

**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 .....

Examinador(a): Assinatura .....

Nome .....

Instituição .....

Examinador(a): Assinatura .....

Nome .....

Instituição .....

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<sub>T</sub>: 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**oxoplasmose, **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 <sub>10</sub>	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 <sup>2</sup>	coeficiente de determinação
PFU/mL	unidade formadora de placa por mililitros



## SUMÁRIO

---

<b>1   INTRODUÇÃO</b> .....	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
<b>2   MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	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
<b>3   RESULTADOS</b> .....	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
<b>4   CONCLUSÃO</b> .....	79
<b>5   DISCUSSÃO</b> .....	81

<b>6   BIBLIOGRAFIA</b> .....	82
<b>7   ANEXOS</b> .....	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).

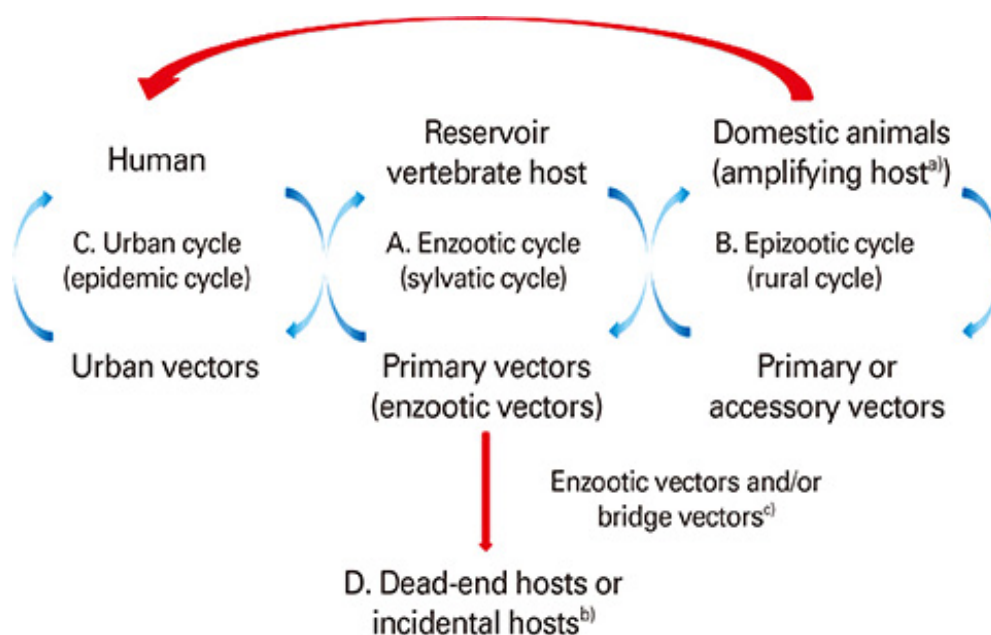
Atualmente são descritas cerca de 540 espécies de arbovírus, dos quais aproximadamente 150 estão relacionados a doenças humanas e de origem zoonótica. As famílias pertencentes a esse grupo são *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Reoviridae* (Gubler 2001, 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.

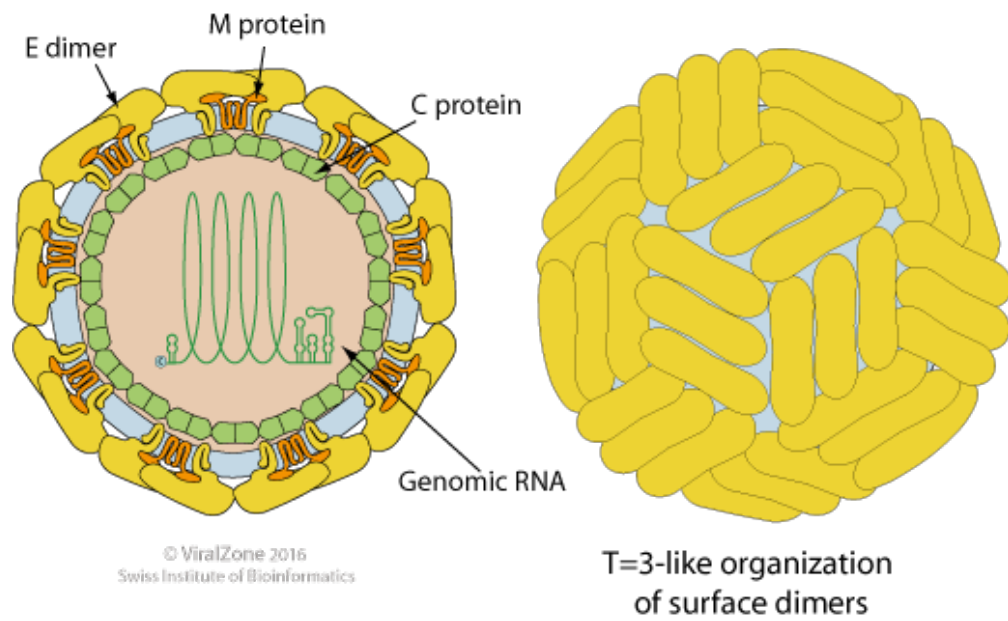
Há divergências em relação à existência das linhagens de ZIKV (Gong *et al.* 2016). Ao considerar análise filogenética dos genes do Envelope e NS5, um grupo de cientistas considera a existência de duas linhagens de ZIKV, a Africana e Asiática (Haddow *et al.* 2012, Faria *et al.* 2016, Wang *et al.*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

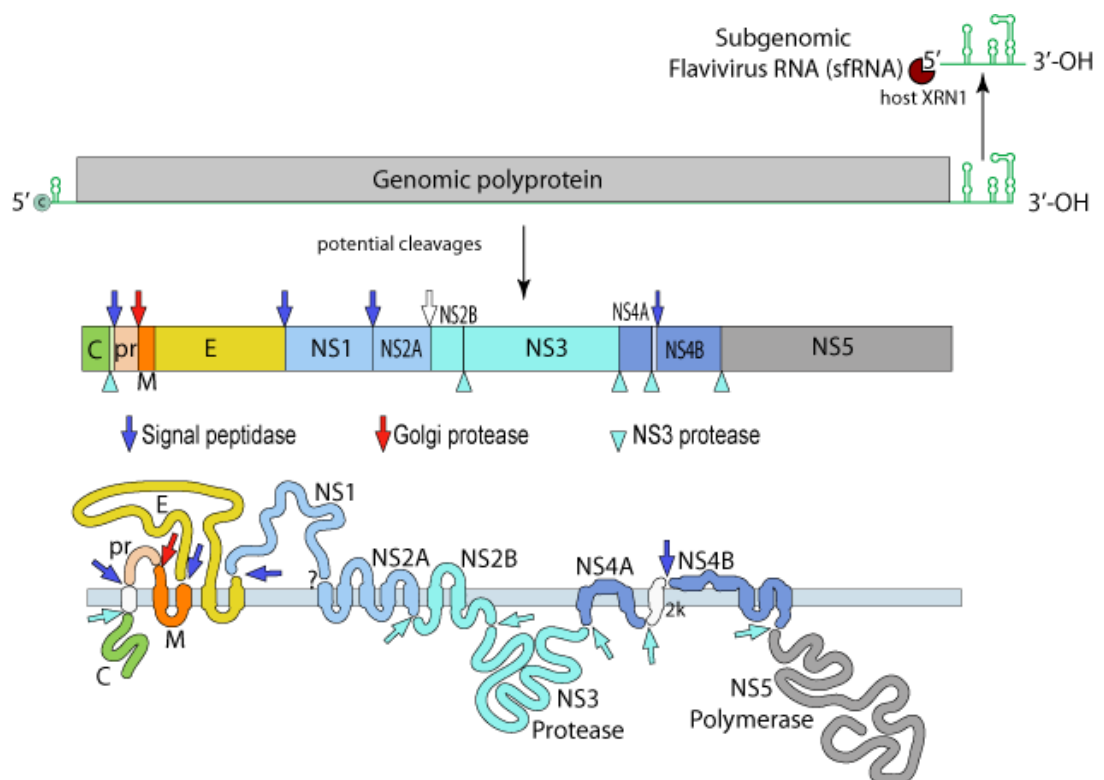
### 1.2.1. Organização do Genoma

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<sub>OH</sub> 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*.

<b>Gene: Proteína</b>	<b>Nome</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Principais Características</b>	<b>Principais Funções</b>
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*.

<b>Gene: Proteína</b>	<b>Nome</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Principais Características</b>	<b>Principais Funções</b>
<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

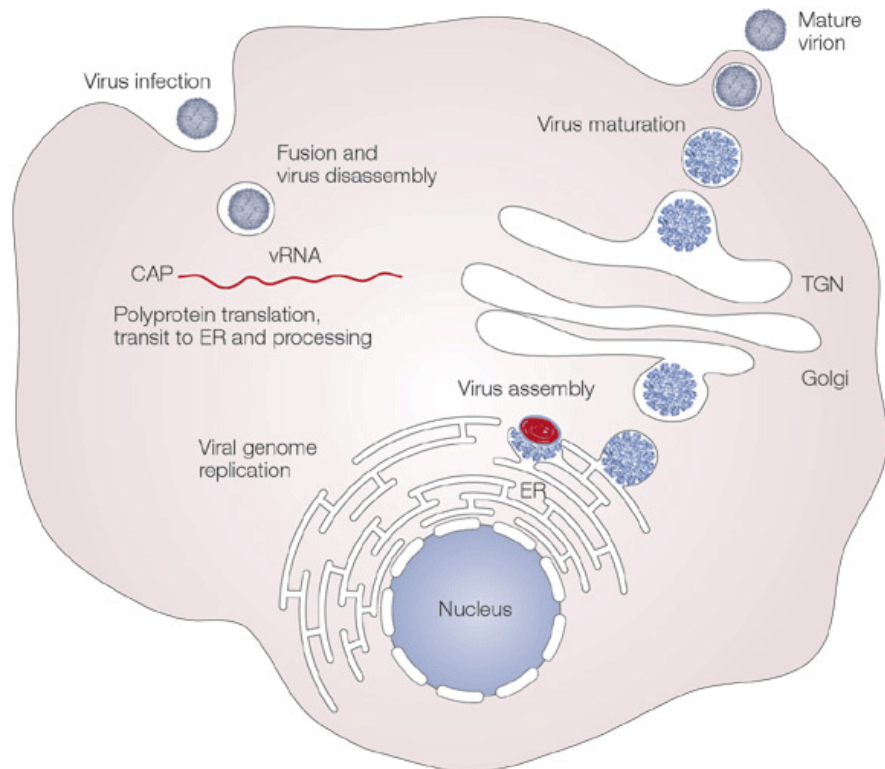
A geração de novas partículas virais maduras, os vírions, inicia-se com a presença de receptores compatíveis com os antígenos virais (Perera-Lecoin *et al.* 2014, Miorin *et al.* 2016, Mukhopadhyay *et al.* 2015, Hamel *et al.* 2016, Laureti *et al.* 2018). No grupo dos *Flavivirus*, incluindo ZIKV, 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, <sup>a</sup>Dick 1952, <sup>b</sup>Dick 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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 <sup>(a,b)</sup>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, <sup>a</sup>Weaver *et al.* 2016, <sup>a</sup>Baud *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, <sup>a</sup>Musso *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 (<sup>b</sup>Musso *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 (<sup>a</sup>Musso *et al.* 2014, <sup>d</sup>Musso 2015, Massad *et al.* 2017).

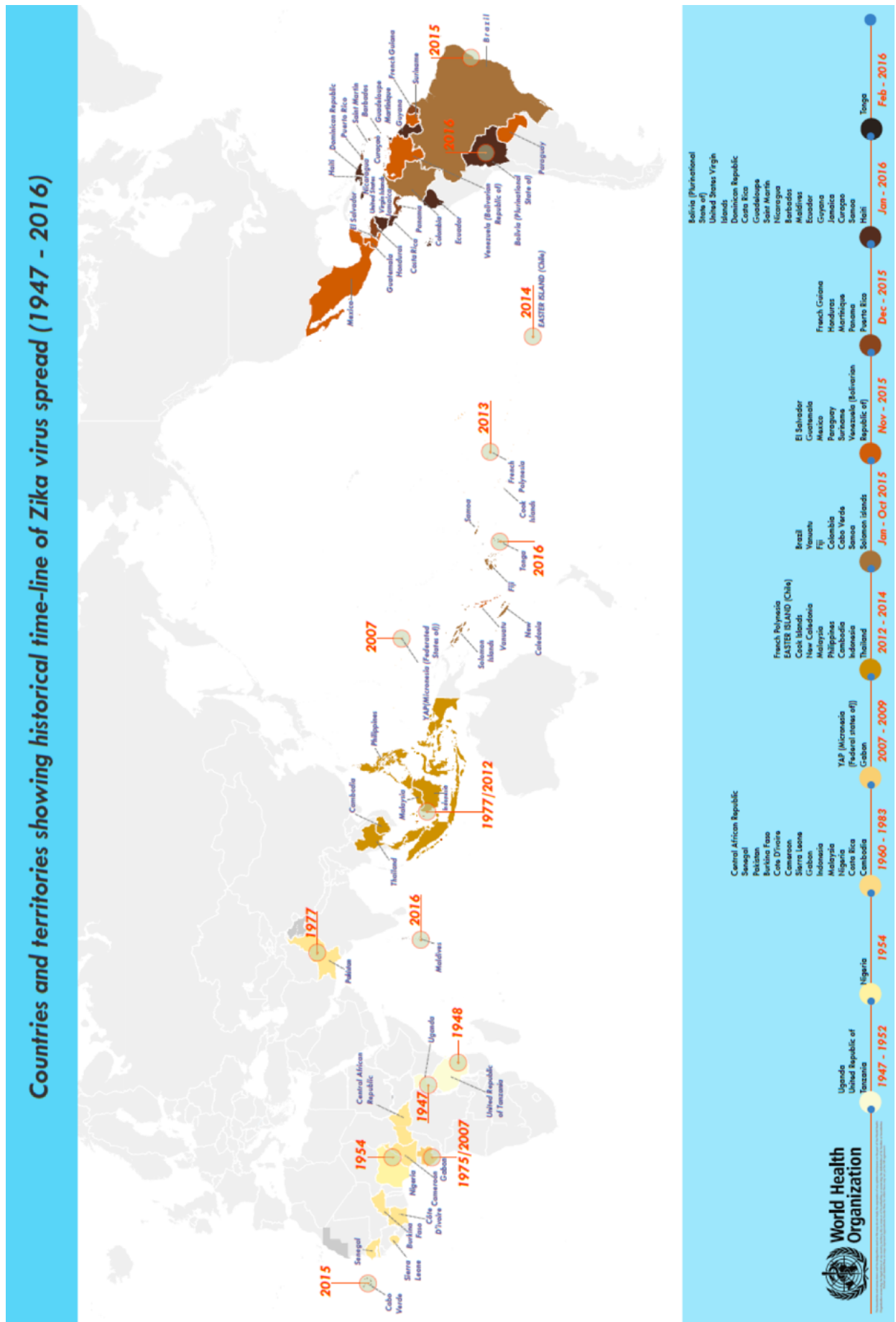
Entre o período de 2013 a 2016, *Zika virus*, disseminou-se ao redor do mundo levado por viajantes, e chegou aos países *naïve* da Europa, Ásia e Américas, além de retornar à África (Fonseca *et al.* 2014, Kutsuma *et al.* 2014, Pyke *et al.* 2014, Zammarchi *et al.* 2014, Leung *et al.* 2015, Tappe *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, <sup>a</sup>Calvet *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).

Figura 5. Mapa de origem e propagação do Zika virus de 1947 a 2016 (Kindhauser et al. 2016)



#### 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, <sup>a</sup>Mansuy *et al.* 2016, <sup>b</sup>Mansuy *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 (<sup>e</sup>Musso *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** (<sup>d</sup>Musso *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, <sup>b</sup>Calvet *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. Tropicismo do Vírus no Hospedeiro

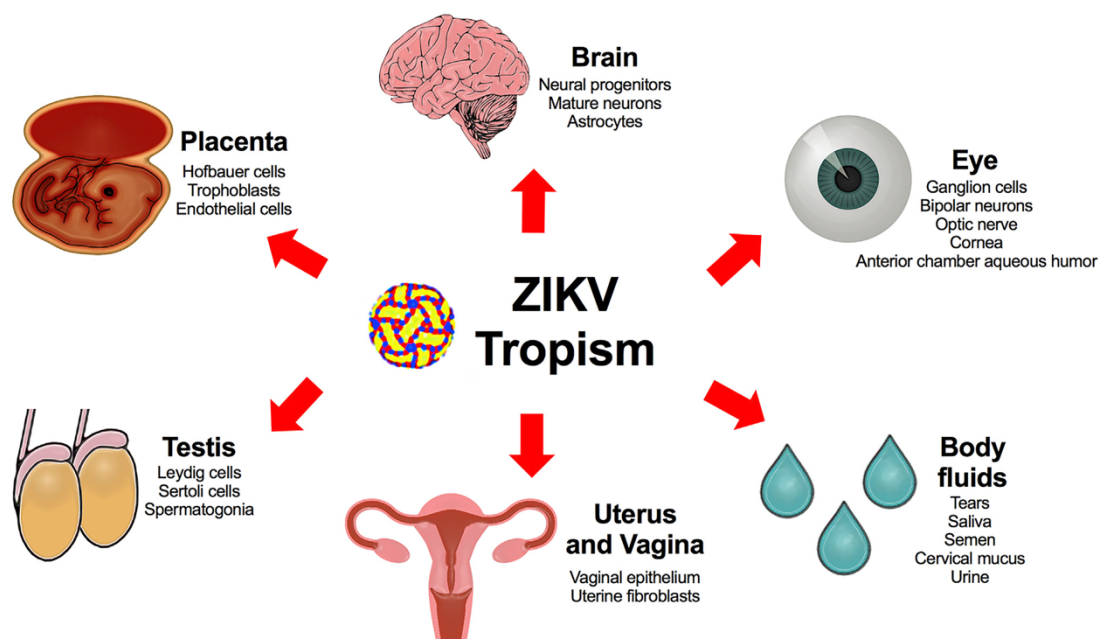
O tropismo do vírus ZIKV como segue o modelo descrito para DENV (Neal 2010, Guzman *et al.* 2016, Levinson 2016, Tabata *et al.* 2016, Laureti *et al.* 2018). A transmissão do vírus para o hospedeiro inicia-se com a picada do vetor na epiderme ou direto na corrente sanguínea. ZIKV infecta os queratinócitos 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

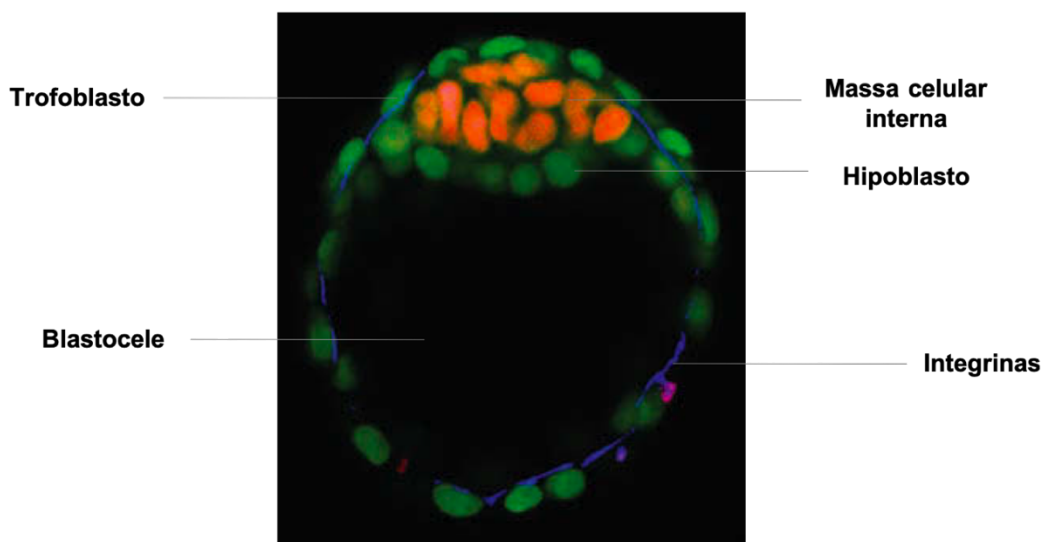
infecções virais diretas ou contínuas. O vírion pode infectar o útero através das células placentárias ou por transporte celular. Uma vez transposta essa barreira o embrião/feto torna-se vulnerável a infecção viral (Quicke *et al.* 2016).

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.

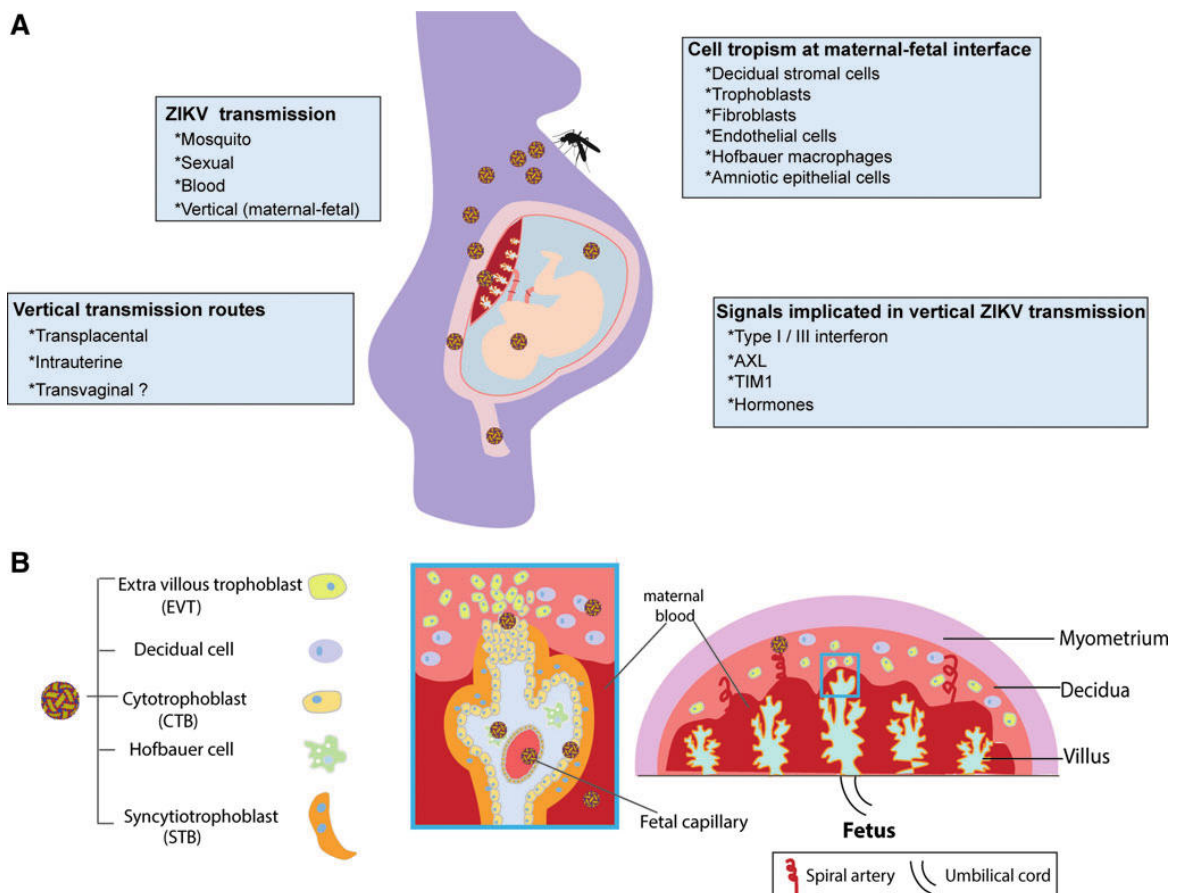
O sinciciotrofoblasto são células altamente resistentes à infecção por diversos patógenos como alguns vírus como *Herpes simplex virus 1* (HSV1), Citomegalovirus humano (HCMV), entre outros. STB da primeira fase gestacional são potencialmente resistentes a diferentes viroses. Diferentemente do citotrofoblasto 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

viroses 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).



## 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., Sadosky, 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.
- <sup>a</sup>Baud, 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.
- <sup>a</sup>Calvet, 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.
- <sup>b</sup>Calvet, 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.
- <sup>c</sup>Calvet, 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.
- <sup>(a)</sup> 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.
- <sup>(b)</sup> 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/](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.
- <sup>a</sup>Mansuy, 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.
- <sup>b</sup>Mansuy, 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.
- <sup>a</sup>Musso, 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.
- <sup>b</sup>Musso, 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.
- <sup>d</sup>Musso, D. (2015). Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis*, 21(10), 1887.
- <sup>e</sup>Musso, 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.
- <sup>a</sup>Weaver, 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.