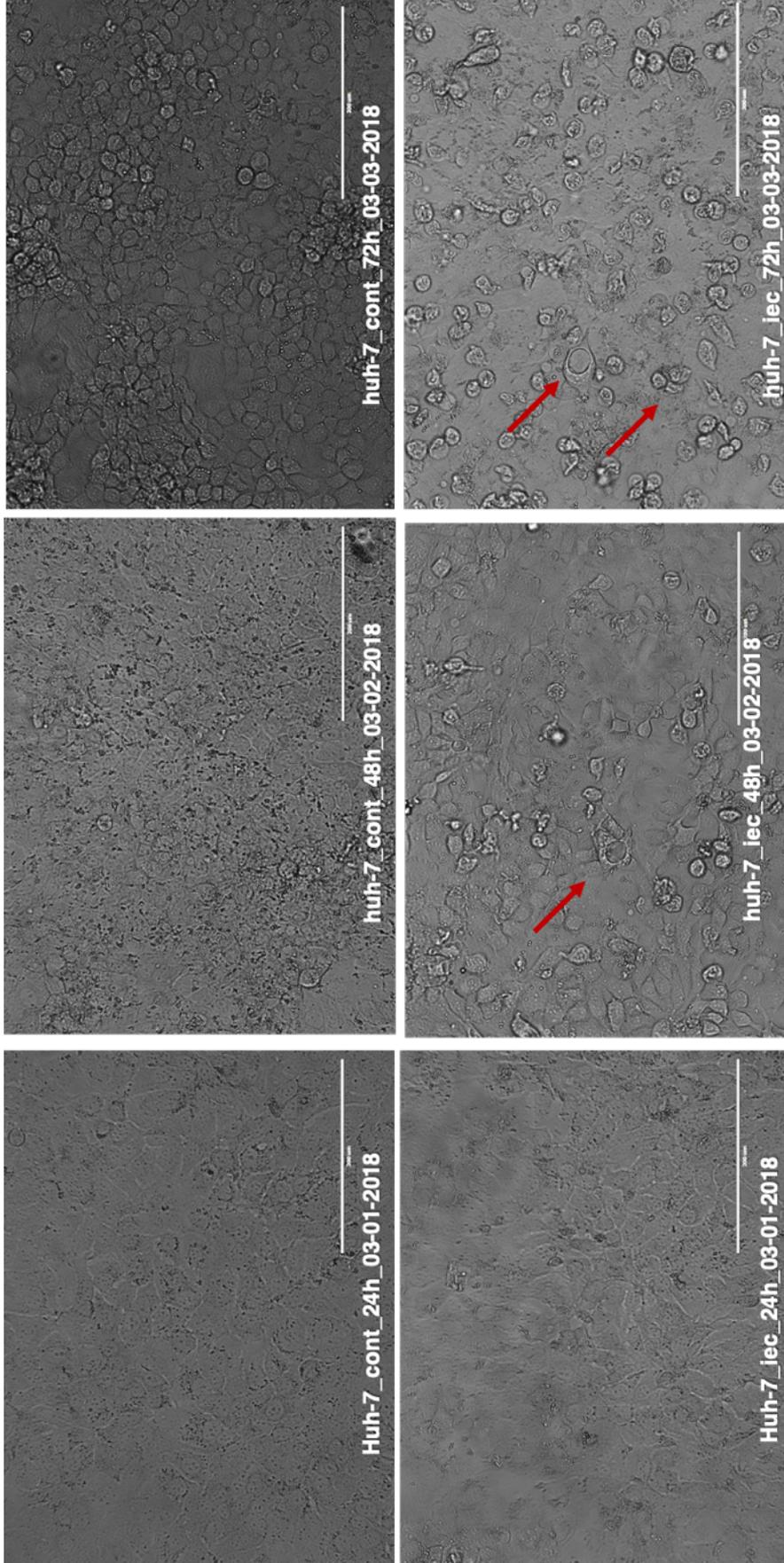


Imagem 6_A2

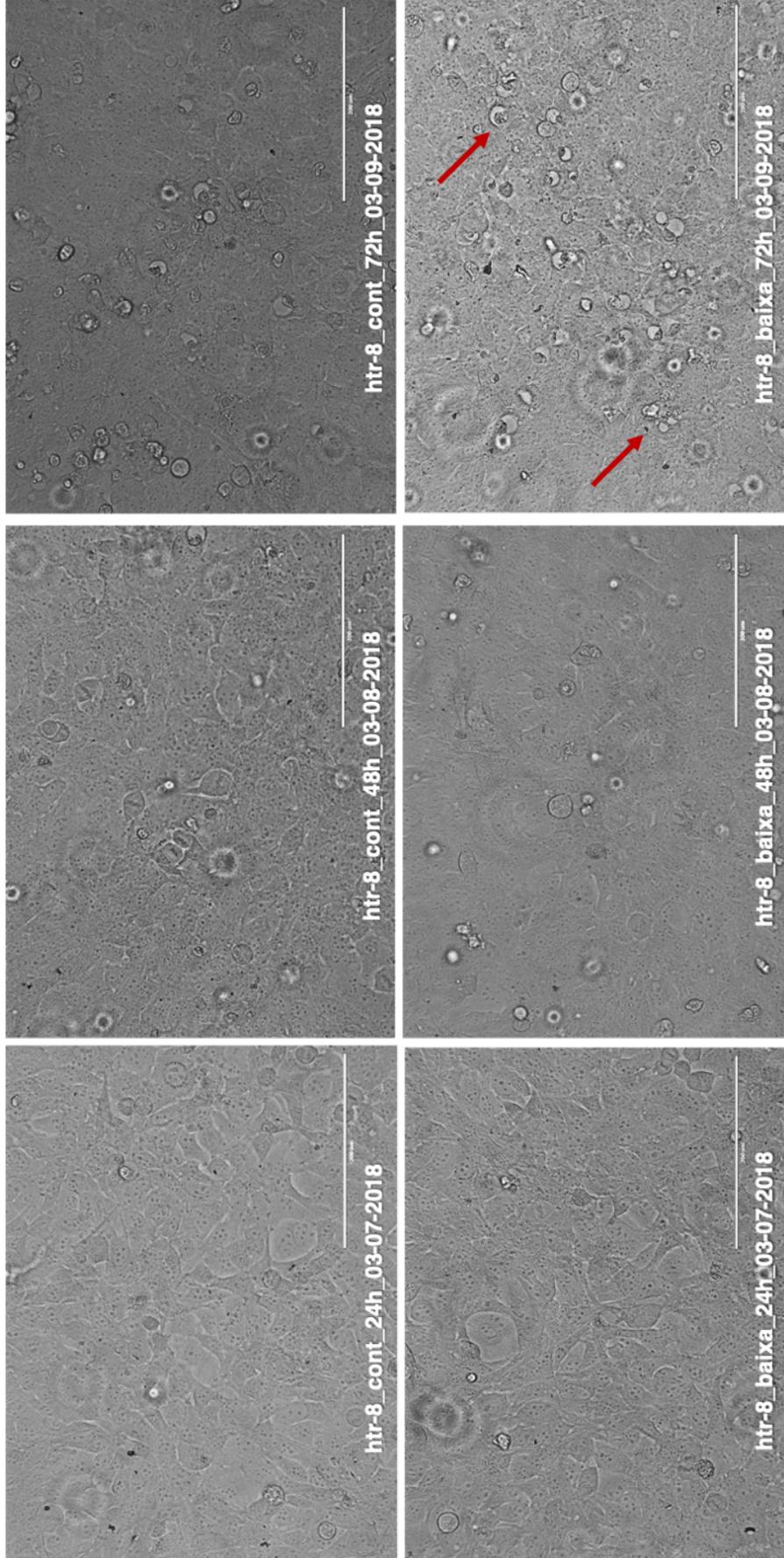


Imagem 7_B2

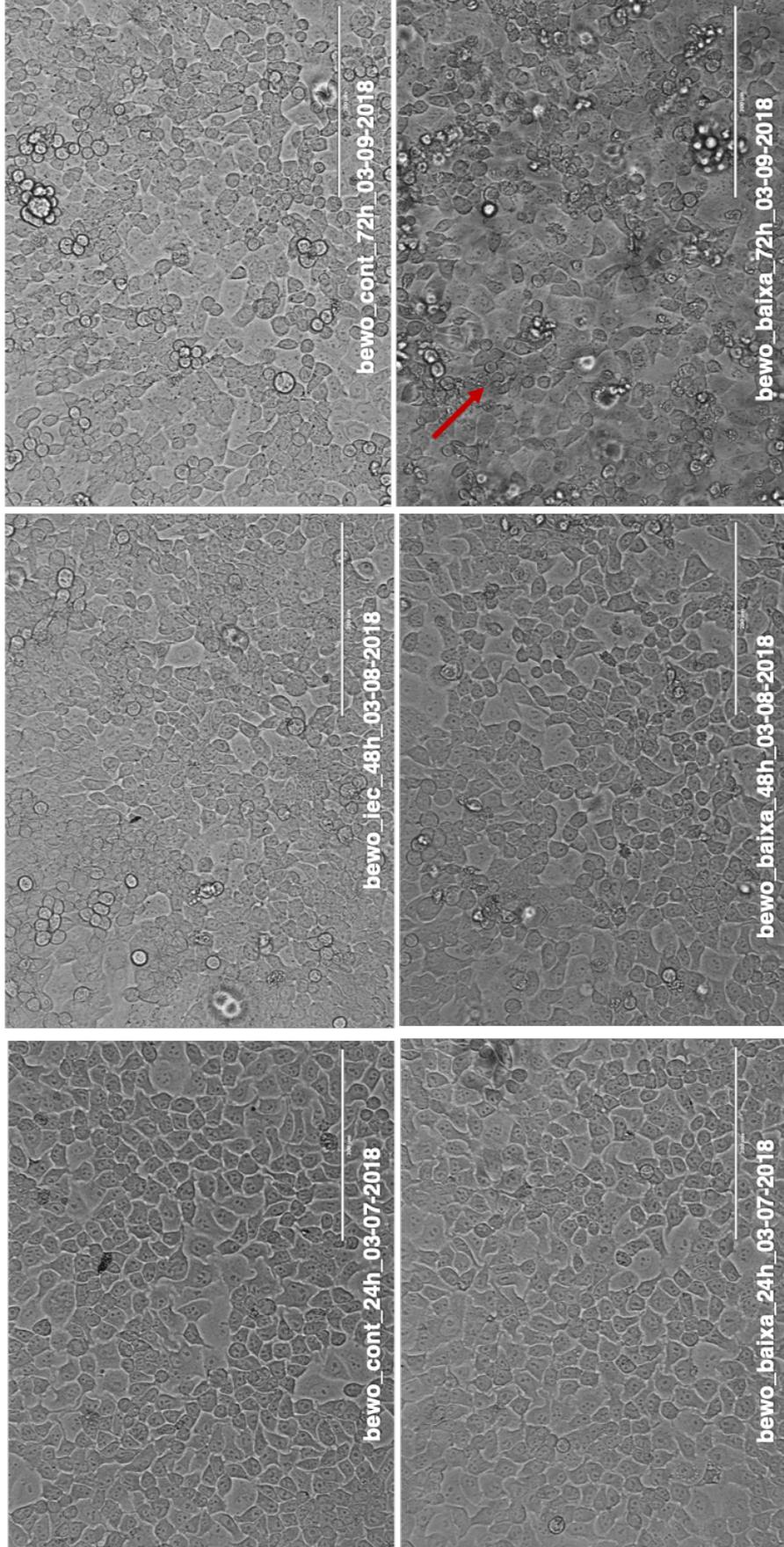


Imagem 8_C2

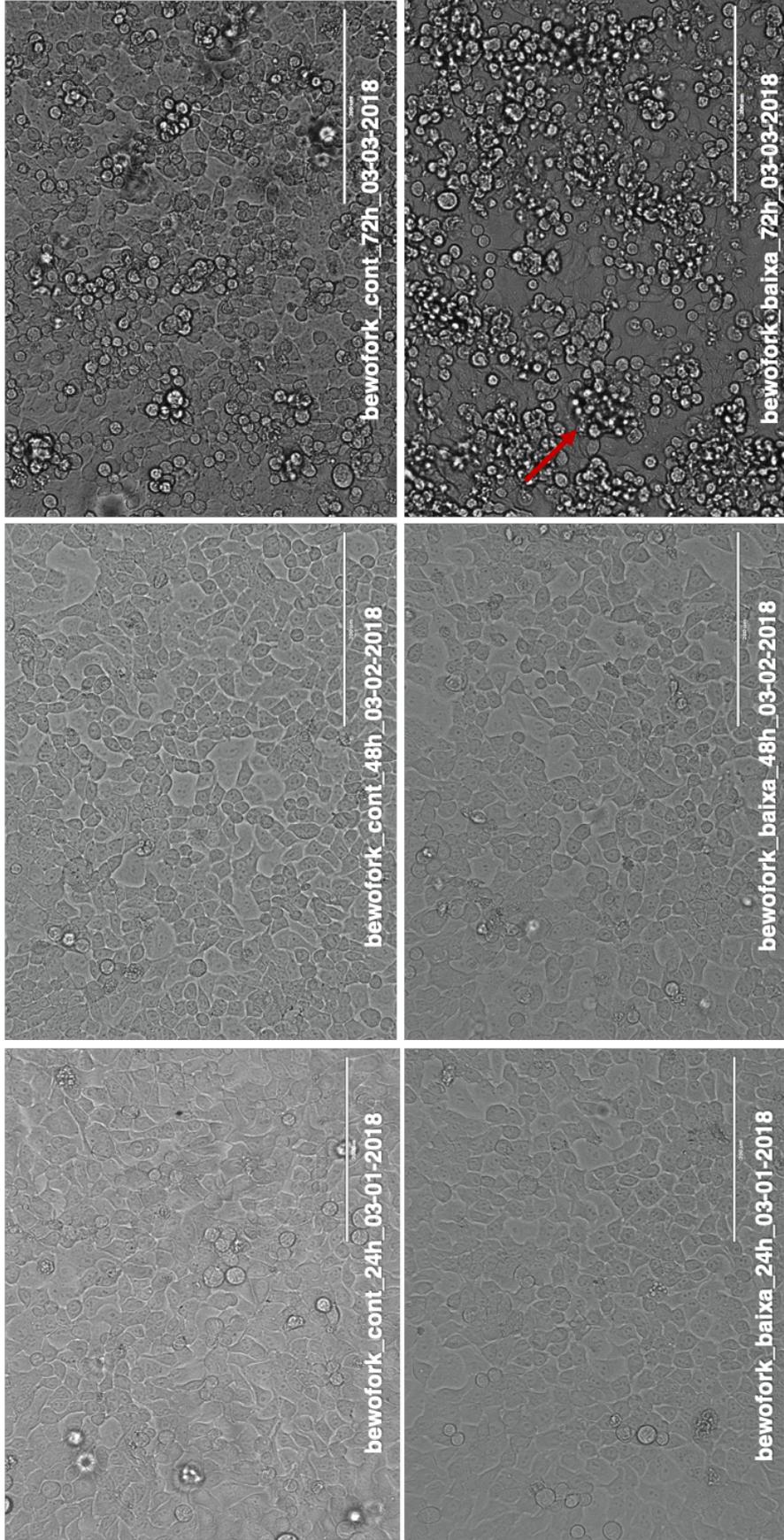
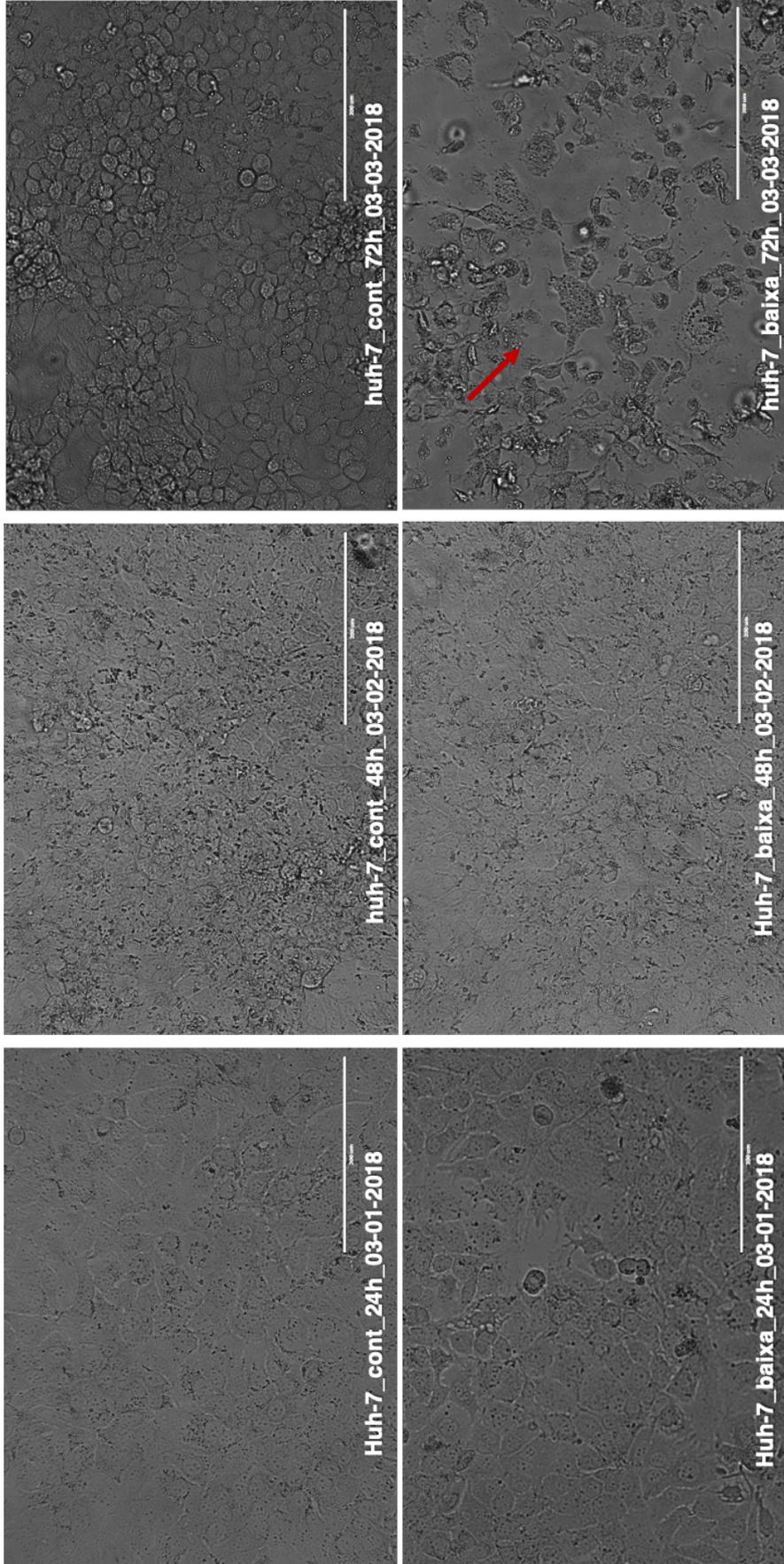


Imagem 9_D2



Das imagens obtidas para todas as células foi possível observar o efeito citopático para a maioria das cinéticas dentro do período de 72h. Todos os inoculados apresentaram as seguintes características do efeito citopático como deslocamento do tapete e arredondamento das células; morte celular lítica ou morte celular sem lise da célula (células refringentes); alterações morfológicas encontradas para outros arbovírus.

BeWo/ZIKV-IEC-Paraíba e BeWo com forskolina/ZIKV-IEC-Paraíba, apresentaram poucas diferenças entre a população de células inoculadas e o controle. **BeWo/ZIKV-MR766bp** a população de células comparadas com as dos controles começa a apresentar diferenças a partir de 48h hpi, no qual a morfologia das células infectadas aparece nesse período. **BeWo com forskolina/ZIKV-MR766bp** poucas diferenças foram apresentadas entre o controle e células inoculadas, sendo que na população de células inoculadas há maior quantidade de células no meio extracelular.

HTR-8/ZIKV-IEC-Paraíba houve um aumento da população de células até 72h hpi, e atingiu 100% de confluência após 24h para o controle e inoculado. **HTR-8/ZIKV-MR766bp** poucas diferenças entre a população de células controle e inoculado. **Huh-7/ZIKV-IEC-Paraíba** a população controle atinge 100% de confluência e inoculada após 48h hpi. **HTR-8/ZIKV-MR766bp** a confluência da população de células atinge 100% após 48h para o controle e o inoculado, sendo que a partir de 72h mais de 50% do tapete de células inoculadas foram infectadas.

3.4. Curva Padrão

Triplicata da titulação de ZIKV-IEC-Paraíba e ZIKV-MR766bp. A concentração de células usada foi de 1×10^5 células/mL de células Vero, inoculado com 0,2 mL de estoque viral por poço em uma placa de 24 poços. As células foram inoculadas após 24h na estufa a temperatura de 37°C e com 5% de CO₂. As placas foram reveladas após cinco dias para ambos os vírus. Os títulos obtidos para **ZIKV-IEC-Paraíba** foram $1,30 \times 10^6$ PFU/mL; $1,40 \times 10^6$ PFU/mL; e $1,68 \times 10^6$ PFU/mL. A média foi de $1,45 \times 10^6$ PFU/mL. **ZIKV-MR766bp** são $1,57 \times 10^8$ PFU/mL; $2,05 \times 10^8$ PFU/mL; e $1,43 \times 10^8$ PFU/mL. A média foi de $1,68 \times 10^8$ PFU/mL. Figura 11 apresenta o resultado da placa de titulação.

Uma parte da diluição seriada da titulação foi usada para determinar por qRT-PCR qual a quantidade de RNA viral presente por cada fração da diluição e usou-se para determinar a curva padrão para ambos os vírus, como pode observar nas tabelas de 3 a 5 e nos gráficos 1 e 2. A extração de RNA total com TRIzol® a partir de 0,25 mL de amostra, a reação da qRT-PCR e os cálculos para determinação da curva padrão seguem descritos no Material e Métodos.

Figura 11. Resultado da formação de placas da titulação de ZIKV IEC-Paraíba (B) e MR766 baixa passagem (C). A imagem (A) representa a distribuição da diluição seriada para quantificação do título. Os títulos foram obtidos em culturas de células Vero (ATCC®). As imagens B e C apresenta o título de a partir da contagem média do número da unidade de placas formadas nos poços 4A e 4B para imagem B e, 6A e 6B para imagem C. A média aritmética dos títulos obtidos fora $1,45 \times 10^6$ PFU/mL ZIKV-IEC-Paraíba (placa B) e $11,68 \times 10^8$ PFU/mL ZIKV-MR766bp (placa C).

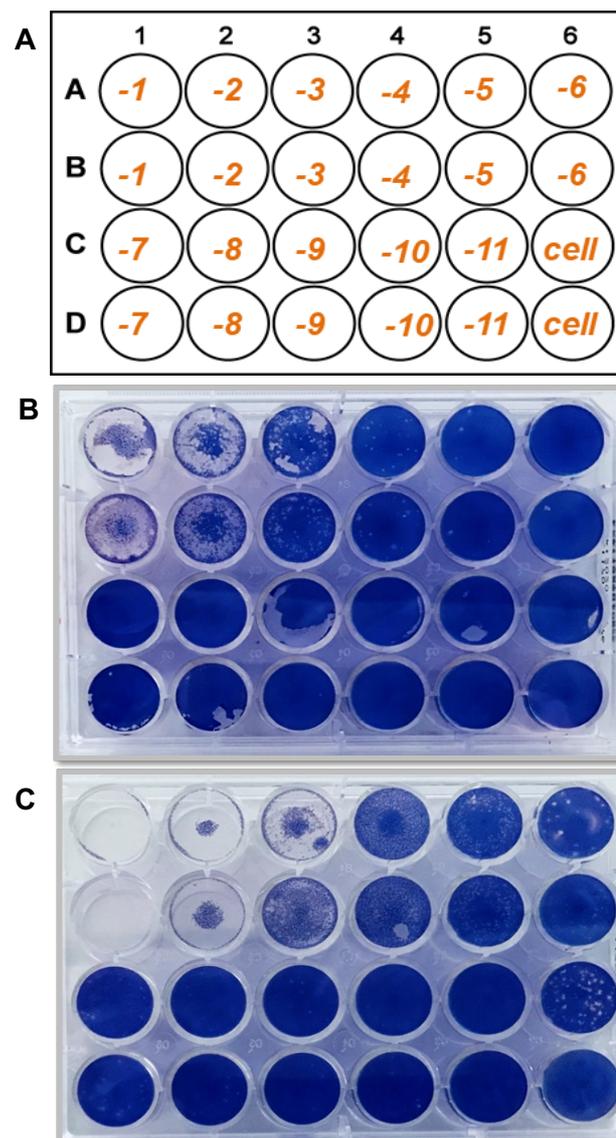


Tabela 3. Valores de C_T obtidos pela qRT-PCR para cada fração da diluição seriada da titulação realizado em triplicata. Primeira é a primeira diluição seriada. Da segunda a quartas colunas são os valores dos C_T da diluição seriada da titulação de **ZIKV-IEC**, seguido da média aritmética. Da sexta a oitava coluna são os valores obtidos dos C_T **ZIKV-MR766bp**.

Diluição	C_T IEC1	C_T IEC2	C_T IEC3	Média C_T IEC	C_T MR766bp.1	C_T MR766bp.2	C_T MR766bp.3	Média C_T MR766bp
10 ⁻¹	15,18	15,36	15,10	15,21	15,47	15,20	14,86	15,18
10 ⁻²	20,85	21,03	21,26	21,05	19,90	19,68	19,99	19,85
10 ⁻³	24,15	23,76	24,32	24,08	22,88	22,88	22,60	22,79
10 ⁻⁴	26,44	25,78	26,74	26,32	26,01	25,97	26,09	26,03
10 ⁻⁵	27,37	27,98	28,02	27,79	30,07	30,05	30,42	30,18
10 ⁻⁶	27,79	28,78	28,57	28,38	31,54	31,74	31,33	31,54
10 ⁻⁷	28,32	28,71	28,46	28,50	30,78	30,80	30,58	30,72
10 ⁻⁸	29,44	29,07	30,07	29,52	30,95	30,93	31,12	31,00
10 ⁻⁹	29,48	33,03	29,03	30,51	32,44	32,88	32,18	32,50
10 ⁻¹⁰	29,99	29,40	30,10	29,83	32,00	33,31	31,61	32,31
10 ⁻¹¹	29,40	29,31	29,73	29,48	32,61	32,87	32,91	32,80

Tabela 4. ZIKV-IEC. Tabela de conversão de valores de C_T em PFU/mL obtido da qRT-PCR para cada fração da diluição seriada da titulação realizado em triplicata do ZIKV-IEC-Paraíba. Primeira coluna é a diluição seriada. Seguido do calculo do **Valor da Titulação** obtido a partir da média aritmética de $1,45 \times 10^6$ PFU/mL para ZIKV-IEC (10⁻¹). Valores de **PFU Extraído** de 250 μ L das amostras da titulação. Volares de **PFU Amplificado** de 5 μ L da extração de RNA total das amostras tituladas para amplificação por qRT-PCR. E transforção para Log₁₀ **Titulação Log₁₀**.

Diluição ZIKV-IEC	Valor da Titulação	PFU Extraído	PFU Amplificado	Titulação Log ₁₀
10 ⁻¹	1450000	362500	36250	4,56
10 ⁻²	145000	36250	3625	3,56
10 ⁻³	14500	3625	362,5	2,56
10 ⁻⁴	1450	362,5	36,25	1,56
10 ⁻⁵	145	36,25	3,625	0,56
10 ⁻⁶	14,5	3,625	0,3625	-0,44
10 ⁻⁷	1,45	0,3625	0,03625	-1,44
10 ⁻⁸	0,145	0,03625	0,003625	-2,44
10 ⁻⁹	0,0145	0,003625	0,0003625	-3,44
10 ⁻¹⁰	0,00145	0,0003625	0,00003625	-4,44
10 ⁻¹¹	0,000145	0,00003625	0,000003625	-5,44

Tabela 5. ZIKV-MR766bp. Tabela de conversão de valores de C_T em PFU/mL obtido da qRT-PCR para cada fração da diluição seriada da titulação realizado em triplicata do ZIKV-MR766bp. Primeira coluna é a diluição seriada. Seguido do calculo do **Valor da Titulação** obtido a partir da média aritmética de $11,68 \times 10^8$ PFU/mL para ZIKV-IEC (10^{-1}). Valores de **PFU Extraído** de 250 μ L das amostras da titulação. Volares de **PFU Amplificado** de 5 μ L da extração de RNA total das amostras tituladas para amplificação por qRT-PCR. E transforção para Log_{10} **Titulação Log₁₀**.

Diluição ZIKV-MR766bp	Valor da Titulação	PFU Extraído	PFU Amplificado	Titulação Log₁₀
10 ⁻¹	168000000	42000000	4200000	6,62
10 ⁻²	16800000	4200000	420000	5,62
10 ⁻³	1680000	420000	42000	4,62
10 ⁻⁴	168000	42000	4200	3,62
10 ⁻⁵	16800	4200	420	2,62
10 ⁻⁶	1680	420	42	1,62
10 ⁻⁷	168	42	4,2	0,62
10 ⁻⁸	16,8	4,2	0,42	-0,38
10 ⁻⁹	1,68	0,42	0,042	-1,38
10 ⁻¹⁰	0,168	0,042	0,0042	-2,38
10 ⁻¹¹	0,0168	0,0042	0,00042	-3,38

Gráfico 1. Curva padrão de ZIKV-IEC-Paraíba. Abcissa apresenta os valores médio do C_T obtido da qRT-PCR para cada fração da diluição seriada da titulação realizado em triplicata. Ordena apresenta a conversão dos C_T em Titulação Log_{10} . A equação da reta (y) e R^2 (coeficiente de determinação) estão representadas no lado esquerdo do gráfico.

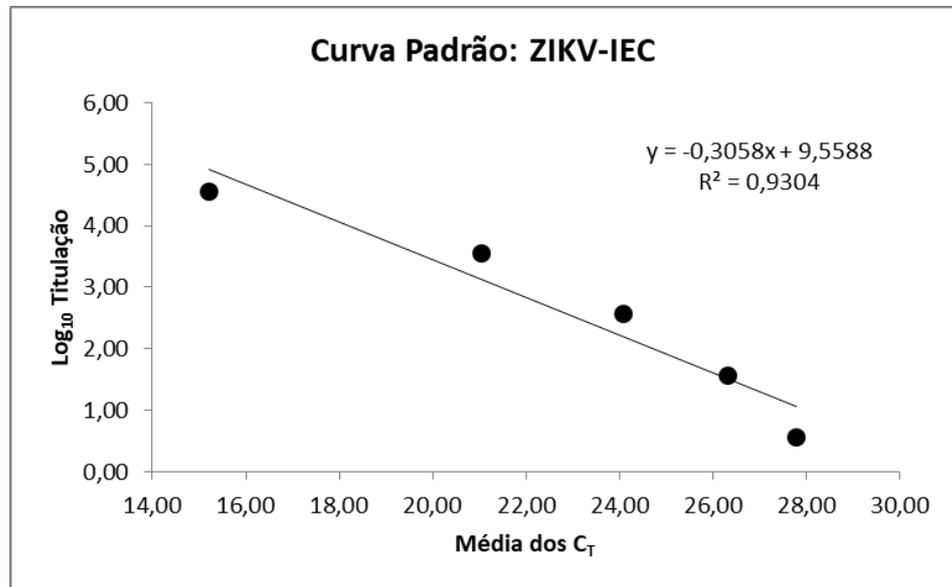
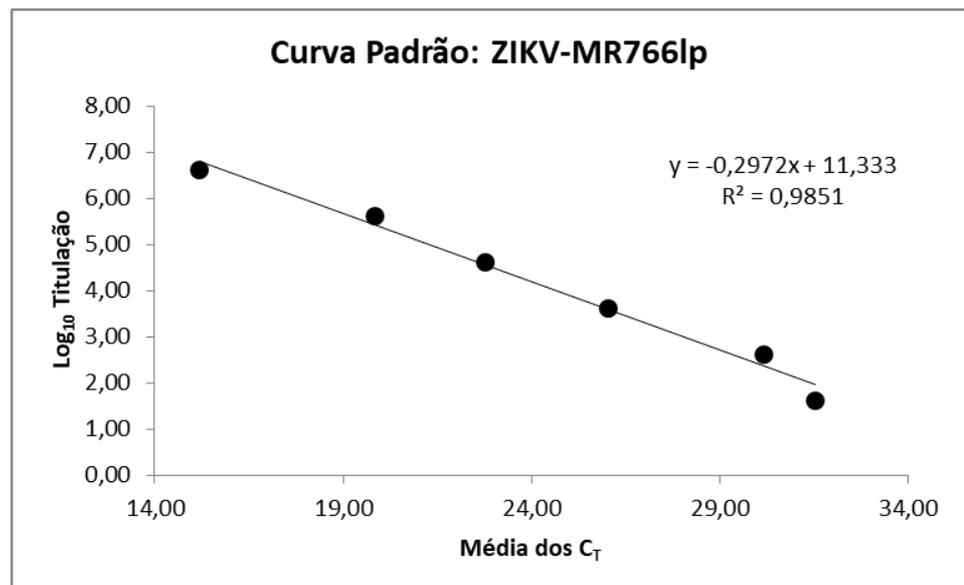


Gráfico 2. Curva padrão de ZIKV-MR766bp. Abcissa apresenta os valores médio do C_T obtido da qRT-PCR para cada fração da diluição seriada da titulação realizado em triplicata. Ordena apresenta a conversão dos C_T em Titulação Log_{10} . A equação da reta (y) e R^2 (coeficiente de determinação) estão representadas no lado esquerdo do gráfico.

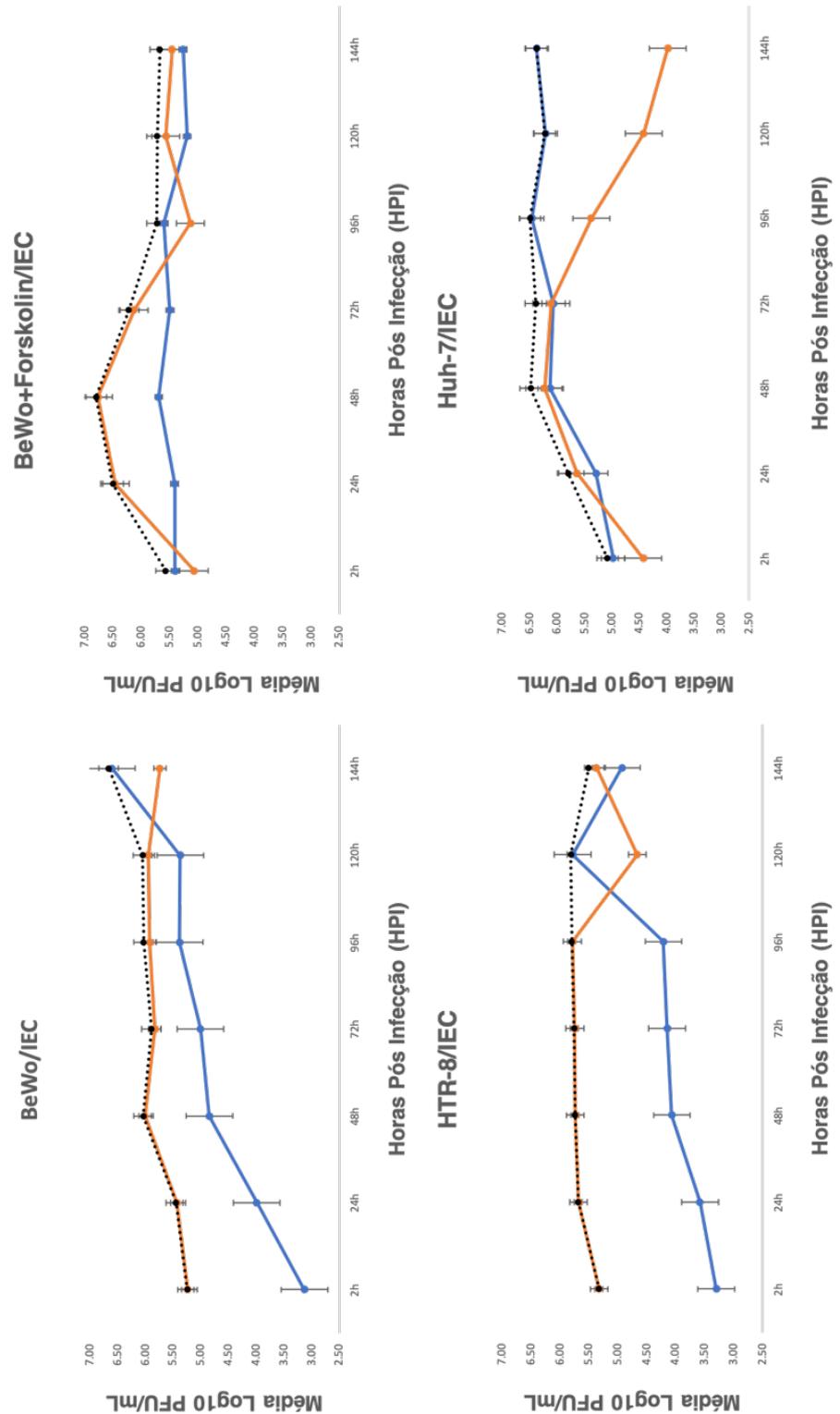


3.5. Cinética Viral

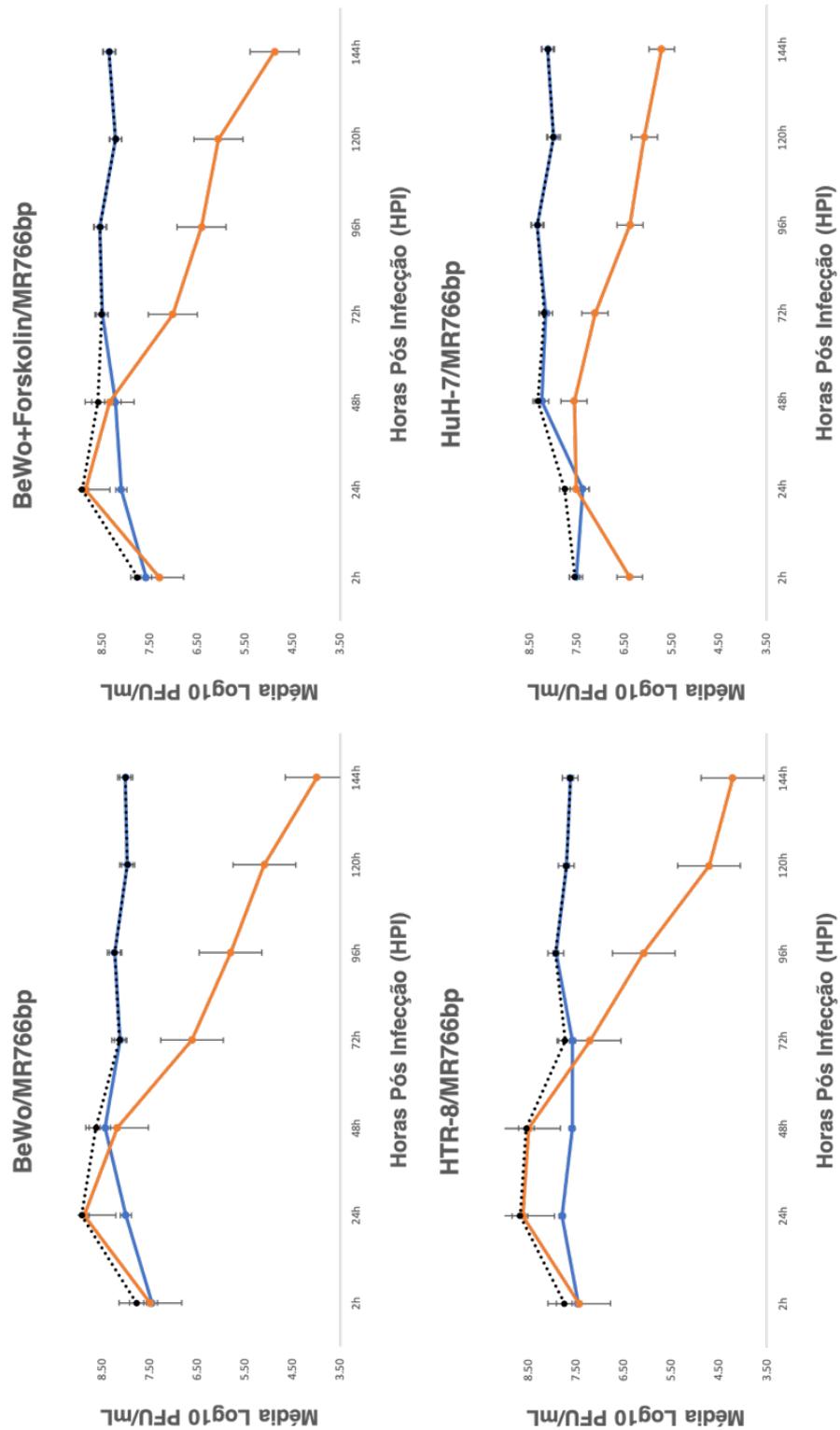
A curva dinâmica da cinética descreve para cada hpi a quantidade de RNA viral detectado nas células inoculada por ZIKV-IEC e ZIK-MR766bp. Para tal, comparou-se a quantidade de RNA entre o meio de cultura extra e intracelular seguida sua somatória. A extração do RNA total, sua quantificação e o cálculo da curva de crescimento em PFU/mL estão descritos no Material e Métodos.

Os resultados da cinética, réplica 1, foram quantificados, calculados e plotados nos gráficos 3 e 4 para todos os hpi. A partir dessa cinética, dos hpi intracelular com maior quantidade de RNA viral selecionou-se os hpi 24h, 48h e 72h para obter a média da triplicata das cinéticas apresentadas nos gráficos 5 e 6. A seguir segue todos os resultados obtidos da réplica 1 e a média dos hpi selecionados. As tabelas com todos os valores usados nos cálculos de conversão dos gráficos 1 a 4 estão no apêndice: resultados. A equação da reta descrita anteriormente foi usada os cálculos de conversão do C_T para PFU/mL.

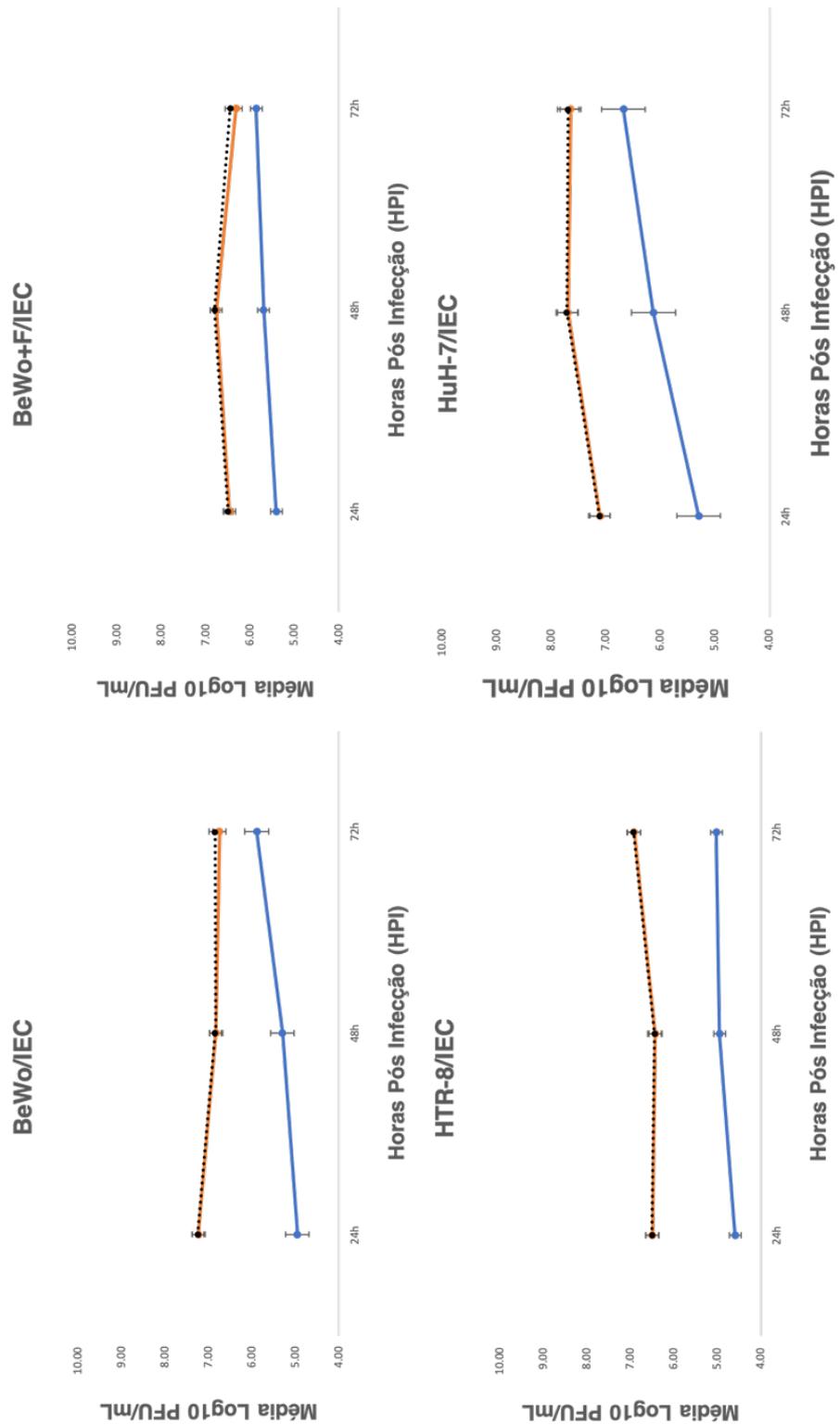
Gráficos 3. Dinâmica da cinética viral das linhagens celulares HTR-8, BeWo, BeWo com forskolina e Huh-7 inoculadas com ZIK-IEC-Paraíba. Abscissa apresenta hpi e a ordenada Log_{10} PFU/mL. A linha azul com losangos é o meio extracelular, linha vermelha com quadrados é o meio intracelular e a pontilhada são a somatória dos valores obtidos intra e extracelular.



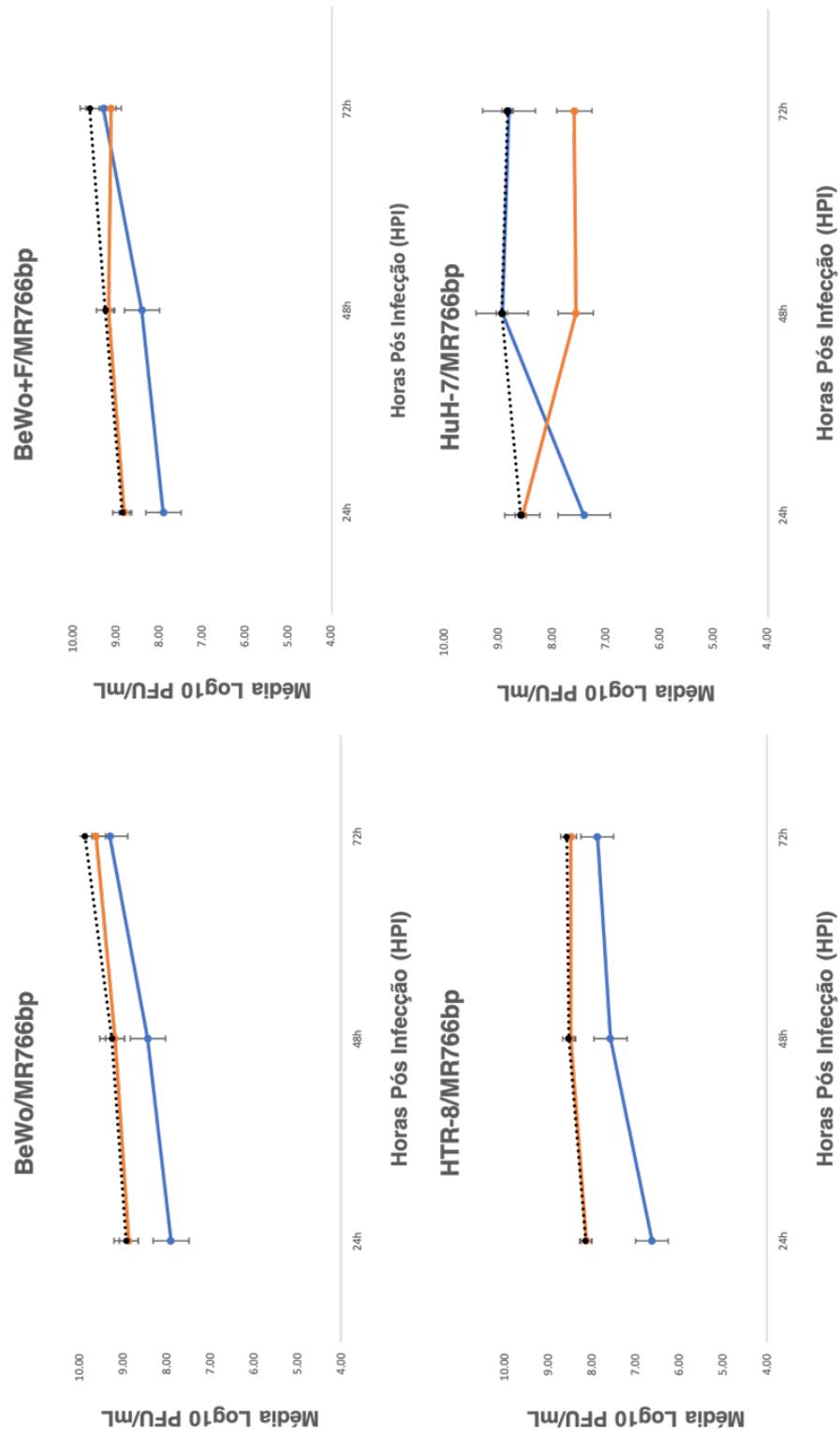
Gráficos 4. Dinâmica da cinética viral das linhagens celulares HTR-8, BeWo, BeWo com forskolina e Huh-7 inoculadas com ZIKV-MR766 baixa passagem. Abscissa apresenta hpi e a ordenada Log_{10} PFU/mL. A linha azul com losangos é o meio extracelular, linha vermelha com quadrados é o meio intracelular e a pontilhada são a somatória dos valores obtidos intra e extracelular.



Gráficos 5. Médias das triplicatas das cinéticas viral das linhagens celulares HTR-8, BeWo, BeWo com forskolina e Huh-7 inoculados com ZIKV-IEC-Paraíba, nos hpi de 24h, 48h e 72h. A linha azul com losangos é o meio extracelular, linha vermelha com quadrados é o meio intracelular e a pontilhada são a somatória dos valores obtidos intra e extracelular.



Gráficos 6. Médias das triplicatas das cinéticas viral das linhagens celulares BeWo, BeWo com forskolina, HTR-8 e Huh-7 inoculados com ZIKV-MR766 baixa passagem, nos hpi de 24h, 48h e 72h. A linha azul com losangos é o meio extracelular, linha vermelha com quadrados é o meio intracelular e a pontilhada são a somatória dos valores obtidos intra e extracelular.



3.6. Cinética Viral: Células de Schwann

A cinética viral com as células de Schwann seguiu os mesmos procedimentos da cinética anterior, sem a conversão de C_T para PFU/mL. Os hpi definidos foram 24h, 48h, 72h e 96h. A inoculação foi com ZIKV-IEC-Paraíba e ZIKV-MR766bp. Abaixo segue os resultados obtidos por qRT-PCR.

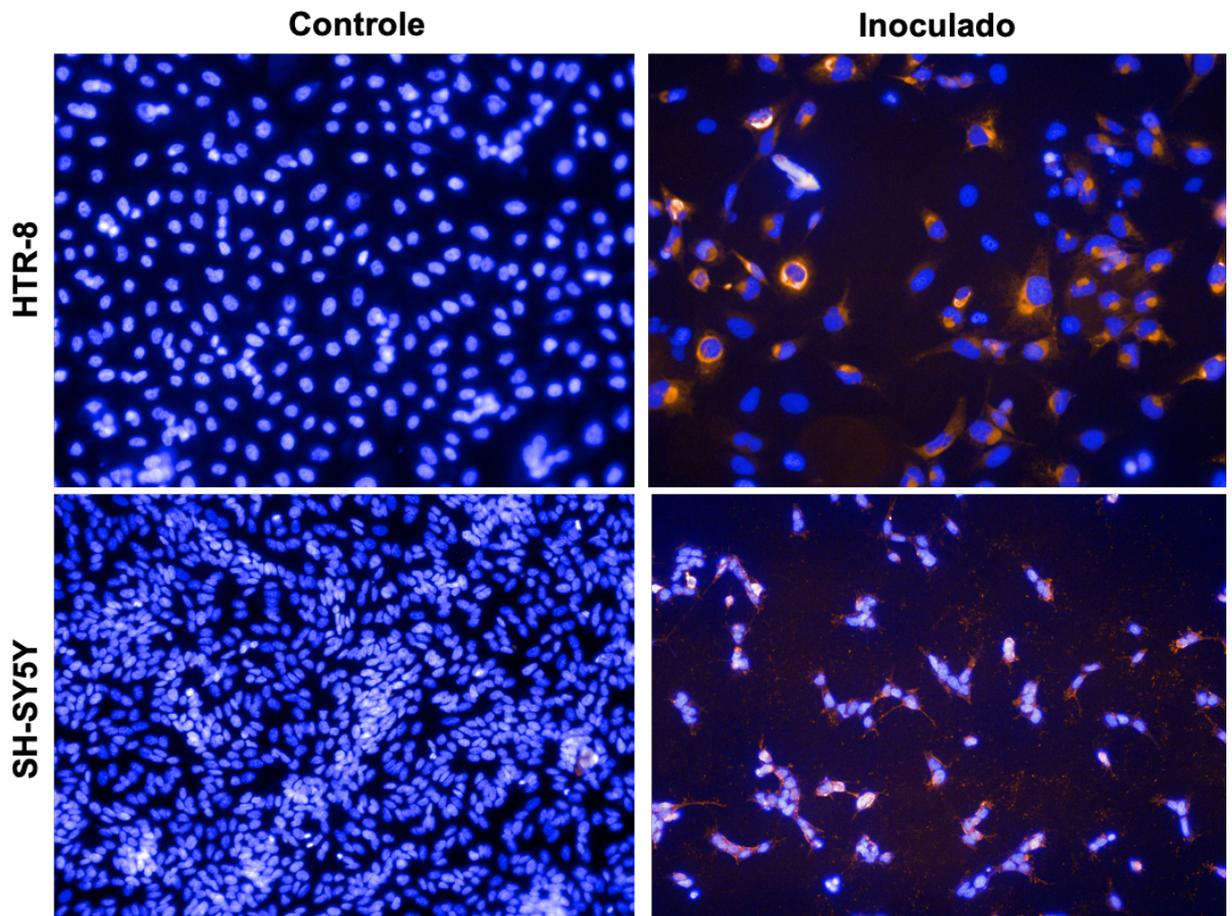
Tabela 6: Valores de C_T obtido da qRT-PCR para cada hora após infecção hpi da cinética viral com células de Schwann.

	C_T hpi 24h	C_T hpi 48h	C_T hpi 72h	C_T hpi 96h
Controle extracelular	nda	nda	nda	10,89
Controle intracelular	nda	nda	14,33	nda
ZIKV-IEC-Paraíba extracelular	19,72	nda	18,61	28,74
ZIKV-IEC-Paraíba intracelular	24,65	23,31	25,45	25,65
ZIKV-MR766bp extracelular	18,46	19,70	19,18	20,18
ZIKV-MR766bp intracelular	20,30	22,75	24,26	22,63

3.7. Imunofluorescência Indireta do ZIKV

Ao determinar a localização e a progressão da infecção no citossol foi possível identificar o tempo necessária da replicação de novos vírions antes do mesmo conduzir o colapso celular e conseqüentemente sua morte. A imagem 10 apresenta o ensaio de padronização para HTR-8 e SH-SY5Y - neuroblastoma derivado da medula óssea de *Homo sapiens*, morfologia epitelial. No hpi de 72h foi possível observar a presença das proteínas do Envelope, marcado em laranja, ao redor do retículo endoplasmático rugoso (RER) no citoplasma e no entorno do núcleo, marcação em azul. Em algumas células foi possível visualizar a difusão da proteína por todo citoplasma, de modo a delimitadas até a membrana celular. Outra característica foi a elevada lise celular, em que junto com o conteúdo difuso do citossol há a proteína do vírus, um indicativo da presença de partículas virais.

Imagem 10. Imagem representativa da imunofluorescência indireta de alto conteúdo. A coluna da esquerda apresenta o controle negativo das células HTR-8 e SH-SY5Y. E a sua direita as células inoculadas com ZIKV-IEC-Paraíba. A fluorescência em azul é o núcleo marcado com DAPI e em laranja a fluorescência Alexa Flúor 594[®]. HTR-8 MOI=7 e SH-SY5Y MOI=3. Contração celular 1×10^4 células/mL para ambos tipos celulares. Aumento de imagem 20x (200 μm) obtidas no Operetta High-Content Imaging System da Pelkin Elmer[®].



4 | DISCUSSÃO

O *Zika virus* faz parte das doenças denominadas de TORCH devido as consequências neurológicas causadas no embrião, durante a gestação e no pós-parto. Dentre as arboviroses é a primeira vez que se tem o risco de transmissão do vírus por outras vias, além de vetorial. Pois, o mesmo pode ser transmitido por contato sexual e materno-fetal. Tal fato possibilita a sua transmissão ser além do período sazonal, além de se estabelecer no ciclo urbano e rural.

Em relação à transmissão materno-fetal, a partir de evidências na literatura, o embrião ou feto pode-se infectar através da placenta, quando a mãe se infecta via vetorial ou sexual durante o período gestacional. As consequências da infecção podem atingir o feto e nos casos mais graves haver aborto ou o recém-nascido nascer com anomalias congênitas neurológicas permanentes. As células trofoblástica HTR-8 e BeWo não tratada e tratada com forskolina demonstraram que no primeiro trimestre gestacional pode elevar o risco de infecção, pois há o risco de transmissão via útero, além desse período o sistema imune materno não protege integralmente o embrião. Pois, os tecidos extraembrionários ainda estão em desenvolvimento.

Na literatura, as células sinciciotrofoblastos (STB) são mais resistentes às infecções virais do que as suas precursoras citotrofoblastos (CTB). Células BeWo tratadas com forskolina tem por intuito mimetizar o processo de formação de sincício, como ocorre durante o desenvolvimento da placenta. A formação de células multinucleas, STB, são importantes no transporte de gases e nutrientes durante a gravidez, além de ser uma importante barreira contra invasão de microrganismos. O fato de tais células serem susceptíveis e permissivas ao ZIKV, independente do período gestacional, aumenta o risco de infectar o feto e esse conseqüentemente desenvolver anomalias neurológicas. As células BeWo tratadas com forskolina que simulam as STB's, em ex vivo, e inoculadas com ZIKV demonstraram a possibilidade de transmissão ocorrer através das vilosidades coriônicas, no qual STB fazem parte.

Apesar de ambas linhagens serem infectantes e apresentarem elevada produção de vírions, a comparação entre os ZIKV Africano e Asiático-Brasileiros não se pode responder porque a linhagem africana não gerou as mesmas consequências neurológicas e de transmissão, como a ocorrido com a linhagem asiático-brasileiro. Porém, alguns estudos propõem alguns fatores que podem ter levado consequências

que observamos hoje, como modificações no gene pr/M, as populações naïve da Ocenia e das Américas, diferentes receptores virais, fatores genéticos, ambientais, entre outros.

A pandemia do ZIKV nos trouxe muitos questionamentos em relação as arboviroses, pois até então, a única via de transmissão conhecida era por um vetor artrópode hematófago, além da gravidade da infecção materno-fetal. *Dengue virus*, *West nile virus* e *Chikungunya virus* são arbovírus transmissíveis durante a gestação, mas que não causam as mesmas consequências que o *Zika virus*, até onde se conhece. Dos muitos questionamentos levantados, alguns são de suma importância como ADE (do inglês antibody-dependent enhancement) pode ocorrer com ZIKV? Pois, a imunoglobulina IgG é transmitada de forma ativa para o feto. Quais são os possíveis mecanismo de infecção por ZIKV durante a gestação se a transmissão for por via sexual? O sêmen infectado por ZIKV é capaz de transmitir o vírus na fase inicial da fecundação? Se uma mãe infectada, o vírus se mantém ativo nos tecidos reprodutivos por longos períodos durante a gestação? E desse modo elevar o risco de infecção do feto? Sinciciotrofoblastos são considerados resistentes à infecção contra a maioria dos patógenos conhecidos. E contra ZIKV mostrou-se susceptível e permissiva ao vírus. Podem existir outros fatores como receptores viriais que permitem ser infectado por ZIKV? Tais questões são de importância para que durante os estudos de ZIKV possam sinalizar caminhos na produção de antivirais e vacinas que protejam as mães antes, durante e pós período gestacional.

5 | CONCLUSÃO

- i. As células trofoblásticas HTR-8 e BeWo tratada e não tratada com forskolina são susceptíveis e permissivas ao *Zika virus*, assim como a célula hematopoiética Huh-7, sistema controle dos ensaios.
- ii. O tempo para evidência de infecção a partir do efeito citopático é de 48 horas após infecção para todos os tipos celulares. E ao final das 144h após a inoculação a maior parte das células estão mortas.
- iii. A comparação entre os ZIKV africano e asiático-brasileiro, ambos apresentaram elevado produção de partículas virais em todos os tipos celulares. O ZIKV africano mostrou ser mais virulento do que o ZIKV asiático-brasileiro.
- iv. Em comparação entre as células BeWo tratada e não tratado com forskolina, ambas são susceptíveis e permissivas ao vírus de ambas as linhagens.

6 | BIBLIOGRAFIA

- Adibi, J. J., Marques Jr, E. T., Cartus, A., & Beigi, R. H. (2016). Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. *The Lancet*, 387(10027), 1587-1590.
- Aliota, M. T., Peinado, S. A., Osorio, J. E., & Bartholomay, L. C. (2016). *Culex pipiens* and *Aedes triseriatus* mosquito susceptibility to Zika virus. *Emerging infectious diseases*, 22(10), 1857.
- Amraoui, F., Atyame-Nten, C., Vega-Rúa, A., Lourenço-De-Oliveira, R., Vazelle, M., & Failloux, A. B. (2016). *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Eurosurveillance*, 21(35).
- Armstrong, N., Hou, W., & Tang, Q. (2017). Biological and historical overview of Zika virus. *World journal of virology*, 6(1), 1.
- Arora, N., Sadovsky, Y., Dermody, T. S., & Coyne, C. B. (2017). Microbial vertical transmission during human pregnancy. *Cell host & microbe*, 21(5), 561-567.
- Atkinson, B., Hearn, P., Afrough, B., Lumley, S., Carter, D., Aarons, E. J., ... & Hewson, R. (2016). Detection of Zika virus in semen. *Emerging infectious diseases*, 22(5), 940.
- Baud, D., Gubler, D. J., Schaub, B., Lanteri, M. C., & Musso, D. (2017). An update on Zika virus infection. *The Lancet*, 390(10107), 2099-2109.
- ^aBaud, D., Musso, D., Vouga, M., Alves, M. P., & Vulliemoz, N. (2017). Zika virus: A new threat to human reproduction. *American journal of reproductive immunology*, 77(2), e12614.
- Bearcroft, W. G. C. (1956). Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(5), 442-448.
- Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. M., & Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*, 19(13), 20751.
- Boorman, J. P. T., & Draper, C. C. (1968). Isolations of arboviruses in the Lagos area of Nigeria, and a survey of antibodies to them in man and animals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2), 269-277.
- Brasil, P., Pereira Jr, J. P., Moreira, M. E., Ribeiro Nogueira, R. M., Damasceno, L., Wakimoto, M., ... & Zin, A. A. (2016). Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2321-2334.
- Burleson, F. G., Chambers, T. M., & Wiedbrauk, D. L. (2014). *Virology: a laboratory manual*. Elsevier.
- Brito, C. A. A. D., & Cordeiro, M. T. (2016). One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(5), 537-543.
- ^aCalvet, G. A., Filippis, A. M. B., Mendonça, M. C. L., Sequeira, P. C., Siqueira, A. M., Veloso, V. G., ... & Brasil, P. (2016). First detection of autochthonous Zika virus transmission in a HIV-infected patient in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Virology*, 74, 1-3.
- ^bCalvet, G. A., Santos, F. B. D., & Sequeira, P. C. (2016). Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. *Current opinion in infectious diseases*, 29(5), 459-466.
- ^cCalvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S., Sampaio, S. A., De Filippis, I., Fabri, A., ... & Tschoeke, D. A. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet infectious diseases*, 16(6), 653-660.

- Cao, B., Diamond, M. S., & Mysorekar, I. U. (2017). Maternal-fetal transmission of Zika virus: routes and signals for infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 37(7), 287-294.
- Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A. L., Mallet, H. P., ... & Musso, D. (2014). Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*, 20(6), 1085.
- Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., ... & Fontanet, A. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *The Lancet*, 387(10033), 2125-2132.
- Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika virus outbreak, bahia, brazil. *Emerging infectious diseases*, 21(10), 1885.
- Cardoso, C. W., Paploski, I. A., Kikuti, M., Rodrigues, M. S., Silva, M. M., Campos, G. S., ... & Ribeiro, G. S. (2015). Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 21(12), 2274.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews in Microbiology*, 44(1), 649-688.
- Chouin-Carneiro, T., & dos Santos, F. B. (2017). Transmission of major arboviruses in Brazil: the role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* vectors. *Biological Control of Pest and Vector Insects*, 231.
- Cleton, N., Koopmans, M., Reimerink, J., Godeke, G. J., & Reusken, C. (2012). Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of Clinical Virology*, 55(3), 191-203.
- Colt, S., Garcia-Casal, M. N., Peña-Rosas, J. P., Finkelstein, J. L., Rayco-Solon, P., Prinzo, Z. C. W., & Mehta, S. (2017). Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(4), e0005528.
- Counotte, M. J., Kim, C. R., Wang, J., Bernstein, K., Deal, C. D., Broutet, N. J. N., & Low, N. (2018). Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: a living systematic review. *PLoS medicine*, 15(7), e1002611.
- Coyne, C. B., & Lazear, H. M. (2016). Zika virus-reigniting the TORCH. *Nature Reviews Microbiology*, 14(11), 707.
- ^(a) Dick, G. W. A. (1952). Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 46(5), 521-534.
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 46(5), 509-520.
- ^(b) Dick, G. W. A. (1952). Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda (Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(1), 13-48.
- Dick, G. W. A. (1953). Epidemiological Notes on Some Viruses isolated in Uganda (Yellow Fever, Rift Valley Fever, Bwamba Fever, West Nile, Mengo, Semliki Forast, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika Viruses). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(1), 13-43.

- Dupont-Rouzeyrol, M., Biron, A., O'Connor, O., Huguon, E., & Descloux, E. (2016). Infectious Zika viral particles in breastmilk. *The Lancet*, 387(10023), 1051.
- El Costa, H., Gouilly, J., Mansuy, J. M., Chen, Q., Levy, C., Cartron, G., ... & Jabrane-Ferrat, N. (2016). ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Scientific reports*, 6, 35296.
- Faria, N. R., da Silva Azevedo, R. D. S., Kraemer, M. U., Souza, R., Cunha, M. S., Hill, S. C., ... & Rocco, I. M. (2016). Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science*, aaf5036.
- Faye, O., Freire, C. C., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., & Zanotto, P. M. (2014). Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(1), e2636.
- Fernandez-Garcia, M. D., Mazzon, M., Jacobs, M., & Amara, A. (2009). Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell host & microbe*, 5(4), 318-328.
- Fonseca, K., Meatherall, B., Zarra, D., Drebot, M., MacDonald, J., Pabbaraju, K., ... & Tellier, R. (2014). First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 91(5), 1035-1038.
- França, G. V., Schuler-Faccini, L., Oliveira, W. K., Henriques, C. M., Carmo, E. H., Pedi, V. D., ... & Barros, F. C. (2016). Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *The lancet*, 388(10047), 891-897.
- Galán-Huerta, K. A., Rivas-Estilla, A. M., Martínez-Landeros, E. A., Arellanos-Soto, D., & Ramos-Jiménez, J. (2016). The Zika virus disease: An overview. *Medicina universitaria*, 18(71), 115-124.
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2016). *Developmental Biology* 11th.
- Go, Y. Y., Balasuriya, U. B., & Lee, C. K. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and experimental vaccine research*, 3(1), 58-77.
- Göertz, G. P., Abbo, S. R., Fros, J. J., & Pijlman, G. P. (2017). Functional RNA during Zika virus infection. *Virus research*.
- Gong, Z., Gao, Y., & Han, G. Z. (2016). Zika virus: two or three lineages? *Trends in microbiology*, 24(7), 521-522.
- Goorhuis, A., von Eije, K. J., Douma, R. A., Rijnberg, N., van Vugt, M., Stijnis, C., & Grobusch, M. P. (2016). Zika virus and the risk of imported infection in returned travelers: implications for clinical care. *Travel medicine and infectious disease*, 14(1), 13-15.
- Gubler, D. J. (2001). Human arbovirus infections worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 951(1), 13-24.
- Guedes, D. R., Paiva, M. H., Donato, M. M., Barbosa, P. P., Krokovsky, L., Rocha, S. W. D. S., ... & Barbosa, R. M. (2017). Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerging microbes & infections*, 6(1), 1-11.

- Guo, X. X., Li, C. X., Deng, Y. Q., Xing, D., Liu, Q. M., Wu, Q., ... & Zhao, T. Y. (2016). *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerging microbes & infections*, 5(9), e102.
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature reviews disease primers*, 2, 16055.
- Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., ... & Weaver, S. C. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(2), e1477.
- Hadjichrysanthou, C., Cauët, E., Lawrence, E., Vegvari, C., De Wolf, F., & Anderson, R. M. (2016). Understanding the within-host dynamics of influenza A virus: from theory to clinical implications. *Journal of The Royal Society Interface*, 13(119), 20160289.
- Hamel, R., Liégeois, F., Wichit, S., Pompon, J., Diop, F., Talignani, L., ... & Missé, D. (2016). Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes and Infection*, 18(7-8), 441-449.
- Hayes, E. B. (2009). Zika virus outside Africa. *Emerging infectious diseases*, 15(9), 1347.
- Hastings, A. K., Yockey, L. J., Jagger, B. W., Hwang, J., Uraki, R., Gaitsch, H. F., ... & Fikrig, E. (2017). TAM receptors are not required for Zika virus infection in mice. *Cell reports*, 19(3), 558-568.
- Heitmann, A., Jansen, S., Lühken, R., Leggewie, M., Badusche, M., Pluskota, B., ... & Tannich, E. (2017). Experimental transmission of Zika virus by mosquitoes from central Europe. *Eurosurveillance*, 22(2).
- Huang, Y. J. S., Ayers, V. B., Lyons, A. C., Unlu, I., Alto, B. W., Cohnstaedt, L. W., ... & Vanlandingham, D. L. (2016). *Culex* species mosquitoes and Zika virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(10), 673-676.
- ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org>>. Acesso em: 11 set. 2019.
- Ioos, S., Mallet, H. P., Goffart, I. L., Gauthier, V., Cardoso, T., & Herida, M. (2014). Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et maladies infectieuses*, 44(7), 302-307.
- Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. & Dye, C (2016). Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. World Health Organization (WHO). Disponível em: <https://www.who.int/bulletin/online_first/16-171082/en/> Acesso em: 01 março de 2019.
- Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). Fields virology. In *Fields virology*.
- Korhonen, E. M., Huhtamo, E., Smura, T., Kallio-Kokko, H., Raassina, M., & Vapalahti, O. (2016). Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. *Eurosurveillance*, 21(2), 30107.

- Krow-Lucal, E. R., Biggerstaff, B. J., & Staples, J. E. (2017). Estimated incubation period for Zika virus disease. *Emerging infectious diseases*, 23(5), 841.
- Kutsuna, S., Kato, Y., Takasaki, T., Moi, M. L., Kotaki, A., Uemura, H., ... & Hayakawa, K. (2014). Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Eurosurveillance*, 19(4), 20683.
- Kuno, G., & Chang, G. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of virology*, 152(4), 687-696.
- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., ... & Duffy, M. R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases*, 14(8), 1232.
- Laureti, M., Narayanan, D., Rodriguez-Andres, J., Fazakerley, J. K., & Kedzierski, L. (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in immunology*, 9.
- Lazear, H. M., & Diamond, M. S. (2016). Zika virus: new clinical syndromes and its emergence in the Western Hemisphere. *Journal of virology*, 90(10), 4864-4875.
- Lessler, J., Chaisson, L. H., Kucirka, L. M., Bi, Q., Grantz, K., Salje, H., ... & Cummings, D. A. (2016). Assessing the global threat from Zika virus. *Science*, 353(6300), aaf8160.
- León-Juárez, M., Martínez-Castillo, M., González-García, L. D., Helguera-Repetto, A. C., Zaga-Clavellina, V., García-Cordero, J., ... & Reyes-Muñoz, E. (2017). Cellular and molecular mechanisms of viral infection in the human placenta. *Pathogens and disease*, 75(7).
- Leung, G. H., Baird, R. W., Druce, J., & Anstey, N. M. (2015). Zika virus infection in Australia following a monkey bite in Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 46(3), 460-4.
- Levinson, W. (2016). *Microbiologia médica e imunologia*. McGraw Hill Brasil.
- Liu, S., DeLalio, L. J., Isakson, B. E., & Wang, T. T. (2016). AXL-mediated productive infection of human endothelial cells by Zika virus. *Circulation research*, CIRCRESAHA-116.
- Lopes, N., Nozawa, C., & Linhares, R. E. C. (2014). Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 5(3), 55-64.
- Fernandez-Garcia, M. D., Mazzon, M., Jacobs, M., & Amara, A. (2009). Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell host & microbe*, 5(4), 318-328.
- Macnamara, F. N. (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2), 139-145.
- ^aMansuy, J. M., Suberbielle, E., Chapuy-Regaud, S., Mengelle, C., Bujan, L., Marchou, B., ... & Martin-Blondel, G. (2016). Zika virus in semen and spermatozoa. *The Lancet Infectious diseases*, 16(10), 1106-1107.
- ^bMansuy, J. M., Dutertre, M., Mengelle, C., Fourcade, C., Marchou, B., Delobel, P., ... & Martin-Blondel, G. (2016). Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *Lancet Infect Dis*, 16(4), 405.

- Marcondes, C. B., & Ximenes, M. D. F. F. D. (2016). Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(1), 4-10.
- Martines, R. B., Bhatnagar, J., de Oliveira Ramos, A. M., Davi, H. P. F., Iglesias, S. D. A., Kanamura, C. T., ... & Ritter, J. (2016). Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *The Lancet*, 388(10047), 898-904.
- Massad, E., Tan, S. H., Khan, K., & Wilder-Smith, A. (2016). Estimated Zika virus importations to Europe by travellers from Brazil. *Global health action*, 9(1), 31669.
- Massad, E., Burattini, M. N., Khan, K., Struchiner, C. J., Coutinho, F. A. B., & Wilder-Smith, A. (2017). On the origin and timing of Zika virus introduction in Brazil. *Epidemiology & Infection*, 145(11), 2303-2312.
- Marchette, N. J., Garcia, R., & Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 18(3), 411-415.
- Meaney-Delman, D., Oduyebo, T., Polen, K. N., White, J. L., Bingham, A. M., Slavinski, S. A., ... & Olson, C. K. (2016). Prolonged detection of Zika virus RNA in pregnant women. *Obstetrics & Gynecology*, 128(4), 724-730.
- Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., ... & Couplier, M. (2017). Axl mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell reports*, 18(2), 324-333.
- Meltzer, E., Lustig, Y., Leshem, E., Levy, R., Gottesman, G., Weissmann, R., ... & Schwartz, E. (2016). Zika virus disease in traveler returning from Vietnam to Israel. *Emerging infectious diseases*, 22(8), 1521.
- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell host & microbe*, 21(2), 134-142.
- Miorin, L., Maiuri, P., & Marcello, A. (2016). Visual detection of Flavivirus RNA in living cells. *Methods*, 98, 82-90.
- Moore, C. A., Staples, J. E., Dobyns, W. B., Pessoa, A., Ventura, C. V., Da Fonseca, E. B., ... & Rasmussen, S. A. (2017). Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA pediatrics*, 171(3), 288-295.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13-22.
- ^aMusso, D., Nilles, E. J., & Cao-Lormeau, V. M. (2014). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), O595-O596.
- ^bMusso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., ... & Broult, J. (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance*, 19(14), 20761.
- ^dMusso, D. (2015). Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis*, 21(10), 1887.
- ^eMusso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V. M. (2015). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging infectious diseases*, 21(2), 359.

- Musso, D., Roche, C., Nhan, T. X., Robin, E., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V. M. (2015). Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology*, *68*, 53-55.
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clinical microbiology reviews*, *29*(3), 487-524.
- Musso, D., Richard, V., Teissier, A., Stone, M., Lanteri, M. C., Latoni, G., ... & ZIKV Study Group. (2017). Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. *Clinical Microbiology and Infection*, *23*(12), 1001-e1. Ng, W., Soto-Acosta, R., Bradrick, S., Garcia-Blanco, M., & Ooi, E. (2017). The 5' and 3' untranslated regions of the flaviviral genome. *Viruses*, *9*(6), 137.
- Neal, J. W. (2014). Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? *Journal of Infection*, *69*(3), 203-215.
- Nicastri, E., Castilletti, C., Liuzzi, G., Iannetta, M., Capobianchi, M. R., & Ippolito, G. (2016). Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Eurosurveillance*, *21*(32).
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., & Kriegstein, A. R. (2016). Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell stem cell*, *18*(5), 591-596.
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparc-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., ... & Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, *19*(9), 20720.
- Offerdahl, D. K., Dorward, D. W., Hansen, B. T., & Bloom, M. E. (2017). Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and *Aedes albopictus* cell lines. *Virology*, *501*, 54-62.
- Oliveira, D. B., Almeida, F. J., Durigon, E. L., Mendes, É. A., Braconi, C. T., Marchetti, I., ... & Melo, S. R. (2016). Prolonged shedding of Zika virus associated with congenital infection. *New England Journal of Medicine*, *375*(12), 1202-1204.
- Oliveira, D., Durigon, G., Mendes, É., Ladner, J., Andreato-Santos, R., Araujo, D., ... & Braconi, C. (2018). Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System. *Viruses*, *10*(11), 615.
- Olson, J. G., & Ksiazek, T. G. (1981). Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *75*(3), 389-393.
- Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., & Amara, A. (2013). Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses*, *6*(1), 69-88.
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika virus. *New England Journal of Medicine*, *374*(16), 1552-1563.
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2018). The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature*, *560*(7720), 573.
- Posen, H. J., Keystone, J. S., Gubbay, J. B., & Morris, S. K. (2016). Epidemiology of Zika virus, 1947–2007. *BMJ global health*, *1*(2), e000087.
- Pyke, A. T., Daly, M. T., Cameron, J. N., Moore, P. R., Taylor, C. T., Hewitson, G. R., ... & Gair, R. (2014). Imported Zika virus infection from the Cook Islands into Australia, 2014. *PLoS currents*, *6*.

- Quicke, K. M., Bowen, J. R., Johnson, E. L., McDonald, C. E., Ma, H., O'Neal, J. T., ... & Schinazi, R. F. (2016). Zika virus infects human placental macrophages. *Cell host & microbe*, 20(1), 83-90.
- Schuler-Faccini, L. (2016). Possible association between Zika virus infection and microcephaly—Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 65.
- Schwartz, D. A. (2016). Autopsy and postmortem studies are concordant: pathology of Zika virus infection is neurotropic in fetuses and infants with microcephaly following transplacental transmission. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(1), 68-72.
- Shen, S., Shi, J., Wang, J., Tang, S., Wang, H., Hu, Z., & Deng, F. (2016). Phylogenetic analysis revealed the central roles of two African countries in the evolution and worldwide spread of Zika virus. *Virologica Sinica*, 31(2), 118-130.
- Sheridan, M. A., Yunusov, D., Balaraman, V., Alexenko, A. P., Yabe, S., Verjovski-Almeida, S., ... & Roberts, R. M. (2017). Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), E1587-E1596.
- Simister, N. E. (2003). Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*, 21(24), 3365-3369.
- Simpson, D. I. H. (1964). Zika virus infection in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(4), 335-338.
- Simonin, Y., Loustalot, F., Desmetz, C., Foulongne, V., Constant, O., Fournier-Wirth, C., ... & Maquart, M. (2016). Zika virus strains potentially display different infectious profiles in human neural cells. *EBioMedicine*, 12, 161-169.
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika virus structure, maturation, and receptors. *The Journal of infectious diseases*, 216 (suppl_10), S935-S944.
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of neuroimmunology*, 308, 50-64.
- Sotelo, J. R., Sotelo, A. B., Sotelo, F. J., Doi, A. M., Pinho, J. R., de Cassia Oliveira, R., ... & Romano, C. M. (2017). Persistence of Zika virus in breast milk after infection in late stage of pregnancy. *Emerging infectious diseases*, 23(5), 854.
- Souza, W. V. D., Araújo, T. V. B. D., Albuquerque, M. D. F. P. M., Braga, M. C., Ximenes, R. A. D. A., Miranda-Filho, D. D. B., ... & Santos, R. H. (2016). Microcephaly in Pernambuco State, Brazil: epidemiological characteristics and evaluation of the diagnostic accuracy of cutoff points for reporting suspected cases. *Cadernos de saude publica*, 32(4).
- Spencer, J. L., Lahon, A., Tran, L. L., Arya, R. P., Kneubehl, A. R., Vogt, M. B., ... & Rico-Hesse, R. R. (2017). Replication of Zika virus in human prostate cells: a potential source of sexually transmitted virus. *The Journal of infectious diseases*, 217(4), 538-547.
- Steele, R. W. (2016). Zika virus: an explosive pandemic and a new TORCH agent. *Clinical pediatrics*, 55(8), 698-700.
- Suy, A., Sulleiro, E., Rodó, C., Vázquez, É., Bocanegra, C., Molina, I., ... & Carreras, E. (2016). Prolonged Zika virus viremia during pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 375(26), 2611-2613.

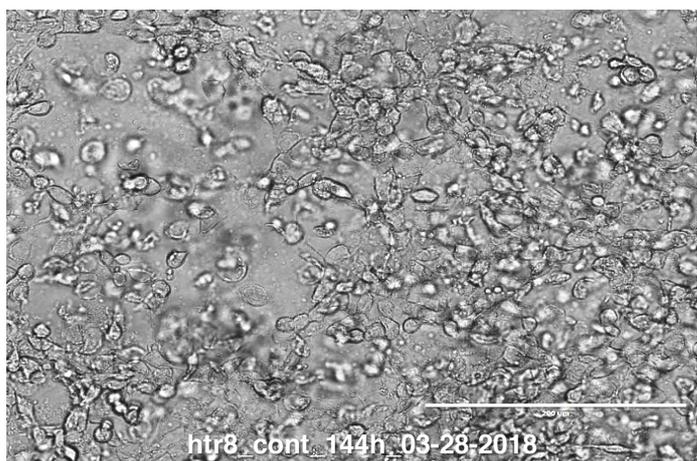
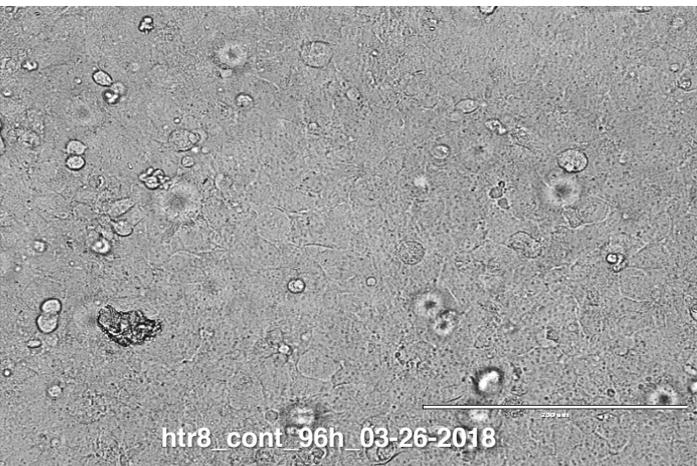
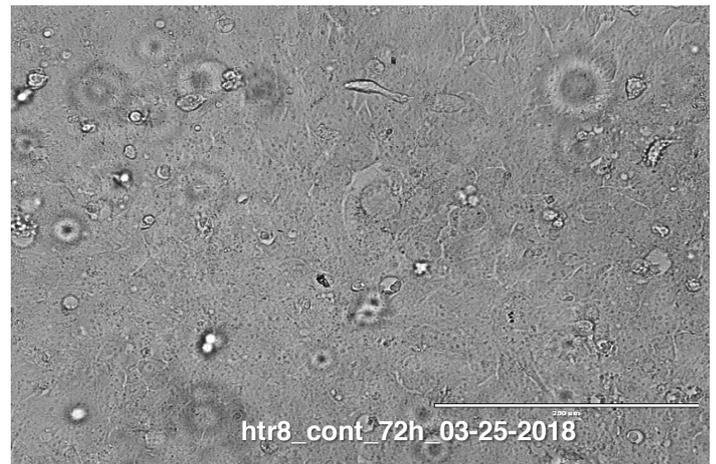
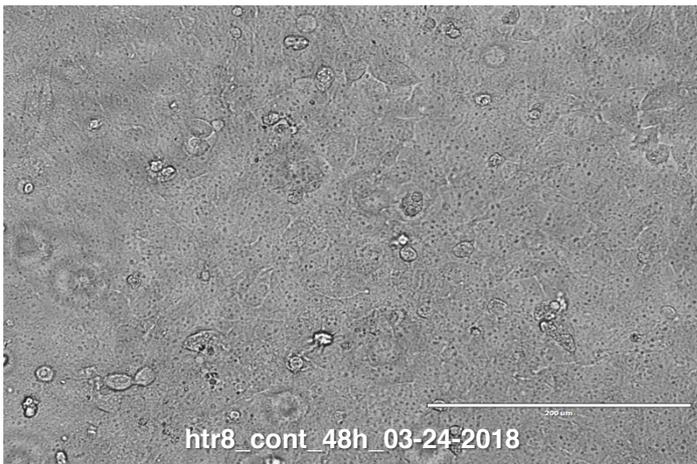
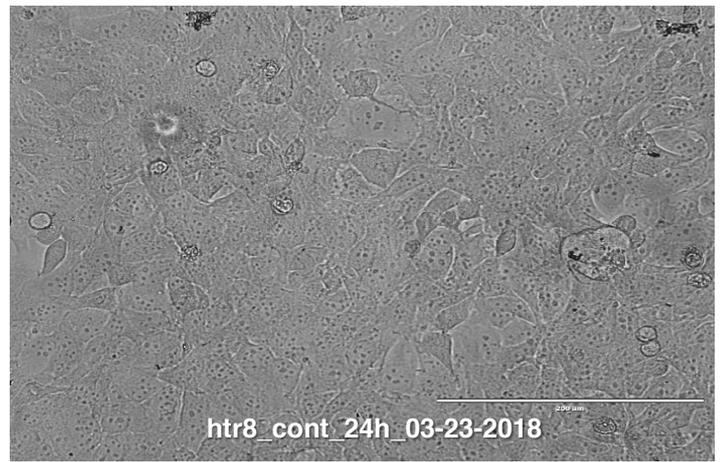
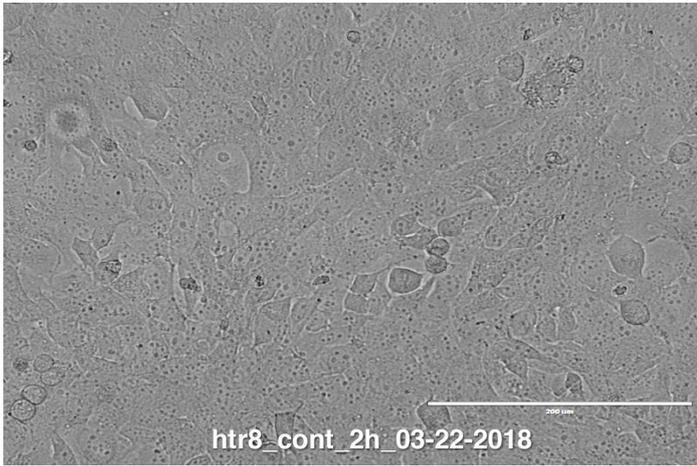
- Tabata, T., Pettitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Wang, C., Fang-Hoover, J., ... & Pereira, L. (2016). Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. *Cell host & microbe*, 20(2), 155-166.
- Tappe, D., Rissland, J., Gabriel, M., Emmerich, P., Günther, S., Held, G., ... & Schmidt-Chanasit, J. (2014). First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Eurosurveillance*, 19(4), 20685.
- Timenetsky, J., Santos, L. M., Buzinhani, M., & Mettifogo, E. (2006). Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Brazilian journal of medical and biological research*, 39(7), 907-914.
- [ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity](https://viralzone.expasy.org/6756). Hulo C, de Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoch A, Xenarios I, Le Mercier P. *Nucleic Acids Res.*, 2011. Jan; 39 (Database issue): D576-82. Disponível em: < <https://viralzone.expasy.org/6756>>. Acesso em: 11 set. 2019.
- Visseaux, B., Mortier, E., Houhou-Fidouh, N., Brichler, S., Collin, G., Larrouy, L., ... & Descamps, D. (2016). Zika virus in the female genital tract. *The Lancet infectious diseases*, 16(11), 1220.
- Vouga, M., & Baud, D. (2016). Imaging of congenital Zika virus infection: the route to identification of prognostic factors. *Prenatal diagnosis*, 36(9), 799-811. Vouga, M., & Baud, D. (2016). Imaging of congenital Zika virus infection: the route to identification of prognostic factors. *Prenatal diagnosis*, 36(9), 799-811.
- Wang, L., Valderramos, S. G., Wu, A., Ouyang, S., Li, C., Brasil, P., ... & Aliyari, R. (2016). From mosquitos to humans: genetic evolution of Zika virus. *Cell host & microbe*, 19(5), 561-565.
- Weaver, S. C., & Barrett, A. D. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 789.
- ^aWeaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., ... & Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral research*, 130, 69-80.
- Wells, M. F., Salick, M. R., Wiskow, O., Ho, D. J., Worringer, K. A., Ihry, R. J., ... & Kane, L. T. (2016). Genetic ablation of AXL does not protect human neural progenitor cells and cerebral organoids from Zika virus infection. *Cell stem cell*, 19(6), 703-708.
- Wikan, N., & Smith, D. R. (2017). First published report of Zika virus infection in people: Simpson, not MacNamara. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(1), 15-17.
- World Health Organization (WHO). Joint FAO/WHO Expert Committee on Zoonoses, World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1959. Joint WHO/FAO Expert Committee on Zoonoses [meeting held in Stockholm from 11 to 16 August 1958]: second report, 1959. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/40435>>. Acesso em: 11 set. 2019.
- World Health Organization (WHO). Scientific Group on Arboviruses and Human Disease & World Health Organization. Arboviruses and human disease: report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 26 September to 1 October 1966], 1967. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/40664>>. Acesso em: 11 set. 2019.

- World Health Organization (WHO). WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations, 2016. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/news-room/detail/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations)>. Acesso em: 11 set. 2019.
- Yadav, R. K., Maity, S., & Saha, S. (2014). A review on TORCH: groups of congenital infection during pregnancy. *J Sci In Res*, 3(2), 258-64.
- Yepez, J. B., Murati, F. A., Pettito, M., Peñaranda, C. F., de Yepez, J., Maestre, G., & Arevalo, J. F. (2017). Ophthalmic manifestations of congenital Zika syndrome in Colombia and Venezuela. *JAMA ophthalmology*, 135(5), 440-445.
- Zanluca, C., Melo, V. C. A. D., Mosimann, A. L. P., Santos, G. I. V. D., Santos, C. N. D. D., & Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569-572.
- Zammarchi, L., Tappe, D., Fortuna, C., Remoli, M. E., Günther, S., Venturi, G., ... & Schmidt-Chanasit, J. (2015). Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil, March 2015. *Eurosurveillance*, 20(23), 21153.
- Zhang, Q., Sun, K., Chinazzi, M., y Piontti, A. P., Dean, N. E., Rojas, D. P., ... & Bray, M. (2017). Spread of Zika virus in the Americas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(22), E4334-E4343.

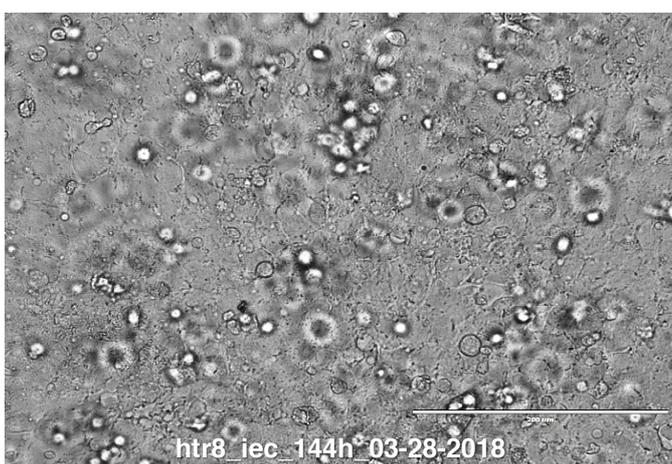
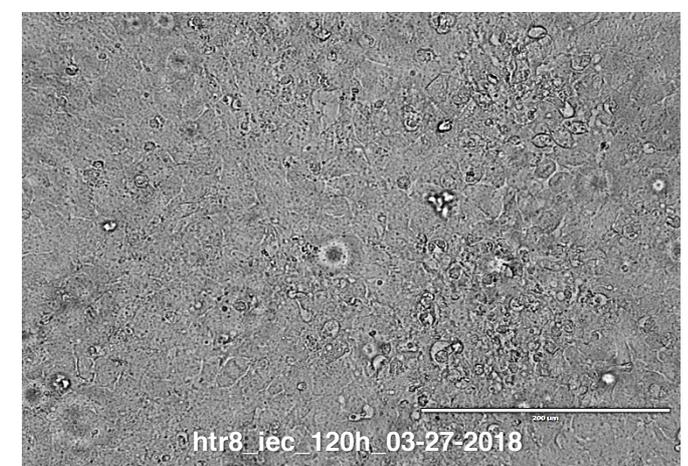
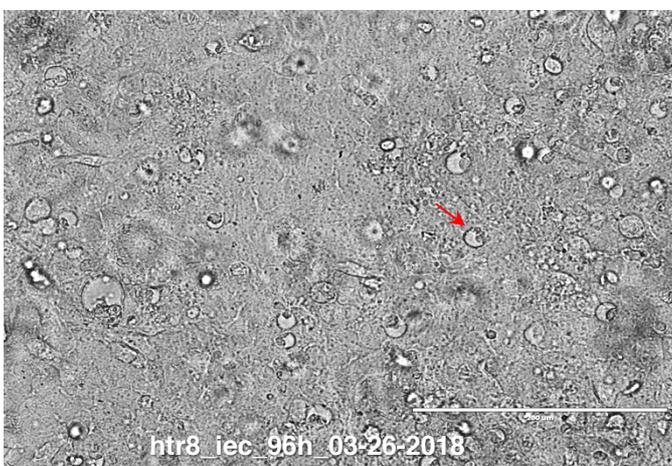
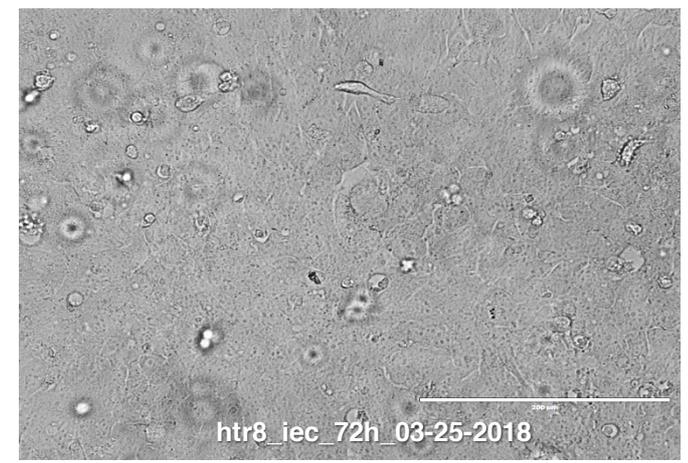
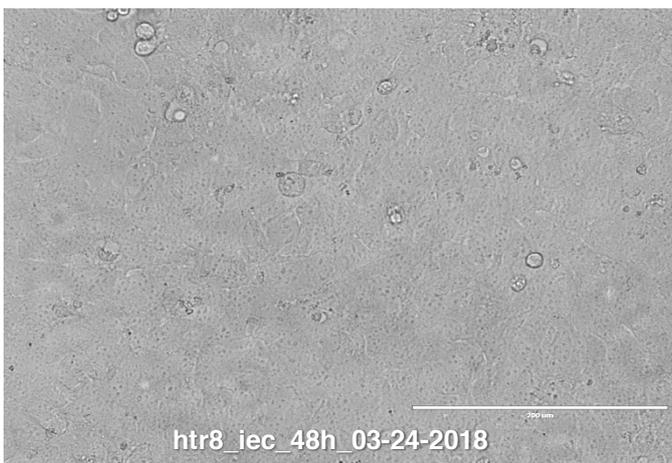
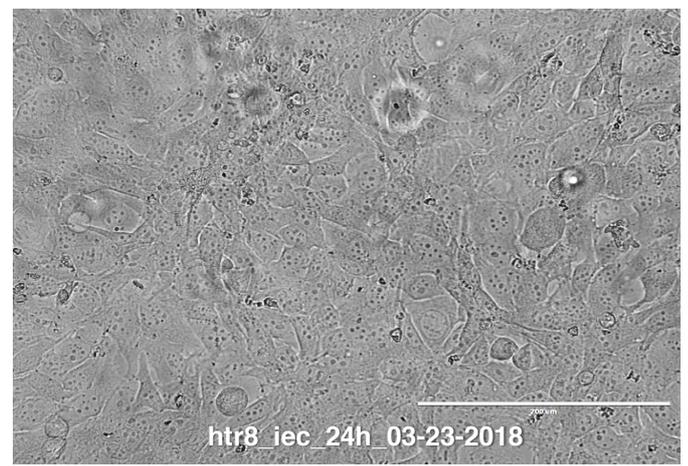
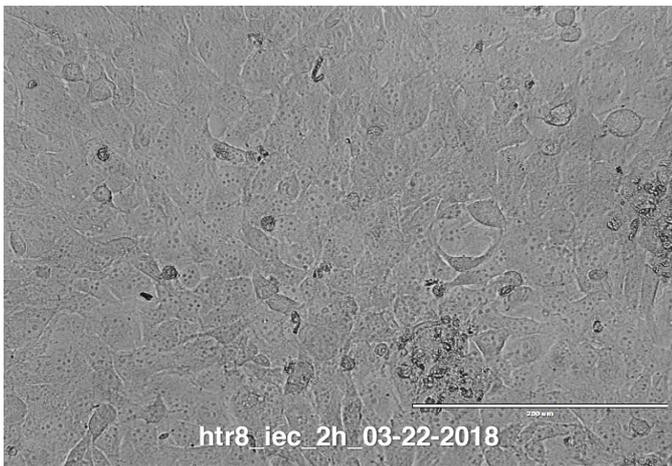
7 | APÊNDICE

7.1. Primeira série da Cinética Viral

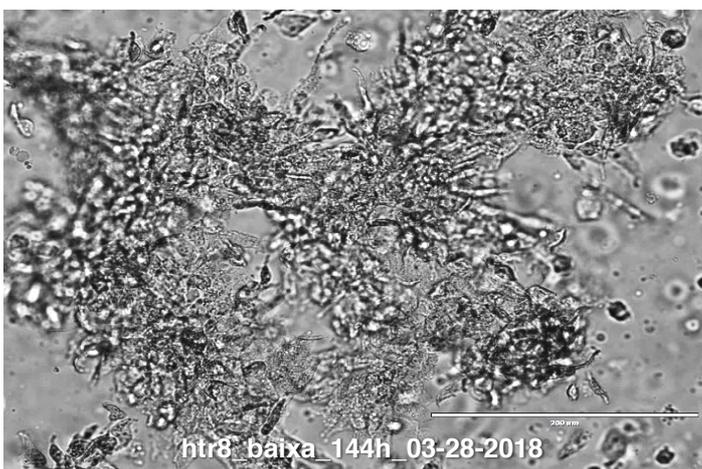
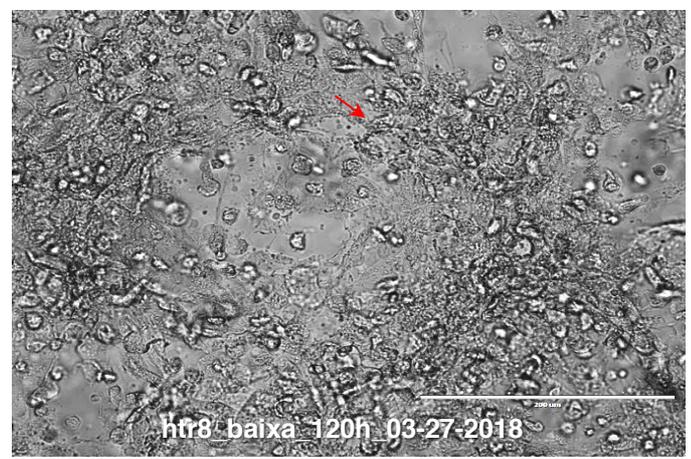
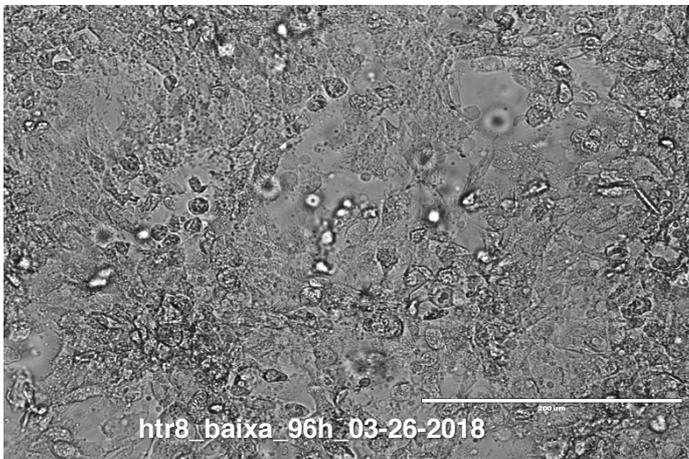
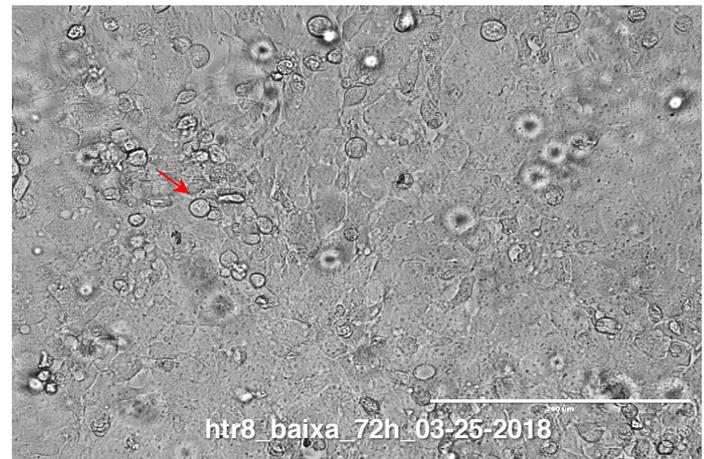
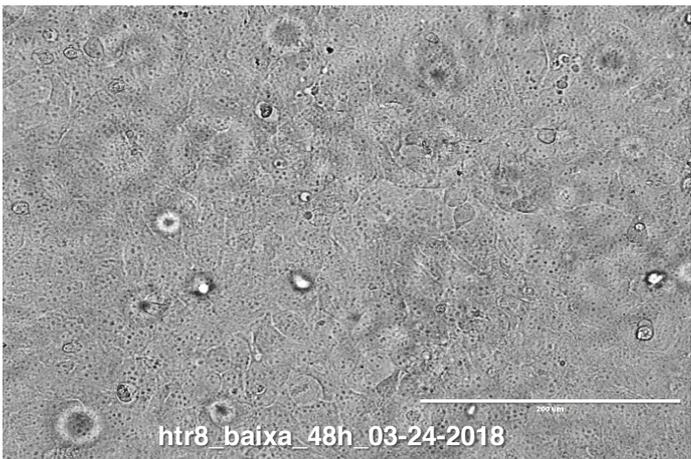
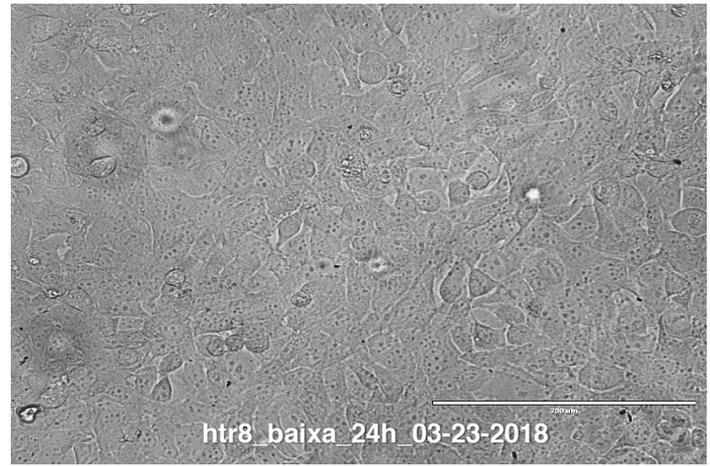
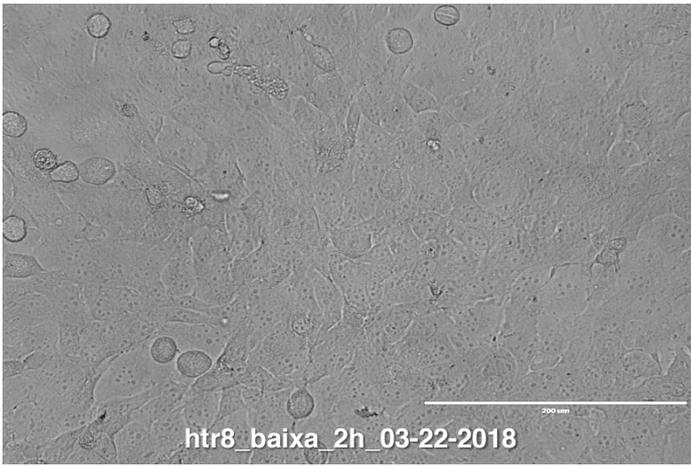
Microscopia óptica da cinética viral para os quatro tipos celulares: HTR-8, BeWo, BeWo tratado com forskolina e HuH-7. E inoculados com duas linhagens de ZIKV-IEC-Paraíba (Asiático-Brasileiro) e ZIKV-MR766bp (Africana). Para todas as cinéticas há o controle não inoculado que apresenta o crescimento celular para cada hora-após-infecção (hpi). A seta vermelha indica o efeito citopático observado durante os hpi. As imagens foram fotografadas no microscópio óptico de luz branca invertido com aumento de vinte vezes (200 μm).



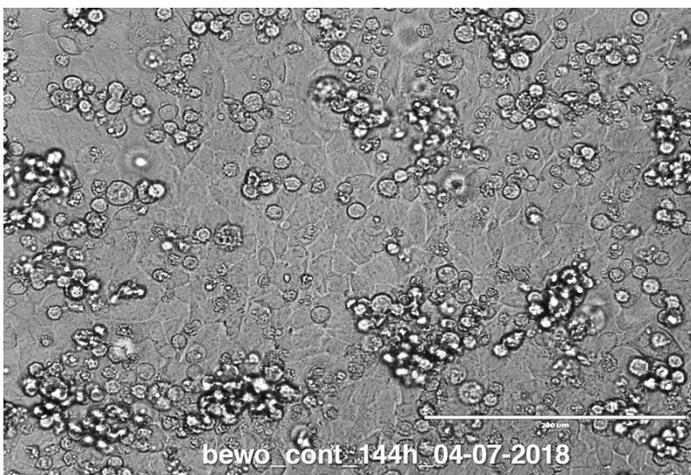
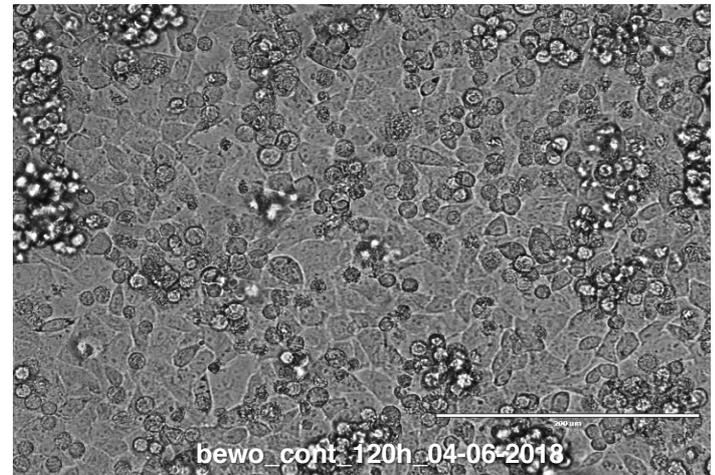
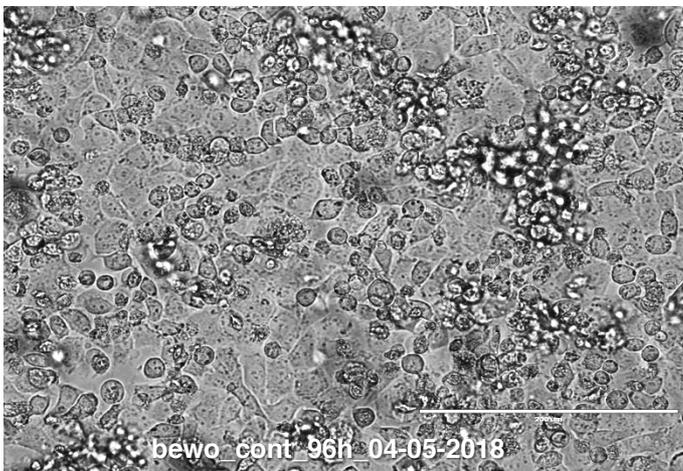
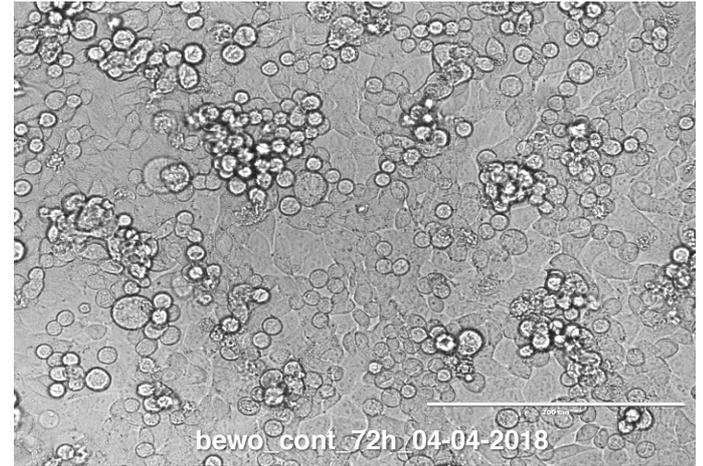
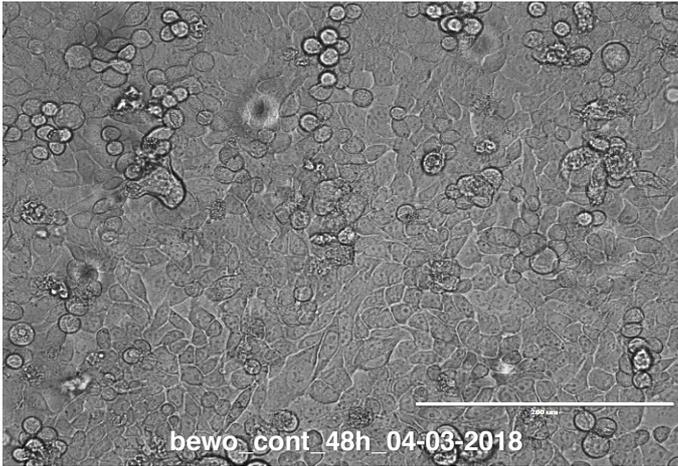
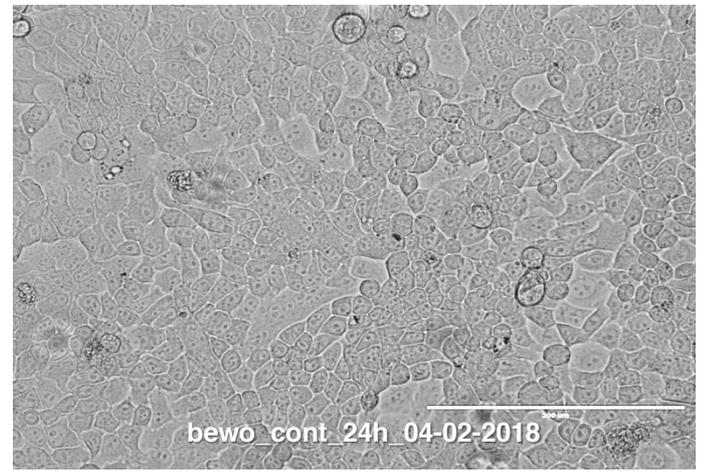
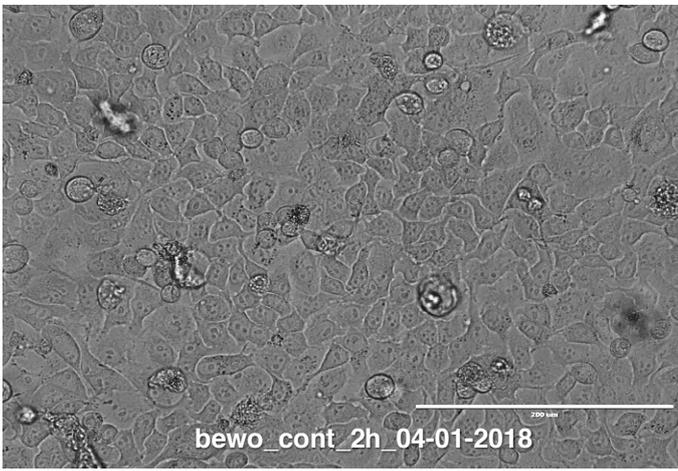
Cinética viral de **HTR-8 controle**. As imagens apresentam a evolução de crescimento da célula a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. O controle segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada com ZIKV-MR766 baixa passagem, linhagem Africana e ZIKV-IEC-Paraíba, linhagem Asiático-Brasileiro. A partir do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura. Até o hpi de 120h a monocamada se mantém íntegra. Com 144h há grande quantidade de células mortas no sobrenadante e o tapete celular se mantém parcialmente íntegro.



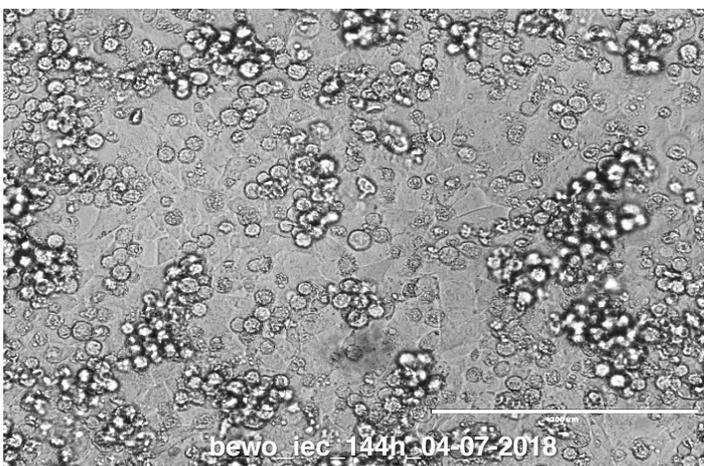
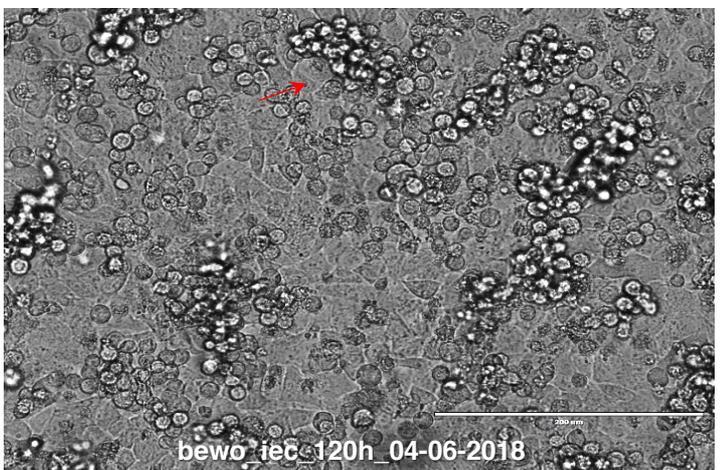
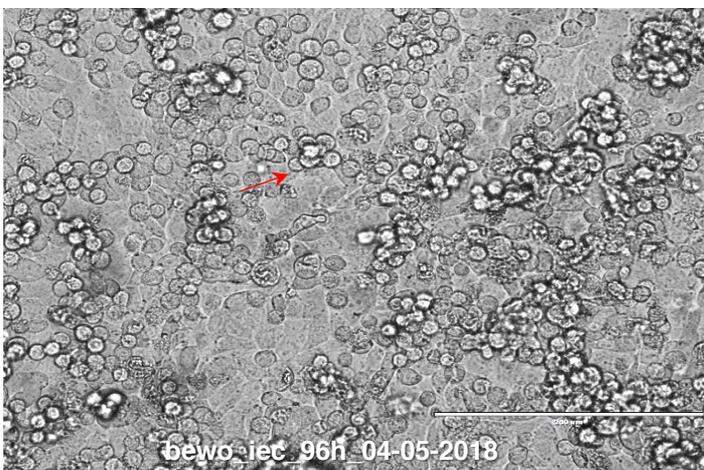
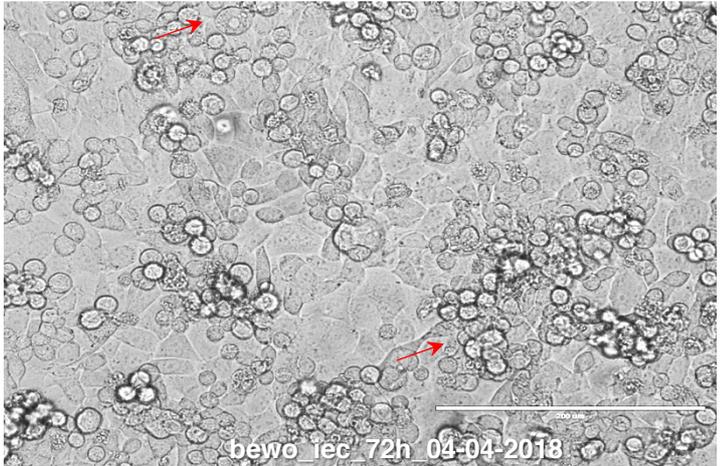
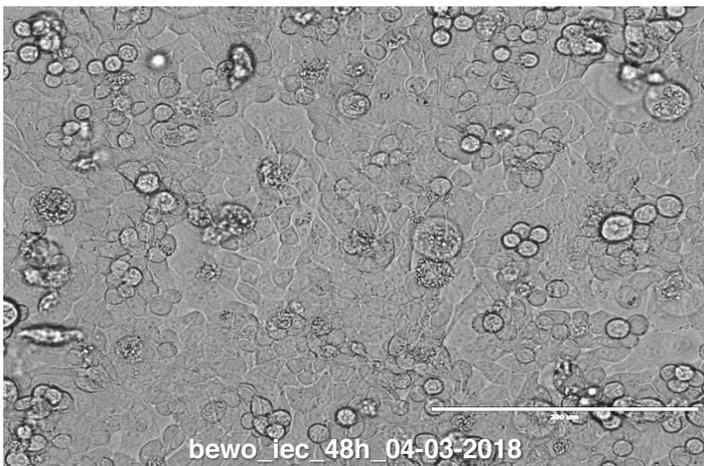
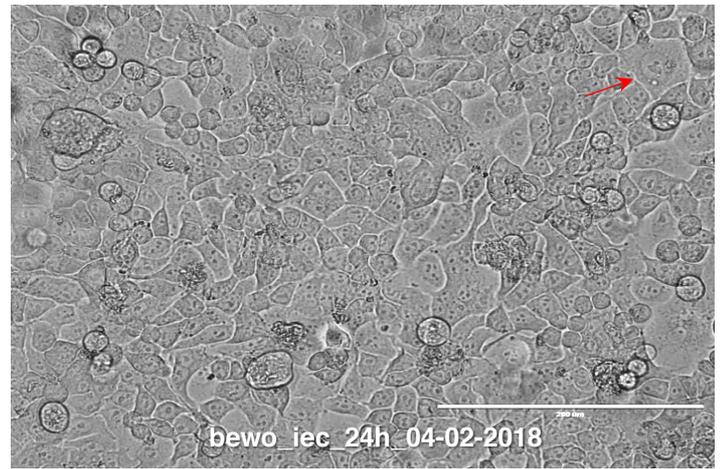
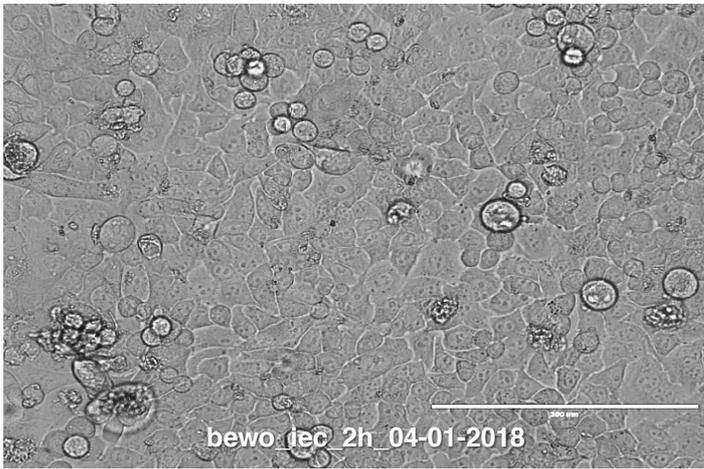
Cinética viral de **HTR-8 inoculado com ZIKV-IEC-Paraíba**. As imagens apresentam a inoculação a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. A cinética segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada. A seta vermelha aponta o efeito citopático observado. Do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura e sem evidências de infecção que segue até para o hpi de 72h. Do 96h até 144h há poucos sinais de efeito citopático. A monocamada de células se mantém íntegra para todos os hpi.



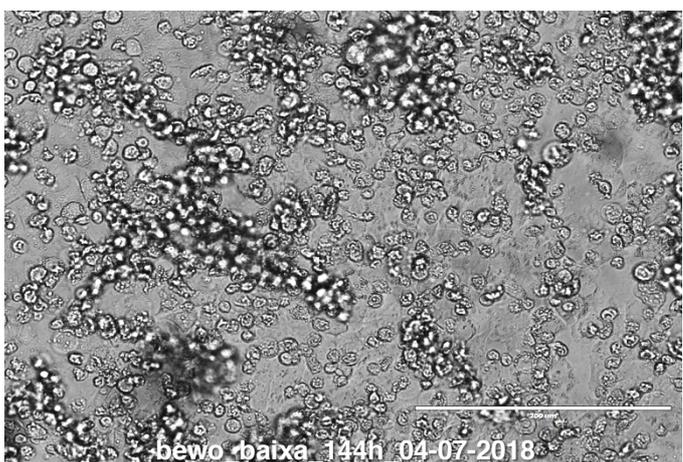
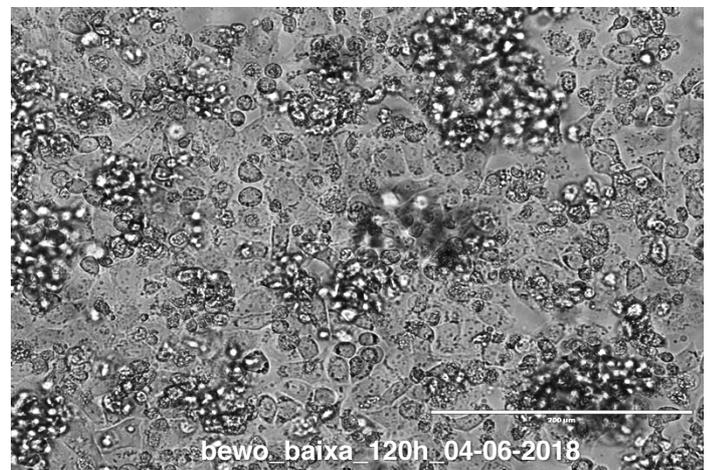
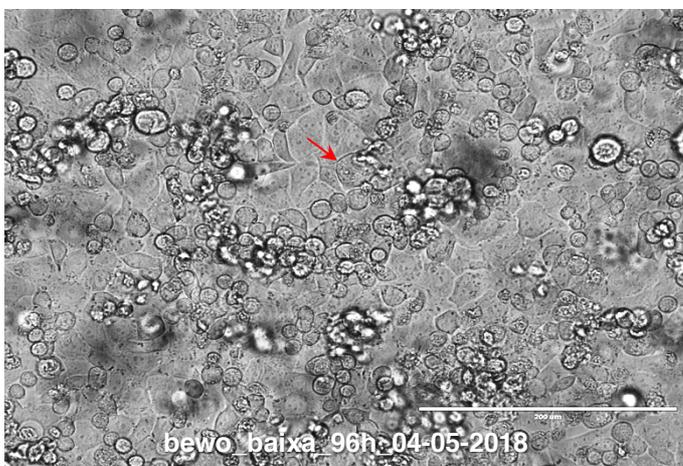
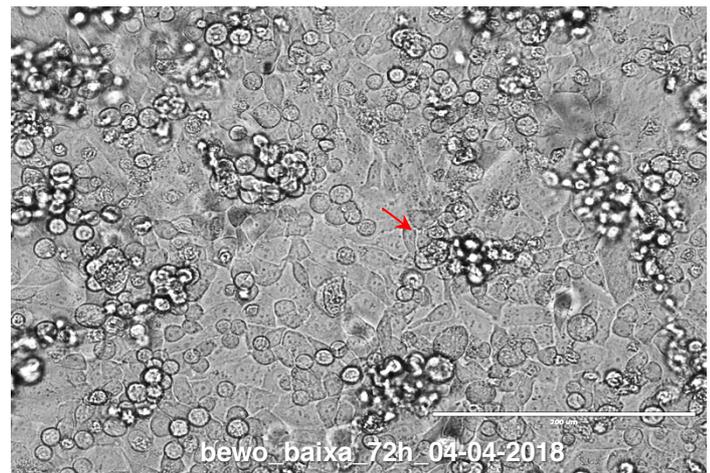
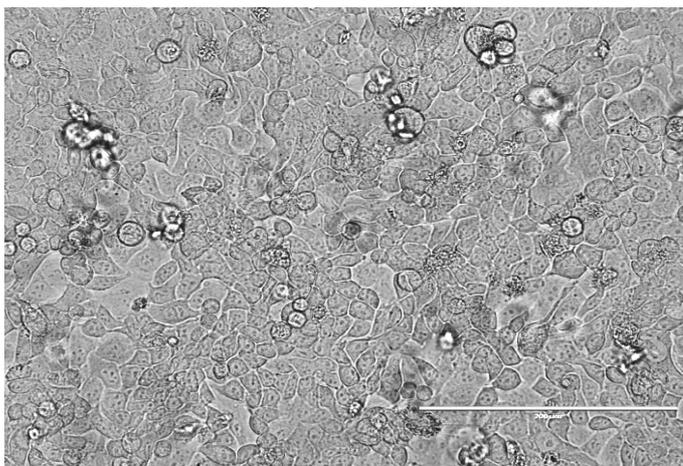
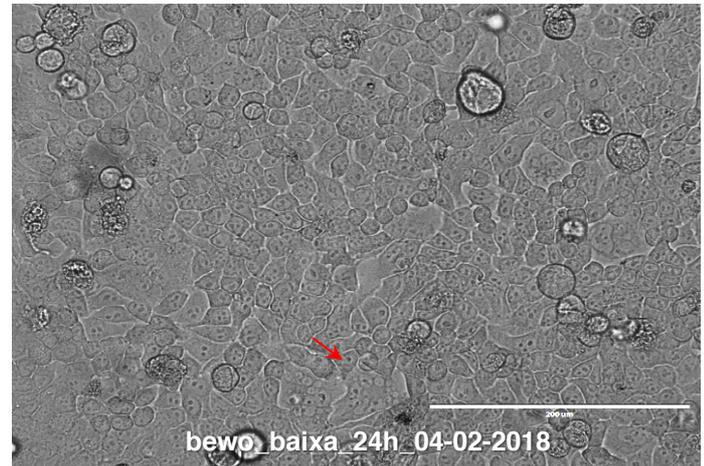
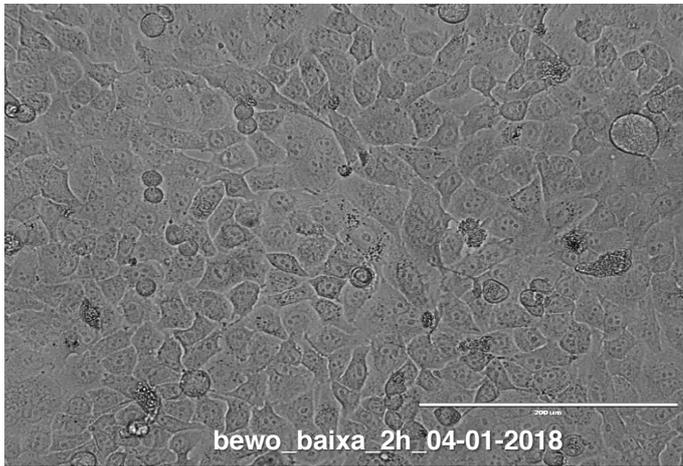
Cinética viral de **HTR-8 inoculado com ZIKV-MR766bp**. As imagens apresentam a inoculação a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. A cinética segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada. A seta vermelha aponta o efeito citopático observado. Do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura e sem evidências de infecção. Até o hpi de 48h não há sinais de infecção. A partir de 72h observa-se células mortas (arredondadas e refringentes) presentes no sobrenadante. A partir de 96h há uma acelerada degeneração monocamada celular e acúmulo de debris celular no sobrenadante. Hpi de 144h praticamente todas as células estão mortas.



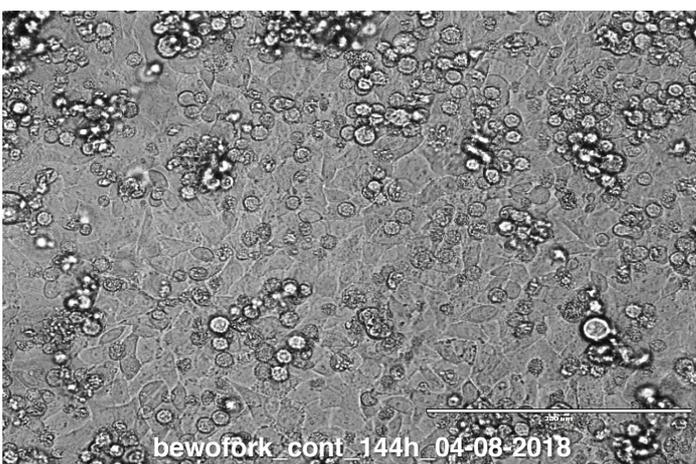
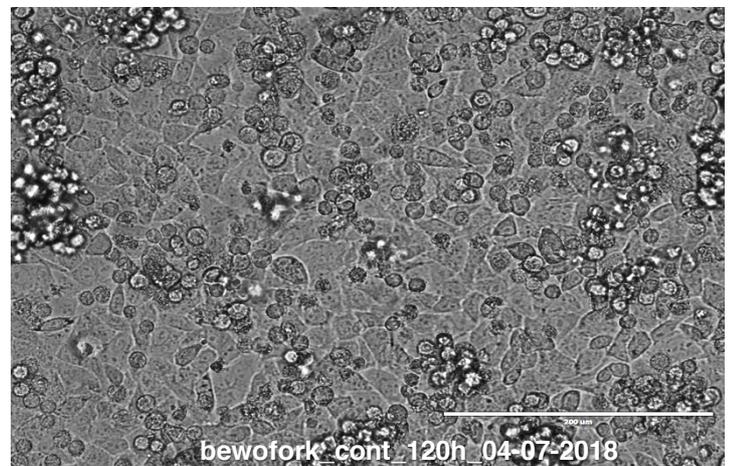
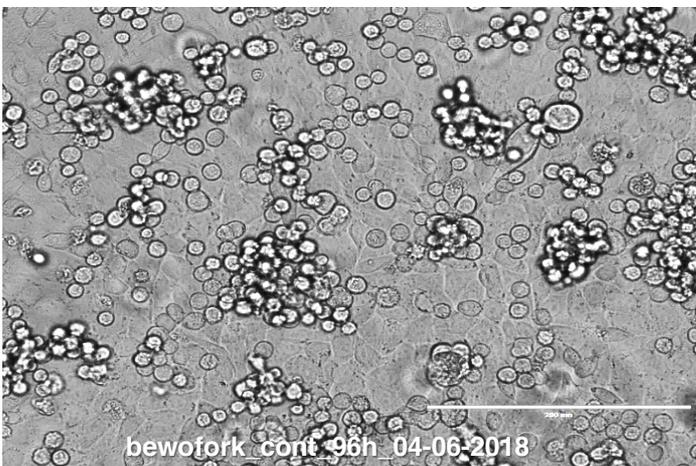
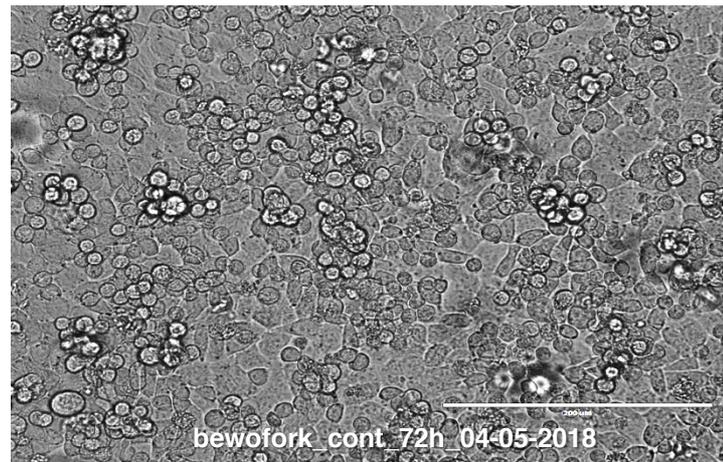
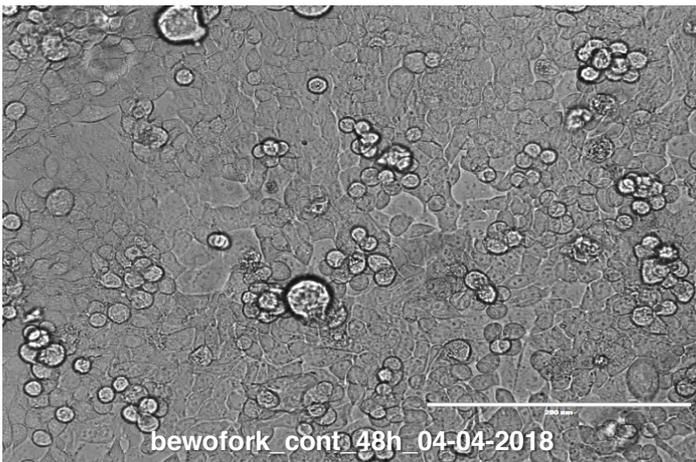
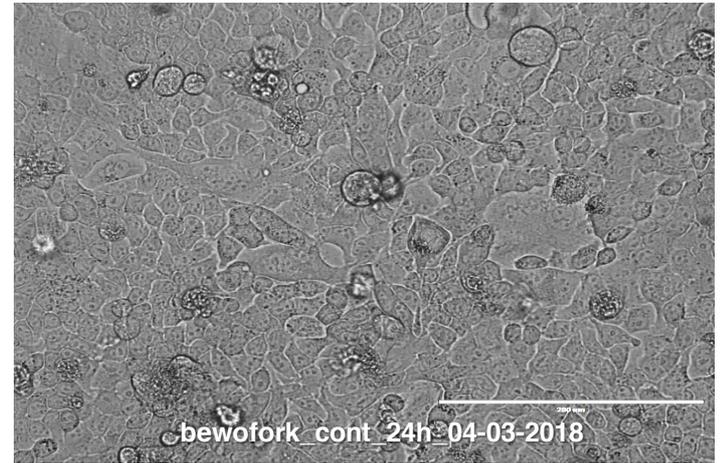
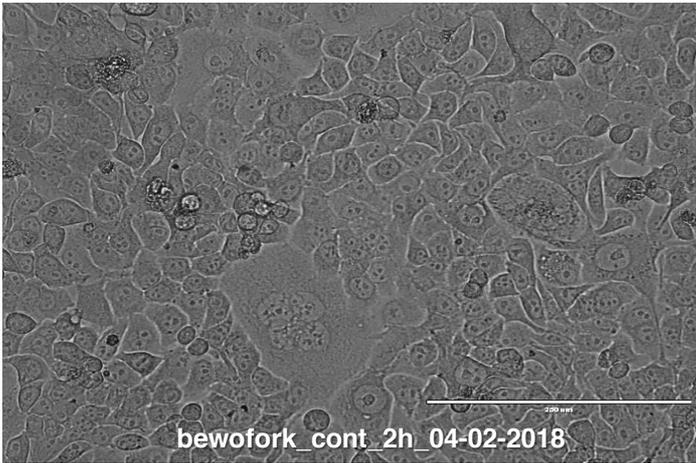
Cinética viral de **BeWo controle**. As imagens apresentam a evolução de crescimento da célula a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. O controle segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada com ZIKV-MR766 baixa passagem, linhagem Africana e ZIKV-IEC-Paraíba, linhagem Asiático-Brasileiro. A partir do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura. Nos hpi posteriores, as células arredondada e refringentes presentes na sobrecamada do tapete estão mortas. A monocamada de células se mantém íntegra até o último hpi.



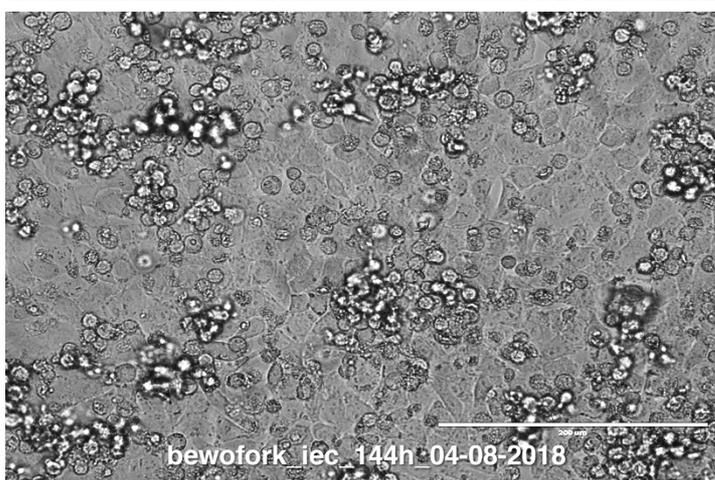
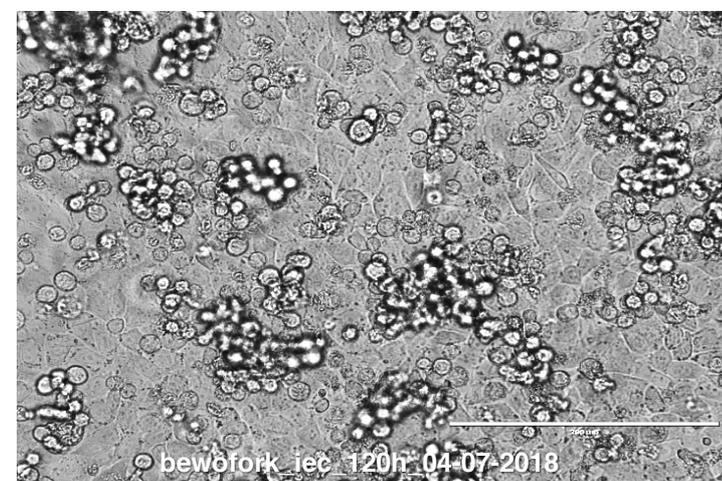
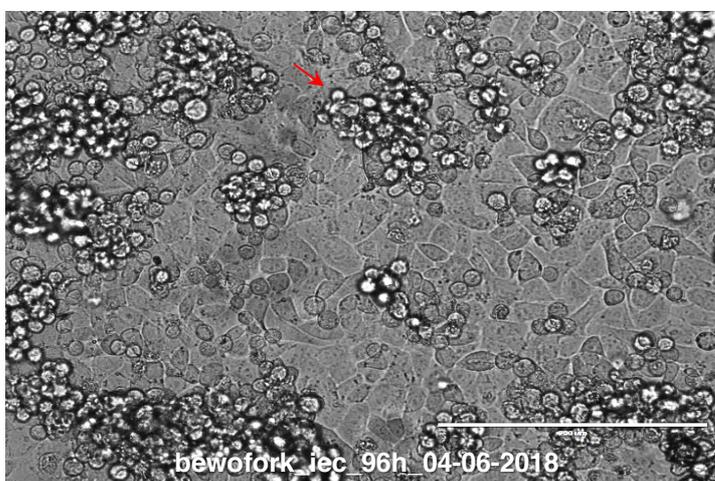
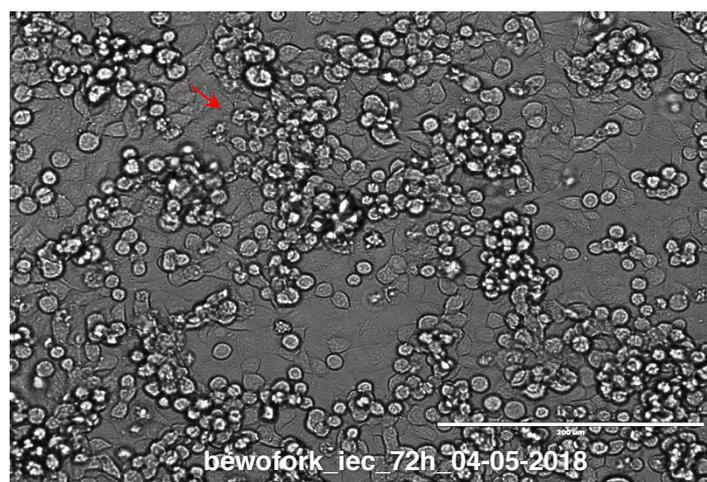
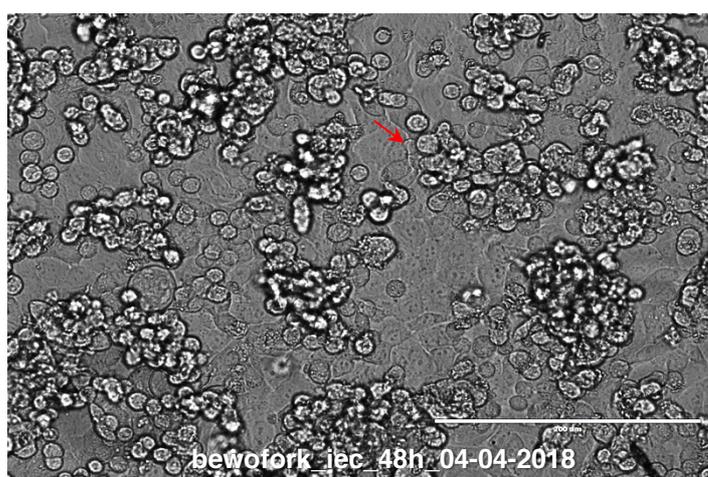
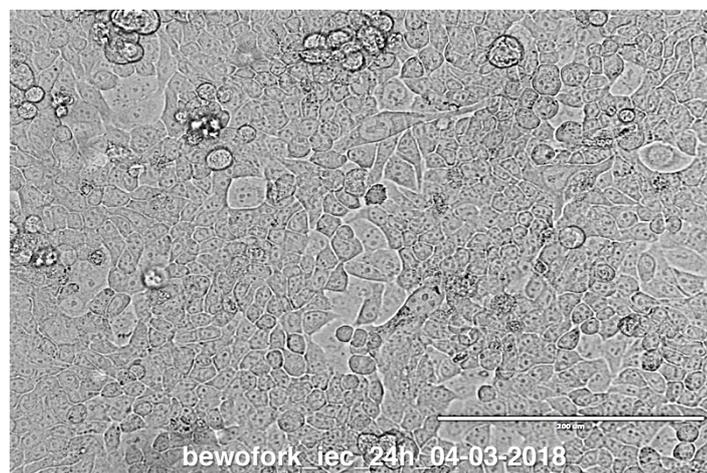
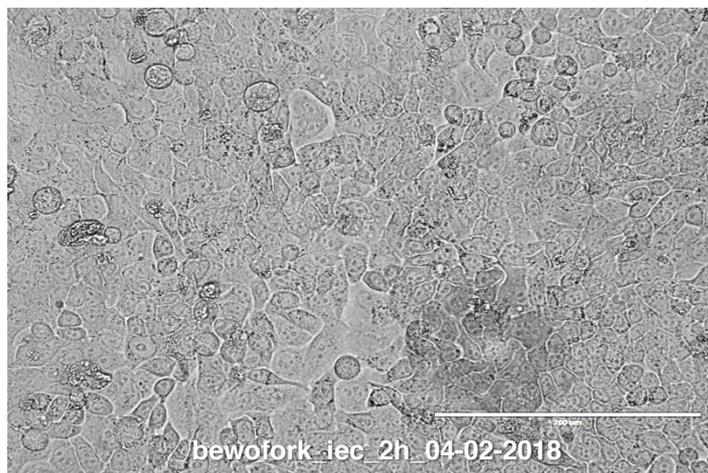
Cinética viral de **BeWo inoculado com ZIKV-IEC-Paraíba**. As imagens apresentam a inoculação a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. A cinética segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada. A seta vermelha aponta o efeito citopático observado. Do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura e sem evidências de infecção. A partir do hpi de 24h há sinais de efeito citopático. Nos hpi posteriores há células mortas (arredondadas e refringentes) presentes no sobrenadante e células com sinais de degeneração no tapete celular. A monocamada de células se mantém íntegra até o último hpi.



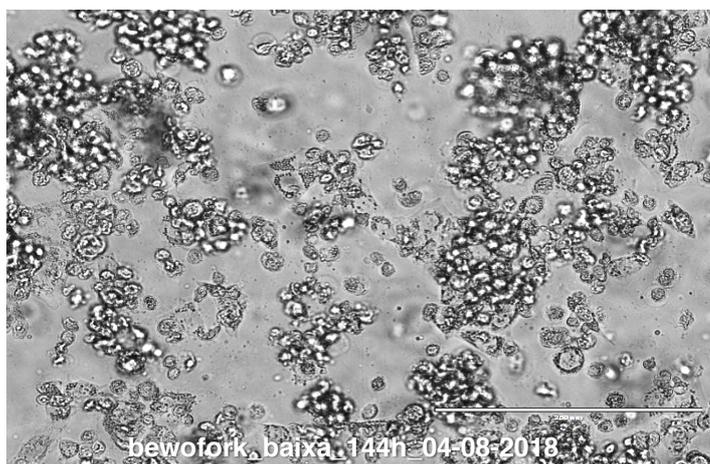
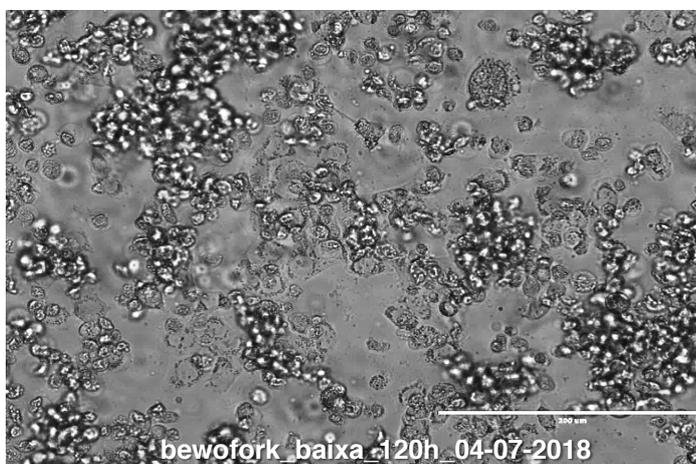
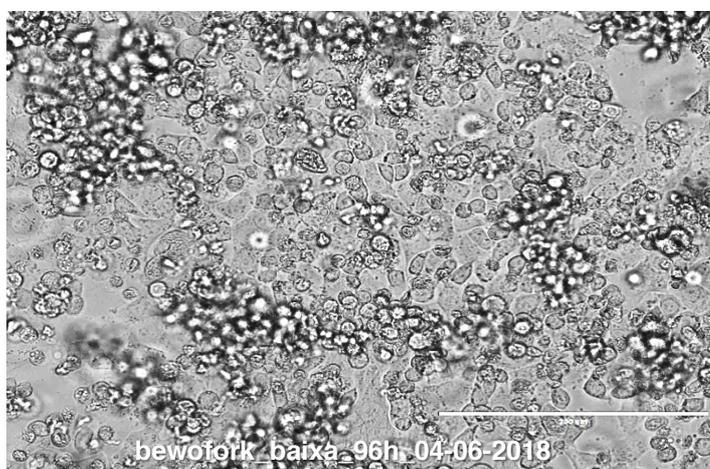
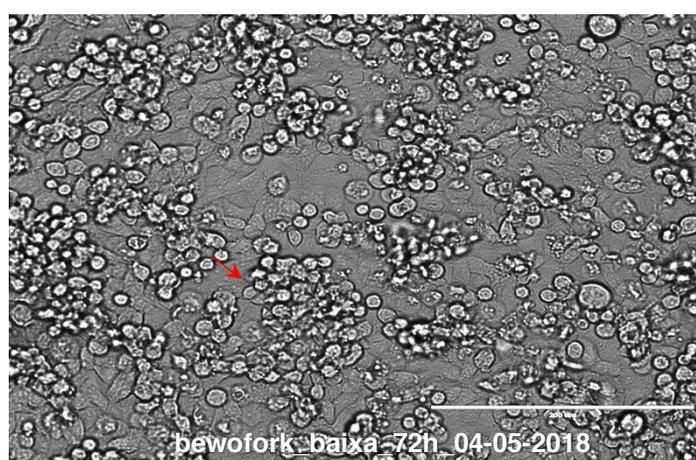
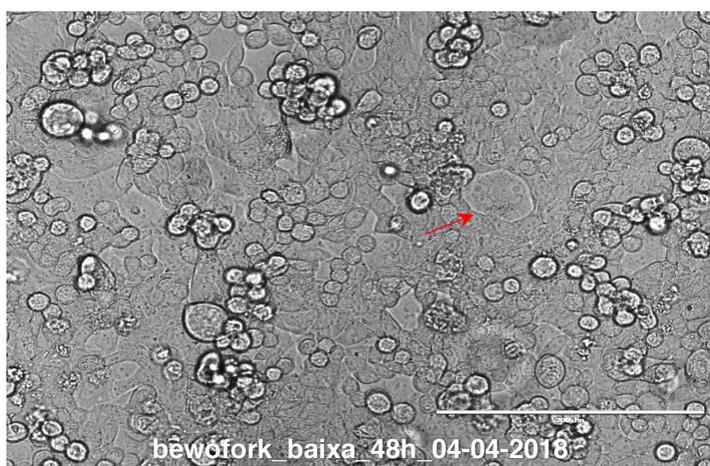
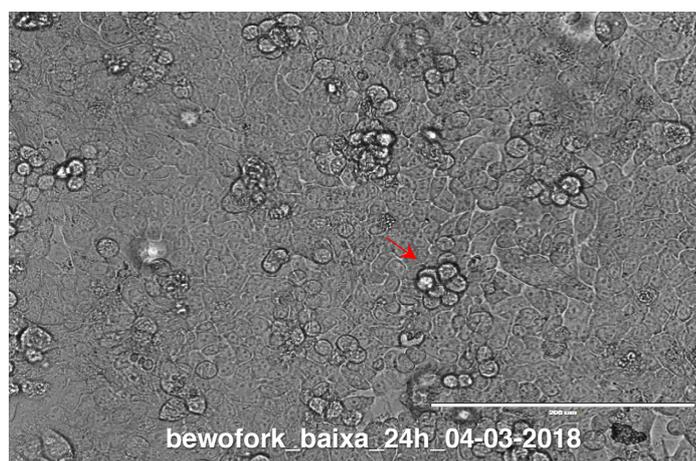
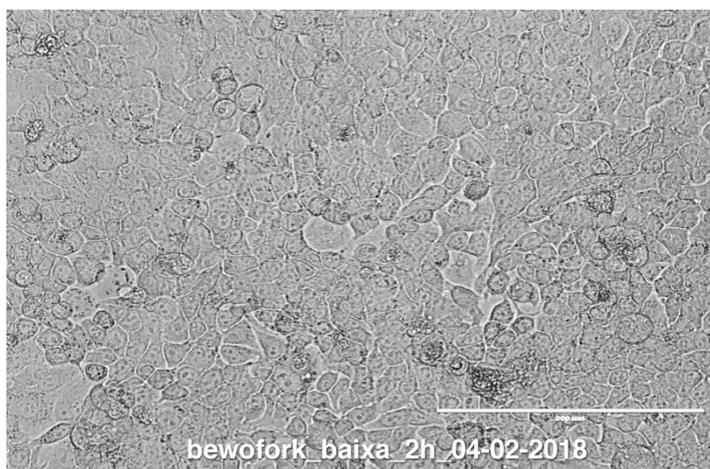
Cinética viral de **BeWo inoculado com ZIKV-MR766bp**. As imagens apresentam a inoculação a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. A cinética segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada. A seta vermelha aponta o efeito citopático observado. Do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura e sem evidências de infecção. A partir do hpi de 24h há sinais de efeito citopático. Nos hpi posteriores há células mortas (arredondadas e refringentes) presentes no sobrenadante e células com sinais de degeneração no tapete celular. A monocamada de células apresenta degeneração progressiva a partir do hpi de 96h.



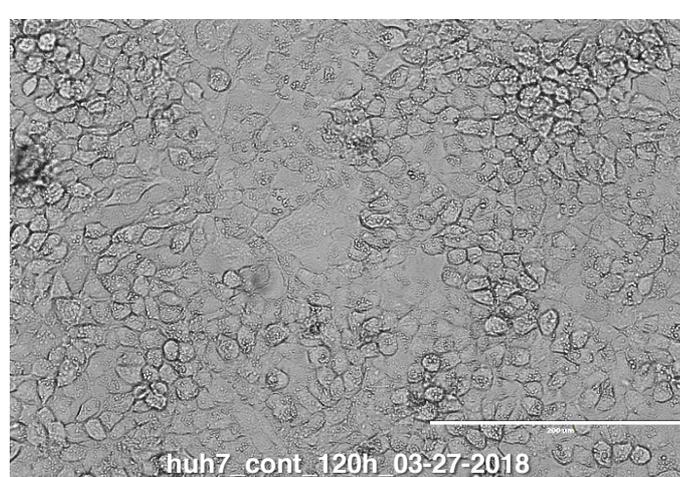
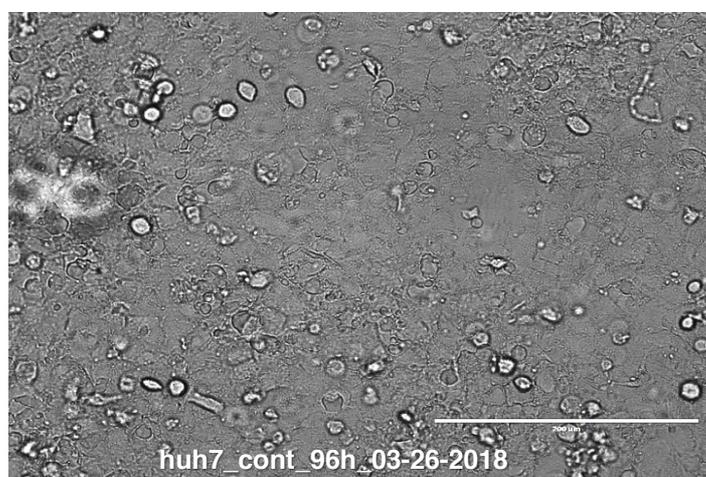
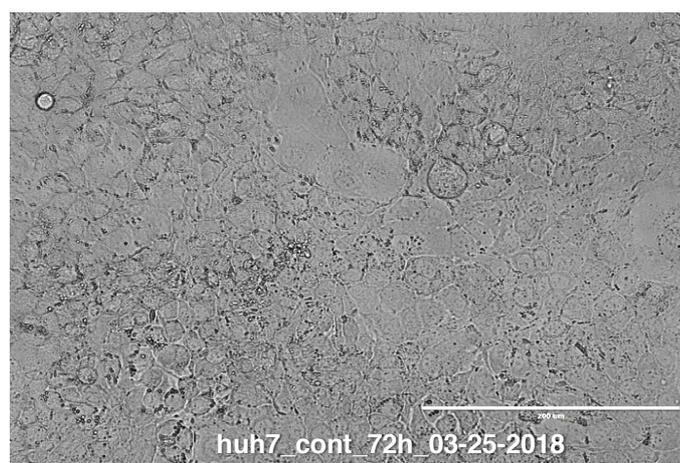
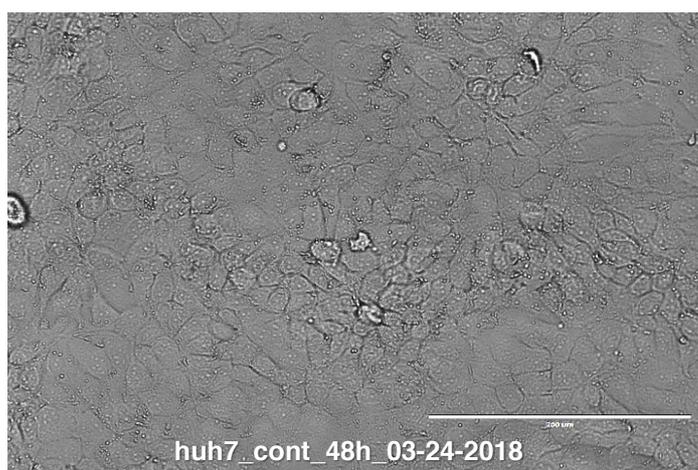
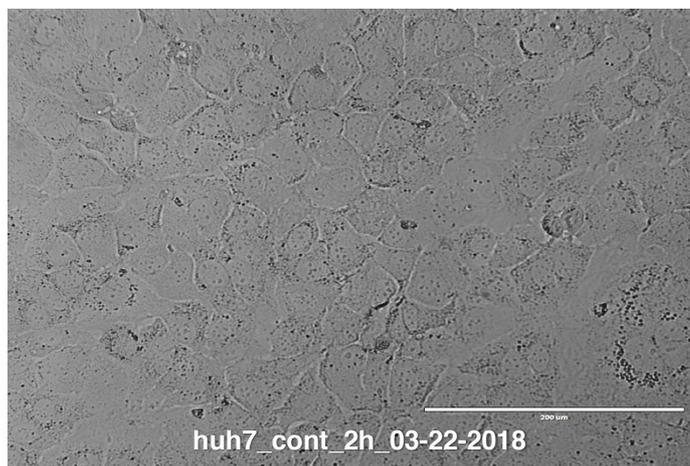
Cinética viral de **BeWo tratada com forskolina controle**. As imagens apresentam a evolução de crescimento da célula a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. O controle segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada com ZIKV-MR766 baixa passagem, linhagem Africana e ZIKV-IEC-Paraíba, linhagem Asiático-Brasileiro. A partir do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura. Nos hpi posteriores, as células arredondada e refringentes presentes na sobrecamada do tapete estão mortas. A monocamada de células se mantém íntegra até o último hpi.



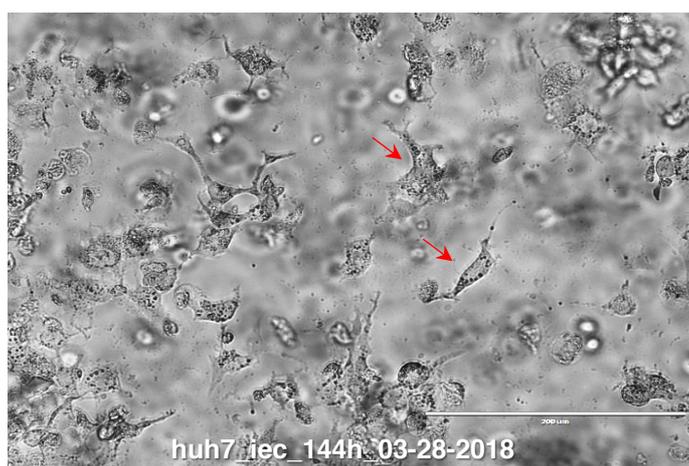
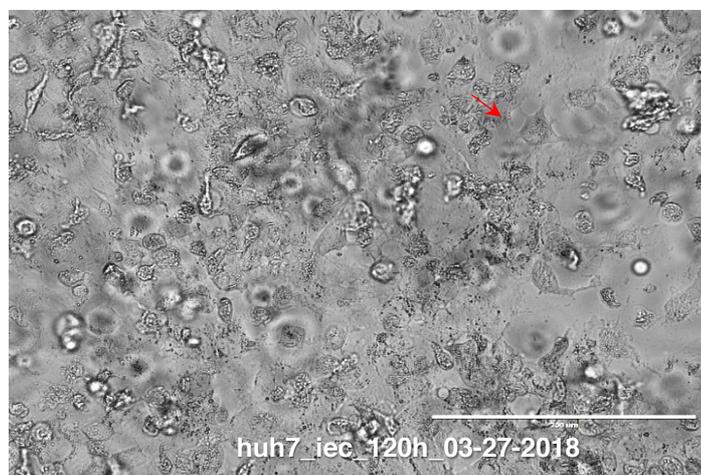
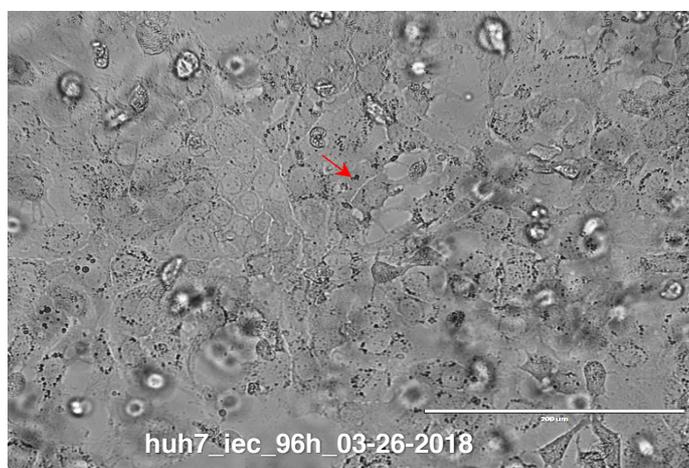
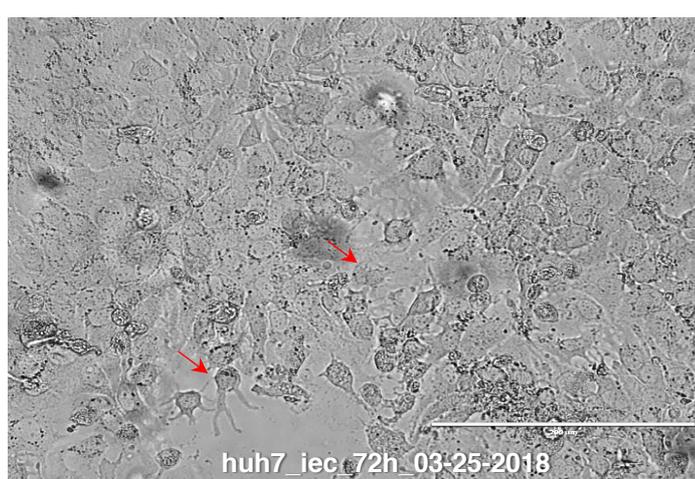
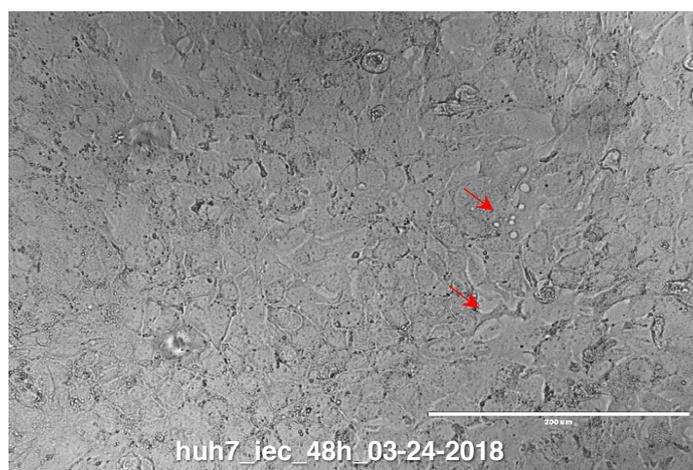
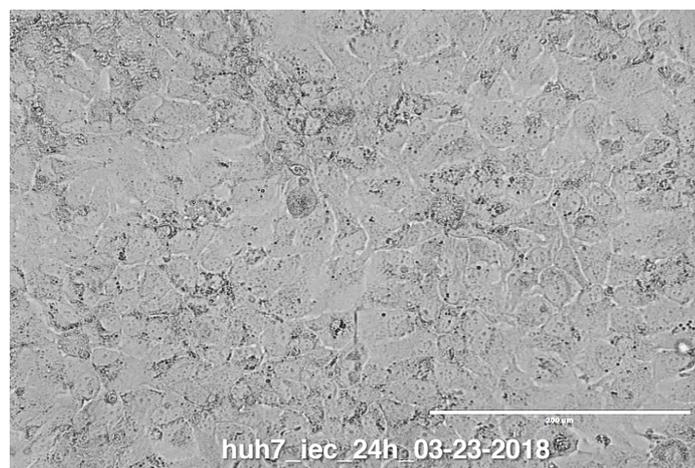
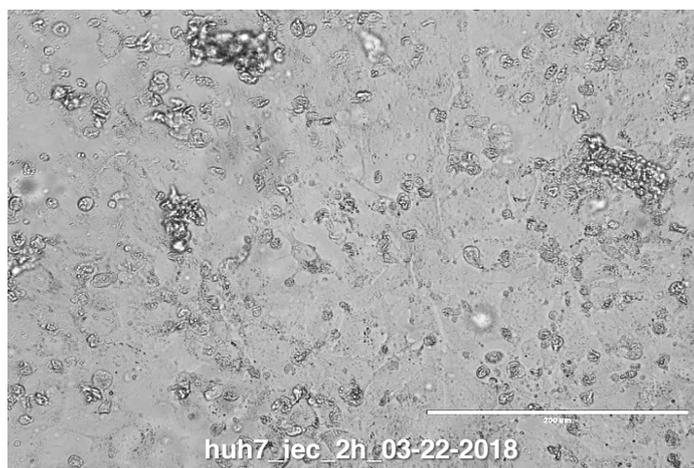
Cinética viral de **BeWo com forskolina inoculado com ZIKV-IEC-Paraíba**. As imagens apresentam a inoculação a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. A cinética segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada. A seta vermelha aponta o efeito citopático observado. Do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura e sem evidências de infecção. A partir do hpi de 24h há sinais de efeito citopático. Nos hpi posteriores há células mortas (arredondadas e refringentes) presentes no sobrenadante e células com sinais de degeneração no tapete celular. A monocamada de células se mantém íntegra até o último hpi.



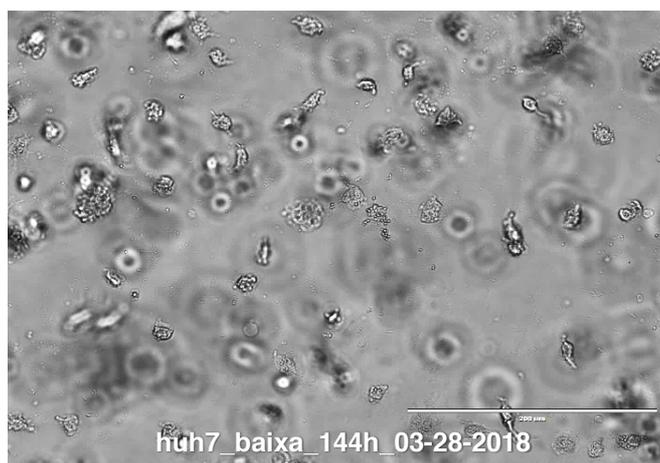
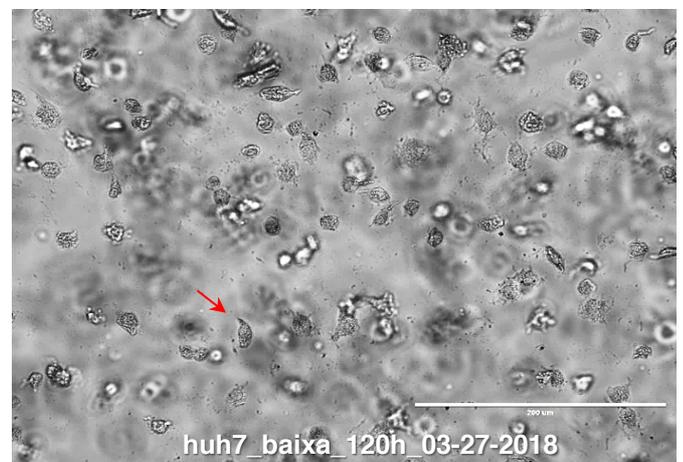
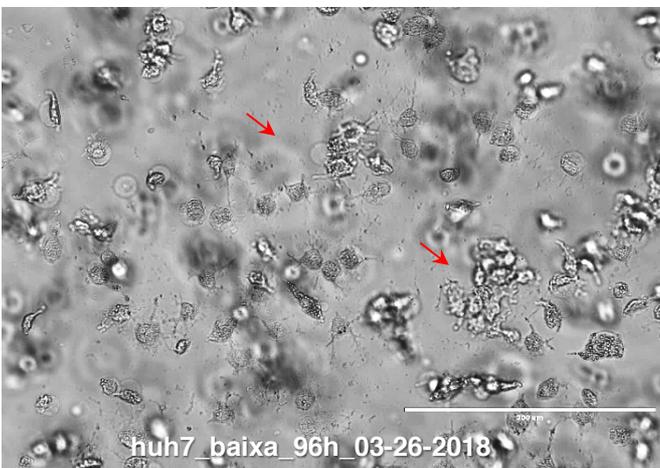
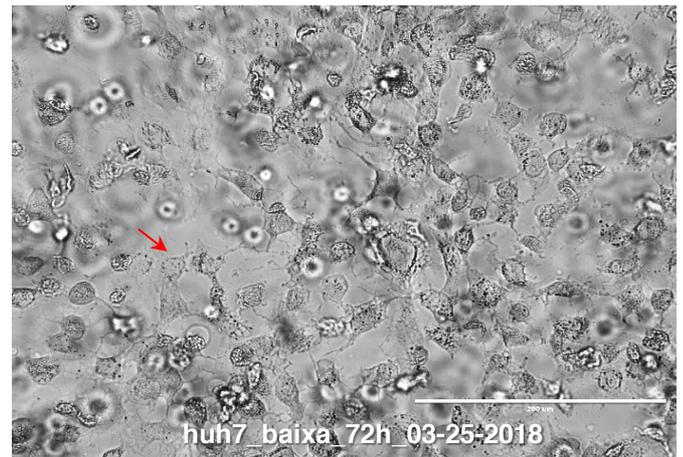
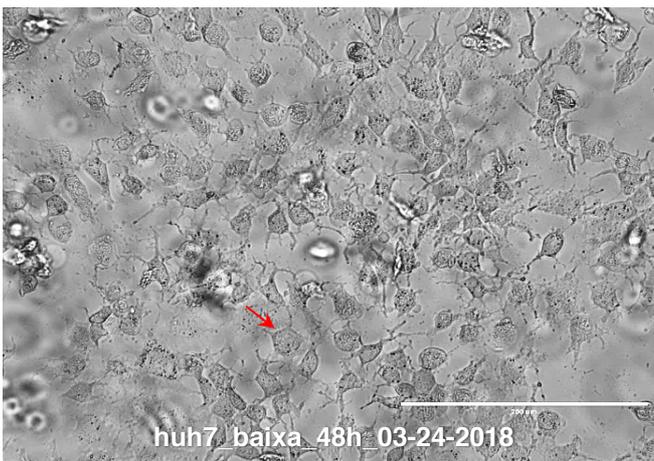
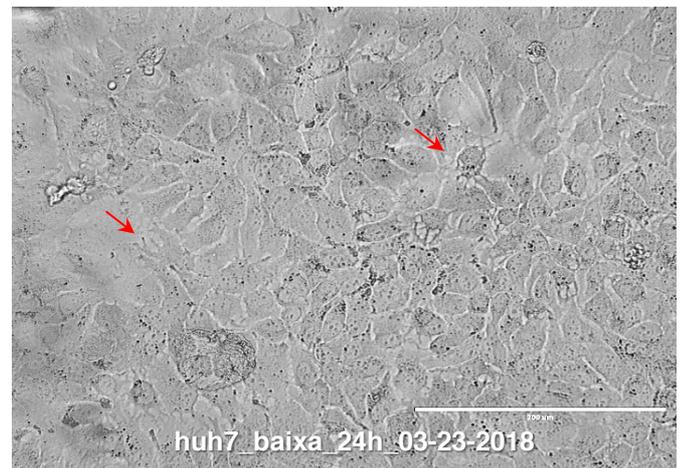
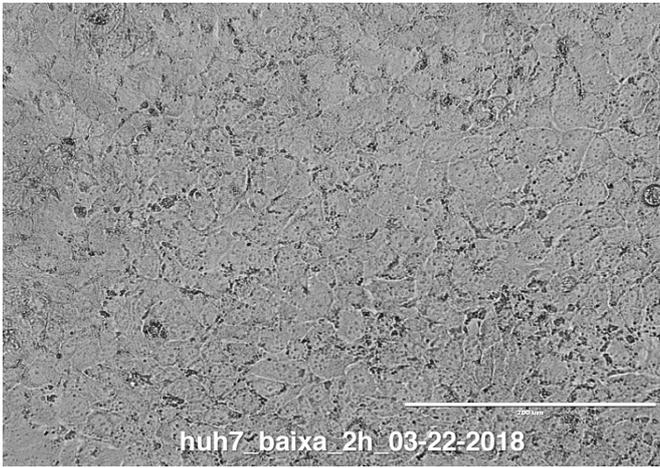
Cinética viral de **BeWo** com forskolina inoculado com **ZIKV-MR766bp**. As imagens apresentam a inoculação a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. A cinética segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada. A seta vermelha aponta o efeito citopático observado. Do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura e sem evidências de infecção. A partir do hpi de 24h há células mortas (arredondadas e refringentes) presentes no sobrenadante. A partir de 96h há degeneração monocamada celular e acúmulo de debris celular. Hpi de 144h praticamente todas as células estão mortas.



Cinética viral de **HuH-7, controle**. As imagens apresentam a evolução de crescimento da célula a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. O controle segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada com ZIKV-MR766 baixa passagem, linhagem Africana e ZIKV-IEC-Paraíba, linhagem Asiático-Brasileiro. A partir do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura. A monocamada de células se mantém até hpi de 144h, com pouca morte celular.



Cinética viral de **HuH-7 inoculado com ZIKV-IEC-Paraíba**. As imagens apresentam a inoculação a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. A cinética segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada. A seta vermelha aponta o efeito citopático observado. Do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura. No hpi de 48h apresenta sinais de efeito citopático. Do 72h até 144h os sinais se intensificam, como a degeneração da monocamada de células e debris celular nos sobrenadante. Com 144h praticamente todas as células estão lisadas.



Cinética viral de **HuH-7 inoculado com ZIKV-MR766bp**. As imagens apresentam a inoculação a partir de 2h e posteriormente a cada 24h até completar 144h. A cinética segue as horas-pós-infecção (hpi) da célula inoculada. A seta vermelha aponta o efeito citopático observado. Do hpi de 2h é possível observar a confluência da monocamada celular com pelos menos 90% de cobertura e sem evidências de infecção. No hpi de 24h observa-se os primeiros sinais de efeito citopático. Com 48h e 72h a maior parte das células estão infectadas, e parte do tapete celular destacou-se devido a lise celular. A partir de 96h todas as células estão mortas, há um acúmulo de debrí celular no sobrenadante e algumas células mortas que permaneceram fixadas na superfície do frasco.

7.2. Padronização da Curva Padrão

Tabelas de conversão de C_T para PFU/mL para todos os hpi da cinética réplica 1 das linhagens celulares BeWo, BeWo com forskolina, HTR-8 e Huh-7 inoculadas das com *Zika virus* IEC-Paraíba e *Zika virus* MR766 baixa passagem.

BeWo/ZIKV-IEC-Paraiba							
hpi	Meio	C_T	PFU Log ₁₀	PPFU anti-Log ₁₀	PFU/0,05 mL	PFU/mL	Log ₁₀ PFU/mL
2h	Extra	26,26	1,53	3,37E+01	3,37E+02	1,35E+03	3,13
	Intra	19,36	3,64	4,34E+03	4,34E+04	1,74E+05	5,24
24h	Extra	23,45	2,39	2,44E+02	2,44E+03	9,76E+03	3,99
	Intra	18,73	3,83	6,77E+03	6,77E+04	2,71E+05	5,43
48h	Extra	20,64	3,25	1,77E+03	1,77E+04	7,06E+04	4,85
	Intra	16,84	4,41	2,56E+04	2,56E+05	1,02E+06	6,01
72h	Extra	20,12	3,41	2,55E+03	2,55E+04	1,02E+05	5,01
	Intra	17,43	4,23	1,69E+04	1,69E+05	6,76E+05	5,83
96h	Extra	18,89	3,78	6,06E+03	6,06E+04	2,42E+05	5,38
	Intra	17,13	4,32	2,09E+04	2,09E+05	8,36E+05	5,92
120h	Extra	18,93	3,77	5,90E+03	5,90E+04	2,36E+05	5,37
	Intra	17,04	4,35	2,23E+04	2,23E+05	8,93E+05	5,95
144h	Extra	14,89	5,00	1,01E+05	1,01E+06	4,04E+06	6,61
	Intra	17,73	4,14	1,37E+04	1,37E+05	5,47E+05	5,74

BeWo/ZIKV-MR766bp							
hpi	Meio	C_T	PFU Log ₁₀	PPFU anti-Log ₁₀	PFU/0,05 mL	PFU/mL	Log ₁₀ PFU/mL
2h	Extra	18,41	5,86	7,25E+05	7,25E+06	2,90E+07	7,46
	Intra	18,29	5,90	7,89E+05	7,89E+06	3,15E+07	7,50
24h	Extra	16,57	6,41	2,56E+06	2,56E+07	1,02E+08	8,01
	Intra	13,65	7,28	1,89E+07	1,89E+08	7,54E+08	8,88
48h	Extra	15,13	6,84	6,85E+06	6,85E+07	2,74E+08	8,44
	Intra	15,98	6,58	3,84E+06	3,84E+07	1,53E+08	8,19
72h	Extra	16,17	6,53	3,37E+06	3,37E+07	1,35E+08	8,13
	Intra	21,25	5,02	1,04E+05	1,04E+06	4,15E+06	6,62
96h	Extra	15,80	6,64	4,34E+06	4,34E+07	1,74E+08	8,24
	Intra	23,98	4,21	1,60E+04	1,60E+05	6,41E+05	5,81
120h	Extra	16,68	6,37	2,37E+06	2,37E+07	9,48E+07	7,98
	Intra	26,35	3,50	3,17E+03	3,17E+04	1,27E+05	5,10
144h	Extra	16,54	6,42	2,61E+06	2,61E+07	1,04E+08	8,02
	Intra	30,05	2,40	2,53E+02	2,53E+03	1,01E+04	4,00

BeWo com forskolina/ZIKV-IEC

hpi	Meio	C _T	PFU Log ₁₀	PPFU anti-Log ₁₀	PFU/0,05 mL	PFU/mL	Log ₁₀ PFU/mL
2h	Extra	18,83	3,80	6320,11	63201,13	252804,52	5,40
	Intra	19,93	3,46	2914,77	29147,74	116590,95	5,07
24h	Extra	18,80	3,81	6449,94	64499,38	257997,50	5,41
	Intra	15,36	4,86	72582,31	725823,10	2903292,42	6,46
48h	Extra	17,88	4,09	12349,63	123496,28	493985,10	5,69
	Intra	14,39	5,16	144479,13	1444791,25	5779165,01	6,76
72h	Extra	18,52	3,90	7852,68	78526,85	314107,38	5,50
	Intra	16,46	4,53	33548,35	335483,49	1341933,98	6,13
96h	Extra	18,19	4,00	9938,06	99380,61	397522,42	5,60
	Intra	19,71	3,53	3394,49	33944,87	135779,49	5,13
120h	Extra	19,53	3,59	3868,09	38680,93	154723,73	5,19
	Intra	18,30	3,96	9202,01	92020,11	368080,45	5,57
144h	Extra	19,29	3,66	4565,64	45656,36	182625,43	5,26
	Intra	18,65	3,85	7161,32	71613,22	286452,87	5,46

BeWo com forskolina /ZIKV-MR766bp

hpi	Meio	C _T	PFU Log ₁₀	PPFU anti-Log ₁₀	PFU/0,05 mL	PFU/mL	Log ₁₀ PFU/mL
2h	Extra	18,01	5,98	956312,19	9563121,90	38252487,61	7,58
	Intra	18,95	5,70	503596,80	5035968,01	20143872,05	7,30
24h	Extra	16,26	6,50	3160917,18	31609171,77	126436687,06	8,10
	Intra	13,73	7,25	17940890,96	179408909,62	717635638,48	8,86
48h	Extra	15,83	6,63	4244816,40	42448164,02	169792656,08	8,23
	Intra	15,44	6,74	5541307,60	55413076,03	221652304,12	8,35
72h	Extra	14,92	6,90	7930107,40	79301074,00	317204295,99	8,50
	Intra	19,89	5,42	263811,82	2638118,16	10552472,62	7,02
96h	Extra	14,76	6,95	8860934,30	88609342,95	354437371,80	8,55
	Intra	21,94	4,81	65004,54	650045,45	2600181,78	6,42
120h	Extra	15,86	6,62	4163700,92	41637009,24	166548036,98	8,22
	Intra	23,11	4,47	29200,92	292009,22	1168036,86	6,07
144h	Extra	15,40	6,76	5688603,43	56886034,29	227544137,15	8,36
	Intra	27,09	3,28	1914,81	19148,13	76592,51	4,88

HTR-8/ZIKV-IEC

hpi	Meio	C _T	PFU Log ₁₀	PPFU anti-Log ₁₀	PFU/0,05 mL	PFU/mL	Log ₁₀ PFU/mL
2h	Extra	25,71	1,70	49,81	498,12	1992,49	3,30
	Intra	19,08	3,73	5309,76	53097,55	212390,21	5,33
24h	Extra	24,79	1,98	95,32	953,18	3812,72	3,58
	Intra	17,91	4,08	12061,17	120611,72	482446,89	5,68
48h	Extra	23,19	2,47	293,50	2934,99	11739,97	4,07
	Intra	17,74	4,14	13648,23	136482,31	545929,23	5,74
72h	Extra	22,92	2,55	354,08	3540,77	14163,09	4,15
	Intra	17,70	4,14	13959,47	139594,67	558378,67	5,75
96h	Extra	22,72	2,61	409,64	4096,37	16385,47	4,21
	Intra	17,56	4,19	15440,86	154408,64	617634,58	5,79
120h	Extra	17,58	4,18	15202,97	152029,71	608118,83	5,78
	Intra	21,23	3,07	1164,74	11647,38	46589,51	4,67
144h	Extra	20,37	3,33	2131,20	21312,00	85248,01	4,93
	Intra	18,92	3,77	5932,76	59327,64	237310,54	5,38

HTR-8/ZIKV-MR766bp

hpi	Meio	C _T	PFU Log ₁₀	PPFU anti-Log ₁₀	PFU/0,05 mL	PFU/mL	Log ₁₀ PFU/mL
2h	Extra	18,41	5,86	725219,22	7252192,16	29008768,65	7,46
	Intra	18,48	5,84	692117,04	6921170,36	27684681,46	7,44
24h	Extra	17,28	6,20	1580463,67	15804636,69	63218546,76	7,80
	Intra	14,51	7,02	10487367,30	104873673,03	419494692,12	8,62
48h	Extra	17,98	5,99	973668,41	9736684,06	38946736,22	7,59
	Intra	14,92	6,90	7917189,79	79171897,91	316687591,64	8,50
72h	Extra	18,02	5,98	951124,94	9511249,39	38044997,58	7,58
	Intra	19,23	5,62	413782,03	4137820,33	16551281,33	7,22
96h	Extra	16,83	6,33	2142358,64	21423586,40	85694345,59	7,93
	Intra	23,03	4,49	30862,98	308629,78	1234519,12	6,09
120h	Extra	17,58	6,11	1280163,54	12801635,45	51206541,79	7,71
	Intra	27,65	3,11	1300,57	13005,74	52022,96	4,72
144h	Extra	17,86	6,02	1057022,90	10570229,02	42280916,09	7,63
	Intra	29,32	2,62	416,76	4167,60	16670,39	4,22

Huh-7/ZIKV-IEC

hpi	Meio	C _T	PFU Log ₁₀	PPFU anti-Log ₁₀	PFU/0,05 mL	PFU/mL	Log ₁₀ PFU/mL
2h	Extra	20,22	3,38	2382,33	23823,28	95293,14	4,98
	Intra	22,02	2,83	670,81	6708,15	26832,60	4,43
24h	Extra	19,19	3,69	4911,82	49118,23	196472,90	5,29
	Intra	18,06	4,04	10856,84	108568,38	434273,53	5,64
48h	Extra	16,45	4,53	33772,80	337728,01	1350912,04	6,13
	Intra	16,12	4,63	42676,13	426761,33	1707045,32	6,23
72h	Extra	16,65	4,47	29405,39	294053,93	1176215,70	6,07
	Intra	16,52	4,51	32136,66	321366,63	1285466,51	6,11
96h	Extra	15,36	4,86	72554,29	725542,90	2902171,62	6,46
	Intra	18,91	3,78	5988,54	59885,36	239541,44	5,38
120h	Extra	16,17	4,61	41021,92	410219,22	1640876,89	6,22
	Intra	22,03	2,82	664,75	6647,55	26590,20	4,42
144h	Extra	15,64	4,78	59602,44	596024,39	2384097,55	6,38
	Intra	23,47	2,38	240,43	2404,32	9617,27	3,98

Huh-7/ZIKV-MR766bp

hpi	Meio	C _T	PFU Log ₁₀	PPFU anti-Log ₁₀	PFU/0,05 mL	PFU/mL	Log ₁₀ PFU/mL
2h	Extra	18,20	5,92	836701,20	8367011,98	33468047,92	7,52
	Intra	22,01	4,79	61785,49	617854,87	2471419,48	6,39
24h	Extra	18,67	5,79	610504,92	6105049,22	24420196,86	7,39
	Intra	18,19	5,93	843470,00	8434700,01	33738800,05	7,53
48h	Extra	15,76	6,65	4443059,66	44430596,65	177722386,59	8,25
	Intra	18,07	5,96	917719,65	9177196,49	36708785,96	7,56
72h	Extra	16,06	6,56	3629197,23	36291972,28	145167889,13	8,16
	Intra	19,55	5,52	333752,43	3337524,26	13350097,05	7,13
96h	Extra	15,45	6,74	5500958,74	55009587,37	220038349,48	8,34
	Intra	22,02	4,79	61320,71	613207,09	2452828,35	6,39
120h	Extra	16,60	6,40	2512730,73	25127307,34	100509229,37	8,00
	Intra	23,05	4,48	30453,45	304534,53	1218138,12	6,09
144h	Extra	16,19	6,52	3329055,37	33290553,73	133162214,93	8,12
	Intra	24,28	4,12	13081,36	130813,55	523254,22	5,72

Tabelas de conversão de C_T par PFU/mL para médias hpi de 24h, 48h e 72h das cinéticas em triplicata das linhagens celulares HTR-8, BeWo, BeWo com forskolina e Huh-7 inoculadas das com *Zika virus* IEC-Paraíba e *Zika virus* MR766 baixa passagem.

HTR-8/ZIKV-IEC-Paraíba

hpi	C_{T_R1}	C_{T_R2}	C_{T_R3}	Média	σ	CV
24h (extracelular)	24,79	20,41	21,49	21,49	2,28	10,62
48h (extracelular)	23,19	19,97	20,31	20,31	1,77	8,70
72h (extracelular)	22,92	20,07	18,57	20,07	2,21	11,02
24h (intracelular)	17,91	12,99	15,25	15,25	2,46	16,14
48h (intracelular)	17,74	12,92	15,47	15,47	2,41	15,56
72h (intracelular)	17,70	12,48	13,90	13,90	2,70	19,43

HTR-8/ZIKV-IEC-Paraíba

hpi	PFU/mL R1	PFU/mL R2	PFU/mL R3	Média PFU/mL	Log ₁₀ PFU/mL
24h (extracelular)	3812,72	83273,83934	38955,51123	3,90E+04	4,590568908
48h (extracelular)	11739,97	113235,2667	88901,01149	8,89E+04	4,948906702
72h (extracelular)	14163,09	105800,337	303239,2821	1,06E+05	5,024487051
24h (intracelular)	482446,89	15396896,28	3139167,399	3,14E+06	6,496814476
48h (intracelular)	545929,23	16161929,71	2696893,947	2,70E+06	6,430863869
72h (intracelular)	558378,67	22056879,49	8143784,85	8,14E+06	6,910826292

HTR-8/ZIKV-MR766bp

hpi	C _T _R1	C _T _R2	C _T _R3	Média	σ	CV
24h (extracelular)	17,28	26,77	21,18	21,18	4,77	22,53
48h (extracelular)	17,98	23,26	15,61	17,98	3,92	21,80
72h (extracelular)	18,02	16,96	14,35	16,96	1,89	11,13
24h (intracelular)	14,51	20,38	16,12	16,12	3,03	18,80
48h (intracelular)	14,92	17,43	12,42	14,92	2,51	16,82
72h (intracelular)	19,23	14,94	13,79	14,94	2,87	19,21

HTR-8/ZIKV-MR766bp

hpi	PFU/mL			Média PFU/mL	Log ₁₀ PFU/mL
	R1	R2	R3		
24h (extracelular)	63218546,76	95494,75616	4383262,699	4,38E+06	6,6417975
48h (extracelular)	38946736,22	1049504,901	198245137	3,89E+07	7,590471069
72h (extracelular)	38044997,58	78549713,32	467640928,3	7,85E+07	7,895144604
24h (intracelular)	419494692,12	7576889,435	139501338,7	1,40E+08	8,144578375
48h (intracelular)	316687591,64	56677026,86	1758988697	3,17E+08	8,500631047
72h (intracelular)	16551281,33	312539265,4	687377799,7	3,13E+08	8,494904587

BeWo/ZIKV-IEC-Paraíba

hpi	C_T_R1	C_T_R2	C_T_R3	Média	σ	CV
24h (extracelular)	23,45	20,29	17,44	20,29	3,01	14,83
48h (extracelular)	20,64	18,92	19,16	19,16	0,93	4,86
72h (extracelular)	20,12	17,23	16,30	17,23	1,99	11,55
24h (intracelular)	18,73	12,64	12,85	12,85	3,46	26,90
48h (intracelular)	16,84	14,16	14,15	14,16	1,55	10,95
72h (intracelular)	17,43	13,93	14,43	14,43	1,89	13,11

BeWo/ZIKV-IEC-Paraíba

hpi	PFU/mL			Média	Log₁₀ PFU/mL
	R1	R2	R3	PFU/mL	
24h (extracelular)	9762,001647	90632,54373	674810,3644	9,06E+04	4,957284169
48h (extracelular)	70616,86854	236766,1665	200146,0768	2,00E+05	5,301347082
72h (extracelular)	101977,5004	778257,9319	1499644,592	7,78E+05	5,891123556
24h (intracelular)	270600,7939	19753052,13	16985687,94	1,70E+07	7,230083141
48h (intracelular)	1024944,462	6785076,31	6797832,129	6,79E+06	6,831554736
72h (intracelular)	676472,7235	7958952,665	5583220,136	5,58E+06	6,746884752

BeWo/ZIKV-MR766bp

hpi	C_T_R1	C_T_R2	C_T_R3	Média	σ	CV
24h (extracelular)	16,57	19,66	16,05	16,57	1,95	11,78
48h (extracelular)	15,13	12,79	14,19	14,19	1,18	8,31
72h (extracelular)	16,17	11,48	11,54	11,54	2,69	23,32
24h (intracelular)	13,65	13,30	12,43	13,30	0,63	4,75
48h (intracelular)	15,98	11,41	13,27	13,27	2,30	17,31
72h (intracelular)	21,25	11,13	11,87	11,87	5,64	47,53

BeWo/ZIKV-MR766bp

hpi	PFU/mL	PFU/mL	PFU/mL	Média	Log₁₀ PFU/mL
	R1	R2	R3	PFU/mL	
24h (extracelular)	102275295,6	12349888,84	80922253,83	8,09E+07	7,90806797
48h (extracelular)	273872863,56	1361084350,38	256977840,7	2,74E+08	8,437549003
72h (extracelular)	134601965,90	3341686538,51	2015141841	2,02E+09	9,30430562
24h (intracelular)	754074439,42	962181054,00	655996874,1	7,54E+08	8,87741422
48h (intracelular)	153406316,13	3495077107,04	1546580480	1,55E+09	9,189372525
72h (intracelular)	4153978,49	4226491250,34	6189436106	4,23E+09	9,625979974

BeWo com forskolina/ZIKV-IEC-Paraíba

hpi	C _T _R1	C _T _R2	C _T _R3	Média	σ	CV
24h (extracelular)	18,80	20,30	18,19	18,80	1,08	5,77
48h (extracelular)	17,88	19,14	17,01	17,88	1,07	5,99
72h (extracelular)	18,52	17,32	17,02	17,32	0,79	4,59
24h (intracelular)	15,36	15,64	11,91	15,36	2,08	13,53
48h (intracelular)	14,39	15,02	13,27	14,39	0,89	6,17
72h (intracelular)	16,46	15,84	13,14	15,84	1,76	11,13

BeWo com forskolina/ZIKV-IEC-Paraíba

hpi	PFU/mL			Média	Log ₁₀ PFU/mL
	R1	R2	R3	PFU/mL	
24h (extracelular)	257997,50	89799,55968	395736,3428	2,58E+05	5,411615498
48h (extracelular)	493985,10	203456,2836	912782,4666	4,94E+05	5,693713851
72h (extracelular)	314107,38	731323,5095	904603,4347	7,31E+05	5,864109535
24h (intracelular)	2903292,42	2387089,997	33000050,92	2,90E+06	6,46289078
48h (intracelular)	5779165,01	3697478,931	12715856,07	5,78E+06	6,761865095
72h (intracelular)	1341933,98	2071856,947	13864937,86	2,07E+06	6,316359766

BeWo com forskolina /ZIKV-MR766bp

hpi	C_T_R1	C_T_R2	C_T_R3	Média	σ	CV
24h (extracelular)	16,26	18,98	16,91	16,91	1,42	8,39
48h (extracelular)	15,83	13,37	15,23	15,23	1,28	8,43
72h (extracelular)	14,92	11,70	12,22	12,22	1,73	14,14
24h (intracelular)	13,73	14,93	13,86	13,86	0,66	4,78
48h (intracelular)	15,44	11,97	12,60	12,60	1,85	14,67
72h (intracelular)	19,89	12,81	10,58	12,81	4,86	37,95

BeWo com forskolina /ZIKV-MR766bp

hpi	PFU/mL			Média PFU/mL	Log₁₀ PFU/mL
	R1	R2	R3		
24h (extracelular)	126436687,06	19691095,73	80922253,83	8,09E+07	7,90806797
48h (extracelular)	169792656,08	915644776,9	256977840,7	2,57E+08	8,409895676
72h (extracelular)	317204295,99	2864038303	2015141841	2,02E+09	9,30430562
24h (intracelular)	717635638,48	314180224,3	655996874,1	6,56E+08	8,81690177
48h (intracelular)	221652304,12	2386179844	1546580480	1,55E+09	9,189372525
72h (intracelular)	10552472,62	1339010353	6189436106	1,34E+09	9,126783935

Huh-7/ZIKV-IEC-Paraíba

hpi	C _T _R1	C _T _R2	C _T _R3	Média	σ	CV
24h (extracelular)	19,19	19,16	18,43	19,16	0,43	2,24
48h (extracelular)	16,45	17,01	15,91	16,45	0,55	3,34
72h (extracelular)	16,65	13,27	14,65	14,65	1,70	11,57
24h (intracelular)	18,06	11,53	13,24	13,24	3,39	25,58
48h (intracelular)	16,12	9,45	11,31	11,31	3,44	30,41
72h (intracelular)	16,52	11,30	11,48	11,48	2,96	25,82

Huh-7/ZIKV-IEC-Paraíba

hpi	PFU/mL			Média	Log ₁₀ PFU/mL
	R1	R2	R3	PFU/mL	
24h (extracelular)	196472,9021	201027,5279	335636,6509	2,01E+05	5,303255532
48h (extracelular)	1350912,037	911173,0712	1976540,653	1,35E+06	6,130627071
72h (extracelular)	1176215,701	12634893,47	4787130,686	4,79E+06	6,680075284
24h (intracelular)	434273,532	43207992,69	12923125,37	1,29E+07	7,111367557
48h (intracelular)	1707045,321	187108875,9	50211996,08	5,02E+07	7,700807486
72h (intracelular)	1285466,509	50705541,07	44780587,71	4,48E+07	7,651089789

Huh-7/ZIKV-MR766bp

hpi	C _T _R1	C _T _R2	C _T _R3	Média	σ	CV
24h (extracelular)	18,67	18,58	15,75	18,58	1,66	8,92
48h (extracelular)	15,76	13,47	11,32	13,47	2,22	16,50
72h (extracelular)	16,06	12,91	13,89	13,89	1,61	11,59
24h (intracelular)	18,19	14,73	11,75	14,73	3,22	21,89
48h (intracelular)	18,07	20,44	15,30	18,07	2,57	14,25
72h (intracelular)	19,55	12,40	17,98	17,98	3,76	20,90

Huh-7/ZIKV-MR766bp

hpi	PFU/mL			Média	Log ₁₀ PFU/mL
	R1	R2	R3	PFU/mL	
24h (extracelular)	24420196,86	25803744,09	179156279,5	2,58E+07	7,411682726
48h (extracelular)	177722386,59	852271262,6	3724515974	8,52E+08	8,930577845
72h (extracelular)	145167889,13	1251370993	639118239,9	6,39E+08	8,805581212
24h (intracelular)	33738800,05	360258514,5	2774876805	3,60E+08	8,556614254
48h (intracelular)	36708785,96	7239707,174	244550918,3	3,67E+07	7,564770022
72h (intracelular)	13350097,05	1780597578	38930828,02	3,89E+07	7,590293641