

PEDECIBA Biología
Sub-área Biología Molecular y Celular

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE FLAVIVIRUS
EMERGENTES EN URUGUAY Y LAS AMÉRICAS:
VIRUS DENGUE Y ZIKA.**

Tesis de Doctorado
MSc. Álvaro Fajardo

Orientador: Dr. Juan Cristina

Tribunal: Dr. Juan Arbiza
Dr. Rodney Colina
Dra. Adriana Delfraro

Montevideo, Diciembre 2016



TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	3
<i>Generalidades de los Flavivirus.....</i>	5
<i>Transmisión.....</i>	7
<i>Epidemiología</i>	8
OBJETIVO GENERAL	11
CAPÍTULO 1: FLAVIVIRUS	12
OBJETIVO ESPECÍFICO I: INVESTIGAR LAS CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS FLAVIVIRUS.	12
<i>Antecedentes y Fundamento teórico</i>	12
<i>Materiales y métodos</i>	13
<i>Resultados y discusión</i>	14
<i>Conclusiones</i>	28
OBJETIVO ESPECÍFICO II: OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE FLAVIVIRUS.	29
<i>Antecedentes y Fundamento teórico</i>	29
<i>Materiales y métodos</i>	30
<i>Resultados y discusión</i>	31
<i>Conclusiones</i>	33
CAPÍTULO 2: VIRUS DENGUE.....	34
<i>Resumen</i>	34
<i>Introducción</i>	35
<i>Historia</i>	37
<i>Ciclo replicativo de DENV.....</i>	37
<i>Patogénesis.....</i>	41
OBJETIVO ESPECÍFICO III: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DE CEPAS DE DENV CIRCULANTES EN URUGUAY.....	44
<i>Antecedentes y Fundamento teórico</i>	44
<i>Materiales y métodos</i>	47
<i>Resultados y discusión</i>	55
<i>Conclusiones</i>	73
CAPÍTULO 3: VIRUS ZIKA	74
<i>Resumen</i>	74
<i>Introducción</i>	75
<i>Epidemiología</i>	75
<i>Transmisión.....</i>	77
<i>Variabilidad genética de ZIKV.....</i>	78
<i>Potencial de dispersión de ZIKV</i>	82
OBJETIVO ESPECÍFICO IV: INVESTIGAR LOS PATRONES EVOLUTIVOS DE ZIKV.	84
<i>Antecedentes y Fundamento teórico</i>	84
<i>Materiales y métodos</i>	86
<i>Resultados.....</i>	88

<i>Discusión</i>	91
<i>Conclusiones</i>	94
OBJETIVO ESPECÍFICO V: INVESTIGAR LOS PATRONES DE USO DE CODONES DE ZIKV.	95
<i>Antecedentes y Fundamento teórico</i>	95
<i>Materiales y métodos</i>	96
<i>Resultados y discusión</i>	99
<i>Conclusiones</i>	106
OBJETIVO ESPECÍFICO VI: EVALUAR LA POSIBLE PRESENCIA DE MIRNÁS CODIFICADOS POR EL GENOMA DE ZIKV.	107
<i>Antecedentes y Fundamento teórico</i>	107
<i>Materiales y métodos</i>	109
<i>Resultados</i>	111
<i>Discusión</i>	115
<i>Conclusiones</i>	118
BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO	149
ANEXO II: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS	159
ANEXO III: OTRAS PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS	204

RESUMEN

El género *Flavivirus*, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, comprende una amplia variedad de arbovirus (virus transmitidos por vectores artrópodos) entre los que se incluyen numerosos patógenos humanos. Debido a que este género incluye virus que son transmitidos por mosquitos o garrapatas, así como por especies sin vector conocido o que sólo circulan en artrópodos, los *Flavivirus* representan un modelo ideal para estudiar la evolución de enfermedades transmitidas por vectores. La exploración de estos mecanismos nos permite obtener información fundamental para interpretar el origen y la dispersión de diferentes enfermedades emergentes y re-emergentes. El creciente reporte de secuencias de genomas completos de distintos *Flavivirus* ha permitido afinar nuestra comprensión de las relaciones evolutivas existentes entre los diferentes miembros de este género.

Es por ello que en esta tesis nos planteamos profundizar en el conocimiento de las características epidemiológicas y las relaciones filogenéticas de las especies que integran el género *Flavivirus*. Los resultados de estos análisis evidenciaron la asociación diferencial de los distintos *Flavivirus* en grupos genéticos de acuerdo a su rango de hospedero, vector transmisor, enfermedades que causan, así como a otras interesantes características epidemiológicas, ecológicas y geográficas. Asimismo, se exploraron y resolvieron algunas discrepancias filogenéticas existentes entre reportes previos, lo que permitió profundizar en el entendimiento de la diversidad, interrelación y dispersión geográfica de los *Flavivirus*, a partir del análisis filogenético más extenso realizado hasta la fecha. Además, la información derivada de este enfoque permitió optimizar una metodología de *Real-Time* PCR para la detección y discriminación de los *Flavivirus* asociados a enfermedades en humanos.

Por otra parte, nos enfocamos en el análisis de dos miembros de este género que recientemente emergieron en Uruguay y las Américas: los virus dengue (DENV) y zika (ZIKV), respectivamente.

DENV es el agente causal de la principal arbovirosis a nivel mundial. Luego de 100 años de ausencia de reportes en el Uruguay, en 2016 volvió a registrarse un brote epidémico de esta enfermedad con 26 casos confirmados y numerosos sospechosos. Diversos estudios relacionan determinados grados de enfermedad con serotipos, genotipos o linajes particulares. Es por ello que en la presente tesis se investigaron las diferentes características genéticas y antigénicas de las distintas variantes de DENV que emergieron en nuestro país.

Los resultados obtenidos evidencian una llamativa heterogeneidad genética entre las diferentes cepas obtenidas de casos autóctonos, lo que revela la co-circulación espacio-temporal de al menos 5 sub-linajes del genotipo V de DENV-1 en Uruguay. Esto sugiere que la epidemia de dengue registrada en 2016 fue producto de diferentes brotes simultáneos causados por múltiples cepas de DENV-1 que se introdujeron y diseminaron independientemente. En consecuencia, se logró concluir que nuestro país es más permeable de lo pensado al ingreso de cepas de DENV, así como a la generación de ciclos de transmisión locales que promuevan la ocurrencia de brotes

epidémicos. Estos resultados deben alertar sobre la posible emergencia de otros arbovirus circulantes en la región que son transmitidos por el mismo vector, como ZIKV o CHIKV, así como de otros serotipos de DENV, lo que revela la importancia de realizar una vigilancia molecular continua contra estos agentes virales.

Por su parte, ZIKV permaneció prácticamente oculto, confinado a ciclos de transmisión enzoótica en África y Asia, hasta la ocurrencia del primer brote importante en humanos en Micronesia en 2007. Brotes epidémicos de creciente incidencia se produjeron subsecuentemente en la Polinesia Francesa, otras Islas del Pacífico Sur y finalmente en las Américas. Esta última epidemia, con una incidencia sin precedentes, reveló la asociación de la infección por ZIKV con la ocurrencia de malformaciones congénitas severas y trastornos autoinmunes, lo que desencadenó una preocupación generalizada debido a su potencial como amenaza para la salud pública mundial. Es por ello que en la presente tesis se investigaron distintos mecanismos moleculares y evolutivos utilizados por ZIKV con el objetivo de interpretar su emergencia y dispersión geográfica, así como sus características epidemiológicas y clínicas.

Los resultados obtenidos indican que la dispersión de ZIKV en las Américas se caracteriza por altas tasas evolutivas y un rápido crecimiento poblacional. Se logró evidenciar una co-circulación temporal de distintos sub-linajes en las Américas y el Pacífico Sur, lo que sugiere la existencia de una significativa subestimación de la diversificación genética y geográfica, así como de la carga de enfermedad causada por ZIKV. Asimismo, estudios enfocados en los patrones de uso de codones de ZIKV revelaron que las cepas epidémicas aisladas recientemente están más adaptadas a humanos que las variantes ancestrales. Esta adaptabilidad sugiere un incremento en la eficiencia traduccional, y por consiguiente, una mayor viremia en humanos, que puede correlacionarse con la mayor incidencia observada recientemente. Por último, en base a aproximaciones bioinformáticas realizadas con condiciones altamente estrictas, se observó la capacidad del genoma de ZIKV de codificar miRNAs, sugiriéndose el potencial papel de estos en la modulación de la expresión de genes humanos asociados a casos de microcefalia.

GENERALIDADES DE LOS FLAVIVIRUS

El género *Flavivirus*, perteneciente a la familia *Flaviviridae*, comprende una amplia gama de virus que son principalmente transmitidos a hospederos vertebrados por vectores artrópodos (arbovirus, de *arthropod-borne virus*). Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), se reconocen dentro de este género 53 especies con amplia distribución global, así como un número creciente de especies no clasificadas o tentativas ("ICTV Virus Taxonomy 2015"). Unas 40 especies son zoonóticas y son responsables de una considerable morbilidad y mortalidad, pudiendo causar desde cuadros asintomáticos hasta graves enfermedades febriles, encefálicas, hemorrágicas y hepáticas en humanos, así como en otros vertebrados. Entre ellos se encuentran especies de gran impacto en la salud humana, como los virus causantes de la fiebre amarilla (YFV), dengue (DENV-1, 2, 3 y 4) y zika (ZIKV), así como los responsables de las encefalitis japonesa (JEV), de Saint Louis (SLEV) y del oeste del Nilo (WNV) (MONATH 1994).

Los *Flavivirus* comparten la familia *Flaviviridae* con los géneros *Pestivirus*, *Pegivirus* y *Hepacivirus* (HENCHAL and PUTNAK 1990; STAPLETON *et al.* 2011) (Figura 1). Se caracterizan por tener un genoma constituido por una cadena simple de aproximadamente 11 kb de ARN de polaridad positiva, que presenta un capuchón (cap) en el extremo 5' y carece de cola poli(A) en el extremo 3' terminal (Figura 2). Poseen un único marco de lectura abierto (ORF), flanqueado por dos regiones no codificantes (NCR), que codifica para una poliproteína que es clivada por proteasas virales y celulares, generando tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (LINDENBACH and RICE 2003).

Entre las proteínas estructurales se encuentran la que compone la cápside (C) que rodea y protege al ácido nucleico, la membrana viral (M), que deriva de la proteólisis de prM, y la E, que conforma la envoltura y está involucrada en la penetración del virus en la célula (CHAMBERS *et al.* 1990; REY 2003; HUNG *et al.* 2004; MONDOTTE *et al.* 2007). Entre las proteínas no estructurales, las más caracterizadas son ARN polimerasa ARN dependiente (NS5) (TAN *et al.* 1996; NOMAGUCHI *et al.* 2003) y la NS3, que participa en la síntesis del ARN viral y en la formación del cap. Además la NS3 posee actividad proteasa cuando forma el complejo NS2B-NS3, siendo responsable del corte de NS2B, NS3, NS4A, NS5 y del extremo carboxilo de la proteína C (LI *et al.* 1999).

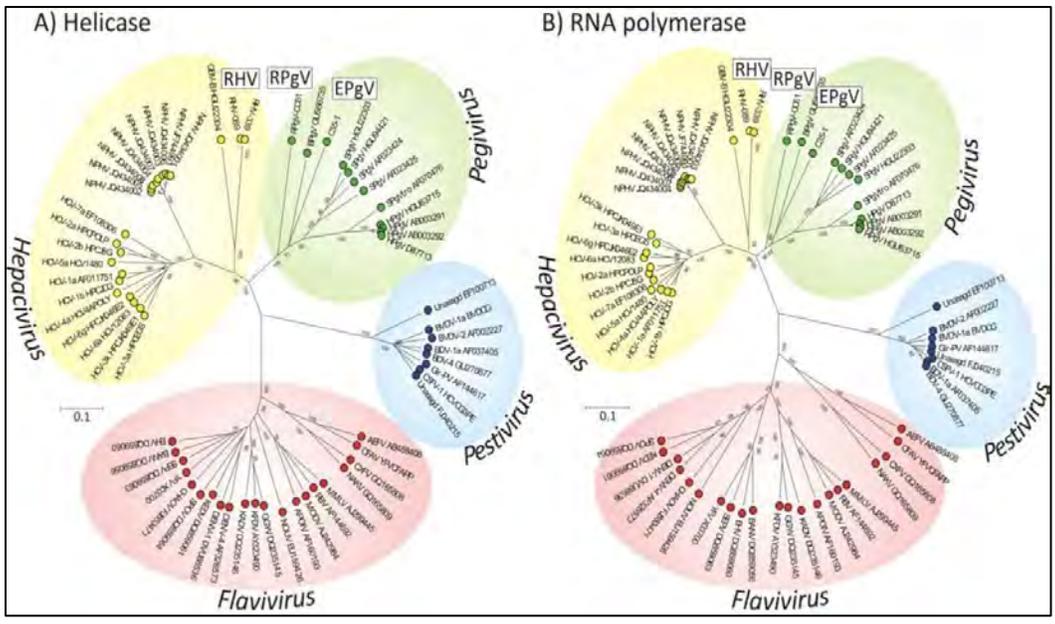


Figura 1. Filogenia de la familia *Flaviviridae*. Se observan las relaciones filogenéticas entre los diferentes géneros de la familia *Flaviviridae* (*Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* y *Pestivirus*) inferida a partir de secuencias conservadas de sus helicasas y ARN Polimerasa ARN dependiente (KAPOOR *et al.* 2013).

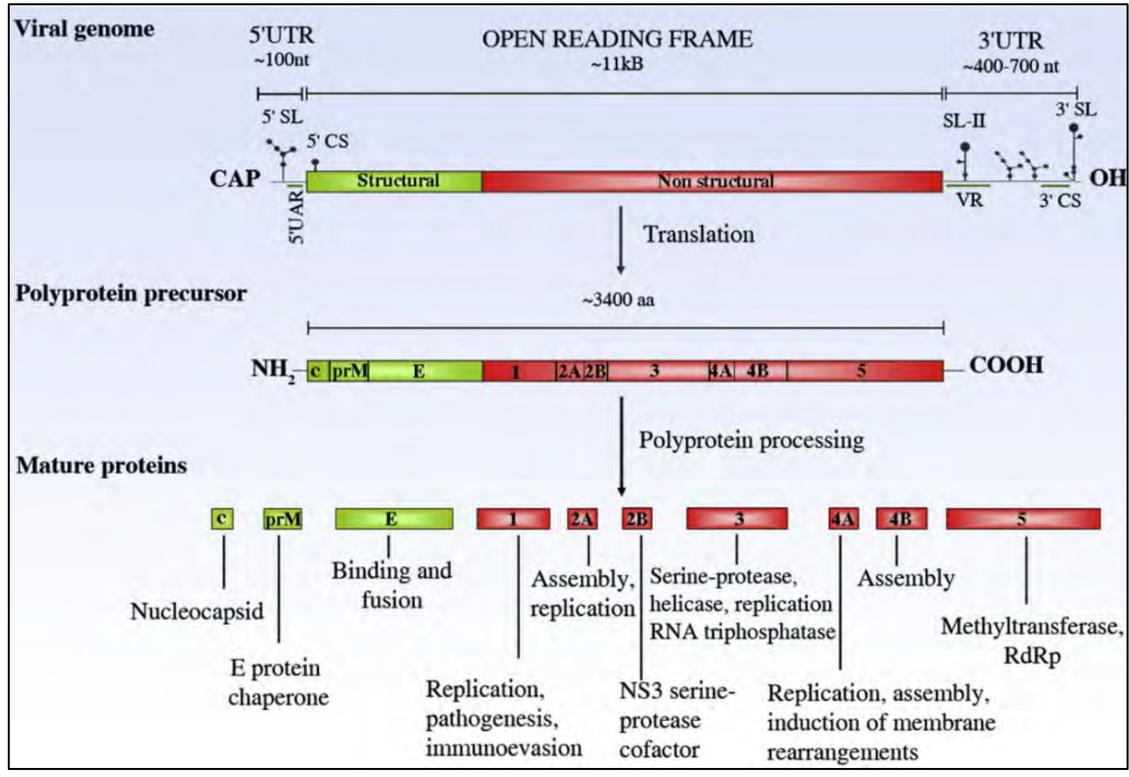


Figura 2. Estructura genómica de los *Flavivirus*. Se esquematiza la organización genómica de los *Flavivirus*, indicándose la función de las proteínas virales. El genoma viral posee un único ORF que codifica para una poliproteína que es clivada en 3 proteínas estructurales (en verde) y 7 no estructurales (rojo). Se indican además las estructuras secundarias en los extremos 5' y 3' (FERNANDEZ-GARCIA *et al.* 2009).

TRANSMISIÓN

A pesar de la similitud en la organización genómica existente entre los Flavivirus, existen diferencias sustanciales en lo que respecta al rango de hospedero y la transmisibilidad de las especies que integran este género. La mayoría de los Flavivirus son transmitidos horizontalmente entre artrópodos hematófagos y vertebrados, distinguiéndose las especies transmitidas por mosquitos (MBFV, de *Mosquito-borne flaviviruses*) y por garrapatas (TBFV, de *Tick-borne flaviviruses*). Por otra parte, algunas especies únicamente circulan en murciélagos o roedores y no se les conoce un vector que las transmita, por lo que se los distingue como Flavivirus sin vector conocido o NKV (del inglés, *no known vector*). Asimismo, existen especies que circulan únicamente en mosquitos y no se transmiten a vertebrados, a las que se las denominan ISFV (de *insect-specific flaviviruses*) (BILLOIR *et al.* 2000; GAUNT *et al.* 2001; KUNO and CHANG 2005a; COOK and HOLMES 2006; GRARD *et al.* 2010; MOUREAU *et al.* 2015; BLITVICH and FIRTH 2015).

La mayoría de los Flavivirus se restringen a ciclos de transmisión enzoóticos integrados por hospederos vertebrados amplificadores y vectores artrópodos hematófagos, mientras que los humanos se consideran hospedadores finales o *dead-end hosts* (WEAVER and BARRETT 2004; GO *et al.* 2014). En ocasiones, los humanos generan una viremia elevada dando lugar a un ciclo de transmisión secundario junto a otros vectores, como sucede con DENV, YFV y ZIKV (GUBLER 2006; ROGERS *et al.* 2006; NHAN and MUSSO 2015). La transmisión mediante un vector artrópodo implica que el virus provoque una alta viremia en el hospedero vertebrado y replique en los tejidos del artrópodo infectado (WEAVER and BARRETT 2004). Los artrópodos se infectan al ingerir el virus con la sangre en el momento de alimentarse. Luego de la ingesta, el virus infecta las células del intestino medio, esparciéndose al hemocele y luego a una gran variedad de tejidos. Finalmente, se infectan las glándulas salivales, por lo que el artrópodo es capaz de transmitir el virus mediante su picadura a otro vertebrado. Por otra parte, las larvas de mosquitos pueden ser infectadas si su desarrollo transcurre en aguas contaminadas con el virus (MITZEL *et al.* 2007). Asimismo, se ha demostrado la transmisión vertical o trans-ovarial de diversas especies de este género. Este mecanismo no sólo permite la propagación de Flavivirus de forma trans-generacional entre mosquitos, sino que juega un rol fundamental en el mantenimiento de diferentes especies entre períodos epidémicos (KHIN and THAN 1983; ROSEN 1988; MOURYA and MISHRA 2000; GIRARD *et al.* 2004; ESPINOSA *et al.* 2014).

Muchos Flavivirus también pueden ser transmitidos directamente entre vertebrados. El modo de transmisión es vía oral e intra-nasal. Esto se puede dar mediante la materia fecal, la orina y la saliva. Los comportamientos animales que favorecen este modo de transmisión incluyen comer, beber, estornudar, el canibalismo y agresiones que impliquen lastimaduras físicas (KUNO and CHANG 2006). Algunos Flavivirus como WNV pueden ser transmitidos a los recién nacidos mediante el consumo de leche materna. También se han reportado infecciones por Flavivirus asociadas a transfusiones de sangre y trasplante de órganos (IWAMOTO *et al.* 2003; STRAMER *et al.* 2005).

Por otra parte, la actual epidemia de ZIKV en las Américas ha alertado a las autoridades a consecuencia de su rápida y explosiva dispersión, con reportes de modos de transmisión

llamativos para los Flavivirus. En particular, la correlación entre la ubicación espacio-temporal del brote epidémico y el notorio aumento en la incidencia de recién nacidos con microcefalia y otras alteraciones del Sistema Nervioso Central (SNC), dio lugar a la sospecha y posterior confirmación de eventos de transmisión trans-placentaria (VENTURA *et al.* 2016; SCHULER-FACCINI *et al.* 2016). La evidencia acumulativa es cada vez más fuerte respecto a esta forma de transmisión e incluye la detección de ARN de ZIKV, partículas virales y/o antígenos virales en placenta, líquido amniótico y tejidos de fetos abortados (RASMUSSEN *et al.* 2016; OLIVEIRA MELO *et al.* 2016; SARNO *et al.* 2016; MARTINES *et al.* 2016; MEANEY-DELMAN *et al.* 2016; MLAKAR *et al.* 2016; CALVET *et al.* 2016; LADHANI *et al.* 2016). Asimismo, un estudio reciente reportó la detección de anticuerpos IgM anti-ZIKV en el líquido cefalorraquídeo de 30 de 31 neonatos con microcefalia, evidenciando este modo de transmisión (CORDEIRO *et al.* 2016). Por otra parte, estudios recientes han demostrado que el genoma de ZIKV puede encontrarse en el semen por hasta 62 días (ATKINSON *et al.* 2016), y diversos casos de transmisión sexual de este agente viral han sido reportados, lo que indica que esta ruta de transmisión puede contribuir significativamente a su dispersión (MUSSO *et al.* 2015; D'ORTENZIO *et al.* 2016a; DECKARD *et al.* 2016; VENTURI *et al.* 2016; HILLS *et al.* 2016; TURMEL *et al.* 2016; FRANK *et al.* 2016; DAVIDSON *et al.* 2016).

EPIDEMIOLOGÍA

La circulación de diversos Flavivirus está ampliamente reportada en la región sudamericana. DENV es el arbovirus más importante desde el punto de vista de la morbilidad y mortalidad, con más de la mitad de la población mundial viviendo en regiones con riesgo de contagio (BENNETT *et al.* 2003a). Según estimaciones recientes de la OMS, el dengue es endémico en más de 120 países, con un número de infectados anuales en el rango de 70 a 500 millones de personas, incluyendo 2 millones de casos severos que originan 20.000 muertes (THOMAS and ENDY 2011). En las Américas circulan los cuatro serotipos (DENV-1 a DENV- 4), lo que aumenta el riesgo de aparición de las formas más graves de la enfermedad. El dengue es una de las principales causas de morbilidad en niños y adultos latinoamericanos y su distribución e incidencia han aumentado notoriamente en los últimos 30 años. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) estima que el número de muertes sugiere una evolución clínica más severa que la anteriormente observada. Los casos de dengue se quintuplicaron en las Américas entre 2003 y 2013, registrándose en este último año más de 2,3 millones de casos, 37.705 de ellos graves y 1.289 muertes (OPS 2014). Si bien ya existe una vacuna aprobada y utilizada en diferentes países donde el dengue es endémico (GUY *et al.* 2015), su efectividad ha sido cuestionada por gran parte de la comunidad científica (FERGUSON *et al.* 2016; HALSTEAD and RUSSELL 2016). Asimismo, no se dispone de drogas antivirales para DENV por lo que la única forma de prevenir epidemias de dengue y dengue severo es el control del *Aedes aegypti* (UMAREDDY *et al.* 2007).

Luego de la exitosa campaña continental llevada a cabo en los 40 y 50 para erradicar este vector de las Américas (SOPER 1963), se produjo su re-introducción en Uruguay en 1997 (SALVATELLA 1997)

y rápidamente se dispersó por todo el territorio nacional (SALVATELLA and ROSA 2003). Debido a este hecho, así como a la ocurrencia de brotes epidémicos en la región, nuestro país ha estado en alerta realizando una activa vigilancia contra este agente viral desde 1997. En 2007, a consecuencia de un presunto brote de dengue en Salto, se puso en marcha el “Plan nacional de contingencia para una epidemia de dengue” (MSP 2006). Estos casos fueron analizados en nuestro laboratorio arrojando resultados negativos, lo que posteriormente fue confirmado por el Centro de Control de Enfermedades (CDC, Puerto Rico). Casos similares han sido estudiados por el MSP desde entonces, registrándose la ocurrencia de casos importados año tras año. Recientemente, en febrero de este año, se registraron los primeros casos de dengue autóctono luego de 100 años de su último reporte (SOSA 1916), a consecuencia de una epidemia que abarcó el cono Sur de América (GRATZ *et al.* 1996).

La emergencia de DENV en nuestro país ocurre en un momento de gran alerta epidemiológica en la región dada la circulación del ZIKV por primera vez en las Américas. ZIKV es un virus emergente transmitido por mosquitos que se identificó por vez primera en Uganda en 1947, en monos Rhesus (*Macaca mulatta*), a través de una red de monitoreo de la fiebre amarilla selvática (HAYES 2009). Posteriormente, se identificó su circulación en humanos en Uganda y en la República Unida de Tanzania (DICK *et al.* 1952). Se han registrado brotes de enfermedad por este virus en África, Asia, el Pacífico y recientemente en las Américas (DUFFY *et al.* 2009; FAYE *et al.* 2014; ZANLUCA *et al.* 2015; CAMPOS *et al.* 2015). Este agente viral ingresó en Sudamérica en 2014-2015 y rápidamente se expandió por todo el continente, habiéndose reportado en abril de 2016 un caso importado en nuestro país. Debido a que el vector es el mismo mosquito transmisor del DENV, no es de extrañar que en el corto plazo pueda darse una emergencia de este agente en Uruguay, con las dificultades sanitarias que puede desencadenar ya que si bien los cuadros clínicos que genera ZIKV suelen ser asintomáticos o muy leves, se ha reportado que puede ser capaz de ocasionar síntomas neurológicos, entre ellos el Síndrome de Guillain-Barré, así como neuropatías congénitas cuando infecta mujeres embarazadas (OEHLER *et al.* 2014; VENTURA *et al.* 2016; SCHULER-FACCINI *et al.* 2016).

En referencia a otros arbovirus pertenecientes a este género, es importante destacar la circulación de WNV, SLEV y YFV en la región sudamericana. WNV se mantiene en la naturaleza ciclando entre mosquitos del género *Culex* y aves, con equinos y humanos actuando como ocasionales hospederos finales (COLPITTS *et al.* 2012). Desde su primer aislamiento en Uganda en 1937 (SMITHBURN 1952) se han reportado casos esporádicos en diferentes regiones geográficas, llegando a las Américas en 1999, generando un importante brote en Estados Unidos (PETERSEN and ROEHRIG 2001). Desde entonces, WNV se ha propagado por todas las Américas hasta el sur de Argentina. Un patrón sin precedentes de grandes epidemias anuales de enfermedad neuro-invasiva en humanos continúa en América del Norte, lo que resulta en un impacto considerable en salud pública (PETERSEN and HAYES 2008). Casos de WNV han sido reportados en aves y equinos de diversos países de América del Sur, incluidos Argentina (MORALES *et al.* 2006; ADRIÁN DIAZ *et al.* 2008) y Brasil (MELANDRI *et al.* 2012; OMETTO *et al.* 2013; PAUVOLID-CORRÊA *et al.* 2014; VIEIRA *et al.* 2015). En Uruguay, si bien se han realizado ensayos serológicos para evaluar seropositividad para WNV en equinos, no existen reportes de su circulación hasta el momento (BURGUEÑO *et al.* 2013).

SLEV está ampliamente distribuido en las Américas, desde Canadá hasta Argentina. Se mantiene en la naturaleza ciclando entre diferentes especies mosquitos del género *Culex* y aves silvestres, teniendo a equinos y humanos como ocasionales hospederos finales (ACHESON 2011). Los cuadros clínicos varían desde casos asintomáticos hasta meningitis, encefalitis y otras afecciones al SNC (TRAVASSOS DA ROSA *et al.* 1998). La mayoría de las infecciones ocurren en Estados Unidos donde fue reportado por primera vez en 1933 (WEBSTER and FITE 1933). Sin embargo, en la región han ocurrido en los últimos años casos esporádicos o brotes en Brasil (ROCCO *et al.* 2005; MONDINI *et al.* 2007a; b; TERZIAN *et al.* 2011) y en las provincias argentinas de Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos (DIAZ *et al.* 2006; SPINSANTI *et al.* 2008; SEIJO *et al.* 2011; DÍAZ *et al.* 2012; BELTRÁN *et al.* 2014). En nuestro país hay trabajos de seroprevalencia realizados en las décadas del 60 y 70 indicando la existencia de seropositividad para SLEV en muestras sanguíneas humanas (SOMMA-MOREIRA *et al.* 1970). Asimismo, se han realizado estudios moleculares para identificar estos agente virales en muestras clínicas (SALAMANO *et al.* 2009) y se han reportado casos clínicos esporádicos de infección por SLEV en humanos en los últimos años, así como su circulación en equinos (DELFRARO 2002; BURGUEÑO 2012; QUIAN *et al.* 2012; BURGUEÑO *et al.* 2013; LÓPEZ and PACIEL 2013).

Por otra parte, existe una preocupación global por la posible re-emergencia de YFV en ciclos urbanos, más aún luego de la actual epidemia en desarrollo en el continente africano que dejó al menos 369 muertes en Angola, con un índice de mortalidad de 9,4% (WHO - YELLOW FEVER REPORT 2016). Se trata de un agente viral que causa la muerte a la mitad de los individuos que desarrollan síntomas graves. En las Américas, YFV se mantiene en la naturaleza en ciclos selváticos, con esporádicas infecciones de individuos reportadas en la última década en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Venezuela. El hecho de que este virus se transmita en ciclos urbanos por medio de *Aedes aegypti* ha dado lugar a la declaración de una alerta epidemiológica por parte de la OPS debido al riesgo de su eventual re-emergencia en el continente (PAHO 2015).

La co-circulación de estos arbovirus en la región sudamericana, así como la presencia en Uruguay de los mosquitos transmisores, ponen en potencial riesgo a nuestro país de la introducción de alguno de estos agentes virales y la subsecuente generación de brotes epidémicos. Una gran proporción de los MBFV que se asocian con enfermedades humanas o animales circulan en las regiones tropicales y subtropicales, debido a la amplia distribución de vectores competentes para su transmisión. Este patrón se expande cada vez a mayor cantidad de Flavivirus cuya circulación endémica ha estado usualmente restringida a regiones particulares del planeta. Los Flavivirus se adaptan rápidamente a nuevos vectores y hospederos susceptibles, incrementando su eficiencia de transmisión y dificultando el control de estas enfermedades emergentes. De esta forma, arbovirus que solían ser enzoóticos ciclando entre mosquitos y mamíferos/aves sin afectar prácticamente a los humanos, han colonizado otras regiones y se han convertido en zoonóticos. La dispersión y el aumento en la frecuencia de epidemias generadas por MBFV se atribuyen a numerosos factores, entre ellos el aumento en la población humana y en la densidad de mosquitos en las últimas décadas, dada la intensa urbanización no planificada, el aumento en el transporte humano, así como el cambio climático, que promueve la generación de ambientes ecológicos óptimos para la actividad vectorial.

OBJETIVO GENERAL

Investigar diferentes aspectos de la epidemiología molecular de los Flavivirus, con especial énfasis en arbovirus emergentes en Uruguay y las Américas: DENV y ZIKV.

CAPÍTULO 1: FLAVIVIRUS

Objetivo Específico I:

Investigar las características epidemiológicas y relaciones filogenéticas de los Flavivirus.

Objetivo Específico II:

Optimización de los métodos de diagnóstico molecular de Flavivirus.

CAPÍTULO 2: VIRUS DENGUE

Objetivo Específico III:

Caracterización genética y antigénica de cepas de DENV circulantes en Uruguay.

CAPÍTULO 3: VIRUS ZIKA

Objetivo Específico IV:

Investigar los patrones evolutivos de ZIKV.

Objetivo Específico V:

Investigar los patrones de uso de codones de ZIKV.

Objetivo Específico VI:

Evaluar la posible presencia de miRNAs codificados por el genoma de ZIKV.

CAPÍTULO 1: FLAVIVIRUS

Objetivo Específico I: Investigar las características epidemiológicas y relaciones filogenéticas de los Flavivirus.

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO TEÓRICO

Los primeros indicios acerca de las relaciones taxonómicas entre los Flavivirus tuvieron como base estudios de reactividad cruzada antigénica en ensayos de neutralización, fijación del complemento e inhibición de la hemaglutinación (DE MADRID and PORTERFIELD 1974; CALISHER *et al.* 1989). Sin embargo, aunque mucha información obtenida por estos estudios resultó de gran utilidad para interpretar algunos aspectos evolutivos de estos agentes virales, no se logró con ellos categorizar con certeza muchos de sus miembros (GAUNT *et al.* 2001). Posteriormente, mediante la utilización de reconstrucciones filogenéticas a partir de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, se produjo un avance sustancial en el entendimiento de la diversidad, interrelación y dispersión de los Flavivirus (GOULD *et al.* 2003). Diferentes enfoques metodológicos fueron utilizados para analizar determinados genes (particularmente las regiones codificantes para las proteínas E, NS3 y NS5), y regiones codificantes completas (MARIN *et al.* 1995b; KUNO *et al.* 1998; BILLOIR *et al.* 2000; GAUNT *et al.* 2001; GOULD *et al.* 2003; COOK and HOLMES 2006; GRARD *et al.* 2010; MOUREAU *et al.* 2015; BLITVICH and FIRTH 2015). Estos estudios lograron agrupar las diferentes especies de acuerdo a su rango de hospedero, vectores que las transmiten, enfermedades que causan, así como otros aspectos epidemiológicos, ecológicos y geográficos. Sin embargo, la topología observada a partir del análisis de diferentes regiones codificantes da lugar a algunas incongruencias filogenéticas que no permiten terminar de resolver las relaciones taxonómicas de manera adecuada.

En el presente estudio realizaremos una extensa revisión bibliográfica para explorar diferentes características epidemiológicas de los Flavivirus. Asimismo, pretendemos investigar las relaciones filogenéticas existentes entre los diferentes miembros de este género, utilizando diversas aproximaciones metodológicas que nos permitan la resolución de algunas discrepancias filogenéticas observadas en reportes previos. Para ello, analizaremos todas las especies cuyas regiones codificantes completas estén reportadas, para obtener el conjunto de datos de secuencias más diverso analizado hasta la fecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

CONSTRUCCIÓN DE CONJUNTO DE DATOS

Se descargaron los genomas completos disponibles de todas las especies pertenecientes al género Flavivirus, tanto las reconocidas por el ICTV, como las tentativas. Para ello se utilizó la base de datos ViPR (*Virus Pathogen Database and Analysis Resource*), del NIAID (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*), disponible en el sitio <http://www.viprbrc.org> (PICKETT *et al.* 2012). Posteriormente, se obtuvo la secuencia consenso para cada especie (los nucleótidos más frecuentes encontrados en cada posición del alineamiento) utilizando el *software Entropy-One* disponible en el sitio <http://www.hiv.lanl.gov>. A continuación, se utilizó el programa *MEGA7* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versión 7.0) (KUMAR *et al.* 2016) para recortar los extremos 5' y 3' NCR, obteniéndose únicamente la región codificante para la poliproteína viral de cada una de las especies.

Asimismo, con el fin de obtener información respecto a cada una de estas especies de Flavivirus, se exploraron diferentes publicaciones presentes en la base de datos bibliográfica Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Se buscó la mayor información posible respecto al vector transmisor, rango de hospedero, afección causada en humanos (si hay reportes) y región geográfica de circulación (ver Tablas 1 y 2).

ALINEAMIENTO

Se consideraron diferentes estrategias para lograr el mejor alineamiento posible. Se utilizaron los programas *Clustal W* (THOMPSON *et al.* 1994) y *MUSCLE* (EDGAR 2004) para alinear secuencias nucleotídicas, aminoácidas y en codones. Asimismo, se evaluó el efecto del curado de los alineamientos obtenidos mediante el programa *GBlocks v.0.91b* (CASTRESANA 2000; TALAVERA and CASTRESANA 2007), eliminando regiones pobremente alineadas bajo condiciones más y menos estrictas en la selección de los bloques.

ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Dada la distancia genética existente entre las diferentes especies de Flavivirus, llevamos a cabo los análisis filogenéticos a partir del análisis de secuencias aminoácidas, limitando los potenciales errores en la inferencia evolutiva que pueden obtenerse a partir del análisis de nucleótidos, en los que suelen haber múltiples sitios saturados (BREINHOLT and KAWAHARA 2013). Para cada alineamiento obtenido bajo las diferentes condiciones descritas, se analizó en primer lugar el modelo de sustitución aminoácido que mejor ajustaba a cada conjunto de datos con el programa *ProtTest 3* (DARRIBA *et al.* 2011). A continuación, utilizando este modelo evolutivo se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud mediante el programa *PhyML* v.3.0 utilizando 500 pseudo-réplicas de *bootstrap* para evaluar la robustez de cada nodo (GUINDON *et al.* 2010). Se editaron los árboles obtenidos mediante el programa *FigTree* v1.4.2 (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONSTRUCCIÓN DE CONJUNTO DE DATOS

Se obtuvo un conjunto de datos de 4356 genomas completos correspondientes a las siguientes 98 especies de Flavivirus:

AEFV (*Aedes* Flavivirus); AHFV (Alkhurma Hemorrhagic Fever virus); ALFV (Alfuy virus); APOIV (Apoi virus); AROAV (Aroa virus); BAGV (Bagaza virus); BANV (Banzi virus); BAIV (Bainyik virus); BARKV (Barkedji virus); BCV (Batu Cave virus); BOUV (Bouboi virus); BSQV (Bussuquara virus); BYDV (Baiyangdian virus); CHAOV (Chaoyang virus); CFAV (Cell Fusing Agent virus); CPCV (Cacipacore virus); CTFV (*Culex theileri* Flavivirus); CxFV (*Culex* Flavivirus); DEDSV (Duck Egg Drop Syndrome virus); DENV-1 (Dengue virus 1); DENV-2 (Dengue virus 2); DENV-3 (Dengue virus 3); DENV-4 (Dengue virus 4); DFV (Duck Flavivirus); DONV (Donggang virus); DTV (Deer Tick virus); EHV (Edge Hill virus); ENTV (Entebbe Bat virus); EPEV (Ecuador Paraíso Escondido virus); GGEV (Greek Goat Encephalitis virus); GGYV (Gadgets Gully virus); HANKV (Hanko virus); IGUV (Iguapé virus); ILHV (Ilheus virus); ILOV (Ilomantsi virus); ITV (Israel Turkey Meningoencephalitis virus); JEV (Japanese Encephalitis virus); JUGV (Jugra virus); JUTV (Jutiapa virus); KADV (Kadam virus); KAMV (Kama virus); KEDV (Kedougou virus); KOKV (Kokobera virus); KOUV (Koutango virus); KRV (Kamiti River virus); KSIV (Karshi virus); KUNV (Kunjin virus); KYDV (Kyasanur Forest Disease virus); LAMV (Lammi virus); LGTV (Langat virus); LIV (Louping Ill virus); MEAV (Meaban virus); MECDV (Mercadeo virus); MMLV (Montana Myotis Leukoencephalitis virus); MODV (Modoc virus); MOSQFV (Mosquito Flavivirus); MVEV (Murray Valley Encephalitis virus); NAKV (Naikiwogo virus); NEGV (Negishi virus); NHUM (Nhumirim virus); NJLV (Naranjal virus); NMV (New Mapoon virus); NOUN (Nounané virus); NTAV (Ntaya virus); OHFU (Omsk Hemorrhagic Fever virus); PaRV (Parramatta River virus); PCV (Palm Creek virus); POTV (Potiskum virus); POWV (Powassan virus); QBV (Quang Binh virus); PPBV (Phnom Penh Bat virus); RBV (Rio Bravo virus); RFV (Royal Farm virus); ROCV (Rocio virus); SABV (Saboya virus); SEPV (Sepik virus); SGEV (Spanish Goat Encephalitis virus); SLEV (Saint Louis Encephalitis virus); SOKV (Sokuluk virus); SPOV (Spondweni virus); SREV (Saumarez Reef virus); SSEV (Spanish Sheep Encephalitis virus); STRV (Stratford virus); STWV (Sitiawan virus); TBEV (Tick Borne Encephalitis virus); TMUV (Tembusu virus); TORV (Torres virus); TSEV (Turkish Sheep Encephalitis virus); TYUV (Tyuleniy virus); UGSV (Uganda S virus); USUV (Usutu virus); WSLV (Wesselsbron virus); WNV (West Nile virus); YAOV (Yaounde virus); YDFV (Yamadai Flavivirus); YFV (Yellow Fever virus); YOKV (Yokose virus) y ZIKV (Zika virus) (ver Tablas 1 y 2).

Tabla 1: Flavivirus pertenecientes a los grupos ISFV, TBFV y NKV. Se detalla la información taxonómica, epidemiológica y geográfica de cada una de las especies.

Acrónimo	Especie	Vector/Hospedero	Vector (Género)	Hospedero	Enferm. en humanos	Región	Referencia
AEFV	<i>Aedes</i> Flavivirus	Circulantes en mosquitos, sin hospedero vertebrado conocido (ISFV)		<i>Aedes</i>	No	USA/Japón	(HADDOW <i>et al.</i> 2013a)
CAV	Cell Fusing Agent virus			<i>Aedes/Culex</i>	No	Amplia	(YAMANAKA <i>et al.</i> 2013)
CxFV	<i>Culex</i> Flavivirus			<i>Culex</i>	No	Global	(NEWMAN <i>et al.</i> 2011)
CTFV	<i>Culex theileri</i> Flavivirus			<i>Culex</i>	No	Portugal	(PARREIRA <i>et al.</i> 2012)
HANKV	Hanko virus			<i>Aedes/Ochlerotatus</i>	No	Finlandia	(HUHTAMO <i>et al.</i> 2012)
KRV	Kamiti River virus			<i>Aedes</i>	No	Kenia	(LUTOMIAH <i>et al.</i> 2009)
MECDV	Mercadeo virus			<i>Culex</i>	No	Panamá	(CARRERA <i>et al.</i> 2015)
MOSQFV	Mosquito Flavivirus			<i>Culex</i>	No	China	(ZUO <i>et al.</i> 2014)
NAKV	Naikiwogo virus			<i>Mansonia</i>	No	Uganda	(COOK <i>et al.</i> 2009)
PaRV	Parramatta River virus			<i>Aedes</i>	No	Australia	(MCLEAN <i>et al.</i> 2015)
PCV	Palm Creek virus			<i>Coquillettidia</i>	No	Australia	(HOBSON-PETERS <i>et al.</i> 2013)
QBV	Quang Binh virus			<i>Culex</i>	No	Asia	(ZUO <i>et al.</i> 2014)
YDFV	Yamadai Flavivirus			<i>Culex</i>	No	Japón	(KUWATA <i>et al.</i> 2015)
AHFV	Alkhurma Hemorrhagic Fever virus			Transmitidos por garrapatas a mamíferos	<i>Ixodes</i>	Camellos/Ovejas	F. Hemorr./Encefalitis
DTV	Deer Tick virus	<i>Ixodes</i>	Roedores		Encefalitis	USA	(EL KHOURY <i>et al.</i> 2013)
GGEV	Greek Goat Encephalitis virus	<i>Ixodes</i>	Cabras		No hay reportes	Grecia	(PAPA <i>et al.</i> 2008)
GGYV	Gadgets Gully virus	<i>Ixodes</i>	Aves marinas		No hay reportes	Australia/Antártida	(GRARD <i>et al.</i> 2007)
KADV	Kadam virus	<i>Ixodes/Rhipicephalus</i>	Ganado/Camellos		No hay reportes	Uganda/A. Saudita	(HENDERSON <i>et al.</i> 1970; WOOD <i>et al.</i> 1982)
KFDV	Kyasanur Forest Disease virus	<i>Haemaphysalis</i>	PNH/Murciélagos		F. Hemorr.	Sudeste Asiático	(PATTNAIK; CALISHER <i>et al.</i> 2006)
KSIV	Karshi virus	<i>Ornithodoros</i>	Roedores		Encefalitis	Asia	(TURELL <i>et al.</i> 2008)
LGTV	Langat virus	<i>Ixodes/Haemaphysalis</i>	Roedores/Humanos		Encefalitis	Sudeste Asiático	(SMITH 1956; BANCROFT <i>et al.</i> 1976)
LIV	Louping Ill virus	<i>Ixodes</i>	Ovejas/Humanos		Encefalitis	Europa	(CHARREL <i>et al.</i> 2004)
NEGV	Negishi virus	Desconocido	Desconocido		Encefalitis	Asia	(VENUGOPAL <i>et al.</i> 1992)
OHFV	Omsk Hemorrhagic Fever virus	<i>Dermacentor</i>	Roedores/Humanos		F. Hemorr./Encefalitis	Rusia	(KARAN <i>et al.</i> 2014)
POWV	Powassan virus	<i>Ixodes/Dermacentor</i>	Roedores/Humanos		Encefalitis	Rusia/N. América	(NEITZEL <i>et al.</i> 2013)
RFV	Royal Farm virus	<i>Argas</i>	Desconocido		No hay reportes	Afganistán	(WILLIAMS <i>et al.</i> 1972)
SGEV	Spanish Goat Encephalitis virus	<i>Ixodes</i>	Cabra		No hay reportes	España	(MANSFIELD <i>et al.</i> 2015)
SSEV	Spanish Sheep Encephalitis virus	<i>Ixodes</i>	Ovejas		No hay reportes	España	(MARIN <i>et al.</i> 1995a)
TBEV	Tick Borne Encephalitis virus	<i>Ixodes</i>	Roedores		Encefalitis	Amplia	(BOGOVIC and STRLE 2015)
TSEV	Turkish Sheep Encephalitis virus	<i>Ixodes</i>	Ovejas		No hay reportes	Turquía	(GAO <i>et al.</i> 1993)
KAMV	Kama virus	Transmitidos por garrapatas a aves	<i>Ixodes</i>	Aves marinas	No hay reportes	Rusia	(L'VOV <i>et al.</i>)
MEAV	Meaban virus		<i>Ornithodoros</i>	Aves marinas	No hay reportes	Francia	(CHASTEL <i>et al.</i> 1985)
SREV	Saumarez Reef virus		<i>Ornithodoros/Ixodes</i>	Aves marinas	No hay reportes	Australia	(ST GEORGE <i>et al.</i> 1977)
TYUV	Tyuleniy virus		<i>Ixodes</i>	Aves marinas	No hay reportes	Rusia	(L'VOV <i>et al.</i>)
APOIV	Apoi virus	Vector desconocido (NKV)		Roedores	No hay reportes	Japón	(JUNGLIN <i>et al.</i> 2009)
BCV	Batu Cave virus			Murciélagos	No hay reportes	Malasia	(KUNO <i>et al.</i> 1998)
JUTV	Jutiapa virus			Roedores	No hay reportes	Guatemala	(VARELAS-WESLEY and CALISHER 1982)
MMLV	Montana Myotis Leuk. Virus			Murciélagos	No hay reportes	USA	(CHARLIER <i>et al.</i> 2002)
MODV	Modoc virus			Roedores	No hay reportes	USA	(ADAMS <i>et al.</i> 2013)
PPBV	Phnom Penh Bat virus			Murciélagos	No hay reportes	Cambodia	(KUNO <i>et al.</i> 1998)
RBV	Rio Bravo virus			Murciélagos	Encefalitis	México/USA	(VOLKOVA <i>et al.</i> 2012)

Tabla 2: Flavivirus transmitidos por mosquitos (MBFV).

Acrónimo	Especie	Comp. antigénico	Vector	Hospedero	Enf. en humanos	Región	Referencia
AROAV	Aroa virus	Aroa	<i>Culex</i>	Roedores	No hay reportes	Venezuela	(MOUREAU <i>et al.</i> 2015)
BSQV	Bussuquara virus		<i>Culex</i>	Roedores/PNH	Fiebre	Sudamérica	(FIGUEIREDO 2000)
IGUV	Iguapé virus		<i>Culex</i>	Roedores	No hay reportes	Brasil	(COIMBRA <i>et al.</i> 1993)
NJLV	Naranjal virus		<i>Culex</i>	Roedores	No hay reportes	Ecuador	(CALISHER <i>et al.</i> 1983)
DENV-1	Dengue virus 1	Dengue	<i>Aedes</i>	PNH/Humanos	Fiebre/F. Hem.	Reg. trop. y subtrop.	(GUZMAN <i>et al.</i> 2010)
DENV-2	Dengue virus 2		<i>Aedes</i>	PNH/Humanos	Fiebre/F. Hem.	Reg. trop. y subtrop.	(GUZMAN <i>et al.</i> 2010)
DENV-3	Dengue virus 3		<i>Aedes</i>	PNH/Humanos	Fiebre/F. Hem.	Reg. trop. y subtrop.	(GUZMAN <i>et al.</i> 2010)
DENV-4	Dengue virus 4		<i>Aedes</i>	PNH/Humanos	Fiebre/F. Hem.	Reg. trop. y subtrop.	(GUZMAN <i>et al.</i> 2010)
KEDV	Kedougou virus		<i>Aedes</i>	Desconocido	Asintomático	Africa	(KUNO and CHANG 2005a)
BAGV	Bagaza virus	Ntaya	<i>Culex/Aedes</i>	Aves	Encefalitis	Africa/Asia/Europa	(BONDRE <i>et al.</i> 2009; LLORENTE <i>et al.</i> 2015)
BYDV	Baiyangdian virus		<i>Culex</i>	Aves	No hay reportes	China	(ZHUOMING QIN 2013)
DEDSV	Duck Egg Drop Syndrome virus		<i>Culex</i>	Aves	Asintomático	Asia	(LIU <i>et al.</i> 2013)
DFV	Duck Flavivirus		<i>Culex</i>	Aves	No hay reportes	China	(MA <i>et al.</i> 2013a)
ILHV	Ilheus virus		<i>Psorophora/Aedes</i>	Aves	Encefalitis	Centro y Sudamérica	(JOHNSON <i>et al.</i> 2007; PAUVOLID-CORRÊA <i>et al.</i> 2013)
ITV	Israel Turkey Mening. Virus		<i>Culex</i>	Aves	No hay reportes	Israel	(BRAVERMAN <i>et al.</i> 2003)
NTAV	Ntaya virus		<i>Culex</i>	Aves/Anim. domést.	Encefalitis	Africa	(DILCHER <i>et al.</i> 2013)
ROCV	Rocio virus		<i>Culex</i>	Aves	Encefalitis	Brasil	(KUNO and CHANG 2005a)
STWV	Sitiawan virus		<i>Culex</i>	Aves	No hay reportes	Malasia	(LIU <i>et al.</i> 2012)
TMUV	Tembusu virus		<i>Culex</i>	Aves	Asintomático	China	(TANG <i>et al.</i> 2015)
BANV	Banzi virus		<i>Culex</i>	Roedores	Fiebre	Africa	(FULOP <i>et al.</i> 1995)
BOUV	Bouboui virus	<i>Aedes/Culex</i>	Roedores	Asintomático	Africa	(DIGOUTTE <i>et al.</i> 1971)	
EHV	Edge Hill virus	<i>Aedes/Culex</i>	Marsupiales	Artralgia	Australia	(MACDONALD <i>et al.</i> 2010)	
JUGV	Jugra virus	Desconocido	Murciélagos	No hay reportes	Asia	(CALISHER <i>et al.</i> 2006)	
POTV	Potiskum virus	Desconocido	Roedores	No hay reportes	Nigeria	(OMILABU <i>et al.</i> 1989)	
SABV	Saboya virus	<i>Phlebotomus/Anopheles</i>	Murciélagos	No hay reportes	Africa	(FONTENILLE <i>et al.</i> 1994)	
SEPV	Sepik virus	<i>Mansonia</i>	Animales domésticos	Fiebre	Oceanía	(KUNO and CHANG 2006)	
UGSV	Uganda S virus	<i>Aedes</i>	Aves/Murciélagos	Asintomático	Africa	(BOORMAN 1958)	
WSLV	Wesselsbron virus	<i>Aedes</i>	Rumiantes	Fiebre	África/Asia	(WEYER <i>et al.</i> 2013)	
YFV	Yellow Fever virus	<i>Aedes/Haemagogus</i>	PNH/Humanos	F. Hemorr.	Africa/Sudamérica	(BARNETT 2007)	
ALFV	Alfy virus	Encefalitis Japonesa	<i>Culex</i>	Aves	Asintomático	Australia	(MAY <i>et al.</i> 2006)
CPCV	Cacipacore virus		Desconocido	Aves	Encefalitis	Brasil	(BALEOTTI <i>et al.</i> 2003; BATISTA <i>et al.</i> 2011)
JEV	Japanese Encephalitis virus		<i>Culex</i>	Aves/Cerdos/Murciél.	Encefalitis	Asia	(CALISHER <i>et al.</i> 2006; LORD <i>et al.</i> 2015)
KOUV	Koutango virus		<i>Aedes</i>	Roedores	Fiebre	África	(PROW <i>et al.</i> 2014)
KUNV	Kunjin virus		<i>Culex</i>	Aves	Asintomático	Oceanía	(PROW 2013)
MVEV	Murray Valley Enceph. Virus		<i>Culex</i>	Aves	Encefalitis	Oceanía	(SELVEY <i>et al.</i> 2014)
SLEV	Saint Louis Encephalitis virus		<i>Culex</i>	Aves/Murciélagos	Encefalitis	América	(CALISHER <i>et al.</i> 2006; REIMANN <i>et al.</i> 2008)
USUV	Usutu virus		<i>Culex/Aedes</i>	Aves	Encefalitis	Africa/Europa	(NIKOLAY <i>et al.</i> 2011; ENGEL <i>et al.</i> 2016)

WNV	West Nile virus		<i>Culex</i>	Aves/Mamíferos	Encefalitis	Amplia	(COLPITTS <i>et al.</i> 2012)
YAOV	Yaounde virus		<i>Culex/Aedes</i>	Aves	No hay reportes	África	(WILLIAMS <i>et al.</i> 2012)
BAIV	Bainyik virus	Kokobera	<i>Culex</i>	Canguros/Caballos	No hay reportes	Oceanía	(WARRILOW <i>et al.</i> 2014)
KOKV	Kokobera virus		<i>Culex</i>	Canguros/Caballos	Artralgia	Oceanía	(NISBET <i>et al.</i> 2005)
NMV	New Mapoon virus		<i>Culex</i>	Canguros/Caballos	No hay reportes	Oceanía	(NISBET <i>et al.</i> 2005)
STRV	Stratford virus		<i>Culex</i>	Canguros/Caballos	Artralgia	Oceanía	(DOHERTY <i>et al.</i> 1963)
TORV	Torres virus		<i>Culex</i>	Canguros/Caballos	No hay reportes	Oceanía	(WARRILOW <i>et al.</i> 2014)
SPOV	Spondweni virus		Spondweni	<i>Aedes/Culex</i>	Desconocido	Fiebre	África/Oceanía
ZIKV	Zika virus	<i>Aedes</i>		PNH/Humanos	Fiebre	África/Asia/América	(FAYE <i>et al.</i> 2014)
BARKV	Barkedji virus	Circulantes en mosquitos, sin hospedero vertebrado conocido (ISFV-2)	<i>Culex</i>	Desconocido	No hay reportes	Senegal	(MOUREAU <i>et al.</i> 2015)
CHAOV	Chaoyang virus		<i>Aedes/Culex</i>	Desconocido	No hay reportes	Asia	(LEE <i>et al.</i> 2013)
DONV	Donggang virus		<i>Aedes</i>	Desconocido	No hay reportes	China	(LEE <i>et al.</i> 2013)
ILOV	Ilomantsi virus		<i>Ochlerotatus</i>	Desconocido	No hay reportes	Finlandia	(HUHTAMO <i>et al.</i> 2014)
LAMV	Lammi virus		<i>Aedes</i>	Desconocido	No hay reportes	Finlandia	(HUHTAMO <i>et al.</i> 2009)
NHUV	Nhumirim virus		<i>Culex</i>	Desconocido	No hay reportes	Brasil	(KENNEY <i>et al.</i> 2014)
NOUV	Nounané virus		<i>Uranotaenia</i>	Desconocido	No hay reportes	Costa de Marfil	(JUNGLIN <i>et al.</i> 2009)
EPEV	Ecuador Paraíso Escondido virus		Aislado de flebótomos	<i>P. abonnenci</i> (flebótomo)	Desconocido	No hay reportes	Ecuador
ENTV	Entebbe Bat virus	Entebbe Bat	Desconocido	Murcélagos	No hay reportes	Uganda	(KADING <i>et al.</i> 2015)
SOKV	Sokoluk virus		Desconocido	Murcélagos	No hay reportes	Asia	(L'VOV <i>et al.</i>)
YOKV	Yokose virus		Desconocido	Murcélagos	No hay reportes	Japón	(TAJIMA <i>et al.</i> 2005)

La información recabada de cada una de estas especies respecto a su dispersión geográfica, vector de transmisión, rango de hospedero y enfermedad causada en humanos, se resume en las Tablas 1 y 2. La Tabla 1 detalla los Flavivirus estrictamente circulantes en insectos (ISFV), los transmitidos por garrapatas (TBFV) y las especies cuyo vector de transmisión es desconocido (NKV). Por otra parte, la Tabla 2 resume la información de los Flavivirus que se asocian evolutivamente con el grupo de las especies transmitidas por mosquitos (MBFV). Para estas especies se detalla además el complejo antigénico al que pertenece cada una de ellas.

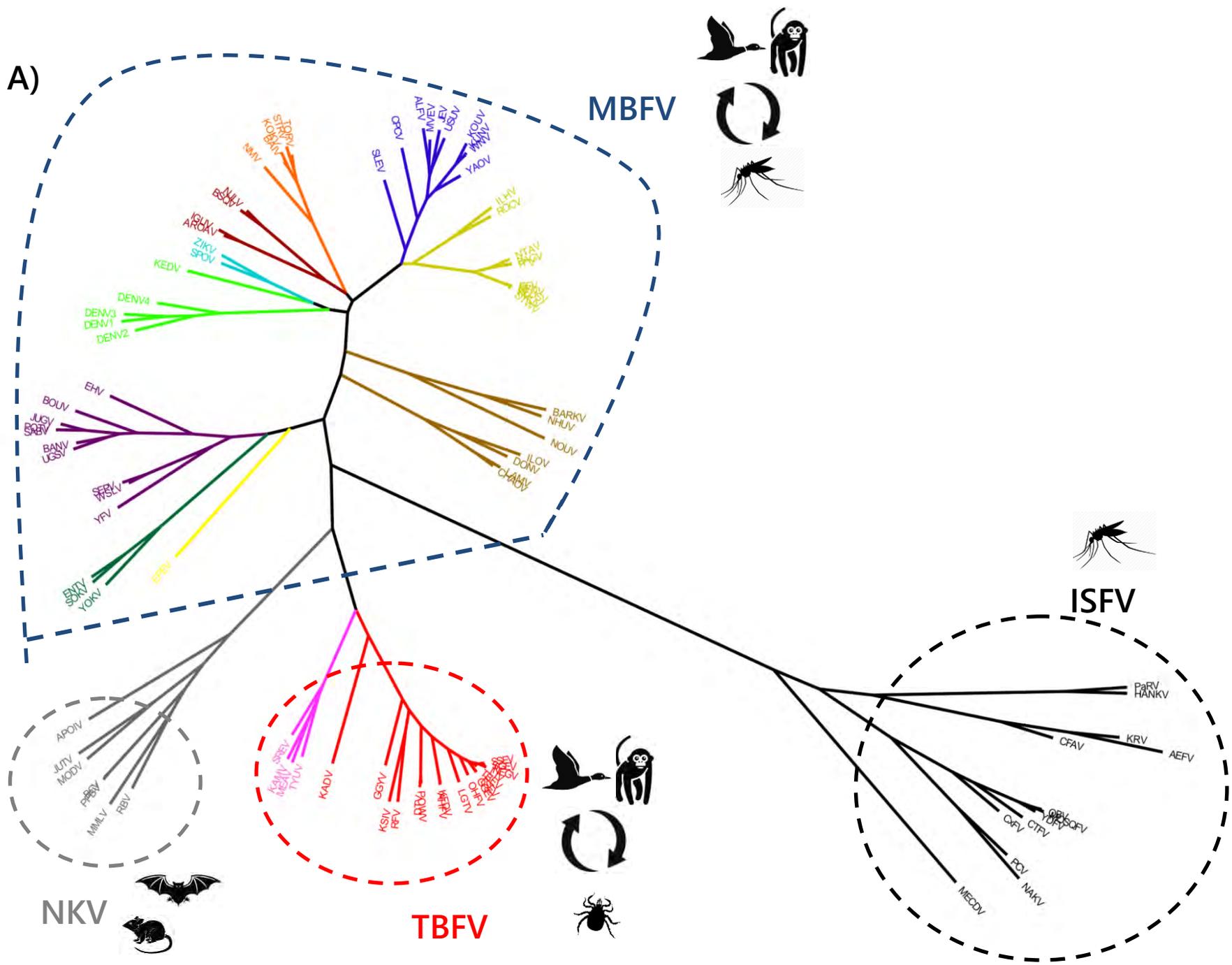
ALINEAMIENTO

Se investigaron diferentes estrategias para la obtención de buenos alineamiento de partida, con el objetivo de obtener relaciones filogenéticas que realmente reflejen las relaciones evolutivas existente entre los distintos Flavivirus. Estos tipos de inferencias resultan particularmente complejos de analizar cuando se consideran especies tan divergentes entre sí, por lo que hay que ser cauto a la hora de escoger las metodologías de análisis para que las relaciones filogenéticas obtenidas no estén sesgadas por errores en el alineamiento. En este sentido descartamos los alineamientos generados a partir de secuencias nucleotídicas, ya que generan *gaps* de 1 y 2 nucleótidos que no tienen ningún significado biológico cuando consideramos una región proteica. Es por ello que teniendo en cuenta que el genoma de los Flavivirus codifica para una poliproteína que es clivada co y post-traduccionalmente, la mejor estrategia para realizar un alineamiento es eliminar las regiones no codificantes de los extremos y alinear las secuencias aminoacídicas. Asimismo, se obtuvieron mejores alineamientos por *MUSCLE* que por *Clustal W*, lo que fue reflejado posteriormente por valores de verosimilitud más altos en las filogenias resultantes.

Por otra parte, se analizaron diferentes condiciones para el curado de los alineamientos mediante el algoritmo *GBlocks*, obteniéndose mejores resultados al utilizar condiciones menos estrictas de selección, permitiendo la inclusión de *gaps* en los bloques finales. El alineamiento final tuvo una longitud de 2179 sitios.

ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Se realizaron árboles de máxima verosimilitud mediante el programa *PhyML* v.3.0 (GUINDON *et al.* 2010), basados en el modelo de sustitución aminoacídica WAG + F (WHELAN and GOLDMAN 2001). Se utilizó una distribución *Gamma* discreta para modelar las diferencias en la tasa evolutiva entre sitios, considerándose algunos sitios invariables (G + I). Asimismo, se utilizó el método de *bootstrap* (500 pseudo-replicas) como medida de robustez para cada nodo. Se editaron los árboles resultantes con el programa *FigTree* v.1.4.2, coloreándose las especies de acuerdo a su vector de transmisión o complejo antigénico. Los resultados se pueden apreciar en los árboles filogenéticos que a efectos de contribuir a su discusión, se muestran tanto en su forma estrellada como tradicional (Figuras 3A y 3B, respectivamente).



B)

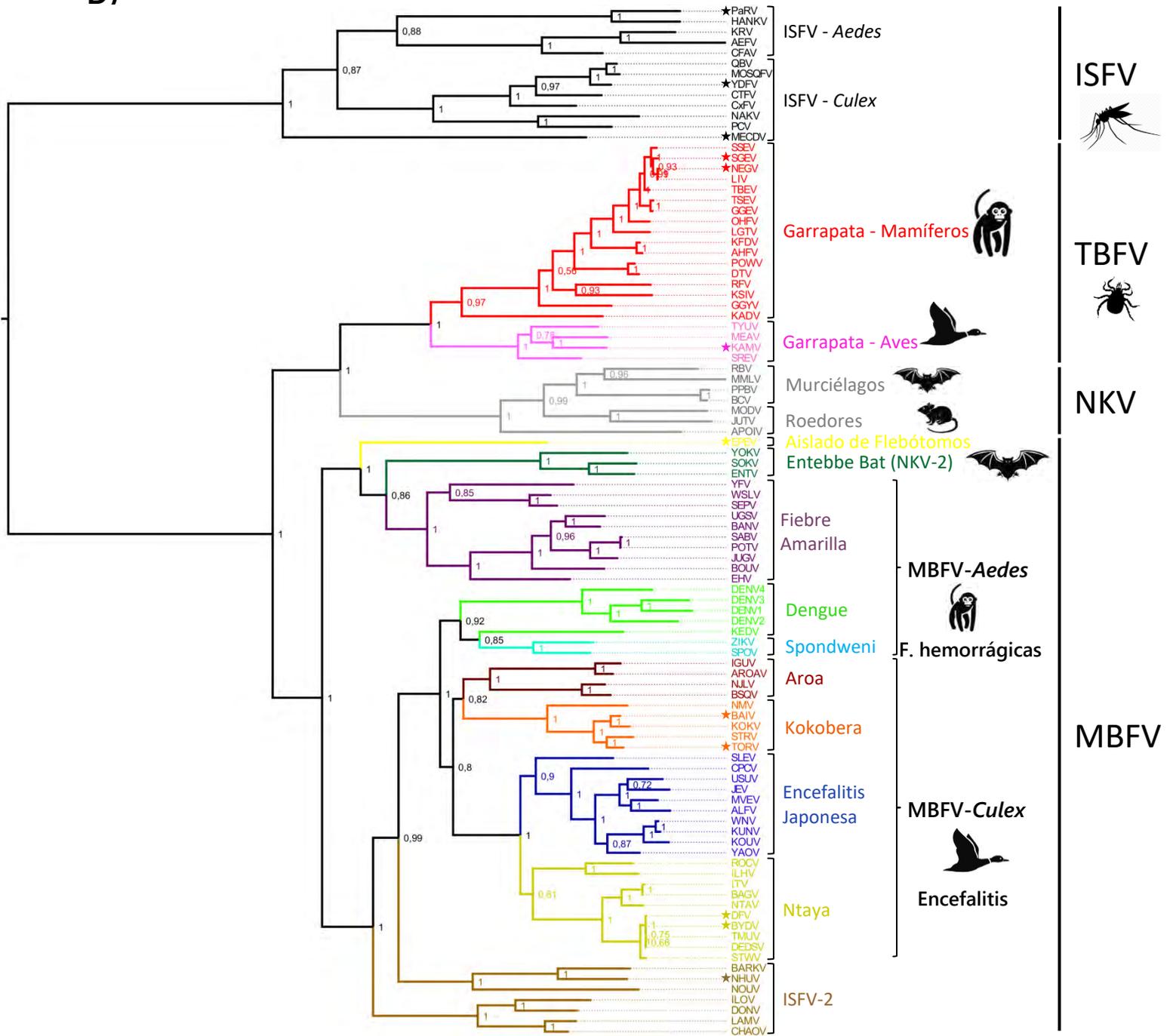


Figura 3 - Análisis filogenético de máxima verosimilitud del género Flavivirus. Se aprecian las relaciones filogenéticas inferidas a partir del análisis de las 98 especies de Flavivirus cuyo ORF completo está disponible, bajo el modelo de sustitución aminoacídica WAG + F + G + I. Se ubicó la raíz en el punto medio a efectos de facilitar la interpretación. Se aprecian las disposiciones estrellada (A) y tradicional (B). Se utilizó el método de *bootstrap* (500 pseudo-replicas) como medida de robustez para cada nodo. Los árboles resultantes se editaron con el programa *FigTree* v.1.4.2, utilizándose el siguiente código de color: ISFV (negro); NKV (gris); TBFV (rojo o rosado, de acuerdo a si infectan mamíferos o aves, respectivamente); ISFV-2 (marrón); EPEV (amarillo); serogrupo Entebbe Bat (verde oscuro). A su vez, los MBFV se indican de acuerdo a su complejo antigénico: Fiebre Amarilla (violeta); Dengue (verde claro); Spondweni (celeste); Aroa (bordeaux); Kokobera (anaranjado); Encefalitis Japonesa (azul); Ntaya (mostaza). La barra de escala denota distancia genética. Las estrellas indican las especies incluidas en este estudio que no fueron tenidas en cuenta en el análisis filogenético más diverso hasta el momento (MOUREAU *et al.* 2015).

Tal como se aprecia en la Figura 3, existe una fuerte correlación entre las relaciones filogenéticas inferidas entre los diferentes Flavivirus, y sus características ecológicas y epidemiológicas, como fue demostrado previamente (GAUNT *et al.* 2001). Las distintas especies se agrupan en clados individuales, todos con un fuerte soporte estadístico (valores de *bootstrap* > 0.8), de acuerdo al vector de transmisión u hospedero específico. Estos grupos, previamente definidos (MARIN *et al.* 1995b; KUNO *et al.* 1998), integran separadamente a los ISFV, TBFV, NKV y MBFV, y se señalan en la Figura 3A en negro, rojo, gris y azul, respectivamente. Asimismo, en la Figura 3B se detallan distintas características particulares de cada grupo que se discutirán individualmente a continuación.

ISFV

Si bien hasta el momento los ISFV han sido aislados exclusivamente de mosquitos, algunos reportes sugieren su circulación en otros tipos de artrópodos (MOUREAU *et al.* 2010; SÁNCHEZ-SECO *et al.* 2010; COOK *et al.* 2013). La detección de distintos ISFV tanto en mosquitos hembras como machos, así como en diferentes estadios de su ciclo de vida, sugiere que la transmisión vertical es el principal mecanismo por el que persisten en la naturaleza (BOLLING *et al.* 2011, 2012; HADDOW *et al.* 2013a). Asimismo, nunca se han podido aislar ISFV de vertebrados ni en líneas celulares de éstos, lo que sugiere que presentan un fenotipo de replicación no competente en vertebrados, hecho por el cual han sido históricamente el grupo de Flavivirus menos estudiado (BLITVICH and FIRTH 2015). Sin embargo, en los últimos años el interés por investigarlos ha aumentado significativamente debido a estudios que indican que la replicación de MBFV puede ser suprimida en mosquitos previamente infectados con ISFV. Esto se puede explicar por el proceso denominado interferencia homóloga o exclusión por súper-infección, por el cual una infección viral pre-existente inhibe la infección por el mismo virus u otro estrechamente relacionado (BARBANTI-BRODANO *et al.* 1970; FARFAN-ALE *et al.* 2009). Este fenómeno ha sido asociado a la inhibición de diferentes MBFV, como MVEV y WNV (HOBSON-PETERS *et al.* 2013). Por contraposición, se ha reportado la potenciación de la infección por WNV en mosquitos simultáneamente infectados con CxFV (KENT *et al.* 2010; NEWMAN *et al.* 2011). Vale destacar que CxFV ha sido detectado el *pooles* de *Culex pipiens* en nuestro país (BURGUEÑO 2012). Claramente resta mucho por conocer acerca de la posible interacción competitiva entre estos grupos de Flavivirus, lo que genera interés en investigar en mayor profundidad los ISFV, sumado al hecho que estudios comparativos entre ellos y los MBFV/TBFV pueden proveernos de información crucial para entender los factores que permiten que ciertas especies infecten vertebrados, mientras que otras no.

Recientemente se ha publicado una extensa revisión de diferentes características epidemiológicas y genéticas de los diferentes ISFV conocidos, en donde también se realizan análisis filogenéticos basados en todas las especies cuyo genoma completo está disponible (BLITVICH and FIRTH 2015). En este estudio se sugiere la subdivisión de los ISFV en dos clados principales de acuerdo a las especies de mosquitos de donde han sido aisladas: Los ISFV asociados a *Aedes spp.* (ISFV–*Aedes*); y los asociados a *Culex spp.* (ISFV–*Culex*) (Tabla 1 y Figura 3B, en negro).

Dentro del grupo de especies ISFV-*Aedes* encontramos a AEFV, CFAV, KRV, así como a HANKV. Esta última especie fue simultáneamente reportada por Huhtamo y colaboradores (2012), así como por otros dos grupos y denominada *Ochlerotatus flavivirus* (CALZOLARI *et al.* 2012) y *Spanish Ochlerotatus flavivirus* (VÁZQUEZ *et al.* 2012). Estudios comparativos realizados por Blitvich y Firth indican que estos 3 virus comparten una identidad mayor al 90%, por lo que son consideradas la misma especie. El mismo reporte sugiere HANKV es una especie altamente divergente del resto de los ISFV. Sin embargo, nuestros resultados indican que estaría mayormente asociado al grupo ISFV-*Aedes*, en concordancia con otros análisis filogenéticos recientes también llevados a cabo con secuencias de ORF completos (MOUREAU *et al.* 2015). Asimismo, nuestro análisis integra dentro de este grupo a PaRV, una especie recientemente aislada de *Aedes vigilax* en Australia (MCLEAN *et al.* 2015), que a su vez comparte una estrecha relación filogenética con HANKV, lo que reafirma nuestra observación anterior.

Por su parte, dentro del clado ISFV-*Culex* se agrupan las especies CTFV, CxFV, MOSQFV, QBV, así como YDFV, recientemente aislada de mosquitos del género *Culex* en Japón (KUWATA *et al.* 2015). Asimismo, NAKV y PCV, aislados de mosquitos de los géneros *Mansonia* y *Coquillettidia*, se agrupan dentro de este clado tal como fue sugerido por Blitvich y Firth, aunque de acuerdo a su rango de hospedero, podría categorizarse como un subgrupo diferente. Por último, se incluyó MECDV, un novedoso ISFV aislado recientemente en Panamá de mosquitos del género *Culex* (CARRERA *et al.* 2015), que parece estar enraizando a todas las demás especies de ISFV analizadas. Este resultado se corresponde con la percepción de diferentes estudios que sugieren que nuestro conocimiento de las especies que integran el grupo de los ISFV es muy limitado y que su diversidad está ampliamente subestimada. De hecho, la distancia genética existente entre los ISFV y los demás miembros del género *Flavivirus* es comparable a la variabilidad genética existente entre los diferentes géneros de la familia *Flaviviridae* (ver Figura 1), por lo que se ha sugerido que los ISFV deberían categorizarse como un nuevo género (MOUREAU *et al.* 2015). No es de extrañar entonces que en vista del interés que ha suscitado el estudio de este grupo de *Flavivirus*, reflejado en el número creciente de especies documentadas en los últimos 10 años y su amplia distribución geográfica, nuevas especies sean reportadas en el corto plazo. Ello será muy importante para ayudar a interpretar la cada vez más compleja historia evolutiva de este género.

ISFV-2

Este grupo de *Flavivirus* integra especies que han sido aisladas a partir de 12 especies de 5 géneros de mosquitos en diferentes regiones geográficas (BLITVICH and FIRTH 2015). Asimismo, no se han podido aislar de vertebrados ni en líneas celulares derivadas de éstos, por lo que se estima que presentan un fenotipo de replicación no competente en vertebrados y su circulación estaría estrictamente restringida a insectos (JUNGLEN *et al.* 2009; HUHTAMO *et al.* 2009).

La secuencia correspondiente al ORF completo sólo está disponible para las 7 especies incluidas en este estudio (Tabla 1, Figura 3B, en marrón). El análisis filogenético desarrollado se corresponde con reportes previos e indica que los ISFV-2 se agrupan con los MBFV en dos clados, integrados por BARKV, NHUV y NOUV, y por CHAOV, DONV, ILOV y LAMV, respectivamente (MOUREAU *et al.*

2015). Esta topología sugiere que la emergencia de los ISFV-2 habría ocurrido en dos eventos independientes. Por consiguiente, si efectivamente los ISFV-2 infectaron ancestralmente a vertebrados y perdieron esta capacidad, tal como es sugerido por algunos estudios (KENNEY *et al.* 2014; BLITVICH and FIRTH 2015), estos eventos habrían ocurrido en al menos en dos oportunidades. De todas formas, los ISFV-2 han sido muy poco estudiados y se estima que su diversidad sea mucho más amplia que la conocida hasta el momento, como lo sugiere la amplitud geográfica de aislamientos.

NKV

Este grupo integra especies que únicamente infectan vertebrados, para las que no se conoce un vector de transmisión, siendo la transmisión vertical entre hospederos el mecanismo responsable de su mantenimiento en la naturaleza (BELL and THOMAS 1964; FAIRBROTHER and YUILL 1987; ADAMS *et al.* 2013). Los análisis filogenéticos se corresponden con estudios previos que sugieren la subdivisión de los NKV en dos grupos (Tabla 1 y Figura 3B, en gris). Se distinguen las especies que infectan murciélagos (BCV, MMLV, PPBV y RBV) de las que circulan en roedores (MODV y JUTV) (BURNS and FARINACCI 1956; JOHNSON 1967). Ambos clados tienen a APOIV (especie aislada en diferentes roedores) conformando un linaje basal (BILLOIR *et al.* 2000; MOUREAU *et al.* 2015).

Por otra parte, se aprecia un clado que integra las especies ENTV, SOKV y YOKV (Figura 3B, en verde oscuro), que circulan únicamente en murciélagos y se clasifican dentro del grupo antigénico “Entebbe Bat” (CALISHER and GOULD 2003). Estas especies se agrupan filogenéticamente con los MBFV que son transmitidos por *Aedes spp.* El hecho de que ENTV y SOKV puedan replicar *in vitro* en células C6/36 (VARELAS-WESLEY and CALISHER 1982), a diferencia de las especies que integran el clado de NKV (Figura 3, en gris), así como su asociación filogenética con los MBFV, apoya la hipótesis de que ENTV, SOKV y YOKV utilizan o utilizaron en el pasado vectores para su transmisión (probablemente mosquitos), y eventualmente perdieron esta capacidad (COOK and HOLMES 2006).

TBFV

Los Flavivirus transmitidos por garrapatas comprenden un grupo creciente de especies de gran importancia epidemiológica que es responsable de al menos 10.000 casos de encefalitis por año alrededor del mundo, aunque se estima una incidencia mucho mayor (“WHO | Tick-borne encephalitis” 2013). Diversos estudios filogenéticos han demostrado la subdivisión de los TBFV en dos grupos evolutivamente distantes que integran diferencialmente las especies que infectan aves de las que circulan en mamíferos (GAO *et al.* 1993, 1997, MARIN *et al.* 1995a; b; ZANOTTO *et al.* 1996; MCGUIRE *et al.* 1998; CHARREL *et al.* 2001, 2004; GRARD *et al.* 2007; MOUREAU *et al.* 2015).

Esta topología se puede apreciar claramente en la Figura 3, donde se observan las especies que infectan aves (KAMV, MEAV, SREV y TYUV, en rosado) formando un linaje basal al otro grupo filogenético que incluye los virus que son transmitidos de garrapatas a mamíferos (en rojo). Este último grupo está integrado por varias especies de gran importancia en la salud humana, causantes de encefalitis (DTV, KSIV, LGTV, LIV, POWV y TBEV), fiebres hemorrágicas (AHFV, KFDV, NEGV y OHFV), así como especies no patogénicas (GGEV, GGYV, KADV, RFV, SGEV y SSEV). La

topología general de este grupo de Flavivirus se corresponde con la observada en el análisis filogenético más completo hasta la fecha (MOUREAU *et al.* 2015), con la inclusión de tres especies (KAMV, NEGV y SGEV).

FLAVIVIRUS AISLADOS DE FLEBÓTOMOS

Recientemente se aisló en Ecuador una nueva especie de Flavivirus denominada Ecuador Paraiso Escondido Virus (EPEV) a partir de flebótomos *Psathyromyia abonnenci* (ALKAN *et al.* 2015). Los análisis filogenéticos (Figura 3B) sugieren que EPEV (en amarillo) se encuentra enraizando los clados integrados por las especies de los complejos antigénicos Entebbe Bat (NKV-2) y Fiebre Amarilla (en verde oscuro y violeta, respectivamente). En este último grupo se encuentra SABV, el único Flavivirus transmitido por flebótomos que se ha reportado hasta la fecha (FONTENILLE *et al.* 1994).

La capacidad de EPEV de replicar en células de mosquito (C6/36) pero no en líneas celulares de vertebrados, sugiere que no infectaría vertebrados. Este descubrimiento abre la posibilidad de que existan más especies que circulen estrictamente en flebótomos. Hasta el momento, además de SABV y EPEV, sólo se ha reportado la detección de secuencias parciales de Flavivirus en flebótomos de Argelia y Portugal, pero serían especies que integrarían el clado ISFV-*Culex* (MOUREAU *et al.* 2010; ALKAN *et al.* 2015).

MBFV

Los Flavivirus que ciclan entre mosquitos y vertebrados son las especies que causan mayor morbilidad y mortalidad dentro de este género, e incluyen virus emergentes y re-emergentes en las Américas como DENV, SLEV, WNV, YFV y ZIKV. Los MBFV se dividen en dos grupos epidemiológicos diferentes: Las especies transmitidas por *Culex spp.* (MBFV-*Culex*), que suelen tener reservorios aviares y son potencialmente neurotrópicos en humanos; y los virus transmitidos por *Aedes spp.* (MBFV-*Aedes*), con primates como hospederos habituales y asociados en casos severos en humanos con fiebres hemorrágicas (KUNO *et al.* 1998; BILLOIR *et al.* 2000; GAUNT *et al.* 2001; COOK and HOLMES 2006; GRARD *et al.* 2010) (Figura 3B). Algunas excepciones encontradas dentro de los grupos MBFV-*Aedes* y MBFV-*Culex* son explicadas por los comportamientos alimenticios de ambas especies de mosquitos. Los mosquitos del género *Culex* suelen alimentarse tanto de aves como de mamíferos, lo que queda reflejado en varias excepciones que encontramos en este grupo. Sin embargo, existe una asociación inequívoca entre los MBFV-*Aedes* y primates/mamíferos, a consecuencia del comportamiento mamalofílico de estas especies de mosquitos (ROBERTSON *et al.* 1993; CHRISTENSEN *et al.* 1996; GAUNT *et al.* 2001).

Asimismo, se ha sugerido que los MBFV-*Culex* habrían evolucionado de especies ancestrales pertenecientes al grupo MBFV-*Aedes* (GRARD *et al.* 2010), lo que se puede observar a partir de la topología del árbol filogenético realizado en el presente estudio (Figura 3B), donde se aprecia la asociación de los diferentes MBFV-*Culex* en un clado monofilético. Integran este grupo especies que se han clasificadas dentro de los complejos antigénicos Aroa, Encefalitis Japonesa, Kokobera y Ntaya (Tabla 2 y Figura 3B, en bordeaux, azul, anaranjado y mostaza, respectivamente).

MBFV-AEDES

Los MBFV-*Aedes* se asocian en dos grupos parafiléticos: uno incluyendo las especies del complejo antigénico Fiebre Amarilla; y el otro conteniendo los serogrupos Dengue y Spondweni (Figura 3B, en violeta, verde claro y celeste, respectivamente). Estos grupos contienen especies que son mantenidas en la naturaleza en ciclos selváticos enzoóticos con primates como principales hospederos, con alguna especie que excepcionalmente puede infectar aves como hospedero accidental. Asimismo, encontramos dentro de los MBFV-*Aedes* las únicas especies que no sólo infectan humanos de manera casual, sino que pueden integrarlos como hospederos amplificadores en ciclos urbanos, como es el caso de DENV, YFV y ZIKV.

Existen excepciones en los MBFV-*Aedes* que no son transmitidas por *Aedes spp.*, en particular dentro del serocomplejo Fiebre Amarilla. Este grupo se compone de dos clados hermanos: uno compuesto por patógenos humanos (SEPV, WSLV y YFV); mientras que el otro integra 7 virus con características particulares (EHV, BOUV, BANV, UGSV, JUGV, POTV and SABV). Estas especies carecen de dos cisteínas en su glicoproteína E, lo que suprime uno de los 6 puentes disulfuro característicos y sumamente conservados entre los Flavivirus. Esta modificación, sólo observada en algunos ISFV (HOSHINO *et al.* 2007), altera la estructura del dominio II de la E donde se encuentra el péptido de fusión, modificando el tropismo y las propiedades antigénicas de esta glicoproteína. Esto se traduce en una capacidad de infectar una gran variedad de especies de vertebrados (primates, roedores, marsupiales, murciélagos y aves), así como mosquitos del género *Aedes*, pero también *Culex spp.* (BANV), e incluso flebótomos (SABV) (ver Tabla 2). En consecuencia, se ha propuesto que estas 7 especies integren un grupo taxonómico diferente del grupo Fiebre Amarilla, que se designó "Edge Hill" (GRARD *et al.* 2010).

El otro linaje de MBFV-*Aedes* incluye los cuatro serotipos de DENV en una posición basal al clado integrado por KEDV y las especies del serocomplejo Spondweni (SPOV y ZIKV) (Figura 3B, en verde claro y celeste, respectivamente). La asociación entre estas especies ha mostrado discrepancias entre diferentes estudios, principalmente debido a que KEDV presenta una posición filogenética ambigua. Estudios basados en secuencias de la NS5 ubican a KEDV en el serogrupo DENV (KUNO *et al.* 1998; GAUNT *et al.* 2001) o en una posición basal a SPOV (GOULD *et al.* 2001; KUNO and CHANG 2005a), mientras que el análisis de la poliproteína completa indica una asociación más estrecha con las especies del complejo antigénico Spondweni (GRARD *et al.* 2010; MOUREAU *et al.* 2015; BLITVICH and FIRTH 2015). Estas incongruencias sugieren que KEDV no pertenecería realmente al serogrupo Dengue, sino que integraría un grupo diferente junto con otras especies que hasta el momento no han sido descubiertas (KUNO and CHANG 2007).

Otra discrepancia encontrada entre diferentes estudios filogenéticos es la asociación entre los complejos antigénicos Dengue y Spondweni. Nuestros resultados se ajustan con varios reportes que indican la asociación de los MBFV-*Aedes* en 2 grupos parafiléticos, lo que discrepa con otros estudios que sugieren su distribución en 3 clados parafiléticos. En particular, la filogenia más detallada hasta el momento agrupa a los serogrupos Dengue y Spondweni en dos clados diferentes (MOUREAU *et al.* 2015). Sin embargo, un reporte posterior de los mismos autores

publicado meses después, utilizando aparentemente la misma metodología con la inclusión de una única especie (EPEV), sugiere la agrupación de ambos serocomplejos en un mismo clado, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos en el presente estudio (ALKAN *et al.* 2015). Este grupo actúa de clado basal para los MBFV-*Culex*, que como se comentó anteriormente, se agrupan en un único clado monofilético. Más adelante se discutirán otros aspectos epidemiológicos de DENV y ZIKV en los Capítulos 2 y 3, respectivamente.

MBFV-CULEX

Los MBFV-*Culex* se asocian en general a ciclos que incluyen aves y raramente integran primates. De hecho, los humanos se consideran hospederos finales cuando intervienen en el ciclo, debido a la baja viremia de corta duración exhibida (KUNO and CHANG 2005a). De todas formas, algunas especies incluyen mamíferos como hospederos amplificadores, como es el caso de JEV que integra cerdos en su ciclo (LORD *et al.* 2015). El serogrupo que recibe el nombre de esta especie integra además otros virus circulantes en todos los continentes, excepto en la Antártida. JEV, MVEV, SLEV y WNV son sus especies más relevantes para la salud humana, ya que se asocian con brotes epidémicos de encefalitis (SOLOMON 2004). Las relaciones filogenéticas inferidas en el presente estudio se corresponden con reportes previos, siendo dos especies únicamente circulantes en las Américas (SLEV y CPCV) las especies basales (Figura 3B, en azul). Asimismo, dos especies aisladas en África (YAOV y KOUV) representan linajes ancestrales de WNV y KUNV (subtipo de WNV endémico en Oceanía), lo que sugiere el origen africano de WNV (MAY *et al.* 2011; MOUREAU *et al.* 2015). El clado hermano a este último integra dos virus circulantes en Australia (ALFV y MVEV) junto con JEV (principal agente causal de encefalitis en Asia) y USUV. Esta última especie ha causado una alarma regional en Europa donde ingresó en repetidas oportunidades desde África y se asoció con una elevada letalidad en aves y numerosos reportes de infecciones humanas (NIKOLAY *et al.* 2011; ENGEL *et al.* 2016). Este hecho refleja el potencial de dispersión de diferentes especies MBFV-*Culex*, mediante la utilización de aves migratorias como vehículo para diseminarse entre continentes, tal como se ha observado con WNV en repetidas ocasiones, especialmente en su emergencia en América del Norte en 1999 (MALKINSON and BANET 2002; MALKINSON *et al.* 2002; ARTSOB *et al.* 2009).

El clado hermano a este serogrupo está integrado por las especies del serocomplejo Ntaya, que se agrupan en dos clados diferentes (Figura 3B, en mostaza). Por un lado se encuentran emparentadas dos especies circulantes en América Latina (ILHV y ROCV) que causan encefalitis en humanos (FIGUEIREDO 2000). El otro clado integra otras dos especies causantes de encefalitis (BAGV y NTAV) (DILCHER *et al.* 2013; LLORENTE *et al.* 2015), junto con ITV (aislada de pavos en Israel) (BRAVERMAN *et al.* 2003), y otras 5 especies que infectan aves de corral en Asia (BYDV, DEDSV, DFV, STWV y TMUV) (LIU *et al.* 2012, 2013; MA *et al.* 2013a; ZHUOMING QIN 2013; TANG *et al.* 2015). Existe evidencia serológica que estas 5 especies pueden infectar a los humanos pero no hay reportes de enfermedades asociadas, y su estrecha relación filogenética, así como su similares características eco-epidemiológicas, sugieren que se trataría de la misma especie (TANG *et al.* 2015). Las relaciones filogenéticas deducidas para este serogrupo se corresponden con reportes previos, aunque en el presente análisis se incluyeron dos nuevas especies (BYDV y DFV).

Por otra parte, las especies del serocomplejo Aroa (AROAV, BSQV, IGUV y NJLV), circulantes en Sudamérica, son excepcionales dentro de los MBFV-*Culex* ya que infectan roedores (CALISHER *et al.* 1983; COIMBRA *et al.* 1993; MOUREAU *et al.* 2015), e incluso BSQV ha sido aislada de monos aulladores (*Alouatta belzebul*) en Brasil (FIGUEIREDO 2000). Esta es la única especie de este grupo que ha sido reportada en humanos en un único caso febril. Las relaciones filogenéticas deducidas en el presente estudio se ajustan a los diferentes reportes previos que sugieren su división en dos clados hermanos en los que se relacionan estrechamente AROAV con BSQV, y NJLV con IGUV, respectivamente (Figura 3B, en bordeaux) (MOUREAU *et al.* 2015).

Por último, el complejo antigénico Kokobera incluye especies que han sido detectadas en *Culex spp.*, caballos o canguros en Oceanía, con esporádicos reportes de artralgias en humanos. Las relaciones filogenéticas inferidas son concordantes con estudios previos (MOUREAU *et al.* 2015), con NMV (NISBET *et al.* 2005) como especie basal de los virus KOKV, STRV (DOHERTY *et al.* 1963) y dos nuevas especies aquí incluidas (BAIV y TORV) (WARRILOW *et al.* 2014).

Tomando en cuenta todo este análisis, se puede resumir que los Flavivirus han evolucionado debido a presiones selectivas impuestas por sus vectores/hospederos para diferenciarse en 4 grupos filogenéticamente distantes, que integran especies: estrictamente circulantes en insectos; sin vector conocido (circulantes en murciélagos o roedores); transmitidas por garrapatas (a aves o a mamíferos); y transmitidas por mosquitos (asociadas principalmente a géneros *Culex* o *Aedes*).

CONCLUSIONES

Este estudio presenta información epidemiológica actualizada de los diferentes miembros del género *Flavivirus*, en base a una intensa exploración bibliográfica (se resume en las Tablas 1 y 2). Asimismo, se presenta el análisis filogenético del género *Flavivirus* más diverso hasta la fecha (Figura 3), con la inclusión de 10 especies más que el reporte filogenético previo más detallado (MOUREAU *et al.* 2015). El conjunto de datos final incluyó las regiones codificantes completas de 98 especies de *Flavivirus* (reconocidas por el ICTV y tentativas) y nos permitió confirmar la asociación diferencial de los distintos *Flavivirus* en grupos evolutivamente distantes, de acuerdo al rango de hospedero/vector y otras características epidemiológicas. Además, se exploraron y resolvieron algunas discrepancias filogenéticas existentes entre reportes previos. Por consiguiente, este estudio nos permitió profundizar en el entendimiento de la diversidad, interrelación y dispersión geográfica de los *Flavivirus*.

Objetivo Específico II: Optimización de los métodos de diagnóstico molecular de Flavivirus.

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO TEÓRICO

Debido a la amplia gama de enfermedades causada por los Flavivirus, a los síntomas clínicos muchas veces indiferenciables entre sí y a la naturaleza emergente de los mismos, resulta de suma importancia contar con técnicas moleculares que nos permitan su diagnóstico. Sin embargo, las metodologías de diagnóstico actuales son un obstáculo para la detección e identificación de distintos Flavivirus, entre otras razones debido a que el aislamiento de estos virus lleva un tiempo considerable y se requieren instalaciones de nivel 3 de bioseguridad. Asimismo, este abordaje resulta inconveniente cuando un diagnóstico temprano es necesario debido al tiempo que insume. Por otra parte, los ensayos de serología suelen dar falsos positivos debido a la existencia de reactividad cruzada entre diferentes Flavivirus por la presencia de epítomos comunes en sus glicoproteínas de superficie. Por estas razones, el desarrollo de métodos moleculares sensibles y específicos para estos agentes es esencial (AYERS *et al.* 2006).

Mucho esfuerzo se ha puesto para mejorar el entendimiento de las relaciones filogenéticas entre los Flavivirus, con el fin de interpretar las relaciones taxonómicas que nos permitan desarrollar herramientas moleculares posibilitando la detección, diagnóstico y vigilancia viral. Es por ello que partiendo del análisis desarrollado en el Objetivo Específico I, nos planteamos poner a punto metodologías de *Real-time* PCR adecuadas para la detección y discriminación de diferentes Flavivirus que puedan circular en la región y que hayan sido reportados como agentes causales de enfermedades en humanos. Este objetivo se desarrolló parcialmente en el marco de la tesis de Licenciatura en Bioquímica realizada por la Lic. Patricia Nuñez (NUÑEZ 2015). En la misma, se evaluaron diferentes técnicas moleculares de RT-PCR descritas en la literatura (tanto a tiempo final como a tiempo real) para el diagnóstico diferencial de Flavivirus (SCARAMOZZINO *et al.* 2001; SÁNCHEZ-SECO *et al.* 2005; AYERS *et al.* 2006; MOUREAU *et al.* 2007; VÁZQUEZ *et al.* 2012). Se logró la puesta a punto de diferentes metodologías y se evaluó la señal filogenética que se obtiene a partir de ellas, considerando métodos desarrollados para la identificación de los miembros más importantes para la salud humana (DENV, JEV, SLEV, TBEV, WNV y YFV). La situación epidemiológica regional cambió en 2015 debido a la emergencia de ZIKV en las Américas, razón por la cual nos propusimos ajustar esta metodología para la detección de este y otros agentes virales potencialmente emergentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

OPTIMIZACIÓN DE LA *REAL-TIME* PCR PARA LA DETECCIÓN DE FLAVIVIRUS CAUSANTES

DE ENFERMEDADES EN HUMANOS

Dada a la sorpresiva emergencia de ZIKV en las Américas, se consideró oportuno ajustar una metodología de *Real-Time* PCR previamente puesta a punto en nuestro laboratorio (NUÑEZ 2015). La misma se enfocaba en los Flavivirus de mayor incidencia en humanos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, JEV, SLEV, TBEV, WNV y YFV). Sin embargo, existe una amplia gama de Flavivirus no considerados que han sido asociados con enfermedades en humanos. Es por ello que en el presente estudio nos planteamos optimizar esta metodología para la detección de diversos Flavivirus causantes de enfermedades en humanos que potencialmente puedan emerger. Utilizando la información epidemiológica recabada en el Objetivo Específico I, se consideraron además de las especies más importantes en la salud humana (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, JEV, SLEV, TBEV, WNV y YFV), las siguiente especies: ALFV, AHFV, BAGV, BANV, BOUV, CPCV, DTV, EHV, ILHV, LIV, KEDV, KFDV, KOKV, KOUV, KSIV, LGTV, MVEV, NEGV, NTAV, OHFV, POWV, RBV, ROCV, SEPV, SPOV, STRV, TMUV, USUV y WSLV (ver Tablas 1 y 2).

Se utilizó el dataset de genomas completos con el que se desarrollaron los análisis filogenéticos detallados en el Objetivo Específico I. Se recortó el alineamiento para visualizar el blanco de amplificación de esta metodología, cuyos primers reconocen las regiones entre los nucleótidos 8927-8949 y 9167-9189 (relativos al genoma completo de la cepa de DENV-1 HNRG25001 - Número de acceso: KC692512). Se evaluó *in silico* la efectividad de los primers reportados para identificar a los distintos Flavivirus mencionados, modificándose la secuencia de los mismos mediante el agregado de nucleótidos degenerados para ajustarlos a las diferentes especies.

Asimismo, se realizó un análisis filogenético de máxima verosimilitud considerando la secuencias aminoacídicas completas de las especies mencionadas. El árbol filogenético resultante (modelo WAG+F+Γ+I) fue editado mediante el programa *FigTree* v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a la emergencia de ZIKV en las Américas en 2015, resolvimos ajustar esta metodología para que pudiera utilizarse tanto para la detección de ZIKV, como también de otros Flavivirus causantes de enfermedades en humanos y potencialmente emergentes.

Se realizó el alineamiento de los primers con especies de Flavivirus que se han reportado en infecciones en humanos (ver Tablas 1 y 2). Las secuencias de los primers directo (MAMDMod) y reverso (cFD2Mod) se indican en la Tabla 3 y son el resultado de la modificación de los primers originalmente descritos (MAMD y cFD2) (SCARAMOZZINO *et al.* 2001), con nucleótidos degenerados para ajustarlos a las siguientes especies:

Complejo antigénico Dengue: DENV-1 a DENV-4 y KEDV.

Complejo antigénico Spondweni: SPOV y ZIKV.

Complejo antigénico Kokobera: KOKV y STRV.

Complejo antigénico Ntaya: BAGV, ILHV, NTAV, ROCV y TMUV.

Complejo antigénico Encefalitis Japonesa: ALFV, CPCV, JEV, KOUV, MVEV, SLEV, USUV y WNV.

Complejo antigénico Fiebre amarilla: BANV, BOUV, EHV, SEPV, WSLV y YFV.

Flavivirus sin vector conocido: RBV

Flavivirus transmitidos por garrapatas: AHFV, DTV, KFDV, KSIV, LGTV, LIV, NEGV, OHFV, POWV y TBEV.

Tabla 3: Secuencias de primers utilizados en este estudio.

Primer	Secuencia
MAMD	5'-AACATGATGGGGAARAGRGARAA-3'
MAMDMod	5'-AACATGATGGG <u>NAARMGW</u> GARAA-3'
cFD2	5'-GTGTCCAGCCGGCGGTGCATCAGC-3'
cFD2Mod	5'-GTGTCCCA <u>CCD</u> GCD <u>GTRTC</u> RTC-3'

Se realizó además un árbol filogenético de máxima verosimilitud (modelo WAG + F + Γ + I) y se editó conservando su topología. Este árbol fue adjuntado al alineamiento para ayudar a la interpretación de las modificaciones realizadas (Figura 4).

CONCLUSIONES

Se logró adaptar una metodología de *Real-Time* PCR para la detección y discriminación de diferentes Flavivirus que hayan sido reportados como agentes causales de enfermedades en humanos. Cabe destacar que esta metodología, así como otras previamente puestas a punto en nuestro laboratorio fueron exitosamente transferidas al Laboratorio de Técnicas Especializadas de la Asociación Española (LTE-ASESP) en el marco del Proyecto Alianzas para la Innovación titulado “Diagnóstico molecular de virosis emergentes de gran impacto en salud pública”. Este proyecto vinculó a nuestro laboratorio con el Laboratorio de Virología Molecular del Centro Universitario Región Litoral Norte (Salto), y el LTE-ASESP, y fue co-financiado por la ASESP y la ANII. Utilizando estas estrategias moleculares, el LTE-ASESP colaboró con el Ministerio de Salud Pública (MSP) en el diagnóstico de casos sospechosos de Dengue y Zika registrados en Uruguay en el presente año.

CAPÍTULO 2: VIRUS DENGUE

RESUMEN

El virus dengue (DENV) es el agente causal de la principal arbovirosis a nivel mundial desde el punto de vista de la morbilidad y mortalidad. En las Américas circulan los cuatro serotipos (DENV-1 a DENV- 4), lo que aumenta el riesgo de aparición de las formas más graves de la enfermedad. El dengue es una de las principales causas de morbilidad en niños y adultos latinoamericanos y su distribución e incidencia han aumentado notoriamente en los últimos 30 años. Luego de 100 años de ausencia de reportes en el Uruguay, en 2016 volvió a registrarse un brote epidémico de esta enfermedad con 26 casos confirmados y numerosos sospechosos. Diversos estudios relacionan determinados grados de enfermedad con serotipos, genotipos o linajes particulares. Es por ello que en la presente tesis se investigaron las diferentes características genéticas y antigénicas de las distintas variantes de DENV que emergieron en nuestro país.

INTRODUCCIÓN

El virus dengue (DENV) pertenece al género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. DENV es un arbovirus (virus transmitidos por vectores artrópodos hematófagos) al igual que otros *Flavivirus* como los causantes de la fiebre amarilla, y las encefalitis japonesa, de Saint Louis y del Nilo Occidental (LINDENBACH and RICE 2003). El genoma de DENV está compuesto por una cadena única, no segmentada, de ARN de polaridad positiva, con aproximadamente 10,7 kilobases (kb) de longitud (CHAMBERS *et al.* 1990). Comprende 4 serotipos relacionados antigénicamente, denominados dengue 1 a dengue 4 (DENV-1 a DENV-4), que son transmitidos al humano principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*, aunque otros miembros del género *Aedes* (entre ellos el *Aedes albopictus* y el *Aedes polynesiensis*) son transmisores en otras regiones geográficas, especialmente en el Sudeste asiático (SENANAYAKE 2006).

La infección por cualquiera de estos serotipos puede originar desde un cuadro subclínico, hasta síndromes severos con una elevada letalidad. Las manifestaciones usuales han sido históricamente denominadas como fiebre del dengue (DF) o dengue clásico, y fiebre hemorrágica del dengue (DHF) o dengue hemorrágico. Estos cuadros de mayor gravedad pueden evolucionar en ocasiones en el síndrome de choque por dengue (DSS), siendo la principal causa de hospitalización y muerte entre los niños en el Sudeste asiático (HENCHAL and PUTNAK 1990; CLYDE *et al.* 2006). Sin embargo, la clasificación actual distingue estos 3 estados de la enfermedad en dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave, respectivamente (WHO 2009) (Figura 5). A efectos prácticos, en adelante nos referiremos a las diferentes manifestaciones como dengue o dengue leve y dengue severo.

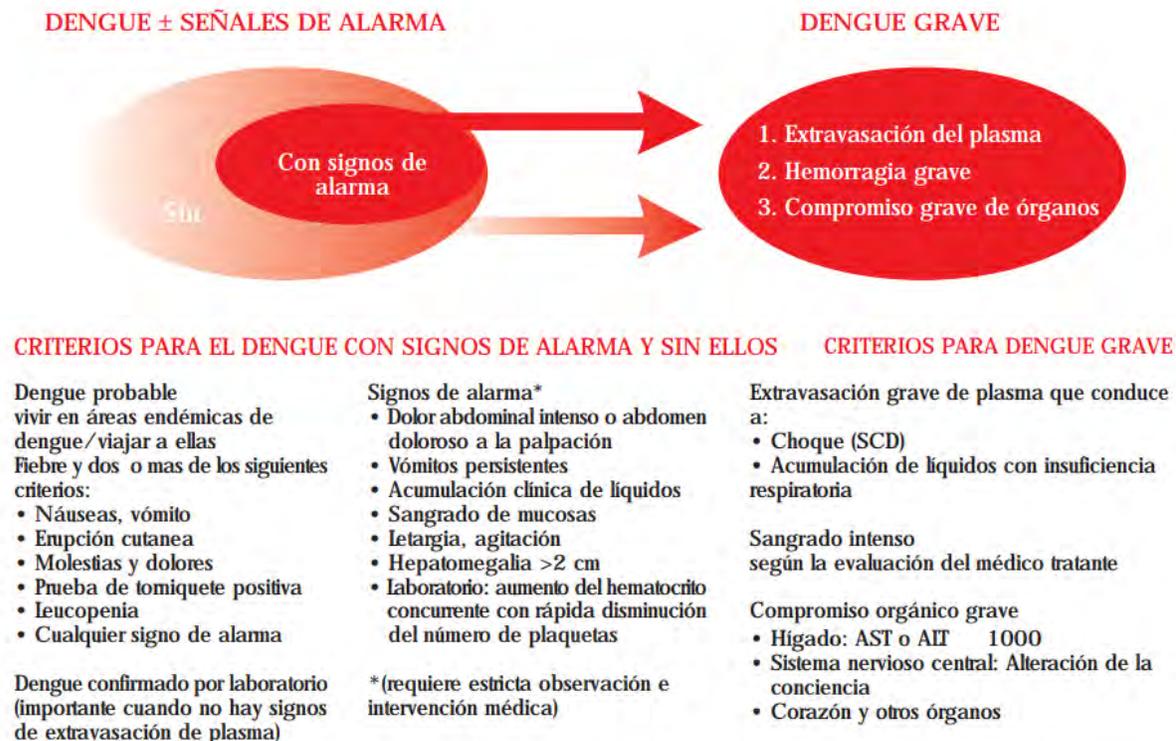


Figura 5. Clasificación de casos de dengue sugerida y niveles de gravedad. (WHO 2009).

El DENV es uno de los virus emergentes más importantes y se plantea como amenaza para más de la mitad de la población mundial (BENNETT *et al.* 2003b; DONG *et al.* 2007). Algunas estimaciones indican una incidencia mundial por año de 50–100 millones de casos de dengue, con 250.000–500.000 casos de dengue severo (FINK *et al.* 2007). Sin embargo, estimaciones recientes de la OMS sugieren que el número de infectados anuales estaría en el rango de 70–500 millones de personas, incluyendo más de 2 millones de casos severos que originan 20.000 muertes.

El dengue es endémico en más de 100 países de África, América, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental, siendo estas últimas dos regiones las más gravemente afectadas. La OPS estima que el número de muertes sugiere una evolución clínica más severa de la usualmente observada (OPS 2008). Los casos de dengue se quintuplicaron en las Américas entre 2003 y 2013, registrándose en este último año más de 2,3 millones de casos, 37.705 de ellos graves y 1.289 muertes (OPS 2014).

Diferentes factores sociales entre los que se incluyen el crecimiento de la población, la urbanización no planificada y la falta de acceso a agua potable, favorecen la transmisión del DENV en las Américas, donde co-circulan los 4 serotipos.

HISTORIA

La primera epidemia descrita de una enfermedad clínicamente compatible con dengue, fue documentada por el Dr. Benjamin Rush en Filadelfia en 1780 (CAREY 1971). El término "dengue" proviene de la frase en swahili "*ka dengha pepo*", que describe un trastorno convulsivo o calambre fuerte causado por malos espíritus. La enfermedad habría cruzado desde el este de África al Caribe en 1827, donde en Cuba se identificó popularmente como "Dengue" (SIMPSON *et al.* 1989). Desde entonces y hasta principios del siglo XX, se registraron grandes epidemias de enfermedades similares al dengue en América, Sur de Europa, Norte de África, Mediterráneo Oriental, Asia y Australia, así como también en Islas de los Océanos Índico y Pacífico y del mar Caribe (WHO 2007).

Como resultado de la Segunda Guerra Mundial, la rápida urbanización en el Sudeste asiático derivó en una pandemia de dengue, donde se registró la primera gran epidemia de dengue severo. En los últimos 25 años del siglo XX se produjo una dramática expansión a nivel global de epidemias de dengue y dengue severo, facilitada por la urbanización descontrolada en países tropicales subdesarrollados, la modernización del transporte, la globalización, la proliferación de criaderos de mosquitos y la falta de medidas efectivas para su control (GUBLER 2006; GURUGAMA *et al.* 2010).

El más dramático aumento de dengue como un gran problema de salud pública ha ocurrido en América. En 1946, la OPS inició un programa de control del mosquito *Aedes aegypti* con el objetivo de eliminar los focos de fiebre amarilla que aún quedaban en diversos países de la región (MONATH 1994; GUBLER *et al.* 2002). A pesar del éxito logrado en su momento, con consecuencias positivas para el control de la fiebre amarilla y del dengue, la erradicación del vector fue difícil de mantener y a finales de la década de 1960 y principios de la de 1970 se constató la re-invasión del mosquito vector. Una epidemia de gran envergadura ocurrió en Cuba en 1981 y otra de dengue severo en Venezuela en 1989-1990. Desde entonces, epidemias han ocurrido en la gran mayoría de los países de Centro y Sudamérica, y brotes, casos confirmados, o ambos han sido reportados de casi todos los países tropicales y subtropicales de las Américas (OPS 2014).

CICLO REPLICATIVO DE DENV

UNIÓN Y ENTRADA

Estudios *in vitro* han demostrado que el DENV es capaz de infectar un gran número de células humanas, entre ellas células dendríticas, monocitos, macrófagos, células B y T, células endoteliales, hepatocitos y células neuronales (ANDERSON 2003). Sin embargo, *in vivo* solo se ha encontrado a monocitos, macrófagos y células dendríticas como blancos primarios de las infecciones por DENV (JESSIE *et al.* 2004).

El primer paso de la infección requiere la interacción entre la partícula viral y receptores presentes en la superficie de la célula blanco, que llevan a la entrada del virión a través de una endocitosis

mediada por receptores (Figura 6). La proteína viral responsable de esta unión es la glicoproteína E, mediante su dominio III localizado hacia su extremo carboxiterminal (CRILL and ROEHRIG 2001).

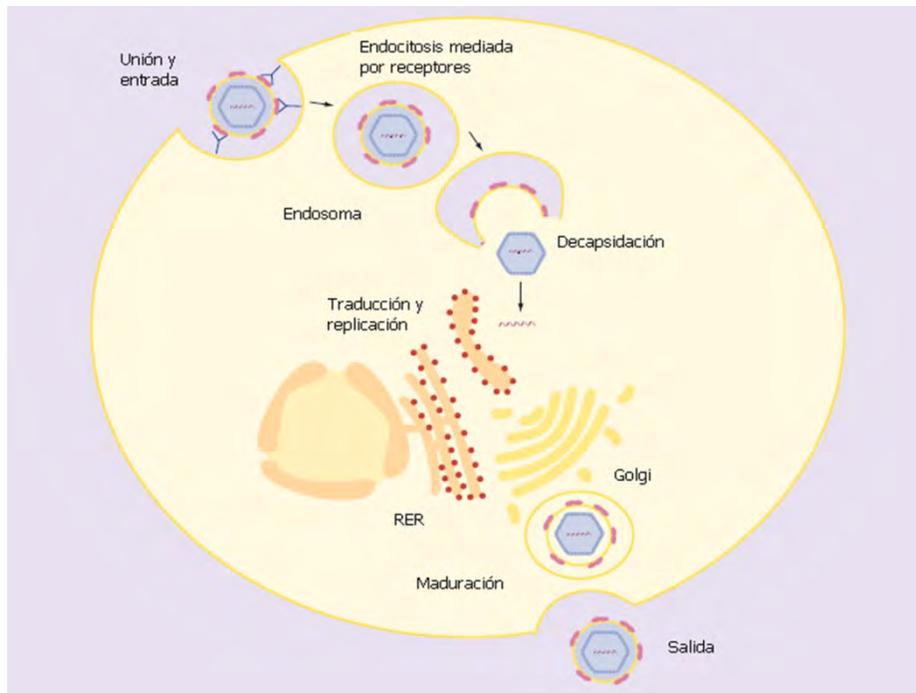


Figura 6. Esquema del ciclo replicativo de DENV. Modificado de (BARTENSCHLAGER and MILLER 2008).

En cuanto a los receptores celulares, mucho esfuerzo se ha puesto en tratar de identificarlos. Diversos estudios indican que el glicosaminoglicano heparán sulfato (HS) está involucrado en la unión del DENV con células de mamíferos (CHEN *et al.* 1997; HILGARD and STOCKERT 2000; GERMI *et al.* 2002; HUNG *et al.* 2004). Dado que el HS está presente en una gran diversidad de células, su interacción con el virus permite la adsorción viral a la superficie de distintos tipos celulares, por lo que otros receptores más específicos son necesarios. En el caso específico de células dendríticas de Langerhans, que están presentes en la piel del hospedero humano y que son de las primeras que se infectan con DENV, el receptor DC-SIGN fue encontrado indispensable para la entrada de los 4 serotipos de DENV (TASSANEETRITHEP *et al.* 2003; NAVARRO-SANCHEZ *et al.* 2003). Sin embargo, DC-SIGN es un receptor de baja afinidad que concentra partículas de DENV en la superficie de la célula dendrítica. Para realizar la internalización son necesarios receptores de alta afinidad que aún no fueron caracterizados, aunque ha habido avances sustanciales para poder determinarlos (LOZACH *et al.* 2005; MONDOTTE *et al.* 2007; REYES-DEL VALLE *et al.* 2014).

La internalización del virión también puede ocurrir por la formación de complejos con las IgG, las cuales se unen a las células susceptibles por sus receptores Fc (MYINT *et al.* 1991). Luego de la internalización de los viriones, se acidifica el endosoma por la fusión con lisosomas, produciendo cambios conformacionales en la glicoproteína E, que se trimeriza irreversiblemente (ver Figura 8).

Esto induce la fusión de las membranas celular y viral, con la consiguiente liberación de la nucleocápside al citoplasma, donde se decapsida liberando el genoma viral (CLYDE *et al.* 2006; BARTENSCHLAGER and MILLER 2008).

SÍNTESIS PROTEICA

Luego de que el genoma viral ya se encuentra en el citoplasma, comienza la traducción de una única poliproteína, por medio de un mecanismo dependiente su cap 5' terminal. En este paso, el factor de iniciación eucariótico 4F (eIF4F) reconoce este cap del genoma viral (del mismo modo que ocurre con los mensajeros celulares), y solo así recluta al complejo ribosómico para iniciar la traducción (GINGRAS *et al.* 1999).

También se ha reportado la existencia de un modelo de traducción independiente del cap, mediante un mecanismo que requiere la interacción de 5' NCR y 3' NCR del DENV, lo que refleja una adaptación a las respuestas antivirales celulares o a diferentes tipos celulares que contienen variados niveles de factores de traducción esenciales (EDGIL *et al.* 2006).

La traducción de la poliproteína ocurre en el RE rugoso, lo cual facilita la localización de las proteínas virales dentro y alrededor de él para su posterior ensamblaje en viriones maduros (YU *et al.* 2006). El procesamiento proteolítico ocurre co y post-traduccionalmente por proteasas tanto celulares como virales (NS2B-NS3), dando lugar a 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales, en el orden C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5, que atraviesan la membrana del RE (CHAMBERS *et al.* 1990).

REPLICACIÓN

Una vez sintetizadas las proteínas esenciales para la replicación, las diferentes proteínas NS, entre las que destacan NS3 y NS5, forman el complejo de replicación viral (CRV) (KLEMA *et al.* 2015). Éste reconoce los ARN virales por su estructura secundaria característica, ubicada en el extremo 5', que es altamente conservada entre los Flavivirus (FILOMATORI *et al.* 2006).

Ésta consiste de una horquilla estabilizante grande (SLA) seguida de una más pequeña (SLB), ubicadas justo antes del codón iniciador de la traducción AUG (Figura 7A). Sin embargo, para que ocurra la replicación del ARN es necesario ubicar el CRV en el extremo 3'. Para que ello suceda se establecen interacciones ARN-ARN de largo alcance mediadas por secuencias complementarias ubicadas en ambos extremos del genoma (ALVAREZ *et al.* 2005). Éstas son 5' UAR (región corriente arriba de AUG) y 3' DAR (región corriente abajo de AUG), ubicadas en las NCR 5' y 3', respectivamente, y 5' CS y 3' CS (secuencia de ciclación), que se ubican en la secuencia codificante de la cápside, y corriente arriba de la horquilla estabilizante 3' (3'SL), respectivamente (BRINTON *et al.* 1986; ZENG *et al.* 1998; TILGNER *et al.* 2005; FRIEBE *et al.* 2012) (Figuras 7A y 7B).

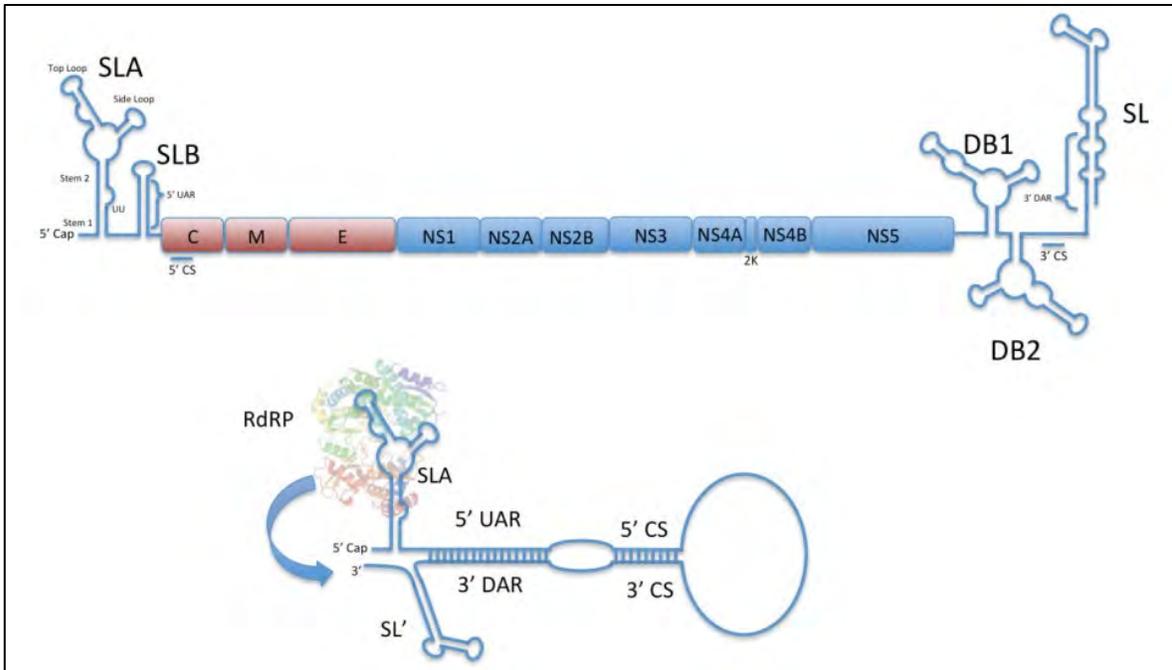


Figura 7. Estructuras genómicas del genoma de DENV. (A) Estructura lineal del genoma de DENV indicando las posiciones de estructuras secundarias de ARN principales y las regiones codificantes de proteínas. (B) La circularización de la cadena positiva de DENV promueve la síntesis de la hebra de ARN negativa. Los extremos 5' y 3' interactúan por intermedio de la asociación de secuencias de ciclación (CS) y regiones UAR/DAR. La hibridación entre 5' UAR y 3' DAR causa una reorganización de la estructura 3' SL, exponiendo el extremo 3' de la hebra positiva. El dominio RdRp de la NS5, que reconoce al SLA en el extremo 5', se transfiere al extremo 3' expuesto y próximo debido a la circularización, iniciando la síntesis de la hebra complementaria (SAEEDI and GEISS 2013).

De esta forma el ARN genómico funciona como molde para la síntesis de cadenas de polaridad negativa, y éstas generarán copias de ARN de polaridad positiva que tendrán tres destinos posibles. Podrán servir nuevamente como plantillas transcripcionales, funcionar como mensajeros para la síntesis proteica, o ensamblarse dentro de la nucleocápside y transformarse en los ARN genómicos de nuevos viriones (DIAMOND 2003).

ENSAMBLAJE Y SALIDA

Inicialmente se forman unas partículas virales inmaduras no infecciosas a nivel del RE, formadas por las proteínas E y prM, además de la nucleocápside y lípidos de membrana. La ruptura proteolítica de prM ocurre en el aparato de Golgi, madurando de esta forma la partícula viral y haciéndola infecciosa (Figura 8). Este virus completo es liberado de la célula por exocitosis para así infectar nuevas células (DIAMOND 2003).

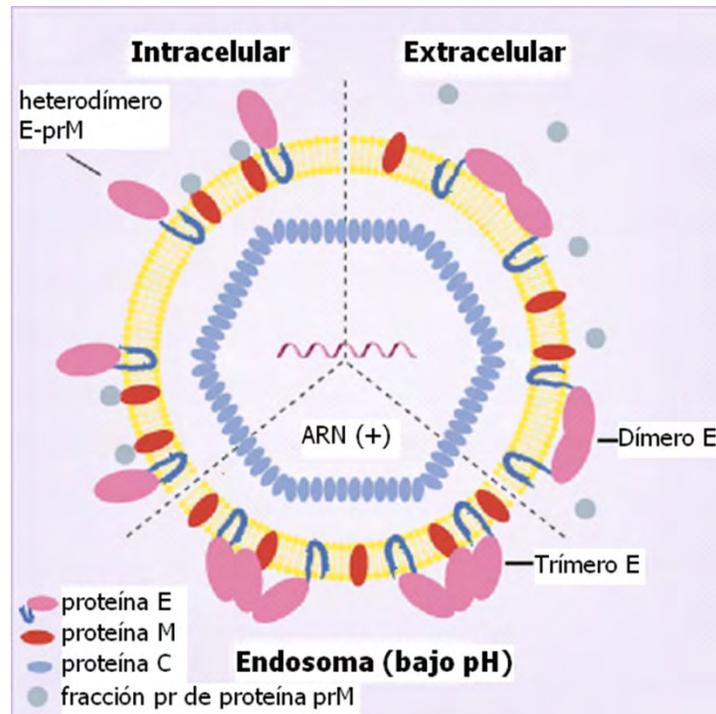


Figura 8. Esquema de las diferentes disposiciones de la proteína E en la partícula viral. Se observan las disposiciones de la E en su estado dimérico (extracelular), trimérico (endosomal) e inmaduro (intracelular). Modificado de (BARTENSCHLAGER and MILLER 2008).

PATOGÉNESIS

La primera infección con cualquiera de los cuatro serotipos se denomina infección primaria y puede resultar en un cuadro de dengue leve. En caso de producirse infecciones subsiguientes (con un nuevo serotipo), éstas reciben el nombre de infecciones secundarias y pueden ocasionar casos de dengue severo (RIGAU-PÉREZ *et al.* 1998). En estos cuadros, los síntomas clásicos de dengue leve suelen agravarse luego de un descenso marcado de la temperatura, donde aparecen manifestaciones hemorrágicas que pueden llegar al choque hipovolémico en ausencia de tratamiento adecuado, con una elevada letalidad de hasta el 47% en las seis horas siguientes (HALSTEAD 1989; GURUGAMA *et al.* 2010).

La mayoría de los casos de dengue severo suceden como resultado de una infección secundaria (ZIVNY *et al.* 1999). Esto es explicado por un fenómeno denominado amplificación dependiente de anticuerpos (ADE) (MORENS 1994). Cuando un individuo es infectado con un serotipo de DENV, genera anticuerpos específicos contra él, capaces de protegerlo por largo tiempo contra la reinfección con ese serotipo, pero solo durante dos o tres meses contra los otros serotipos. La posterior infección con un virus heterólogo produce la formación de complejos virus-anticuerpos que penetran en las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos), gracias a la unión del fragmento constante de la inmunoglobulina G (IgG) a los receptores del tipo *gamma*. Como consecuencia se infecta un mayor número de células y se favorece la diseminación

viral. Además, la replicación del virus induce a estas células infectadas a liberar mediadores vasoactivos que producen permeabilidad vascular y manifestaciones hemorrágicas típicas de un dengue severo (MORENS and HALSTEAD 1990).

Además, en infecciones secundarias, la presencia de anticuerpos anti-Dengue aumenta la lisis celular por asesinas naturales (NK, *natural killers*) a través del mecanismo conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (KURANE *et al.* 1984).

Por otro lado, la respuesta celular específica frente al DENV se inicia con la activación de linfocitos T (LT) CD4+ durante la viremia y posteriormente con la activación de LT CD8+. En individuos con dengue severo por infecciones secundarias, se ha demostrado la presencia de LT CD4+/CD8+ de memoria y LT CD4+/CD8+ citotóxicos (BERRIOS *et al.* 1996; ZIVNY *et al.* 1999), por lo que la activación de los LT y también la producción de citocinas son factores importantes en la patogenia de dengue (HOBER *et al.* 1993).

Además de la respuesta inmune celular en los casos de dengue severo, se exagera la activación y liberación de citocinas, lo que se relaciona con la mayor gravedad del cuadro clínico. En cuadros graves también se ha demostrado la activación del sistema del complemento, pudiéndose detectar concentraciones elevadas de las proteínas C3 y C1q, planteándose como una explicación, que los complejos virus-anticuerpos circulantes serían los que activan la reacción en cascada del complemento (LEI *et al.* 2001).

Igualmente, existe la posibilidad que se presenten reacciones autoinmunes, que pueden estar dadas por la presencia de anticuerpos contra las proteínas virales que presenten reactividad cruzada contra plaquetas y factores de coagulación (MARKOFF *et al.* 1991; LEI *et al.* 2001). Algunas proteínas no estructurales como NS1, NS2 y NS3 parecen tener cierta homología estructural con factores de coagulación, plaquetas, integrinas y adhesinas de células endoteliales humanas, permitiendo la activación de clonas LT autorreactivas que participan en la patología del Dengue (MARKOFF *et al.* 1991).

Por otra parte, la activación de linfocitos de reactividad cruzada o serotipo-específicos pueden llevar a la consecuente formación de anticuerpos de reactividad cruzada, inespecíficos y autorreactivos involucrados con la gravedad de la enfermedad (LIN *et al.* 2003).

No todos los casos de dengue grave ocurren en individuos que experimentan una infección secundaria, en algunos casos la propia virulencia del virus, sumada a las características del hospedero, llevan a la complicación de la enfermedad (BRAVO *et al.* 1987). Algunos genotipos están más relacionados con el desarrollo de epidemias de dengue leve o de mayor gravedad, como son las variantes genotípicas asiáticas del serotipo 2 y también la procedencia asiática del serotipo 3 (WATTS *et al.* 1999; COLOGNA *et al.* 2005), y por otro lado, la mayor carga viral en los casos de dengue severo en comparación con los casos de dengue leve (VAUGHN *et al.* 2000).

También es de destacar que el retículo endoplasmático (RE) del hospedador está involucrado en la síntesis proteica, replicación genómica y ensamblaje de las partículas virales de Flavivirus. Por esta

razón, durante una infección con Flavivirus se suele sobrecargar la capacidad funcional del RE (MACKENZIE and WESTAWAY 2001). Como consecuencia, estos eventos llevan a la activación de respuestas al estrés del RE, modulándose diversas señales con la posible inducción de la muerte celular (UMAREDDY *et al.* 2007).

Objetivo Específico III: Caracterización genética y antigénica de cepas de DENV circulantes en Uruguay.

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO TEÓRICO

El Laboratorio de Virología Molecular (LVM) ha estado vinculado al estudio del DENV desde 2007. En un comienzo colaboramos con el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical de Guayaquil, Ecuador, en el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular rápido y análisis filogenéticos que nos permitieron observar la epidemiología y la evolución de las poblaciones virales de DENV en Ecuador (REGATO *et al.* 2008). Este estudio nos permitió observar por primera vez la variabilidad genética de DENV en Ecuador, evidenciando la co-circulación de los cuatro serotipos.

Posteriormente, en el marco de mi Tesis de Maestría, nos enfocamos en el estudio del genotipo III de DENV-3 en las Américas. Numerosos reportes indican que la aparición de este genotipo en el continente no sólo reemplazó a otros serotipos, sino que también se relacionó con el aumento de brotes de dengue severo (MESSER *et al.* 2003b; SILVA *et al.* 2008). La primera gran epidemia de dengue grave ocurrió en Sri Lanka en 1989, y coincidió con la emergencia de una variante del genotipo III de DENV-3, que se expandió desde el subcontinente Indio hacia África y el Caribe, llegando finalmente a América Latina (MESSER *et al.* 2003b; AQUINO *et al.* 2006). Estas variantes han sido asociadas a severas epidemias de dengue en las Américas (SILVA *et al.* 2008).

Por esta razón, nuestro grupo comenzó a realizar investigaciones en conjunto con el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical de Guayaquil, Ecuador, así como con el Laboratorio Biología de Virus del Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela. A partir de muestras de pacientes ecuatorianos y venezolanos infectados con DENV, obtuvimos secuencias nucleotídicas correspondientes a diferentes regiones del genoma de DENV. Esto nos permitió realizar estudios de variabilidad genética del DENV, así como también caracterizar las estirpes circulantes en la región, lo que ha contribuido a elucidar diferentes aspectos de las fuerzas evolutivas que subyacen en la evolución molecular del DENV. Además, mediante estudios bayesianos de coalescencia, analizamos las tasas evolutivas y las dinámicas de las poblaciones virales del DENV en las regiones sudamericanas estudiadas. Los principales resultados obtenidos son los siguientes:

1) ESTUDIO DE LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS EXISTENTES ENTRE VARIANTES DE DENV-3 AISLADAS EN ECUADOR Y VENEZUELA.

Todas las cepas de DENV-3 que circulan en la región Latinoamericana que fueron incluidas en estos estudios, pertenecen al genotipo III (DE MORA *et al.* 2009; RAMÍREZ *et al.* 2010). Este genotipo particular ha sido asociado con grandes brotes de dengue severo. Además, se pudo evidenciar una gran diversificación de este genotipo en las Américas. Este hecho explica los resultados

epidemiológicos que señalan una mayor incidencia de este genotipo con estados más graves de la enfermedad.

2) ESTIMACIÓN DE LAS TASAS EVOLUTIVAS Y DINÁMICAS POBLACIONALES DE DENV-3 EN SUDAMÉRICA.

El genotipo III de DENV-3 se expandió en la región con tasas evolutivas que son comparativamente más altas que las reportadas para otros serotipos de DENV (FAJARDO *et al.* 2009; RAMÍREZ *et al.* 2010). Esto concuerda con diferentes reportes y también se asocia con los datos epidemiológicos de este genotipo. La tasa de evolutiva de DENV se relaciona directamente con la cantidad de variantes que puedan surgir de él, y por lo tanto mientras más alta sea esta tasa de sustituciones, mayor puede ser su diversidad genética. Esto tiene incidencia en las características fenotípicas de estas variantes, ya que pueden generarse estirpes con antigenicidad alterada, con mayor nivel de transmisibilidad, infectividad o virulencia. De esta manera, esta alta tasa evolutiva nos ayuda a explicar la gran capacidad patogénica de este genotipo.

3) ESTUDIO DE LOS CAMBIOS AMINOACÍDICOS ENCONTRADOS EN LA ENVOLTURA VIRAL DE CEPAS DE DENV-3.

Hay numerosos estudios que indican que las sustituciones encontradas en mutantes de escape generalmente suceden en regiones puntuales de la estructura de la proteína E, especialmente en su dominio III, que está involucrado en el reconocimiento de los receptores celulares y posee múltiples epítopos neutralizantes específicos para cada serotipo. En este estudio se observaron diversas sustituciones de aminoácidos en regiones de la proteína E, particularmente en su dominio III o en residuos expuestos a la superficie (DE MORA *et al.* 2009; RAMÍREZ *et al.* 2010), que pueden conferirle a estas cepas ventajas evolutivas que les permitan escapar a la neutralización.

Estos hechos en conjunto ayudan a explicar, al menos en parte, las características particulares del genotipo III de DENV-3 en las Américas, y su elevada asociación con progresiones hacia estados severos de la enfermedad.

En cuanto al DENV en el Uruguay, su transmisión no se registraba desde 1916, cuando se notificaron los últimos casos en Salto (SOSA 1916), a consecuencia de una epidemia que abarcó el cono Sur de América (GRATZ *et al.* 1996). El principal vector, *Aedes aegypti*, fue erradicado de nuestro país en 1958 (SALVATELLA 1996), pero en 1997 se produjo su re-introducción (SALVATELLA 1997) y rápidamente se dispersó por todo el territorio nacional (SALVATELLA and ROSA 2003). Este hecho, sumado a los constantes brotes epidémicos en la región, llevó al Gobierno Nacional a poner en marcha el Plan Nacional de Contingencia para una Epidemia de Dengue (MSP 2006). En marzo de 2007, nuevamente en el Departamento de Salto, un primer nuevo hipotético caso de dengue autóctono hizo activar el Plan Nacional de Contingencia, evaluándose éste y otros casos similares ocurridos en el mismo Departamento por parte de MSP. Estos casos fueron analizados en nuestro laboratorio arrojando resultados negativos, lo que finalmente fue confirmado por el Centro de Control de Enfermedades (CDC, Puerto Rico) (MSP, 2007). Casos similares han sido estudiados por el MSP desde entonces registrándose casos importados anualmente (MSP 2015).

Recientemente, en febrero de 2016, se reportaron los primeros casos de dengue autóctono luego de 100 años de su último reporte (WHO 2016).

En el siguiente capítulo se describen las estrategias utilizadas para investigar las características genéticas y antigénicas de las cepas de DENV causantes de la epidemia de dengue registrada en Uruguay en 2016.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Las muestras de suero de pacientes uruguayos positivos para DENV fueron obtenidas en el Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública (DLSP-MSP) o en el Laboratorio de Técnicas Especializadas de la Asociación Española (LTE-ASESP). Dichas muestras fueron confirmadas positivas para DENV por métodos moleculares en el correspondiente servicio. Posteriormente, se envió una alícuota de los sueros positivos al LVM donde proseguimos con los análisis. Las muestras analizadas se detallan en la Tabla 4.

EXTRACCIÓN DE ARN

Para la extracción de ARN se partió de muestras de 140 µl de suero de pacientes infectados con DENV. Se utilizó el kit de extracción *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones brindadas por el fabricante, obteniendo ARNs totales de las 32 muestras mencionadas (ver Tabla 1).

CONTROLES POSITIVOS

La ausencia de circulación de DENV y otros Flavivirus en el Uruguay ha significado un obstáculo para poder contar con controles positivos. La imposibilidad de trabajar con sueros positivos o crecer estos virus en cultivos celulares, hace que únicamente podamos trabajar con muestras de ARNs o ADNc obtenidos fuera del Uruguay a partir de muestras positivas para Flavivirus. Los controles positivos utilizados en el presente estudio fueron proporcionados por el Laboratorio de Flavivirus, IOC/FIOCRUZ (LF-FIOCRUZ), Río de Janeiro, Brasil. Se trata de las cepas prototipo de los diferentes serotipos de DENV: Cepas *Hawaii* (DENV-1), *NG-C* (DENV-2), *H-87* (DENV-3) y *H-241* (DENV-4). El ARN de estas variantes fue aislado de sobrenadantes de cultivos celulares (línea C6/36 de *Aedes albopictus*) en el LF/FIOCRUZ, desde donde se trajeron al LVM. Vale destacar que a efectos de cumplir con las normas de bioseguridad nacionales e internacionales, no se utilizaron muestras de suero, sino que únicamente se trabajó a partir de ácidos nucleicos. Por consiguiente, estas muestras no representan ningún riesgo físico, químico o biológico.

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Se realizó una retrotranscripción (RT) para obtener ADN copia (ADNc) de las 32 muestras de DENV uruguayas, a partir de los ARN aislados de dichas muestras. Para ello se realizó una mezcla de reacción utilizando los siguientes reactivos por cada muestra: 3 microlitros (µl) de agua *Milli-Q*, 1 µl de desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP's) a una concentración de 10 milimolar (mM), 3 µl de hexámeros aleatorios y 5 µl de ARN de cada muestra. Esta mezcla se incubó a 65°C por 5 minutos (min) y posteriormente en hielo por 1 min. A continuación, se adicionaron a la mezcla 4 µl de Buffer 5X, 2 µl de DTT 100 mM, 1µl de *ARNasa out* y 1µl de la enzima ADN polimerasa ARN dependiente *Superscript II* (Invitrogen) en una concentración de 200 unidades de enzima (U)/µl, obteniendo un volumen final de 20 µl. Esta mezcla de reacción fue incubada 10 min a 25°C, 60 min a 42°C y 15 min a 70°C en un termociclador *Corbett PalmCycler* CG-196.

Tabla 4: Muestras de pacientes uruguayos infectados con DENV.

Cepa	Procedencia	Sexo	País	Barrio	Diagnóstico	Cuadro clínico
M3	AESP	M	Autóctono	Pocitos	Dengue leve	Fiebre, exantema, mialgia.
M6	MSP	F	Autóctono	Pocitos	Dengue severo	Dengue severo
M12	MSP	M	Importado (Paraguay)	ND	Dengue leve	ND
M13	MSP	M	Importado (Paraguay)	ND	Dengue leve	ND
M14	MSP	F	Importado (Paraguay)	ND	Dengue leve	ND
M15	MSP	F	Importado (Paraguay)	ND	Dengue leve	ND
M16	MSP	F	Importado (Colombia)	ND	Dengue leve	ND
M17	MSP	M	Importado (Paraguay)	ND	Dengue leve	ND
M18	MSP	F	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M19	MSP	M	Importado (Argentina)	ND	Dengue leve	ND
M20	MSP	M	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M21	MSP	F	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M22	MSP	M	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M23	MSP	M	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M24	MSP	F	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M25	MSP	F	Importado (Cuba)	ND	Dengue leve	ND
M26	AESP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M38	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M39	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M40	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M41	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M42	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M43	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M44	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M45	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M46	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M47	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M48	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M49	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M50	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M51	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND
M52	MSP	ND	Autóctono	ND	Dengue leve	ND

ND: Información no disponible

REAL-TIME PCR

Se utilizó la metodología de PCR a tiempo real para la detección de Flavivirus (detallada en el Objetivo Específico II del Capítulo 1) con el fin de confirmar las muestras positivas para DENV. Para ello se modificó brevemente la metodología descrita, considerándose la posibilidad de que otro Flavivirus fuera el agente causal de la enfermedad en algún paciente. Se realizó una mezcla de reacción conteniendo los siguientes reactivos para cada reacción: 10 µl de *SYBR Green Master Mix*; 6 µl de agua *Milli-Q*; 1 µl de primer directo MAMDMod (5'- AAC ATG ATG GGN AAR MGW GAR AA -3'); 1 µl de primer reverso cFD2Mod (5'- GTG TCC CAD CCD GCD GTR TCR TC-3'); y 2 µl de ADN copia de cada muestra problema. Los 20 µl de reacción resultantes fueron incubados en un *StepOnePlus™ Real-time PCR System* de *Applied Biosystems®* a: 95°C por 10 min; 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 20 seg a 53°C y 20 seg a 72°C; 20 seg a 95°C; 1 min a 60°C y 20 seg a 95°C. Se utilizó ADN copia de los 4 serotipos de DENV como controles positivos.

DETERMINACIÓN DE SEROTIPO

Para determinar el serotipo de DENV de cada una de las muestras mencionadas, se sometieron los ADNc generados a una Heminested PCR (LANCIOTTI *et al.* 1992) enfocada en la región C-preM del genoma de DENV. Los primers fueron previamente ajustados de acuerdo a las cepas de DENV circulantes en la actualidad en las Américas. Para la primera ronda de amplificación, se preparó la siguiente mezcla de reacción por muestra: 11.5 µl de agua *Milli-Q*; 5 µl de Buffer 5X (*Phusion*); 1 µl de dNTP's 10 mM; 1 µl de los cebadores D1 y D2, cuyas secuencias nucleotídicas son 5'- TCA ATA TGC TGA AAC GCG HGA GAA ACC G -3', y 5'- TTR CAC CAR CAR TCW AYR TCH TCW GGT TC -3', respectivamente, a una concentración de 15 µM; y 0,5 µl de la enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*, en una concentración de 2000 U/ml. A esta mezcla se le agregaron 5 µl de ADNc y se incubaron los 25 µl resultantes a: 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 1 min y 72°C por 2 min; y 10 min a 72°C. El producto obtenido de 511 pb fue posteriormente sometido a una nueva ronda de amplificación, manteniendo el primer externo D1, e incluyendo esta vez los cebadores TS1, TS2, TS3 y D4, con las siguientes secuencias nucleotídicas: TS1: 5'- YGC CTC AGT RAT CYG GGG R -3'; TS2: 5'- YGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG 3'; TS3: 5'- YAA YAT CAT CAT GAG ACA GAG C -3'; D4: 5' TGTTGTCTTAAACAAGAGAGGTC 3'. Los productos obtenidos a través de este método difieren en su tamaño (DENV-1: D1-TS1, 482 pb; DENV-2: D1-TS2, 119 pb; DENV-3: D1-TS3, 290 pb; DENV-4: D1-D4, 389 pb). De esta manera se puede determinar el serotipo de cada muestra por la comparación de sus diferentes movilidades electroforéticas (Figura 9).



Figura 9. Visualización de una corrida electroforética en gel de agarosa al 2%, para determinar los serotipos de DENV. Los fragmentos amplificados a través de esta Heminested-PCR migran de acuerdo a su tamaño, indicándonos así el serotipo de la cepa de DENV analizada. Teniendo como referencia el Marcador de Serotipos (MS) en el carril 5, podemos comparar la migración de los amplificados y determinar si se tratan de un DENV-1 (482 pb), DENV-2 (119 pb), DENV-3 (290 pb), o DENV-4 (389 pb).

AMPLIFICACIÓN DE GENES DE PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

Se procedió a la amplificación de los genes de las proteínas C, PreM, M y E de las distintas cepas investigadas. Para ello se utilizaron los primers D1S1C-F1 y D1A17-F1 (Tabla 5) que amplifican los primeros 2559 nucleótidos del genoma de DENV-1, región que incluye todas las proteínas estructurales de este virus (Figura 7). Se utilizó la siguiente mezcla de reacción por muestra: 28,5 μ l de agua Milli-Q; 10 μ l de Buffer 5X (*Phusion*); 2 μ l de dNTP's 10 mM; 2 μ l de primers D1S1C-F1 y D1A17-F1 en una concentración de 10 μ M; y 0,5 μ l de la enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*, en una concentración de 2000 U/ml. A esta mezcla se le agregaron 5 μ l de ADNc generados previamente con hexámeros aleatorios. Se incubaron los 50 μ l resultantes a: 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 30 seg a 45°C y 72°C por 2 min; y 10 min a 72°C.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Con el fin de confirmar los tamaños de los diferentes amplicones obtenidos, se realizaron corridas electroforética en geles de agarosa al 1.5%, en buffer TAE 1X. La tinción del mismo se realizó con *SYBR® Safe - DNA Gel Stain* (Invitrogen). Los geles fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiados en un procesador de imágenes *UNIVERSAL HOOD II* de BIO-RAD.

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Los amplicones resultantes fueron purificados (desde el mismo tubo de amplificación o luego de recortarse de los geles de agarosa), mediante el kit *PCR Purification Kit* de Invitrogen, según las instrucciones suministradas por el fabricante. A efectos de contar con una mayor cobertura

nucleotídica, en el caso de la Heminested-PCR solo se enviaron los amplicones derivados del 1^{er} round de amplificación (511 pb).

SECUENCIACIÓN

La secuenciación de los amplicones purificados se realizó a través del servicio de secuenciación comercial *Macrogen Inc*, Seoul, Korea. Para ello se utilizaron los primers de amplificación, así como primers internos de secuenciación en el caso de amplicones del Fragmento 1 (ver Tabla 5). Todos los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones a los efectos de evitar cualquier discrepancia posible.

ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa *Seqman* implementado en el paquete *DNASTar 5.01* (DNASTAR, Madison, USA). Posteriormente fueron analizadas con el algoritmo Nucleotide BLAST (NCBI) para corroborar su identidad.

Con el objetivo de analizar el grado de variabilidad genética de las cepas de DENV aisladas en Uruguay, procedimos a alinear sus secuencias nucleotídicas con secuencias comparables de diferentes regiones geográficas, mediante el programa CLUSTALW (THOMPSON *et al.* 1994) implementado en el programa MEGA7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versión 7.0) (KUMAR *et al.* 2016). Se descargaron secuencias nucleotídicas utilizando la base de datos ViPR (*Virus Pathogen Database and Analysis Resource*), del NIAID (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*), disponible en el sitio <http://www.viprbrc.org> (PICKETT *et al.* 2012).

En primera instancia se descargaron todos los genomas completos de DENV-1 con fecha de aislamiento posterior a 2010. Este conjunto de datos permite obtener un panorama general de la diversidad de variantes de este serotipo actualmente circulante a nivel mundial. Posteriormente, se descargaron únicamente secuencias de DENV-1 de la región sudamericana aisladas en los últimos 10 años. Se generaron tres conjuntos de datos diferentes, que incluyeron secuencias correspondientes a la región C-preM (sitios 160 a 613 del genoma de DENV-1), NS5 (8950-9166) y genes estructurales (1-2559). Debido a que las dos primeras regiones mencionadas se ubican en los extremos opuestos del genoma de DENV, solo se descargaron secuencias comparables con genoma completo para asegurar la concordancia entre los diferentes conjuntos de datos. Este enfoque permite además evaluar la presencia de algún eventual evento de recombinación evidenciado por incongruencias entre las distintas filogenias.

El programa jModelTest (POSADA 2008) se utilizó para identificar el modelo evolutivo que mejor representa la variabilidad de las secuencias analizadas. A través del criterio de información de Akaike (AIC) y de la prueba del cociente de verosimilitud (LRT) jerárquica, se determinó el modelo GTR + Γ + I como el modelo evolutivo óptimo para describir los diferentes conjuntos de datos. Utilizando este modelo se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud, mediante el programa *PhyML* v.3.0 (GUINDON *et al.* 2010) con 500 pseudo-réplicas de *bootstrap* para evaluar la robustez de cada nodo. Se editaron los árboles obtenidos mediante el programa *FigTree* v1.4.2 (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

AMPLIFICACIÓN DE GENOMAS COMPLETOS

Con el objetivo de profundizar en las características genéticas, así como investigar las propiedades antigénicas de estas cepas, se amplificaron los genomas completos de diferentes variantes uruguayas. Para ello, a partir de los análisis filogenéticos previamente realizados, se seleccionaron cepas representativas de los distintos sub-grupos genéticos circulantes en Uruguay. Se utilizó como base el protocolo descrito por Christenbury y colaboradores que amplifica el genoma completo en 5 fragmentos solapados (CHRISTENBURY *et al.* 2010).

En primera instancia, se ajustaron las secuencias de los primers descritos (CHRISTENBURY *et al.* 2010) para la detección de las variantes circulantes en la región. Las modificaciones realizadas se resumen en la Tabla 5. Se amplificaron los diferentes fragmentos detallados utilizando la siguiente mezcla de reacción por muestra: 28,5 µl de agua Milli-Q; 10 µl de Buffer 5X (*Phusion*); 2 µl de dNTP's 10 mM; 2 µl de primers de cada fragmento (ver Tabla 5) a una concentración de 10 µM; y 0,5 µl de la enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*, en una concentración de 2000 U/ml. A esta mezcla se le agregaron 5 µl de ADNc generados previamente con el primer reverso más externo del genoma (D1A4B-F5). Se incubaron los 50 µl resultantes a: 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 30 seg a 45-55°C (para diferentes fragmentos se utilizaron distintas temperaturas de *annealing*) y 72°C por 2 min; y 10 min a 72°C. Se corrieron los productos obtenidos en geles de electroforesis y las bandas esperadas fueron purificadas desde gel, o desde producto de PCR en casos de bandas únicas (protocolos detallados anteriormente).

SECUENCIACIÓN MASIVA DE GENOMAS COMPLETOS

Los amplicones resultantes fueron sometidos a una secuenciación masiva utilizando la plataforma *Illumina Genome Analyzer IIX* presente en el Laboratorio del Dr. Marco Vignuzzi, *Unité de Populations Virales et Pathogénèse, Viral Populations and Pathogenesis Unit, Institut Pasteur de Paris*, Francia. Para ello fue fundamental la contribución del Dr. Gonzalo Moratorio, así como el Dr. Fran Pérez Rodríguez, quienes procesaron los diferentes amplicones para realizar la construcción de las librerías genómicas. Asimismo, el posterior procesamiento de las secuencias nucleotídicas estuvo a cargo del Lic. Martín Sónora en el marco de su Tesis Maestría en Bioinformática. El Lic. Sónora se encargó de la generación de los genomas consenso de cada variante, las tablas de frecuencias nucleotídicas y la reconstrucción de haplotipos de variantes minoritarias, por lo que gran parte de este trabajo hubiera sido imposible sin su aporte. Las metodologías bioinformáticas utilizadas para estos fines se describen brevemente a continuación.

PRE-PROCESAMIENTO Y ALINEAMIENTO

Se evaluó el estado de calidad de las secuencias obtenidas utilizando el programa *FastQC* versión 0.11.5 (ANDREWS 2010). Este programa provee una descripción general sobre aspectos relacionados con los datos de secuencias, mostrando gráficos y tablas para rápidamente evaluar los mismos. De esta forma, se evaluó la calidad de las lecturas antes y después de cada paso del análisis. Los *reads* fueron recortados o "trimados" utilizando el programa *Scythe* versión 0.991 (disponible en: <https://github.com/vsbuffalo/scythe>), lo que permitió la remoción de los adaptadores usados durante la construcción de las librerías. *Scythe* utiliza una aproximación

bayesiana para la clasificación de pequeños *substrings* encontrados en las lecturas. Asimismo, considera la información de calidad que lo hace más robusto en la eliminación del adaptador del extremo 3', que usualmente presenta bases de baja calidad. En el trimado de los *reads* se consideró la calidad de las bases. Para ello se usó el programa *Sickle* versión 1.33 (JOSHI and FASS 2011) con el parámetro de calidad -q igual a 33. *Sickle* se vale de ventanas deslizantes según umbrales de calidad y longitud para determinar cuándo la calidad es suficientemente baja y alta para "trimar" los extremos 3' y 5', respectivamente. Posteriormente, se utilizó el paquete bioinformático *cutadapt* versión 1.10 (MARTIN 2011) para remover 20 y 15 nts de los extremos 5' y 3' de cada *read*, respectivamente. Como paso final del pre-procesamiento se decidió ajustar la longitud de las secuencias a un mismo largo. Para esto se usó el programa *fastx_trimmer* del paquete bioinformático *FASTX-Toolkit* (disponible en: http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) ajustando el parámetro -m en 110. *FASTX-Toolkit* es una herramienta de línea de comando que integra un conjunto de programas para el pre-procesamiento de los archivos de lecturas, tanto en formato FASTA como FASTQ. Además, brinda información sobre estadísticas de calidad, remueve secuencias de adaptadores y filtra y corta secuencias en base a su calidad.

Los *reads* que superaron la etapa de pre-procesamiento fueron alineados contra un genoma de referencia (cepa HNRG25001 de DENV-1, número de acceso KC692512), utilizando el programa *Bowtie* versión 1.1.2 (LANGMEAD *et al.* 2009). Durante el alineamiento se permitió un número máximo de 3 mismatches en la región semilla, lo que permitió una captura mayor de *reads*. El alineamiento generado fue procesado con programas del paquete *SAMtools* (LI *et al.* 2009) (disponibles en: <http://github.com/samtools/samtools>), visualizándose con el programa *Tablet* versión 1.16.09.06 (MILNE *et al.* 2013), donde se usaron los archivos binarios para la etapa del estudio de variantes o "*Variant Calling*" mediante la opción *mpileup*. El archivo resultante sirvió de entrada para el paquete computacional *VarScan* versión 2.3.7 (KOBOLDT *et al.* 2009), mediante el cual, utilizando la opción *mpileup2snp*, se identificaron los diferentes polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Se utilizó la opción "*filter*" del programa *VarScan* para realizar el filtrado de los SNPs por cobertura, frecuencia y p-value.

ENSAMBLADO DE LOS FRAGMENTOS: SECUENCIAS CONSENSO

Además de alinear los *reads* contra el genoma de referencia, se realizó el ensamblado de los mismos para generar las secuencias consenso de los genomas completos de cada cepa analizada. Para ello se utilizó el programa *Trinity* versión 2.2.0 (GRABHERR *et al.* 2011) que permite la reconstrucción *de novo* de transcritos a partir de datos de *RNA-seq*. Trinity combina tres algoritmos (*Inchworm*, *Chrysalis* y *Butterfly*) que son aplicados secuencialmente para el procesamiento de grandes volúmenes de datos de *RNA-seq*. De esta forma, particiona los datos de secuencia en muchos grafos de *Bruijn* individuales, cada uno representando la complejidad transcripcional para un gen o *locus* determinado, y luego procesa cada grafo independientemente para extraer las isoformas de *splicing* de largo completo y para separar los transcritos derivados de genes parálogos.

CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA

Se procedió a investigar las características antigénicas de las diferentes cepas de DENV circulantes en Uruguay. Para ello se analizó la información nucleotídica de las regiones codificantes completas obtenidas por secuenciación masiva. Asimismo, para las demás muestras cuyos genomas completos no fueron amplificados, se utilizaron las secuencias del Fragmento 1 (Figura 15, Tabla 5) que incluye los genes de proteínas estructurales. Mediante esta aproximación se buscó profundizar en la interpretación de la diversidad genética y antigénica de estirpes uruguayas. Se realizó la traducción *in silico* de las secuencias nucleotídicas mediante el programa MEGA7 (KUMAR *et al.* 2016) para obtener las diferentes secuencias proteicas. La información respecto a las diferentes modificaciones aminoacídicas encontradas en los ORF completos se resumió en Tabla Suplementaria 1. Asimismo, algunas sustituciones aminoacídicas encontradas entre las diferentes secuencias de la glicoproteína E, fueron utilizadas para modelar por homología la estructura de esta proteína utilizando el programa Modeller (disponible en <https://salilab.org/modeller/contact.html>) (MARTÍ-RENOM *et al.* 2000; WEBB and SALI 2016). Para ello se utilizó la estructura tridimensional comparable con mejor resolución atómica, obtenida por crio-microscopía electrónica de una cepa de DENV-2 (PDB ID: 3J27) (ZHANG *et al.* 2013). Para la visualización y edición de la estructura se utilizó el programa VMD (HUMPHREY *et al.* 1996). Estos análisis fueron realizados por el Dr. Sergio Pantano en el Laboratorio de Simulaciones Biomoleculares del Instituto Pasteur de Montevideo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de caracterizar las variantes de DENV circulantes en el brote registrado en Uruguay en 2016, se sometieron dichas muestras a los procedimientos detallados que incluyeron dos metodologías de diagnóstico: una *Real-time* PCR y una Heminested PCR. Todas las muestras resultaron positivas para DENV por ambos métodos, a excepción de M16 (caso importado de Colombia) y M24 (caso autóctono), que arrojaron resultados negativos por ambas estrategias metodológicas. Esto nos permitió obtener secuencias de las regiones C-preM y NS5 para 30 cepas uruguayas (ver Tabla 4). De ellas, 7 corresponden a variantes aisladas de pacientes con casos importados, siendo las 23 restantes provenientes de casos autóctonos.

Los amplicones obtenidos por ambas metodologías fueron purificados y enviados a secuenciar. Se procedió de igual forma con los productos amplificados correspondientes a los controles positivos de los 4 serotipos, para descartar la posibilidad de contaminaciones. Las secuencias resultantes, luego de su edición y corrección, fueron analizadas mediante el algoritmo *Nucleotide BLAST* para corroborar su identidad. Este análisis evidenció que de las 30 variantes analizadas, 29 corresponden a DENV-1 y 1 a DENV-4. Esta última cepa corresponde a un caso importado de Paraguay, por lo que se desprende que la totalidad de las muestras autóctonas analizadas pertenecen al mismo serotipo (DENV-1).

Con el objetivo de investigar en mayor detalle la variabilidad genética existente entre los diferentes aislados de DENV uruguayos, se realizaron distintos análisis filogenéticos. Para el diseño del conjunto de datos se utilizó la base de datos ViPR, del NIAID (PICKETT *et al.* 2012). Se descargaron todos los genomas completos de diferentes genotipos de DENV-1 que presentaran fechas de aislamiento posteriores a 2010. Se alinearon con las secuencias de DENV uruguayas obtenidas y se generó un *dataset* que incluye secuencias nucleotídicas de la región C-preM. En las Figuras 10 y 11 se aprecia el árbol filogenético generado con la región C-preM (nucleótidos 160 a 613 del genoma de DENV-1, relativos a la cepa HNRG25001: número de acceso KC692512) de diferentes variantes de DENV-1 reportadas desde 2010. Mediante el mismo se pretende ilustrar la variabilidad de cepas de DENV-1 que circularon en los últimos años y que corresponden a diferentes genotipos.

El genotipo I circula predominantemente en Asia e incluye cepas de Arabia Saudita, China, India, Indonesia, Japón, Singapur, Sri Lanka, Tailandia y Taiwán, aisladas entre 2010 y 2014. Se incluyen además en este genotipo una variante de Angola de 2013, así como la cepa prototipo de DENV-1, *Hawaii*, que se utilizó como control positivo de este serotipo (Figuras 10 y 11, en verde). Con respecto al genotipo IV, sus representantes con genoma completo corresponden a variantes de China, Filipinas, Nueva Caledonia y Singapur, aisladas entre 2010 y 2016 (Figuras 10 y 11, en amarillo). El otro genotipo actualmente circulante es el V, que se divide filogenéticamente en variantes asiáticas y americanas (Figuras 10 y 11, en celeste y violeta, respectivamente). En este último clado se agrupan todas las variantes uruguayas reportadas en el presente trabajo (Figuras 10 y 11, en rojo), así como las derivadas de casos importados (Figuras 10 y 11, en azul), a excepción de la cepa M15, correspondiente a DENV-4.

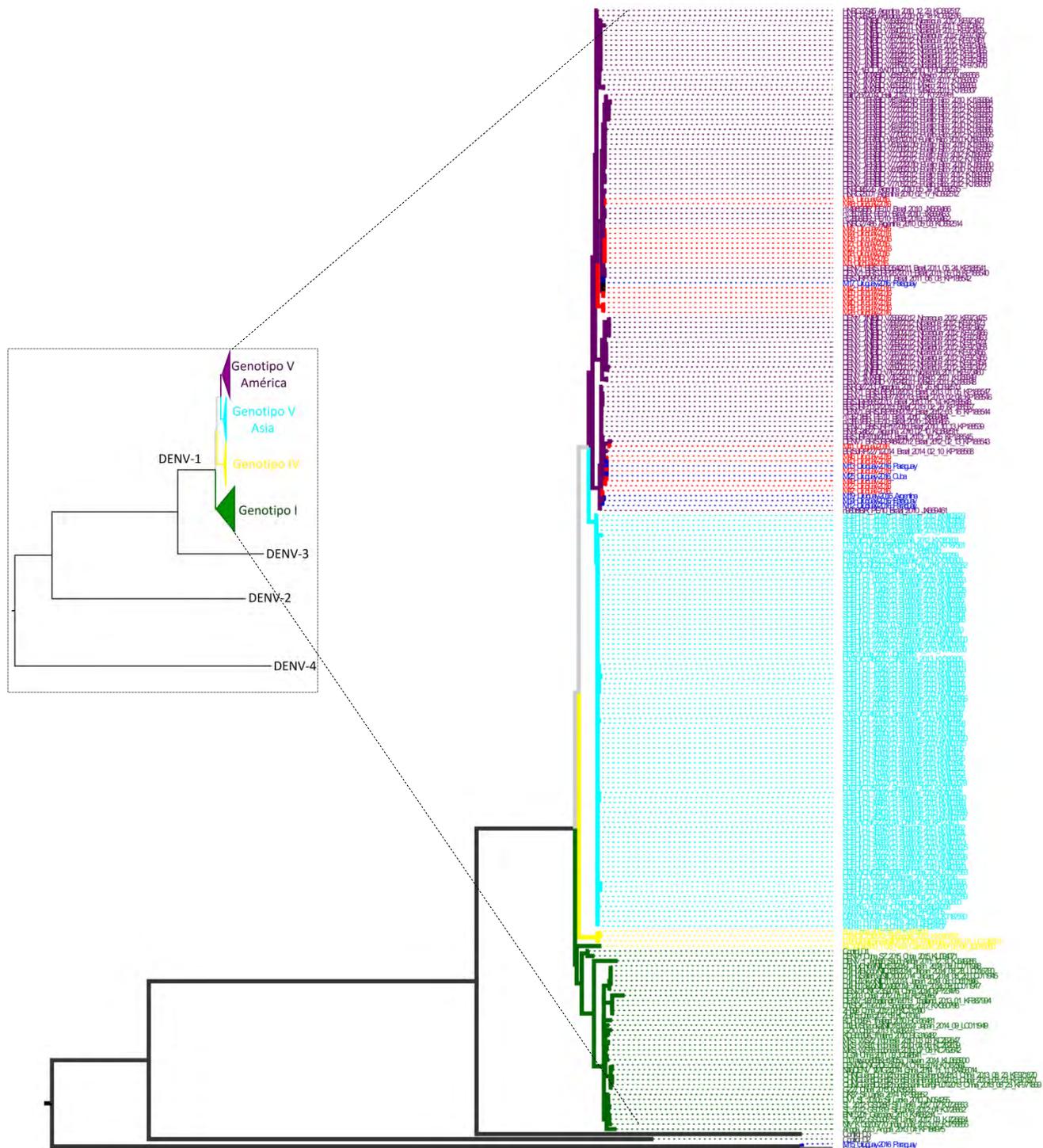


Figura 10. Filogenia de cepas de DENV-1 actuales. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (y esquema del mismo) realizado a partir de secuencias de la región C-preM de variantes aisladas desde 2010. Se distinguen los diferentes genotipos de DENV-1 en verde (I), amarillo (IV), celeste (V Asiático) y violeta (V Americano). Se incluyeron cepas de DENV-2, 3 y 4 para evidenciar distancias genéticas entre serotipos. En rojo y azul se incluyeron cepas uruguayas de casos autóctonos e importados, respectivamente. Se obtuvieron valores de soporte >90% en los nodos principales que no se indican para mejorar la visualización.

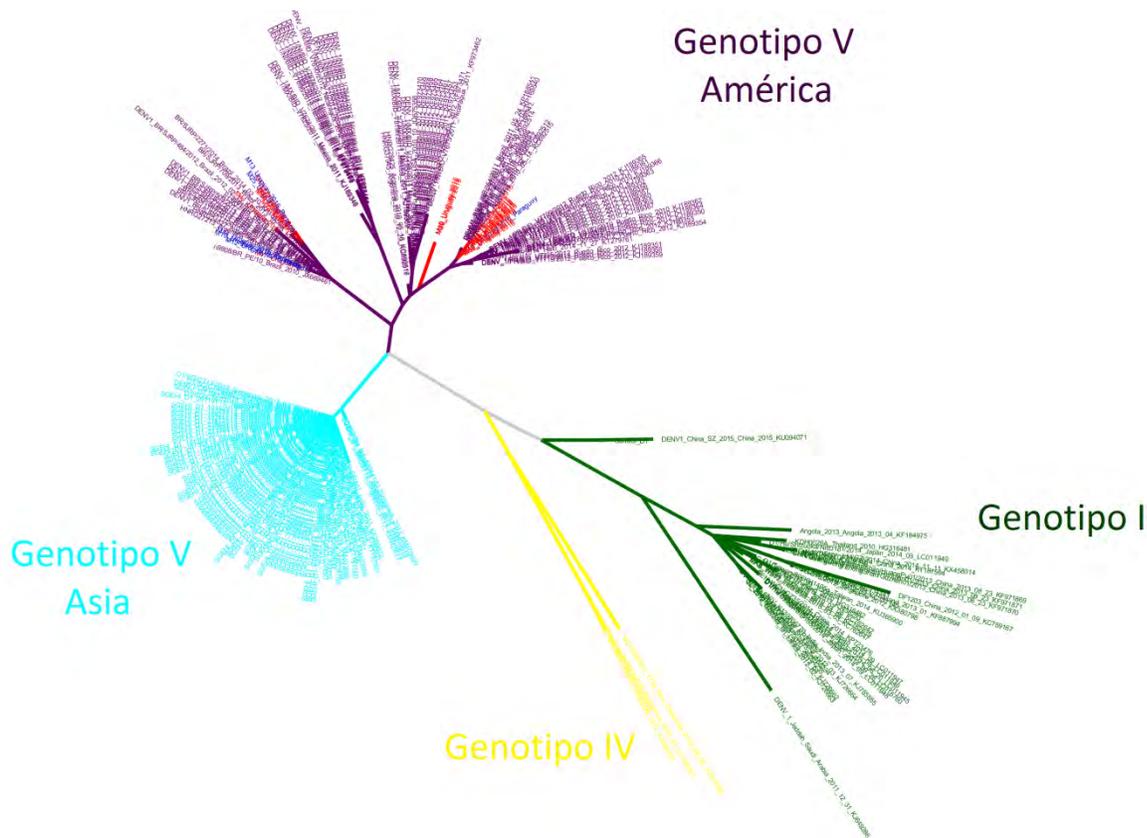


Figura 11. Filogenia de cepas de DENV-1 actuales. Árbol filogenético de máxima verosimilitud en su disposición estrellada, realizado a partir de secuencias de la región C-preM de variantes de DENV-1 aisladas desde 2010. Se distinguen los diferentes genotipos de DENV-1 en verde (I), amarillo (IV), celeste (V Asiático) y violeta (V Americano). Se incluyeron además cepas de DENV-2, DENV-3 y DENV-4 para evidenciar las distancias genéticas inter-serotípicas. En rojo y azul se incluyeron cepas uruguayas de casos autóctonos e importados, respectivamente. Se obtuvieron valores de soporte >90% en los nodos principales que no se indican para mejorar la visualización.

A partir de estos análisis podemos visualizar distancias filogenéticas importantes entre las diferentes variantes uruguayas. Con el objetivo de investigar en mayor profundidad el grado de variabilidad existente entre ellas, se procedió a descargar secuencias sudamericanas de DENV-1 circulantes en los últimos 10 años. Se realizó un análisis filogenético de máxima verosimilitud considerando la región parcial de la NS5 obtenida mediante la *Real-Time* PCR. La filogenia resultante se muestra en la Figura 12.

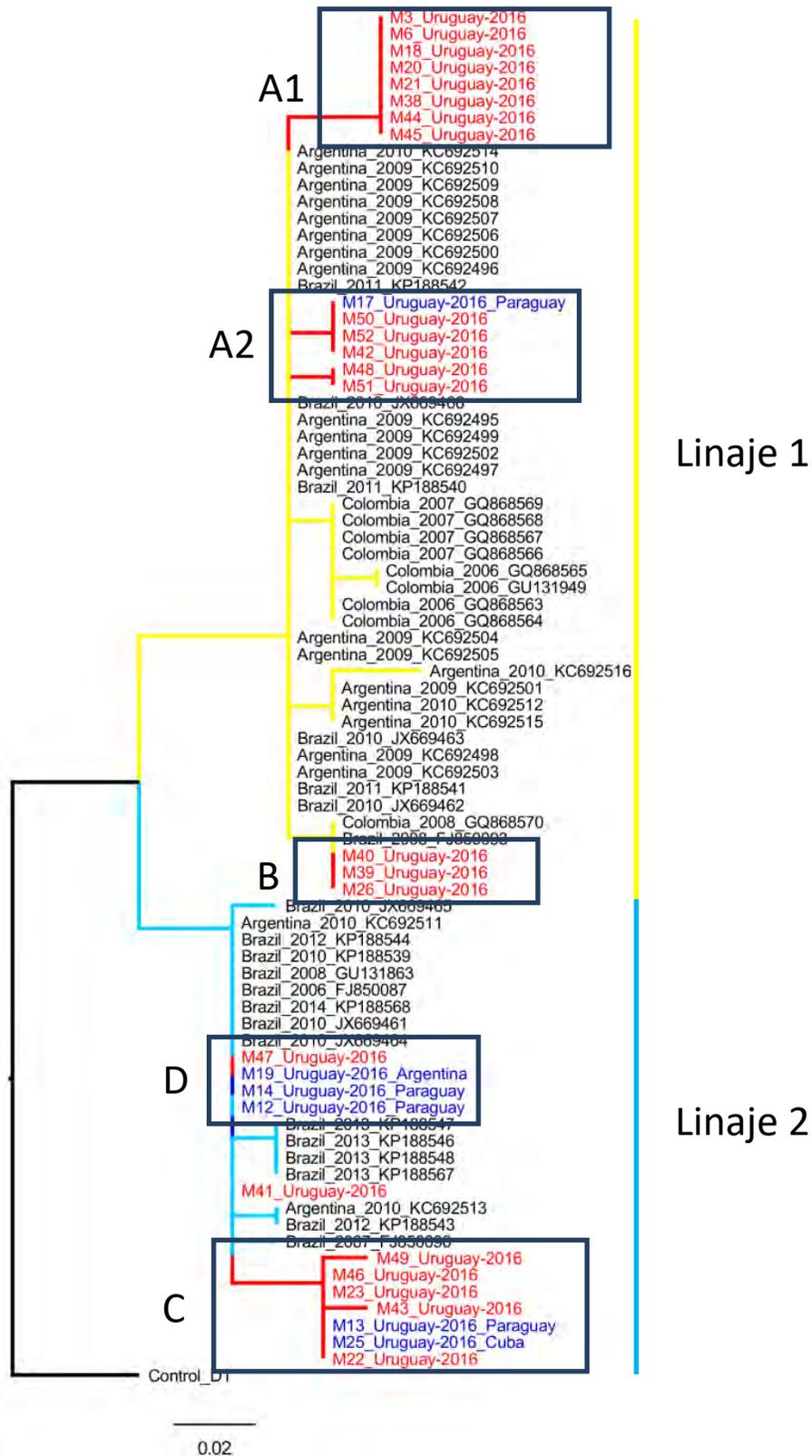


Figura 12. Análisis filogenético de cepas de DENV-1 aisladas en Uruguay. Se observa el árbol filogenético de máxima verosimilitud (modelo de sustitución nucleotídica GTR + Γ + I) obtenido a partir del análisis de una región parcial del gen NS5. Se incluyeron todas las cepas aisladas en Uruguay en 2016, así como secuencias comparables de cepas sudamericanas. Como grupo externo se utilizó la secuencia del control positivo utilizado, correspondiente a la cepa *Hawaii*. Se distinguen los linajes 1 y 2, en amarillo y celeste, respectivamente. En rojo y azul se indican las cepas uruguayas derivadas de casos autóctonos e importados, respectivamente. Se obtuvieron valores de soporte >90% en los nodos principales que no se indican para mejorar la visualización.

Tal como se puede observar en la Figura 12, las diferentes variantes uruguayas se distribuyen diferencialmente en dos clados dentro del genotipo V. Estos grupos filogenéticos corresponden a los dos linajes del genotipo V actualmente circulantes en Sudamérica que han sido previamente reportados (MENDEZ *et al.* 2010; DOS SANTOS *et al.* 2011; CARNEIRO *et al.* 2012; DRUMOND *et al.* 2012; TITTARELLI *et al.* 2014; DE BRUYCKER-NOGUEIRA *et al.* 2015, 2016; CUNHA *et al.* 2016). Los mismos han sido denominados de diferentes formas en distintos reportes. En el presente estudio se hará referencia a ellos como linajes 1 y 2 (Figura 12, en amarillo y celeste, respectivamente). Si bien la señal filogenética de esta región ha sido valorada como idónea para discriminar entre diferentes especies de Flavivirus (NUÑEZ 2015), el análisis aquí realizado pretende investigar las relaciones filogenéticas a un nivel más profundo, considerando genotipos y linajes dentro de cada serotipo. Por consiguiente, esta región genética puede no ser lo suficientemente informativa para sacar conclusiones firmes.

Es por ello que realizamos el mismo análisis contemplando las regiones amplificadas mediante la Heminested PCR. Los resultados pueden visualizarse en la Figura 13 y evidencian una topología muy similar a la obtenida mediante la región parcial del gen NS5. Si bien la resolución del árbol filogenético mejora, la distribución general de las variantes se mantiene, observándose los dos linajes previamente mencionados. De hecho, entre las cepas uruguayas, se aprecian prácticamente las mismas interrelaciones inferidas anteriormente.

Dentro del linaje 1 encontramos relacionadas filogenéticamente a las cepas M3, M6, M18, M21, M38, M42, M44, M45, M48, M50, M51 y M52, derivadas de casos autóctonos. Estas variantes se asocian genéticamente con M17, que deriva de un caso importado de Paraguay (Figuras 12 y 13, clado A). Asimismo, M26, M39 y M40 forman parte de otro clado integrado por una cepa colombiana aislada en 2008 (GQ868570) (Figuras 12 y 13, clado B).

Por otra parte, las demás variantes uruguayas se observan formando parte de dos subgrupos diferentes dentro del linaje 2. Se aprecian las cepas M22, M23, M43, M46 y M49, estrechamente vinculadas con variantes importadas de Paraguay y Cuba (M13 y M25, respectivamente) (Figuras 12 y 13, clado C). En otro sub-clado dentro de este linaje se ubica la cepa M47, junto con las variantes M12, M14 (importadas de Paraguay) y M19 (importada de Argentina) (Figuras 12 y 13, clado D). La ubicación de M41 discrepa entre ambas filogenias, con asociaciones más estrechas con cepas del clado C y D, a partir del análisis de las regiones C-preM y NS5, respectivamente. Esta es la única variante que muestra una leve discrepancia respecto a las distribuciones filogenéticas observadas mediante ambos abordajes, que puede tener su explicación en la menor resolución de la región derivada de la *Real-Time* PCR, o deberse a una historia evolutiva diferente de esta cepa.

Con el objetivo de explorar en mayor detalle este punto, así como para confirmar las interrelaciones obtenidas por ambos enfoques, se procedió a amplificar la región codificante de todas las proteínas estructurales (2559 pb) de las cepas en estudio. No se pudo amplificar la totalidad de esta región para las cepas M3, M18, M23 y M42. La filogenia resultante de esta región se muestra en la Figura 14. En ella se aprecian las mismas interrelaciones entre las variantes uruguayas en estudio, lo que confirma los resultados inferidos por las otras dos metodologías.

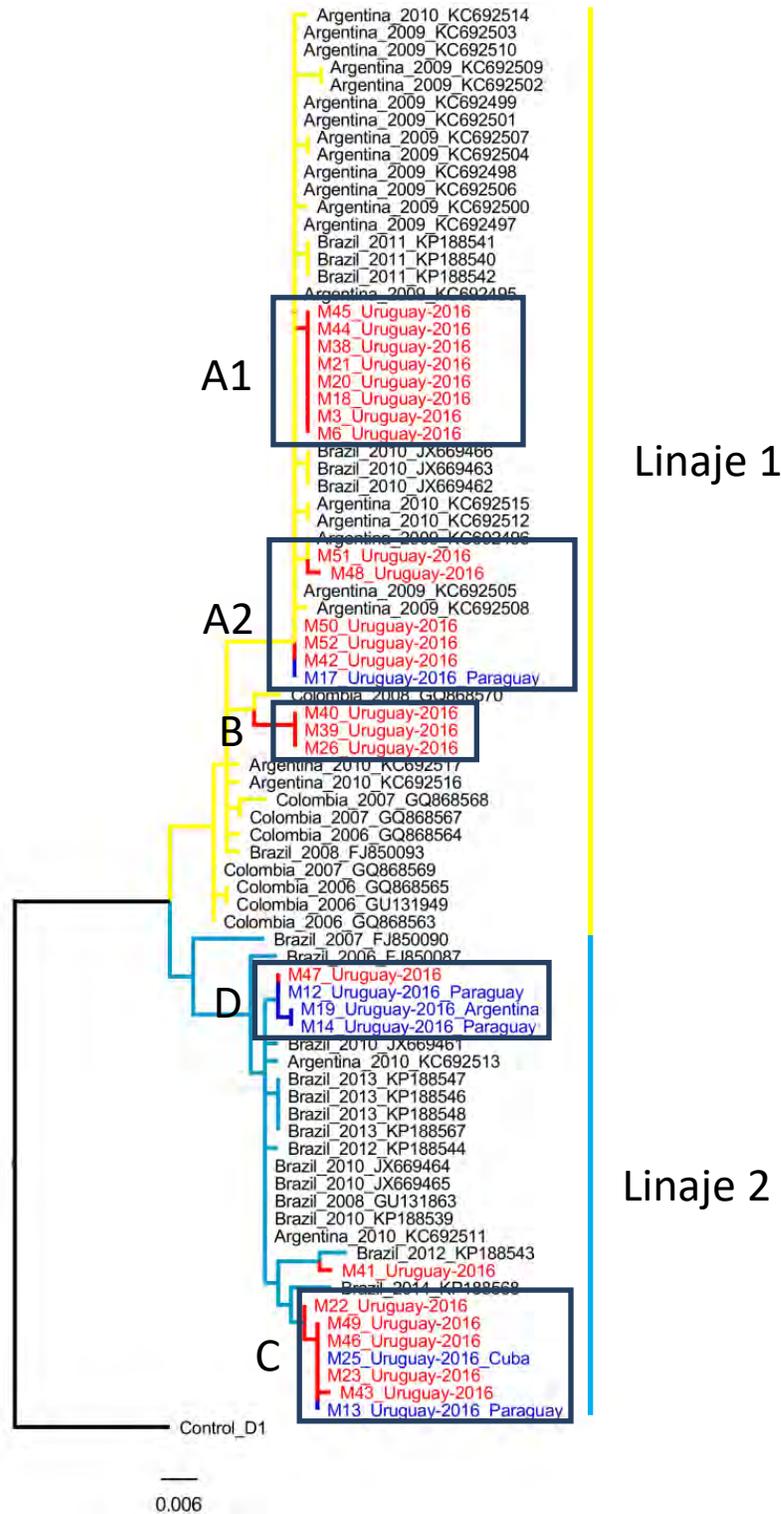


Figura 13. Análisis filogenético de cepas de DENV-1 aisladas en Uruguay. Se observa el árbol filogenético de máxima verosimilitud (modelo de sustitución nucleotídica GTR + Γ + I) obtenido a partir del análisis de la región C-preM. Se incluyeron todas las cepas aisladas en Uruguay en 2016, así como secuencias comparables de cepas sudamericanas. Como grupo externo se utilizó la secuencia del control positivo utilizado, correspondiente a la cepa *Hawaii*. Se distinguen los linajes 1 y 2, en amarillo y celeste, respectivamente. En rojo y azul se indican las cepas uruguayas derivadas de casos autóctonos e importados, respectivamente. Por efectos visuales no se incluyeron los valores de *bootstrap* que fueron superiores al 90% en los nodos principales.

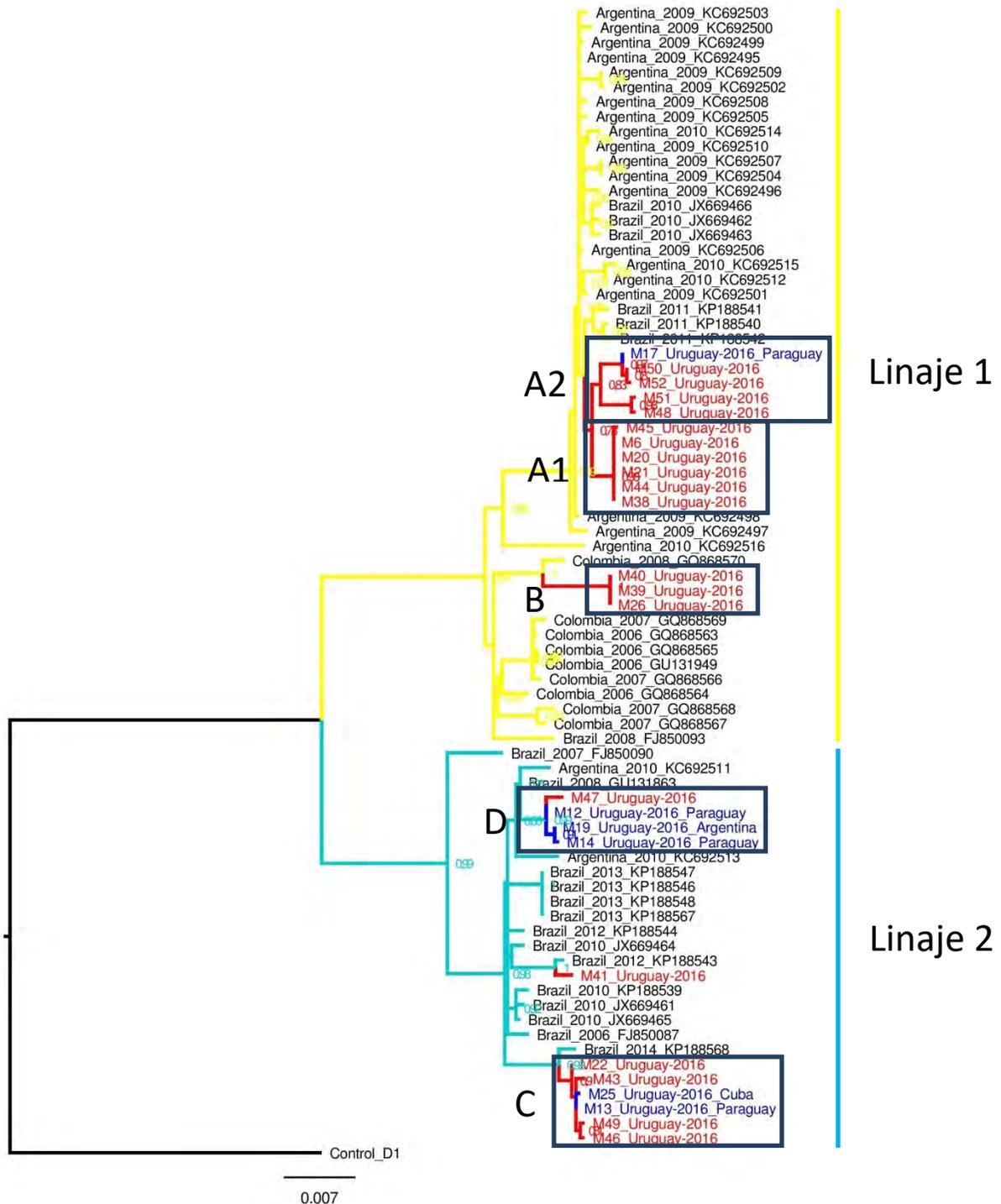


Figura 14. Análisis filogenético de cepas de DENV-1 aisladas en Uruguay. Se observa el árbol filogenético de máxima verosimilitud (modelo de sustitución nucleotídica GTR + Γ + I) obtenido a partir del análisis de la región codificante para las proteínas estructurales (C-prM-M-E). Se incluyeron todas las cepas aisladas en Uruguay en 2016 (a excepción de M3, M18, M23 y M42), así como secuencias comparables de cepas sudamericanas. Como grupo externo se utilizó la secuencia del control positivo utilizado, correspondiente a la cepa *Hawaii*. Se distinguen los linajes 1 y 2, en amarillo y celeste, respectivamente. En rojo y azul se indican las cepas uruguayas derivadas de casos autóctonos e importados, respectivamente.

En base a los patrones filogenéticos observados podemos interpretar que las variantes uruguayas de DENV-1 circulantes en 2016 presentan una notoria heterogeneidad genética. Si bien todas las cepas derivadas de casos autóctonos pertenecen al genotipo V de DENV-1, se pudo evidenciar la co-circulación temporal de variantes pertenecientes a los dos linajes actualmente presentes en las Américas. Asimismo, dentro de cada linaje encontramos que los diferentes representantes uruguayos se agrupan en clados diferenciales. De hecho, pudimos apreciar la co-circulación de variantes que se agrupan en al menos 4 sub-linajes distintos. De hecho, la filogenia obtenida a partir de los genes de proteínas estructurales nos confirma la asociación diferencial de la cepa M41 que tendría una historia evolutiva distinta de las demás variantes. Más aún, si observamos en detenimiento el clado más representativo (clado A), existe una identidad para estas regiones genómicas de 100% entre 8 variantes (M3, M6, M18, M20, M21, M38, M44 y M45), distinguiéndose de las demás cepas de este clado (M17, M42, M48, M50, M51 y M52). A efectos de interpretación de resultados diferenciaremos estos dos sub-grupos como clados A1 y A2, respectivamente.

Estas observaciones evidencian claramente que los casos de dengue registrados en 2016 fueron consecuencia de múltiples brotes epidémicos simultáneos. En algunos casos se puede hipotetizar el origen de las variantes autóctonas de diferentes casos importados. Por ejemplo, el clado A2 integra cepas con una estrecha relación filogenética con una cepa importada de Paraguay. Asimismo, el clado C incluye cepas relacionadas con variantes importadas de Cuba y Paraguay, que pudieron haber sido las responsables del ingreso de estas estirpes a nuestro país. Sin embargo, es muy difícil conjeturar el origen de las demás cepas uruguayas. Las variantes del clado B posiblemente puedan provenir de Colombia, ya que como se comentó anteriormente, una muestra derivada de un caso importado de aquel país no pudo ser caracterizada. Además, los patrones filogenéticos de las variantes de este sub-grupo (M26, M39 y M40) muestran una clara asociación con cepas colombianas. Asimismo, el clado D incluye una única cepa autóctona (M47) junto a cepas importadas de Argentina y Paraguay. La amplitud de este clado, así como el origen de las demás cepas restan por resolverse debido a la limitada cantidad de cepas disponibles. De todas formas, en base a información del MSP, este año hubo 41 casos importados documentados, por lo que un análisis más exhaustivo de otras cepas no consideradas podría proveer información importante para resolver estas cuestiones.

Desde su primer aislamiento en 1944 en Hawái, DENV-1 ha sido identificado como el agente causal de diversas epidemias en todo el mundo (GUBLER 1997). Debido a su alta tasa de mutación, este serotipo se encuentra diversificado en 5 (WEAVER and VASILAKIS 2009) o hasta 6 genotipos diferentes (PYKE *et al.* 2016), los que pueden diferir en sus niveles de transmisibilidad y virulencia (COLOGNA *et al.* 2005). A excepción de los genotipos II y III, reportados tiempo atrás en Sudeste asiático y actualmente extintos, los demás genotipos circulan en distintas regiones geográficas (RAGHWANI *et al.* 2011; VILLABONA-ARENAS and ZANOTTO 2011) (Figuras 10 y 11). En las Américas, desde el primer brote importante ocurrido en Jamaica y Cuba en 1977 (GUZMAN and KOURI 2003), DENV-1 ha circulado continuamente causando epidemias de dengue y dengue severo (SAN MARTÍN *et al.* 2010). El genotipo V ha sido el de mayor prevalencia en este continente, diversificándose en

diferentes linajes que han co-circulado en distintos países de Sudamérica, como Brasil (DOS SANTOS *et al.* 2011; CARNEIRO *et al.* 2012; DRUMOND *et al.* 2012; DE BRUYCKER-NOGUEIRA *et al.* 2015; CUNHA *et al.* 2016), Argentina (TITTARELLI *et al.* 2014) y Colombia (MENDEZ *et al.* 2010). Estudios filogeográficos recientes sugieren que las variantes de DENV-1 actualmente circulantes en las Américas provienen de India y habrían emergido en el Caribe a través de dos introducciones independientes ocurridas alrededor de 1970 y 1980, respectivamente (WALIMBE *et al.* 2014; DE BRUYCKER-NOGUEIRA *et al.* 2016; CUNHA *et al.* 2016).

En la actualidad existe una marcada diversificación de este genotipo en las Américas, distinguiéndose al menos dos linajes principales que co-circulan simultáneamente. Sorprendentemente, integrantes de estos dos linajes fueron aislados en Uruguay en su primera epidemia de dengue registrada desde 1916. Con el objetivo de profundizar en las características genéticas de estas variantes, se procedió a amplificar el genoma completo de diferentes cepas representativas de cada clado mencionado.

Para ello, a partir de los análisis filogenéticos realizados, seleccionamos cepas que representan a los distintos grupos genéticos responsables de los brotes registrados en Uruguay. De esta forma, elegimos las siguientes variantes: M6 (clado A1); M48 (clado A2); M39 (clado B); M22 (clado C); y M47 (clado D). Utilizamos el protocolo descrito por Christenbury y colaboradores que amplifica el genoma completo en 5 fragmentos solapados (CHRISTENBURY *et al.* 2010) (Figura 15).

Los diferentes fragmentos obtenidos fueron secuenciados en el *Institut Pasteur* de Paris, Francia, mediante el equipo *Illumina Genome Analyzer IIX*, en el Vignuzzi Lab (*Unité de Populations Virales et Pathogénèse, Viral Populations and Pathogenesis Unit, Institut Pasteur Paris, Francia*). La preparación de las librerías genómicas estuvo a cargo del Dr. Gonzalo Moratorio y del Dr. Fran Pérez Rodríguez. El procesamiento de los *reads* resultantes fue realizado por el Lic. Martín Sónora en el marco de su Tesis Maestría en Bioinformática. De esta forma obtuvimos las secuencias consenso de los genomas completos de cada variante uruguaya analizada, así como las frecuencias de nucleótidos en cada sitio (estas últimas no serán consideradas en el presente estudio). Se consideró especialmente la información resultante de los fragmentos 1, debido a que esta región contiene todos los genes que dan lugar a las proteínas estructurales de DENV-1 (Figura 15).



Figura 14. Esquema que resume los diferentes fragmentos solapantes amplificados para obtener los genomas completos de DENV-1. Las secuencias de los primers de amplificación y secuenciación utilizados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Se indican las secuencias de los primers reportadas (CHRISTENBURY *et al.* 2010) y las modificaciones realizadas en base a la comparación con cepas circulantes en la región sudamericana.

Primer	Primer reportado	Primer modificado	Posición
d1s1C-F1	5'-GATGAGGGGAGATGGGG AGTTGTTAGTCTACGTGGAC-3'	Sin modificaciones	0-20
d1a21	5'-CATYGCAATRAGRGTGCACAT-3'	Sin modificaciones	533-553
d1s3	5'-AAACGTTCCGTSGCACTGGC-3'	Sin modificaciones	704-723
d1a20	5'-CGTCTTCAAGAGTTCAATGTCC-3'	5'-CGTYTYAAGAGTTCAATGTCC-3'	1057-1078
d1s4	5'-TGTGTGTCGMCGAACGTT-3'	5'-TGTGTGTCGMCGRACGYT-3'	1204-1221
d1a19	5'-GTTTGTGGACRAGCCATGATT-3'	Sin modificaciones	1545-1565
d1s5	5'-GCAATGCACACYGCGTTG-3'	5'-GCAATGCAYACWGCGYTG-3'	1709-1726
d1a18	5'-AAAGGTGGYTCYGYTCAAT-3'	5'-AAAGGYGGITCTHGYTCAAT-3'	2033-2052
d1s6-F2	5'-GGYTCTATAGGAGGRGTTCAC-3'	5'-GGYTCTATAGGAGGRGTTCAC-3'	2201-2223
d1a17-F1	5'-CCAATGGCYGCTGAYAGTCT-3'	Sin modificaciones	2540-2559
d1s7	5'-GGCCCAAGGARAARAAATG-3'	Sin modificaciones	2710-2728
d1a16	5'-CARCTTCCARGTYTCGTCTT-3'	5'-CARCTTCCAGTYTCRTTCTT-3'	3035-3055
d1s8	5'-ACAACAGCAGGGCCRTGGCA-3'	5'-ACAACRGCAGGGCCRTGGCA-3'	3205-3225
d1a15	5'-GCATYTTTCTRCTCATCTGGATC-3'	Sin modificaciones	3546-3569
d1s9	5'-CCTAGCYTGTAGGTCYACTTT-3'	Sin modificaciones	3697-3717
d1a14	5'-CCGGAAGCCATGTTGTTT-3'	Sin modificaciones	4037-4055
d1s10-F3	5'-RGCYGGSCCACTAATAGCT-3'	Sin modificaciones	4213-4231
d1a13-F2	5'-TTCCACTTCYGGAGGGCT-3'	Sin modificaciones	4544-4561
d1s11	5'-AAGAGRCTGGAACCRAGYTGGGC-3'	Sin modificaciones	4706-4728
d1a12	5'-CCTCGTCCCTCAATCTCTGGTAG-3'	Sin modificaciones	5045-5066
d1s12	5'-AAATGGCAGAGGCCTCAAGGG-3'	5'-AAATGGCAGAGGCRTCAAGGG-3'	5211-5232
d1a11	5'-CRTAGCCTGARTTCCATGATCT-3'	Sin modificaciones	5546-5567
d1s13	5'-ACAAAAAAYAYGACTGGGACTAT-3'	5'-ACAAAAAAYAYGACTGGGAYTAY-3'	5711-5734
d1a10	5'-TCTCTCYGGCTCAAAGAGGG-3'	5'-TCTCTCYGGCTCAAARAGGG-3'	6042-6061
d1s14-F4	5'-ATGGRGAAAGGAACAACCAG-3'	5'-AYGGGAAAGGAACAACCAG-3'	6216-6235
d1a9-F3	5'-CCAGTYARCACAGCTATCAAAGC-3'	Sin modificaciones	6551-6573
d1s15	5'-GGATAGCGGCCTCYATCATACT-3'	Sin modificaciones	6687-6708
d1a8	5'-CAAGTCCCATCAATATAGCTGC-3'	5'-CAAGTCCCATCAATATRGCTGC-3'	7043-7064
d1s16	5'-GCAAARGCYACTAGAGAAGCTCAA-3'	Sin modificaciones	7208-7231
d1a7	5'-CCTACCTCTCTARAGATTTCA-3'	Sin modificaciones	7548-7570
d1s17	5'-GAAACRACYAAACAYGCAGTG-3'	Sin modificaciones	7718-7738
d1a6	5'-AGRACACGTAACGTTCTWCCTTC-3'	5'-ABRACACGTARCGTTCTICCTTC-3'	8045-8067
d1s18-F5	5'-CCACYCATGAAATGTAYTGGGT-3'	5'-CYACYCATGAAATGTAYTGGGT-3'	8211-8232
d1a5-F4	5'-GGRATRACATCCCATTGTTT-3'	Sin modificaciones	8558-8577
d1s19	5'-GCCARGTGTTATGGGGTTT-3'	5'-GCCARGTGTTATGGGGTTT-3'	8702-8721
d1a4	5'-CACTCCAAGTGAATCTCTCT-3'	Sin modificaciones	9068-9091
d1s20	5'-GGATGATCTTCAGAATGAGGC-3'	5'-GGATGAYCTYCAGAATGAGGC-3'	9202-9222
d1a3	5'-YACRCARTCATCTCCRCTGAT-3'	5'-YACRCARTCATCTCCRCTRAT-3'	9548-9568
d1s21	5'-TYATGAAGGATGGGAGGA-3'	5'-TYATGAARGATGGRAGRA-3'	9720-9738
d1a2	5'-DTCTTCCAACTGGAYACATG-3'	Sin modificaciones	10055-10075
d1s1	5'-TRGCTCCATCGTGGGGAT-3'	Sin modificaciones	10439-10456
d1a5B-F5	5'-TTGTCGGTCTGGGGGGTAT AGAACCTGTTGATTCAACRGC-3'	5'-TTGTCGGTCTGGGGGGTAT AGAACCTGTTGATTCAACAGC-3'	10715-10736

Con el fin de complementar la caracterización genética de las cepas de DENV-1 circulantes en Uruguay, se procedió a explorar las secuencias consenso de los genomas completos obtenidos. Se realizó un análisis filogenético utilizando el mismo conjunto de datos comparable que se utilizó en los abordajes previos. El árbol filogenético de máxima verosimilitud resultante se observa en la Figura 16. Los resultados obtenidos concuerdan con los análisis previamente discutidos, realizados con regiones genómicas parciales. Básicamente, se puede observar la discriminación de dos linajes diferentes dentro del genotipo V de DENV-1, concordando con resultados anteriores. Asimismo, se aprecian distancias filogenéticas claras entre las diferentes cepas consideradas, correspondientes los grupos genéticos aquí denominados como clados A1, A2, B, C y D.

Si bien mediante este análisis se obtiene una resolución filogenética mayor a la definición observada en los abordajes previos, la topología resultante es muy similar. Esto nos permite confirmar que las relaciones filogenéticas inferidas mediante las regiones parciales del gen NS5 y C-preM son adecuadas para caracterizar las diferentes variantes de DENV-1 en genotipos y linajes, demostrando la idoneidad de estas metodologías como herramientas de diagnóstico molecular.

Tomando estos resultados en su conjunto, podemos aseverar que las variantes circulantes en el brote de dengue de 2016 en Uruguay, corresponden a diferentes sub-grupos del genotipo V de DENV-1. En particular, se observan los dos linajes sugeridos por diferentes estudios previos, pese a que las variantes del clado B (26, 39 y 40) se categorizarían dentro de un tercer linaje si nos basamos en algunas clasificaciones (CARNEIRO *et al.* 2012). Este grupo genético está compuesto mayoritariamente por cepas colombianas, y tal como discutimos previamente, se puede conjeturar que las cepas uruguayas de este clado provengan de aquel país. De todas formas, la ausencia de datos epidemiológicos relevantes limitó nuestra interpretación de los patrones de diseminación de las diferentes cepas de DENV en nuestro país. Por ejemplo, distintos datos respecto a la ubicación geográfica y fecha de aislamiento de cada cepa podrían proveernos de información clave para realizar análisis filogeográficos en busca de interpretar las diferentes rutas de transmisión. Recientemente se publicó un estudio en el que se exploran los patrones espacio-temporales del genotipo V de DENV-1, basadas en Envolturas completas (DE BRUYCKER-NOGUEIRA *et al.* 2016). Debido a que en dicho análisis no se incluyen cepas de Uruguay ni Paraguay, los datos obtenidos en el presente estudio podrían contribuir a complementar nuestro entendimiento de las dinámicas de dispersión de este genotipo en las Américas. Por otra parte, en base a información difundida por la prensa, habrían ocurrido brotes simultáneos de dengue en dos barrios de Montevideo (Pocitos y Malvín Norte), así como casos aislados en otros Departamentos. Para poder interpretar cuáles fueron las variantes causantes de cada brote requeriríamos contar con estos datos epidemiológicamente esenciales.

Con el objetivo de caracterizar antigénicamente las cepas de DENV-1 uruguayas, investigamos las diferentes sustituciones aminoacídicas presentes en sus diferentes proteínas estructurales, en particular, en la glicoproteína de superficie (E). La Tabla 6 resume los diferentes sitios aminoacídicos donde se observan diferencias entre las variantes uruguayas. Como se puede apreciar, existen varios sitios en los que se aprecian modificaciones que están conservadas entre los distintos linajes.

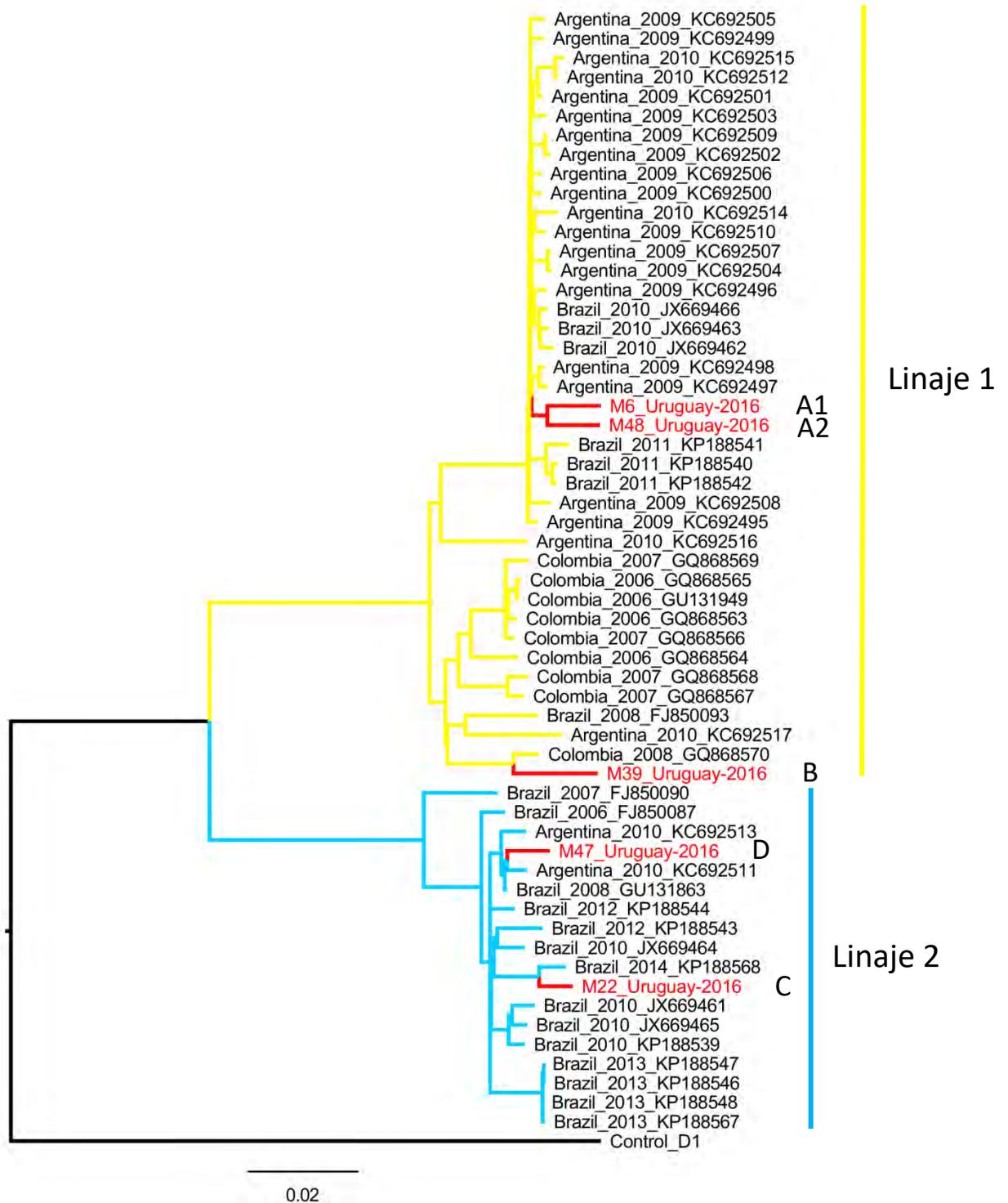


Figura 16. Análisis filogenético de cepas de DENV-1 aisladas en Uruguay. Se observa el árbol filogenético de máxima verosimilitud (modelo de sustitución nucleotídica GTR + Γ + I) obtenido a partir del análisis del ORF completo. Las cepas aisladas en Uruguay cuyos genomas completos fueron determinados se incluyen en rojo. Las demás secuencias corresponden a cepas sudamericanas con genoma completo. Se distinguen los linajes 1 y 2, en amarillo y celeste, respectivamente. A efectos visuales no se incluyeron los valores de *bootstrap* que fueron superiores a 80% en los nodos principales.

Tabla 6: Sustituciones aminoacídicas presentes en las proteínas estructurales de cepas de uruguayas.

		90	95	143	203	236	252	502	515	605	609	618	641	674	708	716
	Linaje/ Clado	C ₉₀	C ₉₅	prM ₂₉	prM ₈₉	M ₃₁	M ₄₇	E ₂₂₂	E ₂₃₅	E ₃₂₅	E ₃₂₉	E ₃₃₈	E ₃₆₁	E ₃₉₄	E ₄₂₈	E ₄₃₆
M6	1/A1	S	M	A	E	R	L	S	D	K	T	S	K	R	V	V
M3	1/A1	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M18	1/A1	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M20	1/A1
M21	1/A1
M38	1/A1
M44	1/A1
M45	1/A1
M17	1/A2	F
M42	1/A2	.	.	.	-	-	F
M50	1/A2	F
M52	1/A2	F
M48	1/A2	F	T
M51	1/A2	F	T
M26	1/B	.	.	.	D	A	.	.	K	.	.
M39	1/B	.	.	.	D	A	.	.	K	.	.
M40	1/B	.	.	.	D	A	.	.	K	.	.
M13	2/C	.	I	V	D	K	L	.	K	L	I
M25	2/C	.	I	V	D	K	L	.	K	L	I
M22	2/C	.	I	V	D	K	L	.	K	L	I
M23	2/C	.	I	V	-	-	L	.	K	L	I
M43	2/C	.	I	V	D	K	L	.	K	L	I
M46	2/C	.	I	V	D	K	L	.	K	L	I
M49	2/C	.	I	V	D	K	L	.	K	L	I
M41	2/C	N	I	V	D	K	L	.	K	L	I
M12	2/D	.	I	V	D	K	.	.	E	R	.	L	R	K	L	I
M14	2/D	.	I	V	D	K	.	.	E	R	.	L	R	K	L	I
M19	2/D	.	I	V	D	K	.	.	E	R	.	L	R	K	L	I
M47	2/D	.	I	V	D	K	.	.	E	R	.	L	R	K	L	I

Los números hacen referencia a la posición del aminoácido en la poliproteína y en las proteínas estructurales correspondientes. Se resaltan en celeste los sitios informativos que discriminan entre linajes 1 y 2. Los puntos marcan concordancia en el aminoácido y los guiones denotan ausencia de información en esos sitios. Las cepas M3, M18, M23 y M42 no pudieron amplificarse completamente. Se resaltan en rojo y azul, las cepas derivadas de casos autóctonos e importados, respectivamente. A: Alanina; D: Ác. Aspártico; E: Ác. Glutámico; I: Isoleucina; K: Lisina; L: Leucina; M: Metionina; R: Arginina; S: Serina; T: Treonina; V: Valina.

Las secuencias aminoacídicas de las diferentes proteínas estructurales de variantes de DENV-1 uruguayas se encuentran conservadas entre los distintos miembros de cada clado, pero difieren claramente al compararse representantes de diferentes clados. Existen sustituciones que diferencian las variantes de ambos linajes. En particular, en el sitio 95 de la Cápside (C₉₅) observamos la sustitución M→I, en relación a los linajes 1 y 2, respectivamente. Asimismo, se aprecian cambios en la prM (A29V), M (R31K) y E (S338L; V428L y V436I). Estas modificaciones se conservan entre todos los miembros analizados de cada linaje y reflejan una firma aminoacídica en cada grupo genético mencionado. Asimismo, a lo largo de todo el genoma, se aprecian 35 sustituciones aminoacídicas que distinguen ambos linajes. Estas modificaciones ocurren en todos los genes de DENV-1 (Tabla Suplementaria 1). El análisis correspondiente a estas sustituciones se plantea como una perspectiva de esta tesis.

Con respecto a las sustituciones observadas en E, 2 de ellas ocurren en la Hélice 2 de la región *Stem* (S) (Figura 17). Estas sustituciones (V428L y V436I) distinguen a los miembros de los linajes 1 y 2. En base a la interpretación de la funcionalidad de H2, región donde ocurren ambas modificaciones, se puede conjeturar que ambas sustituciones podrían ser complementarias para mantener la estructura de la hélice α . De hecho, la comparación de variantes uruguayas, así como de otras representantes sudamericanas, indica que la presencia de una Valina en el sitio 428 se asocia con otra Valina en la posición 436 del dominio S (Figura 17). De igual forma, las variantes que tienen una Leucina en 428, presentan una Isoleucina en 436 (Figura 17). La estabilización de esta hélice es fundamental para el proceso de fusión que media la internalización del virión a la célula del hospedero, como se resume en la Figura 17 (KLEIN *et al.* 2013). Ambas modificaciones suplantando un aminoácido hidrofóbico por otro de las mismas características fisicoquímicas pero con un grupo lateral de mayor tamaño (Figura 18). Se puede evidenciar que las modificaciones ocurren en la región de la α hélice que se ubica asociada a la membrana lipídica, por lo que se trata de aminoácidos clave en la asociación entre el ectodominio y la membrana lipídica viral.

Por otra parte, observamos la sustitución R394K, que se ubica en el último sitio del dominio III (Figuras 17 y 18). A partir de allí se originan las dos hélices α correspondientes a la región S, que asocian el ectodominio al dominio carboxi-terminal transmembrana (TM) de anclaje (Figura 17). El hecho de que este aminoácido se ubique a la altura de la membrana lipídica viral (Figura 18) indica que esta modificación puede ser relevante en la estabilidad de la misma. De todas formas, se requerirá un análisis más profundo considerando estas tres sustituciones en el contexto de diferentes disposiciones de la glicoproteína. Este análisis fue realizado con base en la disposición madura de la E, donde se asocia de forma homodimérica (Figura 19). Es entonces preciso investigar las interacciones de estos aminoácidos en sus diferentes estados de madurez, especialmente en sus disposiciones trimérica (endosomal) e inmadura (intracelular) (Figuras 8 y 17). Estos objetivos se plantean como perspectivas a investigarse luego de esta tesis.

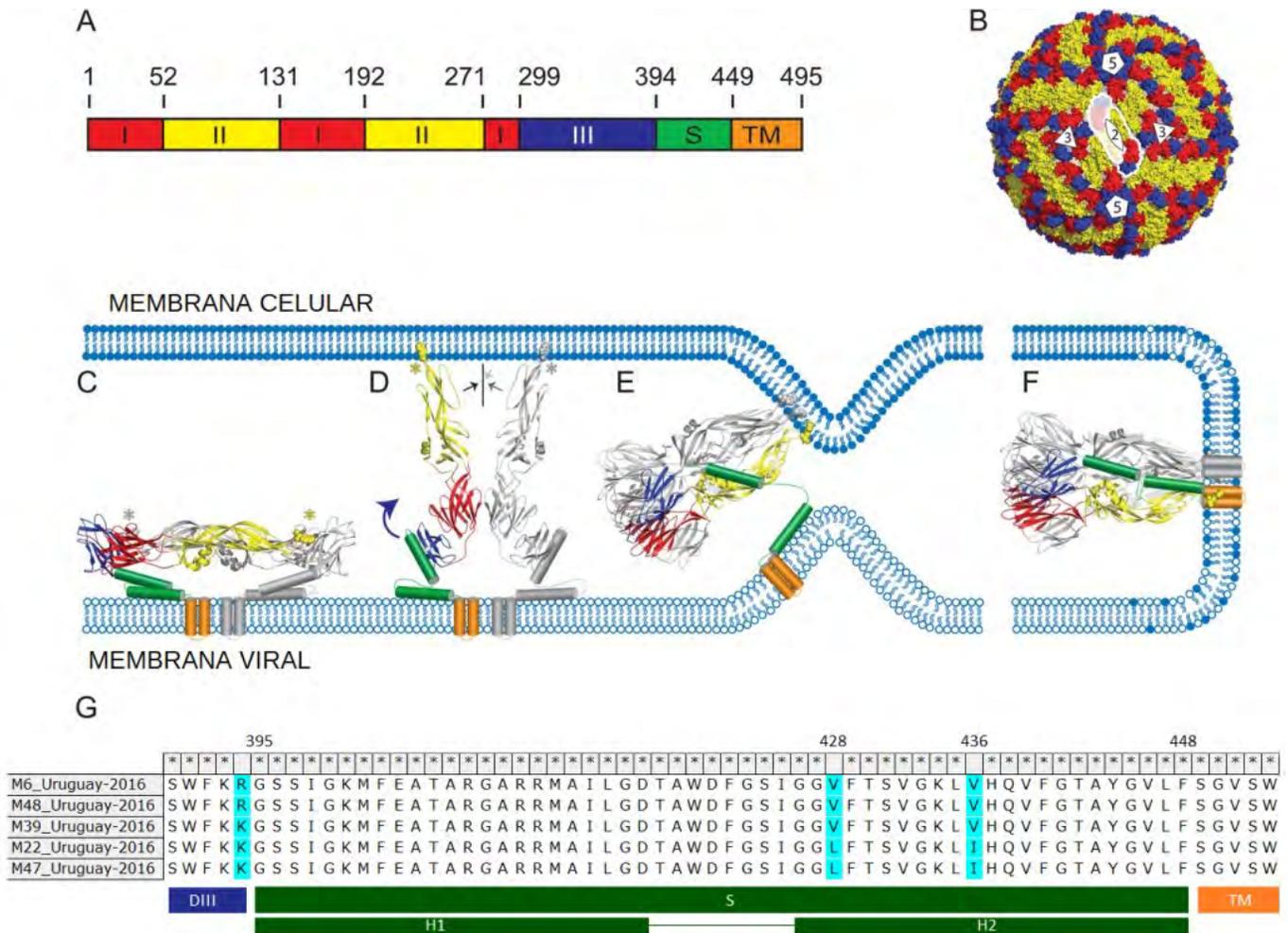


Figura 17. Envoltura (E) de DENV. (A) Representación lineal, mostrando la distribución de la cadena polipeptídica en sus tres dominios (I a III), que se indican en rojo, amarillo y azul, respectivamente. El dominio III conduce a dos hélices α (S de *Stem*, en verde) que asocian la región extracelular al dominio carboxi-terminal transmembrana (TM). (B) Superficie del virión maduro compuesto por 90 monómeros de E dispuestos en homodímeros. (C a F) **Esquema del proceso de fusión.** (C) El dímero se encuentra plano sobre la membrana viral en el estado de pre-fusión, con los bucles de fusión (asteriscos) enterrados entre los dímeros. Los dos tallos helicoidales (en verde) se encuentran contra la membrana. (D) El pH bajo hace que el dímero se disocie y los monómeros se proyecten hacia afuera, asociándose los bucles de fusión con la membrana celular. El dominio III se repliega y se asocia con del dominio I, estabilizando un trímero. Las flechas indican que los *loops* de fusión de del dominio II de 3 monómeros se unen en esa conformación trimérica. (E) La hélice 1 (H1) se asocia entre los dominios II mientras que la hélice 2 (H2) se mantiene asociada a TM. (F) H1, H2 atraviesan a lo largo al dominio II, uniendo el anclaje TM y el *loop* de fusión, completando la fusión de membranas y la formación de poros. (G) Secuencia aminoacídica de H1 y H2 de variantes uruguayas de DENV-1. Se señalan en celeste las sustituciones aminoacídicas presentes en cada una de ellas, distinguiéndose los residuos característicos de los linajes 1 y 2 del genotipo V en H2. Figura modificada de (KLEIN et al. 2013).

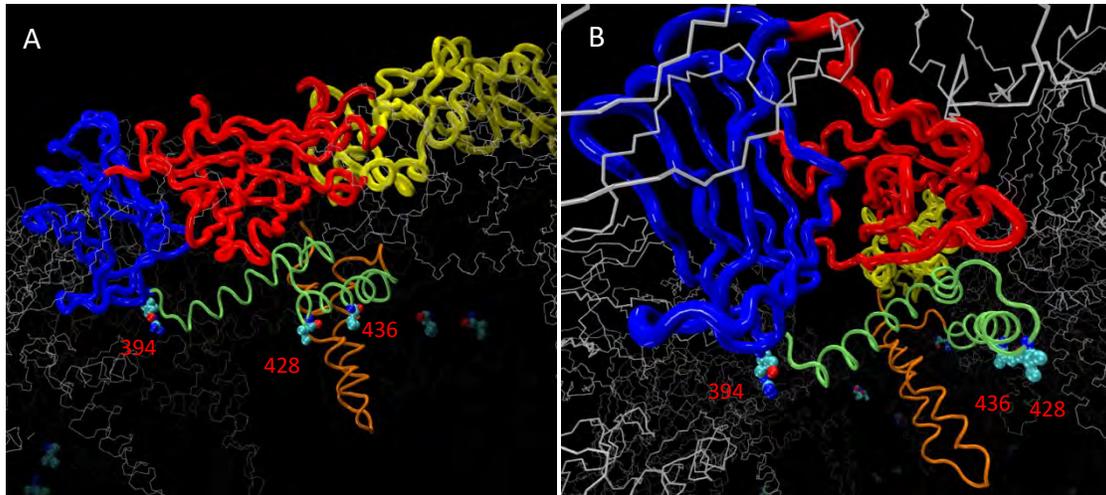


Figura 18. Mapeo de las sustituciones aminoacídicas en los sitios 394, 428 y 436 de la glicoproteína E. Se utilizó como molde la estructura tridimensional comparable con mejor resolución atómica, perteneciente a una variante de DENV-2 (PDB ID: 3J27) determinada por criomicroscopía electrónica (ZHANG *et al.* 2013). Se utilizó el mismo código de colores de la Figura 17. En (A) y (B) se observan dos perspectivas diferentes, donde la región transmembrana (en naranja) se ubica a la altura de la membrana lipídica viral (ver Figura 17).

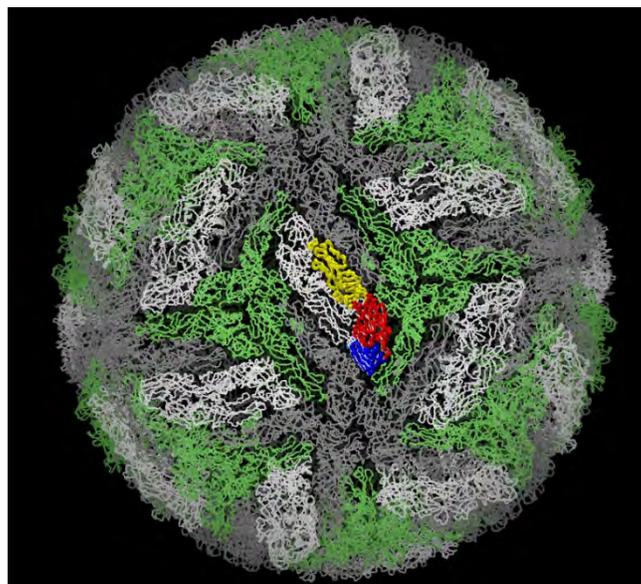


Figura 19. Modelado de la estructura de DENV. Se utilizó como molde para el modelado por homología la estructura comparable con mejor resolución atómica, perteneciente a una variante de DENV-2 (PDB ID: 3J27) determinada por criomicroscopía electrónica (ZHANG *et al.* 2013). Los dominios I, II y III de la glicoproteína E se indican en rojo, amarillo y azul, respectivamente.

Como se aprecia en la Tabla 6, la mayoría de las sustituciones aminoacídicas ocurren en el dominio III de E. Se trata del principal blanco de anticuerpos neutralizantes contra los diferentes serotipos de DENV. Es por esta razón que presenta una gran variabilidad genética, por lo que la caracterización de este dominio es suficiente para distinguir precisamente entre variantes de ambos linajes, obteniendo relaciones filogenéticas comparables con la del genoma completo (DE BRUYCKER-NOGUEIRA *et al.* 2015). Asimismo, las sustituciones que ocurren en este dominio suelen ser muy relevantes, pudiendo alterar sus características inmunogénicas y modificar su patogenicidad, así como determinar la especificidad de receptores, tipo de vectores y tropismo celular (CHEN *et al.* 1996; MANDL *et al.* 2000; CRILL and ROHRIG 2001; GONCALVEZ *et al.* 2002; NAYAK *et al.* 2009; THAI *et al.* 2012; CARNEIRO *et al.* 2012; DRUMOND *et al.* 2012; DE BRUYCKER-NOGUEIRA *et al.* 2015). Entre las modificaciones observadas, una de ellas distingue las cepas de los linajes 1 y 2. Se trata de un cambio no conservativo en el sitio 338 que modifica un aa polar neutro (Serina) por uno hidrofóbico (Leucina). Esta sustitución ha sido previamente observada entre los linajes 1 y 2 (DRUMOND *et al.* 2012; DE BRUYCKER-NOGUEIRA *et al.* 2015; CUNHA *et al.* 2016). Sin embargo su relevancia no ha sido investigada hasta el momento.

Por otra parte, algunos de estos cambios ocurren en sitios previamente reconocidos en regiones expuestas del ectodominio en epitopes de neutralización. En particular observamos que todas las cepas del clado B presentan la sustitución T329A (Figura 20). Estudios recientes en modelos murinos evidenciaron la emergencia de variantes que escaparon a la neutralización por parte del anticuerpo DENV1-E106, que neutraliza los 5 genotipos de DENV-1. Estas cepas únicamente presentaron la modificación T329A, que les confirió resistencia a este anticuerpo (SHRESTHA *et al.* 2012). Los otros aminoácidos mapeados (K325R y K361R) también se encuentran expuestos en la superficie por lo que se puede especular que puedan estar implicados en modificaciones de las características antigénicas. De todas formas, todas las modificaciones observadas serán sujetas a un análisis más exhaustivo posterior a esta tesis.

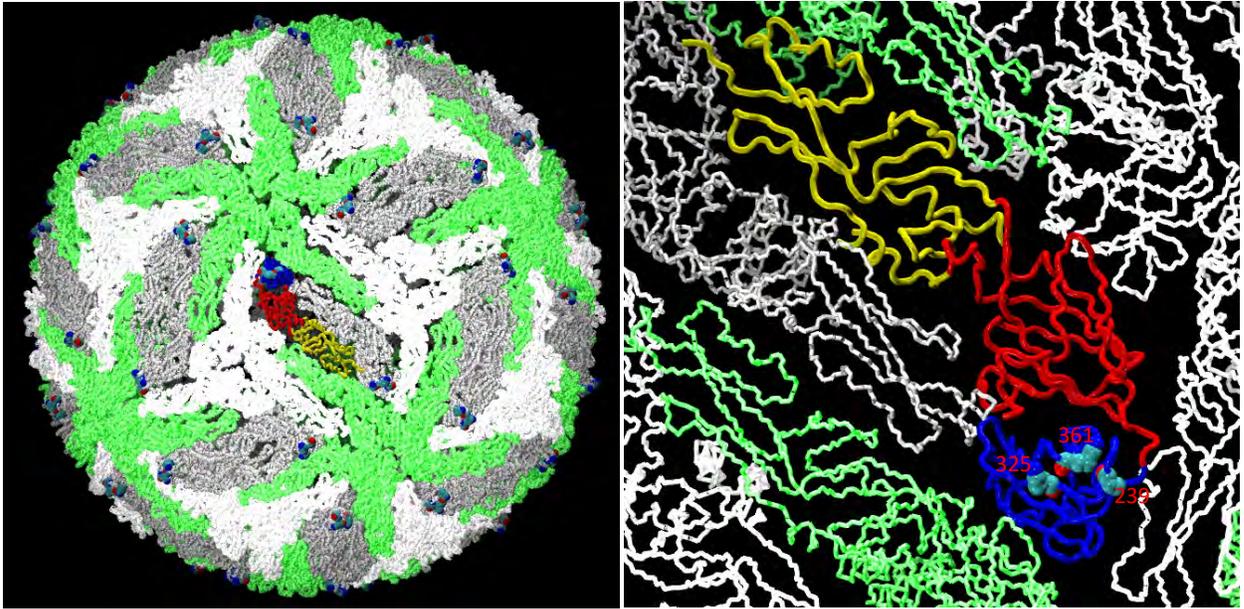


Figura 20. Mapeo de sustituciones aminoacídicas en el dominio III de la Envoltura de DENV. (A) Modificaciones observadas en el contexto de la estructura viral madura. **(B)** Enfoque en el homodímero de E. Se indican las sustituciones K325R, T329A y K361R.

CONCLUSIONES

En el presente estudio investigamos la variabilidad genética y antigénica de las variantes responsables de la primera epidemia de dengue reportada en el Uruguay desde 1916. Si bien los diferentes conjuntos de secuencias generados permiten distintos grados de resolución filogenética, todos ellos, así como los análisis de sustituciones aminoacídicas, concuerdan en la co-circulación de diferentes linajes del genotipo V de DENV-1 en el país. Este hecho es notoriamente llamativo si consideramos que de los 26 casos autóctonos confirmados, nuestros análisis de 23 de ellos evidenciaron la introducción y posterior diseminación de al menos 5 clados genéticos de distintos linajes. Se puede deducir de estas observaciones que nuestro país es más permeable de lo pensado al ingreso de variantes de DENV, así como a la generación de ciclos de transmisión locales que promuevan la ocurrencia de brotes epidémicos. Esto nos debe alertar sobre la posible emergencia de otros arbovirus circulantes en la región y transmitidos por el mismo vector, como ZIKV o CHIKV. La caracterización de una variante importada de DENV-4 evidencia aún más este punto. Asimismo, la identificación de variantes importadas de distintos países del continente demuestra la naturalidad de los procesos de dispersión de DENV, que son fundamentales para la introducción de nuevas variantes y la generación de epidemias. Estos estudios revelan la importancia de realizar una vigilancia molecular continua contra DENV, así como contra otros arbovirus potencialmente emergentes.

CAPÍTULO 3: VIRUS ZIKA

RESUMEN

El virus zika (ZIKV) es un arbovirus perteneciente al género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*), estrechamente relacionado desde el punto de vista evolutivo con los DENV, YFV y WNV. ZIKV permaneció oculto, confinado a ciclos de transmisión enzoótica en África y Asia, hasta la ocurrencia del primer brote importante en humanos en Micronesia en 2007. Brotes epidémicos de creciente incidencia se produjeron subsecuentemente en la Polinesia Francesa, otras Islas del Pacífico Sur y finalmente en las Américas. Esta última epidemia, con una incidencia sin precedentes, reveló la asociación de la infección por ZIKV con la ocurrencia de malformaciones congénitas severas y trastornos autoinmunes, lo que desencadenó una preocupación generalizada debido a su potencial como amenaza para la salud pública mundial. Diversos datos serológicos, entomológicos y epidemiológicos sugieren que la diversificación genética y geográfica de ZIKV puede estar significativamente subestimada. En el presente capítulo discutiremos diferentes mecanismos moleculares y procesos evolutivos que han promovido la emergencia y dispersión de ZIKV en las Américas. La sección introductoria tiene como base una revisión bibliográfica recientemente publicada (FAJARDO *et al.* 2016b), que se adjunta en el Anexo II.

INTRODUCCIÓN

El virus Zika (ZIKV) es un arbovirus perteneciente a la serocomplejo Spondweni del género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*). ZIKV está estrechamente relacionado con los DENV, YFV y WNV (KUNO *et al.* 1998). Aunque la actividad enzoótica de ZIKV ha sido observada en varias ocasiones en diferentes regiones de África y Asia, solo recientemente se han reportado brotes importantes en humanos, en particular durante la actual epidemia americana (HADDOW *et al.* 2013b). Debido a su alta variabilidad, gran adaptabilidad a vectores y hospederos, así como a su asociación con enfermedades neurológicas y malformaciones congénitas, ZIKV se ha convertido en uno de los mayores retos para la salud pública mundial.

EPIDEMIOLOGÍA

ZIKV fue detectado por primera vez en 1947 en monos Rhesus (*Macaca mulatta*), durante una rutina de vigilancia de fiebre amarilla en el bosque Zika, en Uganda, donde un año más tarde fue aislado de un *pool* de mosquitos *Aedes africanus* (DICK *et al.* 1952). La primera enfermedad humana relacionada con ZIKV se informó en 1954 en Nigeria (MACNAMARA 1954). La actividad enzoótica de ZIKV fue observada posteriormente en diversas ocasiones en diferentes regiones de África y Asia, pero solo se reportaron 14 casos humanos hasta 2007 (FAYE *et al.* 2014), cuando se registró el primer brote importante de ZIKV en la Isla de Yap (Micronesia), que afectó al 73% de los residentes mayores de 3 años (DUFFY *et al.* 2009). Más tarde, en 2013, se desencadenó un gran epidemia en la Polinesia Francesa con alrededor de 30.000 casos sintomáticos que incluyeron fiebre baja, erupción maculopapular, artralgia y conjuntivitis (MUSSO *et al.* 2014). Este evento dio lugar a diversos brotes registrados en diferentes Islas del Pacífico como Nueva Caledonia, Islas Salomón, Islas Cook, Fiyi, Samoa, Vanuatu y la Isla de Pascua (CAO-LORMEAU *et al.* 2014; DUPONT-ROUZEYROL *et al.* 2015; MUSSO and GUBLER 2016). En marzo de 2015, se reportó la circulación de ZIKV en Salvador, Brasil (ZANLUCA *et al.* 2015; CAMPOS *et al.* 2015), extendiéndose rápidamente a lo largo de las Américas con la ocurrencia de casos autóctonos en 40 países de este continente para el 7 de julio de 2016 (PAHO 2016).

Las infecciones por ZIKV en humanos son principalmente asintomáticas, provocando en algunos pacientes una enfermedad febril leve, autolimitada, que puede acompañarse de otros síntomas clínicos, tales como erupciones cutáneas, artralgia o conjuntivitis (SIMPSON 1964). Este fue el cuadro clínico habitual hasta la epidemia de 2013 en la Polinesia Francesa, donde se asoció la infección por ZIKV con complicaciones neurológicas graves. Datos epidemiológicos de este brote indicaron un aumento del 2000% en la incidencia de casos con síndrome de Guillain-Barré (GBS) (OEHLER *et al.* 2014), así como reportes de meningoencefalitis (CARTEAUX *et al.* 2016) y mielitis aguda (MÉCHARLES *et al.* 2016). Casos de GBS también se asociaron con infecciones por ZIKV durante la actual epidemia en las Américas en al menos 12 países (DIRLIKOV *et al.* 2016; PAHO 2016; ROZÉ *et al.* 2016; DOS SANTOS *et al.* 2016). Además, este brote coincidió tanto temporal como

geográficamente con un marcado aumento en el número de niños nacidos con microcefalia y otras malformaciones del SNC (VENTURA *et al.* 2016; SCHULER-FACCINI *et al.* 2016). En julio de 2016, 1.638 casos de síndrome congénito asociado a la infección por ZIKV fueron confirmados en Brasil, con casos reportados de este trastorno en Colombia, El Salvador, Guayana Francesa, Martinica, Panamá, Puerto Rico y Estados Unidos (PAHO 2016).

Estudios retrospectivos posteriores también revelaron una mayor incidencia de malformaciones cerebrales congénitas en recién nacidos durante el brote de la Polinesia Francesa de 2013 (CAUCHEMEZ *et al.* 2016; BESNARD *et al.* 2016). La asociación entre la infección por ZIKV y la ocurrencia de defectos congénitos está fuertemente apoyada por evidencia acumulativa, que incluye la detección de ARN de ZIKV, partículas virales y/o antígenos virales en placenta, líquido amniótico y tejidos fetales, siendo estos últimos estudios realizados en fetos con microcefalia, abortados o con muerte neonatal (RASMUSSEN *et al.* 2016; OLIVEIRA MELO *et al.* 2016; SARNO *et al.* 2016; MARTINES *et al.* 2016; MEANEY-DELMAN *et al.* 2016; MLAKAR *et al.* 2016; CALVET *et al.* 2016; LADHANI *et al.* 2016). Por otra parte, en un estudio reciente se detectó la presencia de anticuerpos IgM anti-ZIKV en el líquido cefalorraquídeo de 30 de 31 recién nacidos con microcefalia, lo que sugiere fuertemente una infección congénita con ZIKV (CORDEIRO *et al.* 2016). Además, recientes experimentos han demostrado que ZIKV es capaz de infectar las células progenitoras neurales humanas, atenuando su crecimiento (TANG *et al.* 2016; HUGHES *et al.* 2016; LI *et al.* 2016; NGUYEN *et al.* 2016).

Como se discutió previamente, hasta el año 2007 nuestro conocimiento de ZIKV se restringía a limitados casos confirmados en África y Asia. Sin embargo, sobre la base de estudios entomológicos, epidemiológicos y de seroprevalencia, se puede deducir que la incidencia, prevalencia y dispersión de ZIKV han sido significativamente subestimadas (MUSSO and GUBLER 2016). Estudios serológicos en humanos sugieren que ZIKV podría ser endémico en la mayor parte de África y el Sudeste de Asia (SMITHBURN 1952, 1954; DICK *et al.* 1952; HAMMON *et al.* 1958; POND 1963; FAGBAMI 1979a; PETERSEN *et al.* 2016), aunque es importante señalar que la especificidad de las técnicas serológicas utilizadas es incierta debido a la significativa reactividad cruzada existente entre diferentes Flavivirus (LAZEAR and DIAMOND 2016). Esta circulación silenciosa puede deberse al hecho de que la mayoría de las infecciones por ZIKV son asintomáticas, y las manifestaciones clínicas son generalmente leves y pueden confundirse con otras infecciones por arbovirus, lo que da lugar a un importante sub-registro a causa de diagnósticos erróneos (HADDOW *et al.* 2012). Por ejemplo, los individuos infectados por ZIKV en el brote de Micronesia de 2007 fueron inicialmente diagnosticados con dengue (LANCIOTTI *et al.* 2008; DUFFY *et al.* 2009). Este hecho se repite en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales donde otras enfermedades con síntomas no específicos como el dengue o el chikungunya son endémicas (NHAN and MUSSO 2015). Además, ZIKV no se considera usualmente en ensayos de diagnóstico de rutina, por lo que se asume que un número considerable de casos permanecen indetectados. Recientemente, en base a análisis retrospectivos, se reveló una amplia distribución de ZIKV en Tailandia (BUATHONG *et al.* 2015), como fue sugerido previamente por la confirmación de casos importados de viajeros que regresaron a distintos puntos desde aquel país (TAPPE *et al.* 2014; FONSECA *et al.* 2014). Asimismo,

se han reportado numerosos casos importados de turistas que visitaron diferentes Islas del Pacífico Sur y Asia, lo que revela que la circulación de ZIKV permanece silenciosa en diferentes países de esta región geográfica (KORHONEN *et al.* 2016; DENG *et al.* 2016; ZHANG *et al.* 2016).

TRANSMISIÓN

La circulación de ZIKV ocurre principalmente en ciclos de transmisión enzoóticos, que involucran mosquitos del género *Aedes* (A.) y primates no humanos (DARWISH *et al.* 1983; HAYES 2009; FAYE *et al.* 2014). Varias especies de mosquitos han sido vinculadas con ciclos selváticos en África y Asia, especialmente *A. africanus* (HADDOW *et al.* 1964; DIALLO *et al.* 2014; BERTHET *et al.* 2014), así como otros *Aedes spp.* como *A. opok* (BERTHET *et al.* 2014), *A. apicoargentus* (MCCRAE and KIRYA 1982), *A. luteocephalus* (CORNET *et al.* 1979a; FAGBAMI 1979b), *A. taylori* (MARCHETTE *et al.* 1969), *A. vittatus*, *A. furcifer* y *A. aegypti formosus* (AKOUA-KOFFI *et al.* 2001; DIALLO *et al.* 2014). ZIKV también fue aislado de otras especies de mosquitos, incluyendo *A. dalzieli*, *A. hirsutus*, *A. unilineatus*, *A. metallicus*, así como de *Anopheles coustani*, *Mansonia uniformis*, y *Culex perfuscus* (DIALLO *et al.* 2014). En estos ciclos selváticos, los humanos y otros mamíferos pueden actuar como ocasionales hospederos finales o *dead-end hosts* (KENNEY and BRAULT 2014). Asimismo, se han detectado anticuerpos contra ZIKV en diversos vertebrados, incluidos búfalos, elefantes, hipopótamos, impalas, leones, ovejas, cabras, roedores, ñus y cebras (DARWISH *et al.* 1983; HADDOW *et al.* 2012). Si bien la transmisión biológica de los arbovirus depende en gran medida de la viremia en los hospedadores vertebrados, se ha observado que bajo ciertas condiciones los vectores pueden infectarse al alimentarse simultáneamente del mismo hospedero junto con otros vectores infectados, incluso cuando no se alcanzan niveles de virus detectables en el vertebrado (JONES *et al.* 1987). Este tipo de transmisión, denominada transmisión no virémica, es más probable que ocurra entre las garrapatas ya que normalmente se alimentan en grupos (LABUDA *et al.* 1993; JONES *et al.* 1997), aunque también existen reportes de dicho mecanismo en virus transmitidos por mosquitos, como WNV (HIGGS *et al.* 2005; MCGEE *et al.* 2007). Por lo tanto, la relevancia de diferentes vertebrados en la epidemiología de ZIKV no puede despreciarse, ya que pueden jugar un papel importante en su mantenimiento y dispersión, independientemente de si están o no involucrados en su ciclo natural de transmisión (KUNO and CHANG 2005b).

Los humanos infectados accidentalmente pueden potencialmente actuar como hospederos naturales en ciclos urbanos, en caso de presentar una viremia alta y sostenida en el tiempo (KUNO and CHANG 2005b; DUFFY *et al.* 2009). Para que este escenario se presente se requiere la acción de vectores puente que vinculen estos dos ciclos de transmisión ecológicamente distintos. En este sentido, existen trabajos en los que se han investigado las preferencias alimenticias de diversas especies de mosquitos, con el fin de evaluar su potencial como vectores puente de diferentes arbovirus (KADDUMUKASA *et al.* 2015). *A. vittatus* ha sido sugerido como responsable de vincular ambos ciclos de ZIKV en África (DIALLO *et al.* 2014). Por otra parte, se reportó la implicancia de *A. albopictus* en la alternancia de ciclos de DENV en Asia (VASILAKIS *et al.* 2011; HANLEY *et al.* 2013),

por lo que es probable que pueda desempeñar el mismo papel con ZIKV. Esta hipótesis se apoya además en datos experimentales y epidemiológicos que sugieren la adaptabilidad de *A. albopictus* para transmitir ZIKV (WONG *et al.* 2013; CHOUIN-CARNEIRO *et al.* 2016; DI LUCA *et al.* 2016), tal como se observó en un brote ocurrido en Gabón en 2007 (GRARD *et al.* 2014). Sin embargo, el principal vector responsable de la transmisión de ZIKV en ciclos urbanos es *A. aegypti*, que ha tenido un papel protagónico en la mayor parte de los brotes reportados, incluida la presente epidemia americana (BOORMAN and PORTERFIELD 1956; MARCHETTE *et al.* 1969; CORNET *et al.* 1979b; OLSON *et al.* 1981; LI *et al.* 2012; WEAVER *et al.* 2016). Tanto *A. aegypti* como *A. albopictus* son mosquitos antropofílicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales, y son vectores competentes para otros arbovirus de importancia médica como DENV, YFV y CHIKV (MUSSO and GUBLER 2016). De todas formas vale destacar que otras especies de mosquitos, como *A. hensilli* y *A. polynesiensis*, han sido respectivamente responsable de los brotes epidémicos de ZIKV ocurridos en la Isla de Yap en 2007 (LEDERMANN *et al.* 2014) y en la Polinesia Francesa (2013-2014) (MUSSO *et al.* 2014), lo que sugiere que no se debe descartar el potencial rol de otras *Aedes spp.* como vectores adicionales.

Aunque la principal ruta de transmisión de ZIKV es a través de mosquitos, los recientes brotes en el Pacífico Sur y las Américas dejaron al descubierto otros modos de transmisión biológica. Particularmente llamó la atención la elevada incidencia de casos de microcefalia en recién nacidos, lo que reveló la posibilidad de ocurrencia de transmisión materno-fetal durante el embarazo. Como se comentó anteriormente, existe fuerte evidencia acumulativa que apoya la transmisión trans-placentaria. Asimismo, la transmisión perinatal del ZIKV también ha sido reportada desde la epidemia de 2013 en la Polinesia Francesa (BESNARD *et al.* 2014). Además, estudios recientes han demostrado que el ARN de ZIKV puede encontrarse en el semen 62 y 93 días después de la aparición de los síntomas, aunque la infectividad del virus no fue comprobada en estos casos (ATKINSON *et al.* 2016; MANSUY *et al.* 2016). Esta observación se correlaciona con la cantidad de casos de transmisión sexual que han sido reportadas recientemente (MUSSO *et al.* 2015; DECKARD *et al.* 2016; VENTURI *et al.* 2016; HILLS *et al.* 2016; TURMEL *et al.* 2016; D'ORTENZIO *et al.* 2016b; FRANK *et al.* 2016). Asimismo, estudios recientemente publicados describieron el primer caso de transmisión sexual de mujer a hombre (DAVIDSON *et al.* 2016). A pesar de que estudios recientes sugieren que existe una baja probabilidad de que la transmisión sexual promueva epidemias de ZIKV (YAKOB *et al.* 2016), estos hallazgos indican que esta vía de transmisión puede contribuir a la dispersión de ZIKV en mayor medida que lo inicialmente imaginado.

VARIABILIDAD GENÉTICA DE ZIKV

El genoma de ZIKV consiste en una cadena simple de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 10,794 kb de longitud. Contiene un único marco abierto de lectura que codifica para una poliproteína que es clivada por proteasas virales y celulares, generando tres proteínas estructurales (cápside (C), precursora de la membrana (M) y envoltura (E)) y siete proteínas no

estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (KUNO and CHANG 2007). La diversidad genética de ZIKV ha sido investigada mediante numerosos análisis filogenéticos en los que se analizaron tanto regiones genómicas parciales como completas (LANCIOTTI *et al.* 2008; HADDOW *et al.* 2012; FAYE *et al.* 2014; ENFISSI *et al.* 2016; SHEN *et al.* 2016; FARIA *et al.* 2016; WANG *et al.* 2016; FAJARDO *et al.* 2016a; GONG *et al.* 2016). En base a análisis realizados con secuencias del ORF completo, se ha observado que la alta tasa de error de la ARN polimerasa ARN dependiente ha conducido a ZIKV a evolucionar en dos grupos genéticos diferentes, conocidos como linajes Africano y Asiático-Americano (Figura 21) (HADDOW *et al.* 2012; ENFISSI *et al.* 2016; FARIA *et al.* 2016).

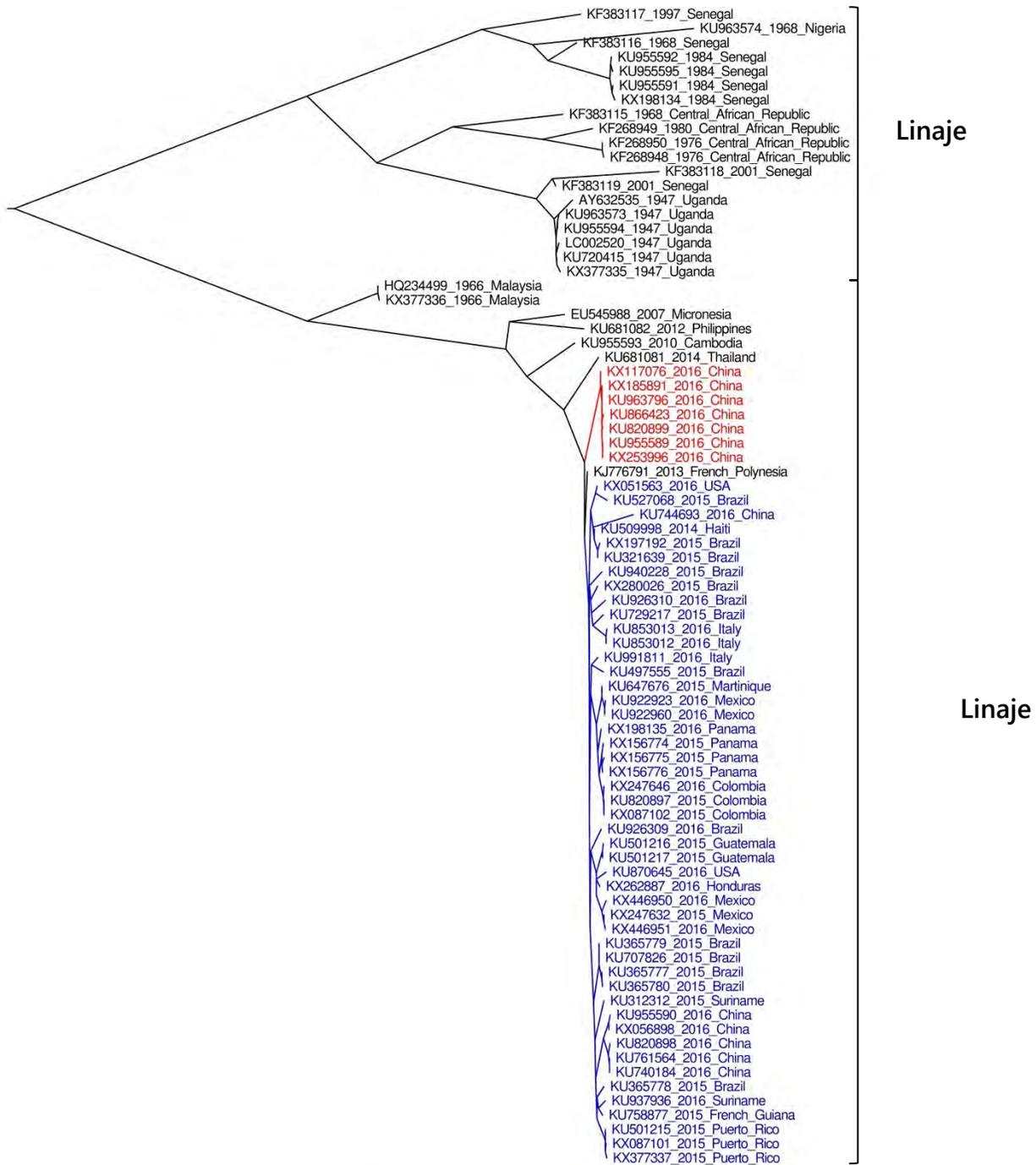


Figura 21. Análisis filogenético de máxima verosimilitud de todas las secuencias disponibles del ORF completo de ZIKV. Se aprecian las relaciones filogenéticas inferidas a partir del análisis de todas las variantes de ZIKV cuyo ORF completo está disponible. Se utilizó el programa *PhyML* (GUINDON *et al.* 2005) bajo el modelo de sustitución nucleotídica GTR + Γ + I, con 500 pseudo-réplicas de *bootstrap* como medida de robustez para cada nodo. Se obtuvieron valores de soporte >90% en los nodos principales pero no se indican para mejorar la visualización. El árbol resultante se editó con el programa *FigTree* v.1.4.2 (disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk>). Las secuencias se indican por su número de acceso, año y país de aislamiento. Se señalan las secuencias derivadas de variantes aisladas durante la presente epidemia americana (en azul) y a partir de casos importados de Fiji y Samoa (en rojo) (DENG *et al.* 2016; ZHANG *et al.* 2016).

El linaje Africano comprende cepas aisladas en Burkina Faso, República Centroafricana, Costa de Marfil, Gabón, Senegal y Uganda, y puede ser dividido en dos sub-linajes como se ha sugerido por aproximaciones filogenéticas restringidas a los genes NS5 (LANCIOTTI *et al.* 2008) y E (FAYE *et al.* 2014). Con base en estudios filodinámicos, Faye y colaboradores estimaron que el ancestro común más reciente de todas las cepas de ZIKV reportadas circuló alrededor de 1920 en Uganda, desde donde se dispersó hacia África Occidental, y posteriormente hacia Malasia, dando origen al linaje Asiático (actualmente Asiático-Americano) (FAYE *et al.* 2014). Este grupo genético es el mejor caracterizado hasta el momento, especialmente luego de la epidemia actual en la que se obtuvieron diversas secuencias de genoma completo. Este linaje agrupa cepas ancestrales de Malasia (1966) con variantes aisladas en Micronesia (2007), Camboya (2010), Filipinas (2012), Tailandia (2014) y todas las cepas reportadas en la presente epidemia americana (Figura 21, en azul), que están estrechamente relacionadas con variantes del brote de 2013 ocurrido en la Polinesia Francesa. Estudios recientes indican que las cepas de ZIKV circulantes en las Américas se generaron a partir de una única introducción al continente de variantes que circularon en la Polinesia Francesa entre Agosto del 2013 y Junio del 2014 (FARIA *et al.* 2016; FAJARDO *et al.* 2016a). Esta observación se correlaciona con los patrones filogenéticos obtenidos, en los que se aprecia al clado americano enraizado en esta variante de Polinesia Francesa (Figura 21). Sin embargo, siete cepas recientemente aisladas de turistas chinos que visitaron las Islas Fiyi y Samoa (Figura 21, en rojo), comparten una historia evolutiva diferente, lo que revela que las actuales epidemias que tienen lugar en las Américas y en las Islas del Pacífico Sur son consecuencia de la circulación de variantes de dos sub-linajes distintos (DENG *et al.* 2016; ZHANG *et al.* 2016). En este sentido, estudios recientes indican que estas cepas importadas comparten con las variantes americanas un ancestro que circuló alrededor de Mayo del 2013 (FAJARDO *et al.* 2016a), concordando temporalmente con el período en el cual circuló el ancestro de todas las variantes americanas (FARIA *et al.* 2016). Estos hallazgos indican que las cepas ancestrales que emergieron en la Polinesia Francesa en 2013 siguieron dos rutas evolutivas diferentes, dando origen a dos sub-linajes contemporáneos que circulan respectivamente en las Américas y el Pacífico Sur, lo que sugiere que la diversificación genética y geográfica de ZIKV puede estar notoriamente subestimada (FAJARDO *et al.* 2016a).

Lamentablemente, no hay secuencias disponibles del ORF completo de otras cepas aisladas en las Islas del Pacífico Sur, lo que limita nuestra interpretación de los patrones evolutivos, diversidad y patogenicidad de las variantes de ZIKV actualmente circulantes. De hecho, la escasez de secuencias de genoma completo ha sido una de las principales limitantes históricas para explorar en detalle las relaciones filogenéticas de las variantes de ZIKV y su distribución espacio-temporal. En este sentido, reportes recientes han sugerido que otro grupo genético (linaje Africano II), se evidencia al deducir las relaciones filogenéticas mediante el análisis de secuencias de los genes E y NS5 (Figura 22) (SHEN *et al.* 2016; GONG *et al.* 2016). Este clado agrupa una variante de Costa de Marfil de 1980 y seis cepas aisladas en Senegal entre 1998 y 2001 (FAYE *et al.* 2014). Asimismo, este clado sería basal a los linajes Africano y Asiático-Americano, lo que sugiere una diversificación genética y geográfica de ZIKV aún mayor (SHEN *et al.* 2016). Esta hipótesis se apoya además en estudios realizados por Gong y colaboradores en los que se estimó una distancia genética de 0.212

s/s entre secuencias del gen E de dos aislados contemporáneos de Senegal, que pertenecen al linaje Africano y Africano II, respectivamente. De acuerdo a las tasas evolutivas del orden de 10^{-3} s/s/a recientemente estimadas (FARIA *et al.* 2016; FAJARDO *et al.* 2016a), ZIKV habría estado circulando en África desde hace más de 100 años (GONG *et al.* 2016). Por consiguiente, la caracterización genética de variantes de este linaje proporcionaría información esencial para investigar el origen, la dispersión geográfica y la diversidad genética de ZIKV.

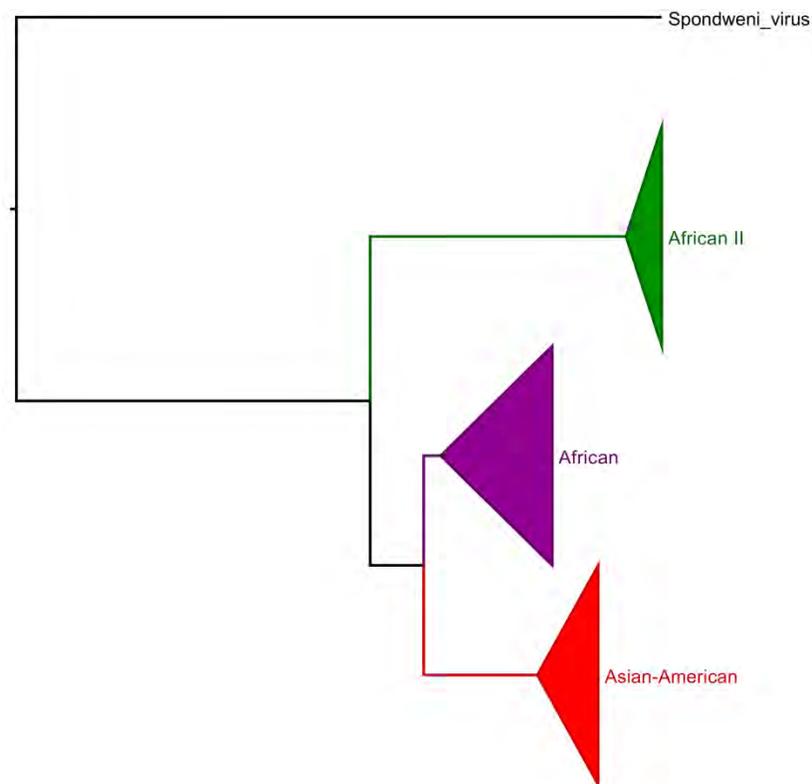


Figura 22. Esquema de la diversidad genética de ZIKV. Árbol de máxima verosimilitud indicando los tres linajes que se evidencian al analizar todas las secuencias disponibles del gen E de variantes aisladas en diferentes regiones geográficas. Se observa el linaje Africano II (en verde) enraizando a los linajes Africano (violeta) y Asiático-Americano (rojo).

POTENCIAL DE DISPERSIÓN DE ZIKV

La emergencia y dispersión de ZIKV en las Américas nos recuerda a la ruta previamente seguida por otros arbovirus, como DENV y CHIKV, que fueron detectados por primera vez en África, y posteriormente se extendieron hacia Asia y América. Este patrón de migración se asocia con la capacidad de adaptabilidad de ZIKV a vectores urbanos, como *A. aegypti*, lo que permite su expansión hacia ambientes humanos. Una característica general que comparten diferentes

arbovirus es su alta tasa de mutación, que les proporciona la posibilidad de explorar diferentes cambios fenotípicos en su continuo proceso evolutivo para adaptarse a los diferentes vectores y hospedadores (KUNO and CHANG 2005b). Por ejemplo, un único cambio aminoacídico en su glicoproteína de superficie le permitió a CHIKV cambiar su vector competente a *A. albopictus* (TSETSARKIN *et al.* 2007). Por consiguiente, las modificaciones genéticas juegan un papel importante en la adaptación de los arbovirus a diferentes hospederos y vectores, como ha sido reportado además en DENV (MESSER *et al.* 2003a; BENNETT *et al.* 2010) y WNV (MALKINSON *et al.* 2002; MOUDY *et al.* 2007; BRAULT *et al.* 2007).

Las recientes epidemias ocurridas en el Pacífico Sur y el continente americano revelaron la asociación sin precedentes de ZIKV con casos de SGB y microcefalia, lo que condujo al planteo de diferentes hipótesis para explicar esta emergencia. Es probable que como consecuencia de diferentes cambios genéticos, el linaje Asiático ancestral haya evolucionado en cepas epidémicas mejor adaptadas a los humanos, dando lugar a infecciones con niveles de viremia más altos, promoviendo la transmisión trans-placentaria y modulando cambios en el tropismo celular (WEAVER *et al.* 2016; MUSSO and GUBLER 2016). En este sentido, análisis recientes han sugerido un sesgo en el uso de codones de ZIKV, incrementando su *fitness* en humanos (FREIRE *et al.* 2015; RUSSELL 2016; CRISTINA *et al.* 2016b). Esta hipótesis está apoyada por la explosiva diversificación que se observa entre los aislados recientes (Figura 21), lo que revela la dispersión de ZIKV en una gran población inmunológicamente *naïve* (WEAVER *et al.* 2016). También se ha planteado la hipótesis de que las malformaciones congénitas y los trastornos inmunológicos registrados puedan tratarse de eventos de baja frecuencia en infecciones por ZIKV, que quedaron revelados debido a la magnitud de los recientes brotes (MUSSO and GUBLER 2016). Por otra parte, estudios recientes han sugerido que anticuerpos anti-DENV pre-existentes podrían potenciar la infección por ZIKV a través de un mecanismo de estimulación dependiente de anticuerpos (*ADE* o *Antibody-dependent enhancement*), de forma similar a lo que ocurre en las infecciones secundarias de DENV (PAUL *et al.* 2016; DEJNIRATTISAI *et al.* 2016). Si esto se confirma tendría una enorme implicancia en la patogénesis de la enfermedad, teniendo en cuenta que las actuales epidemias están ocurriendo en regiones donde la mayoría de la población ya ha sido expuesta a DENV. Este mecanismo de potenciación de la infección, sumado a la capacidad de adaptabilidad de ZIKV a vectores/hospederos, a la amplia distribución de mosquitos competentes y a las inusuales rutas de transmisión no vectoriales observadas, pueden ayudar a interpretar las razones de esta explosiva emergencia repentina de ZIKV en las Américas y su potencial de propagarse hacia otras regiones geográficas.

Objetivo Específico IV: Investigar los patrones evolutivos de ZIKV.

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO TEÓRICO

Desde su emergencia en Brasil, ZIKV disparó una epidemia con una amplitud sin precedentes, expandiéndose rápidamente por todo el continente americano. Estudios filogeográficos recientes estimaron que dicho brote se originó a partir de una única introducción de ZIKV en las Américas. La misma se habría producido entre mayo y diciembre de 2013, más de 12 meses antes de su primera detección en Brasil. Asimismo, se evidenció que este lapso temporal coincide con un aumento en la frecuencia de vuelos hacia Brasil, provenientes de diferentes Islas del Pacífico donde se registraban brotes de enfermedad causados por este agente viral (FARIA *et al.* 2016). La situación epidemiológica hizo que en mayo de 2016 la Organización Mundial de la Salud expresara su preocupación acerca de la posibilidad de que ZIKV se continuara propagando por el resto de las Américas, así como hacia otros continentes (GULLAND 2016). Estudios detallados del modo de evolución de ZIKV son de suma importancia para la comprensión de la emergencia y dispersión de sus poblaciones. Con el objetivo de investigar estas cuestiones, se realizaron análisis bayesianos de coalescencia utilizando Cadenas de Markov mediante la simulación Monte Carlo (MCMC). Se analizaron todas las variantes de ZIKV con genoma completo, incluyendo cepas aisladas de casos de microcefalia. La publicación derivada de este estudio se adjunta en el Anexo II (FAJARDO *et al.* 2016a).

TEORÍA DE COALESCENCIA

La teoría de la coalescencia establece que todos los genes o alelos en una población determinada son heredadas de un ancestro único y compartido por todos los miembros de la población, conocido como el ancestro común más reciente (MRCA) (KINGMAN 2000). Las relaciones de herencia entre alelos son generalmente representados como una genealogía de genes, de forma similar a un árbol filogenético. Esta genealogía genética es también conocida como el coalescente. La comprensión de las propiedades estadísticas de la coalescencia bajo diferentes supuestos es la base de la teoría de coalescencia. El coalescente ejecuta modelos de la deriva génica hacia atrás en el tiempo y permite reconstruir la historia evolutiva de una población viral (HARVEY 1996).

La teoría básica de coalescencia asume que los genes no sufrieron procesos de recombinación y modela la deriva génica como un proceso estocástico conocido como un proceso de Markov (FELSENSTEIN 2006). Debido a que el proceso de fijación de genes debido a la deriva génica es un componente crucial de la teoría de coalescencia, es muy útil cuando el locus genético en estudio no está bajo selección natural. Esta teoría es una extensión natural del concepto clásico de

genética de poblaciones de la evolución neutral y es una aproximación al modelo de Fisher-Wright para grandes poblaciones. Se han realizado importantes contribuciones al desarrollo de la teoría de coalescencia, que permitieron la incorporación de variaciones en el tamaño de la población, recombinación y selección, así como también la inclusión de prácticamente cualquier modelo de evolución arbitrariamente complejo o modelos demográficos en el análisis de genética de poblaciones (KAPLAN *et al.* 1988; HUDSON 1991; DONNELLY and TAVARÉ 1995; NEUHAUSER and KRONE 1997; SLATKIN 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

SECUENCIAS

Todas los genomas completos disponibles de ZIKV fueron descargados de la base de datos nucleotídica GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), procediéndose luego a su alineamiento mediante el algoritmo ClustalW (THOMPSON *et al.* 1994) implementado en el programa MEGA6 (TAMURA *et al.* 2013). Posteriormente se eliminaron las regiones no codificantes en los extremos 5' y 3', dejando únicamente la secuencias codificantes de la poliproteína viral, de 10.269 nucleótidos. Los nombres de las cepas, sus números de acceso y lugar de aislamiento se indican en la Tabla 7.

EVALUACIÓN DE LA SEÑAL TEMPORAL

La hipótesis del reloj molecular postula que las especies evolucionan a una tasa evolutiva constante. Por ende, la distancia genética entre dos organismos va a ser proporcional al tiempo de divergencia de los mismos a partir del ancestro común más reciente (ZUCKERKANDL 1987). Con el objetivo de investigar la señal temporal y qué tan bien se ajusta el conjunto de secuencias utilizado a la hipótesis del reloj molecular (*clock-likeness*), se utilizó el programa *TempEst* v1.5 (anteriormente denominado *Path-O-Gen*) (RAMBAUT *et al.*).

ANÁLISIS DE COALESCENCIA

Con el objetivo de investigar la tasa evolutiva y el modo de evolución de las cepas de ZIKV circulantes en las Américas, se utilizó una aproximación bayesiana utilizando Cadenas de Markov mediante la simulación Monte Carlo (MCMC), implementada en el paquete BEAST v.1.8.0 (DRUMMOND and RAMBAUT 2007). Las cepas incluidas en estos análisis se detallan en la Tabla 7. En primer lugar, se identificó el modelo evolutivo óptimo para el conjunto de datos a analizar mediante el servidor Datamonkey (DELPORT *et al.* 2010), utilizando los criterios de información de Akaike y la prueba de la razón de verosimilitud jerárquica (AIC y HLRT). Utilizando este modelo evolutivo (GTR + Γ) y 40 millones de generaciones de MCMC, se testearon diferentes modelos poblacionales: tamaño poblacional constante; crecimientos poblacionales exponencial, expansional y logístico; y *Bayesian Skyline*. La incertidumbre estadística de los datos se refleja por la densidad de probabilidad mayor a 95% y la convergencia fue evaluada por valores de ESS (tamaño efectivo de muestreo) superiores a 200. Los resultados fueron examinados utilizando el programa TRACER v1.6 (disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). Este mismo programa fue utilizado para comparar los resultados obtenidos mediante diferentes modelos poblacionales, mediante el cálculo del factor de Bayes (DRUMMOND *et al.* 2006) (disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Modelcomparison>). Posteriormente se generó el árbol de máxima credibilidad de clados (MCC) utilizando el programa TreeAnnotator v1.8.0 (del paquete BEAST) y se editó el mismo mediante el programa FigTree v1.4.2 (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

Tabla 7: Orígenes de las cepas analizadas.

Nombre	País	Año	Número de Acceso
Yap/Micronesia/2007.4548	Micronesia	2007	EU545988
FSS13025/Cambodia/2010.5014	Camboya	2010	KU955593
CPC-0740/Philippines/2012.3552	Filipinas	2012	KU681082
H_FP_2013/French Polynesia/2013.9096	Polinesia Francesa	2013	KJ776791
Haiti/1225/Haiti/2014.9507	Haití	2014	KU509998
SV0127-14/Thailand/2014.5479	Tailandia	2014	KU681081
ZikaSPH2015/Brazil/2015.0200	Brasil	2015	KU321639
BeH818995/Brazil/2015.5534	Brasil	2015	KU365777
BeH819015/Brazil/2015.5589	Brasil	2015	KU365778
BeH819966/Brazil/2015.6712	Brasil	2015	KU365779
BeH815744/Brazil/2015.3780	Brasil	2015	KU365780
ZKV2015/Brazil/2015.9151	Brasil	2015	KU497555
NataIRGN/Brazil/2015.5014	Brasil	2015	KU527068
SSABR1/Brazil/2015.4987	Brasil	2015	KU707826
BeH823339/Brazil/2015.8821	Brasil	2015	KU729217
BeH828305/Brazil/2015.4192	Brasil	2015	KU729218
Bahia07/Brazil/2015.4986	Brasil	2015	KU940228
FLR/Colombia/2015.9562	Colombia	2015	KU820897
103344/Guatemala/2015.9178	Guatemala	2015	KU501216
8395/Guatemala/2015.8356	Guatemala	2015	KU501217
MRS_OPY_Martinique_PaRi.9562	Martinica	2015	KU647676
PRVABC59/Puerto Rico/2015.9205	Puerto Rico	2015	KU501215
Z1106033/Suriname/2015.8383	Surinam	2015	KU312312
Rio-U1/Brazil/2016.0384	Brasil	2016	KU926309
Rio-S1/Brazil/2016.0795	Brasil	2016	KU926310
GD01/China/2016.1257	China	2016	KU740184
GDZ16001/China/2016.1175	China	2016	KU761564
GZ01/China/2016.1230	China	2016	KU820898
ZJ03/China/2016.1315	China	2016	KU820899
SZ01/China/2016.1257	China	2016	KU866423
Z16006/China/2016.1284	China	2016	KU955589
Z16019/China/2016.1562	China	2016	KU955590
SZ-WIV01/China/2016.1257	China	2016	KU963796
PD1/Dominican Republic/2016.0877	República Dominicana	2016	KU853012
PD2/Dominican Republic/2016.0877	República Dominicana	2016	KU853013
FB-GWUH-2016/Guatemala/2016.0904	Guatemala	2016	KU870645
InDRE/Lm/Mexico/2016.1530	México	2016	KU922923
InDRE/Sm/Mexico/2016.1530	México	2016	KU922960
Brazil/2016/INMI1/2016.1803	Italia	2016	KU991811

EVALUACIÓN DE LA SEÑAL TEMPORAL

Con el objetivo de testear el ajuste de las secuencias nucleotídicas a la hipótesis del reloj molecular, se realizó un árbol de máxima verosimilitud (modelo evolutivo GTR + Γ), comparándose secuencias completas del linaje Asiático-Americano de ZIKV, obtenidas desde 2007 en adelante (Tabla 7). Se agregó además la secuencia nucleotídica correspondiente a la única variante asiática con genoma completo que está ausente de este conjunto de datos (cepa ZIKV/Aedessp./MYS/P6-740/1966, aislada en Malasia en 1966). En base a este árbol filogenético (Figura 23), se evaluó su señal temporal mediante el programa *TempEst* v1.5.



Figura 23. Árbol de máxima verosimilitud generado con todas las cepas de ZIKV con genoma completo pertenecientes al linaje Asiático-Americano. Las diferentes variantes se indican por su nombre, país de aislamiento y año expresado en formato decimal.

Como se aprecia en la Figura 24, existe una fuerte correlación entre la fecha de muestreo de cada secuencia y la distancia genética desde la raíz del árbol filogenético (coeficiente de correlación 0.9937). En consecuencia, podemos aseverar que las secuencias utilizadas se ajustan a la hipótesis del reloj molecular, por lo que el *dataset* es ideal para llevar a cabo análisis filodinámicos.

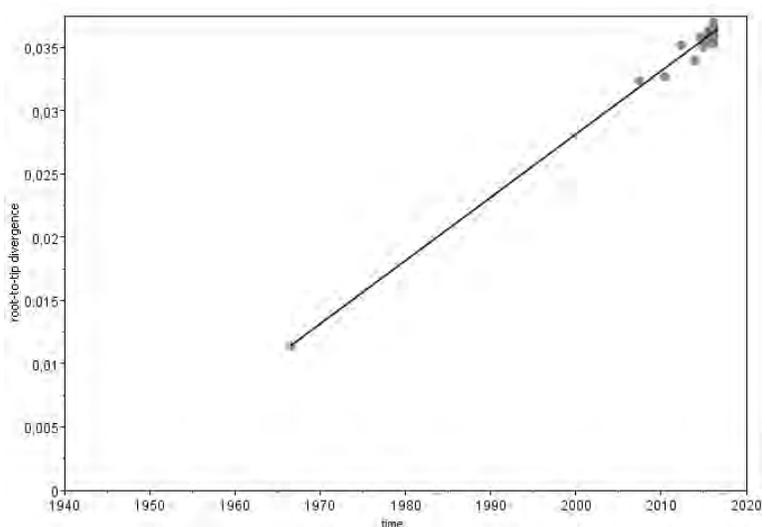


Figura 24. Evaluación de la señal temporal. Se aprecia la regresión lineal entre la distancia genética existente entre las cepas de ZIKV analizadas y sus años de aislamiento.

ANÁLISIS DE COALESCENCIA

Los resultados del análisis realizado para inferir los patrones evolutivos de las cepas de ZIKV actualmente circulantes en las Américas se resumen en la Tabla 8. Los mismos derivan del análisis de regiones codificantes completas de ZIKV a través de 40 millones de generaciones de MCMC, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica GTR + Γ , un reloj molecular estricto y el modelo poblacional *Bayesian Skyline*.

La tasa evolutiva media se estimó en 1.20×10^{-3} sustituciones nucleotídicas por sitio por año (s/s/a) para las cepas de ZIKV pertenecientes al linaje Asiático-Americano. Sus relaciones filogenéticas inferidas con escala temporal son resumidas en un árbol de MCC (Figura 25). Tanto las variantes de ZIKV que emergieron en América Latina en 2015, como las aisladas en 2016, se encuentran estrechamente relacionados con la única variante disponible del brote de 2014 en la Polinesia Francesa, concordando con estudios recientes (Musso 2015). Dentro de este grupo genético se evidencia la presencia de varias cepas aisladas en China en 2016 (Figura 25, en rojo). Curiosamente, otras variantes aisladas en China se observan conformando un clado diferente al de las demás cepas americanas (Figura 25, en azul), revelando la co-circulación temporal de dos sub-linajes de ZIKV diferentes. Las estirpes aisladas de casos de microcefalia en 2015 y 2016 no son idénticas y se agrupan en diferentes ramas del clado latinoamericano (Figura 25, en verde).

Tabla 8: Estimaciones de diferentes parámetros poblacionales a partir del análisis de secuencias codificantes completas de ZIKV.

Grupo ^a	Parametro	Valor ^b	HPD ^c	ESS ^d
Secuencia codificante completa de ZIKV	Prior	-2657	-2673 a -2640	2232
	Posterior	-22566	-22584 a -22548	3101
	Log likelihood	-19909	-19920 a -19899	6369
	Tasa evolutiva ^e	1.20×10^{-3}	9.51×10^{-4} a 1.47×10^{-3}	1967
tMRCA ^f Clado Americano	2.063	2.4398-1.7244	1773	
	11/02/2014	27/09/2013-15/06/2014		
tMRCA ^f Clado Americano-Chino	2.774	3.2125-2.4054	2663	
	28/05/2013	19/12/2012-09/10/2013		

^a Ver Tabla 7 por cepas incluidas en este análisis. ^b Se indica el valor promedio. ^c HPD: valores de alta densidad de probabilidad. ^d ESS: tamaño efectivo de muestreo. ^e Tasa evolutiva: Expresada en sustituciones/sitio/año. ^f tMRCA: tiempo del ancestro común más reciente. La fecha estimada se indica en negrita.

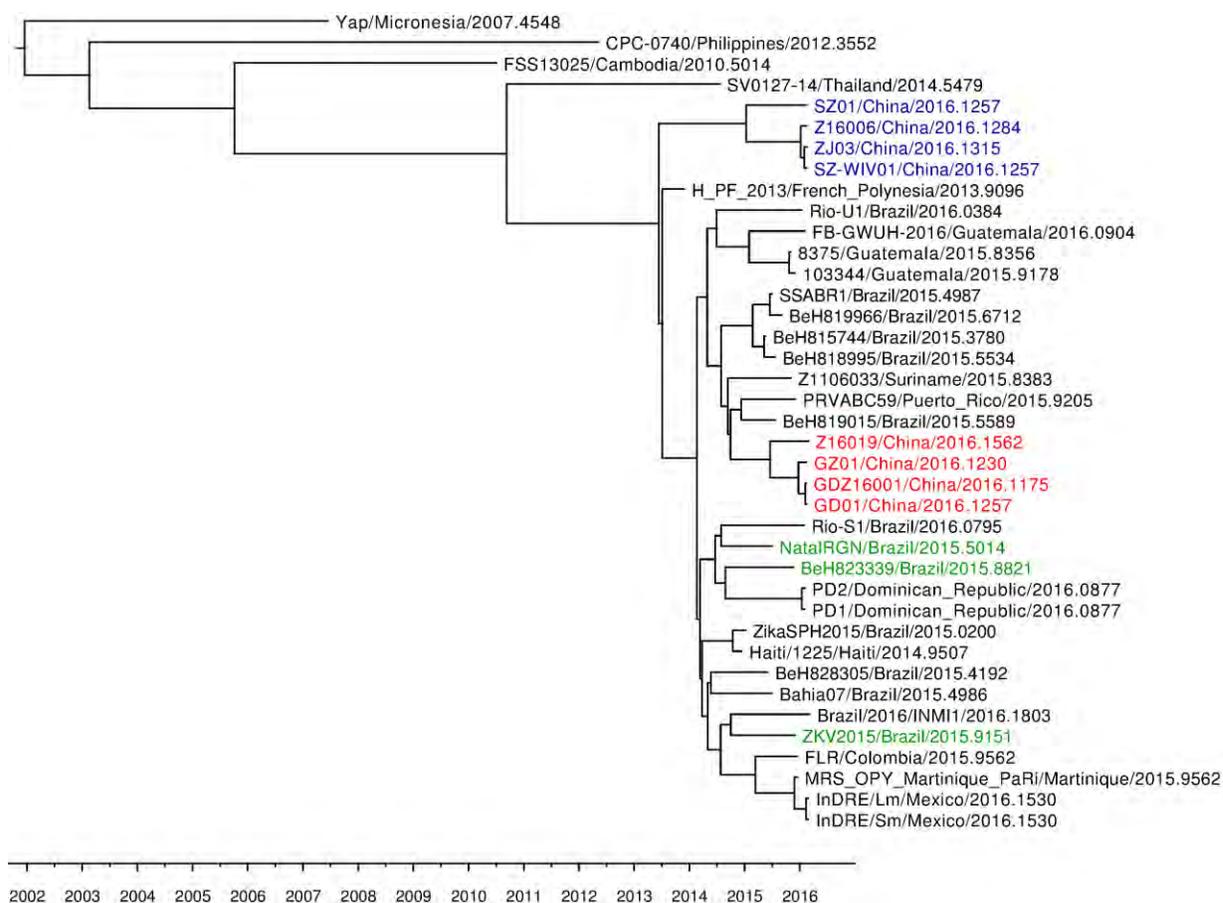


Figura 25. Árbol de MCC de secuencias codificantes completas de ZIKV. Se obtuvo un árbol de máxima credibilidad de clados a partir del análisis con el modelo de sustitución nucleotídica GTR + Γ , el modelo poblacional *Bayesian Skyline* y un reloj molecular estricto. El mismo está enraizado en el ancestro común más reciente de las cepas incluidas. Las diferentes variantes se indican por su nombre, ubicación geográfica y el año de aislamiento expresado en formato decimal. Las cepas de ZIKV aisladas en China que se agrupan con las latinoamericanas se señalan en rojo, mientras que el clado que incluye otras variantes de ZIKV aisladas en ese país se indican en azul. Las cepas aisladas de casos de microcefalia se visualizan en verde. El eje de las X indica la escala temporal en años.

DISCUSIÓN

La tasa de evolución estimada en el presente estudio para las cepas de ZIKV actualmente circulantes (1.20×10^{-3} s/s/a) es ligeramente superior a la reportada en trabajos recientes realizados sobre las primeras etapas del brote de ZIKV en las Américas ($0.98 - 1.06 \times 10^{-3}$ s/s/a) (FARIA *et al.* 2016). Las diferencias en estas estimaciones pueden deberse al hecho de que el presente estudio incluye mayor cantidad de cepas americanas, así como variantes aisladas en otros continentes a partir de casos importados. Asimismo, el alto valor de esta estimación responde posiblemente a que las cepas analizadas fueron aisladas durante la fase expansiva del brote, período en el cual las tasas evolutivas tienden a ser más altas, disminuyendo progresivamente a medida que la epidemia avanza (MEYER *et al.* 2015; PARK *et al.* 2015). Estudios previos han demostrado que las cepas de ZIKV aisladas en América Latina pertenecen al linaje Asiático (CAMPOS *et al.* 2015; MUSSO 2015). En el presente trabajo, utilizando únicamente secuencias codificante completas, se revela la presencia de un clado que agrupa exclusivamente variantes de ZIKV que surgieron en las Américas, en concordancia con reportes recientes (FARIA *et al.* 2016) (ver Figura 25).

Estudios recientes revelaron variaciones significativas entre los genomas de cepas africanas y asiáticas, así como entre diferentes estirpes del linaje Asiático-Americano. Esta observación puede correlacionarse con las características epidemiológicas de estas variantes de ZIKV, ya que las manifestaciones clínicas pasaron de ser leves a incluir graves neuropatías (WANG *et al.* 2016). La proteína prM tuvo el mayor porcentaje de variabilidad aminoacídica, dando lugar a notorios cambios estructurales entre las cepas africanas y asiáticas que podrían desempeñar un papel importante en la virulencia o en el *fitness*.

En el presente análisis se incluyeron tres cepas aisladas de casos de microcefalia (MLAKAR *et al.* 2016; CALVET *et al.* 2016; DRIGGERS *et al.* 2016). A nivel filogenético no se observaron asociaciones particulares entre ellas, ya que se agrupan en diferentes ramas del árbol filogenético (Figura 25, en verde). Asimismo, se realizó un alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de estas tres variantes con otras cepas del linaje Asiático-Americano con el objetivo de investigar la posible coincidencia de sustituciones particulares en los genomas de cada cepa. Los resultados se muestran en la Figura Suplementaria 1.

El genoma de la cepa NatalRGN/Brazil/2015, aislada a partir del tejido cerebral de un feto con microcefalia (MLAKAR *et al.* 2016), revela cuatro sustituciones únicas de aminoácidos en relación con las demás cepas analizadas. Tres de ellas ocurren en la proteína NS1 (sustituciones K143E, T230A, y M346V) y la siguiente en la proteína NS5 (T3I). Con respecto a la cepa ZKV2015/Brazil/2015, aislada del líquido amniótico de un feto con microcefalia (CALVET *et al.* 2016), presentó tres sustituciones de aminoácidos únicas: S287E (en la proteína E); L107F (NS2A); y E579V (NS5). Asimismo, la cepa FB-GWUH-2016, aislada del cerebro de un feto (DRIGGERS *et al.* 2016), presenta nueve sustituciones únicas: F147L (preM); V390I (E); G108A y K224Q (NS1); M38V (NS2B); T462A y M467L (NS3); y A171T y R538C (NS5). Como se puede observar (Figura Suplementaria 1), ninguna de estas sustituciones son compartidos entre los genomas de aislados

provenientes de casos de microcefalia, lo que sugiere otros factores independientes de las diferencias genéticas pueden estar desempeñando un papel en la patogénesis causada por la infección por ZIKV.

Estudios filogenéticos previos indicaron la agrupación de las variantes de ZIKV en dos grandes grupos genéticos: linajes Africano y Asiático (actualmente denominado Asiático-Americano) (HADDOW *et al.* 2012; FAYE *et al.* 2014). Sin embargo, estudios recientes han sugerido que si se restringen los análisis filogenéticos a los genes E y NS5, se revela la existencia de otro linaje: Africano II (SHEN *et al.* 2016; GONG *et al.* 2016). Estos estudios también asignan importantes papeles filogeográficos a dos países africanos (Senegal y Costa de Marfil) en la evolución y divergencia de ZIKV, sugiriendo su migración desde Senegal hacia regiones de Asia y del Pacífico Sur (SHEN *et al.* 2016). Esto concuerda con los resultados del presente trabajo y de reportes previos que indican que la cepa evolutivamente más cercana a las variantes que emergieron en Brasil fue aislada en la Polinesia Francesa y pertenece al linaje Asiático-Americano (Musso 2015) (Figura 25).

La circulación del ancestro común más reciente (tMRCA) de todas las cepas de ZIKV de América Latina se estimó entorno a febrero de 2014, con un intervalo de confianza (95% HPD, valores de densidad de probabilidad superiores al 95%) que se ubica entre setiembre de 2013 y junio de 2014 (Tabla 8). Este resultado está en línea con estudios previos que estimaron el tMRCA de los aislados brasileños entre agosto de 2013 y abril de 2014 (FARIA *et al.* 2016). Este clado no se compone exclusivamente de cepas americanas, apreciándose además varias estirpes aisladas en China (Figura 25, en rojo). Estas cepas derivan de casos importados de América Latina, lo que también ha sido observado en otras regiones del mundo (MASSAD *et al.* 2016), como por ejemplo la variante Brazil/2016/INMI1, incluida en estos estudios y aislada en Roma, Italia, de origen brasileño. Sorpresivamente, este análisis evidenció la presencia de otro clado que está compuesto exclusivamente de cepas aisladas en China (Figura 25, en azul). Este sub-linaje comparte un ancestro común con las cepas americanas que fue calculado alrededor de mayo de 2013 (95% HPD: diciembre de 2012 - octubre de 2013). Esta fecha es anterior a la circulación de la variante ancestral que originó tanto las cepas de Polinesia Francesa como las americanas (Figura 25), que fue recientemente estimada en mayo de 2013 (95% HPD: diciembre de 2012 - setiembre de 2013) (FARIA *et al.* 2016).

Esta observación sugiere que el sub-linaje evidenciado en China evolucionó a partir de un ancestro que circuló en las Islas del Pacífico Sur en 2013. Dicha co-circulación temporal de linajes virales con diferentes historias evolutivas sugiere que la diversificación de ZIKV puede estar significativamente subestimada. Esto se debe en gran medida al hecho de que la mayoría de las infecciones por ZIKV suelen ser asintomáticas, y los casos sintomáticos son generalmente leves, con manifestaciones clínicas que pueden confundirse con otras infecciones arbovirales, lo que genera diagnósticos erróneos y el consecuente sub-registro (HADDOW *et al.* 2012). Este fue el caso del brote de ZIKV registrado en 2007 en Micronesia, donde el diagnóstico inicial sugirió que el agente causal de la epidemia era DENV (LANCIOTTI *et al.* 2008; DUFFY *et al.* 2009). Otro aspecto importante que apoya esta observación es que el ciclo de transmisión enzoótico de ZIKV involucra mosquitos del género *Aedes* y primates no humanos, mientras que los humanos y otros mamíferos pueden actuar como

hospederos ocasionales (DARWISH *et al.* 1983; HAYES 2009; FAYE *et al.* 2014). Sin embargo, los seres humanos pueden también participar como hospederos amplificadores en ciclos urbanos, si exhiben viremias lo suficientemente elevadas y duraderas (DUFFY *et al.* 2009). De hecho, aunque se ha sugerido que el mantenimiento de ZIKV en la naturaleza se debe principalmente a su ciclo selvático, evidencias serológicas sugieren una alta incidencia de su circulación en humanos (DUFFY *et al.* 2009; FAYE *et al.* 2014). Estos aspectos, sumados a la extensión sin precedentes de la actual epidemia de ZIKV en las Américas, así como a la circulación de un sub-linaje genético contemporáneo (que probablemente habría pasado desapercibido en ausencia del brote americano), explican la emergencia de ZIKV y su potencial para extenderse hacia otras regiones geográficas.

CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios realizados indican que las altas tasas evolutivas, así como el rápido crecimiento poblacional, han caracterizado la dinámica poblacional de las cepas de ZIKV que emergieron en la región latinoamericana. Las dificultades para diagnosticar las infecciones por ZIKV han históricamente conducido a un sub-reporte de casos y a la limitada disponibilidad de secuencias nucleotídicas, impidiendo investigar diferentes aspectos de la epidemiología molecular de este virus. Sin embargo, la co-circulación temporal de sub-linajes diferentes revelada por una mayor vigilancia de ZIKV, se alinea con la evidencia serológica y molecular sugiriendo la existencia de una significativa subestimación de la diversificación genética y geográfica. Estas observaciones también sugieren el potencial de ZIKV de emerger y diseminarse en otras regiones geográficas. Las cepas aisladas de casos microcefalia no comparten las sustituciones de aminoácidos, lo que sugiere que otros factores además de las diferencias genéticas pueden desempeñar un papel para la patogénesis causada por la infección ZIKV.

La actual epidemia de ZIKV en el continente americano representa el ejemplo más reciente de la introducción de un virus transmitido por mosquitos en una región geográfica previamente inafectada con una población inmunológicamente *naïve*. Esta emergencia repentina sigue un patrón de difusión similar al anteriormente observado para DENV, WNV y CHIKV, lo que responde claramente a actividades humanas que promueven ambientes ecológicos óptimos para la actividad vectorial. Si bien ZIKV ha permanecido prácticamente ignorado durante medio siglo, estudios entomológicos, epidemiológicos y moleculares han sugerido que su incidencia, dispersión geográfica y diversidad genética han sido significativamente subestimadas. Su adaptabilidad a diferentes especies de mosquitos le ha permitido a ZIKV colonizar eficientemente ciclos de transmisión urbanos, aprovechando la amplia distribución geográfica de los mosquitos competentes. Por otra parte, las rutas de transmisión sin precedentes para los Flavivirus, incluyendo la transmisión materno-fetal y sexual, pueden contribuir a aumentar su potencial de propagación.

Objetivo Específico V: Investigar los patrones de uso de codones de ZIKV.

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO TEÓRICO

La redundancia del código genético ofrece a la evolución la oportunidad de ajustar la eficiencia y precisión en la producción de proteínas a varios niveles, sin modificar la secuencia de aminoácidos (STOLETZKI and EYRE-WALKER 2006). A través de cambios en su composición nucleotídica, los virus pueden modificar su uso de codones y adaptarlo a nuevos hospederos, lo que significa un mecanismo evolutivo fundamental que promueve saltos inter-especie (PEPIN *et al.* 2010; LONGDON *et al.* 2014). La relación entre el uso de codones de diferentes especies virales y sus hospederos provee información importante para comprender aspectos evolutivos relativos a la supervivencia y *fitness* viral, así como a la evasión del sistema inmune (BURNS *et al.* 2006; MUELLER *et al.* 2006; COSTAFREDA *et al.* 2014). Los tripletes sinónimos no son generalmente utilizados al azar, habiendo diferentes fuerzas que impulsan hacia un sesgo de los mismos: la selección natural (que está principalmente relacionada con la eficiencia traduccional, tanto en velocidad como en precisión); y los sesgos mutacionales (SHARP *et al.* 2010). Por ende, el estudio de los patrones de uso de codones puede revelar información importante sobre la evolución viral, la regulación de la expresión génica y la síntesis de proteínas, contribuyendo potencialmente al diseño de vacunas (BUTT *et al.* 2014).

En el presente estudio se realizó un análisis exhaustivo del uso de codones y la composición genética de diferentes cepas de ZIKV cuyo genoma completo está disponible, incluyendo variantes aisladas de casos de microcefalia. Mediante estos estudios se investigaron diferentes determinantes evolutivos clave para interpretar los posibles sesgos. La publicación derivada de este estudio se adjunta en el Anexo II (CRISTINA *et al.* 2016b).

MATERIALES Y MÉTODOS

SECUENCIAS

Las secuencias completas del genoma de 37 cepas de ZIKV se obtuvieron de las bases de datos DDBJ y GenBank (disponible en: <http://arsa.ddbj.nig.ac.jp> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, respectivamente). Se incluyeron todos los genomas disponibles de variantes de ZIKV aisladas de casos de microcefalia (MLAKAR *et al.* 2016; CALVET *et al.* 2016; DRIGGERS *et al.* 2016). La información de las variantes utilizadas se detalla en la Tabla 9. Las secuencias de las regiones codificantes completas de cada cepa fueron alineadas con el programa MUSCLE (EDGAR 2004). El conjunto de datos final comprende un total de 126.615 codones.

ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó el programa CodonW (disponible at <http://sourceforge.net/projects/codonw>) para calcular el uso de codones, la frecuencia de dinucleótidos, la composición de bases, el uso relativo de codones sinónimos (RSCU) (SHARP and LI 1986), el número efectivo de codones (ENC) (NOVEMBRE 2002), el contenido G+C genómico, así como el contenido G+C en la primera, segunda y tercera posición del codón. El índice ENC puede variar entre 20 and 61, siendo los valores bajos indicativos de un fuerte sesgo en el uso de codones. Para investigar las preferencias en el uso de codones de ZIKV en relación al uso de codones en humanos, así como en los principales vectores de ciclos urbanos (*A. aegypti* y *A. albopictus*), utilizamos el Índice de Adaptación de Codones (CAI, o *Codon Adaptation Index*) (SHARP and LI 1987). El CAI fue calculado utilizando la aproximación descrita por Puigbò y colaboradores para células humanas, de *A. aegypti* y de *A. albopictus* (PUIGBÒ *et al.* 2008a). Este método permite comparar el uso de codones de ZIKV con diferentes referencias predefinidas (en este caso se utilizaran datos de humanos, *A. aegypti* y *A. albopictus*).

Con el objetivo de evaluar el grado de adaptabilidad de los genes de ZIKV al uso de codones del conjunto de referencia, construimos un *dataset* compuesto de 322 genes humanos seleccionados al azar de la base de datos *Ensembl* (disponible en <http://www.ensembl.org>). Asimismo, se obtuvieron 22 genes de *A. aegypti* y 15 de *A. albopictus* de la base de datos ARSA (disponible en: <http://www.arsa.ddbj.nig.ac.jp>). Se aplicó la prueba de Wilcoxon & Mann-Whitney (WESSA 2012) para evaluar diferencias estadísticamente significativas los valores de CAI. Para discernir si las diferencias estadísticamente significativas en los valores de CAI surgen de las preferencias en el uso de codones, se calculó el valor de CAI esperado (e-CAI) y su intervalo de confianza del 95%, lo que también fue evaluado a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov (PUIGBÒ *et al.* 2008b). Los valores de RSCU de células humanas, de *A. aegypti* y de *A. albopictus* se obtuvieron de la base de datos *Kazusa* (disponible en: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

Tabla 9. Cepas de ZIKV utilizadas en el presente análisis.^a

Nombre	País de aislamiento	Fecha de aislamiento	Número de Acceso
H.sapiens-tc/KHM/2010/FSS13025	Camboya	2010	KU955593
H.sapiens-tc/PHL/2012/CPC-0740	Filipinas	2012	KU681082
H.sapiens-tc/THA/2014/SV0127-14	Tailandia	2014	KU681081
Haiti/1225/Haiti/2014	Haití	2014	KU509998
SSABR1/Brazil/2015	Brasil	2015	KU707826
ZKV2015/Brazil/2015	Brasil	2015	KU497555
NatalRGN/Brazil/2015	Brasil	2015	KU527068
ZikaSPH2015/Brazil/2015	Brasil	2015	KU321639
BeH815744/Brazil/2015	Brasil	2015	KU365780
BeH819966/Brazil/2015	Brasil	2015	KU365779
BeH818995/Brazil/2015	Brasil	2015	KU365777
BeH819015/Brazil/2015	Brasil	2015	KU365778
Rio-S1/Brazil/2016	Brasil	2016	KU926310
Rio-U1/Brazil/2016	Brasil	2016	KU926309
ArB1362	Rep. Centro Africana	1968	KF383115
ARB7701	Rep. Centro Africana	1976	KF268950
ARB15076	Rep. Centro Africana	1976	KF268949
ARB13565	Rep. Centro Africana	1976	KF268948
VE-GAXIAN/China/2016	China	2016	KU744693
GD01/China/2016	China	2016	KU740184
GZ01/China/2016	China	2016	KU820898
ZJ03/China/2016	China	2016	KU820899
PD1/Dominican Republic/2016	Rep. Dominicana	2016	KU853012
PD2/Dominican Republic/2016	Rep. Dominicana	2016	KU853013
H/PF/2013	Polinesia Francesa	2013	KJ776791
FB-GWUH-2016	Guatemala	2016	KU870645
InDRE/Lm/Mexico/2016	México	2016	KU922923
InDRE/Sm/Mexico/2016	México	2016	KU922960
EU545988	Micronesia	2007	EU545988
IbH-30656_SM21V1-V3	Nigeria	1968	KU963574
PRVABC59/Puerto Rico/2015	Puerto Rico	2015	KU501215
ArD158084	Senegal	2001	KF383119
ArD128000	Senegal	1997	KF383117
ArD7117	Senegal	1968	KF383116
Z1106033/Suriname/2015	Surinam	2015	KU312312
MR766-NIID	Uganda	1947	LC002520
MR_766	Uganda	1947	KU720415

^a Las cepas aisladas de casos de microcefalia se indican en negrita.

ANÁLISIS MULTIVARIANTE

La relación entre variables y muestras puede obtenerse mediante un análisis estadístico multivariante. El análisis de correspondencia (COA) es un tipo de análisis multivariante que permite una representación geométrica de los conjuntos de filas y columnas en un conjunto de datos (GREENACRE 1984; WONG *et al.* 2010). Cada ORF se representa como un vector de 59 dimensiones y cada dimensión corresponde al valor de RSCU de cada codón (todos los tripletes excluyendo AUG, UGG y los codones stop). Las principales tendencias dentro de un conjunto de datos pueden determinarse usando medidas de inercia relativa y genes ordenados según su posición a lo largo de los diferentes ejes (TAO *et al.* 2009). El COA fue realizado sobre los valores de RSCU utilizando el programa CodonW. El análisis de correlación se llevó a cabo utilizando el método de análisis de correlación de rango de Spearman (WESSA 2012) (disponible en: www.wessa.net).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PATRONES GENERALES DEL USO DE CODONES DE ZIKV

Con el objetivo de investigar el grado de sesgo en el uso de codones de ZIKV, se calcularon los valores de ENC de las 37 cepas incluidas en este estudio, obteniéndose un valor medio de $53,16 \pm 0,28$. Por lo general existe una relación inversa entre el valor de ENC y la expresión génica. Es decir, un bajo valor de ENC sugiere un alto sesgo de uso de codones, lo que indica una expresión génica más alta, y viceversa (WRIGHT 1990). El valor medio de ENC obtenido ($ENC > 40$) es indicativo de una composición genómica relativamente conservada entre los diferentes genomas de ZIKV.

Valores similares han sido calculados para otros virus de ARN, como los virus Ebola ($ENC = 57.23$) (CRISTINA *et al.* 2015), Chikungunya ($ENC = 55.56$) Hepatitis C ($ENC = 52,62$) (Hu *et al.* 2011), así como para otros Flavivirus relacionados como WNV ($ENC = 53.81$) (MORATORIO *et al.* 2013) o DENV ($ENC = 49.70$) (MA *et al.* 2013b). Una posible explicación para este débil sesgo encontrado en diferentes virus de ARN es que podría proveerles ventajas para una eficiente replicación en células de hospederos que presenten preferencias de codones potencialmente distintas (JENKINS and HOLMES 2003). En particular, los arbovirus deben de equilibrar su uso de codones para poder infectar células de vectores y hospederos vertebrados al mismo tiempo, por lo que un sesgo marcado podría imposibilitarles llevar a cabo el ciclo de transmisión.

La relación entre ENC y GC3S (el contenido de G+C en la tercera posición de codón) se usa ampliamente para estudiar la variación del uso de codones entre genes en diferentes organismos (WRIGHT 1990). La curva continua indica, para un valor dado de contenido GC3, los valores esperados de ENC de acuerdo a una utilización al azar de codones. Por ende, el gráfico ENC-GC3S de genes cuya elección de codones se restringe solamente por el sesgo mutacional hacia G3+C3, ubicará los puntos sobre o justo por debajo de la curva continua dada por los valores de ENC esperados (TSAI *et al.* 2007). La Figura 26 muestra el gráfico ENC-GC3S para todas las cepas de ZIKV incluidas en este estudio. Como se puede apreciar, todos los puntos se ubican debajo de la curva esperada, lo que indica que la composición G+C podría desempeñar un rol en el uso de codones de ZIKV. Se desprende de estos resultados además que el uso de codones de ZIKV está regulado por el sesgo mutacional, siendo el control traduccional muy leve a nivel general.

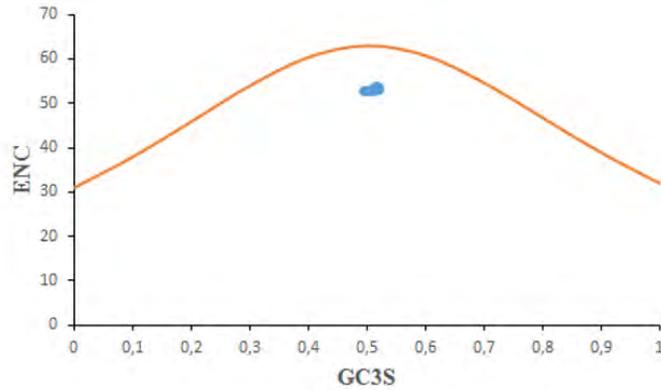


Figura 26. Gráfico entre el número efectivo de codones (ENC) utilizados en por ZIKV y el contenido de G+C en la tercera posición de codón (GC3S). La curva indica la relación esperada en ausencia de selección. Los puntos azules muestran los resultados obtenidos para las cepas de ZIKV incluidas en este análisis.

ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA

Se investigó la variabilidad del uso de codones entre los diferentes genomas ZIKV mediante la realización de un COA. Se utilizaron los valores de RSCU de cada genoma, examinándose la distribución de las cepas en el plano definido por los dos ejes principales del COA. El primer eje generado representa el 72,80% de la variación total, mientras que el segundo eje representa el 7,55%. Los resultados de este estudio se grafican en la Figura 27.

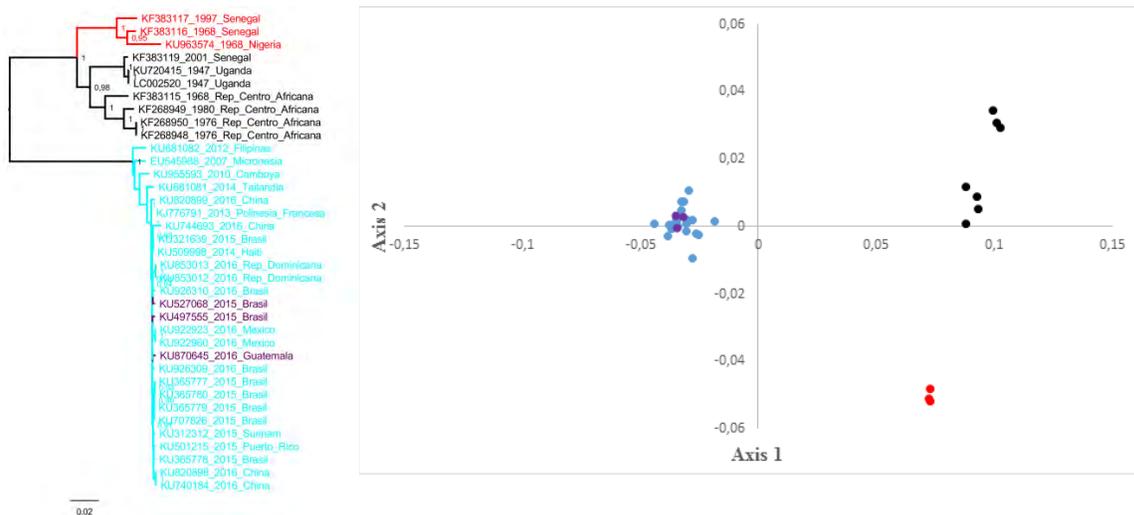


Figura 27. Filogenia de ZIKV y gráfico de los dos ejes principales del análisis de correspondencia (COA) de los valores del uso relativo de codones sinónimos (RSCU). El primer y el segundo eje representan el 72,80% y el 7,55% de la variación total, respectivamente. Las cepas pertenecientes a los sub-linajes del centro-este y oeste de África, y al linaje Asiático-Americano se muestran en negro, rojo y celeste, respectivamente. Las cepas aisladas de los casos de microcefalia se muestran en violeta.

Como se puede apreciar, las cepas de ZIKV se ubican graficadas en diferentes posiciones del plano (Figura 27, sobre la derecha). Esta distribución concuerda con la filogenia obtenida a partir de la comparación de los genomas completos de las cepas en estudio (Figura 27, sobre la izquierda), mediante la cual las distintas variantes de ZIKV se agrupan en tres grupos genéticos diferentes. El linaje Africano se sub-divide en dos clados: uno compuesto por cepas de Centro y Este de África (aislados de Uganda, República Centro Africana y Senegal) (Figura 27, en negro); y otro asocia variantes de Nigeria y Senegal (Figura 27, en rojo). Por su parte, todas las cepas aisladas en Asia y en el reciente brote en las Américas (linaje Asiático-Americano) se señalan en celeste (indicándose en violeta las variantes aisladas de casos de microcefalia).

Los resultados de estos estudios sugieren que la emergencia de ZIKV fuera de África, en el Pacífico y las Américas, se asocia además con un uso diferencial de codones. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en el uso de codones entre las cepas aisladas de los casos de microcefalia y el resto de cepas del Linaje Asiático-Americano (Figura 27, en violeta).

USO DE CODONES DE ZIKV

Con el objetivo de comparar las preferencias en el uso de codones de ZIKV con las de humanos, *A. aegypti* y *A. albopictus*, se calcularon los valores de RSCU de ZIKV (a partir del ORF de las diferentes variantes de ZIKV) y se compararon con los de las otras tres especies. Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 10.

Las frecuencias de uso de codones de ZIKV son significativamente diferentes en relación a la de células humanas o de mosquitos. Comparando con células humanas, se encontraron frecuencias altamente sesgadas para UUG (Leu), AUA (Ile), UCA (Ser), CCA (Pro), ACA (Thr), CAA (Gln), AGA (Arg) y GGA (Gly). El hecho de que la mayor parte de los codones altamente preferidos terminan en Adenina sugiere un fuerte sesgo mutacional como modelador del uso de codones en ZIKV.

Por otra parte, se calcularon los valores de CAI para todos los tripletes utilizando como conjuntos de referencia los usos de codones de células humanas, *A. aegypti* and *A. albopictus*. Los resultados se muestran en la Tabla 11. Los valores de CAI oscilan entre 0 y 1, siendo 1 cuando la frecuencia de uso del codón por parte de ZIKV es igual a la frecuencia del conjunto de referencia. Se obtuvieron valores medios de 0,750, 0,737 y 0,670 para los genes de ZIKV, en relación a humanos, *A. aegypti* y *A. albopictus*, respectivamente. Asimismo, se obtuvieron valores de CAI medios de 0,809, 0,799 y 0,711 para los conjuntos de datos de genes humanos, *A. aegypti* y *A. albopictus* en relación con las mismas muestras de referencia (Tabla 11). Con el fin de evaluar si las diferencias son estadísticamente significativas, se realizó una prueba de Wilcoxon & Mann-Whitney. Los resultados revelaron que las diferencias en los valores de CAI son estadísticamente significativas en todas las comparaciones ($T = 0$, $p\text{-value} < 0,001$; $T = 242$, $p\text{-value} < 0,001$ y $T = 195$, $p\text{-value} < 0,001$ para humanos, *A. aegypti* y *A. albopictus*, respectivamente).

Tabla 10. Valores de RSCU^a.

AA	Cod	HC	<i>Aae</i>	<i>Aal</i>	ZIKV	AA	Cod	HC	<i>Aae</i>	<i>Aal</i>	ZIKV
Phe	<i>UUU</i>	0.92	0.56	0.49	1.01	Ser	UCU	1.14	0.66	0.52	0.88
	UUC	1.08	1.44	1.55	0.99		UCC	1.32	1.20	1.36	0.92
Leu	UUA	0.48	0.36	0.23	0.37	Pro	<i>UCA</i>	0.90	0.66	0.46	1.58
	<i>UUG</i>	0.78	1.32	1.11	1.42		UCG	0.30	1.44	1.64	0.50
	CUU	0.78	0.66	0.48	0.79	CCU	1.16	0.68	0.35	0.73	
	CUC	1.20	0.84	0.86	0.96	CCC	1.28	0.84	1.13	1.07	
	CUA	0.42	0.54	0.56	0.66	<i>CCA</i>	1.12	1.20	1.07	1.75	
	CUG	2.40	2.28	2.72	1.81	CCG	0.44	1.32	1.44	0.45	
Ile	AUU	1.08	1.00	0.74	0.86	Thr	ACU	1.00	0.80	0.64	0.94
	AUC	1.40	1.60	1.86	1.18		ACC	1.44	1.48	1.78	1.07
	<i>AUA</i>	0.51	0.40	0.39	0.96		<i>ACA</i>	1.12	0.72	0.58	1.56
Met	AUG	1.00	1.00	1.00	1.00	ACG	0.44	1.00	0.99	0.42	
Val	GUU	0.72	1.04	0.87	0.85	Ala	GCU	1.08	1.08	0.98	1.14
	GUC	0.96	1.08	1.30	1.03		GCC	1.60	1.48	1.80	1.25
	GUA	0.48	0.60	0.51	0.40		GCA	0.92	0.76	0.58	1.19
	GUG	1.84	1.28	1.30	1.72		GCG	0.44	0.68	0.61	0.43
Tyr	UAU	0.88	0.64	0.55	0.78	Cys	UGU	0.92	1.16	0.69	0.94
	UAC	1.12	1.36	1.44	1.22		UGC	1.08	0.84	1.30	1.06
TER	UAA	**	**	**	**	TER	UGA	**	**	**	**
	UAG	**	**	**	**	Trp	UGG	1.00	1.00	1.00	1.00
His	CAU	0.84	0.84	0.75	0.94	Arg	CGU	0.48	1.38	1.20	0.42
	CAC	1.16	1.16	1.24	1.06		CGC	1.08	1.26	1.05	0.57
Gln	<i>CAA</i>	0.54	0.82	0.59	0.99		CGA	0.66	1.20	0.77	0.30
	CAG	1.46	1.18	1.40	1.01		CGG	1.20	1.02	0.97	0.57
Asn	AAU	0.94	0.80	0.63	0.76	Ser	AGU	0.90	0.96	0.84	1.01
	AAC	1.06	1.20	1.36	1.24		AGC	1.44	1.08	1.15	1.11
Lys	AAA	0.86	0.80	0.58	0.86	Arg	<i>AGA</i>	1.26	0.66	1.16	2.44
	AAG	1.14	1.20	1.41	1.14		<i>AGG</i>	1.26	0.54	0.83	1.69
Asp	GAU	0.92	1.12	0.96	0.90	Gly	GGU	0.64	1.12	1.23	0.56
	GAC	1.08	0.88	1.03	1.10		GGC	1.36	1.04	1.07	0.67
Glu	GAA	0.84	1.16	1.10	0.93		<i>GGA</i>	1.00	1.48	1.21	1.81
	GAG	1.16	0.84	0.89	1.07		GGG	1.00	0.36	0.47	0.96

^aRSCU, uso relativo de codones sinónimos; AA, aminoácido; Cod, codón; HC, Células Humanas; *Aae*, *Aedes aegypti*; *Aal*, *Aedes albopictus*. **, codones de terminación. Los codones con un incremento significativo con respecto a HC o células de mosquitos ($\Delta \geq 0.30$) se indican subrayados y/o en itálica, respectivamente. Los codones con una disminución significativa con respecto a células de mosquito se indican en negrita.

Tabla 11. CAI de ZIKV en relación al uso de codones de humanos, *Aedes aegypti* y *A. albopictus*.

	CAI-Hs	CAI-Aae	CAI-Aal	%GC	%GC(1)	%GC(2)	%GC(3)
ZIKV genes	0.750±0.005	0.737±0.008	0.670±0.010	49.04±0.43	47.93±0.26	44.87±0.27	54.43±1.44
Hs genes	0.809±0.038	NA	NA	56.47±7.72	58.37±6.88	44.35±7.71	66.69±14.81
Aae genes	NA	0.799±0.046	NA	50.77±3.49	55.41±4.16	34.84±6.90	62.03±12.08
Aal genes	NA	NA	0.711±0.067	48.72±3.49	50.26±3.01	37.33±3.92	58.55±10.59

^aCAI. Índice de adaptación de codones. CAI-HS, CAI-Aae y CAI-Aal, hacen referencia al CAI en relación a sets de usos de codones de *H. sapiens*, *A. aegypti* y *A. albopictus*, respectivamente. %GC, porcentaje de G+C genómico; %GC(1) a (3), porcentaje de G+C en las posiciones 1 a 3 del codón, respectivamente. En todos los casos se indica el valor promedio ± el desvío estándar. NA, no disponible.

Para determinar si las diferencias estadísticamente significativas en los valores de CAI son consecuencia de las preferencias de codones (PUIGBÒ *et al.* 2008a), se calcularon los valores de CAI esperados (e-CAI) para las secuencias de ZIKV en relación a los conjuntos de referencia de uso de codones de humanos, *A. aegypti* o *A. albopictus*. El algoritmo e-CAI (PUIGBÒ *et al.* 2008b) generó 500 secuencias aleatorias con la misma composición de nucleótidos y aminoácidos que las secuencias de interés (en este caso secuencias de ZIKV). Luego, se calcularon los valores de CAI para todas ellas y se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov para los valores de e-CAI de estas secuencias aleatorias, con el fin de evaluar si las secuencias generadas siguen una distribución normal. Los resultados revelaron valores de e-CAI de 0,768 ($p < 0,05$), 0,751 ($p < 0,05$) y 0,670 ($p < 0,05$) para las tres comparaciones, respectivamente. El test de Kolmogorov-Smirnov reveló una distribución normal de las secuencias generadas en todos los casos (valores de 0,032, 0,035 y 0,024, para las tres comparaciones, respectivamente, que están por debajo del valor crítico de 0,061). Tomando todos estos resultados en conjunto, se evidenció que los valores de CAI para los genes de ZIKV son diferentes de los valores de CAI obtenidos para secuencias de humanos, *A. aegypti* y *A. albopictus*. Asimismo, se evidencia una mayor adaptación de ZIKV a humanos, seguida del principal vector, *A. aegypti*.

Posteriormente, se analizaron las abundancias relativas de los 16 dinucleótidos en el ORF de ZIKV (Tabla 12). Como se puede observar, las frecuencias de dinucleótidos no son aleatorias y ningún dinucleótido se encuentra presente en la frecuencia esperada. Las abundancias relativas de CpG y UpA mostraron una fuerte desviación de las frecuencias esperadas (1,0) (valor promedio ± S.D. = $0,44 \pm 0,001$ y $0,49 \pm 0,000$, respectivamente), estando significativamente sub-representadas. Por su parte, UpG, ApG, GpA y GpG están marcadamente sobre-utilizadas ($1,44 \pm 0,001$, $1,33 \pm 0,001$, $1,43 \pm 0,001$, $1,45 \pm 0,001$, respectivamente) (Tabla 12).

Tabla 12. Abundancia relativa de dinucleótidos en cepas de ZIKV y resumen de valores de COA.

		UU	UC	UA	UG	CU	CC	CA	CG
Mean \pm SD ^a		0.75 \pm 0.00	0.75 \pm 0.00	0.49 \pm 0.00	1.44 \pm 0.00	0.95 \pm 0.00	0.84 \pm 0.00	1.24 \pm 0.01	0.44 \pm 0.00
Axis 1 ^b	R	0.197250	-0,39201	-0,128082	0.766477	-0,246681	0.376363	0.704184	-0,737198
	P	0.234	<0.05	0.441	<0.001	0.136	<0.05	<0.001	<0.001
		AU	AC	AA	AG	GU	GC	GA	GG
Mean \pm SD ^a		0.91 \pm 0.00	0.92 \pm 0.00	1.18 \pm 0.00	1.33 \pm 0.00	0.83 \pm 0.00	0.95 \pm 0.00	1.43 \pm 0.00	1.45 \pm 0.00
Axis 1 ^b	R	0.601174	0.155880	-0,218172	0.704540	0.302394	0.608760	0.791904	-0,485835
	P	<0.001	0.347	0.190	<0.001	0.068	<0.001	<0.001	<0.001

^aValores promedio de la frecuencia de dinucleótidos de cepas de ZIKV \pm desvío estándar. ^bAnálisis de correlación entre el primer eje del COA y las frecuencias de los 16 dinucleótidos en ZIKV.

Estudios previos han demostrado que la deficiencia de CpG en Flavivirus se asocia con las propiedades inmunoestimuladoras de los CpGs no metilados, que son reconocidos por el sistema inmune innato del hospedero como una firma de patógenos (DORN and KIPPENBERGER 2008). Por otra parte, debido a que UpA está presente en dos de los tres codones stop, su sub-representación se ha sugerido como una estrategia para disminuir la probabilidad de mutaciones sin sentido (LOBO *et al.* 2009), que tendría profundas implicaciones biológicas en virus de ARN que codifican para una única poliproteína, como es el caso de ZIKV. Además, entre los 16 dinucleótidos, 10 están correlacionados con la posición de las secuencias a lo largo del primer eje en el COA (*p-values* <0,05, Tabla 12), lo que indica que la composición de los dinucleótidos también determina la variación en el uso de codones sinónimos entre ZIKV.

Resultados similares a los arrojados por estos estudios fueron encontrados sobre el inicio de la epidemia americana en estudios realizados sobre genomas completos, así como sobre genes particulares de ZIKV (FREIRE *et al.* 2015). Pese al bajo sesgo en el uso de codones de diferentes cepas de ZIKV, se observó una preferencia diferencial de codones en los diferentes linajes, tal como apreciamos en la Figura 27. De hecho, análisis restringidos al gen de la proteína NS1 arrojaron valores de CAI elevados en las cepas aisladas del brote americano. Esta observación evidencia una adaptación de las variantes epidémicas al uso de codones humano, lo que refleja la acción del control traduccional sobre esta región genómica. En otras palabras, estos resultados indican que las variantes epidémicas de ZIKV están mejor adaptadas al humano que las variantes africanas, lo que se evidencia en la Figura 28, donde se aprecia un incremento en los valores de CAI de variantes actuales que superan el umbral de significancia en todos los casos.

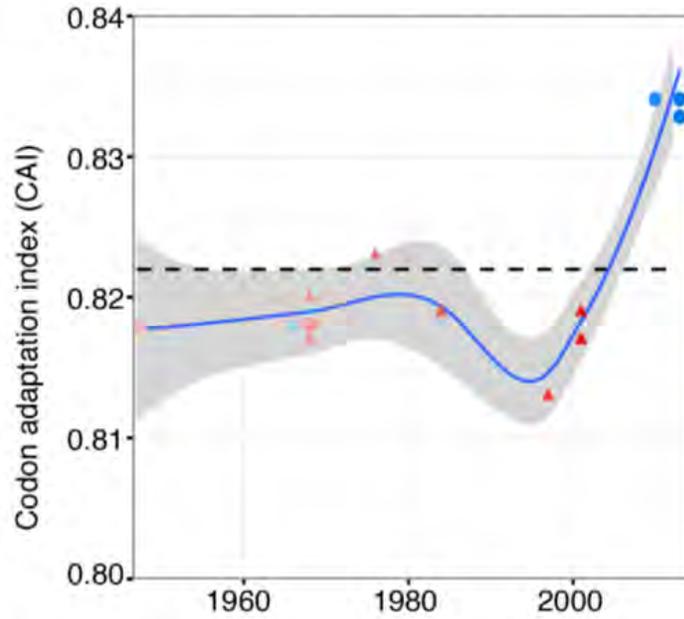


Figura 28. Valores de CAI para el gen NS1 de variantes de ZIKV con respecto a genes humanos. Se distinguen en rojo y celeste las variantes del linaje Africano y Asiático-Americano, respectivamente. Los aislados de mosquitos, monos y humanos se indican como triángulos, cuadrados y círculos, respectivamente. La línea punteada marca el umbral de significancia. Extraído de (FREIRE *et al.* 2015).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio indican que el uso de codones de ZIKV se encuentra ligeramente sesgado. El leve desvío en los valores observados de ENC, la predominancia de codones más frecuentes que terminan en Adenina, así como la composición de dinucleótidos, sugiere que el sesgo mutacional es una fuerza principal que modela el uso de codones de ZIKV. Asimismo, existen diferentes preferencias en los codones utilizados por ZIKV con respecto a humanos y vectores, siendo más adaptadas a humanos las cepas recientemente aisladas en las epidemias del Pacífico Sur y las Américas. Si bien no se encontraron diferencias significativas en el uso de codones entre cepas aisladas de casos de microcefalia y el resto de cepas del linaje Asiático-Americano, la mayor adaptabilidad observada para variantes epidémicas sugiere un incremento en la eficiencia traduccional, y por consiguiente, una mayor viremia en humanos, que puede correlacionarse con la mayor incidencia observada recientemente.

Objetivo Específico VI: Evaluar la posible presencia de miRNAs codificados por el genoma de ZIKV.

ANTECEDENTES Y FUNDAMENTO TEÓRICO

En 2015, ZIKV desencadenó una gran epidemia en Brasil y se extendió explosivamente por toda América Latina. En noviembre de ese año, el Ministerio de Salud de Brasil informó de un aumento de 20 veces en los casos de microcefalia neonatal, coincidiendo geográfica y temporalmente con el brote de zika. Asimismo, ZIKV fue detectado por microscopía electrónica y RT-qPCR en tejidos cerebrales y líquido amniótico de fetos microcefálicos, comprobando la asociación entre la infección por ZIKV y el aumento de la incidencia de casos de microcefalia (MLAKAR *et al.* 2016; CALVET *et al.* 2016). Además, estudios recientes demuestran que ZIKV puede infectar *in vitro* las células progenitoras neurales (NPCs) derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) humanas, lo que resulta en la desregulación de las vías relacionadas con el ciclo celular y el aumento de la muerte celular (TANG *et al.* 2016). El desarrollo de modelos animales ha permitido comenzar a comprender la patología subyacente de la infección por ZIKV (ROSSI and VASILAKIS 2016; HICKMAN and PIERSON 2016). El modelado de la infección por ZIKV en ratones reveló efectos directos de ZIKV en el desarrollo de células precursoras neurales, incluyendo proliferación, diferenciación y muerte celular (LI *et al.* 2016). Sin embargo, los mecanismos por los cuales ZIKV altera el desarrollo neurofisiológico permanecen desconocidos.

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños ARN no codificantes, de 19 a 24 nucleótidos de longitud, que regulan post-transcripcionalmente la expresión de un gen diana inhibiendo la traducción de mensajeros o promoviendo su clivaje (ALMEIDA *et al.* 2011). Muchos miRNAs han sido encontrados codificados por genomas virales (GRUNDHOFF and SULLIVAN 2011) y desempeñan un papel fundamental en diversos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, apoptosis, tumorigénesis, proliferación, entre otros (AMBROS 2001). Si bien los métodos tradicionales para detectarlos se basan en la clonación de células infectadas (PFEFFER 2004), las predicciones computacionales y los análisis de hibridación han sido de gran utilidad para lograr la identificación de diversos miRNAs virales (SULLIVAN and GANEM 2005; CUI *et al.* 2006).

Hasta la fecha se han descrito miRNAs codificados por diversos virus de ARN, como HCV (SHRIVASTAVA *et al.* 2015), HIV (ZHANG *et al.* 2014), HAV (SHI *et al.* 2014), y los virus de la leucemia bovina (BLV) (ROSEWICK *et al.* 2013), del Síndrome Respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV) (HASAN *et al.* 2014) y Ebolavirus (EBOV) (TENG *et al.* 2015). Asimismo, se han identificado miRNAs en otros Flavivirus como WNV (HUSSAIN *et al.* 2012a) o DENV (HUSSAIN and ASGARI 2014) y estudios *in silico* recientes revelaron la capacidad de codificación de miRNAs del genoma de ZIKV (PYLRO *et al.* 2016).

Es por ello que en el presente estudio investigaremos los posibles miRNAs que pueden estar codificados por el genoma de ZIKV así como sus posibles blancos de acción. Utilizaremos

herramientas computacionales para predecir nuevos miRNAs de ZIKV y evaluaremos su efectividad de hibridación con transcritos de genes humanos previamente reportados como involucrados en ocurrencia de casos de microcefalia. Este abordaje puede ayudar a interpretar mejor la interacción hospedero-patógeno, así como contribuir al desarrollo de nuevas estrategias antivirales contra la infección por ZIKV. La publicación derivada de este estudio se adjunta en el Anexo II (CRISTINA *et al.* 2016a).

MATERIALES Y MÉTODOS

PREDICCIÓN DE PRE-MiRNAs MEDIANTE UNA ABORDAJE AB INITIO

Se utilizó la secuencia del genoma completo de la cepa de ZIKV Natal-RGN (Número de acceso de GenBank: KU527068), aislada en 2015 a partir del tejido cerebral de un feto diagnosticado con microcefalia (MLAKAR *et al.* 2016). Se analizó esta secuencia mediante el programa VMir (GRUNDHOFF 2011). VMir es un programa de predicción *ab initio* específicamente diseñado para identificar pre-miRNA en genomas virales. Utilizando este enfoque se buscaron posibles premiRNAs (formadas por estructuras en horquilla, o *hairpin structures*), usando parámetros de filtrado altamente estrictos (tamaño de horquilla mínimo y máximo: 60 y 120 nucleótidos, respectivamente; puntuación mínima de horquilla de 160; número mínimo de ventanas de 25). Los puntajes de VMir fueron calculados de acuerdo a lo sugerido (GRUNDHOFF 2011).

CONFIRMACIÓN DE SECUENCIAS PRE-MiRNAs PRESUNTAS

Para discriminar pre-miRNAs reales de otras estructuras en horquilla (pseudo horquillas) se utilizó la aproximación iMiRNA-SSF (CHEN *et al.* 2016). Este enfoque representa una mejora en el rendimiento para la identificación precisa de precursores de miRNAs mediante la combinación de conjuntos negativos con diferentes distribuciones (CHEN *et al.* 2016).

IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE MiRNAs MADURAS

Con el fin de extraer miRNAs maduros (derivados de pre-miRNAs), se utilizó la aproximación MiRduplexSVM, que utiliza una nueva metodología que tiene en cuenta varios aspectos de la biogénesis de miRNAs (KARATHANASIS *et al.* 2015).

CONSERVACIÓN DE LAS SECUENCIAS SUGERIDAS ENTRE DIFERENTES CEPAS DE ZIKV

Con el objetivo de evidenciar la presencia de las secuencias de pre-miRNA y miRNAs maduros encontradas en la cepa Natal-NGR, en otras cepas de ZIKV, se descargaron de GenBank todos los genomas completos disponibles (ver Tabla 9 en Objetivo específico V). Se generaron las secuencias consenso utilizando el programa Entropy-One de la base de datos de HIV (disponible en: <http://www.hiv.lanl.gov/>).

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DE PRECURSORES DE MiRNAs

Se utilizó el servidor web RNAfold (GRUBER *et al.* 2008) para predecir la estructura secundaria de los pre-miRNAs, con los parámetros por defecto.

PREDICCIÓN DE POTENCIALES GENES DIANA

Con el fin de evaluar la complementariedad de los miRNAs sugeridos y sus presuntos genes blanco, se empleó el programa miRTar (Hsu *et al.* 2011). Los parámetros asignados para las hibridaciones se fijaron con un valor de corte de -14 kcal/mol de energía libre mínima (MFE) y un puntaje de alineamiento ≥ 140 . Se estudió la relación entre los miRNAs predichos y los transcritos de genes diana, considerándose genes humanos implicados en microcefalia. Los nombres,

números de acceso y funciones en el desarrollo del cerebro de los genes incluidos en estos análisis se indican en la Tabla 13.

Tabla 13. Genes humanos asociados a microcefalia^a.

Gen	N. acceso	Descripción de la proteína	Role en el desarrollo del cerebro
MCPH1	AK022909	Microcefalina 1	Involucrada en la condensación cromosómica
WDR62	BX647726	Repetido WD en proteína 62	Desarrollo cortical cerebral, proliferación y migración de precursores neuronales
CDK5RAP2	BK005504	Proteína 2 reguladora asociada con la subunidad CDK5 (quinasa dependiente de ciclina 5)	Regula la función de microtúbulos
CASC5	AF173994	Candidato para la susceptibilidad al cáncer	Importante para el control del huso mitótico
ASPM	AY367065	Microcefalia Asociada de Tipo Huso Anormal	Involucrado en la orientación de los husos mitóticos durante la neurogénesis embrionaria
CENPJ	AF139625	Proteína J asociada al centrómero	Controla la longitud del centriolo y la función de los microtúbulos
STIL	M74558	(SCL/TAL1 de locus de interrupción	Regulador de la apoptosis y progresión del ciclo celular
CEP135	AB014535	Proteína centrosomal 135	Mantiene la organización y estructura del centrosoma
CEP152	AB020719	Proteína centrosomal 152	Duplicación y forma del centriolo, polaridad celular y motilidad
ZNF335	AK026157	Protein dedo de cinc 335	División y diferenciación de células progenitoras
PHC1	U89277	Regulador del desarrollo temprano 1	Involucrado en la regulación del ciclo celular
CDK6	XM_006715835	Quinasa dependiente de ciclina 6	Control del ciclo celular y organización de microtúbulos
CENPF	U30872	Proteína centrómero F, 350/400ka (mitosina)	Proteína del cinetocoro asociada con la neurogénesis cortical

^a De acuerdo con (GRUNDHOFF and SULLIVAN 2011; FAHEEM *et al.* 2015).

HIBRIDACIÓN ENTRE LOS MIARNAS MADUROS DE ZIKV Y LOS TRANSCRIPTOS DIANA

Con el objetivo de confirmar una hibridación eficaz entre los miARNs predichos de ZIKV y los transcriptos blanco, se empleó el programa RNAhybrid (REHMSMEIER 2004). RNAhybrid es una herramienta para encontrar la energía libre mínima de hibridación entre ARNs cortos y largos y es ampliamente utilizado para la predicción de miARNs diana. La energía libre mínima (MFE) indica la estabilidad de la hibridación. Se empleó una condición restrictiva, con un valor de corte de MFE ajustado a -30 kcal/mol para todas las hibridaciones.

RESULTADOS

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURAS EN STEM-LOOP DE PRE-MiRNAs EN EL GENOMA ZIKV

La predicción computacional representa una estrategia ampliamente utilizada y eficaz para identificar nuevos miRNAs que pueden ser posteriormente examinados y validados por métodos experimentales. Con el objetivo de investigar si el genoma de ZIKV contiene secuencias que puedan formar estructuras en *stem-loop* de pre-miRNAs, se analizó la secuencia completa de la cepa Natal-RGN (Número de acceso: KU527068). Se filtró el archivo de salida del Vmir (GRUNDHOFF 2011) utilizando ajustes personalizados estrictos.

Los resultados de este análisis revelaron seis horquillas que fueron seleccionadas como posibles pre-miRNA, sugiriendo la potencial capacidad del genoma de esta cepa de ZIKV para codificar miRNAs. Posteriormente, clasificamos las diferentes estructuras en pre-miRNAs reales o pseudo pre-miRNAs mediante la herramienta iMiRNA-SSF (CHEN *et al.* 2016). Este enfoque filtró cuatro de las seis estructuras (MD1, MD13, MD17 y MD21) que fueron categorizadas como pre-miRNA reales. Estas estructuras están presentes en diferentes regiones del genoma ZIKV (Tabla 14).

Tabla 14. Horquillas predichas y secuencias maduras en el genoma de la cepa de ZIKV Natal-RGN^a.

Horquilla	Posición ^a	Región ^b	Score ^c	Clasificación ^d	MFE ^e	Brazo 5' maduro
MD1	190-275	Cápside	170.1	Real	-37.3	AGGCUGCCAGCCGGACUUCUGC
MD13	5125-5231	NS3	189.4	Real	-37.5	UGCUUCGAGCCUUCGAUGCUGAA
MD17	8243-8336	NS5	188.2	Real	-31.7	UGCAGCGUAGGUAUGGGGGAGG
MD21	10724-10808	3'UTR	188.3	Real	-53.8	AGUUUCCACCACGCUGCCGCC

^aPosiciones relativas al genoma de la cepa Natal-RGN (Número de acceso: KU527068). ^bRegión genómica. ^cValor de puntaje en Vmir. ^dClasificación en pseudo pre-miRNA o pre-miRNA real, según la aproximación iMiRNA-SSF (CHEN *et al.* 2016). ^eMFE, Energía libre mínima en kcal/mol.

CONSERVACIÓN DE SECUENCIAS DE MiRNAs ENTRE DIFERENTES GENOMAS DE ZIKV

Como virus de ARN, ZIKV tiene un alto grado de variabilidad y heterogeneidad genética, con una tasa evolutiva en el entorno de $0,98 \times 10^{-3}$ y $1,20 \times 10^{-3}$ s/s/y (FARIA *et al.* 2016; FAJARDO *et al.* 2016a) (ver Objetivo Específico IV). En consecuencia, como se comentó previamente, ZIKV se encuentra diversificado en dos o tres linajes principales (ver Figura 22). Por estas razones nos propusimos investigar el grado de conservación de los pre-miRNAs y miRNAs predichos, entre las diferentes variantes conocidas de ZIKV (ver Tabla 9).

Los resultados de este abordaje revelaron una identidad del 98% entre el pre-miRNA MD1 y las demás secuencias disponibles de ZIKV, y del 100% considerando MD13, MD17 y MD21. Asimismo, comparando las secuencias de miRNAs maduros con todas las variantes de ZIKV, la identidad resultante fue de 100% en todos los casos. Asimismo, el modelo obtenido para las estructuras secundarias de los pre-miRNAs predichos resultó idéntico al obtenido de las demás variantes de ZIKV analizadas (Figura 29). Por consiguiente, los resultados de este análisis revelaron que tanto

los pre-miRNAs como los miRNAs maduros predichos están ampliamente conservados entre diferentes cepas de ZIKV.

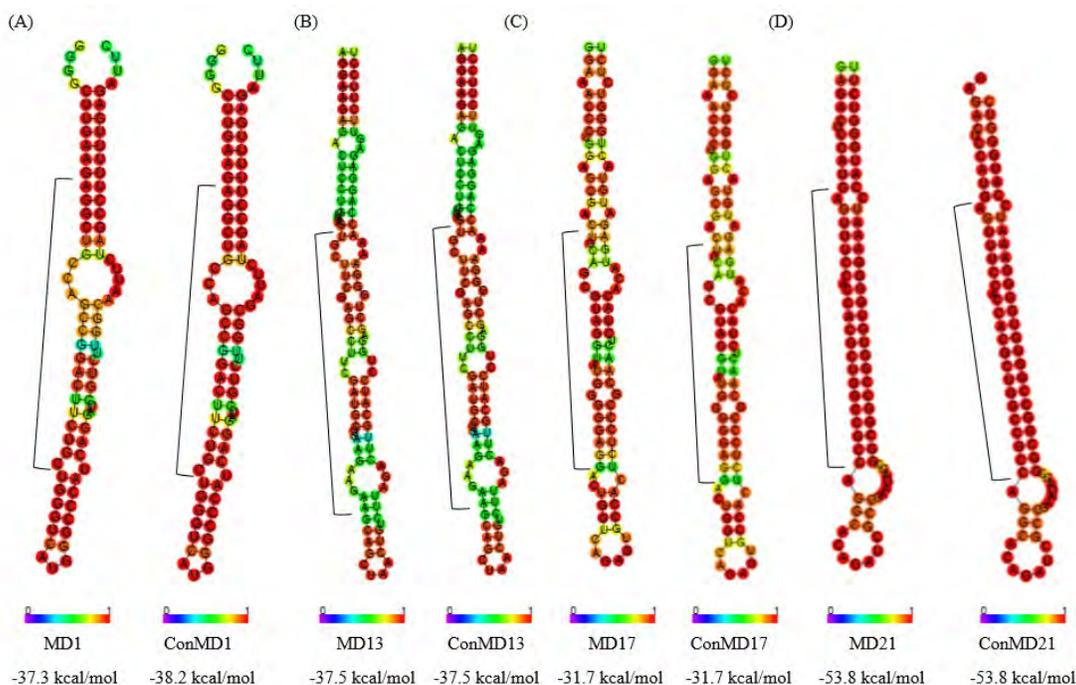


Figura 29. Modelo de las estructuras secundarias de pre-miRNAs. Se muestran las comparaciones de la estructura secundaria predicha para las secuencias de pre-miRNAs encontradas en la cepa Natal-NGR, con la estructura secundaria derivada de las secuencias consenso (con) de otras variantes de ZIKV. Dichas comparaciones se señalan para MD1, MD13, MD17 y MD21, en A, B, C y D, respectivamente, con sus valores de energía libre mínima (MFE). Las barras en la parte inferior de las estructuras denotan probabilidades de apareamiento de bases. Las secuencias de miRNAs maduros se indican mediante una llave recta junto a cada estructura.

PREDICCIÓN DE POTENCIALES BLANCOS ASOCIADOS CON MICROCEFALIA PARA LOS miRNAs DE ZIKV PREDICHOS

Con el fin de comprender la dinámica entre los miRNAs virales y sus dianas, es sumamente importante comprender la complejidad de la regulación biológica y la interacción virus/hospedero. Los análisis *in silico* nos proporcionan un enfoque adecuado para poder identificar blancos de miRNAs en base a la complementariedad parcial o completa encontrada. En el presente estudio se utilizó la base de datos miRTar (Hsu *et al.* 2011) para evaluar el grado de complementariedad existente los diferentes miRNAs predichos (MD1, MD13, MD17 y MD21) y diferentes transcritos de genes asociados con microcefalia. Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 15.

Como puede apreciarse, miRNA-MD1 y miRNA-MD17 hibridan con transcritos de genes humanos asociados con microcefalia.

Tabla 15. Genes asociados con microcefalia identificados mediante análisis *in silico* como blancos de miRNAs de ZIKV predichos.

premiRNA	miRNA predicho	Gen blanco	N. acceso	Descripción de la proteína
MD1	ZIKV-miRNA-MD1	MCPH1	AK022909	Microcefalina 1
		WDR62	BX647726	Repetido WD en proteína 62
		CDK5RAP2	BK005504	Proteína 2 reguladora asociada con la subunidad CDK5 (quinasa dependiente de ciclina 5)
		ASPM	AY367065	Microcefalia Asociada de Tipo Huso Anormal
		CEP152	AB020719	Proteína centrosomal 152
		ZNF335	AK026157	Protein dedo de cinc 335
		PHC1	U89277	Regulador del desarrollo temprano 1
		CENPF	U30872	Proteína centrómero F, 350/400ka (mitosina)
MD17	ZIKV-miRNA-MD17	CENPF	U30872	Proteína centrómero F, 350/400ka (mitosina)

HIBRIDACIÓN EFECTIVA ENTRE MIARNAS PREDICHOS Y TRANSCRIPTOS HUMANOS

Con el fin de evaluar el grado de hibridación entre miRNA-MD1 y miRNA-MD17 y sus transcritos blancos identificados, observamos sus patrones de hibridación y calculamos la energía libre mínima en cada caso. Como se comentó previamente utilizamos condiciones muy estrictas, imponiendo un valor de corte para cada hibridación de -30 kcal/mol. Los resultados se detallan en la Tabla 17.

Tabla 17. Hibridación efectiva entre miRNAs predichos de ZIKV y transcritos humanos.

Predicted miRNA	Target gene	5' target position ^a	Hybridization	MFE ^b (kcal/mol)
ZIKV-miRNA-MD1	MCPH1	2059	target 5' U G A 3' GCGGAGG CCGG U CAGCC CGUCUUC GGCC A GUCGG miRNA 3' A G CC A 5'	-31.6
	WDR62	76	target 5' G U GCG A G A 3' GCGGGAG UCCGGC G G GGCC CGUCUUC AGGCCG C C UCGG miRNA 3' A G A 5'	-36.1
	CDK5RAP2	4733	target 5' A CA A 3' GGAGGUCC GCUG GCGGCC UCUUCAGG CGAC CGUCGG miRNA 3' CG C A 5'	-35.0
	ASPM	50	target 5' A GCCCGCGG CGGGGCCCC G 3' GCGGAGG CC GGCUG GCGGCC CGUCUUC GG CCGAC CGUCGG miRNA 3' A A	-32.0
	ZNF335	1818	target 5' C GCGCACA ACAGCACUCA A 3' GAGGUCCGG UGGC AGCCU CUUCAGGCC ACCG UCGGA miRNA 3' CGU G 5'	-32.0
	PHC1	1758	target 5' G UUU GG G CACA G 3' GC G GUU G GCUGGCAGCU CG C CAG C CGACCGUCGG miRNA 3' U UU G A 5'	-32.9
	CENPF	9300	target 5' G A A C 3' AGAAGUCCG CUG CAGCC UCUUCAGGC GAC GUCGG miRNA 3' CG C C A 5'	-34.4
ZIKV-miRNA-MD17	CENPF	9100	target 5' A AG C 3' CC CCCCC GCCUG GCUGCA GG GGGGG UGGAU CGACGU 5' miRNA 3' A UA G	-34.0

^aPosición 5' del blanco al que se hibrida el miRNA.

DISCUSIÓN

Los miRNAs juegan un papel fundamental en diversos procesos biológicos tales como crecimiento y proliferación celular, diferenciación de tejidos, desarrollo embrionario y apoptosis. Como consecuencia, su desregulación altera la expresión génica pudiendo tener consecuencias patológicas (FAHEEM *et al.* 2015). La microcefalia se caracteriza por una reducción de la circunferencia occipitofrontal (OFC) de la cabeza de al menos 4 desviaciones estándar (SD) por debajo del promedio para la edad y sexo, y es causada por un desarrollo insuficiente del cerebro fetal que afecta principalmente a la corteza cerebral (FAHEEM *et al.* 2015). Varios genes han sido asociados a casos de microcefalia en varias poblaciones alrededor del mundo, entre ellos Microcefalina 1, WDR62, CDK5RAP2, CASC5, ASPM, CENPJ, STIL, CEP135, CEP152, ZNF335, PHC1, CDK6 y CENPF (HUSSAIN *et al.* 2012b) (ver Tabla 13).

Modelos murinos han proporcionado pruebas significativas de que ZIKV puede afectar el desarrollo de células cerebrales y producir microcefalia (LI *et al.* 2016; ROSSI and VASILAKIS 2016). Sin embargo, los mecanismos por los cuales ZIKV altera el desarrollo neurofisiológico siguen siendo desconocidos. Estudios recientes revelaron la capacidad de ZIKV de codificar miRNAs (PYLRO *et al.* 2016), lo que se correlaciona con los resultados encontrados en el presente trabajo (ver Tabla 14). Se analizó la cepa de ZIKV Natal-RGN, que fue aislada del tejido cerebral de un feto diagnosticado con microcefalia (MLAKAR *et al.* 2016). A través de abordajes *in silico*, utilizando condiciones muy estrictas, se evidenciaron cuatro nuevos miRNAs ubicados en diferentes regiones genómicas, cuyas secuencias se encuentran altamente conservadas entre diferentes cepas de ZIKV (ver Tabla 14 y Figura 29). Además, se observó que dos de ellos (miRNA-MD1 y miRNA-MD17) hibridan con transcritos de genes que previamente habían sido asociados con microcefalia (Tabla 15). En particular, bajo condiciones muy rigurosas (MFE > 30,0 kcal/mol) se evidenció que miRNA-MD1 hibrida eficazmente con MCPH1, WDR62, CDK5RAP2, ASPM, ZNF335 y CENPF, mientras que ZIKV-miRNA-MD17 lo hace con CENPF (Tablas 16 y 17). Todos estos genes relacionados con microcefalia han sido encontrados regulados negativamente en estudios *in vivo* utilizando un modelo murino para la infección por ZIKV, lo que condujo a la interrupción del desarrollo neuronal generando microcefalia (LI *et al.* 2016).

Por otra parte, uno de los miRNAs predichos en este estudio (miRNA-MD21) se encontró ubicado en la región 3'UTR del genoma de ZIKV (Tabla 14). Los Flavivirus se caracterizan por tener una 3'UTR relativamente larga y altamente estructurada (CLARKE *et al.* 2015). En esta región contiene varias estructuras en *stem-loop* y otras estructuras terciarias conservadas entre los diferentes miembros de este género (HAHN *et al.* 1987), impidiendo la degradación por RNAsas (PIJLMAN *et al.* 2008). Uno de estos *stem-loops*, el 3'SL, está situado en el extremo final de la 3'UTR y ha demostrado ser crucial para la replicación viral, interactuando con diferentes proteínas (YU *et al.* 2008).

Con el objetivo de investigar la ubicación y las posibles funciones de miRNA-MD21, se modeló la estructura secundaria de la 3'UTR de la secuencia consenso obtenida a partir de los genomas de ZIKV (Figura 30).

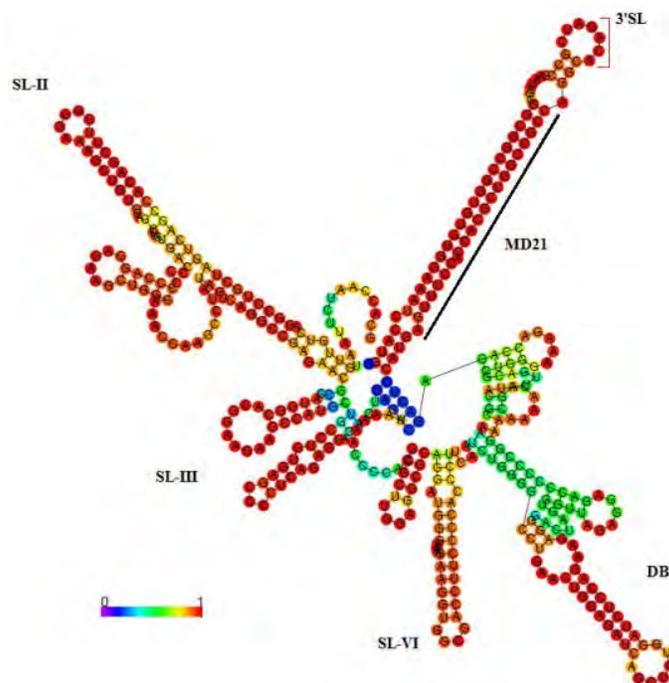


Figura 30. Modelo de la estructura secundaria de la 3'UTR de ZIKV. Los nombres de las distintas estructuras en *stem-loop* (SL) se indican al lado de cada una. La secuencia 5'-ACAG-3', conservada entre Flavivirus en el *loop* del 3'SL se indica por una llave roja. La secuencia del miRNA-MD21 maduro se señala con una línea negra. La barra inferior denota la probabilidad de apareamiento de bases.

Se pudo evidenciar que el pre-miRNA MD21 es idéntico al 3'SL de los Flavivirus y contiene la secuencia corta 5'-ACAG-3' en el bucle superior del 3'SL, que está conservada entre los diferentes miembros de este género (Figura 30). Estudios recientes revelaron la producción de un miRNA (KUN-miR-1) del 3'SL de la 3'UTR de WNV (HUSSAIN *et al.* 2012a; ROBY *et al.* 2014). Se demostró que la producción de este miRNA era necesaria para una replicación eficaz de WNV en células de mosquitos. Asimismo, se evidenció que KUN-miR-1 funciona a través de la regulación de la expresión del factor de transcripción GATA4, que a su vez es necesario para facilitar la replicación del WNV en las células de mosquito (HUSSAIN *et al.* 2012a). Con el fin de observar si GATA4 puede ser un blanco para miRNA-MD21, se calculó su hibridación (Tabla 18). El resultado de este análisis reveló que miRNA-MD21 tiene la capacidad de hibridar con el factor de transcripción GATA4 de *Aedes aegypti* (Tabla 18).

Tabla 18. Hibridación efectiva entre miRNA-MD21 y el transcrito del gen GATA4 de *Aedes aegypti*.

Predicted miRNA	Target gene ^a	Accession number	5' target position ^a	Hybridization	MFE ^b (kcal/mol)
ZIKV-miR-MD21	<i>Aedes aegypti</i> GATA4	XM_001654324	477	target 5' A CAAC AA A 3' GCGGUCAGUG GGU GAGAU CCGCCGGUCGC CCA CUUUG miRNA 3' A C A 5'	-31.1

Asimismo, estudios recientes reportaron la producción de otro miRNA a partir de diferentes estructuras en horquilla localizadas en la 3'UTR de DENV-2 en células de mosquitos infectados (HUSSAIN and ASGARI 2014). Por lo tanto, existe una creciente evidencia sugiriendo el papel de la 3'UTR de Flavivirus como fuente de miRNAs, lo que apoya los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, diferentes detalles de los mecanismos de generación de estos miRNAs y sus potenciales funciones en la replicación viral en hospederos invertebrados requiere aún de una investigación más profunda (CLARKE *et al.* 2015).

Los resultados del presente estudio sugieren el posible rol de miRNAs codificados por ZIKV en la modulación de la expresión de genes humanos asociados con la ocurrencia de casos de microcefalia. Se sugieren diferentes miRNAs candidatos que deben ser confirmados por análisis experimentales.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo revelaron la capacidad del genoma de ZIKV de codificar miRNAs, concordando con estudios recientes (PYLRO *et al.* 2016). Mediante aproximaciones bioinformáticas, utilizando condiciones altamente estrictas, se encontraron cuatro presuntos miRNAs en el genoma de la cepa Natal-RGN, aislada del tejido cerebral de un feto diagnosticado con microcefalia. Estos miRNAs se ubican en diferentes regiones del genoma de ZIKV y sus secuencias están ampliamente conservadas entre diferentes cepas de ZIKV. Dos de estos miRNA (miRNA-MD1 y miRNA-MD17) hibridan efectivamente bajo condiciones altamente rigurosas con transcritos de genes que fueron previamente asociados a procesos que dan lugar a casos de microcefalia. Por otra parte, se predijo la presencia de miRNA-MD21 en el 3'SL de la 3'UTR del genoma de ZIKV, reforzando resultados de estudios recientes que sugieren el potencial de este extremo genómico como fuente de producción de miRNAs. Estos resultados sugieren un posible papel de miRNAs codificados por ZIKV en la modulación de la expresión de genes humanos asociados a casos de microcefalia, los que requerirán ser examinados y validados por métodos experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

- ACHESON N. H., 2011 *Fundamentals of molecular virology*. John Wiley & Sons.
- ADAMS A. P., TRAVASSOS DA ROSA A. P. A., NUNES M. R., XIAO S.-Y., TESH R. B., 2013 Pathogenesis of Modoc virus (Flaviviridae; Flavivirus) in persistently infected hamsters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **88**: 455–60.
- ADRIÁN DIAZ L., KOMAR N., VISINTIN A., DANTUR JURI M. J., STEIN M., LOBO ALLENDE R., SPINSANTI L., KONIGHEIM B., AGUILAR J., LAURITO M., ALMIRÓN W., CONTIGIANI M., 2008 West Nile virus in birds, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 689–91.
- AKOUA-KOFFI C., DIARRASSOUBA S., BÉNIÉ V. B., NGBICHI J. M., BOZOUA T., BOSSON A., AKRAN V., CARNEVALE P., EHOUMAN A., 2001 [Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Côte d'Ivoire in 1999]. *Bull. la Société Pathol. Exot.* **94**: 227–30.
- ALKAN C., ZAPATA S., BICHAUD L., MOUREAU G., LEMEY P., FIRTH A. E., GRITSUN T. S., GOULD E. A., LAMBALLERIE X. DE, DEPAQUIT J., CHARREL R. N., 2015 Ecuador Paraiso Escondido Virus, a New Flavivirus Isolated from New World Sand Flies in Ecuador, Is the First Representative of a Novel Clade in the Genus Flavivirus. *J. Virol.* **89**: 11773–85.
- ALMEIDA M. I., REIS R. M., CALIN G. A., 2011 MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **717**: 1–8.
- ALVAREZ D. E., LODEIRO M. F., LUDUEÑA S. J., PIETRASANTA L. I., GAMARNIK A. V., 2005 Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* **79**: 6631–43.
- AMBROS V., 2001 microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* **107**: 823–6.
- ANDERSON R., 2003 Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Adv. Virus Res.* **59**: 229–74.
- ANDREWS S., 2010 FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- AQUINO V. H., ANATRIELLO E., GONÇALVES P. F., SILVA E. V DA, VASCONCELOS P. F. C., VIEIRA D. S., BATISTA W. C., BOBADILLA M. L., VAZQUEZ C., MORAN M., FIGUEIREDO L. T. M., 2006 Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002–2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**: 710–5.
- ARTSOB H., GUBLER D. J., ENRIA D. A., MORALES M. A., PUPO M., BUNNING M. L., DUDLEY J. P., 2009 West Nile Virus in the New World: trends in the spread and proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses Public Health* **56**: 357–69.
- ATKINSON B., HEARN P., AFROUGH B., LUMLEY S., CARTER D., AARONS E. J., SIMPSON A. J., BROOKS T. J., HEWSON R., 2016 Detection of Zika Virus in Semen. *Emerg. Infect. Dis.* **22**: 940.
- AYERS M., ADACHI D., JOHNSON G., ANDONOVA M., DREBOT M., TELLIER R., 2006 A single tube RT-PCR assay for the detection of mosquito-borne flaviviruses. *J. Virol. Methods* **135**: 235–239.
- BALEOTTI F. G., MORELI M. L., FIGUEIREDO L. T. M., 2003 Brazilian Flavivirus phylogeny based on NS5. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**: 379–382.
- BANCROFT W. H., SCOTT R. M., SNITBHAN R., WEAVER R. E., GOULD D. J., 1976 Isolation of Langkat virus from *Haemaphysalis papuana* Thorell in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **25**: 500–4.
- BARBANTI-BRODANO G., SWETLY P., KOPROWSKI H., 1970 Superinfection of simian virus 40-transformed permissive cells with simian virus 40. *J. Virol.* **6**: 644–51.
- BARNETT E. D., 2007 Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin. Infect. Dis.* **44**: 850–6.
- BARTENSCHLAGER R., MILLER S., 2008 Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol.* **3**: 155–65.
- BATISTA W. C., TAVARES G. da S. B., VIEIRA D. S., HONDA E. R., PEREIRA S. S., TADA M. S., 2011 Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the State of Rondônia, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **44**: 528–530.

- BELL J. F., THOMAS L. A., 1964 A new virus, "MML", enzootic in bats (*Myotis lucifugus*) of Montana. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **13**: 607–12.
- BELTRÁN F. J., BECHARA Y. I., GUIDO G. G., CICCUTTI G. L., BEAUDOIN J. B., GURY DOHMEN F. E., 2014 Detección molecular de virus de encefalitis de Saint Louis en mosquitos de Buenos Aires, Argentina. *Med. (Buenos Aires)* **74**: 433–436.
- BENNETT S. N., HOLMES E. C., CHIRIVELLA M., RODRIGUEZ D. M., BELTRAN M., VORNDAM V., GUBLER D. J., McMILLAN W. O., 2003a Selection-Driven Evolution of Emergent Dengue Virus. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1650–1658.
- BENNETT S. N., HOLMES E. C., CHIRIVELLA M., RODRIGUEZ D. M., BELTRAN M., VORNDAM V., GUBLER D. J., McMILLAN W. O., 2003b Selection-Driven Evolution of Emergent Dengue Virus. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1650–1658.
- BENNETT S. N., DRUMMOND A. J., KAPAN D. D., SUCHARD M. A., MUÑOZ-JORDÁN J. L., PYBUS O. G., HOLMES E. C., GUBLER D. J., 2010 Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 811–8.
- BERRIOS V., KURANE I., ENNIS F. A., 1996 Immunomodulatory effects of IL-7 on dengue virus-specific cytotoxic CD4+ T cell clones. *Immunol. Invest.* **25**: 231–40.
- BERTHET N., NAKOUNÉ E., KAMGANG B., SELEKON B., DESCORPS-DECLÈRE S., GESSAIN A., MANUGUERRA J.-C., KAZANJI M., 2014 Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **14**: 862–5.
- BESNARD M., LASTÈRE S., TEISSIER A., CAO-LORMEAU V., MUSSO D., 2014 Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* **19**.
- BESNARD M., EYROLLE-GUIGNOT D., GUILLEMETTE-ARTUR P., LASTÈRE S., BOST-BEZEAUD F., MARCELIS L., ABADIE V., GAREL C., MOUTARD M.-L., JOUANNIC J.-M., ROZENBERG F., LEPARC-GOFFART I., MALLET H.-P., 2016 Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* **21**.
- BILLOIR F., CHESSE R. DE, TOLOU H., MICCO P. DE, GOULD E. A., LAMBALLERIE X. DE, 2000 Phylogeny of the genus flavivirus using complete coding sequences of arthropod-borne viruses and viruses with no known vector. *J. Gen. Virol.* **81**: 781–90.
- BLITVICH B. J., FIRTH A. E., 2015 Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses* **7**: 1927–59.
- BOGOVIC P., STRLE F., 2015 Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J. Clin. cases* **3**: 430–41.
- BOLLING B. G., EISEN L., MOORE C. G., BLAIR C. D., 2011 Insect-specific flaviviruses from *Culex* mosquitoes in Colorado, with evidence of vertical transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**: 169–77.
- BOLLING B. G., OLEA-POPELKA F. J., EISEN L., MOORE C. G., BLAIR C. D., 2012 Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology* **427**: 90–7.
- BONDRE V. P., SAPKAL G. N., YERGOLKAR P. N., FULMALI P. V., SANKARARAMAN V., AYACHIT V. M., MISHRA A. C., GORE M. M., 2009 Genetic characterization of Bagaza virus (BAGV) isolated in India and evidence of anti-BAGV antibodies in sera collected from encephalitis patients. *J. Gen. Virol.* **90**: 2644–9.
- BOORMAN J. P., PORTERFIELD J. S., 1956 A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **50**: 238–42.
- BOORMAN J. P., 1958 Transmission of Uganda S virus by *Aedes* (*Stegomyia*) *Aegypti* Linn. *Trans. R.*

- Soc. Trop. Med. Hyg. **52**: 383–388.
- BRAULT A. C., HUANG C. Y.-H., LANGEVIN S. A., KINNEY R. M., BOWEN R. A., RAMEY W. N., PANELLA N. A., HOLMES E. C., POWERS A. M., MILLER B. R., 2007 A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat. Genet.* **39**: 1162–6.
- BRAVERMAN Y., DAVIDSON I., CHIZOV-GINZBURG A., CHASTEL C., 2003 Detection of Israel turkey meningoencephalitis virus from mosquito (Diptera: Culicidae) and Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) species and its survival in *Culex pipiens* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Phlebotomidae). *J. Med. Entomol.* **40**: 518–21.
- BRAVO J. R., GUZMÁN M. G., KOURI G. P., 1987 Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 816–20.
- BREINHOLT J. W., KAWAHARA A. Y., 2013 Phylotranscriptomics: saturated third codon positions radically influence the estimation of trees based on next-gen data. *Genome Biol. Evol.* **5**: 2082–92.
- BRINTON M. A., FERNANDEZ A. V., DISPOTO J. H., 1986 The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology* **153**: 113–21.
- BRUYCKER-NOGUEIRA F. DE, NOGUEIRA R. M. R., FARIA N. R. da C., SIMÕES J. B. S., NUNES P. C. G., FILIPPIS A. M. B. DE, SANTOS F. B. DOS, 2015 Insights of the genetic diversity of DENV-1 detected in Brazil in 25years: Analysis of the envelope domain III allows lineages characterization. *Infect. Genet. Evol.* **34**: 126–136.
- BRUYCKER-NOGUEIRA F. DE, MIR D., SANTOS F. B. DOS, BELLO G., 2016 Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. *Infect. Genet. Evol.* **45**: 454–460.
- BUATHONG R., HERMANN L., THAISOMBOONSUK B., RUTVISUTTINUNT W., KLUNGTHONG C., CHINNAWIROTPISAN P., MANASATIENKIJ W., NISALAK A., FERNANDEZ S., YOON I.-K., AKRASEWI P., PLIPAT T., 2015 Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**: 380–383.
- BURGUEÑO A., 2012 Estudio de la circulación de arbovirus en Uruguay. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (disponible en <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/3931/1/uy24-16170.pdf>).
- BURGUEÑO A., SPINSANTI L., DÍAZ L. A., RIVAROLA M. E., ARBIZA J., CONTIGIANI M., DELFRARO A., 2013 Seroprevalence of St. Louis encephalitis virus and West Nile virus (Flavivirus, Flaviviridae) in horses, Uruguay. *Biomed Res. Int.* **2013**: 582957.
- BURNS K. F., FARINACCI C. J., 1956 Virus of bats antigenically related to St. Louis encephalitis. *Science* **123**: 227.
- BURNS C. C., SHAW J., CAMPAGNOLI R., JORBA J., VINCENT A., QUAY J., KEW O., 2006 Modulation of Poliovirus Replicative Fitness in HeLa Cells by Deoptimization of Synonymous Codon Usage in the Capsid Region. *J. Virol.* **80**: 3259–3272.
- BUTT A. M., NASRULLAH I., TONG Y., 2014 Genome-Wide Analysis of Codon Usage and Influencing Factors in Chikungunya Viruses (F Baldanti, Ed.). *PLoS One* **9**: e90905.
- CALISHER C. H., GUTIERREZ E., FRANCOY D. B., ALAVA A., MUTH D. J., LAZUICK J. S., 1983 Identification of hitherto unrecognized arboviruses from Ecuador: members of serogroups B, C, Bunyamwera, Patois, and Minatitlan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 877–85.
- CALISHER C. H., KARABATSOS N., DALRYMPLE J. M., SHOPE R. E., PORTERFIELD J. S., WESTAWAY E. G., BRANDT W. E., 1989 Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.* **70 (Pt 1)**: 37–43.
- CALISHER C. H., GOULD E. A., 2003 Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv. Virus Res.* **59**: 1–19.
- CALISHER C. H., CHILDS J. E., FIELD H. E., HOLMES K. V., SCHOUNTZ T., 2006 Bats: Important Reservoir

- Hosts of Emerging Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 531–545.
- CALVET G., AGUIAR R. S., MELO A. S. O., SAMPAIO S. A., FILIPPIS I. DE, FABRI A., ARAUJO E. S. M., SEQUEIRA P. C. DE, MENDONÇA M. C. L. DE, OLIVEIRA L. DE, TSCHOEKE D. A., SCHRAGO C. G., THOMPSON F. L., BRASIL P., SANTOS F. B. DOS, NOGUEIRA R. M. R., TANURI A., FILIPPIS A. M. B. DE, 2016 Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* **16**: 653–660.
- CALZOLARI M., ZÉ-ZÉ L., RŮŽEK D., VÁZQUEZ A., JEFFRIES C., DEFILIPPO F., OSÓRIO H. C., KILIAN P., RUÍZ S., FOOKS A. R., MAIOLI G., AMARO F., TLUSTY M., FIGUEROLA J., MEDLOCK J. M., BONILAUDI P., ALVES M. J., ŠEBESTA O., TENORIO A., VAUX A. G. C., BELLINI R., GELBIČ I., SÁNCHEZ-SECO M. P., JOHNSON N., DOTTORI M., 2012 Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *J. Gen. Virol.* **93**: 1215–25.
- CAMPOS G. S., BANDEIRA A. C., SARDI S. I., 2015 Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 1885–6.
- CAO-LORMEAU V.-M., ROCHE C., TEISSIER A., ROBIN E., BERRY A.-L., MALLET H.-P., SALL A. A., MUSSO D., 2014 Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **20**: 1085–6.
- CAREY D. E., 1971 Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J. Hist. Med. Allied Sci.* **26**: 243–62.
- CARNEIRO A. R., CRUZ A. C. R., VALLINOTO M., MELO D. de V., RAMOS R. T. J., MEDEIROS D. B. A., SILVA E. V. P. da, VASCONCELOS P. F. da C., 2012 Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **107**: 805–12.
- CARRERA J.-P., GUZMAN H., BELTRÁN D., DÍAZ Y., LÓPEZ-VERGÈS S., TORRES-COSME R., POPOV V., WIDEN S. G., WOOD T. G., WEAVER S. C., CÁCERES-CARRERA L., VASILAKIS N., TESH R. B., 2015 Mercadeo Virus: A Novel Mosquito-Specific Flavivirus from Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**: 1014–9.
- CARTEAUX G., MAQUART M., BEDET A., CONTOU D., BRUGIÈRES P., FOURATI S., CLERET DE LANGAVANT L., BROUCKER T. DE, BRUN-BUISSON C., LEPARC-GOFFART I., MEKONTSO DESSAP A., 2016 Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1602964>.
- CASTRESANA J., 2000 Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 540–52.
- CAUCHEMEZ S., BESNARD M., BOMPARD P., DUB T., GUILLEMETTE-ARTUR P., EYROLLE-GUIGNOT D., SALJE H., KERKHOVE M. D. VAN, ABADIE V., GAREL C., FONTANET A., MALLET H.-P., 2016 Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. www.thelancet.com **387**.
- CHAMBERS T. J., HAHN C. S., GALLER R., RICE C. M., 1990 Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 649–88.
- CHARLIER N., LEYSSEN P., PLEIJ C. W. A., LEMEY P., BILLOIR F., LAETHEM K. VAN, VANDAMME A.-M., CLERCQ E. DE, LAMBALLERIE X. DE, NEYTS J., 2002 Complete genome sequence of Montana Myotis leukoencephalitis virus, phylogenetic analysis and comparative study of the 3' untranslated region of flaviviruses with no known vector. *J. Gen. Virol.* **83**: 1875–85.
- CHARREL R. N., ZAKI A. M., ATTOUI H., FAKHEH M., BILLOIR F., YOUSEF A. I., CHESSE R. DE, MICCO P. DE, GOULD E. A., LAMBALLERIE X. DE, 2001 Complete Coding Sequence of the Alkhurma Virus, a Tick-Borne Flavivirus Causing Severe Hemorrhagic Fever in Humans in Saudi Arabia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**: 455–461.
- CHARREL R. N., ATTOUI H., BUTENKO A. M., CLEGG J. C., DEUBEL V., FROLOVA T. V., GOULD E. A., GRITSUN T. S., HEINZ F. X., LABUDA M., LASHKEVICH V. A., LOKTEV V., LUNDKVIST A., LVOV D. V., MANDL C. W., NIEDRIG M., PAPA A., PETROV V. S., PLYUSNIN A., RANDOLPH S., SÜSS J., ZLOBIN V. I., LAMBALLERIE X. DE, 2004 Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**: 1040–1055.

- CHASTEL C., MAIN A. J., GUIGUEN C., LAY G. LE, QUILLIEN M. C., MONNAT J. Y., BEAUCOURNU J. C., 1985 The isolation of Meaban virus, a new Flavivirus from the seabird tick *Ornithodoros (Alectorobius) maritimus* in France. *Arch. Virol.* **83**: 129–140.
- CHEN Y., MAGUIRE T., MARKS R. M., 1996 Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J. Virol.* **70**: 8765–72.
- CHEN Y., MAGUIRE T., HILEMAN R. E., FROMM J. R., ESKO J. D., LINHARDT R. J., MARKS R. M., 1997 Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* **3**: 866–71.
- CHEN J., WANG X., LIU B., 2016 iMiRNA-SSF: Improving the Identification of MicroRNA Precursors by Combining Negative Sets with Different Distributions. *Sci. Rep.* **6**: 19062.
- CHOUIN-CARNEIRO T., VEGA-RUA A., VAZEILLE M., YEBAKIMA A., GIROD R., GOINDIN D., DUPONT-ROUZEYROL M., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R., FAILLOUX A.-B., 2016 Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**: e0004543.
- CHRISTENBURY J. G., AW P. P. K., ONG S. H., SCHREIBER M. J., CHOW A., GUBLER D. J., VASUDEVAN S. G., OOI E. E., HIBBERD M. L., 2010 *A method for full genome sequencing of all four serotypes of the dengue virus.*
- CHRISTENSEN H. A., VASQUEZ A. M. DE, BOREHAM M. M., 1996 Host-feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from central Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**: 202–8.
- CLARKE B. D., ROBY J. A., SLONCHAK A., KHROMYKH A. A., 2015 Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Res.* **206**: 53–61.
- CLYDE K., KYLE J. L., HARRIS E., 2006 Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.* **80**: 11418–31.
- COIMBRA T. L., NASSAR E. S., NAGAMORI A. H., FERREIRA I. B., PEREIRA L. E., ROCCO I. M., UEDA-ITO M., ROMANO N. S., 1993 Iguape: a newly recognized flavivirus from São Paulo State, Brazil. *Intervirology* **36**: 144–52.
- COLOGNA R., ARMSTRONG P. M., RICO-HESSÉ R., 2005 Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J. Virol.* **79**: 853–9.
- COLPITTS T. M., CONWAY M. J., MONTGOMERY R. R., FIKRIG E., 2012 West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**: 635–648.
- COOK S., HOLMES E. C., 2006 A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Arch. Virol.* **151**: 309–25.
- COOK S., MOUREAU G., HARBACH R. E., MUKWAYA L., GOODGER K., SSENFUKA F., GOULD E., HOLMES E. C., LAMBALLERIE X. DE, 2009 Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex flavivirus* (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. *J. Gen. Virol.* **90**: 2669–78.
- COOK S., CHUNG B. Y.-W., BASS D., MOUREAU G., TANG S., MCALISTER E., CULVERWELL C. L., GLÜCKSMAN E., WANG H., BROWN T. D. K., GOULD E. A., HARBACH R. E., LAMBALLERIE X. DE, FIRTH A. E., 2013 Novel virus discovery and genome reconstruction from field RNA samples reveals highly divergent viruses in dipteran hosts. *PLoS One* **8**: e80720.
- CORDEIRO M. T., PENA L. J., BRITO C. A., GIL L. H., MARQUES E. T., WHO, LANCIOTTI R., KOSOY O., JANEEN J., AL. et, CARROLLA I., TOOVEY S., TUNKEL A., GLASER C., BLOCH K., AL. et, 2016 Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *Lancet* **387**: 1811–1812.
- CORNET M., ROBIN Y., CHATEAU R., HÈME G., ADAM C., VALADE M., GONIDEC G. LE, JAN C., RENAUDET J., DIENG P. L., BANGOURA J. F., LORAND A., 1979a Isolements d'arbovirus au Sénégal oriental à partir de moustiques (1972-1977) et notes sur l'épidémiologie des virus transmis par les *Aedes*, en particulier du virus amaril. *Cah. ORSTOM. Série Entomol. Médicale Parasitol.* **17**:

149–163.

- CORNET M., ROBIN Y., ADAM C., VALADE M., CALVO M. A., 1979b Comparison between experimental transmission of yellow fever and Zika viruses in *Aedes aegypti* [arbovirus diseases, Ethiopian region, Senegal]. *Cah. Ser. Entomol. Medicale Parasitol.* **27**: 47–53.
- COSTAFREDA M. I., PEREZ-RODRIGUEZ F. J., D'ANDREA L., GUIX S., RIBES E., BOSCH A., PINTO R. M., 2014 Hepatitis A Virus Adaptation to Cellular Shutoff Is Driven by Dynamic Adjustments of Codon Usage and Results in the Selection of Populations with Altered Capsids. *J. Virol.* **88**: 5029–5041.
- CRILL W. D., ROEHRIG J. T., 2001 Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J. Virol.* **75**: 7769–73.
- CRISTINA J., MORENO P., MORATORIO G., MUSTO H., 2015 Genome-wide analysis of codon usage bias in Ebolavirus. *Virus Res.* **196**: 87–93.
- CRISTINA J., ECHEVERRIA N., GAMBARO F., FAJARDO A., MORENO P., 2016a Genome-wide prediction of microRNAs in Zika virus genomes reveals possible interactions with human genes involved in the nervous system development. *bioRxiv*.
- CRISTINA J., FAJARDO A., SOÑORA M., MORATORIO G., MUSTO H., 2016b A detailed comparative analysis of codon usage bias in Zika virus. *Virus Res.* **223**: 147–152.
- CUI C., GRIFFITHS A., LI G., SILVA L. M., KRAMER M. F., GAASTERLAND T., WANG X.-J., COEN D. M., 2006 Prediction and Identification of Herpes Simplex Virus 1-Encoded MicroRNAs. *J. Virol.* **80**: 5499–5508.
- CUNHA M. D. P., GUIMARÃES V. N., SOUZA M., PAULA CARDOSO D. das D. DE, ALMEIDA T. N. V. DE, OLIVEIRA T. S. DE, FIACCADORI F. S., 2016 Phylodynamics of DENV-1 reveals the spatiotemporal co-circulation of two distinct lineages in 2013 and multiple introductions of dengue virus in Goiás, Brazil. *Infect. Genet. Evol.* **43**: 130–4.
- D'ORTENZIO E., MATHERON S., LAMBALLERIE X. DE, HUBERT B., PIORKOWSKI G., MAQUART M., DESCAMPS D., DAMOND F., YAZDANPANAH Y., LEPARC-GOFFART I., 2016a Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1604449>.
- D'ORTENZIO E., MATHERON S., YAZDANPANAH Y., LAMBALLERIE X. DE, HUBERT B., PIORKOWSKI G., MAQUART M., DESCAMPS D., DAMOND F., LEPARC-GOFFART I., 2016b Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* **374**: 2195–8.
- DARRIBA D., TABOADA G. L., DOALLO R., POSADA D., 2011 ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **27**: 1164–5.
- DARWISH M. A., HOOGSTRAAL H., ROBERTS T. J., AHMED I. P., OMAR F., 1983 A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 442–445.
- DAVIDSON A., SLAVINSKI S., KOMOTO K., RAKEMAN J., WEISS D., 2016 Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**.
- DECKARD D. T., CHUNG W. M., BROOKS J. T., SMITH J. C., WOLDAI S., HENNESSEY M., KWIT N., MEAD P., 2016 Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - Texas, January 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**: 372–4.
- DEJNIRATTISAI W., SUPASA P., WONGWIWAT W., ROUVINSKI A., BARBA-SPAETH G., DUANGCHINDA T., SAKUNTABHAI A., CAO-LORMEAU V.-M., MALASIT P., REY F. A., MONGKOLSAPAYA J., SCREATON G. R., 2016 Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat. Immunol.*
- DELFRARO A., 2002 *Arbovirus en Uruguay: Dengue - Diagnóstico. Serie Monografías del Instituto de Higiene. Virus y Virología Médica*. Montevideo.
- DELPORT W., POON A. F. Y., FROST S. D. W., KOSAKOVSKY POND S. L., 2010 Datamonkey 2010: a suite of

- phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* **26**: 2455–7.
- DENG C., LIU S., ZHANG Q., XU M., ZHANG H., GU D., SHI L., HE J., XIAO G., ZHANG B., 2016 Isolation and characterization of Zika virus imported to China using C6/36 mosquito cells. *Viol. Sin.* **31**: 176–9.
- DIALLO D., SALL A. A., DIAGNE C. T., FAYE O., FAYE O., BA Y., HANLEY K. A., BUENEMANN M., WEAVER S. C., DIALLO M., 2014 Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011 (H Attoui, Ed.). *PLoS One* **9**: e109442.
- DIAMOND M. S., 2003 Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunol. Cell Biol.* **81**: 196–206.
- DIAZ L. A., RÉ V., ALMIRÓN W. R., FARÍAS A., VÁZQUEZ A., SANCHEZ-SECO M. P., AGUILAR J., SPINSANTI L., KONIGHEIM B., VISINTIN A., GARCÍA J., MORALES M. A., TENORIO A., CONTIGIANI M., 2006 Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1752–4.
- DÍAZ L. A., ALBRIEU LLINÁS G., VÁZQUEZ A., TENORIO A., CONTIGIANI M. S., 2012 Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Cordoba, Argentina (2005). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**: e1489.
- DICK G. W. A., KITCHEN S. F., HADDOW A. J., 1952 Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**: 509–20.
- DIGOUTTE J. P., PAJOT F. X., BRÈS P., N'GUYEN TRUNG LUONG P., 1971 [Bouboui virus (BA 409), a new arbovirus prototype isolated in Central African Republic]. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. **120**: 98–106.
- DILCHER M., SALL A. A., HUFERT F. T., WEIDMANN M., 2013 Full-length genome sequence of Ntaya virus. *Virus Genes* **46**: 162–4.
- DIRLIKOV E., MAJOR C. G., MAYSHACK M., MEDINA N., MATOS D., RYFF K. R., TORRES-APONTE J., ALKIS R., MUNOZ-JORDAN J., COLON-SANCHEZ C., SALINAS J. L., PASTULA D. M., GARCIA M., SEGARRA M. O., MALAVE G., THOMAS D. L., RODRÍGUEZ-VEGA G. M., LUCIANO C. A., SEIVAR J., SHARP T. M., RIVERA-GARCIA B., 2016 Guillain-Barré Syndrome During Ongoing Zika Virus Transmission - Puerto Rico, January 1-July 31, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**: 910–4.
- DOHERTY R. L., CARLEY J. G., MACKERRAS M. J., MARKS E. N., 1963 Studies of arthropod-borne virus infections in Queensland. III. Isolation and characterization of virus strains from wild-caught mosquitoes in North Queensland. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **41**: 17–39.
- DONG T., MORAN E., VINH CHAU N., SIMMONS C., LUHN K., PENG Y., WILLS B., PHUONG DUNG N., THI THU THAO L., HIEN T. T., MCMICHAEL A., FARRAR J., ROWLAND-JONES S., 2007 High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. *PLoS One* **2**: e1192.
- DONNELLY P., TAVARÉ S., 1995 Coalescents and genealogical structure under neutrality. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 401–21.
- DORN A., KIPPENBERGER S., 2008 Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **10**: 10–20.
- DRIGGERS R. W., HO C.-Y., KORHONEN E. M., KUIVANEN S., JÄÄSKELÄINEN A. J., SMURA T., ROSENBERG A., HILL D. A., DEBIASI R. L., VEZINA G., TIMOFFEV J., RODRIGUEZ F. J., LEVANOV L., RAZAK J., IYENGAR P., HENNENFENT A., KENNEDY R., LANCIOTTI R., PLESSIS A. DU, VAPALAHTI O., 2016 Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N. Engl. J. Med.* **374**: 2142–2151.
- DRUMMOND A. J., HO S. Y. W., PHILLIPS M. J., RAMBAUT A., 2006 Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* **4**: e88.
- DRUMMOND A. J., RAMBAUT A., 2007 BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* **7**: 214.
- DRUMOND B. P., MONDINI A., SCHMIDT D. J., BOSCH I., NOGUEIRA M. L., 2012 Population dynamics of

- DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Arch. Virol.* **157**: 2061–2073.
- DUFFY M. R., CHEN T.-H., HANCOCK W. T., POWERS A. M., KOOL J. L., LANCIOTTI R. S., PRETRICK M., MARFEL M., HOLZBAUER S., DUBRAY C., GUILLAUMOT L., GRIGGS A., BEL M., LAMBERT A. J., LAVEN J., KOSOY O., PANELLA A., BIGGERSTAFF B. J., FISCHER M., HAYES E. B., 2009 Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**: 2536–43.
- DUPONT-ROUZEYROL M., O’CONNOR O., CALVEZ E., DAURÈS M., JOHN M., GRANGEON J.-P., GOURINAT A.-C., 2015 Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 381–2.
- EDGAR R. C., 2004 MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1792–7.
- EDGIL D., POLACEK C., HARRIS E., 2006 Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J. Virol.* **80**: 2976–86.
- ENFISSI A., CODRINGTON J., ROOSBLAD J., KAZANJI M., ROUSSET D., LANCIOTTI R., KOSOY O., LAVEN J., AL. et, CAO-LORMEAU V., MUSSO D., OEHLER E., WATRIN L., LARRE P., AL. et, ZANLUCA C., MELO V. de, MOSIMANN A., SANTOS G. Dos, SANTOS C. Dos, LUZ K., WHO, ECDC, 2016 Zika virus genome from the Americas. *Lancet (London, England)* **387**: 227–8.
- ENGEL D., JÖST H., WINK M., BÖRSTLER J., BOSCH S., GARIGLIANY M.-M., JÖST A., CZAJKA C., LÜHKEN R., ZIEGLER U., GROSCHUP M. H., PFEFFER M., BECKER N., CADAR D., SCHMIDT-CHANASIT J., 2016 Reconstruction of the Evolutionary History and Dispersal of Usutu Virus, a Neglected Emerging Arbovirus in Europe and Africa. *MBio* **7**: e01938-15.
- ESPINOSA M., GIAMPERETTI S., ABRIL M., SEIJO A., 2014 Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. *Rev. do Inst. Med. Trop. São Paulo* **56**: 165–7.
- FAGBAMI A. H., 1979a Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J. Hyg. (Lond)*. **83**: 213–9.
- FAGBAMI A. H., 1979b Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J. Hyg. (Lond)*. **83**: 213.
- FAHEEM M., NASEER M. I., RASOOL M., CHAUDHARY A. G., KUMOSANI T. A., ILYAS A. M., PUSHPARAJ P. N., AHMED F., ALGAHTANI H. A., AL-QAHTANI M. H., SALEH JAMAL H., 2015 Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med. Genomics* **8**: S4.
- FAIRBROTHER A., YUILL T. M., 1987 Experimental infection and horizontal transmission of Modoc virus in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J. Wildl. Dis.* **23**: 179–85.
- FAJARDO A., RECAREY R., MORA D. DE, ANDREA L. D’, ALVAREZ M., REGATO M., COLINA R., KHAN B., CRISTINA J., 2009 Modeling gene sequence changes over time in type 3 dengue viruses from Ecuador. *Virus Res.* **141**: 105–109.
- FAJARDO A., SOÑORA M., MORENO P., MORATORIO G., CRISTINA J., 2016a Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and diversification of Zika virus populations. *J. Med. Virol.*
- FAJARDO Á., CRISTINA J., MORENO P., 2016b Emergence and Spreading Potential of Zika Virus. *Front. Microbiol.* **7**.
- FARFAN-ALE J. A., LOROÑO-PINO M. A., GARCIA-REJON J. E., HOVAV E., POWERS A. M., LIN M., DORMAN K. S., PLATT K. B., BARTHOLOMAY L. C., SOTO V., BEATY B. J., LANCIOTTI R. S., BLITVICH B. J., 2009 Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**: 85–95.
- FARIA N. R., AZEVEDO R. do S. da S., KRAEMER M. U. G., SOUZA R., CUNHA M. S., HILL S. C., THÉZÉ J., BONSALE M. B., BOWDEN T. A., RISSANEN I., ROCCO I. M., NOGUEIRA J. S., MAEDA A. Y., VASAMI F. G. da S., MACEDO F. L. de L., SUZUKI A., RODRIGUES S. G., CRUZ A. C. R., NUNES B. T., MEDEIROS D. B.

- de A., RODRIGUES D. S. G., NUNES QUEIROZ A. L., SILVA E. V. P. DA, HENRIQUES D. F., TRAVASSOS DA ROSA E. S., OLIVEIRA C. S. DE, MARTINS L. C., VASCONCELOS H. B., CASSEB L. M. N., SIMITH D. de B., MESSINA J. P., ABADE L., LOURENÇO J., CARLOS JUNIOR ALCANTARA L., LIMA M. M. DE, GIOVANETTI M., HAY S. I., OLIVEIRA R. S. DE, LEMOS P. da S., OLIVEIRA L. F. DE, LIMA C. P. S. DE, SILVA S. P. DA, VASCONCELOS J. M. DE, FRANCO L., CARDOSO J. F., VIANEZ-JÚNIOR J. L. da S. G., MIR D., BELLO G., DELATORRE E., KHAN K., CREATORE M., COELHO G. E., OLIVEIRA W. K. DE, TESH R., PYBUS O. G., NUNES M. R. T., VASCONCELOS P. F. C., 2016 Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **352**: 345–9.
- FAYE O., FREIRE C. C. M., IAMARINO A., FAYE O., OLIVEIRA J. V. C. DE, DIALLO M., ZANOTTO P. M. A., SALL A. A., 2014 Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**: e2636.
- FELSENSTEIN J., 2006 Evolutionary Theory: Mathematical and Conceptual Foundations. *Q. Rev. Biol.* **81**: 171–171.
- FERGUSON N. M., RODRÍGUEZ-BARRAQUER I., DORIGATTI I., MIER-Y-TERAN-ROMERO L., LAYDON D. J., CUMMINGS D. A. T., 2016 Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science* (80-.). **353**.
- 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**: 318–28.
- FIGUEIREDO L. T., 2000 The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* **2**: 1643–9.
- FILOMATORI C. V., LODEIRO M. F., ALVAREZ D. E., SAMSA M. M., PIETRASANTA L., GAMARNIK A. V., 2006 A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* **20**: 2238–49.
- FINK J., GU F., LING L., TOLFVENSTAM T., OLFAT F., CHIN K. C., AW P., GEORGE J., KUZNETSOV V. A., SCHREIBER M., VASUDEVAN S. G., HIBBERD M. L., 2007 Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **1**: e86.
- FONSECA K., MEATHERALL B., ZARRA D., DREBOT M., MACDONALD J., PABBARAJU K., WONG S., WEBSTER P., LINDSAY R., TELLIER R., 2014 First Case of Zika Virus Infection in a Returning Canadian Traveler. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **91**: 1035–1038.
- FONTENILLE D., TRAORE-LAMIZANA M., TROUILLET J., LECLERC A., MONDO M., BA Y., DIGOUTTE J. P., ZELLER H. G., 1994 First isolations of arboviruses from phlebotomine sand flies in West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 570–4.
- FRANK C., CADAR D., SCHLAPHOF A., NEDDERSEN N., GÜNTHER S., SCHMIDT-CHANASIT J., TAPPE D., 2016 Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* **21**.
- FREIRE C. C. de M., IAMARINO A., NETO D. F. de L., SALL A. A., ZANOTTO P. M. de A., 2015 *Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans*. Cold Spring Harbor Labs Journals.
- FRIEBE P., PEÑA J., POHL M. O. F., HARRIS E., 2012 Composition of the sequence downstream of the dengue virus 5' cyclization sequence (dCS) affects viral RNA replication. *Virology* **422**: 346–56.
- FULOP L. D., BARRETT A. D. T., TITBALP R. W., 1995 Nucleotide sequence of the NS5 gene of Banzi virus: comparison with other flaviviruses. *J. Gen. Virol.* **76**.
- GAO G. F., HUSSAIN M. H., REID H. W., GOULD E. A., 1993 Classification of a new member of the TBE flavivirus subgroup by its immunological, pathogenetic and molecular characteristics: identification of subgroup-specific pentapeptides. *Virus Res.* **30**: 129–44.
- GAO G. F., ZANOTTO P. M., HOLMES E. C., REID H. W., GOULD E. A., 1997 Molecular variation, evolution and geographical distribution of louping ill virus. *Acta Virol.* **41**: 259–68.
- GAUNT M. W., SALL A. A., LAMBALLERIE X. DE, FALCONAR A. K., DZHIVANIAN T. I., GOULD E. A., 2001 Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease

- association and biogeography. *J. Gen. Virol.* **82**: 1867–76.
- GERMI R., CRANCE J.-M., GARIN D., GUIMET J., LORTAT-JACOB H., RUIGROK R. W. H., ZARSKI J.-P., DROUET E., 2002 Heparan Sulfate-Mediated Binding of Infectious Dengue Virus Type 2 and Yellow Fever Virus. *Virology* **292**: 162–168.
- GINGRAS A. C., GYGI S. P., RAUGHT B., POLAKIEWICZ R. D., ABRAHAM R. T., HOEKSTRA M. F., AEBERSOLD R., SONENBERG N., 1999 Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.* **13**: 1422–37.
- GIRARD Y. A., KLINGLER K. A., HIGGS S., 2004 West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **4**: 109–22.
- GO Y. Y., BALASURIYA U. B. R., LEE C.-K., 2014 Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **3**: 58–77.
- GONCALVEZ A. P., ESCALANTE A. A., PUJOL F. H., LUDERT J. E., TOVAR D., SALAS R. A., LIPRANDI F., 2002 Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* **303**: 110–9.
- GONG Z., GAO Y., HAN G.-Z., BROUET N., AL. et, DUFFY M. R., AL. et, FARIA N. R., AL. et, WANG L., AL. et, SHEN S., AL. et, HADDOW A. D., AL. et, FAYE O., AL. et, WOROBAY M., 2016 Zika Virus: Two or Three Lineages? *Trends Microbiol.* **24**: 521–522.
- GOULD E. A., LAMBALLERIE X. DE, ZANOTTO P. M., HOLMES E. C., 2001 Evolution, epidemiology, and dispersal of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Adv. Virus Res.* **57**: 71–103.
- GOULD E. A., LAMBALLERIE X. DE, ZANOTTO P. M., HOLMES E. C., 2003 Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv. Virus Res.* **59**: 277–314.
- GRABHERR M. G., HAAS B. J., YASSOUR M., LEVIN J. Z., THOMPSON D. A., AMIT I., ADICONIS X., FAN L., RAYCHOWDHURY R., ZENG Q., CHEN Z., MAUCELI E., HACOEN N., GNIRKE A., RHIND N., PALMA F. DI, BIRREN B. W., NUSBAUM C., LINDBLAD-TOH K., FRIEDMAN N., REGEV A., 2011 Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* **29**: 644–652.
- GRARD G., MOUREAU G., CHARREL R. N., LEMASSON J.-J., GONZALEZ J.-P., GALLIAN P., GRITSUN T. S., HOLMES E. C., GOULD E. A., LAMBALLERIE X. DE, 2007 Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* **361**: 80–92.
- GRARD G., MOUREAU G., CHARREL R. N., HOLMES E. C., GOULD E. A., LAMBALLERIE X. DE, 2010 Genomics and evolution of *Aedes*-borne flaviviruses. *J. Gen. Virol.* **91**: 87–94.
- GRARD G., CARON M., MOMBO I. M., NKOGE D., MBOUI ONDO S., JIOLLE D., FONTENILLE D., PAUPY C., LEROY E. M., 2014 Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? (R Charrel, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**: e2681.
- GRATZ N. G., KNUDSEN A. B., DISEASES W. H. O. D. of C. of T., 1996 The rise and spread of dengue, dengue haemorrhagic fever and its vectors : a historical review (up to 1995) / by Norman G. Gratz and A. Bruce Knudsen.
- GREENACRE M., 1984 CARME-N: Correspondence Analysis and Related Methods Network.
- GRUBER A. R., LORENZ R., BERNHART S. H., NEUBOCK R., HOFACKER I. L., 2008 The Vienna RNA Website. *Nucleic Acids Res.* **36**: W70–W74.
- GRUNDHOFF A., 2011 Computational Prediction of Viral miRNAs. In: pp. 143–152.
- GRUNDHOFF A., SULLIVAN C. S., 2011 Virus-encoded microRNAs. *Virology* **411**: 325–343.
- GUBLER D. J., 1997 Epidemic Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: A Global Public Health Problem in the 21st Century*. *Dengue Bull.* – **21**: 1–14.
- GUBLER D. J., GUBLER D. J., HALSTEAD S. B., GUBLER D. J., MELTZER M., RICO-HESSE R., AL. et, HALSTEAD S. B., GUBLER D. J., GRATZ N. G., NEWTON E. A. C., REITER P., ALLMEN S. D. Von, AL. et, KOURI G. P., AL. et, SORNMANI S., AL. et, OKANURAK K., AL. et, MURRAY C. J. L., LOPEZ A. D., MELTZER M. I., AL. et, GUBLER D. J., KINNEY R. M., HUANG C. Y. H., 2002 Epidemic dengue/dengue hemorrhagic

- fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* **10**: 100–3.
- GUBLER D. J., 2006 Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found. Symp.* **277**: 3-16-22, 71–3, 251–3.
- GUINDON S., LETHIEC F., DUROUX P., GASCUEL O., 2005 PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* **33**: W557-9.
- GUINDON S., DUFAYARD J.-F., LEFORT V., ANISIMOVA M., HORDIJK W., GASCUEL O., 2010 New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**: 307–21.
- GULLAND A., 2016 WHO's Chan warns over spread of Zika virus beyond Latin America. *BMJ* **352**: i1739.
- GURUGAMA P., GARG P., PERERA J., WIJEWICKRAMA A., SENEVIRATNE S. L., 2010 Dengue viral infections. *Indian J. Dermatol.* **55**: 68–78.
- GUY B., BRIAND O., LANG J., SAVILLE M., JACKSON N., 2015 Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. *Vaccine* **33**: 7100–7111.
- GUZMAN M. G., KOURI G., 2003 Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J. Clin. Virol.* **27**: 1–13.
- GUZMAN M. G., HALSTEAD S. B., ARTSOB H., BUCHY P., FARRAR J., GUBLER D. J., HUNSPERGER E., KROEGER A., MARGOLIS H. S., MARTÍNEZ E., NATHAN M. B., PELEGRINO J. L., SIMMONS C., YOKSAN S., PEELING R. W., 2010 Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: S7–S16.
- HADDOW A. J., WILLIAMS M. C., WOODALL J. P., SIMPSON D. I., GOMA L. K., 1964 Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bull. World Health Organ.* **31**: 57–69.
- HADDOW A. D., SCHUH A. J., YASUDA C. Y., KASPER M. R., HEANG V., HUY R., GUZMAN H., TESH R. B., WEAVER S. C., 2012 Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**: e1477.
- HADDOW A. D., GUZMAN H., POPOV V. L., WOOD T. G., WIDEN S. G., HADDOW A. D., TESH R. B., WEAVER S. C., 2013a First isolation of *Aedes flavivirus* in the Western Hemisphere and evidence of vertical transmission in the mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae). *Virology* **440**: 134–139.
- HADDOW A. D., GUZMAN H., POPOV V. L., WOOD T. G., WIDEN S. G., HADDOW A. D., TESH R. B., WEAVER S. C., 2013b First isolation of *Aedes flavivirus* in the Western Hemisphere and evidence of vertical transmission in the mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae). *Virology* **440**: 134–9.
- HAHN C. S., HAHN Y. S., RICE C. M., LEE E., DALGARNO L., STRAUSS E. G., STRAUSS J. H., 1987 Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J. Mol. Biol.* **198**: 33–41.
- HALSTEAD S. B., 1989 Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev. Infect. Dis.* **11 Suppl 4**: S830-9.
- HALSTEAD S. B., RUSSELL P. K., 2016 Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vaccine* **34**: 1643–1647.
- HAMMON W. M., SCHRACK W. D., SATHER G. E., 1958 Serological survey for an arthropod-borne virus infections in the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**: 323–8.
- HANLEY K. A., MONATH T. P., WEAVER S. C., ROSSI S. L., RICHMAN R. L., VASILAKIS N., 2013 Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infect. Genet. Evol.* **19**: 292–311.
- HARVEY P., 1996 *New uses for new phylogenies*. Oxford University Press.

- HASAN M. M., AKTER R., ULLAH M. S., ABEDIN M. J., ULLAH G. M. A., HOSSAIN M. Z., 2014 A Computational Approach for Predicting Role of Human MicroRNAs in MERS-CoV Genome. *Adv. Bioinformatics* **2014**: 1–8.
- HAYES E. B., 2009 Zika Virus Outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 1347–1350.
- HENCHAL E. A., PUTNAK J. R., 1990 The dengue viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**: 376–96.
- HENDERSON B. E., TUKEI P. M., MCCRAE A. W., SSENKUBUGE Y., MUGO W. N., 1970 Virus isolations from Ixodid ticks in Uganda. II. Kadam virus--a new member of arbovirus group B isolated from *Rhipicephalus pravus* DONTIZ. *East Afr. Med. J.* **47**: 273–6.
- HICKMAN H. D., PIERSON T. C., 2016 Zika in the Brain: New Models Shed Light on Viral Infection. *Trends Mol. Med.* **22**: 639–641.
- HIGGS S., SCHNEIDER B. S., VANLANDINGHAM D. L., KLINGLER K. A., GOULD E. A., 2005 Nonviremic transmission of West Nile virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 8871–4.
- HILGARD P., STOCKERT R., 2000 Heparan Sulfate Proteoglycans Initiate Dengue Virus Infection of Hepatocytes. *Hepatology* **32**: 1069–1077.
- HILLS S. L., RUSSELL K., HENNESSEY M., WILLIAMS C., OSTER A. M., FISCHER M., MEAD P., 2016 Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**: 215–6.
- HOBER D., POLI L., ROBLIN B., GESTAS P., CHUNGUE E., GRANIC G., IMBERT P., PECARERE J. L., VERGEZ-PASCAL R., WATTRE P., 1993 Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**: 324–31.
- HOBSON-PETERS J., YAM A. W. Y., LU J. W. F., SETOH Y. X., MAY F. J., KURUCZ N., WALSH S., PROW N. A., DAVIS S. S., WEIR R., MELVILLE L., HUNT N., WEBB R. I., BLITVICH B. J., WHELAN P., HALL R. A., 2013 A New Insect-Specific Flavivirus from Northern Australia Suppresses Replication of West Nile Virus and Murray Valley Encephalitis Virus in Co-infected Mosquito Cells (T Wang, Ed.). *PLoS One* **8**: e56534.
- HOSHINO K., ISAWA H., TSUDA Y., YANO K., SASAKI T., YUDA M., TAKASAKI T., KOBAYASHI M., SAWABE K., 2007 Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* **359**: 405–14.
- HSU J., CHIU C.-M., HSU S.-D., HUANG W.-Y., CHIEN C.-H., LEE T.-Y., HUANG H.-D., 2011 miRTar: an integrated system for identifying miRNA-target interactions in human. *BMC Bioinformatics* **12**: 300.
- HU J., WANG Q., ZHANG J., CHEN H., XU Z., ZHU L., DING Y., MA L., XU K., GU Y., LIU Y., 2011 The characteristic of codon usage pattern and its evolution of hepatitis C virus. *Infect. Genet. Evol.* **11**: 2098–2102.
- HUDSON R. R., 1991 Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surv. Evol. Biol.* **7**: 1–44.
- HUGHES B. W., ADDANKI K. C., SRISKANDA A. N., MCLEAN E., BAGASRA O., 2016 Infectivity of Immature Neurons to Zika Virus: A Link to Congenital Zika Syndrome. *EBioMedicine* **0**: 442–448.
- HUHTAMO E., PUTKURI N., KURKELA S., MANNI T., VAHERI A., VAPALAHTI O., UZCATEGUI N. Y., 2009 Characterization of a Novel Flavivirus from Mosquitoes in Northern Europe That Is Related to Mosquito-Borne Flaviviruses of the Tropics. *J. Virol.* **83**: 9532–9540.
- HUHTAMO E., MOUREAU G., COOK S., JULKUNEN O., PUTKURI N., KURKELA S., UZCATEGUI N. Y., HARBACH R. E., GOULD E. A., VAPALAHTI O., LAMBALLERIE X. DE, 2012 Novel insect-specific flavivirus isolated from northern Europe. *Virology* **433**: 471–8.
- HUHTAMO E., COOK S., MOUREAU G., UZCATEGUI N. Y., SIRONEN T., KUIVANEN S., PUTKURI N., KURKELA S., HARBACH R. E., FIRTH A. E., VAPALAHTI O., GOULD E. A., LAMBALLERIE X. DE, 2014 Novel flaviviruses from mosquitoes: Mosquito-specific evolutionary lineages within the phylogenetic group of mosquito-borne flaviviruses. *Virology* **464**: 320–329.

- HUMPHREY W., DALKE A., SCHULTEN K., 1996 VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**: 33–38.
- HUNG J.-J., HSIEH M.-T., YOUNG M.-J., KAO C.-L., KING C.-C., CHANG W., 2004 An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J. Virol.* **78**: 378–88.
- HUSSAIN M., TORRES S., SCHNETTLER E., FUNK A., GRUNDHOFF A., PIJLMAN G. P., KHROMYKH A. A., ASGARI S., 2012a West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res.* **40**: 2210–23.
- HUSSAIN M. S., BAIG S. M., NEUMANN S., NÜRNBERG G., FAROOQ M., AHMAD I., ALEF T., HENNIES H. C., TECHNAU M., ALTMÜLLER J., FROMMOLT P., THIELE H., NOEGEL A. A., NÜRNBERG P., 2012b A Truncating Mutation of CEP135 Causes Primary Microcephaly and Disturbed Centrosomal Function. *Am. J. Hum. Genet.* **90**: 871–878.
- HUSSAIN M., ASGARI S., 2014 MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 2746–51.
- ICTV Virus Taxonomy 2015,
- IWAMOTO M., JERNIGAN D. B., GUASCH A., TREPKA M. J., BLACKMORE C. G., HELLINGER W. C., PHAM S. M., ZAKI S., LANCIOTTI R. S., LANCE-PARKER S. E., DIAZGRANADOS C. A., WINQUIST A. G., PERLINO C. A., WIERSMA S., HILLYER K. L., GOODMAN J. L., MARFIN A. A., CHAMBERLAND M. E., PETERSEN L. R., 2003 Transmission of West Nile Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* **348**: 2196–2203.
- JENKINS G. M., HOLMES E. C., 2003 The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. *Virus Res.* **92**: 1–7.
- JESSIE K., FONG M. Y., DEVI S., LAM S. K., WONG K. T., 2004 Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Infect. Dis.* **189**: 1411–8.
- JOHNSON H. N., 1967 Ecological implications of antigenically related mammalian viruses for which arthropod vectors are unknown and avian associated soft tick viruses. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **20 Suppl**: 160–6.
- JOHNSON B. W., CRUZ C., FELICES V., ESPINOZA W. R., MANOCK S. R., GUEVARA C., OLSON J. G., KOCHER T. J., 2007 Ilheus virus isolate from a human, Ecuador. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 956–8.
- JONES L. D., DAVIES C. R., STEELE G. M., NUTTALL P. A., 1987 A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. *Science* **237**: 775–7.
- JONES L. D., GAUNT M., HAILS R. S., LAURENSEN K., HUDSON P. J., REID H., HENBEST P., GOULD E. A., 1997 Transmission of louping ill virus between infected and uninfected ticks co-feeding on mountain hares. *Med. Vet. Entomol.* **11**: 172–6.
- JOSHI, FASS J., 2011 Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files.
- JUNGLÉN S., KOPP A., KURTH A., PAULI G., ELLERBROK H., LEENDERTZ F. H., 2009 A New Flavivirus and a New Vector: Characterization of a Novel Flavivirus Isolated from *Uranotaenia* Mosquitoes from a Tropical Rain Forest. *J. Virol.* **83**: 4462–4468.
- KADDUMUKASA A. M., KAYONDO K. J., MASIGA D., AKOL M. A., LUTWAMA J. J., MASEMBE C., 2015 High proportion of mosquito vectors in Zika forest, Uganda, feeding on humans has implications for the spread of new arbovirus pathogens. *African J. Biotechnol.* **14**: 1418–1426.
- KADING R. C., KITYO R., NAKAYIKI T., LEDERMANN J., CRABTREE M. B., LUTWAMA J., MILLER B. R., 2015 Detection of Entebbe Bat Virus After 54 Years. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**: 475–7.
- KAPLAN N. L., DARDEN T., HUDSON R. R., 1988 The coalescent process in models with selection. *Genetics* **120**: 819–29.
- KAPOOR A., SIMMONDS P., SCHEEL T. K. H., HJELLE B., CULLEN J. M., BURBELO P. D., CHAUHAN L. V.,

- DURASAMY R., SANCHEZ LEON M., JAIN K., VANDEGRIFT K. J., CALISHER C. H., RICE C. M., LIPKIN W. I., 2013 Identification of Rodent Homologs of Hepatitis C Virus and Pegiviruses. *MBio* **4**: e00216-13-e00216-13.
- KARAN L. S., CICCOTZI M., YAKIMENKO V. V., PRESTI A. LO, CELLA E., ZEHENDER G., REZZA G., PLATONOV A. E., 2014 The deduced evolution history of Omsk hemorrhagic fever virus. *J. Med. Virol.* **86**: 1181–7.
- KARATHANASIS N., TSAMARDINOS I., POIRAZI P., 2015 MiRduplexSVM: A High-Performing MiRNA-Duplex Prediction and Evaluation Methodology (S Patnaik, Ed.). *PLoS One* **10**: e0126151.
- KENNEY J. L., BRAULT A. C., 2014 Chapter Two – The Role of Environmental, Virological and Vector Interactions in Dictating Biological Transmission of Arthropod-Borne Viruses by Mosquitoes. In: *Advances in Virus Research*, pp. 39–83.
- KENNEY J. L., SOLBERG O. D., LANGEVIN S. A., BRAULT A. C., 2014 Characterization of a novel insect-specific flavivirus from Brazil: potential for inhibition of infection of arthropod cells with medically important flaviviruses. *J. Gen. Virol.* **95**: 2796–808.
- KENT R. J., CRABTREE M. B., MILLER B. R., 2010 Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with *Culex* Flavivirus Izabal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**: e671.
- KHIN M. M., THAN K. A., 1983 Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 590–4.
- KHOURY M. Y. EL, CAMARGO J. F., WHITE J. L., BACKENSON B. P., DUPUIS A. P., ESCUYER K. L., KRAMER L., ST GEORGE K., CHATTERJEE D., PRUSINSKI M., WORMSER G. P., WONG S. J., 2013 Potential role of deer tick virus in Powassan encephalitis cases in Lyme disease-endemic areas of New York, U.S.A. *Emerg. Infect. Dis.* **19**: 1926–33.
- KINGMAN J. F., 2000 Origins of the coalescent. 1974-1982. *Genetics* **156**: 1461–3.
- KLEIN D. E., CHOI J. L., HARRISON S. C., 2013 Structure of a Dengue Virus Envelope Protein Late-Stage Fusion Intermediate. *J. Virol.* **87**: 2287–2293.
- KLEMA V. J., PADMANABHAN R., CHOI K. H., 2015 Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses* **7**: 4640–56.
- KOBOLDT D. C., CHEN K., WYLIE T., LARSON D. E., MCLELLAN M. D., MARDIS E. R., WEINSTOCK G. M., WILSON R. K., DING L., 2009 VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* **25**: 2283–2285.
- KORHONEN E., HUHTAMO E., SMURA T., 2016 Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. *Euro.*
- KUMAR S., STECHER G., TAMURA K., 2016 MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**: 1870–4.
- KUNO G., CHANG G. J., TSUCHIYA K. R., KARABATSOS N., CROPP C. B., 1998 Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* **72**: 73–83.
- KUNO G., CHANG G.-J. J., 2005a Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 608–37.
- KUNO G., CHANG G.-J. J., 2005b Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**: 608–637.
- KUNO G., CHANG G.-J. J., 2006 Characterization of Sepik and Entebbe bat viruses closely related to yellow fever virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**: 1165–70.
- KUNO G., CHANG G.-J. J., 2007 Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* **152**: 687–96.
- KURANE I., HEBBLEWAITE D., BRANDT W. E., ENNIS F. A., 1984 Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J.*

- Viol. **52**: 223–30.
- KUWATA R., SUGIYAMA H., YONEMITSU K., DUNG N. VAN, TERADA Y., TANIGUCHI M., SHIMODA H., TAKANO A., MAEDA K., 2015 Isolation of Japanese encephalitis virus and a novel insect-specific flavivirus from mosquitoes collected in a cowshed in Japan. *Arch. Virol.* **160**: 2151–9.
- L'VOV D. K., ARISTOVA V. A., GROMASHEVSKIĬ V. L., SKVORTSOVA T. M., BOĬKO V. A., MEL'NIKOVA E. E., GUSHCHINA E. A., IARULOVA R. A., MOROZOVA T. N., PETROVA E. S., [Kama, a new virus (Flaviviridae, Flavivirus, Tiulenii antigenic group), isolated from *Ixodes lividus* ticks]. *Vopr. Virusol.* **43**: 71–4.
- L'VOV D. K., AL'KHOVSKIĬ S. V., SHCHELKANOV M. I., SHCHETININ A. M., DERIABIN P. G., GITEL'MAN A. K., SAMOKHVALOV E. I., BOTIKOV A. G., [Taxonomy of the Sokuluk virus (SOKV) (Flaviviridae, Flavivirus, Entebbe bat virus group) isolated from bats (*Vespertilio pipistrellus* Schreber, 1774), ticks (*Argasidae* Koch, 1844), and birds in Kyrgyzstan]. *Vopr. Virusol.* **59**: 30–4.
- LABUDA M., JONES L. D., WILLIAMS T., NUTTALL P. A., 1993 Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med. Vet. Entomol.* **7**: 193–6.
- LADHANI S. N., O'CONNOR C., KIRKBRIDE H., BROOKS T., MORGAN D., 2016 Outbreak of Zika virus disease in the Americas and the association with microcephaly, congenital malformations and Guillain–Barré syndrome. *Arch. Dis. Child.* **101**: 600–602.
- LANCIOTTI R. S., CALISHER C. H., GUBLER D. J., CHANG G. J., VORNDAM A. V., 1992 Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 545–51.
- LANCIOTTI R. S., KOSOY O. L., LAVEN J. J., VELEZ J. O., LAMBERT A. J., JOHNSON A. J., STANFIELD S. M., DUFFY M. R., 2008 Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 1232–9.
- LANGMEAD B., TRAPNELL C., POP M., SALZBERG S. L., DOWN T., RAKYAN V., TURNER D., FLICEK P., LI H., KULESHA E., GRAF S., JOHNSON N., HERRERO J., TOMAZOU E., THORNE N., BACKDAHL L., HERBERTH M., HOWE K., JACKSON D., MIRETTI M., MARIONI J., BIRNEY E., HUBBARD T., DURBIN R., TAVARE S., BECK S., JOHNSON D., MORTAZAVI A., MYERS R., WOLD B., MARIONI J., MASON C., MANE S., STEPHENS M., GILAD Y., BENTLEY D., BALASUBRAMANIAN S., SWERDLOW H., SMITH G., MILTON J., BROWN C., HALL K., EVERS D., BARNES C., BIGNELL H., BOUTELL J., BRYANT J., CARTER R., CHEETHAM R. K., COX A., ELLIS D., FLATBUSH M., GORMLEY N., HUMPHRAY S., IRVING L., KARBELASHVILI M., KIRK S., LI H., LIU X., MAISINGER K., MURRAY L., OBRADOVIC B., OST T., PARKINSON M., PRATT M., LEY T., MARDIS E., DING L., FULTON B., MCLELLAN M., CHEN K., DOOLING D., DUNFORD-SHORE B., MCGRATH S., HICKENBOTHAM M., COOK L., ABBOTT R., LARSON D., KOBOLDT D., POHL C., SMITH S., HAWKINS A., ABBOTT S., LOCKE D., HILLIER L., MINER T., FULTON L., MAGRINI V., WYLIE T., GLASSCOCK J., CONYERS J., SANDER N., SHI X., OSBORNE J., MINX P., WANG J., WANG W., LI R., LI Y., TIAN G., GOODMAN L., FAN W., ZHANG J., LI J., ZHANG J., GUO Y., FENG B., LI H., LU Y., FANG X., LIANG H., DU Z., LI D., ZHAO Y., HU Y., YANG Z., ZHENG H., HELLMANN I., INOUE M., POOL J., YI X., ZHAO J., DUAN J., ZHOU Y., QIN J., LI H., RUAN J., DURBIN R., LI R., LI Y., KRISTIANSEN K., WANG J., KAISER J., SMITH A., XUAN Z., ZHANG M., LIN H., ZHANG Z., ZHANG M., MA B., LI M., BAEZA-YATES R., PERLEBERG C., BURKHARDT S., KÄRKKÄINEN J., MA B., TROMP J., LI M., SMITH T., WATERMAN M., BURROWS M., WHEELER D., FERRAGINA P., MANZINI G., HEALY J., THOMAS E., SCHWARTZ J., WIGLER M., LIPPERT R., GRAF S., NIELSEN F., KURTZ S., HUYNEN M., BIRNEY E., STUNNENBERG H., FLICEK P., LAM T., SUNG W., TAM S., WONG C., YIU S., EWING B., GREEN P., CAMPBELL P., STEPHENS P., PLEASANCE E., O'MEARA S., LI H., SANTARIUS T., STEBBINGS L., LEROY C., EDKINS S., HARDY C., TEAGUE J., MENZIES A., GOODHEAD I., TURNER D., CLEE C., QUAIL M., COX A., BROWN C., DURBIN R., HURLES M., EDWARDS P., BIGNELL G., STRATTON M., FUTREAL P., HOLT K., PARKHILL J., MAZZONI C., ROUMAGNAC P., WEILL F., GOODHEAD I., RANCE R., BAKER S., MASKELL D., WAIN J., DOLECEK C., ACHTMAN M., DOUGAN G., NAGALAKSHMI U., WANG Z., WAERN K., SHOU C., RAHA D., GERSTEIN M., SNYDER M., KÄRKKÄINEN J., DORING A., WEESE D., RAUSCH T., REINERT K.,

- 2009 Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**: R25.
- LAZEAR H. M., DIAMOND M. S., 2016 Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere (TC Pierson, Ed.). *J. Virol.* **90**: 4864–4875.
- LEDERMANN J. P., GUILLAUMOT L., YUG L., SAWEYOG S. C., TIDED M., MACHIENG P., PRETRICK M., MARFEL M., GRIGGS A., BEL M., DUFFY M. R., HANCOCK W. T., HO-CHEN T., POWERS A. M., 2014 *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**: e3188.
- LEE J. S., GRUBAUGH N. D., KONDIG J. P., TURELL M. J., KIM H.-C., KLEIN T. A., O'GUINN M. L., 2013 *Isolation and genomic characterization of Chaoyang virus strain ROK144 from Aedes vexans nipponii from the Republic of Korea.*
- LEI H. Y., YEH T. M., LIU H. S., LIN Y. S., CHEN S. H., LIU C. C., 2001 Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J. Biomed. Sci.* **8**: 377–88.
- LI H., CLUM S., YOU S., EBNER K. E., PADMANABHAN R., 1999 The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J. Virol.* **73**: 3108–16.
- LI H., HANDSAKER B., WYSOKER A., FENNELT T., RUAN J., HOMER N., MARTH G., ABECASIS G., DURBIN R., 2009 The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078–2079.
- LI M. I., WONG P. S. J., NG L. C., TAN C. H., 2012 Oral Susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika Virus (MJ Turell, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**: e1792.
- LI C., XU D., YE Q., HONG S., JIANG Y., LIU X., ZHANG N., SHI L., QIN C.-F., XU Z., 2016 Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* **19**: 120–126.
- LIN C.-F., LEI H.-Y., SHIAU A.-L., LIU C.-C., LIU H.-S., YEH T.-M., CHEN S.-H., LIN Y.-S., 2003 Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J. Med. Virol.* **69**: 82–90.
- LINDENBACH B. D., RICE C. M., 2003 Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* **59**: 23–61.
- LIU P., LU H., LI S., MOUREAU G., DENG Y.-Q., WANG Y., ZHANG L., JIANG T., LAMBALLERIE X. DE, QIN C.-F., GOULD E. A., SU J., GAO G. F., 2012 Genomic and antigenic characterization of the newly emerging Chinese duck egg-drop syndrome flavivirus: genomic comparison with Tembusu and Sitiawan viruses. *J. Gen. Virol.* **93**: 2158–70.
- LIU P., LU H., LI S., WU Y., GAO G. F., SU J., 2013 Duck egg drop syndrome virus: an emerging Tembusu-related flavivirus in China. *Sci. China. Life Sci.* **56**: 701–10.
- LLORENTE F., PÉREZ-RAMÍREZ E., FERNÁNDEZ-PINERO J., ELIZALDE M., FIGUEROLA J., SORIGUER R. C., JIMÉNEZ-CLAVERO M. Á., 2015 Bagaza virus is pathogenic and transmitted by direct contact in experimentally infected partridges, but is not infectious in house sparrows and adult mice. *Vet. Res.* **46**: 93.
- LOBO F. P., MOTA B. E. F., PENA S. D. J., AZEVEDO V., MACEDO A. M., TAUCH A., MACHADO C. R., FRANCO G. R., 2009 Virus-Host Coevolution: Common Patterns of Nucleotide Motif Usage in Flaviviridae and Their Hosts (LL Coffey, Ed.). *PLoS One* **4**: e6282.
- LONGDON B., BROCKHURST M. A., RUSSELL C. A., WELCH J. J., JIGGINS F. M., 2014 The Evolution and Genetics of Virus Host Shifts (TC Hobman, Ed.). *PLoS Pathog.* **10**: e1004395.
- LÓPEZ M., PACIEL D. D., 2013 Ateneo Encefalitis por Virus de Saint Louis en trasplantado renal.
- LORD J. S., GURLEY E. S., PULLIAM J. R. C., 2015 Rethinking Japanese Encephalitis Virus Transmission: A Framework for Implicating Host and Vector Species (AM Powers, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**: e0004074.
- LOZACH P.-Y., BURLEIGH L., STAROPOLI I., NAVARRO-SANCHEZ E., HARRIAGUE J., VIRELIZIER J.-L., REY F. A., DESPRÈS P., ARENZANA-SEISDEDOS F., AMARA A., 2005 Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN)-mediated Enhancement of Dengue

- Virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals. *J. Biol. Chem.* **280**: 23698–23708.
- LUCA M. DI, SEVERINI F., TOMA L., BOCCOLINI D., ROMI R., REMOLI M. E., SABBATUCCI M., RIZZO C., VENTURI G., REZZA G., FORTUNA C., 2016 Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* **21**.
- LUTOMIAH J. J. L., MWANDAWIRO C., MAGAMBO J., SANG R. C., 2009 Infection and Vertical Transmission of Kamiti River Virus in Laboratory Bred *Aedes aegypti* Mosquitoes. <http://dx.doi.org/10.1673/031.007.5501>.
- MA X., HUANG B., LI Y., QIN Z., LI F., SONG M., 2013a Journal of Immunological Techniques in Infectious Diseases Seroprevalence of Newly Discovered Duck Flavivirus in Farm Animals. *J. Immunol Tech Infect Dis* **2**.
- MA J.-J., ZHAO F., ZHANG J., ZHOU J.-H., MA L.-N., DING Y.-Z., CHEN H.-T., GU Y.-X., LIU Y.-S., 2013b Analysis of Synonymous Codon Usage in Dengue Viruses. *J. Anim. Vet. Adv.:* **12**: 88-98.
- MACDONALD J., POIDINGER M., MACKENZIE J. S., RUSSELL R. C., DOGGETT S., BROOM A. K., PHILLIPS D., POTAMSKI J., GARD G., WHELAN P., WEIR R., YOUNG P. R., GENDLE D., MAHER S., BARNARD R. T., HALL R. A., 2010 Molecular phylogeny of edge hill virus supports its position in the yellow Fever virus group and identifies a new genetic variant. *Evol. Bioinform. Online* **6**: 91–6.
- MACKENZIE J. M., WESTAWAY E. G., 2001 Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J. Virol.* **75**: 10787–99.
- MACNAMARA F. N., 1954 Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **48**: 139–45.
- MADRID A. T. DE, PORTERFIELD J. S., 1974 The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J. Gen. Virol.* **23**: 91–6.
- MALKINSON M., BANET C., 2002 The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **267**: 309–22.
- MALKINSON M., BANET C., WEISMAN Y., POKAMUNSKI S., KING R., DROUET M.-T., DEUBEL V., 2002 Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 392–7.
- MANDL C. W., ALLISON S. L., HOLZMANN H., MEIXNER T., HEINZ F. X., 2000 Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J. Virol.* **74**: 9601–9.
- MANSFIELD K. L., MORALES A. B., JOHNSON N., AYLLÓN N., HÖFLE U., ALBERDI P., FERNÁNDEZ DE MERA I. G., MARÍN J. F. G., GORTÁZAR C., LA FUENTE J. DE, FOOKS A. R., 2015 Identification and characterization of a novel tick-borne flavivirus subtype in goats (*Capra hircus*) in Spain. *J. Gen. Virol.* **96**: 1676–81.
- MANSUY J. M., PASQUIER C., DAUDIN M., CHAPUY-REGAUD S., MOINARD N., CHEVREAU C., IZOPET J., MENGELLE C., BUJAN L., MUSSO D., GUBLER D., MANSUY J., DUTERTRE M., MENGELLE C., AL. et, D'ORTENZIO E., MATHERON S., LAMBALLERIE X. de, AL. et, BUATHONG R., HERMANN L., THAISOMBOONSUK B., AL. et, PETERSEN E., POLEN K., MEANEY-DELMAN D., AL. et, 2016 Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area. *Lancet Infect. Dis.* **16**: 894–895.
- MARCHETTE N. J., GARCIA R., RUDNICK A., 1969 Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **18**: 411–5.
- MARIN M. S., MCKENZIE J., GAO G. F., REID H. W., ANTONIADIS A., GOULD E. A., 1995a The virus causing encephalomyelitis in sheep in Spain: a new member of the tick-borne encephalitis group. *Res. Vet. Sci.* **58**: 11–3.
- MARIN M. S., ZANOTTO P. M., GRITSUN T. S., GOULD E. A., 1995b Phylogeny of TYU, SRE, and CFA virus:

- different evolutionary rates in the genus *Flavivirus*. *Virology* **206**: 1133–9.
- MARKOFF L. J., INNIS B. L., HOUGHTEN R., HENCHAL L. S., 1991 Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J. Infect. Dis.* **164**: 294–301.
- MARTÍ-RENOM M. A., STUART A. C., FISER A., SÁNCHEZ R., MELO F., ŠALI A., 2000 Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**: 291–325.
- MARTIN M., 2011 Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**: 10.
- MARTINES R. B., BHATNAGAR J., KEATING M. K., SILVA-FLANNERY L., MUEHLENBACHS A., GARY J., GOLDSMITH C., HALE G., RITTER J., ROLLIN D., SHIEH W.-J., LUZ K. G., RAMOS A. M. de O., DAVI H. P. F., KLEBER DE OLIVERIA W., LANCIOTTI R., LAMBERT A., ZAKI S., 2016 Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses--Brazil, 2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**: 159–60.
- MASSAD E., TAN S.-H., KHAN K., WILDER-SMITH A., 2016 Estimated Zika virus importations to Europe by travellers from Brazil. *Glob. Health Action* **9**: 31669.
- MAY F. J., LOBIGS M., LEE E., GENDLE D. J., MACKENZIE J. S., BROOM A. K., CONLAN J. V., HALL R. A., 2006 Biological, antigenic and phylogenetic characterization of the flavivirus Alfuy. *J. Gen. Virol.* **87**: 329–337.
- MAY F. J., DAVIS C. T., TESH R. B., BARRETT A. D. T., 2011 Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J. Virol.* **85**: 2964–74.
- MCCRAE A. W., KIRYA B. G., 1982 Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**: 552–62.
- MCGEE C. E., SCHNEIDER B. S., GIRARD Y. A., VANLANDINGHAM D. L., HIGGS S., 2007 Nonviremic transmission of West Nile virus: evaluation of the effects of space, time, and mosquito species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 424–30.
- MCGUIRE K., HOLMES E. C., GAO G. F., REID H. W., GOULD E. A., 1998 Tracing the origins of louping ill virus by molecular phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* **79 (Pt 5)**: 981–8.
- MCLEAN B. J., HOBSON-PETERS J., WEBB C. E., WATTERSON D., PROW N. A., NGUYEN H. D., HALL-MENDELIN S., WARRILOW D., JOHANSEN C. A., JANSEN C. C., HURK A. F. VAN DEN, BEEBE N. W., SCHNETTLER E., BARNARD R. T., HALL R. A., 2015 A novel insect-specific flavivirus replicates only in *Aedes*-derived cells and persists at high prevalence in wild *Aedes vigilax* populations in Sydney, Australia. *Virology* **486**: 272–83.
- MEANEY-DELMAN D., HILLS S. L., WILLIAMS C., GALANG R. R., IYENGAR P., HENNENFENT A. K., RABE I. B., PANELLA A., ODUYEBO T., HONEIN M. A., ZAKI S., LINDSEY N., LEHMAN J. A., KWIT N., BERTOLLI J., ELLINGTON S., IGBINOSA I., MINTA A. A., PETERSEN E. E., MEAD P., RASMUSSEN S. A., JAMIESON D. J., 2016 Zika Virus Infection Among U.S. Pregnant Travelers — August 2015–February 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**.
- MÉCHARLES S., HERRMANN C., POUILLAIN P., TRAN T.-H., DESCHAMPS N., MATHON G., LANDAIS A., BREUREC S., LANNUZEL A., FAUCI A., MORENS D., LARIK A., CHIONG Y., LEE L., NG Y., VERMA R., PRAHARAJ H., PATIL T., GIRI P., ALI M., SAFRIEL Y., SOHI J., LLAVE A., WEATHERS S., SAMUEL M., WANG H., SIDDHARTHAN V., MORREY J., DIAMOND M., 2016 Acute myelitis due to Zika virus infection. *Lancet* **387**: 1481.
- MELANDRI V., GUIMARÃES A. É., KOMAR N., NOGUEIRA M. L., MONDINI A., FERNANDEZ-SESMA A., ALENCAR J., BOSCH I., 2012 Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* **107**: 1073–5.
- MENDEZ J. A., USME-CIRO J. A., DOMINGO C., REY G. J., SANCHEZ J. A., TENORIO A., GALLEGGO-GOMEZ J. C., 2010 Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Viol. J.* **7**: 226.

- MESSER W., GUBLER D., HARRIS E., SIVANANTHAN K., 2003a Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emergence*.
- MESSER W. B., GUBLER D. J., HARRIS E., SIVANANTHAN K., SILVA A. M. DE, 2003b Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 800–9.
- MEYER A. G., SPIELMAN S. J., BEDFORD T., WILKE C. O., 2015 Time dependence of evolutionary metrics during the 2009 pandemic influenza virus outbreak. *Virus Evol.* **1**.
- MILNE I., STEPHEN G., BAYER M., COCK P. J. A., PRITCHARD L., CARDLE L., SHAW P. D., MARSHALL D., 2013 Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief. Bioinform.* **14**: 193–202.
- MITZEL D. N., WOLFINBARGER J. B., LONG R. D., MASNICK M., BEST S. M., BLOOM M. E., 2007 Tick-borne flavivirus infection in *Ixodes scapularis* larvae: development of a novel method for synchronous viral infection of ticks. *Virology* **365**: 410–8.
- MLAKAR J., KORVA M., TUL N., POPOVIĆ M., POLJŠAK-PRIJATELJ M., MRAZ J., KOLENC M., RESMAN RUS K., VESNAVER VIPOTNIK T., FABJAN VODUŠEK V., VIZJAK A., PIŽEM J., PETROVEC M., AVŠIČ ŽUPANC T., 2016 Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **374**: 951–8.
- MONATH T. P., 1994 Yellow fever and dengue—the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. *Semin. Virol.* **5**: 133–145.
- MONDINI A., CARDEAL I. L. S., LÁZARO E., NUNES S. H., MOREIRA C. C., RAHAL P., MAIA I. L., FRANCO C., GÓNGORA D. V. N., GÓNGORA-RUBIO F., CABRERA E. M. S., FIGUEIREDO L. T. M., FONSECA F. G. DA, BRONZONI R. V. M., CHIARAVALLOTI-NETO F., NOGUEIRA M. L., 2007a Saint Louis encephalitis virus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 176–8.
- MONDINI A., BRONZONI R. V. de M., CARDEAL I. L. S., SANTOS T. M. I. L. DOS, LÁZARO E., NUNES S. H. P., SILVA G. C. D., MADRID M. C. F. S., RAHAL P., FIGUEIREDO L. T., CHIARAVALLOTI F. N., NOGUEIRA M. L., 2007b Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J. Clin. Virol.* **40**: 84–6.
- MONDOTTE J. A., LOZACH P.-Y., AMARA A., GAMARNIK A. V., 2007 Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation. *J. Virol.* **81**: 7136–7148.
- MORA D. DE, ANDREA L. D., ALVAREZ M., REGATO M., FAJARDO A., RE CAREY R., COLINA R., KHAN B., CRISTINA J., 2009 Evidence of diversification of dengue virus type 3 genotype III in the South American region. *Arch. Virol.* **154**: 699–707.
- MORALES M. A., BARRANDEGUY M., FABBRI C., GARCIA J. B., VISSANI A., TRONO K., GUTIERREZ G., PIGRETTI S., MENCHACA H., GARRIDO N., TAYLOR N., FERNANDEZ F., LEVIS S., ENRÍA D., 2006 West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1559–61.
- MORATORIO G., IRIARTE A., MORENO P., MUSTO H., CRISTINA J., 2013 A detailed comparative analysis on the overall codon usage patterns in West Nile virus. *Infect. Genet. Evol.* **14**: 396–400.
- MORENS D. M., HALSTEAD S. B., 1990 Measurement of Antibody-dependent Infection Enhancement of Four Dengue Virus Serotypes by Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *J. Gen. Virol.* **71**: 2909–2914.
- MORENS D. M., 1994 Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin. Infect. Dis.* **19**: 500–12.
- MOUDY R. M., MEOLA M. A., MORIN L.-L. L., EBEL G. D., KRAMER L. D., 2007 A newly emergent genotype of West Nile virus is transmitted earlier and more efficiently by *Culex* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**: 365–70.
- MOUREAU G., TEMMAM S., GONZALEZ J. P., CHARREL R. N., GRARD G., LAMBALLERIE X. DE, 2007 A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**: 467–77.
- MOUREAU G., NINOVE L., IZRI A., COOK S., LAMBALLERIE X. DE, CHARREL R. N., 2010 Flavivirus RNA in phlebotomine sandflies. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**: 195–7.

- MOUREAU G., COOK S., LEMEY P., NOUGAIREDE A., FORRESTER N. L., KHASNATINOV M., CHARREL R. N., FIRTH A. E., GOULD E. A., LAMBALLERIE X. DE, 2015 New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences. *PLoS One* **10**: e0117849.
- MOURYA D. T., MISHRA A. C., 2000 Antigen distribution pattern of Japanese encephalitis virus in *Culex tritaeniorhynchus*, *C. vishnui* & *C. pseudovishnui*. *Indian J. Med. Res.* **111**: 157–61.
- MSP, 2006 PLAN NACIONAL DE CONTINGENCIA PARA UNA EPIDEMIA DE DENGUE.
- MUELLER S., PAPAMICHAIL D., COLEMAN J. R., SKIENA S., WIMMER E., 2006 Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J. Virol.* **80**: 9687–96.
- MUSSO D., NILLES E. J., CAO-LORMEAU V.-M., KIRYA B., DUFFY M., CHEN T., HANCOCK W., AL. et, CAO-LORMEAU V., ROCHE C., TEISSIER A., AL. et, BESNARD M., LASTÈRE S., TEISSIER A., AL. et, OEHLER E., WATRIN L., LEPARC-GOFFART I., AL. et, SEJVAR J., BAUGHMAN A., WISE M., AL. et, GRARD G., CARON M., MOMBO I., AL. et, FOY B., KOBYLINSKI K., FOY J. C., AL. et, MUSSO D., NHAN T., ROBIN E., AL. et, SANITAIRE I. de V., 2014 Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**: O595-6.
- MUSSO D., ROCHE C., ROBIN E., NHAN T., TEISSIER A., CAO-LORMEAU V.-M., 2015 Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 359–61.
- MUSSO D., 2015 Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**: 1887.
- MUSSO D., GUBLER D. J., 2016 Zika Virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**: 487–524.
- MYINT S., NISALAK A., KALAYANAROOJ S., NIMMANNITYA S., INNIS B., 1991 Six hour laboratory confirmation of dengue antigen detection in peripheral blood mononuclear cell by immunohistochemistry. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**(3 Suppl): 173.
- NAVARRO-SANCHEZ E., ALTMAYER R., AMARA A., SCHWARTZ O., FIESCHI F., VIRELIZIER J.-L., ARENZANA-SEISDEDOS F., DESPRÈS P., 2003 Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* **4**: 723–8.
- NAYAK V., DESSAU M., KUCERA K., ANTHONY K., LEDIZET M., MODIS Y., 2009 Crystal Structure of Dengue Virus Type 1 Envelope Protein in the Postfusion Conformation and Its Implications for Membrane Fusion. *J. Virol.* **83**: 4338–4344.
- NEITZEL D. F., LYNFIELD R., SMITH K., 2013 Powassan virus encephalitis, Minnesota, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **19**: 686.
- NEUHAUSER C., KRONE S. M., 1997 The genealogy of samples in models with selection. *Genetics* **145**: 519–34.
- NEWMAN C. M., CERUTTI F., ANDERSON T. K., HAMER G. L., WALKER E. D., KITRON U. D., RUIZ M. O., BRAWN J. D., GOLDBERG T. L., 2011 *Culex* flavivirus and West Nile virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **11**: 1099–105.
- NGUYEN H. N., QIAN X., SONG H., MING G., 2016 Neural stem cells attacked by Zika virus. *Cell Res.* **26**: 753–754.
- NHAN T.-X., MUSSO D., 2015 Emergence of Zika virus. *Virologie* **19**: 225–235.
- NIKOLAY B., DIALLO M., BOYE C. S. B., SALL A. A., 2011 Usutu Virus in Africa. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0631>.
- NISBET D. J., LEE K. J., HURK A. F. van den, JOHANSEN C. A., KUNO G., CHANG G.-J. J., MACKENZIE J. S., RITCHIE S. A., HALL R. A., 2005 Identification of new flaviviruses in the Kokobera virus complex. *J. Gen. Virol.* **86**: 121–124.
- NOMAGUCHI M., ACKERMANN M., YON C., YOU S., PADMANABHAN R., PADMANABHAN R., 2003 De novo

- synthesis of negative-strand RNA by Dengue virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: nucleotide, primer, and template parameters. *J. Virol.* **77**: 8831–42.
- NOVEMBRE J. A., 2002 Accounting for background nucleotide composition when measuring codon usage bias. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 1390–4.
- NUÑEZ P., 2015 Puesta a punto de técnicas moleculares para el diagnóstico diferencial de infecciones por Flavivirus en muestras clínicas. Tesina de grado. Licenciatura en Bioquímica (disponible en <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/5122/1/uy24-17413.p>).
- OEHLER E., WATRIN L., LARRE P., LEPARC-GOFFART I., LASTERE S., VALOUR F., BAUDOIN L., MALLET H., MUSSO D., GHAWCHE F., 2014 Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome-- case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* **19**.
- OLIVEIRA MELO A. S., MALINGER G., XIMENES R., SZEJNFELD P. O., ALVES SAMPAIO S., BISPO DE FILIPPIS A. M., 2016 Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **47**: 6–7.
- OLSON J. G., KSIAZEK T. G., SUHANDIMAN, TRIWIBOWO, 1981 Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**: 389–393.
- OMETTO T., DURIGON E. L., ARAUJO J. DE, APRELON R., AGUIAR D. M. DE, CAVALCANTE G. T., MELO R. M., LEVI J. E., AZEVEDO JÚNIOR S. M. DE, PETRY M. V., NETO I. S., SERAFINI P., VILLALOBOS E., CUNHA E. M. S., LARA M. do C. C. S. H., NAVA A. F. D., NARDI M. S., HURTADO R., RODRIGUES R., SHERER A. L., SHERER J. de F. M., GERALDI M. P., SEIXAS M. M. M. DE, PETERKA C., BANDEIRA D. de S., PRADEL J., VACHIERY N., LABRUNA M. B., CAMARGO L. M. A. DE, LANCIOTTI R., LEFRANÇOIS T., 2013 West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **107**: 723–30.
- OMILABU S. A., FAGBAMI A. H., OLALEYE O. D., 1989 Susceptibility of laboratory and domestic animals to experimental infection with Potiskum virus. *Microbios* **60**: 53–8.
- OPS, 2014 Los casos de dengue en las Américas se quintuplicaron en diez años, según nuevos datos de la OPS/OMS.
- PAHO, 2016 Zika - Actualización Epidemiológica Regional de la OPS (Américas) - 7 de julio de 2016. PAHO 2015, Alerta Epidemiológica.
- PAPA A., PAVLIDOU V., ANTONIADIS A., 2008 Greek goat encephalitis virus strain isolated from Ixodes ricinus, Greece. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 330–2.
- PARK D. J., DUDAS G., WOHL S., GOBA A., WHITMER S. L. M., ANDERSEN K. G., SEALFON R. S., LADNER J. T., KUGELMAN J. R., MATRANGA C. B., WINNICKI S. M., QU J., GIRE S. K., GLADDEN-YOUNG A., JALLOH S., NOSAMIEFAN D., YOZWIAK N. L., MOSES L. M., JIANG P.-P., LIN A. E., SCHAFFNER S. F., BIRD B., TOWNER J., MAMOH M., GBAKIE M., KANNEH L., KARGBO D., MASSALLY J. L. B., KAMARA F. K., KONUWA E., SELLU J., JALLOH A. A., MUSTAPHA I., FODAY M., YILLAH M., ERICKSON B. R., SEALY T., BLAU D., PADDOCK C., BRAULT A., AMMAN B., BASILE J., BEARDEN S., BELSER J., BERGERON E., CAMPBELL S., CHAKRABARTI A., DODD K., FLINT M., GIBBONS A., GOODMAN C., KLENA J., MCMULLAN L., MORGAN L., RUSSELL B., SALZER J., SANCHEZ A., WANG D., JUNGREIS I., TOMKINS-TINCH C., KISLYUK A., LIN M. F., CHAPMAN S., MACINNIS B., MATTHEWS A., BOCHICCHIO J., HENSLEY L. E., KUHN J. H., NUSBAUM C., SCHIEFFELIN J. S., BIRREN B. W., FORGET M., NICHOL S. T., PALACIOS G. F., NDIAYE D., HAPPI C., GEVAO S. M., VANDI M. A., KARGBO B., HOLMES E. C., BEDFORD T., GNIRKE A., STRÖHER U., RAMBAUT A., GARRY R. F., SABETI P. C., 2015 Ebola Virus Epidemiology, Transmission, and Evolution during Seven Months in Sierra Leone. *Cell* **161**: 1516–26.
- PARREIRA R., COOK S., LOPES Â., MATOS A. P. DE, ALMEIDA A. P. G. DE, PIEDADE J., ESTEVES A., 2012 Genetic characterization of an insect-specific flavivirus isolated from *Culex theileri* mosquitoes collected in southern Portugal. *Virus Res.* **167**: 152–61.
- PATNAIK P., Kyasanur forest disease: an epidemiological view in India. *Rev. Med. Virol.* **16**: 151–65.

- PAUL L. M., CARLIN E. R., JENKINS M. M., TAN A. L., BARCELONA C. M., NICHOLSON C. O., TRAUTMANN L., MICHAEL S. F., ISERN S., 2016 *Dengue Virus Antibodies Enhance Zika Virus Infection*. Cold Spring Harbor Labs Journals.
- PAUVOLID-CORRÊA A., KENNEY J. L., COUTO-LIMA D., CAMPOS Z. M. S., SCHATZMAYR H. G., NOGUEIRA R. M. R., BRAULT A. C., KOMAR N., 2013 Ilheus Virus Isolation in the Pantanal, West-Central Brazil (MJ Turell, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**: e2318.
- PAUVOLID-CORRÊA A., CAMPOS Z., JULIANO R., VELEZ J., NOGUEIRA R. M. R., KOMAR N., 2014 Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**: e2706.
- PEPIN K. M., LASS S., PULLIAM J. R. C., READ A. F., LLOYD-SMITH J. O., 2010 Identifying genetic markers of adaptation for surveillance of viral host jumps. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 802–813.
- PETERSEN L. R., ROEHRIG J. T., 2001 West Nile Virus: A Reemerging Global Pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 611–614.
- PETERSEN L. R., HAYES E. B., 2008 West Nile virus in the Americas. *Med. Clin. North Am.* **92**: 1307–22, ix.
- PETERSEN L. R., JAMIESON D. J., POWERS A. M., HONEIN M. A., 2016 Zika Virus. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1602113>.
- PFEFFER S., 2004 Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* (80-.). **304**: 734–736.
- PICKETT B. E., SADAT E. L., ZHANG Y., NORONHA J. M., SQUIRES R. B., HUNT V., LIU M., KUMAR S., ZAREMBA S., GU Z., ZHOU L., LARSON C. N., DIETRICH J., KLEM E. B., SCHEUERMANN R. H., 2012 ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. *Nucleic Acids Res.* **40**: D593-8.
- PIJLMAN G. P., FUNK A., KONDRATIEVA N., LEUNG J., TORRES S., AA L. VAN DER, LIU W. J., PALMENBERG A. C., SHI P.-Y., HALL R. A., KHROMYKH A. A., 2008 A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. *Cell Host Microbe* **4**: 579–591.
- POND W. L., 1963 Arthropod-borne virus antibodies in sera from residents of South-East Asia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **57**: 364–71.
- POSADA D., 2008 jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1253–6.
- PROW N. A., 2013 The changing epidemiology of Kunjin virus in Australia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **10**: 6255–72.
- PROW N. A., SETOH Y. X., BIRON R. M., SESTER D. P., KIM K. S., HOBSON-PETERS J., HALL R. A., BIELEFELDT-OHMANN H., 2014 The West Nile Virus-Like Flavivirus Koutango Is Highly Virulent in Mice due to Delayed Viral Clearance and the Induction of a Poor Neutralizing Antibody Response. *J. Virol.* **88**: 9947–9962.
- PUIGBÒ P., BRAVO I. G., GARCIA-VALLVE S., GRANTHAM R., GAUTIER C., GOUY M., MERCIER R., PAVE A., GOUY M., GAUTIER C., CARBONE A., ZINOVYEV A., KEPES F., SHARP P., LI W., WU G., CULLEY D., ZHANG W., WU G., NIE L., ZHANG W., PUIGBO P., GUZMAN E., ROMEU A., GARCIA-VALLVE S., RAMAZZOTTI M., BRILLI M., FANI R., MANAO G., DEGL'INNOCENTI D., PUIGBO P., ROMEU A., GARCIA-VALLVE S., WILLENBROCK H., FRIIS C., JUNCKER A., USSERY D., GARCIA-VALLVE S., PALAU J., ROMEU A., GARCIA-VALLVE S., GUZMAN E., MONTERO M., ROMEU A., XIA X., NAKAMURA Y., GOJOBORI T., IKEMURA T., RICE P., LONGDEN I., BLEASBY A., WRIGHT F., PUIGBO P., BRAVO I., GARCIA-VALLVE S., GARCIA-VALLVE S., ALONSO A., BRAVO I., GARCIA-VALLVE S., IGLESIAS-ROZAS J., ALONSO A., BRAVO I., BRAVO I., MULLER M., ZHAO K., LIU W., FRAZER I., HUGHES A., HUGHES M., PEH W., BRANDSMA J., CHRISTENSEN N., CLADEL N., WU X., DOORBAR J., DOORBAR J., PALERMO-DILTS D., BROKER T., CHOW L., GOTTSCHLING M., STAMATAKIS A., NINDL I., STOCKFLETH E., ALONSO A., BRAVO I., 2008a CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biol. Direct* **3**: 38.
- PUIGBÒ P., BRAVO I. G., GARCIA-VALLVÉ S., 2008b E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC Bioinformatics* **9**: 65.

- PYKE A. T., MOORE P. R., TAYLOR C. T., HALL-MENDELIN S., CAMERON J. N., HEWITSON G. R., PUKALLUS D. S., HUANG B., WARRILOW D., HURK A. F. VAN DEN, 2016 Highly divergent dengue virus type 1 genotype sets a new distance record. *Sci. Rep.* **6**: 22356.
- PYLRO V. S., OLIVEIRA F. S., MORAIS D. K., CUADROS-ORELLANA S., PAIS F. S.-M., MEDEIROS J. D., GERALDO J. A., GILBERT J., VOLPINI A. C., FERNANDES G. R., 2016 ZIKV – CDB: A Collaborative Database to Guide Research Linking SncRNAs and ZIKA Virus Disease Symptoms (KE Olson, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**: e0004817.
- QUIAN J., SCAVONE C., FERNÁNDEZ A., FERRE A., PAYSSÉ S., BALDOVINO R., GUERRA M., 2012 Encefalitis de San Luis, descripción de un caso clínico.: Primera comunicación nacional. *Arch. Pediatr. Urug.* **83**: 181–184.
- RAGHWANI J., RAMBAUT A., HOLMES E. C., HANG V. T., HIEN T. T., FARRAR J., WILLS B., LENNON N. J., BIRREN B. W., HENN M. R., SIMMONS C. P., 2011 Endemic Dengue Associated with the Co-Circulation of Multiple Viral Lineages and Localized Density-Dependent Transmission (AV Gamarnik, Ed.). *PLoS Pathog.* **7**: e1002064.
- RAMBAUT A., LAM T. T., CARVALHO L. M., PYBUS O. G., Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen).
- RAMÍREZ A., FAJARDO A., MOROS Z., GERDER M., CARABALLO G., CAMACHO D., COMACH G., ALARCÓN V., ZAMBRANO J., HERNÁNDEZ R., MORATORIO G., CRISTINA J., LIPRANDI F., 2010 Evolution of dengue virus type 3 genotype III in Venezuela: diversification, rates and population dynamics. *Viol. J.* **7**: 329.
- RASMUSSEN S. A., JAMIESON D. J., HONEIN M. A., PETERSEN L. R., 2016 Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMSr1604338>.
- REGATO M., RECAREY R., MORATORIO G., MORA D. DE, GARCIA-AGUIRRE L., GÓNZALEZ M., MOSQUERA C., ALAVA A., FAJARDO A., ALVAREZ M., ANDREA L. D', DUBRA A., MARTÍNEZ M., KHAN B., CRISTINA J., 2008 Phylogenetic analysis of the NS5 gene of dengue viruses isolated in Ecuador. *Virus Res.* **132**: 197–200.
- REHMSMEIER M., 2004 Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* **10**: 1507–1517.
- REIMANN C. A., HAYES E. B., DIGUISEPPI C., HOFFMAN R., LEHMAN J. A., LINDSEY N. P., CAMPBELL G. L., FISCHER M., 2008 Epidemiology of neuroinvasive arboviral disease in the United States, 1999–2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **79**: 974–9.
- REY F. A., 2003 Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 6899–901.
- REYES-DEL VALLE J., SALAS-BENITO J., SOTO-ACOSTA R., ANGEL R. M. DEL, 2014 Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. *Curr. Trop. Med. Reports* **1**: 36–43.
- RIGAU-PÉREZ J. G., CLARK G. G., GUBLER D. J., REITER P., SANDERS E. J., VORNDAM A. V., 1998 Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet (London, England)* **352**: 971–7.
- ROBERTSON L. C., PRIOR S., APPERSON C. S., IRBY W. S., 1993 Bionomics of *Anopheles quadrimaculatus* and *Culex erraticus* (Diptera: Culicidae) in the Falls Lake basin, North Carolina: seasonal changes in abundance and gonotrophic status, and host-feeding patterns. *J. Med. Entomol.* **30**: 689–98.
- ROBY J., PIJLMAN G., WILUSZ J., KHROMYKH A., 2014 Noncoding Subgenomic Flavivirus RNA: Multiple Functions in West Nile Virus Pathogenesis and Modulation of Host Responses. *Viruses* **6**: 404–427.
- ROCCO I. M., SANTOS C. L. S., BISORDI I., PETRELLA S. M. C. N., PEREIRA L. E., SOUZA R. P., COIMBRA T. L. M., BESSA T. A. F., OSHIRO F. M., LIMA L. B. Q., CERRONI M. P., MARTI A. T., BARBOSA V. M., KATZ G., SUZUKI A., 2005 St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo state, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **47**: 281–285.

- ROGERS D. J., WILSON A. J., HAY S. I., GRAHAM A. J., 2006 The global distribution of yellow fever and dengue. *Adv. Parasitol.* **62**: 181–220.
- ROSEN L., 1988 Further observations on the mechanism of vertical transmission of flaviviruses by *Aedes* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**: 123–6.
- ROSEWICK N., MOMONT M., DURKIN K., TAKEDA H., CAIMENT F., CLEUTER Y., VERNIN C., MORTREUX F., WATTEL E., BURNY A., GEORGES M., BROEKE A. VAN DEN, 2013 Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia/lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 2306–2311.
- ROSSI S. L., VASILAKIS N., 2016 Modeling Zika Virus Infection in Mice. *Cell Stem Cell* **19**: 4–6.
- ROZÉ B., NAJIOULLAH F., FERGÉ J.-L., APETSE K., BROUSTE Y., CESAIRE R., FAGOUR C., FAGOUR L., HOCHEDÉZ P., JEANNIN S., JOUX J., MEHDAOUI H., VALENTINO R., SIGNATE A., CABIÉ A., GBS ZIKA WORKING GROUP, 2016 Zika virus detection in urine from patients with Guillain-Barré syndrome on Martinique, January 2016. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* **21**.
- RUSSELL P. K., 2016 The Zika Pandemic - A Perfect Storm? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**: e0004589.
- SAEEDI B. J., GEISS B. J., 2013 Regulation of flavivirus RNA synthesis and capping. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **4**: n/a-n/a.
- SALAMANO R., SCAVONE C., BAZ M., REY A., GONZÁLEZ G., PERNA A., CARDINAL P., LEWIN S., ARBIZA J., RUCHANSKI D., 2009 Meningitis y encefalitis víricas en Uruguay: Relevamiento mediante técnicas de reacción en cadena de polimerasa aplicadas al líquido cefalorraquídeo de los grupos herpes, enterovirus y arbovirus como principales agentes etiológicos. *Rev. Médica del Uruguay* **25**: 212–218.
- SALVATELLA R., 1996 *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. *Rev Med Uruguay* **12**: 28–36.
- SALVATELLA R., 1997 *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Notificación de su presencia en Uruguay. *Rev Med Uruguay* **13**: 118–121.
- SALVATELLA R., ROSA R., 2003 Culícidos y Salud Humana en Uruguay. *Entomol. Vect.* **10**: 431–436.
- SAN MARTÍN J. L., BRATHWAITE O., ZAMBRANO B., SOLÓRZANO J. O., BOUCKENOOGHE A., DAYAN G. H., GUZMÁN M. G., 2010 The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**: 128–35.
- SÁNCHEZ-SECO M. P., ROSARIO D., DOMINGO C., HERNÁNDEZ L., VALDÉS K., GUZMÁN M. G., TENORIO A., 2005 Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J. Virol. Methods* **126**: 101–9.
- SÁNCHEZ-SECO M.-P., VÁZQUEZ A., COLLAO X., HERNÁNDEZ L., ARANDA C., RUIZ S., ESCOSA R., MARQUÉS E., BUSTILLO M.-A., MOLERO F., TENORIO A., 2010 Surveillance of arboviruses in Spanish wetlands: detection of new flavi- and phleboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**: 203–6.
- SANTOS F. B. DOS, NOGUEIRA F. B., CASTRO M. G., NUNES P. C., FILIPPIS A. M. B. DE, FARIA N. R., SIMÕES J. B., SAMPAIO S. A., SANTOS C. R., NOGUEIRA R. M. R., 2011 First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virol. J.* **8**: 387.
- SANTOS T. DOS, RODRIGUEZ A., ALMIRON M., SANHUEZA A., RAMON P., OLIVEIRA W. K. DE, COELHO G. E., BADARÓ R., CORTEZ J., OSPINA M., PIMENTEL R., MASIS R., HERNANDEZ F., LARA B., MONTOYA R., JUBITHANA B., MELCHOR A., ALVAREZ A., ALDIGHIERI S., DYE C., ESPINAL M. A., 2016 Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. *N. Engl. J. Med.:* NEJMc1609015.
- SARNO M., SACRAMENTO G. A., KHOURI R., ROSÁRIO M. S. DO, COSTA F., ARCHANJO G., SANTOS L. A., NERY N., VASILAKIS N., KO A. I., ALMEIDA A. R. P. DE, 2016 Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**: e0004517.

- SCARAMOZZINO N., CRANCE J.-M., JOUAN A., DEBRIEL D. A., STOLL F., GARIN D., 2001 Comparison of Flavivirus Universal Primer Pairs and Development of a Rapid, Highly Sensitive Heminested Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Flaviviruses Targeted to a Conserved Region of the NS5 Gene Sequences. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1922–1927.
- SCHULER-FACCINI L., RIBEIRO E. M., FEITOSA I. M. L., HOROVITZ D. D. G., CAVALCANTI D. P., PESSOA A., DORIQUEI M. J. R., NERI J. I., NETO J. M. de P., WANDERLEY H. Y. C., CERNACH M., EL-HUSNY A. S., PONE M. V. S., SERAO C. L. C., SANSEVERINO M. T. V., 2016 Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**: 59–62.
- SEIJO A., MORALES A., POUSTIS G., ROMER Y., EFRON E., VILORA G., LLOVERAS S., GIAMPERETTI S., PUENTE T., MONROIG J., LUPPO V., ENRIA D., 2011 Brote de encefalitis de San Luis en el Área Metropolitana Buenos Aires. *Med. (Buenos Aires)* **71**: 211–217.
- SELVEY L. A., DAILEY L., LINDSAY M., ARMSTRONG P., TOBIN S., KOEHLER A. P., MARKEY P. G., SMITH D. W., 2014 The Changing Epidemiology of Murray Valley Encephalitis in Australia: The 2011 Outbreak and a Review of the Literature (M Kasper, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**: e2656.
- SENANAYAKE S., 2006 Dengue fever and dengue haemorrhagic fever—a diagnostic challenge. *Aust. Fam. Physician* **35**: 609–12.
- SHARP P. M., LI W. H., 1986 An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. *J. Mol. Evol.* **24**: 28–38.
- SHARP P. M., LI W. H., 1987 The codon Adaptation Index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* **15**: 1281–95.
- SHARP P. M., EMERY L. R., ZENG K., 2010 Forces that influence the evolution of codon bias. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **365**.
- 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. *Viol. Sin.* **31**: 118–30.
- SHI J., DUAN Z., SUN J., WU M., WANG B., ZHANG J., WANG H., HU N., HU Y., 2014 Identification and validation of a novel microRNA-like molecule derived from a cytoplasmic RNA virus antigenome by bioinformatics and experimental approaches. *Viol. J.* **11**: 121.
- SHRESTHA B., AUSTIN S. K., DOWD K. A., PRASAD A. N., YOUN S., PIERSON T. C., FREMONT D. H., EBEL G. D., DIAMOND M. S., 2012 Complex phenotypes in mosquitoes and mice associated with neutralization escape of a Dengue virus type 1 monoclonal antibody. *Virology* **427**: 127–134.
- SHRIVASTAVA S., STEELE R., RAY R., RAY R. B., 2015 MicroRNAs: Role in hepatitis C virus pathogenesis. *Genes Dis.* **2**: 35–45.
- SILVA R. L. A., SILVA A. M. DE, HARRIS E., MACDONALD G. H., 2008 *Genetic analysis of Dengue 3 virus subtype III 5' and 3' non-coding regions.*
- SIMPSON D. I., 1964 Zika virus infection in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **58**: 335–8.
- SIMPSON J. A., WEINER E. S. C., OXFORD UNIVERSITY PRESS., 1989 *The Oxford English Dictionary.* Clarendon Press.
- SLATKIN M., 2001 Simulating genealogies of selected alleles in a population of variable size. *Genet. Res.* **78**: 49–57.
- SMITH C. E. G., 1956 A virus resembling Russian spring-summer encephalitis virus from an ixodid tick in Malaya. *Nature* **178**: 581–2.
- SMITHBURN K. C., 1952 Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. *J. Immunol.* **69**: 223–34.
- SMITHBURN K. C., 1954 Neutralizing antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of long-time residents of Malaya and Borneo. *Am. J. Hyg.* **59**: 157–63.
- SOLOMON T., 2004 Flavivirus encephalitis. *N. Engl. J. Med.* **351**: 370–8.

- SOMMA-MOREIRA R., CAMPIONE-PICCARDO J., RUSSI J., HORTAL DE GIORDANO M., BAUZÁ C., PELUFFO G., TOSI H., 1970 Arbovirus en el Uruguay. *Arch. Pediatr. Urug.* **41**: 5.
- SOPER F. L., 1963 The Elimination of Urban Yellow Fever in the Americas Through the Eradication of *Aedes aegypti*. *Am. J. Public Heal. Nations Heal.* **53**: 7–16.
- SOSA P., 1916 Informe del Médico del Servicio Público del Departamento de Salto, relative a una epidemia de dengue desarrollada en la capital de aquel departamento. *Bol Cons Nal Hig* **11**: 222–223.
- SPINSANTI L. I., DÍAZ L. A., GLATSTEIN N., ARSELÁN S., MORALES M. A., FARIÁS A. A., FABBRI C., AGUILAR J. J., RÉ V., FRÍAS M., ALMIRÓN W. R., HUNSPERGER E., SIIRIN M., ROSA A. T. DA, TESH R. B., ENRÍA D., CONTIGIANI M., 2008 Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J. Clin. Virol.* **42**: 27–33.
- ST GEORGE T. D., STANDFAST H. A., DOHERTY R. L., CARLEY J. G., FILLIPICH C., BRANDSMA J., 1977 The isolation of Saumarez Reef virus, a new flavivirus, from bird ticks *Ornithodoros capensis* and *Ixodes eudyptidis* in Australia. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **55**: 493–9.
- STAPLETON J. T., FOUNG S., MUERHOFF A. S., BUKH J., SIMMONDS P., 2011 The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus *Pegivirus* within the family *Flaviviridae*. *J. Gen. Virol.* **92**: 233–46.
- STOLETZKI N., EYRE-WALKER A., 2006 Synonymous Codon Usage in *Escherichia coli*: Selection for Translational Accuracy. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 374–381.
- STRAMER S. L., FANG C. T., FOSTER G. A., WAGNER A. G., BRODSKY J. P., DODD R. Y., 2005 West Nile Virus among Blood Donors in the United States, 2003 and 2004. *N. Engl. J. Med.* **353**: 451–459.
- SULLIVAN C. S., GANEM D., 2005 MicroRNAs and viral infection. *Mol. Cell* **20**: 3–7.
- TAJIMA S., TAKASAKI T., MATSUNO S., NAKAYAMA M., KURANE I., 2005 Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* **332**: 38–44.
- TALAVERA G., CASTRESANA J., 2007 Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* **56**: 564–77.
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S., 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–9.
- TAN B.-H., FU J., SUGRUE R. J., YAP E.-H., CHAN Y.-C., TAN Y. H., 1996 Recombinant Dengue Type 1 Virus NS5 Protein Expressed in *Escherichia coli* Exhibits RNA-Dependent RNA Polymerase Activity. *Virology* **216**: 317–325.
- TANG Y., DIAO Y., CHEN H., OU Q., LIU X., GAO X., YU C., WANG L., 2015 Isolation and Genetic Characterization of a Tembusu Virus Strain Isolated From Mosquitoes in Shandong, China. *Transbound. Emerg. Dis.* **62**: 209–216.
- TANG H., HAMMACK C., OGDEN S. C., WEN Z., QIAN X., LI Y., YAO B., SHIN J., ZHANG F., LEE E. M., CHRISTIAN K. M., DIDIER R. A., JIN P., SONG H., MING G., 2016 Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* **18**: 587–590.
- TAO P., DAI L., LUO M., TANG F., TIEN P., PAN Z., 2009 Analysis of synonymous codon usage in classical swine fever virus. *Virus Genes* **38**: 104–112.
- TAPPE D., RISSLAND J., GABRIEL M., EMMERICH P., GUNTHER S., HELD G., SMOLA S., SCHMIDT-CHANASIT J., 2014 First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* **19**.
- TASSANEETRITHEP B., BURGESS T. H., GRANELLI-PIPERNO A., TRUMPFHELLER C., FINKE J., SUN W., ELLER M. A., PATTANAPANYASAT K., SARASOMBATH S., BIRX D. L., STEINMAN R. M., SCHLESINGER S., MAROVICH M. A., 2003 DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **197**: 823–9.
- TENG Y., WANG Y., ZHANG X., LIU W., FAN H., YAO H., LIN B., ZHU P., YUAN W., TONG Y., CAO W., 2015 Systematic Genome-wide Screening and Prediction of microRNAs in EBOV During the 2014

- Ebolavirus Outbreak. *Sci. Rep.* **5**: 9912.
- TERZIAN A. C. B., MONDINI A., BRONZONI R. V. de M., DRUMOND B. P., FERRO B. P., CABRERA E. M. S., FIGUEIREDO L. T. M., CHIARAVALLOTTI-NETO F., NOGUEIRA M. L., 2011 Detection of Saint Louis encephalitis virus in dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **11**: 291–300.
- THAI K. T. D., HENN M. R., ZODY M. C., TRICOU V., NGUYET N. M., CHARLEBOIS P., LENNON N. J., GREEN L., VRIES P. J. DE, HIEN T. T., FARRAR J., DOORN H. R. VAN, JONG M. D. DE, BIRREN B. W., HOLMES E. C., SIMMONS C. P., 2012 High-Resolution Analysis of Intrahost Genetic Diversity in Dengue Virus Serotype 1 Infection Identifies Mixed Infections. *J. Virol.* **86**: 835–843.
- THOMAS S. J., ENDY T. P., 2011 Vaccines for the prevention of dengue: Development update. *Hum. Vaccin.* **7**: 674–684.
- THOMPSON J. D., HIGGINS D. G., GIBSON T. J., 1994 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–80.
- TILGNER M., DEAS T. S., SHI P.-Y., 2005 The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology* **331**: 375–386.
- TITTARELLI E., MISTCHENKO A. S., BARRERO P. R., 2014 Dengue Virus 1 in Buenos Aires from 1999 to 2010: Towards Local Spread (AWE Franz, Ed.). *PLoS One* **9**: e111017.
- TRAVASSOS DA ROSA A. P. A., VASCONCELOS P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA J. F. S., 1998 *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries*. Instituto Evandro Chagas.
- TSAI C.-T., LIN C.-H., CHANG C.-Y., 2007 Analysis of codon usage bias and base compositional constraints in iridovirus genomes. *Virus Res.* **126**: 196–206.
- TSETSARKIN K. A., VANLANDINGHAM D. L., MCGEE C. E., HIGGS S., 2007 A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* **3**: e201.
- TURELL M. J., WHITEHOUSE C. A., BUTLER A., BALDWIN C., HOTTEL H., MORES C. N., 2008 Assay for and replication of Karshi (mammalian tick-borne flavivirus group) virus in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **78**: 344–7.
- TURMEL J. M., ABGUEGUEN P., HUBERT B., VANDAMME Y. M., MAQUART M., GUILLOU-GUILLEMETTE H. LE, LEPARC-GOFFART I., D'ORTENZIO E., MATHERON S., LAMBALLERIE X. de, AL. et, VENTURI G., ZAMMARCI L., FORTUNA C., AL. et, LESSLER J., OTT C., CARCELEN A., AL. et, WHO, CONTROL E. C. for D. P. and, 2016 Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. *Lancet* **387**: 2501.
- UMAREDDY I., PLUQUET O., WANG Q. Y., VASUDEVAN S. G., CHEVET E., GU F., 2007 Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virol. J.* **4**: 91.
- VARELAS-WESLEY I., CALISHER C. H., 1982 Antigenic relationships of flaviviruses with undetermined arthropod-borne status. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**: 1273–84.
- VASILAKIS N., CARDOSA J., HANLEY K. A., HOLMES E. C., WEAVER S. C., 2011 Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 532–41.
- VAUGHN D. W., GREEN S., KALAYANAROOJ S., INNIS B. L., NIMMANNITYA S., SUNTAYAKORN S., ENDY T. P., RAENGSAKULRACH B., ROTHMAN A. L., ENNIS F. A., NISALAK A., 2000 Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Infect. Dis.* **181**: 2–9.
- VÁZQUEZ A., SÁNCHEZ-SECO M.-P., PALACIOS G., MOLERO F., REYES N., RUIZ S., ARANDA C., MARQUÉS E., ESCOSA R., MORENO J., FIGUEROLA J., TENORIO A., 2012 Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **12**: 223–9.
- VENTURA C. V., MAIA M., BRAVO-FILHO V., GÓIS A. L., BELFORT R., DICK G., KITCHEN S., HADDOW A., WHO, HEALTH B. M. of, HEALTH B. M. of, WHO, 2016 Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child

- with microcephaly. *Lancet* (London, England) **387**: 228.
- VENTURI G., ZAMMARCHI L., FORTUNA C., REMOLI M. E., BENEDETTI E., FIORENTINI C., TROTTA M., RIZZO C., MANTELLA A., REZZA G., BARTOLONI A., 2016 An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.* **21**.
- VENUGOPAL K., BUCKLEY A., REID H. W., GOULD E. A., 1992 Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein of Negishi virus shows very close homology to louping ill virus. *Virology* **190**: 515–21.
- VIEIRA M. A. C. E. S., AGUIAR A. de A. X., BORBA A. de S., GUIMARÃES H. C. L., EULÁLIO K. D., ALBUQUERQUE-NETO L. L. DE, SALMITO M. do A., LIMA O. B., 2015 WEST NILE FEVER IN BRAZIL: SPORADIC CASE, SILENT ENDEMIC DISEASE OR EPIDEMIC IN ITS INITIAL STAGES? *Rev. do Inst. Med. Trop. São Paulo* **57**: 276.
- VILLABONA-ARENAS C. J., ZANOTTO P. M. de A., 2011 Evolutionary history of Dengue virus type 4: insights into genotype phylodynamics. *Infect. Genet. Evol.* **11**: 878–85.
- VOLKOVA E., TESH R. B., MONATH T. P., VASILAKIS N., 2012 Full Genomic Sequence of the Prototype Strain (M64) of Rio Bravo Virus. *J. Virol.* **86**: 4715–4715.
- WALIMBE A. M., LOTANKAR M., CECILIA D., CHERIAN S. S., 2014 Global phylogeography of Dengue type 1 and 2 viruses reveals the role of India. *Infect. Genet. Evol.* **22**: 30–39.
- WANG L., VALDERRAMOS S. G., WU A., OUYANG S., LI C., BRASIL P., BONALDO M., COATES T., NIELSEN-SAINES K., JIANG T., ALIYARI R., CHENG G., 2016 From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell Host Microbe* **19**: 561–565.
- WARRILOW D., HALL-MENDELIN S., HOBSON-PETERS J., PROW N. A., ALLCOCK R., HALL R. A., 2014 Complete coding sequences of three members of the kokobera group of flaviviruses. *Genome Announc.* **2**.
- WATTS D. M., PORTER K. R., PUTVATANA P., VASQUEZ B., CALAMPA C., HAYES C. G., HALSTEAD S. B., 1999 Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* (London, England) **354**: 1431–4.
- WEAVER S. C., BARRETT A. D. T., 2004 Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 789–801.
- WEAVER S. C., VASILAKIS N., 2009 Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect. Genet. Evol.* **9**: 523–40.
- WEAVER S. C., COSTA F., GARCIA-BLANCO M. A., KO A. I., RIBEIRO G. S., SAADE G., SHI P.-Y., VASILAKIS N., 2016 Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res.* **130**: 69–80.
- WEBB B., SALI A., 2016 Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. In: *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, p. 2.9.1-2.9.37.
- WEBSTER L. T., FITE G. L., 1933 A VIRUS ENCOUNTERED IN THE STUDY OF MATERIAL FROM CASES OF ENCEPHALITIS IN THE ST. LOUIS AND KANSAS CITY EPIDEMICS OF 1933. *Science* **78**: 463–5.
- WESSA P., 2012 Free Statistics Software, Office for Research Development and Education, version 1.1.23-r7.
- WEYER J., THOMAS J., LEMAN P. A., GROBBELAAR A. A., KEMP A., PAWESKA J. T., 2013 Human cases of Wesselsbron disease, South Africa 2010–2011. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **13**: 330–6.
- WHELAN S., GOLDMAN N., 2001 A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 691–9.
- WHO, 2009 DENGUE GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL
TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL.
- WHO, 2016 OMS | Dengue — Uruguay. WHO.

- WHO - YELLOW FEVER REPORT, 2016 WHO - Yellow fever situation report. WHO.
- WHO | Tick-borne encephalitis, 2013 WHO.
- WILLIAMS R. E., CASALS J., MOUSSA M. I., HOOGSTRAAL H., 1972 Royal farm virus: a new tickborne group B agent related to the RSSE complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **21**: 582–6.
- WILLIAMS R. A. J., VÁZQUEZ A., ASAMTE I., BONNEY K., ODOOM S., PUPLAMPU N., AMPOFO W., SÁNCHEZ-SECO M. P., TENORIO A., PETERSON A. T., 2012 Yaoundé-like virus in resident wild bird, Ghana.
- WONG E. H., SMITH D. K., RABADAN R., PEIRIS M., POON L. L., 2010 Codon usage bias and the evolution of influenza A viruses. *Codon Usage Biases of Influenza Virus. BMC Evol. Biol.* **10**: 253.
- WONG P.-S. J., LI M. I., CHONG C.-S., NG L.-C., TAN C.-H., 2013 *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**: e2348.
- WOOD O. L., MOUSSA M. I., HOOGSTRAAL H., BÜTTIKER W., 1982 Kadam virus (Togaviridae, Flavivirus) infecting camel-parasitizing *Hyalomma dromedarii* ticks (Acari: Ixodidae) in Saudi Arabia. *J. Med. Entomol.* **19**: 207–8.
- WRIGHT F., 1990 The “effective number of codons” used in a gene. *Gene* **87**: 23–9.
- YAKOB L., KUCHARSKI A., HUE S., EDMUNDS W. J., 2016 Low risk of a sexually-transmitted Zika virus outbreak. *Lancet. Infect. Dis.* **16**: 1100–2.
- YAMANAKA A., THONGRUNGIAT S., RAMASOOTA P., KONISHI E., 2013 Genetic and evolutionary analysis of cell-fusing agent virus based on Thai strains isolated in 2008 and 2012. *Infect. Genet. Evol.* **19**: 188–94.
- YU C.-Y., HSU Y.-W., LIAO C.-L., LIN Y.-L., 2006 Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J. Virol.* **80**: 11868–80.
- YU L., NOMAGUCHI M., PADMANABHAN R., MARKOFF L., 2008 Specific requirements for elements of the 5′ and 3′ terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology* **374**: 170–185.
- ZANLUCA C., MELO V. C. A. de, MOSIMANN A. L. P., SANTOS G. I. V. dos, SANTOS C. N. D. dos, LUZ K., ZANLUCA C., MELO V. C. A. de, MOSIMANN A. L. P., SANTOS G. I. V. dos, SANTOS C. N. D. dos, LUZ K., 2015 First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**: 569–572.
- ZANOTTO P. M., GOULD E. A., GAO G. F., HARVEY P. H., HOLMES E. C., 1996 Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 548–53.
- ZENG L., FALGOUT B., MARKOFF L., 1998 Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3′-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication. *J. Virol.* **72**: 7510–22.
- ZHANG X., GE P., YU X., BRANNAN J. M., BI G., ZHANG Q., SCHEIN S., ZHOU Z. H., 2013 Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**: 105–10.
- ZHANG Y., FAN M., GENG G., LIU B., HUANG Z., LUO H., ZHOU J., GUO X., CAI W., ZHANG H., 2014 A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region. *Retrovirology* **11**: 23.
- ZHANG Y., CHEN W., WONG G., BI Y., YAN J., SUN Y., CHEN E., YAN H., LOU X., MAO H., XIA S., GAO G. F., SHI W., CHEN Z., 2016 Highly diversified Zika viruses imported to China, 2016. *Protein Cell* **7**: 461–4.
- ZHUOMING QIN Y. L., 2013 Seroprevalence of Newly Discovered Duck Flavivirus in Farm Animals. *J. Immunol. Tech. Infect. Dis.* **2**.
- ZIVNY J., DEFRONZO M., JARRY W., JAMESON J., CRUZ J., ENNIS F. A., ROTHMAN A. L., 1999 Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virus serotype. *J. Immunol.* **163**: 2754–60.
- ZUCKERKANDL E., 1987 On the molecular evolutionary clock. *J. Mol. Evol.* **26**: 34–46.
- ZUO S., ZHAO Q., GUO X., ZHOU H., CAO W., ZHANG J., 2014 Detection of Quang Binh virus from

mosquitoes in China. *Virus Res.* **180**: 31–8.

ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figura Suplementaria 2. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la región codificante completa de cepas de ZIKV^a.



451 | | 600

ENVOLTURA

KU527068 DENRAKVEI TPNSPRAEAT LCGFGSLGLDCE PRTGLDFS DLYYL TMNNKHW LVHKWFHDI PLPWHAGADTGT PHWNNKEA LVEFKDAHAKRQT VVVLG SQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGRLS SCHLKCR LFMDKLRLKGVSYSLCTA

KU497555 -----T-----

KU870645 -----

KU681082 -----

KU681081 -----T-----

KU707826 -----

KU744693 -----A-----A-----

KU509998 -----

KU501215 -----

KU321639 -----

KU740184 -----

KU365780 -----

KU365779 -----

KU312312 -----

601 | | 750

ENVOLTURA

KU527068 AFTFTKI PAETLHGTVTVVEVQYAGTDGPKVPAQMAVDMQT LTPVGRLLI TANPVITESTENSKMMLDPPFGDSY IVIGVGEKKI THEWHRS GSTIGKAFEA TVRCARRMAV LGDTAWDFG SVGCA LNS LKGIHQIFGAAFKS LFGGM

KU497555 -----I-----

KU870645 -----

KU681082 -----

KU681081 -----G-----V-----

KU707826 -----

KU744693 -----VD-----G-----G-----I-----

KU509998 -----

KU501215 -----

KU321639 -----

KU740184 -----

KU365780 -----

KU365779 -----

KU312312 -----

751 | | 900

NS1

KU527068 SWFSQILIGTLLM LGLNFKNGSISLMCLALGGVLI PLS TAVSADV GCSVD FSKKE TRCGTGVFVYNDVEAWRDYKYHPDSPRRLAAAVKQAWEDGICGISSVSRMENIMRSVEGE LNAI LEENGVQLTVVVGSVKPNMWRGPRLPV

KU497555 -----

KU870645 -----

KU681082 -----V-----T-----A-----

KU681081 -----

KU707826 -----V-----

KU744693 -----GG-----

KU509998 -----

KU501215 -----

KU321639 -----

KU740184 -----

KU365780 -----

KU365779 -----

KU312312 -----A-----

1351 | NS2A | NS2B | 1500

KU527068 AVRLVDPINVVGLLLL TRSGKRSWPPSEVLTAVGLICALAGGFAKADIE MAGPMAAVGLLI VSYVSGKPSVDMYLERAGDI TWEKDAEVTGNS PRLDVALDES QDFSLVEDDGPPMRE II LKVVLMPTICGMNPIAIPFAAGAWYVYVKTG

KU497555 -----

KU870645 -----V-----I-----

KU681082 -----

KU681081 -----

KU707826 -----

KU744693 -----

KU509998 -----

KU501215 -----

KU321639 -----

KU740184 -----

KU365780 -----

KU365779 -----

KU312312 -----

1501 | NS3 | 1650

KU527068 KRSCALNDVPAKREVKKCEITIDGVYRVMIFRRLLGSTQMGVGVQEGVFBIMWHVTKCSALRSCEGRLDPYWGDVQDLVSYCGPWKILDAAWDGHSEVQILLAVPPGERARNIQIILPCIEKTKKCDICAVALLIYPACTSCSPILDKKCRVIG

KU497555 -----

KU870645 -----

KU681082 -----T-----

KU681081 -----

KU707826 -----

KU744693 -----

KU509998 -----

KU501215 -----

KU321639 -----

KU740184 -----

KU365780 -----

KU365779 -----

KU312312 -----

1651 | NS3 | 1800

KU527068 IYNGVWIKNGSYVSAITQGRRELET PVECFEPSMLKKKQLTVLDDLHPGAGKTRRVLPETVREAIKTRLRITVILAPTRVVAEMEEALRGLVVRIMTAVNVT HSGTEIVDLMCHATFTSRLIQPIRVPNYNLYLMDLAHFTDPSLSIAAR

KU497555 -----

KU870645 -----

KU681082 -----

KU681081 -----

KU707826 -----

KU744693 -----

KU509998 -----

KU501215 -----

KU321639 -----

KU740184 -----

KU365780 -----

KU365779 -----

KU312312 -----

1801 1950

NS3

KU5 270 68 | **CVISIRVEMGEAAAIFMTAIPPGRROAIPDSNSPIMDTEVEVPERANSSGF DWTDHSGRTVWVFPVSVRNGNE LAACLTKAGKRVIQLSRKTFETEFQRTKHQEWDFVVTTDISEMGANFKADRVIDSRRCLKPVILDGERVILAGPMP** |

KU4 975 55 -----

KU8 706 45 -----

KU6 810 82 -----T-----N-----

KU6 810 81 -----

KU7 078 26 -----

KU7 446 93 -----EY-----R-----G-----

KU5 099 98 -----Y-----

KU5 012 15 -----

KU3 216 39 -----Y-----

KU7 401 84 -----

KU3 657 80 -----

KU3 657 79 -----

KU3 123 12 -----

1951 2100

NS3

KU5 270 68 | **THASAAQRNGRI GRNPKNPQDEYLYCGGCAETDEHHAHWLEARMLLDNIYLQDGLIASLYRPEADKVAALIGE FKLRTFQRRTFVEIMKRGDLPWLA YQVASAGITTYTDRRWCFDGTINNTIMEDSVPAEVWTRHGERVLLKPRWMDAR** |

KU4 975 55 -----

KU8 706 45 -----A-----L-----

KU6 810 82 -----M-----Y-----

KU6 810 81 -----M-----

KU7 078 26 -----

KU7 446 93 -----

KU5 099 98 -----

KU5 012 15 -----

KU3 216 39 -----

KU7 401 84 -----

KU3 657 80 -----

KU3 657 79 -----

KU3 123 12 -----

2101 2250

NS3 NS4A

KU5 270 68 | **VCSDHAA LKSPKCF AAGKRCAAFCVMEALGTLPGHMTERFQEAINLAVLMRAETGSRPYKAAAALPETLETIMLLGLLGTVSLGIFVLMRNKGIGKMGFGMVTLGASAWLMW LSEIEPARIACVLIVVFLLLWVLIPEPEKQRSPOD** |

KU4 975 55 -----

KU8 706 45 -----

KU6 810 82 -----I-----M-----

KU6 810 81 -----

KU7 078 26 -----

KU7 446 93 -----

KU5 099 98 -----

KU5 012 15 -----

KU3 216 39 -----

KU7 401 84 -----

KU3 657 80 -----

KU3 657 79 -----

KU3 123 12 -----

2251 | NS4B | 2400

KU527068 NQMAIIIMVAVGLLGLITANE LGWLERTKSDLSHLMGFRREGATIGFSMDIDLRPASAWAIYAALTTFITPAVQHAVTTSYNNYSLMAMATQAGVLFQMGKMPFYAWDFGVPLLMIGCYSQLTPLTLIVAIILLVAHYMYLIPGLQAAA

KU497555 -----

KU870645 -----

KU681082 ----- T ----- M -----

KU681081 -----

KU707826 -----

KU744693 ----- M ----- -P-----S-----

KU509998 ----- M -----

KU501215 -----

KU321639 ----- M -----

KU740184 -----

KU365780 -----

KU365779 -----

KU312312 -----

2401 | NS4B | NS5 | 2550

KU527068 ARAAQKRTAAGIMKNPVVDGIVVTDIDTMTIDPQVEKKMQVLLIAVAVSSAILSRTAWGWGEAGALITAAATSTLWEGSPNKYWNSSTATSLCNIFRGSYLAGASLTYLVTRNAGLVKRRGGGTGETLGEKWKARLNQMSALEFYSYKKS

KU497555 ----- T -----

KU870645 ----- T -----

KU681082 ----- T -----

KU681081 ----- T -----

KU707826 ----- T -----

KU744693 ----- E ----- M ----- T -----

KU509998 ----- M ----- T -----

KU501215 ----- T -----

KU321639 ----- M ----- T -----

KU740184 ----- T -----

KU365780 ----- T -----

KU365779 ----- T -----

KU312312 ----- T -----

2551 | NS5 | 2700

KU527068 GI TEVCREEARRALKDGVA TGCHAVSRGSAKLRWLVERGYLQPYCKVIDLGCCRGCWSYAAATIRKVQEVKGYTKGGPCHEEPVLVQS YQWNI VRLKSGVDVYHMAAEPCDTLLCDIGESS SPEVEEARTLRVL SMVQDWLEKRPGAFC

KU497555 -----

KU870645 ----- T -----

KU681082 ----- M -----

KU681081 ----- M -----

KU707826 -----

KU744693 -----

KU509998 -----

KU501215 ----- V -----

KU321639 -----

KU740184 -----

KU365780 -----

KU365779 -----

KU312312 -----

2701 | NS5 | 2850

KU527068 | **IKVLCPTSTMMETLERLQRRYGGGLVRVPLSRNSTHEMYWVSGAKSNTLKSVSFTSQLLGRMDGPRPVRVYEEVDNLSGSTRAVVSCAEAPNMKLLGNRLERLRSEHAETWFFDENHPYRTWAYHGSYEAPTQGSASSLINCVRLLS** |

KU497555 |-----V-----|

KU870645 |-----|

KU681082 |-----|

KU681081 |V-----|

KU707826 |-----|

KU744693 |-----A-K-----D-A-----|

KU509998 |-----|

KU501215 |-----|

KU321639 |-----|

KU740184 |-----I-----A-----|

KU365780 |-----D-----|

KU365779 |-----|

KU312312 |-----|

2851 | NS5 | 3000

KU527068 | **KPNDVVTGVTGLAMTDITPYGQQRVFKKVDTRVDPQRCRQVMSMVS SWLNKELGRHKRPRVCTKEEFLNKVRSNAALGAI FEE EKWKTA VEA VNDPRFWALVDKEREHHLRGECQSCVYNMMGKREKQGEFGKAKGSRATWYMWI** |

KU497555 |-----|

KU870645 |-----|

KU681082 |-----|

KU681081 |-----|

KU707826 |-----|

KU744693 |-----IT-----|

KU509998 |-----|

KU501215 |-----|

KU321639 |-----|

KU740184 |-----|

KU365780 |-----|

KU365779 |-----|

KU312312 |-----|

3001 | NS5 | 3150

KU527068 | **CARFLEFEALGF LNEDHMMGRENSGGGVEGLGLQRLGYVLEMSRI PGGEMYADDTACWDTRI SRF DLENEALITNOMERGRALALAIKYTYCNKVVKVL RPAERKRTVMOLI SFQDQSGQVVTYALNTFTNLVQLIRNMEAEV** |

KU497555 |-----C-----|

KU870645 |-----|

KU681082 |-----|

KU681081 |-----|

KU707826 |-----|

KU744693 |-----|

KU509998 |-----|

KU501215 |-----|

KU321639 |-----|

KU740184 |-----|

KU365780 |-----|

KU365779 |-----|

KU312312 |-----|

ANEXO II: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA

TESIS

Bayesian Coalescent Inference Reveals High Evolutionary Rates and Diversification of Zika Virus Populations

Alvaro Fajardo,¹ Martín Soñora,¹ Pilar Moreno,¹ Gonzalo Moratorio,^{1,2} and Juan Cristina^{1*}

¹Molecular Virology Laboratory, CIN, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay

²Viral Populations and Pathogenesis laboratory. Institut Pasteur, Paris, France

Zika virus (ZIKV) is a member of the family *Flaviviridae*. In 2015, ZIKV triggered an epidemic in Brazil and spread across Latin America. By May of 2016, the World Health Organization warns over spread of ZIKV beyond this region. Detailed studies on the mode of evolution of ZIKV strains are extremely important for our understanding of the emergence and spread of ZIKV populations. In order to gain insight into these matters, a Bayesian coalescent Markov Chain Monte Carlo analysis of complete genome sequences of recently isolated ZIKV strains was performed. The results of these studies revealed a mean rate of evolution of 1.20×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year (s/s/y) for ZIKV strains enrolled in this study. Several variants isolated in China are grouped together with all strains isolated in Latin America. Another genetic group composed exclusively by Chinese strains were also observed, suggesting the co-circulation of different genetic lineages in China. These findings indicate a high level of diversification of ZIKV populations. Strains isolated from microcephaly cases do not share amino acid substitutions, suggesting that other factors besides viral genetic differences may play a role for the proposed pathogenesis caused by ZIKV infection. **J. Med. Virol.**

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: Zika; coalescent; bayesian; evolution; microcephaly

INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus, whose natural transmission cycle involves mosquitoes vectors from the *Aedes* (*Ae.*) genus, while humans are occasional hosts [Hayes, 2009]. Clinical manifestations of disease range from asymptomatic cases to fever,

headache, malaise, and cutaneous rash. ZIKV is transmitted primarily by *Ae. aegypti* mosquitoes [Hayes, 2009]. Other mosquitoes species, like *Ae. albopictus*, can transmit the virus. Both mosquitoes species are found throughout the Americas, where also transmit Dengue and Chikungunya viruses [Hennessey et al., 2016].

ZIKV genome consists of a single-stranded positive sense RNA molecule of 10,794 nt in length. It has two non-coding regions at the 5' and 3' end of the genome. This genome encode for a single long open reading frame encoding a polyprotein that is cleaved into capsid (C), precursor of membrane (prM), envelope (E), and seven non-structural proteins (NS) [Kuno and Chang, 2007].

ZIKV was isolated for the first time in 1947, from the blood of a sentinel Rhesus monkey stationed in the Zika forest, Uganda [Dick et al., 1952]. Although, ZIKV enzootic activity was reported in diverse countries of Africa and Asia, few human cases were reported until 2007, when an epidemic took place in Micronesia [Duffy et al., 2009]. A large ZIKV outbreak took place in French Polynesia during 2013–2014 and then spread to other Pacific Islands [Musso, 2015]. In early 2015, a ZIKV epidemic outbreak took place in Brazil, currently estimated at 440,000–1,300,000 cases [Campos et al., 2015]. By January 20th, 2016, ZIKV locally transmitted cases were reported from Puerto Rico and 19 other

Grant sponsor: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII); Grant sponsor: PEDECIBA; Grant sponsor: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC); Grant sponsor: Grupos I+D program

Conflict of interest: None.

*Correspondence to: Juan Cristina, Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Igua 4225, 11400 Montevideo, Uruguay. E-mail: cristina@cin.edu.uy

Accepted 2 June 2016

DOI 10.1002/jmv.24596

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

© 2016 WILEY PERIODICALS, INC.

countries or territories in the American region to the Pan American Health Organization [Hennessey et al., 2016]. Several studies have raised concern about the possible relation among microcephaly and ZIKV infection [Schuler-Faccini et al., 2016].

Recent phylogenetic studies estimates a single introduction of ZIKV in the American region occurred between May and December of 2013. This is more than 12 months prior the detection of ZIKV in Brazil. This date coincides with an increase of passengers flying to Brazil from ZIKV endemic areas, and with outbreaks in Pacific Islands [Faria et al., 2016].

By May of 2016, the World Health Organization expressed concern over spread of ZIKV beyond Latin America [Gulland, 2016]. In order to gain insight into the current situation of the ZIKV outbreak, a Bayesian coalescent analysis of recently isolated ZIKV strains, including strains isolated from microcephaly cases and for whom complete genomes are known, was performed in order to investigate evolutionary rates, population dynamics, and patterns of evolution.

MATERIALS AND METHODS

Sequences

Complete coding sequences of 39 available and comparable ZIKV strains (10,269 nucleotides) were obtained from GenBank (available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). For strain names and accession numbers see Supplementary Material Table S I. Sequences were aligned using the MUSCLE program [Edgar, 2004].

Bayesian Coalescent Markov Chain Monte Carlo (MCMC) Analysis

In order to gain insight into the evolutionary rate and mode of evolution of currently circulating ZIKV strains, we used a Bayesian MCMC approach as implemented in the BEAST package v.1.8.0 [Drummond and Rambaut, 2007]. First, the optimal evolutionary model that best fitted our sequence

dataset was identified using FindModel software (available at: <http://hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>). Akaike Information Criteria (AIC) and the log of the likelihood (LnL) indicated that the GTR+ Γ model was the most suitable model. Both strict and relaxed molecular clock models were used to test different dynamic models (constant population size, exponential population growth, expansion population growth, logistic population growth, and Bayesian Skyline). To account for uncertainty of sampling date, precision values were included for sequences that only indicated its sampling year. Statistical uncertainty in the data was reflected by the 95% highest posterior density (HPD) values. Results were examined using the TRACER v1.6 program (available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). Convergence was obtained for two independent runs with 40 million generations, after a burn-in of four million steps, which were sufficient to obtain a proper sample for the posterior, assessed by effective sample sizes (ESS) above 200. Models were compared by AICM from the posterior output of each of the models using TRACER v1.6 program. Lower AICM values indicate better model fit. The Bayesian Skyline model was the best model to analyze the data. Maximum clade credibility trees were generated by means of the use of the Tree Annotator program from the BEAST package. Visualization of the annotated trees was done using the FigTree program v1.4.2 (available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

RESULTS

In order to determine the evolutionary rate and mode of evolution of the currently circulating ZIKV strains, a Bayesian MCMC approach was employed as implemented in the BEAST package v.1.8.0 [Drummond and Rambaut, 2007]. The results shown in Table I are the outcome of 40 million steps of the MCMC, using the GTR+ Γ model, a strict molecular clock, and the Bayesian Skyline model.

A mean rate of 1.20×10^{-3} nucleotide substitutions per site per year (s/s/y) was obtained for the ZIKV

TABLE I. Bayesian Coalescent Inference of ZIKV Strains

Group ^a	Parameter	Value ^b	HPD ^c	ESS ^d
ZIKV full-length coding sequence	Prior	-2657	-2673 to -2640	2232
	Posterior	-22566	-22584 to -22548	3101
	Log likelihood	-19909	-19920 to -19899	6369
	Clock rate ^e	1.20×10^{-3}	9.51×10^{-4} to 1.41×10^{-3}	1967
	tMRCA ^f American clade	2.063	2.4398 to 1.7244	1773
	tMRCA ^f American-China clade	11/02/2014	27/09/2013 to 15/06/2014	2663
		2.774	3.2125 to 2.4054	
		28/05/2013	19/12/2012 to 09/10/2013	

^aSee Supplementary Material Table SI for strains included in this analysis.

^bIn all cases, the mean values are shown.

^cHPD, high probability density values.

^dESS, effective sample size.

^eClock rate was calculated in substitutions/site/year.

^ftMRCA, time of the most common recent ancestor is shown in years. The date estimated is indicated in bold.

strains enrolled in these studies using exclusively complete coding sequences (Table I). Phylogenetic relations among currently circulating ZIKV strains were explored and summarized in a maximum clade credibility tree shown in Figure. 1. ZIKV strains that emerged in Latin America in 2015, as well as strains isolated in that region in 2016 cluster together and are closely related with the only French Polynesian variant available, in agreement with recent results [Musso, 2015]. This Latin American cluster group together several strains isolated in China in 2016 (Fig. 1, in red). Interestingly, another genetic group composed exclusively by Chinese strains can be observed (Fig. 1, in blue), revealing that two different genetic lineages of ZIKV co-circulate in China. Strains isolated from microcephaly cases in 2015 and 2016 are not identical and cluster in different branches of the Latin American group (Fig. 1, in green).

DISCUSSION

The evolutionary rate estimated in this study for currently circulating ZIKV strains (1.20×10^{-3} s/s/y) is slightly higher than the one reported in recent studies on the early stages of the ZIKV outbreak in the Americas ($0.98-1.06 \times 10^{-3}$ s/s/y) [Faria et al., 2016].

The difference in these estimates can be explained by the fact that the present study includes more Latin American strains, as more recently obtained sequences were considered. Therefore, it is possible that the epidemic is still in its expansive phase, as suggested in previous epidemics analyses which showed that higher evolutionary rates tend to decline as the epidemic progresses [Meyer et al., 2015; Park et al., 2015].

Previous studies have shown that ZIKV strains isolated in Latin America belong to the Asian cluster [Campos et al., 2015; Musso, 2015]. In this study, using full-length coding sequences, a cluster exclusively composed of ZIKV strains that emerged in Latin America was observed, in agreement with recent results [Faria et al., 2016] (see Fig. 1).

Recent studies revealed a significant sequence variations in ZIKV genomes between the African and Asian lineages, as well as among different strains within Asian lineage, as the clinical disease caused by ZIKV has changed from a benign illness to include severe neuropathology [Wang et al., 2016]. ZIKV prM protein had the highest percentage variability between the Asian human and the African mosquito ZIKV strains. Amino acid substitutions in that protein resulted in a dramatic predicted structural change between the African and Asian strains

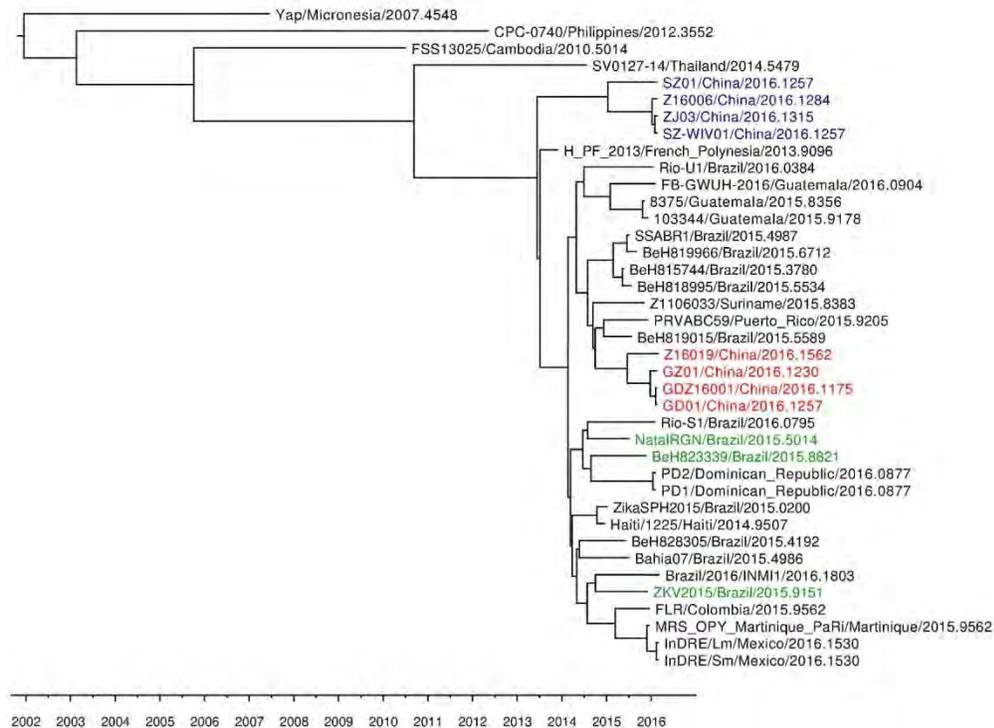


Fig. 1. MCC tree of ZIKV complete coding sequences. A maximum clade credibility tree was obtained using the GTR+I model, the Bayesian Skyline model, and a strict clock. The tree is rooted to the MRCA of strains included. The x axis indicates years. Strains in the tree are shown by their name, geographi-

cal location and year of isolation expressed in decimal format. ZIKV strains isolated in China clustering with Latin American variants are highlighted red, while other ZIKV variants isolated in that country that cluster apart are indicated in blue. Strains isolated from microcephaly cases are indicated in green.

[Wang et al., 2016]. These changes in prM could play a role in virulence or improved fitness. More studies will be needed to address this important issue.

Previous phylogenetic analysis characterized two major genetic lineages of ZIKV, the African and Asian lineages [Haddow et al., 2012; Faye et al., 2014]. Very recently, phylogenetic analyses based on ZIKV E and NS5 genes revealed the presence of three distinct lineages, (Asian/American lineage, African lineage 1, and African lineage 2) [Shen et al., 2016]. These studies also revealed important phylogeographic roles of two African countries, Senegal and Cote d'Ivoire, in ZIKV evolution and divergence [Shen et al., 2016]. Moreover, these studies revealed the migration of ZIKV from Senegal to the Asian countries and Pacific islands. Senegal was also suggested as the geographic origin of all known ZIKV epidemics outside Africa [Shen et al., 2016]. This is in agreement with the results of this work, since ZIKV strains belonging to the cluster exclusively composed by Latin American strains have a close genetic relation with strains isolated in the French Polynesia (see Fig. 1). Moreover, this is also in agreement with recent studies that revealed that the closest strain to the one that emerged in Brazil was isolated from samples from French Polynesia that spread to the Pacific Islands [Musso, 2015].

The time of the most recent common ancestor (tMRCA) of all Latin American ZIKV strains was estimated around February 2014 (95% HPD: September 2013 to June 2014) (Table I). This result is in line with recent studies that estimate the tMRCA of Brazilian isolates between August 2013 and April 2014 [Faria et al., 2016]. This clade is not exclusively composed of Latin American strains, as several Chinese strains can be observed (Fig. 1, in red). These strains seem to derive from imported cases from Latin American variants. This has also been observed in other regions of the world [Massad et al., 2016], as is the case of strain Brazil/2016/INMI1, isolated in Rome, Italy, of Brazilian origin. Interestingly, another cluster composed exclusively of Chinese strains can be observed (Fig. 1, in blue). This Chinese genetic lineage shares a common ancestor with Latin American strains, which was estimated in May 2013 (95% HPD: December 2012 to October 2013), short before the circulation of an ancestral variant that give rise to both Latin American and French Polynesian strains (Fig. 1), recently, dated to May 2013 (confidence interval: December 2012 and September 2013) [Faria et al., 2016]. This finding suggests that this Chinese genetic lineage should have probably evolved from an ancestor that circulated in the Pacific Islands outbreak in 2013. This co-temporal circulation of viral lineages with different evolutionary histories suggests that ZIKV diversification may be greatly underestimated. This may be related to the fact that most of ZIKV infections are asymptomatic, and symptomatic diseases are

generally mild with clinical manifestations that can be mistaken with other arboviral infections, leading to misdiagnosis and underreporting [Haddow et al., 2012]. This was the case in Micronesian outbreak of 2007, where patients were initially diagnosed with dengue fever [Lanciotti et al., 2008; Duffy et al., 2009]. Another important aspect that supports this observation is that ZIKV natural transmission cycle involves mainly *Aedes* mosquitoes and monkeys, while humans and other mammals act as occasional hosts [Darwish et al., 1983; Hayes, 2009; Faye et al., 2014]. However, humans may act as potentially reservoirs hosts in urban cycles if they exhibit high and sustainable level of viremia [Duffy et al., 2009]. Therefore, although it has been suggested that ZIKV is mainly maintained in nature in its sylvatic cycle, the serological evidence suggest a high incidence of ZIKV circulation in humans [Duffy et al., 2009; Faye et al., 2014]. Moreover, the potential of ZIKV as an emerging disease that can easily spread around the world can be supported by the extent of the current Latin American outbreak, as well as the observation of a different genetic lineage circulating in China, which may have probably remained undetected in the absence of this American epidemic.

Interestingly, although all Latin American strains enrolled in this study are assigned to the same cluster, strains isolated from microcephaly cases are not identical and cluster in different branches of the cluster (see Fig. 1). A more detailed study of ZIKV strain NatalRGN/Brazil/2015 genome, isolated from fetal brain tissue from a microcephaly case [Mlakar et al., 2016], reveal four unique amino acids substitutions in relation to all other strains enrolled in these studies, three of them in NS1 protein (substitutions K143E, T230A, and M346V) and one in NS5 protein (T3I). A similar analysis of ZIKV strain ZKV2015/Brazil/2015, isolated from amniotic fluid of fetuses with microcephaly [Calvet et al., 2016] revealed three unique amino acid substitutions in relation to all other strains enrolled in these studies, one in the envelope (E) protein (substitution S287E), one in the NS2A protein (substitution L107F), and one in NS5 protein (substitution E579V). Strain FB-GWUH-2016, isolated in 2016 from fetal brain [Driggers et al., 2016], reveal nine unique amino acid substitutions in relation to all other strains enrolled in this studies, which are substitution F147L in pre-membrane, V390I in envelope, G108A and K224Q in NS1, M38V in NS2B, T462A and M467L in NS3, A171T and R538C in NS5 proteins. As it can be observed, none of these substitutions are shared among recently published microcephaly-case genomes. This is in agreement with recent and previous reports [Calvet et al., 2016; Faria et al., 2016; Mlakar et al., 2016].

CONCLUSIONS

Taking all these results together, high evolutionary rates and fast population growth characterize the

population dynamics of ZIKV strains that emerged in the Latin American region. Difficulties to diagnose ZIKV infections have historically lead to low number of reporting cases and limited sequence availability. However, both the serological evidence of high level of ZIKV circulation in humans, and the observation of a genetic lineage in China that cluster apart from Latin American outbreak strains, indicate a high level of diversification of this viral agent. These observations also suggest the potential of ZIKV as an emerging disease capable to rapid spread to different regions of the world. Strains isolated from microcephaly cases do not share amino acid substitutions, suggesting that other factors besides viral genetic differences may play a role for the proposed pathogenesis caused by ZIKV infection.

REFERENCES

- Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, Araujo ES, de Sequeira PC, de Mendonça MC, de Oliveira L, Tschoeke DA, Schrago CG, Thompson FL, Brasil P, Dos Santos FB, Nogueira RM, Tanuri A, de Filippis AM. 2016. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: A case study. *Lancet Infect Dis* S1473–S3099.
- Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. 2015. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 21:1885–1886.
- Darwish MA, Hoogstraal H, Roberts TJ, Ahmed IP, Omar F. 1983. A seroepidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77:442–445.
- Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46: 509–520.
- Driggers RW, Ho CY, Korhonen EM, Kuivaniemi S, Jääskeläinen AJ, Smura T, Rosenberg A, Hill DA, DeBiasi RL, Vezina G, Timofeev J, Rodriguez FJ, Levanov L, Razak J, Iyengar P, Hennenfent A, Kennedy R, Lanciotti R, du Plessis A, Vapalahti O. 2016. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and FBrain abnormalities. *New Engl J Med* 374:2142–2151.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB. 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360:2536–2543.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:113.
- Faria NR, Azevedo RD, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, Thézé J, Bonsall MB, Bowden TA, Rissanen I, Rocco IM, Nogueira JS, Maeda AY, Vasami FG, Macedo FL, Suzuki A, Rodrigues SG, Cruz AC, Nunes BT, Medeiros DB, Rodrigues DS, Nunes Queiroz AL, Silva EV, Henriques DF, Travassos da Rosa ES, de Oliveira CS, Martins LC, Vasconcelos HB, Casseb LM, Simith DB, Messina JP, Abade L, Lourenço J, Alcantara LC, Lima MM, Giovanetti M, Hay SI, de Oliveira RS, Lemos PD, Oliveira LF, de Lima CP, da Silva SP, Vasconcelos JM, Franco L, Cardoso JF, Vianez-Júnior JL, Mir D, Bello G, Delatorre E, Khan K, Creatore M, Coelho GE, de Oliveira WK, Tesh R, Pybus OG, Nunes MR, Vasconcelos PF. 2016. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* 352:345–349.
- Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M. 2014. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis* 8:2636.
- Gulland A. 2016. WHO's Chan warns over spread of Zika virus beyond Latin America. *BMJ*. 352:1739.
- Haddock AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R. 2012. Genetic characterization of Zika virus strains: Geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis* 6:1477.
- Hayes EB. 2009. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis* 15: 1347–1350.
- Hennessey M, Fischer M, Staples E. 2016. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65:55–58.
- Kuno G, Chang G. 2007. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol* 152:687–696.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 14:1232–1239.
- Massad E, Tan SH, Khan K, Wilder-Smith A. 2016. Estimated Zika virus importations to Europe by travellers from Brazil. *Glob Health Action* 9:31669.
- Meyer AG, Spielman SJ, Bedford T, Wilke CO. 2015. Time dependence of evolutionary metrics during the 2009 pandemic influenza virus outbreak. *Virus Evol* 1:vev006.
- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, Vizjak A, Pizem J, Petrovec M, Avšič Županc T. 2016. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med* 374:951–958.
- Musso D. 2015. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis* 21:1887.
- Park DJ, Dudas G, Wohl S, Goba A, Whitmer SL, Andersen KG, Sealfon RS, Ladner JT, Kugelman JR, Matranga CB, Winnicki SM, Qu J, Gire SK, Gladden-Young A, Jalloh S, Nosamiefan D, Yozwiak NL, Moses LM, Jiang PP, Lin AE, Schaffner SF, Bird B, Towner J, Mamoh M, Gbokie M, Klena L, Kargbo D, Massally JL, Kamara FK, Konuwa E, Sellu J, Jalloh AA, Mustapha I, Foday M, Yillah M, Erickson BR, Sealy T, Blau D, Paddock C, Brault A, Amman B, Basile J, Bearden S, Belsler J, Bergeron E, Campbell S, Chakrabarti A, Dodd K, Flint M, Gibbons A, Goodman C, Klena J, McMullan L, Morgan L, Russell B, Salzer J, Sanchez A, Wang D, Jungreis I, Tomkins-Tinch C, Kislyuk A, Lin MF, Chapman S, MacInnis B, Matthews A, Bochicchio J, Hensley LE, Kuhn JH, Nusbaum C, Schieffelin JS, Birren BW, Forget M, Nichol ST, Palacios GF, Ndiaye D, Happi C, Gevao SM, Vandi MA, Kargbo B, Holmes EC, Bedford T, Gnirke A, Ströher U, Rambaut A, Garry RF, Sabeti PC. 2015. Ebola virus epidemiology, transmission, and evolution during seven months in Sierra Leone. *Cell* 161:1516–1526.
- Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, Doriqui MJ, Neri JI, Neto JM, Wanderley HY, Cernach M, El-Husny AS, Pone MV, Seroo CL, Sanseverino MT, Brazilian Medical Genetics Society—Zika Embryopathy Task Force. 2016. Possible association between Zika virus infection and Microcephaly—Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65:59–62.
- 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. *Virus Sin* 31:118–130.
- Wang L, Valderramos SG, Wu A, Li C, Brasil P, Bonaldo M, Coates T, Nielsen-Saines K, Jiang T, Aliyari R, Cheng G. 2016. From mosquitoes to humans: Genetic evolution of Zika virus. *Cell Host Microbe* 19:561–565.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.



A detailed comparative analysis of codon usage bias in Zika virus



Juan Cristina^{a,*}, Alvaro Fajardo^a, Martín Soñora^a, Gonzalo Moratorio^{a,b}, Héctor Musto^c

^a Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^b Viral Populations and Pathogenesis laboratory, Institut Pasteur, CNRS UMR 3569, Paris, France

^c Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 February 2016

Received in revised form 8 June 2016

Accepted 14 June 2016

Available online 19 July 2016

Keywords:

Zika

Codon usage

Codon bias

Evolution

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is a member of the family *Flaviviridae* and its genome consists of a single-stranded positive sense RNA molecule with 10,794 nucleotides. Clinical manifestations of disease caused by ZIKV infection range from asymptomatic cases to an influenza-like syndrome. There is an increasing concern about the possible relation among microcephaly and ZIKV infection. To get insight into the relation of codon usage among viruses and their hosts is extremely important to understand virus survival, fitness, evasion from host's immune system and evolution. In this study, we performed a comprehensive analysis of codon usage and composition of ZIKV. The overall codon usage among ZIKV strains is similar and slightly biased. Different codon preferences in ZIKV genes in relation to codon usage of human, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* genes were found. Most of the highly frequent codons are A-ending, which strongly suggests that mutational bias is the main force shaping codon usage in this virus. G+C compositional constraint as well as dinucleotide composition also influence the codon usage of ZIKV. The results of these studies suggest that the emergence of ZIKV outside Africa, in the Pacific and the Americas may also be reflected in ZIKV codon usage. No significant differences were found in codon usage among strains isolated from microcephaly cases and the rest of strains from the Asian cluster enrolled in these studies.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne flavivirus, whose natural transmission cycle involves mainly vectors from the *Aedes* (*A.*) genus, while humans are occasional hosts (Hayes, 2009). Clinical manifestations of disease range from asymptomatic cases to an influenza-like syndrome associated to fever, headache, malaise and cutaneous rash (Simpson, 1964). ZIKV is transmitted mainly by *A. aegypti* mosquitoes.

(Hayes, 2009). *A. albopictus* mosquitoes might also transmit the virus. These vectors are found throughout the Americas, and also transmit dengue and chikungunya viruses (Hennessey et al., 2016).

In early 2015, an outbreak of ZIKV was identified in northeast Brazil, and by September of that year, reports of an increase in the number of infants born with microcephaly in ZIKV-affected areas began to emerge, raising concern about the possible relation among microcephaly and ZIKV infection (Schuler-Faccini et al., 2016). More studies currently under way address this important

issue (Butler, 2016). The presence of *Aedes* mosquitoes across Latin America, coupled with suitable climatic conditions, have triggered a ZIKV epidemic in Brazil, currently estimated at 440,000–1,300,000 cases, with the potential to rapidly spread across Latin

America and the Caribbean (Bogoch et al., 2016). By January 20, 2016, locally-transmitted cases had been reported to the Pan American Health Organization from Puerto Rico and 19 other countries or territories in the Americas (Hennessey et al., 2016).

The ZIKV genome consists of a single-stranded positive sense RNA molecule of 10,794 nucleotides with 2 flanking non-coding regions (5' and 3'NCR) and a single long open reading frame encoding a polyprotein: 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3', that is cleaved into capsid (C), precursor of membrane (prM), envelope (E) and seven non-structural proteins (NS) (Kuno and Chang, 2007).

The redundancy of the genetic code offers evolution the opportunity to tune the efficiency and accuracy of protein production to various levels, while maintaining the same amino acid sequence (Stoletzki and Eyre-Walker, 2007).

The relation of codon usage among viruses and their hosts is expected to affect viral survival, fitness, evasion from host's

* Corresponding author.

E-mail address: cristina@cin.edu.uy (J. Cristina).

immune system and evolution (Burns et al., 2006; Mueller et al., 2006; Costafreda et al., 2014).

Synonymous triplets are generally not used randomly, and the main forces that drive this bias from equal usage are natural selection (which is mainly related to translation efficiency at two different levels: speed and accuracy) and mutational biases (for a review see Sharp et al., 2010). Therefore, the study of codon usage patterns in viruses can reveal important information about virus evolution, regulation of gene expression and protein synthesis, and aid in vaccine design (Butt et al., 2014).

In the present study, we performed comprehensive analyses of codon usage and composition of ZIKV strains from which complete genome sequences are known, including all available strains isolated from microcephaly cases, and investigated the possible key evolutionary determinants of the biases found.

2. Materials and methods

2.1. Sequences

Complete genome sequences for 37 ZIKV strains were obtained from DDBJ and GenBank databases (available at: <http://arsa.ddbj.nig.ac.jp> and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, respectively), including all available ZIKV genomes isolated from microcephaly cases (Mlakar et al., 2016; Calvet et al., 2016; Driggers et al., 2016). For strain names and accession numbers see Supplementary material Table 1. For each strain the ORFs were aligned using the MUSCLE program (Edgar, 2004). The alignment is available upon request. The data set comprised a total of 126,615 codons.

2.2. Data analysis

Codon usage, dinucleotide frequencies, base composition, the relative synonymous codon usage (RSCU) (Sharp and Li, 1986), the effective number of codons (ENC) (Novembre, 2002), total G + C genomic content, as well as G + C content at first, second and third codon positions were calculated using the program CodonW (written by John Peden and available at <http://sourceforge.net/projects/codonw>). ENC index can vary between 20 and 61 and a low value indicates a strong bias in codon usage. To study codon usage preferences in ZIKV in relation to the codon usage of human, *A. aegypti* or *A. albopictus* cells, we employed the codon adaptation index (CAI) (Sharp and Li, 1987). CAI was calculated using the approach of Puigbo et al. (2008a) (available at: <http://genomes.urv.es/CAIcal>) for human, *A. aegypti* and *A. albopictus* cells. This method allows to compare a given codon usage (in our case, ZIKV) to a predefined reference set (human, *A. aegypti* or *A. albopictus*). In order to show whether the ZIKV genes are well adapted to the codon usage of the reference set, as measured by CAI, we constructed a dataset composed of 322 human genes selected at random from Ensembl Database (available at <http://www.ensembl.org>), 22 *A. aegypti* and 15 *A. albopictus* genes obtained from ARSA at DNA Database of Japan (available at: <http://www.arsa.ddbj.nig.ac.jp/>). A statistically significant difference among CAI values was addressed applying a Wilcoxon & Mann-Whitney test (Wessa, 2012). In order to discern if the statistically significant differences in the CAI values arise from codon preferences, we used e-CAI (Puigbo et al., 2008b) to calculate the expected value of CAI (eCAI) at the 95% confident interval. A Kolmogorov-Smirnov test for the expected CAI was also performed (Puigbo et al., 2008b). The RSCU values of human, *A. aegypti* and *A. albopictus* cells were obtained from Kazusa database (available at: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

2.3. Multivariate analysis

The relationship between variables and samples can be obtained using a multivariate statistical analysis. Correspondence analysis (COA) is a type of multivariate analysis that allows a geometrical representation of the sets of rows and columns in a dataset (Wong et al., 2010; Greenacre, 1984). Each ORF is represented as a 59-dimensional vector and each dimension corresponds to the RSCU value of each codon (all triplets excluding AUG, UGG and stop triplets). Major trends within a dataset can be determined using measures of relative inertia and genes ordered according to their position along the different axes (Tao et al., 2009). COA was performed on the RSCU values using the program CodonW. Correlation analysis was carried out using Spearman's rank correlation analysis method (Wessa, 2012; available at: www.wessa.net).

3. Results and discussion

3.1. General codon usage pattern in ZIKV

In order to gain insight into the extent of codon usage bias in ZIKV, the ENC's values were calculated for the 37 strains enrolled in this study. A mean value of 53.16 ± 0.28 was obtained for ZIKV strains enrolled in these studies. In general, there is an inverse relationship between ENC and gene expression; i.e., a lower ENC value indicates a higher codon usage bias and is suggestive of higher gene expression and vice versa (Wright, 1990). An average value of ENC of 53.16 ± 0.28 (ENC > 40) represents stable ENC values and indicates a relatively conserved genomic composition among different ZIKV genomes.

This is in agreement with previous studies in other RNA viruses, like Zaire Ebola virus (ENC = 57.23) (Cristina et al., 2015), Chikungunya virus (ENC = 55.56) (Butt et al., 2014), bovine viral diarrhoea virus (ENC = 50.91) (Wang et al., 2011), classical swine fever virus (ENC = 51.7) (Tao et al., 2009), Hepatitis C virus (ENC = 52.62) (Hu et al., 2011), West Nile virus (ENC = 53.81) (Moratorio et al., 2013) and Dengue virus (DENV) (ENC = 49.70) (Ma et al., 2013). One possible explanation for the weak codon bias found for RNA viruses is that it might be advantageous for efficient replication in host cells with potentially distinct codon preferences (Jenkins and Holmes, 2003).

A plot of ENC versus GC3 S (ENC plotted against G + C content at the third codon position) is widely used to study codon usage variation among genes in different organisms (Wright, 1990). It has been shown that an ENC-GC3 S plot of genes, whose codon choice is constrained only by a G3+ C3 mutational bias, will lie on or just below the continuous curve of the predicted ENC values (Tsai et al., 2007). In order to gain insight into these matters, we constructed the plot between the ENC and GC3 S values obtained for all ZIKV strains enrolled in these studies. As shown in Fig. 1, all points lie together under the expected ENC curve, indicating that G + C compositional constraints might play a role in ZIKV codon usage.

Moreover, these results indicate that codon bias in ZIKV is related to mutational bias and not to translational control, which may be very weak and/or virtually absent in the reading frames of these viruses.

3.2. Trends in codon usage variation across ZIKV strains

In order to gain insight into the trends in codon usage variation among different ZIKV genomes, we performed a COA analysis. COA was performed on the RSCU values for each strain and we examined the distribution of the strains in the plane defined by the first two principal axes of COA. The first axis generated by the analysis accounts for 72.80% of the total variation, while the second

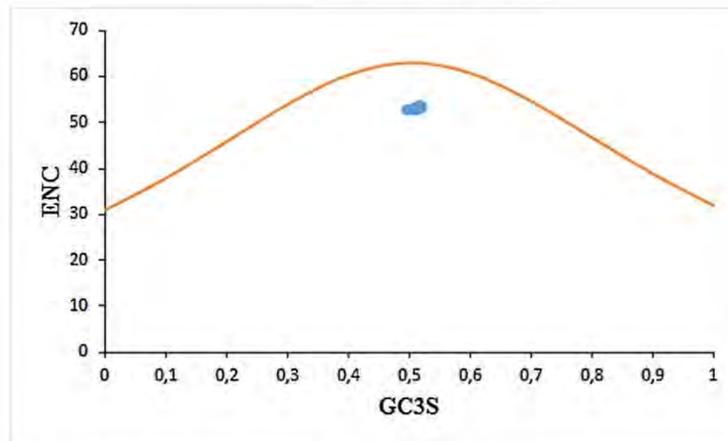


Fig. 1. Effective number of codons (ENC) used in ZIKV ORFs plotted against the GC3S. The curve plots the relationship between GC3S and ENC in absence of selection. Blue dots show the results obtained for ZIKV strains. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

axis accounts for 7.55%. The results of these studies are shown in Fig. 2.

It can be seen that different ZIKV isolates are located at different positions in the plane. This is in agreement with previous reports revealing that ZIKV strains can be assigned to three different genetic clusters (Faye et al., 2014; Alera et al., 2015). One cluster, denominated Ugandan cluster, is composed of African strains isolated in Cote d'Ivoire, Senegal and Central African Republic, and contains the MR766 prototype strain isolated in Uganda en 1947 (red points). A second cluster of African strains, denominated Nigerian cluster (black points), is composed by strains isolated also in Cote d'Ivoire and Senegal, and strains isolated in Nigeria. A third cluster, nominated Asian cluster, is composed by strains isolated in Asia and Latin America (blue points). Strains from this genetic lineage emerged in the French Polynesia by 2013, and spread among the Pacific Islands to Brazil causing the current outbreak since early 2015 (Berthet et al., 2014; Campos et al., 2015; Musso, 2015; Zanluca et al., 2015). The results of these studies suggest that the emergence of ZIKV outside Africa, in the Pacific and the Americas may also be reflected in ZIKV codon usage. No significant differences were found in codon

usage among strains isolated from microcephaly cases (all of them from the Asian cluster) and the rest of strains from the Asian cluster enrolled in these studies (purple points, see Fig. 2).

3.3. Codon usage preferences in ZIKV

In order to compare the codon usage preferences of ZIKV with those of human, *A. aegypti* and *A. albopictus*, the RSCU values of the codons in ZIKV ORFs were calculated and compared with those of the other three species. The results of these studies are shown in Table 1.

The frequencies of codon usage in ZIKV ORFs are significantly different in relation to human or mosquitoes cells. Comparing with human cells, highly biased frequencies were found for UUG (Leu), AUA (Ile), UCA (Ser), CCA (Pro), ACA (Thr), CAA (Gln), AGA (Arg), AGG (Arg) and GGA (Gly). As can be seen, most of the highly preferred codons are A-ending, which strongly suggests that mutational bias is a main force shaping codon usage in ZIKV. Moreover, comparing with mosquitoes cells, highly biased frequencies are found for most codons containing the dinucleotide CpG, suggesting that superim-

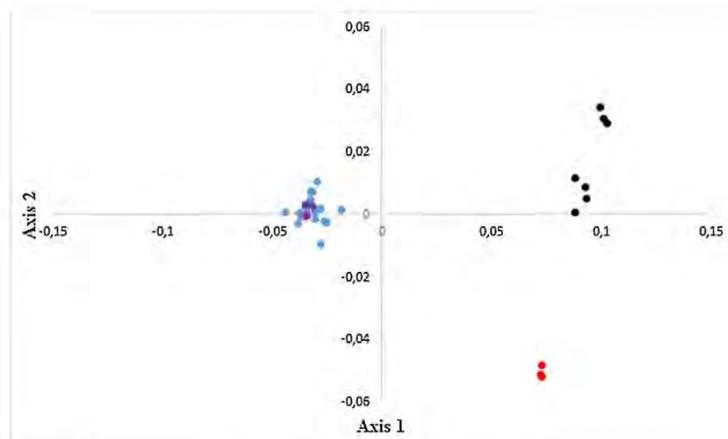


Fig. 2. Positions of the ZIKV strains in the plot of the first two major axes by correspondence analysis (COA) of relative synonymous codon usage (RSCU) values. The first and second axes account for 72.80% and 7.55% of the total variation, respectively. Strains belonging to Ugandan, Nigerian and Asian genotypes are shown in red, black and blue, respectively. Strains isolated from microcephaly cases are shown in purple. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Codon usage in ZIKV, displayed as RSCU^a values.

AA	Cod	HC	<i>Aae</i>	<i>Aal</i>	ZIKV	AA	Cod	HC	<i>Aae</i>	<i>Aal</i>	ZIKV
Phe	<i>UUU</i>	0.92	0.56	0.49	1.01	Ser	UCU	1.14	0.66	0.52	0.86
	UUC	1.08	1.44	1.55	0.99		UCC	1.32	1.20	1.36	0.98
	UUA	0.48	0.36	0.23	0.33		<i>UCA</i>	0.90	0.66	0.46	1.52
Leu	<i>UUG</i>	0.78	1.32	1.11	1.32	UCG	0.30	1.44	1.64	0.41	
	CUU	0.78	0.66	0.48	0.80	Pro	CCU	1.16	0.68	0.35	0.67
	CUC	1.20	0.84	0.86	1.00		CCC	1.28	0.84	1.13	1.13
	CUA	0.42	0.54	0.56	0.66		<i>CCA</i>	1.12	1.20	1.07	1.81
	CUG	2.40	2.28	2.72	1.89		CCG	0.44	1.32	1.44	0.46
AUU	1.08	1.00	0.74	0.88	Thr		ACU	1.00	0.80	0.64	0.99
AUC	1.40	1.60	1.86	1.16		ACC	1.44	1.48	1.78	1.13	
<i>AUA</i>	0.51	0.40	0.39	0.97		<i>ACA</i>	1.12	0.72	0.58	1.46	
Met	AUG	1.00	1.00	1.00	1.00	ACG	0.44	1.00	0.99	0.42	
Val	GUU	0.72	1.04	0.87	0.84	Ala	GCU	1.08	1.08	0.98	1.13
	GUC	0.96	1.08	1.30	1.11		GCC	1.60	1.48	1.80	1.29
	GUA	0.48	0.60	0.51	0.38		GCA	0.92	0.76	0.58	1.13
Tyr	GUG	1.84	1.28	1.30	1.66	GCC	0.44	0.68	0.61	0.46	
	UAU	0.88	0.64	0.55	0.75	Cys	UGU	0.92	1.16	0.69	0.94
	UAC	1.12	1.36	1.44	1.25		UGC	1.08	0.84	1.30	0.06
UAA	**	**	**	**	UGA		**	**	**	**	
TER	UAG	**	**	**	**	TER	UGA	**	**	**	**
His	CAU	0.84	0.84	0.75	0.85	Trp	UGG	1.00	1.00	1.00	1.00
	CAC	1.16	1.16	1.24	1.15		Arg	CGU	0.48	1.38	1.20
Gln	<i>CAA</i>	0.54	0.82	0.59	1.12	CGC	1.08	1.26	1.05	0.60	
	CAG	1.46	1.18	1.40	0.88	CGA	0.66	1.20	0.77	0.25	
	AAU	0.94	0.80	0.63	0.69	CGG	1.20	1.02	0.97	0.55	
Asn	AAC	1.06	1.20	1.36	1.31	Ser	AGU	0.90	0.96	0.84	1.01
	AAA	0.86	0.80	0.58	0.86		AGC	1.44	1.08	1.15	1.23
Lys	AAG	1.14	1.20	1.41	1.14	Arg	<i>AGA</i>	1.26	0.66	1.16	2.45
	GAU	0.92	1.12	0.96	0.91		<i>AGG</i>	1.26	0.54	0.83	1.69
Asp	GAC	1.08	0.88	1.03	1.09	Gly	GGU	0.64	1.12	1.23	0.53
	GAA	0.84	1.16	1.10	0.93		GGC	1.36	1.04	1.07	0.67
Glu	GAG	1.16	0.84	0.89	1.07	<i>GGA</i>	1.00	1.48	1.21	1.79	
						<i>GGG</i>	1.00	0.36	0.47	1.01	

^a RSCU, relative synonymous codon usage; AA, amino acid; Cod, codons; HC, human cells; *Aae*, *Aedes aegypti*; *Aal*, *Aedes albopictus*; ZIKV, Zika virus. **, termination codons. Highly increased codons with respect to human and/or mosquito cells ($\Delta \geq 0.30$) are shown underlined and/or in italics, respectively. Highly decreased codons with respect to mosquito cells are shown in bold.

posed to mutational bias, there is a crucial role for a “dinucleotide effect”, which leads to a strong avoidance of CpG.

3.4. Codon usage adaptation in ZIKV

In order to compare the codon usage preferences of ZIKV with those of humans, *A. aegypti* and *A. albopictus*, CAI values for all triplets were calculated, using again human, *A. aegypti* and *A. albopictus* codon usages as reference sets. The results of these studies are shown in Table 2.

CAI index ranges from 0 to 1, being 1 if the frequency of codon usage by ZIKV equals the frequency of usage of the reference set. Mean values of 0.750, 0.737 and 0.670 were obtained for ZIKV genes in relation to human, *A. aegypti* and *A. albopictus*, respectively; while mean CAI values of 0.809, 0.799 and 0.711 were obtained for a human, *A. aegypti* and *A. albopictus* genes datasets in relation to the same reference samples (see Table 2). In order to evaluate if the differences were statistically significant, we performed a Wilcoxon & Mann-Whitney test. The results of these tests revealed that the differences in CAI values are statistically significant in all compar-

isons ($T=0$, p -value < 0.001 ; $T=242$, $p < 0.001$ and $T=195$, $p < 0.001$ for human and *A. aegypti* and *A. albopictus*, respectively).

In order to discern if the statistically significant differences in CAI values arise from codon preferences (Puigbo et al., 2008a), the expected CAI (e-CAI) values were calculated for ZIKV sequences in relation to human, *A. aegypti* or *A. albopictus* codon usage reference sets. The e-CAI algorithm (Puigbo et al., 2008b) generated 500 random sequences with the same nucleotide and amino acid composition as the sequences of interest (in this case ZIKV sequences). Then, we calculate the CAI values for all of them, and applied a Kolmogorov-Smirnov test for the e-CAI of these random sequences in order to show whether the generated sequences follow a normal distribution. The results of these studies revealed e-CAI values of 0.768 ($p < 0.05$), 0.751 ($p < 0.05$) and 0.670 ($p < 0.05$) for the three comparisons, respectively. Kolmogorov-Smirnov test revealed a normal distribution of the generated sequences in all cases (Kolmogorov-Smirnov test of e-CAI values of 0.032, 0.035 and 0.024 for the three comparisons, respectively, which are below critical value of 0.061). Taking all these results together, our studies revealed that the CAI values for ZIKV genes are different from the CAI values obtained from human, *A. aegypti* and *A. albopictus*

Table 2
Codon adaptation of ZIKV genes in relation to human, *Aedes aegypti* and *A. albopictus* codon usage, displayed as CAI^a values.

	CAI-Hs	CAI-Aae	CAI-Aal	%GC	%GC(1)	%GC(2)	%GC(3)
ZIKV genes	0.750 ± 0.005	0.737 ± 0.008	0.670 ± 0.010	49.04 ± 0.43	47.93 ± 0.26	44.87 ± 0.27	54.43 ± 1.44
Human genes	0.809 ± 0.038	NA	NA	56.47 ± 7.72	58.37 ± 6.88	44.35 ± 7.71	66.69 ± 14.81
<i>A. aegypti</i> genes	NA	0.799 ± 0.046	NA	50.77 ± 3.49	55.41 ± 4.16	34.84 ± 6.90	62.03 ± 12.08
<i>A. albopictus</i> genes	NA	NA	0.711 ± 0.067	48.72 ± 3.41	50.26 ± 3.01	37.33 ± 3.92	58.55 ± 10.59

^a CAI, codon adaptation index. CAI-Hs; codon adaptation index in relation to *H. sapiens* reference codon usage set. CAI-Aae, codon adaptation index in relation to *A. aegypti* codon usage set. CAI-Aal, codon adaptation index in relation to *A. albopictus* codon usage set. %GC, percentage of G+C genomic content, %GC(1) through (3), percentage of G+C genomic content at codon positions 1 through 3, respectively. In all cases, mean ± standard deviation values are shown. NA, not available.

Table 3
Relative abundance of dinucleotides in ZIKV strains and summary of COA.

		UU	UC	UA	UG	CU	CC	CA	CG
Mean ± S.D. ^a		0.75 ± 0.000	0.75 ± 0.000	0.49 ± 0.000	1.44 ± 0.001	0.95 ± 0.001	0.84 ± 0.000	1.24 ± 0.013	0.44 ± 0.001
Axis 1 ^b	r	0.197250	−0.392010	−0.128082	0.766477	−0.246681	0.376363	0.704184	−0.737198
	P	0.234	<0.05	0.441	<0.001	0.136	<0.05	<0.001	<0.001
		AU	AC	AA	AG	GU	GC	GA	GG
Mean ± S.D. ^a		0.91 ± 0.001	0.92 ± 0.000	1.18 ± 0.000	1.33 ± 0.001	0.83 ± 0.000	0.95 ± 0.000	1.43 ± 0.001	1.45 ± 0.001
Axis 1 ^b	r	0.601174	0.155880	−0.218172	0.704540	0.302394	−0.608760	0.791904	−0.485835
	P	<0.001	0.347	0.190	<0.001	0.068	<0.001	<0.001	<0.001

^a Mean values of ZIKV strains relative dinucleotide ratios ± standard deviation.

^b Correlation analysis between the first axis in COA and the sixteen dinucleotides frequencies in ZIKV proteins is shown.

sequences. These results suggest that these differences are related to codon usage preferences.

In order to gain insight into this possibility, the relative abundances of the 16 dinucleotides in ZIKV ORFs were analyzed. The results of these studies are shown in Table 3.

As it can be seen, the occurrences of dinucleotides are not random and no dinucleotide is present at the expected frequencies. The relative abundances of CpG and UpA showed a strong deviation from the expected frequencies (i.e. 1.0) (mean ± S.D. = 0.44 ± 0.001 and 0.49 ± 0.000, respectively) and were markedly under-represented. On the other hand, UpG, ApG, GpA and GpG are markedly over-used (mean ± S.D. = 1.44 ± 0.001, 1.33 ± 0.001, 1.43 ± 0.001, 1.45 ± 0.001, respectively) (Table 3).

Previous studies have shown that CpG deficiency in flaviviruses is associated with the immunostimulatory properties of unmethylated CpGs, which are recognized by the host's innate immune system as a pathogen signature (Dorn and Kippenberger, 2008). Moreover, as UpA is present in two out of three stop codons, its under-representation has been suggested as a strategy to decrease the probability of non-sense mutations (Lobo et al., 2009), which would have deeper biological implications in RNA viruses coding for a single polyprotein, as is the case of ZIKV.

Besides, among the 16 dinucleotides, ten are correlated with the position of the sequences along the first axis in COA (P values < 0.05, Table 3). These results indicate that the composition of dinucleotides also determines the variation in synonymous codon usage among ZIKV.

4. Conclusions

The overall codon usage among ZIKV strains is similar and slightly biased. Different codon preferences in ZIKV genes in relation to codon usage of human, *A. aegypti* and *A. albopictus* genes were found (see Tables 1 and 2). Geographical and genetic variability may play a role in shaping the molecular evolution and codon usage in ZIKV. G + C compositional constraint influences the codon usage of ZIKV. Highly frequent codons are mostly A- ending, which strongly suggests that mutational bias is a main force shaping codon usage in this virus. Dinucleotide composition also plays a role in the overall pattern of ZIKV codon usage. No significant differences were found in codon usage among strains isolated from microcephaly cases and the rest of strains from the Asian cluster enrolled in these studies.

Acknowledgements

Authors acknowledge support by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) through project PE_ALL_2009_1.1603, FondoMaríaViñas and PEDECIBA, Uruguay. We also thank the support of Fondo Clemente Estable, 2007_722 to HM. We acknowledge Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, Uruguay, for support through Grupos I+D program.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.06.022>.

References

- Alera, M.T., Hermann, L., Tac-An, I.A., Klungthong, C., Rutvittuntinut, W., Manasatienkij, W., et al., 2015. Zika virus infection Philippines, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 722–724. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2104.141707>.
- Berthet, N., Nakoune, E., Kamgang, B., Selekon, B., Descorps-Declere, S., Gessain, A., Manuguerra, J.C., Kazanji, M., 2014. Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14, 862–865. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2014.1607>.
- Bogoch, I., Brady, O., Kraemer, M., German, M., Creatore, M., Kulkarni, M., Brownstein, J., et al., 2016. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *Lancet* 387, 335–336. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00080-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00080-5).
- Burns, C.C., Shaw, J., Campagnoli, R., Jorba, J., Vincent, A., Quay, J., Kew, O., 2006. Modulation of poliovirus replicative fitness in HeLa cells by deoptimization of synonymous codon usage in the capsid region. *J. Virol.* 80, 3259–3272.
- Butler, D., 2016. Zika virus: Brazil's surge in small-headed babies questioned by report. *Nature* 530, 13–14.
- Butt, A.M., Nasrullah, I., Tong, Y., 2014. Genome-wide analysis of codon usage and influencing factors in Chikungunya viruses. *PLoS One* 9, e90905.
- Calvet, G., Aguiar, R.S., Melo, A.S., Sampaio, S.A., de Filippis, I., et al., 2016. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5).
- Campos, G.S., Bandeira, A.C., Sardi, S.I., 2015. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1885–1886. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2110.150847>.
- Costafreda, M.I., Pérez-Rodríguez, F.J., D'Andrea, L., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A., Pintó, R.M., 2014. Hepatitis A virus adaptation to cellular shutoff is driven by dynamic adjustments of codon usage and results in the selection of populations with altered capsids. *J. Virol.* 88, 5029–5041.
- Cristina, J., Moreno, P., Moratorio, G., Musto, H., 2015. Genome-wide analysis of codon usage bias in Ebolavirus. *Virus Res.* 196, 87–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.005>.
- Dorn, A., Kippenberger, S., 2008. Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10, 10–20.
- Driggers, R.W., Ho, C.Y., Korhonen, E.M., Kuivanen, S., Jääskeläinen, A.J., et al., 2016. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. *New Engl. J. Med.* <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1601824>.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinf.* 5, 113.
- Faye, O., Freire, C.C., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J.V., et al., 2014. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2636. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>.
- Greenacre, M., 1984. *Theory and Applications of Correspondence Analysis*. Academic.
- Hayes, E.B., 2009. Zika virus outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1347–1350. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1509.090442>.
- Hennessey, M., Fischer, M., Staples, E., 2016. Zika virus spreads to new areas – region of the Americas, may 2015–January 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 55–58.
- Hu, J.S., Wang, Q.Q., Zhang, J., Chen, H.T., Xu, Z.W., et al., 2011. The characteristic of codon usage pattern and its evolution of hepatitis C virus. *Infect. Genet. Evol.* 11, 2098–2102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.025>.
- Jenkins, G.M., Holmes, E.C., 2003. The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. *Virus Res.* 92, 1–7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00309-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00309-X).
- Kuno, G., Chang, G., 2007. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* 152, 687–696. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-006-0903-z>.

- Lobo, F.P., Mota, B.E., Pena, S.D., Azevedo, V., Macedo, A.M., et al., 2009. Virus–host coevolution: common patterns of nucleotide motif usage in Flaviviridae and their hosts. *PLoS One* 20, e6282.
- Ma, J.J., Zhao, F., Zhang, J., Zhou, J.H., Ma, L.N., et al., 2013. Analysis of synonymous codon usage in Dengue viruses. *J. Anim. Vet. Adv.* 12, 88–98.
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., et al., 2016. Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* 374, 951–958, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1600651>.
- Moratorio, G., Iriarte, A., Moreno, P., Musto, H., Cristina, J., 2013. A detailed comparative analysis on the overall codon usage patterns in West Nile virus. *Infect. Genet. Evol.* 14, 396–400.
- Mueller, S., Papamichail, D., Coleman, J.R., Skiena, S., Wimmer, E., 2006. Reduction of the rate of poliovirus protein synthesis through large-scale codon deoptimization causes attenuation of viral virulence by lowering specific infectivity. *J. Virol.* 80, 9687–9696.
- Musso, D., 2015. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1887, <http://dx.doi.org/10.3201/eid2110.151125>.
- Novembre, J.A., 2002. Accounting for background nucleotide composition when measuring codon usage bias. *Mol. Biol. Evol.* 19, 1390–1394.
- Puigbo, P., Bravo, I.G., Garcia-Vallve, S., 2008a. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *BiologyDirect* 3, e38.
- Puigbo, P., Bravo, I.G., Garcia-Vallve, S., 2008b. E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC Bioinf.* 9, e65.
- Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E.M., Feitosa, I.M., Horovitz, D.D., Cavalcanti, D.P., et al., 2016. Possible association between Zika virus infection and microcephaly – Brazil, 2015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 59–62, <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2>.
- Sharp, P.M., Li, W.H., 1986. An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. *J. Mol. Evol.* 24, 28–38.
- Sharp, P.M., Li, W.H., 1987. The codon adaptation index – a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* 15, 1281–1295.
- Sharp, P.M., Emery, L.R., Zeng, K., 2010. Forces that influence the evolution of codon bias. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365, 1203–1212.
- Simpson, D.I., 1964. Zika virus infection in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 58, 335–338.
- Stoletzki, N., Eyre-Walker, A., 2007. Synonymous codon usage in *Escherichia coli*: selection for translational accuracy. *Mol. Biol. Evol.* 24, 374–381.
- Tao, P., Dai, L., Luo, M., Tang, F., Tien, P., Pan, Z., 2009. Analysis of synonymous codon usage in classical swine fever virus. *Virus Genes* 38, 104–112.
- Tsai, C.T., Lin, C.H., Chang, C.Y., 2007. Analysis of codon usage bias and base compositional constraints in Iridovirus genomes. *Virus Res.* 126, 196–206.
- Wang, M., Zhang, J., Zhou, J.H., Chen, H.T., Ma, L.N., et al., 2011. Analysis of codon usage in bovine viral diarrhea virus. *Arch. Virol.* 156, 153–160.
- Wessa, P., 2012. Free Statistics Software, Office for Research Development and Education, version 1.1.23-r7, URL: <http://www.wessa.net>.
- Wong, E.H., Smith, D.K., Rabadan, R., Peiris, M., Poon, L.L., 2010. Codon usage bias and the evolution of influenza A viruses. *Codon Usage Biases of Influenza Virus. BMC Evol. Biol.* 19, 253.
- Wright, F., 1990. The effective number of codons used in a gene. *Gene* 87, 23–29.
- Zanluca, C., de Melo, V.C.A., Mosimann, A.L.P., dos Santos, G.I.V., dos Santos, C.N.D., Luz, K., 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 569–572, <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150192>.

Genome-wide Prediction of microRNAs in Zika virus Genomes Reveals Possible Interactions with Human Genes Involved in the Nervous System Development

Juan Cristina^{1*}, Natalia Echeverría¹, Fabiana Gambaro¹, Alvaro Fajardo¹ and Pilar
Moreno¹

¹ Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de
Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

* Corresponding author

E-mail: cristina@cin.edu.uy (JC)

Abstract

Zika virus (ZIKV) is a member of the family *Flaviviridae*. In 2015, ZIKV triggered a large epidemic in Brazil and spread across Latin America. In November of that year, the Brazilian Ministry of Health reported a 20-fold increase in cases of neonatal microcephaly, which corresponds geographically and temporally to the ZIKV outbreak. ZIKV was isolated from the brain tissue of a fetus diagnosed with microcephaly, and recent studies in mice models revealed that ZIKV infection may cause brain defects by influencing brain cell developments. Unfortunately, the mechanisms by which ZIKV alters neurophysiological development remain unknown. MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that regulate post-transcriptional gene expression by translational repression. In order to gain insight into the possible role of ZIKV-mediated miRNA signaling dysfunction in brain-tissue development, we computationally predicted new miRNAs encoded by the ZIKV genome and their effective hybridization with transcripts from human genes previously shown to be involved in microcephalia. The results of these studies suggest a possible role of these miRNAs on the expression of human genes associated with this disease. Besides, a new ZIKV miRNA was predicted in the 3' stem loop (3' SL) of the 3' untranslated region (3'UTR) of the ZIKV genome, suggesting the role of the 3'UTR of flaviviruses as a source of miRNAs.

Introduction

Zika virus (ZIKV) is a member of the family *Flaviviridae*, whose natural transmission cycle involves mainly vectors from the *Aedes* genus, while humans are occasional hosts [1]. Clinical manifestations of disease caused by ZIKV range from asymptomatic cases to an influenza-like syndrome associated to fever, headache, malaise and cutaneous rash [2]. ZIKV genome consists of a single-stranded positive sense RNA molecule of approximately 10,800 nt in length [3]. Although ZIKV enzootic activity was reported in diverse countries of Africa and Asia, few human cases were reported until 2007, when a large epidemic took place in Micronesia [4]. A large ZIKV outbreak occurred in French Polynesia during 2013–2014 and then spread to other Pacific islands [5]. In early 2015, a ZIKV epidemic outbreak took place in Brazil, currently estimated at 440,000–1,300,000 cases [6]. In November 2015, the Brazilian Ministry of Health reported a 20-fold increase in cases of neonatal microcephaly, which corresponds geographically and temporally to the ZIKV outbreak [7]. Due to this global threat, World Health Organization (WHO) declared a public health emergency of international concern on February 1st, 2016 [8].

ZIKV was detected by electron microscopy and RT-qPCR in brains and amniotic fluid of microcephalic fetuses, strengthening the causal link between ZIKV and increased incidence of microcephaly [9, 10]. Furthermore, recent studies show that ZIKV can infect human iPSC-derived neural progenitor cells (NPCs) *in vitro*, resulting in dysregulation of cell-cycle-related pathways and increased cell death [11]. The development of animal models permits to begin to understand the underlying pathology of ZIKV infection [12, 13]. Modeling ZIKV infection in mice revealed direct effects of ZIKV on neural precursor cells development, including proliferation, differentiation and cell death, which may link ZIKV with the development of microcephaly [14]. Notably,

genes associated with microcephaly were downregulated in ZIKV-infected mice brains [14] and NPCs [11]. Multiple approaches will be needed to understand the pathogenesis of ZIKV infection [12].

MicroRNAs (miRNAs) are small regulatory non-coding RNAs, ranging from 19 to 24 nucleotides in length, that post-transcriptionally regulate target gene expression by inhibiting the translation of mRNA transcripts or leading to their cleavage [15]. While encoded not only by cellular genomes but also by viral genomes [16], miRNAs play a vital role in diverse biological processes, including development, apoptosis, tumorigenesis, proliferation, etc. [17]. Viral miRNAs are mostly identified by traditional cloning from virus-infected cells [18], nevertheless, computational prediction and hybridization analysis are also applied to viral miRNA identification [19, 20]. To date, RNA virus-encoded miRNAs have been identified in Hepatitis C virus [21], Human Immunodeficiency virus (HIV) [22], Bovine Leukemia virus (BLV) [23], Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronavirus [24] Hepatitis A virus (HAV) [25] and Ebolavirus [26]. Interestingly, miRNAs have also been identified in other members of the family *Flaviviridae*, like West Nile virus (WNV) [27] or Dengue virus (DENV) [28]. Very recent *in silico* studies revealed the miRNA coding capacity of the ZIKV genome [29]. In order to get insight into the role of ZIKV genome in relation to miRNA coding, we computationally identified new potential miRNAs on the ZIKV genome along with their target genes. Our study may help to better understand host-pathogen interaction as well as to contribute to the development of new antiviral strategies against ZIKV infection.

Materials and Methods

Viral sequences and prediction of pre-miRNAs by an *ab initio* approach

In this study, we used complete genome sequences of ZIKV strain Natal-RGN (GenBank accession number: KU527068), isolated in 2015, from the brain tissue of a fetus diagnosed with microcephaly [10]. VMir program [30] was used to analyze the ZIKV strain sequences. VMir is an *ab initio* prediction program specifically designed to identify pre-miRNA in viral genomes. Using this approach, ZIKV sequences were analyzed for possible pre-miRNA hairpin structures, using highly stringent filtering parameters (minimum hairpin size of 60 nucleotides, maximum hairpin size of 120 nucleotides, minimum hairpin score of 160, minimum window count of 25). VMir scores were calculated according to Grundhoof [30].

Confirmation of putative pre-miRNA sequences

To discriminate real pre-miRNAs from other hairpin structures (pseudo hairpins) we employed iMiRNA-SSF approach [31]. This approach represents an improvement in the performance for accurate identification of miRNA precursors by combining negative sets with different distributions [31].

Identification of mature miRNA sequences

With the purpose of extracting mature miRNA: miRNA* duplexes from pre-miRNA hairpins, we employed MiRduplexSVM [32]. This approach uses a novel SVM-based methodology and takes into account several aspects of the biogenesis of miRNAs, whereby a duplex is formed before the mature molecule is selected [32].

Conservation of predicted miRNA sequences among ZIKV strains

In order to observe the degree of conservation of the predicted pre-miRNA and mature miRNA sequences in Natal-NGR ZIKV strain and strains from all types isolated elsewhere, the sequences from all available and comparable ZIKV strains for which the complete genome sequences are known, were downloaded from the GeneBank database. Once downloaded, the sequences were aligned using the MUSCLE program [33]. Consensus sequences (i.e. the calculated most frequent nucleotide residue found at each position of the sequence alignment) were established using Entropy-One software from the HIV database (available at: <http://www.hiv.lanl.gov/>). For names and accession numbers of ZIKV strains included in these studies, see Supplementary Material Table 1.

Prediction of secondary structure of miRNA precursors

The RNAfold web server [34] was used to predict the secondary structure of pre-miRNAs. Only default parameters were used.

Prediction of potential gene targets

In order to identify the regulatory relationships between predicted miRNAs and their putative target gene transcripts we employed miRTar [35]. The parameters assigned for the hybridization were set to -14 kcal/mol of minimum free energy (MFE) for all hybridizations as a cut-off value and an alignment score ≥ 140 . We studied the relation between predicted miRNAs and their target gene transcripts focusing on human genes involved in microcephaly. For names, accession numbers and their roles on brain development of the genes involved in these analyses, see Supplementary Material Table 2.

Hybridization between gene transcript targets and mature

ZIKV miRNA

In order to confirm an effective hybridization between gene transcript targets and predicted ZIKV miRNA, we employed the RNAhybrid [36]. RNA hybrid is a tool for finding the minimum free energy hybridization of a long and a short RNA and is widely used for miRNA target prediction. Pairing energy or minimum free energy (MFE) indicates the stability of the hybridization. A stringent condition was employed, with a MFE set at -30 kcal/mol for all hybridizations, as a cut-off value.

Results

Prediction of pre-miRNA stem-loop structures in Natal-RGN

ZIKV genome

Computational prediction represents a widely used and effective strategy to identify novel miRNAs that can be further examined and validated by experimental approaches. In order to observe whether ZIKV genome could be folded into putative pre-miRNA stem-loop structures, we first analyzed its putative miRNA-encoding capacity using full-length sequences from Natal-RGN ZIKV genome (GenBank accession number: KU527068). We filtered VMir [30] output using stringent custom setting. The results of these studies revealed six pre-miRNA hairpins that were selected as potential hairpins and suggested the potential miRNA-coding capacity of the genome of this ZIKV strain. Then, in order to confirm the presence of these pre-miRNA structures, we classified them into real or pseudo pre-miRNAs by means of the iMiRNA-SSF approach [31]. Four out of the six pre-miRNA structures (named MD1, MD13, MD17 and MD21)

were classified as real pre-miRNA. These structures are present in different genomic regions of the ZIKV genome (see Table 1).

Table 1. Predicted hairpin and mature sequences within Natal-RGN ZIKV genome.

Hairpin	Position ^a	Region ^b	Score ^c	Classification ^d	MFE ^e	Mature 5' arm
MD1	190- 275	Capsid	170.1	Real	-37.3	AGGCUGCCAGCCGGACUUCUGC
MD13	5125-5231	NS3	189.4	Real	-37.5	UGCUUCGAGCCUUCGAUGCUGAA
MD17	8243-8336	NS5	188.2	Real	-31.7	UGCAGCGUAGGUAUGGGGGAGG
MD21	10724-10808	3'UTR	188.3	Real	-53.8	AGUUUCCACCACGCGUGCCGCC

^a Positions relative to Natal-RGN ZIKV strain genome (GenBank accession number: KU527068).

^b ZIKV genome region according to reference strain MR766 (GenBank accession number: AY632535). Capsid, capsid protein; NS3, nonstructural protein NS3; NS5, nonstructural protein NS5; 3'UTR, 3' untranslated region.

^d Classification in real or pseudo pre-miRNA according to iMiRNA-SSF approach [31].

^e MFE, minimum free energy, in kcal/mol.

miRNAs sequence conservation among ZIKV strains genomes

As an RNA virus, ZIKV has a high degree of genetic variability and heterogeneity. Recent studies have estimated the rate of evolution of ZIKV from 0.98 to 1.06×10^{-3} substitutions per site per year (s/s/y) [37] and 1.20×10^{-3} s/s/y [38]. Besides, previous phylogenetic analysis characterized two major genetic lineages of ZIKV, the African and Asian lineages [39]. Very recently, phylogenetic analyses revealed the presence of three distinct lineages, (Asian/American lineage, African lineage 1 and African lineage 2) [40]. For these reasons, it is important to establish the degree of conservation of the pre-miRNAs and mature miRNAs sequences of predicted miRNAs in the genome of Natal-RGN ZIKV strain among ZIKV strains from all genetic lineages and isolated elsewhere.

In order to gain insight into this matter, all available and comparable ZIKV strains for which complete genome sequences are known were downloaded from the GenBank database and aligned using the MEGA6 program [41]. These strains were isolated elsewhere and represent all genetic lineages of ZIKV strains (for strains and accession numbers, see Supplementary Material Table 1). Once aligned, consensus sequences (i.e. the calculated most frequent nucleotide residue found at each position of the sequence alignment) were established and compared to predicted pre-miRNA and mature miRNA sequences in Natal-NGR ZIKV strain. The results of these studies revealed 98 % identity among pre-miRNA MD1 and corresponding consensus sequences, and 100 % identity among pre-miRNAs MD13, MD17 and MD21 and corresponding consensus sequences. 100 % identity among mature miRNAs and consensus sequences were found in all cases. The secondary RNA structure of predicted pre-miRNA sequences and corresponding consensus sequences were identical in all cases (see Fig 1). The results of

these studies revealed that these predicted pre-miRNAs and mature miRNAs sequences are highly conserved among ZIKV strains.

Prediction of potential targets associated with microcephalia for the predicted ZIKV miRNAs

In order to comprehend the dynamics between viral miRNAs and their targets is extremely important to understand the complexity of biological regulation and virus-host interaction. *In silico* prediction of miRNA targets provides a suitable approach for identifying potential target sites based on their complete or partial complementarity with miRNAs. For these reasons, pairwise comparison of human gene transcripts of genes associated with microcephaly and miRNA-MD1, -MD13, -MD17 and -MD21 were performed by means of the use of the miRTar database [35]. The results of these studies are shown in Table 2. As it can be seen in this table, miRNA-MD1, and miRNA-MD17 hybridize with human gene transcripts of genes associated with microcephaly.

Table 2. Predicted ZIKV miRNA targets associated with microcephaly, identified by *in silico* analysis.

Hairpin	Predicted miRNA	Targeted gene	Accession number	Protein description
MD1	ZIKV-miRNA-MD1	MCPH1	AK022909	Microcephalin 1
		WDR62	BX647726	WD repeat domain 62
		CDK5RAP2	BK005504	CDK5 regulatory subunit associated protein 2
		ASPM	AY367065	Abnormal spindle microtubule assembly
		CEP152	AB020719	Centrosomal protein 152kDa
		ZNF335	AK026157	Zinc finger protein 335
		PHC1	U89277	Early development regulator 1
		CENPF	U30872	Centromere protein F, 350/400ka (mitosin)
MD17	ZIKV-miRNA-MD17	CENPF	U30872	Centromere protein F, 350/400ka (mitosin)

Effective hybridization of predicted miRNAs and human gene transcript targets

In order to reconfirm effective hybridizations among the identified gene transcript targets and miRNA-MD1 and -MD17, we observed their hybridization patterns and calculated the minimum free energy for each hybridization. We used very stringent conditions, with a MFE of -30 kcal/mol as a cut-off value for miRNA-target pairing. The results of these studies are shown in Table 3.

Table 3. Effective hybridization of predicted ZIKV miRNA and transcript gene targets.

Predicted miRNA	Target gene	5' target position ^a	Hybridization	MFE ^b (kcal/mol)
ZIKV-miRNA-MD1	MCPH1	2059	target 5' U G A 3' GCGGAGG CCGG U CAGCC CGUCUUC GGCC A GUCGG miRNA 3' A G CC A 5'	-31.6
	WDR62	76	target 5' G U GCG A G A 3' GCGGGAG UCCGGC G G GGCC CGUCUUC AGGCCG C C UCCGG miRNA 3' A G A 5'	-36.1
	CDK5RAP2	4733	target 5' A CA A 3' GGAGGUCC GCUG GCGGCC UCUUCAGG CGAC CGUCGG miRNA 3' CG C A 5'	-35.0
	ASPM	50	target 5' A GCCCGCGG CCGGGCCCC G 3' GCGGAGG CC GGCUG GCGGCC CGUCUUC GG CCGAC CGUCGG miRNA 3' A A	-32.0
	ZNF335	1818	target 5' C GCGCACA ACAGCACUCA A 3' GAGGUCCGG UGGC AGCCU CUUCAGGCC ACCG UCGGA miRNA 3' CGU G 5'	-32.0
	PHC1	1758	target 5' G UUU GG G CACA G 3' GC G GUU G GCUGGCAGCU CG C CAG C CGACCGUCGG miRNA 3' U UU G A 5'	-32.9
	CENPF	9300	target 5' G A A C 3' AGAAGUCCG CUG CAGCC UCUUCAGGC GAC GUCGG miRNA 3' CG C C A 5'	-34.4
ZIKV-miRNA-MD17	CENPF	9100	target 5' A AG C 3' CC CCCC GCCUG GCUGCA GG GGGGG UGGAU CGACGU 5' miRNA 3' A UA G	-34.0

^a 5' sequence position of gene target at which the miRNA hybridize. ^b MFE, minimum free energy.

Discussion

miRNAs play critical roles in many biological processes, such as cell growth, tissue differentiation, cell proliferation, embryonic development, cell proliferation, and apoptosis. As a consequence, their deregulation perturbs gene expression and can have pathological consequences [42].

Microcephaly is characterized by a reduced occipitofrontal circumference (OFC) of the head that is at least 4 standard deviations (SD) below the age- and sex-matched means and is caused by insufficient fetal brain development, which mostly affects the cerebral cortex [42]. Several genes have been mapped to date from various populations around the world in relation with microcephaly, including Microcephalin, WDR62, CDK5RAP2, CASC5, ASPM, CENPJ, STIL, CEP135, CEP152, ZNF335, PHC1, CDK6 and CENPF [43] (for gene names, accession numbers, protein description and role on brain development, see Supplementary Material Table 2).

Natal-RGN ZIKV strain was isolated from the brain tissue of a fetus diagnosed with microcephaly [10] and mouse models have provided significant evidence that ZIKV infection may cause brain defects by influencing brain cell development [12, 14]. Unfortunately, the mechanism by which ZIKV alters neurophysiological development remains unknown.

A recent study revealed the miRNA coding capacity of ZIKV strains [29], which is in agreement with the results found in this work (see Table 1). In this study, using highly stringent conditions, four new miRNAs were found in the Natal-RGN ZIKV strain (Table 1).

These miRNAs are situated in different ZIKV genome regions and are highly conserved among ZIKV strains (see Table 1 and Fig. 1). Moreover, two of these miRNA (ZIKV-miRNA-MD1 and MD17) were found to hybridize with target transcripts from genes previously shown to be associated with microcephaly (see Table 2). Furthermore, ZIKV-

miRNA-MD1 effectively hybridize with MCPH1, WDR62, CDK5RAP2, ASPM, ZNF335 and CENPF (Table 2) even in stringent conditions (MFE > 30.0 kcal/mol) (Table 3), while ZIKV-miRNA-MD17 effectively hybridizes with CENPF in the same conditions (Table 3). All these microcephaly associated genes have been found to be downregulated in an *in vivo* mice model of ZIKV infection, leading to disruption of neural development and microcephaly [14]. In this study, one of the predicted ZIKV miRNA (MD-21) is situated in the 3' untranslated region (3'UTR) of the ZIKV genome (Table 1). Flaviviruses are characterized by a relatively long and highly structured 3'UTR [44]. This region contains a number of stem-loops (SLs) and tertiary structures conserved among members of the genus *Flavivirus* [45], which makes it resistant to RNase degradation [46]. One of these SLs, the 3'SL located at the very end of the 3'UTR has been shown to be crucial for viral replication and interacts with a variety of proteins [47]. In order to gain insight into the location and possible functions of MD-21, the secondary structure of the 3'UTR of the consensus sequences obtained for ZIKV genomes included in these studies was established (Fig. 2). Interestingly, we found that the pre-miRNA-MD21 is identical to flaviviruses 3'SL and contains the short 5'-ACAG-3' sequence in the top loop of the 3'SL, which is conserved among the members of this genus (see Fig. 2). Recent studies revealed the production of a miRNA (KUN-miR-1) from the 3'SL of the 3'UTR of WNV [27, 48]. Production of this miRNA was shown to be required for efficient WNV replication in mosquito cells. These studies also demonstrated that KUN-miR-1 functions *via* up-regulation of the expression of transcription factor GATA4, which in turn is required to facilitate WNV replication in mosquito cells [27]. In order to observe if GATA4 may be a target for ZIKV-miR-MD21, we computationally calculated that hybridization (Table 4). The result of this analysis revealed that ZIKV-miR-MD21 has the capability to hybridize *Aedes aegypti* GATA4 (Table 4).

Table 4. Effective hybridization of ZIKV-miR-MD21 and *Aedes aegypti* GATA4 gene.

Predicted miRNA	Target gene ^a	Accession number	5' target position ^a	Hybridization	MFE ^b (kcal/mol)
ZIKV-miR-MD21	<i>Aedes aegypti</i> GATA4	XM_001654324	477	target 5' A CAAC AA A 3' GGCGUCAGUG GGU GAGAU CCGCCGGUCGC CCA CUUUG miRNA 3' A C A 5'	-31.1

^a 5' sequence position of gene target at which the miRNA hybridize. ^b MFE, minimum free energy.

Additionally, a recent study has reported another miRNA also produced from hairpin structures located in the 3'UTR of DENV-2 in infected mosquito cells [28].

Thus, there is increasing evidence suggesting the role of the 3'UTR of flaviviruses as a source of miRNAs. This is in agreement with the results of this work.

However, the details of the mechanisms for the generation of these miRNAs and their potential functions in virus replication in invertebrates hosts will require further investigation [44].

The results presented here suggest a possible role of miRNAs on the expression of human genes associated with microcephaly. Besides, they hint to candidate miRNAs that should be further confirmed by experimental analysis.

Conclusions

The results of this work revealed the miRNA coding capacity of the ZIKV genome, in agreement with a recent report [29]. In this study, using highly stringent conditions, four new miRNAs were found in the Natal-RGN ZIKV genome, which was isolated from the brain tissue of a fetus diagnosed with microcephaly. These miRNAs are situated in different ZIKV genome regions and are highly conserved among ZIKV strains. Two of these miRNA (ZIKV-miRNA-MD1 and -MD17) were found to hybridize with target transcripts from genes previously shown to be associated with microcephaly. Moreover, effective hybridizations among ZIKV-miRNA-MD1 and -MD17 and these target genes can be observed even in highly stringent conditions ($MFE > 30.0$ kcal/mol). These results suggest a possible role of miRNAs on the expression of human genes associated with microcephaly and revealed candidate miRNAs that should be further confirmed by experimental analysis. Additionally, another new ZIKV miRNA, ZIKV-miRNA-MD21, was predicted in the 3'SL of the 3'UTR

of the ZIKV genome, suggesting a potential role for the 3'UTR of flaviviruses as a source of miRNAs production.

Acknowledgements

Authors acknowledge support by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), PEDECIBA and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Grupos I+D, Universidad de la República, Uruguay.

References

1. Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 1347–1350.
2. Simpson DI. Zika virus infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964; 58: 335–338.
3. Kuno G, Chang G. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* 2007; 152: 687–696.
4. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009; 360: 2536–2543.
5. Musso D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21: 1887.
6. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21: 1885-1886.
7. MARRS C, OLSON G, SAADE G, HANKINS G, WEN T, PATEL J et al. Zika virus and pregnancy: a review of the literature and clinical considerations. *Am J Perinatol.* 2016; 33: 625-639.

8. Heymann DL, Hodgson A, Sall AA, Freedman DO, Staples JE, Althabe F et al. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet* 2016; 387: 719–721.
9. Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16:653-660.
10. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med.* 2016; 374: 951-958.
11. Tang H, Hammack C, Ogden SC, 11, Wen Z, Qian X, Li Y et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* 2016; 18: 587-590.
12. Rossi S, Vasilakis N. Modeling Zika virus infection in mice. *Cell Stem Cell* 2016; 19: 4-6.
13. Hickman HD, Pierson TC. Zika in the brain: new models shed light on viral infection. *Trends Mol Med.* 2016; 22:639-641.
14. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell* 2016; 19: 120-126.
15. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res.* 2011; 717: 1-8.
16. Grundhoff A, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs. *Virology* 2011; 411: 325-343.
17. Ambros V. microRNA: tiny regulators with great potential. *Cell* 2001; 107: 823-826.
18. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 2004; 304: 734-736.
19. Sullivan CS, Ganem D. MicroRNAs and viral infection. *Molecular Cell* 2005; 20: 3-7.

20. Cui C, Griffiths A, Li G, Silva LM, Kramer MF, Gaasterland T et al. Prediction and identification of Herpes Simplex virus 1-encoded microRNAs. *J Virol*. 2006; 5499-5508.
21. Shivastava S, Steele R, Ray R, Ray RB. MicroRNAs: role in Hepatitis C virus pathogenesis. *Genes Dis*. 2015; 2: 35-45.
22. Zhang Y, Fan M, Geng G, Liu B, Huang Z, Luo H et al. A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region. *Retrovirology* 2014; 11:23.
23. Rosewick N, Momont M, Durkin K, Takeda H, Caiment F, Cleuter Y et al. Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-Cell leukemia/lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 2306-2311.
24. Hasan MM, Akter R, Ullah MS, Abedin MJ, Ullah GMA, Hossain MZ. Computational approach for predicting role of human microRNAs in MERS-CoV genome. *Adv Bioinformatics* 2014; *Adv Bioinformatics*. 2014; 2014:967946.
25. Shi J, Duan Z, Sun J, Wu M, Wang B, Zhang J et al. Identification and validation of a novel micro-RNA-like molecule derived from a cytoplasmic RNA virus antigenome by bioinformatics and experimental approaches. *Virology J* 2014; 11: 121.
26. Teng J, Wang Y, Zhang X, Liu W, Fan H, Yao H et al. Systematic genome-wide screening and prediction of microRNAs in EBOV during the 2014 Ebola virus outbreak. *Sci Rep*. 2015; 5: 9912.
27. Hussain M, Torres S, Schnettler E, Funk A, Grundhoff A, Pijlman GP et al. West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40, 2210-2223.

28. Hussain M, Asgari S. MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 2746-2751.
29. Pylro VS, Oliveira FS, Morais DK, Cuadros-Orellana S, Pais FS, Medeiros JD et al. ZIKV - CDB: a collaborative database to guide research linking SncRNAs and ZIKA virus disease symptoms. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 22;10(6):e0004817.
30. Grundhoff A. Computational prediction of viral miRNAs. In: van Rij RP, editor. *Antiviral RNAi: concepts, methods and applications*. Humana Press, New York; 2011, 143-152.
31. Chen J, Wang X, Liu B. iMiRNA-SSF: improving the identification of microRNA precursors by combining negative sets with different distributions. *Sci Rep* 2016; 6:19062.
32. Karathanasis N, Tsamardinos I, Poirazi P. MiRduplexSVM: a high-performing MiRNA-duplex prediction and evaluation methodology. *PLoS ONE* 2015; 10: e0126151.
33. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 2004; 5: 113.
34. Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neubock R, Hofacker IL. The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: W70-W74.
35. Hsu JB, Chiu CM, Hsu SD, Huang WY, Chien CH, Lee TY et al. miRTar: an integrated system for identifying miRNA-target interactions in human. *BMC Bioinformatics* 2011; 12: 300.
36. Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich, R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes RNA. *RNA* 2004; 10:1507-1517.

37. Faria NR, Azevedo RD, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* 2016; 352: 345-349.
38. Fajardo A, Soñora M, Moreno P, Moratorio G, Cristina J. Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and diversification of Zika virus populations. *J Med Virol*. 2016; 88:1672-1676.
39. Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M. 2014. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8:e2636.
40. Shen S, Shi J, Wang J, Tang S, Wang H et al. Phylogenetic analysis revealed the central roles of two African countries in the evolution and worldwide spread of Zika virus. *Virol Sin*. 2016; 31: 118-130.
41. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30: 2725-2729.
42. Faheem M, Naseer MI, Rasool M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Ilyas AM et al. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Medical Gen*. 2015; 8: S4.
43. Hussain MS, Baig SM, Neumann S, Nurnberg G, Farooq M, Ahmad I et al. A truncating mutation of CEP135 causes primary microcephaly and disturbed centrosomal function. *Am J Human Gen*. 2012; 90: 871-878.
44. Clarke BD, Roby JA, Slonchak A, Khromykh AA. Functional non-coding RNA derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Res*. 2015; 206: 53-61.

45. Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L et al. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol* 1987; 198: 33-41.
46. Pijlman GP, Funk A, Kondratieva N, Leung J, Torres S et al. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe* 2008; 4: 579-591.
47. Yu L, Nomaguchi M, Padmanabhan R, Markoff L. Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology* 2008; 374: 170-185.
48. Roby JA, Pijlman GP, Wilusz J, Khromykh AA. Noncoding subgenomic flavivirus RNA: multiple functions in West Nile virus pathogenesis and modulation of host responses. *Viruses* 2014; 6: 404-427.

Legends to the figures

Fig 1. Predicted secondary structure of pre-miRNAs. In A to D, comparisons of the predicted secondary structure of the pre-miRNAs sequences found in Natal-NGR ZIKV strain and ZIKV corresponding consensus sequences are shown. Structures of the predicted pre-miRNA hairpins and their respective consensus (con) sequences are indicated by name at the bottom of the figure as well as the minimum free energy (MFE) values obtained for each structure. Bars at the bottom of the structures denote base pair probabilities. Only centroid structures are depicted. Mature miRNAs sequences are indicated by a square bracket next to each structure.

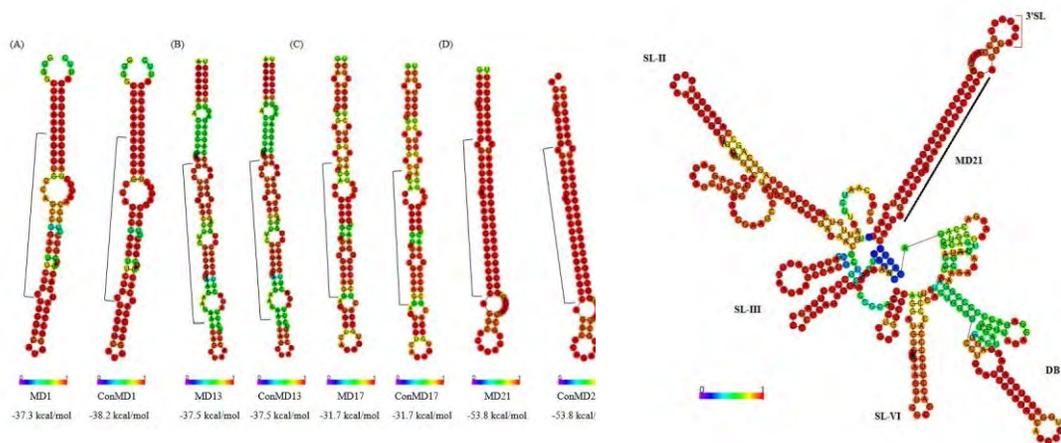
Fig 2. Predicted secondary structure of ZIKV 3'UTR.

The secondary structure of 3'UTR consensus sequences obtained for the ZIKV strains included in these studies is shown. Stem-loops (SLs) names are indicated next to each SL. Flavivirus conserved 5'-ACAG-3' sequence in the top loop of the 3'SL is indicated by a red bracket. Mature miRNA-MD21 sequences are indicated by a black line next to the sequences. Bar at the bottom of the structures denote base pair probabilities.

Supporting Information

Supplementary Material Table 1. Origins of the ZIKV strains.

Supplementary Material Table 2. Human genes known to be associated with microcephaly.





Emergence and Spreading Potential of Zika Virus

Álvaro Fajardo, Juan Cristina and Pilar Moreno*

Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

OPEN ACCESS

Edited by:

Rubén Bueno-Mari,
University of Valencia, Spain

Reviewed by:

Raul Isea,
Fundación Instituto de Estudios
Avanzados, Venezuela

Indra Vythilingam,
University of Malaya, Malaysia
Sandra Laurence Lopez-Verges,
Instituto Conmemorativo Gorgas
de Estudios de la Salud, Panama

*Correspondence:

Pilar Moreno
pmoreno@cin.edu.uy

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 31 July 2016

Accepted: 05 October 2016

Published: 20 October 2016

Citation:

Fajardo Á, Cristina J and Moreno P
(2016) Emergence and Spreading
Potential of Zika Virus.
Front. Microbiol. 7:1667.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01667

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne *Flavivirus* (family *Flaviviridae*) closely related to dengue, yellow fever and West Nile viruses. ZIKV remained neglected, confined to enzootic transmission cycles in Africa and Asia, until the first significant outbreak was reported in Micronesia in 2007. Subsequent epidemics of growing incidence occurred in French Polynesia and other South Pacific Islands, and recently, in the Americas. The latter and currently ongoing outbreak of unprecedented incidence revealed the association of ZIKV infection with the occurrence of severe congenital malformations and neurological diseases, leading to a widespread concern about its potential to pose a global public health threat. Serological and molecular data suggest that the genetic and geographic diversification of ZIKV may be greatly underestimated. Here we discuss several ecological and epidemiological aspects, together with the evolutionary processes that may have driven the emergence and abrupt spread of ZIKV in the Americas.

Keywords: ZIKV, emerging infectious diseases, genetic variability ZIKV, molecular evolution, spreading potential ZIKV

INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne virus that belongs to the Spondweni serocomplex in the *Flavivirus* genus of the *Flaviviridae* family. ZIKV is closely related to dengue virus (DENV), yellow fever virus (YFV), and West Nile virus (WNV) (Kuno et al., 1998). Although ZIKV enzootic activity was repeatedly observed in different regions of Africa and Asia, significant human outbreaks have only recently occurred, in particular during current American epidemics (Haddow et al., 2013). Its high variability, great adaptability to vectors and hosts, as well as its association with neurological diseases and fetus malformations, has converted ZIKV in one of the biggest challenges for global health as regards to prevention, detection and prospect for control.

EPIDEMIOLOGY

Zika virus was first detected in 1947 in rhesus monkeys, during a yellow fever routine surveillance in the Zika Forest in Uganda, where one year later was also isolated from a pool of *Aedes africanus* mosquitoes (Dick et al., 1952). The first human disease related with ZIKV was reported in 1954 in Nigeria (Macnamara, 1954). ZIKV enzootic activity was repeatedly observed in different regions of Africa and Asia, but only 14 human cases were reported until 2007 (Faye et al., 2014), when the first significant ZIKV outbreak occurred in Yap Island (Micronesia), leading to infection of 73% of the residents older than 3 years (Duffy et al., 2009). Later on, in 2013, a huge epidemic event occurred

in French Polynesia with around 30,000 symptomatic cases that included low fever, maculopapular rash, arthralgia and conjunctivitis (Musso et al., 2014). ZIKV outbreaks were subsequently reported in different Pacific islands including New Caledonia, Solomon Islands, Cook Islands, Fiji, Samoa, Vanuatu, and Easter Island (Cao-Lormeau et al., 2014; Dupont-Rouzeyrol et al., 2015; Musso and Gubler, 2016). In March 2015, ZIKV was reported in Salvador, Brazil (Campos et al., 2015; Zanluca et al., 2015), and rapidly spread throughout the Americas, leading to autochthonous cases in 40 countries of this continent by July 7th, 2016 (PAHO, 2016).

Zika virus ZIKV infections in humans are mainly asymptomatic, causing in some patients a mild, self-limited febrile illness that can be accompanied by other clinical symptoms like rash, arthralgia or conjunctivitis (Simpson, 1964). This was the usual clinical picture until the French Polynesian outbreak in 2013, when severe neurological complications were observed. Epidemiological data from this outbreak documented a 20-fold increase from expected in the incidence of Guillain-Barré syndrome (GBS) (Oehler et al., 2014), as well as meningoencephalitis (Carteaux et al., 2016) and acute myelitis (Mécharles et al., 2016) cases. GBS was also associated with ZIKV infections during current epidemics in the Americas in 12 countries (Dirlikov et al., 2016; dos Santos et al., 2016; PAHO, 2016; Rozé et al., 2016). In addition, the latter outbreak coincided both in time and geographic location with an increase in the number of infants born with microcephaly and other central nervous system malformations (Schuler-Faccini et al., 2016; Ventura et al., 2016). By July 2016, 1,638 cases of congenital syndrome associated with ZIKV infection were confirmed in Brazil, with reported cases of this disorder in Colombia, El Salvador, French Guiana, Martinique, Panama, Puerto Rico, and United States (PAHO, 2016). Subsequent retrospective studies also revealed congenital cerebral malformations in newborns during French Polynesian outbreak of 2013 (Besnard et al., 2016; Cauchemez et al., 2016). Accumulating evidence supports the association between ZIKV infection and birth defects, including the detection of ZIKV RNA, viral particles, and/or viral antigens in placenta, amniotic fluid and fetal tissues, being the latter studies performed on microcephalic fetuses after miscarriage or neonatal death (Calvet et al., 2016; Ladhani et al., 2016; Martinez et al., 2016; Meaney-Delman et al., 2016; Mlakar et al., 2016; Oliveira Melo et al., 2016; Rasmussen et al., 2016; Sarno et al., 2016). Moreover, a recent study reports the detection of anti-ZIKV IgM antibodies in cerebrospinal fluids of 30 out of 31 neonates with microcephaly, strongly suggesting a congenital infection with ZIKV (Cordeiro et al., 2016). In addition, experimental data indicated that ZIKV infects human neural progenitor cells attenuating their growth (Hughes et al., 2016; Li et al., 2016; Nguyen et al., 2016; Tang et al., 2016).

As previously discussed, until 2007 our knowledge of this ZIKV was restricted to limited confirmed cases in Africa and Asia. However, on the basis of entomological, epidemiological and seroprevalence studies, it can be deduced that the incidence, prevalence and dispersion of ZIKV have been significantly underestimated (Musso and Gubler, 2016). Human serosurveys suggest that ZIKV might be endemic in most part of Africa

and South-East Asia (Dick et al., 1952; Smithburn, 1952, 1954; Hammon et al., 1958; Pond, 1963; Fagbami, 1979; Petersen et al., 2016), although it is important to note that the specificity of the serological studies used is uncertain due to the significant cross-reaction between different flaviviruses (Lazear and Diamond, 2016). This silent circulation may be explained by the fact that most ZIKV infections are asymptomatic, and clinical manifestations are generally mild and can be mistaken with other arboviral infections, leading to significant misdiagnosis and underreporting (Haddow et al., 2012). For instance, patients of Micronesian outbreak of 2007 were initially diagnosed with dengue fever (Lanciotti et al., 2008; Duffy et al., 2009). The same happens in most tropical and subtropical regions where other non-specific diseases like dengue and/or chikungunya are endemic (Nhan and Musso, 2015). Moreover, as ZIKV is not commonly tested in routine diagnostic assays, a considerable number of cases are expected to remain undetected. For example, recently retrospective analyses revealed a widespread distribution of ZIKV in Thailand (Buathong et al., 2015), as was previously suggested by the confirmation of imported cases from travelers returning from that country (Fonseca et al., 2014; Tappe et al., 2014). Several other reports of imported cases from tourists that have visited different Asian and South Pacific Islands reveal that circulation of ZIKV remain silent in different countries (Deng et al., 2016; Korhonen et al., 2016; Zhang et al., 2016).

TRANSMISSION

Zika virus circulation has been mainly reported in sylvatic enzootic transmission cycles, involving arboreal mosquitos and non-human primates (Darwish et al., 1983; Hayes, 2009; Faye et al., 2014). Several mosquitoes species have been related with African and Asian jungle cycles, especially *A. africanus* (Dick et al., 1952; Haddow et al., 1964; Berthet et al., 2014; Diallo et al., 2014), as well as other *Aedes spp.* mosquitoes (Marchette et al., 1969; Cornet et al., 1979b; Fagbami, 1979; McCrae and Kirya, 1982; Akoua-Koffi et al., 2001; Berthet et al., 2014; Diallo et al., 2014). In enzootic transmission cycles, humans and other mammals may act as occasional dead-end hosts (Kenney and Brault, 2014). ZIKV antibodies have been detected in several vertebrates (Darwish et al., 1983; Haddow et al., 2012), suggesting that other animals may be involved in natural transmission cycles.

Humans accidentally infected may potentially act as hosts leading to urban cycles, if they exhibit high and sustainable viremia (Kuno and Chang, 2005; Duffy et al., 2009). The role of a bridge vector between both ecologically distinct transmission cycles is essential for these events to occur. Several mosquito species have been studied in terms of their host choice to evaluate their potential as bridge vectors of different arboviruses (Kaddumukasa et al., 2015). *A. vittatus* have been suggested to link both ZIKV cycles in Africa (Diallo et al., 2014). *A. albopictus* was found to be implicated in DENV cycle switching in Asia (Vasilakis et al., 2011; Hanley et al., 2013), and therefore, it is likely to play the same role with ZIKV. Moreover, experimental data have shown *A. albopictus* adaptability to transmit ZIKV

(Wong et al., 2013; Chouin-Carneiro et al., 2016; Di Luca et al., 2016), as has been observed at least in Gabon in 2007 (Grard et al., 2014). However, *A. aegypti* seems to have the highest vectorial capacity in urban cycles (Lord et al., 2015), and has been related with most human outbreaks, including current American epidemics (Boorman and Porterfield, 1956; Marchette et al., 1969; Cornet et al., 1979a; Olson et al., 1981; Li et al., 2012; Weaver et al., 2016). Both *A. aegypti* and *A. albopictus* are anthropophilic mosquitoes that are widely distributed throughout tropical and subtropical regions and are also competent vectors for other arboviruses like DENV, YFV and chikungunya virus (CHIKV) (Musso and Gubler, 2016). Other mosquito species, like *A. hensilli* and *A. polynesiensis*, have been, respectively, responsible for ZIKV outbreaks in Yap Island in 2007 (Ledermann et al., 2014) and French Polynesia in 2013–2014 (Musso et al., 2014), suggesting that the potential role of other *Aedes* spp. as additional vectors should not be ruled out.

Although mosquito-borne transmission is the most common route for ZIKV infection, current South Pacific/American outbreaks revealed other modes of biological transmission. In particular, the elevated number of newborns with microcephaly raised concern about maternal-fetal transmission during pregnancy. As previously discussed, growing evidence support trans-placental transmission, and perinatal transmission of ZIKV has also been reported in French Polynesia (Besnard et al., 2014). Furthermore, recent studies have demonstrated that ZIKV RNA can be found in semen 62 and 93 days after onset of symptoms, although virus infectivity was not tested as cell culture assays were not performed (Atkinson et al., 2016; Mansuy et al., 2016). This finding is in line with the amount of sexually transmitted cases that have been lately reported (Musso et al., 2015; Deckard et al., 2016; D'Ortenzio et al., 2016; Frank et al., 2016; Hills et al., 2016; Turmel et al., 2016; Venturi et al., 2016). Moreover, recently published data suggest the first case of female to male sexual transmission (Davidson et al., 2016). Despite the potential of sexual transmission to promote an epidemic has been predicted to be unlikely (Yakob et al., 2016), these findings indicate that this route of transmission may contribute to dispersal of ZIKV greater than initially thought.

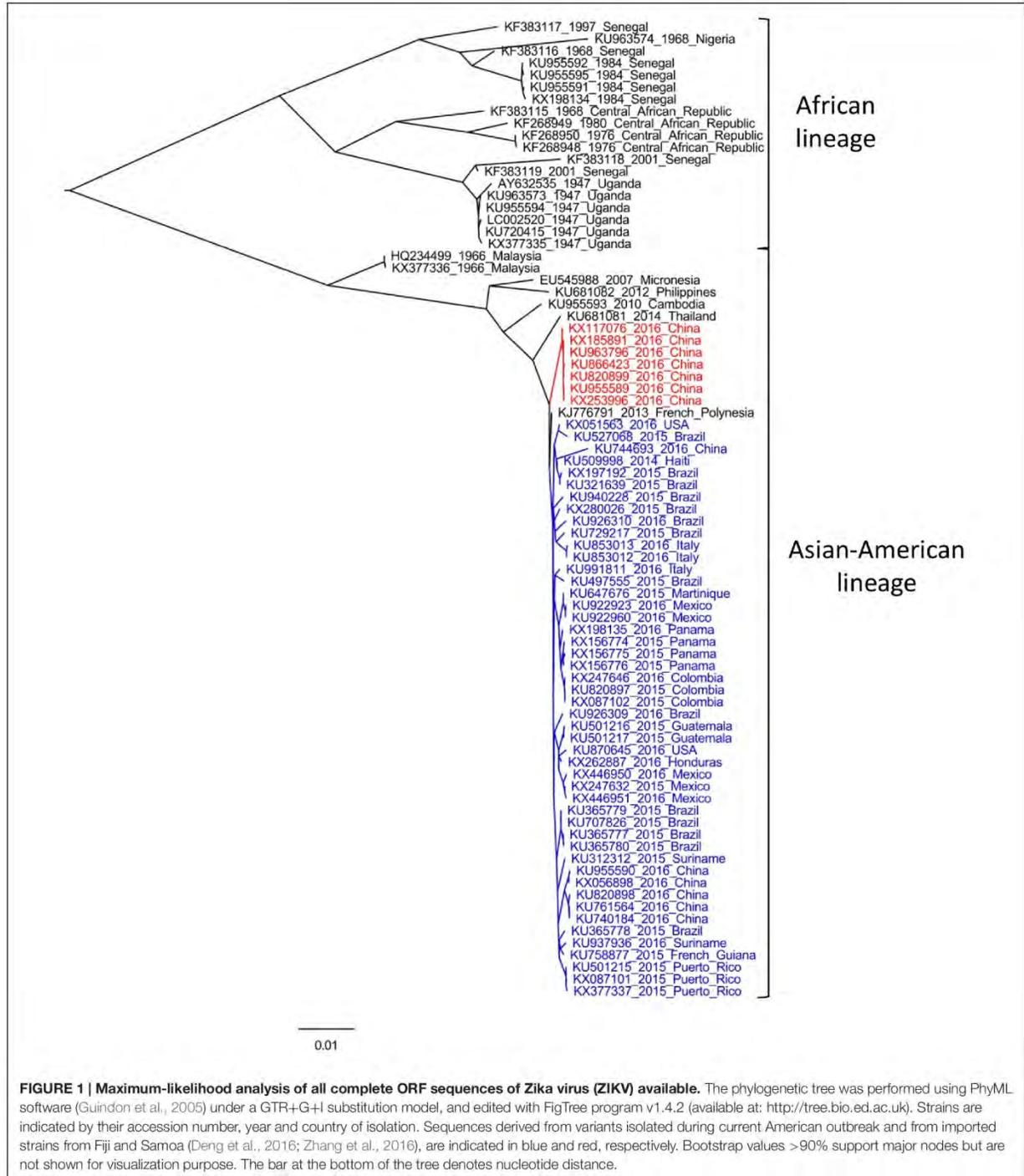
GENETIC VARIABILITY OF ZIKV

Zika virus is a single-stranded, positive sense, RNA virus with a genome of approximately 10,794 nt in length. Its genome carries a single open reading frame (ORF) that encodes three structural (capsid (C), precursor of membrane (prM) and envelope (E)) and seven non-structural (NS) proteins, with 2 flanking non-coding regions (5' and 3' NCR) (Kuno and Chang, 2007). Several phylogenetic analyses have been performed in order to investigate the genetic diversity of ZIKV, using both partial and complete genome regions (Lanciotti et al., 2008; Haddow et al., 2012; Faye et al., 2014; Enfissi et al., 2016; Fajardo et al., 2016; Faria et al., 2016; Gong et al., 2016; Shen et al., 2016; Wang et al., 2016). Full-length ORF sequences analyses reveal that the high error rate of RNA-dependent RNA polymerase has driven ZIKV to evolve into

two different genetic groups, denominated African and Asian-American lineages (see **Figure 1**) (Haddow et al., 2012; Enfissi et al., 2016; Faria et al., 2016).

African lineage comprises strains isolated in Burkina Faso, Central African Republic, Cote d'Ivoire, Gabon, Nigeria, Senegal, and Uganda, and can be further divided in two sub-lineages, as was indicated by phylogenetic approaches restricted to RNA-polymerase (NS5) (Lanciotti et al., 2008) or E (Faye et al., 2014) coding regions. On the basis of phylodynamic studies, Faye et al. (2014) suggested that the most common recent ancestor of all reported ZIKV strains circulated around 1920 in Uganda, from where it spread to West Africa and afterward to Malaysia, giving rise to Asian (currently Asian-American) lineage (Faye et al., 2014). This genetic group has been better characterized, especially after current epidemics when several full-length sequences were obtained. This lineage clusters together ancestral Malaysian strains (1966) with variants from Micronesia (2007), Cambodia (2010), Philippines (2012), Thailand (2014), and all ZIKV strains reported in the ongoing American outbreak (**Figure 1**, in blue), which are closely related to French Polynesian variants of ZIKV epidemics of 2013. Recent studies indicated that currently ZIKV strains circulating in the Americas emerged from a single introduction of an ancestor that existed in French Polynesia between August 2013 and June 2014 (Fajardo et al., 2016; Faria et al., 2016). This hypothesis is in line with observed phylogenetic patterns, as French Polynesian variant roots the American cluster (**Figure 1**). However, seven variants recently obtained from Chinese travelers returning from Fiji and Samoa (**Figure 1**, in red), share a different evolutionary history, revealing that two different sub-lineages are responsible of current ZIKV epidemics in the Americas and in South Pacific Islands (Deng et al., 2016; Zhang et al., 2016). Moreover, a recent study indicated that these imported Chinese strains share an ancestor with American variants that circulated around May 2013 (Fajardo et al., 2016), coinciding with the time when the ancestor of all American isolates was circulating (Faria et al., 2016). This finding indicates that two different evolutionary routes were followed by ancestral strains that emerged in French Polynesia, giving rise to different contemporaneous sub-lineages circulating in the Americas and in South Pacific Islands, revealing that ZIKV diversification may be greatly underestimated (Fajardo et al., 2016).

Unfortunately, there are no other full-length sequences available from the Pacific Islands outbreak, which limits our interpretation of the evolutionary patterns, diversity and pathogenicity of currently circulating ZIKV strains. In fact, the lack of complete genome sequences distributed over time and space has been one of the major historical limitations to explore in detail the phylogenetic relationships of ZIKV variants and their spatio-temporal distribution. For instance, recent reports have suggested that another genetic group, African lineage II, is revealed when phylogenetic relationships are deduced through the analysis of E and NS5 coding regions (Gong et al., 2016; Shen et al., 2016). This lineage group together one variant of Cote d'Ivoire of 1980 and six strains isolated in Senegal between 1998 and 2001 (Faye et al., 2014). Furthermore, both African and Asian-American clusters seem to be rooted by this lineage, which also suggests a greater ZIKV genetic and geographic



diversification than expected (Shen et al., 2016). This hypothesis was also supported by Gong et al., who calculated a genetic distance of 0.212 substitutions/site between the E gene of two contemporary isolates of Senegal, belonging to African lineages I

and II, respectively. Considering evolutionary rates of the order of 10^{-3} substitutions/site/year, as recently estimated for American ZIKV strains (Fajardo et al., 2016; Faria et al., 2016), ZIKV may have been circulating in Africa for more than 100 years

(Gong et al., 2016). Therefore, the genetic characterization of variants of this lineage would provide essential information to investigate the origin, geographic dispersion and genetic diversity of ZIKV.

ZIKV SPREADING POTENTIAL

The emergence and dispersal of ZIKV in the Americas reminds us of the route that was previously followed by other arboviruses, like DENV and CHIKV, which were first detected in Africa, and spread subsequently to Asia and the Americas. This migration pattern is associated with ZIKV capacity to adapt to urban vectors, like *A. aegypti*, which allows its expansion into human environments. A general characteristic that is shared between different arboviruses is their high mutation rates, which provide them with the possibility to explore different phenotypical changes in their continually evolving process to adapt to different vectors and hosts (Kuno and Chang, 2005). For instance, a single amino acid change in its surface glycoprotein allows CHIKV to switch its competent vector to *A. albopictus* (Tsetsarkin et al., 2007). Therefore, genetic changes play a major role in adaptation of arboviruses to different hosts and vectors, as has been also reported in DENV (Messer et al., 2003; Bennett et al., 2010) and WNV (Malkinson et al., 2002; Brault et al., 2007; Moudy et al., 2007).

The recent epidemics in South Pacific and the Americas with its unprecedented association with microcephaly and GBS cases, led to the proposal of different hypothesis to explain this emergence. It is likely that as a consequence of different genetic changes, ancestral Asian lineage gave rise to epidemic strains that become better adapted to humans, leading to infections with higher viremia levels, enhancing trans-placental transmission and modulating changes in cell tropism (Musso and Gubler, 2016; Weaver et al., 2016). Moreover, recent analyses have suggested a bias in the codon usage of ZIKV to increase its fitness in humans (Freire et al., 2015; Cristina et al., 2016; Russell, 2016). This hypothesis is supported by the short-term diversification observed among recent isolates (Figure 1), revealing the expansion of ZIKV into a large naïve population (Weaver et al., 2016). It has also been hypothesized that the rare congenital malformations and immunological disorders may be in fact low frequency events in ZIKV infections, that are now exposed due to the extent of recent outbreaks (Musso and Gubler, 2016). Furthermore, recent studies have suggested that pre-existing DENV antibodies may enhance

ZIKV infection through an antibody-dependent enhancement mechanism, similar to what happens in secondary infections of DENV (Dejnirattisai et al., 2016; Paul et al., 2016). If this is confirmed it would have huge implications for disease pathogenesis, considering that current epidemics are occurring in regions where most of the population has already been exposed to DENV. Additionally, this mechanism of infection enhancement, together with ZIKV adaptability to vectors/hosts, the widely distribution of competent mosquitoes and the unusual non-vectorial human-to-human transmission routes observed, can help to interpret the reasons for the suddenly explosive emergence of ZIKV in the Americas and its potential to spread into other geographic regions.

CONCLUSIONS

Current ZIKV epidemics occurring throughout the American continent represent the most recent example of a mosquito-borne virus introduction into previously unaffected areas with immunologically naïve population. This unexpected emergence follows recent arrival and spreading of DENV, WNV, and CHIKV, which clearly responds to human activities that promotes optimal ecological environments for vectorial activity. Although ZIKV has remained almost ignored for half a century, entomological, epidemiological and molecular studies have strongly indicated that its incidence, geographic dispersion and genetic diversity have been significantly underestimated. Its adaptability to different mosquito species allowed ZIKV to spread into efficient urban transmission cycles helped by the widespread distribution of competent vectors. Furthermore, unprecedented routes of transmission for flaviviruses, including maternal-fetal and sexual intercourse, may contribute to increase its spreading potential.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AF, JC, and PM contributed to the elaboration of this minireview. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdelaR, Uruguay; Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII); and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

REFERENCES

- Akoua-Koffi, C., Diarrassouba, S., Béné, V. B., Ngbichi, J. M., Bozoua, T., Bosson, A., et al. (2001). [Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Côte d'Ivoire in 1999]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 94, 227–230.
- Atkinson, B., Hearn, P., Afrough, B., Lumley, S., Carter, D., Aarons, E. J., et al. (2016). Detection of Zika virus in semen. *Emerg. Infect. Dis.* 22:940. doi: 10.3201/eid2205.160107
- Bennett, S. N., Drummond, A. J., Kapan, D. D., Suchard, M. A., Muñoz-Jordán, J. L., Pybus, O. G., et al. (2010). Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. *Mol. Biol. Evol.* 27, 811–818. doi: 10.1093/molbev/msp285
- Berthet, N., Nakouné, E., Kamgang, B., Selekon, B., Descorps-Declère, S., Gessain, A., et al. (2014). Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14, 862–865. doi: 10.1089/vbz.2014.1607

- Besnard, M., Eyrolle-Guignot, D., Guillemette-Artur, P., Lastère, S., Bost-Bezeaud, F., Marcellis, L., et al. (2016). Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Euro Surveill.* 21. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.13.30181
- Besnard, M., Lastère, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V., and Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* 19.
- Boorman, J. P., and Porterfield, J. S. (1956). A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 50, 238–242. doi: 10.1016/0035-9203(56)90029-3
- Brault, A. C., Huang, C. Y.-H., Langevin, S. A., Kinney, R. M., Bowen, R. A., Ramey, W. N., et al. (2007). A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virulence in American crows. *Nat. Genet.* 39, 1162–1166. doi: 10.1038/ng2097
- Buathong, R., Hermann, L., Thaisomboonsuk, B., Rutvisuttinunt, W., Klungthong, C., Chinnawirotpisan, P., et al. (2015). Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012–2014. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 380–383. doi: 10.4269/ajtmh.15-0022
- Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., et al. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 653–660. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5
- Campos, G. S., Bandeira, A. C., and Sardi, S. I. (2015). Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1885–1886. doi: 10.3201/eid2110.150847
- Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.-L., Mallet, H.-P., et al. (2014). Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1085–1086. doi: 10.3201/eid2006.140138
- Carteaux, G., Maquart, M., Bedet, A., Contou, D., Brugières, P., Fourati, S., et al. (2016). Zika virus associated with meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* 374, 1595–1596. doi: 10.1056/NEJMc1602964
- Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., et al. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *Lancet* 387, 2125–2132. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00651-6
- Chouin-Carreiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., et al. (2016). Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004543. doi: 10.1371/journal.pntd.0004543
- Cordeiro, M. T., Pena, L. J., Brito, C. A., Gil, L. H., Marques, E. T., et al. (2016). Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *Lancet* 387, 1811–1812. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30253-7
- Cornet, M., Robin, Y., Adam, C., Valade, M., and Calvo, M. A. (1979a). Comparison between experimental transmission of yellow fever and Zika viruses in *Aedes aegypti* [arbovirus diseases, Ethiopian region, Senegal]. *Cah. Ser. Entomol. Med. Parasitol.* 27, 47–53.
- Cornet, M., Robin, Y., Chateau, R., Hème, G., Adam, C., Valade, M., et al. (1979b). Isolements d'arbovirus au Sénégal oriental à partir de moustiques (1972–1977) et notes sur l'épidémiologie des virus transmis par les *Aedes*, en particulier du virus amaril. *Cah. ORSTOM. Série Entomol. Médicale Parasitol.* 17, 149–163.
- Cristina, J., Fajardo, A., Soñora, M., Moratorio, G., and Musto, H. (2016). A detailed comparative analysis of codon usage bias in Zika virus. *Virus Res.* 223, 147–152. doi: 10.1016/j.virusres.2016.06.022
- Darwish, M. A., Hoogstraal, H., Roberts, T. J., Ahmed, I. P., and Omar, F. (1983). A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 442–445. doi: 10.1016/0035-9203(83)90106-2
- Davidson, A., Slavinski, S., Komoto, K., Rakeman, J., and Weiss, D. (2016). Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 716–717. doi: 10.15585/mmwr.mm6528e2
- Deckard, D. T., Chung, W. M., Brooks, J. T., Smith, J. C., Woldai, S., Hennessey, M., et al. (2016). Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 372–374. doi: 10.15585/mmwr.mm6514a3
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., et al. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat. Immunol.* 17, 1102–1108. doi: 10.1038/ni.3515
- Deng, C., Liu, S., Zhang, Q., Xu, M., Zhang, H., Gu, D., et al. (2016). Isolation and characterization of Zika virus imported to China using C6/36 mosquito cells. *Viol. Sin.* 31, 176–179. doi: 10.1007/s12250-016-3778-5
- Di Luca, M., Severini, F., Toma, L., Boccolini, D., Romi, R., Remoli, M. E., et al. (2016). Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Euro Surveill.* 21. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.18.30223
- Diallo, D., Sall, A. A., Diagne, C. T., Faye, O., Faye, O., Ba, Y., et al. (2014). Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLoS ONE* 9:e109442. doi: 10.1371/journal.pone.0109442
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., and Haddock, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 509–520. doi: 10.1016/0035-9203(52)90042-4
- Dirlikov, E., Major, C. G., Maysback, M., Medina, N., Matos, D., Ryff, K. R., et al. (2016). Guillain-Barré syndrome during ongoing Zika virus transmission — Puerto Rico, January 1–July 31, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 910–914. doi: 10.15585/mmwr.mm6534e1
- D'Ortenzio, E., Matheron, S., Yazdanpanah, Y., de Lamballerie, X., Hubert, B., Piorkowski, G., et al. (2016). Evidence of sexual transmission of Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 374, 2195–2198. doi: 10.1056/NEJMc1604449
- dos Santos, T., Rodriguez, A., Almiron, M., Sanhueza, A., Ramon, P., de Oliveira, W. K., et al. (2016). Zika virus and the Guillain-Barré syndrome — case series from seven countries. *N. Engl. J. Med.* doi: 10.1056/NEJMc1609015
- Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543. doi: 10.1056/NEJMoa0805715
- Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., Calvez, E., Daurès, M., John, M., Grangeon, J.-P., et al. (2015). Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 381–382. doi: 10.3201/eid2102.141553
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M., Rousset, D., Lanciotti, R., et al. (2016). Zika virus genome from the Americas. *Lancet* 387, 227–228. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00003-9
- Fagbami, A. H. (1979). Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J. Hyg. (Lond)*. 83, 213–219. doi: 10.1017/S0022172400025997
- Fajardo, A., Soñora, M., Moreno, P., Moratorio, G., and Cristina, J. (2016). Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and diversification of Zika virus populations. *J. Med. Virol.* 88, 1672–1676. doi: 10.1002/jmv.24596
- Faria, N. R., Azevedo, R., do, S., da, S., Kraemer, M. U. G., Souza, R., et al. (2016). Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science* 352, 345–349. doi: 10.1126/science.aaf5036
- Faye, O., Freire, C. C. M., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., et al. (2014). Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2636. doi: 10.1371/journal.pntd.0002636
- Fonseca, K., Meatherall, B., Zarra, D., Drebot, M., MacDonald, J., Pabbaraju, K., et al. (2014). First Case of Zika Virus Infection in a Returning Canadian Traveler. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91, 1035–1038. doi: 10.4269/ajtmh.14-0151
- Frank, C., Cadar, D., Schlaphof, A., Neddersen, N., Günther, S., Schmidt-Chanasit, J., et al. (2016). Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. *Euro Surveill.* 21. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.23.30252
- Freire, C. C., de, M., Iamarino, A., Neto, D. F., de, L., Sall, A. A., et al. (2015). Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans. *Cold Spring Harb. Labs J.* doi: 10.1101/032839
- Gong, Z., Gao, Y., and Han, G.-Z. (2016). Zika virus: two or three lineages? *Trends Microbiol.* 24, 521–522. doi: 10.1016/j.tim.2016.05.002
- Grard, G., Caron, M., Mombo, I. M., Nkoghe, D., Mboui Ondo, S., Jiolle, D., et al. (2014). Zika Virus in Gabon (Central Africa) — 2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2681. doi: 10.1371/journal.pntd.0002681
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., and Gascuel, O. (2005). PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* 33, W557–W559. doi: 10.1093/nar/gki352
- Haddock, A. D., Guzman, H., Popov, V. L., Wood, T. G., Widen, S. G., Haddock, A. D., et al. (2013). First isolation of *Aedes flavivirus* in the Western Hemisphere and evidence of vertical transmission in the mosquito

- Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae). *Virology* 440, 134–139. doi: 10.1016/j.virol.2012.12.008
- Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., et al. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1477. doi: 10.1371/journal.pntd.0001477
- Haddow, A. J., Williams, M. C., Woodall, J. P., Simpson, D. I., and Goma, L. K. (1964). Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bull. World Health Organ.* 31, 57–69.
- Hammon, W. M., Schrack, W. D., and Sather, G. E. (1958). Serological survey for an arthropod-borne virus infections in the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7, 323–328.
- Hanley, K. A., Monath, T. P., Weaver, S. C., Rossi, S. L., Richman, R. L., and Vasilakis, N. (2013). Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infect. Genet. Evol.* 19, 292–311. doi: 10.1016/j.meegid.2013.03.008
- Hayes, E. B. (2009). Zika virus outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1347–1350. doi: 10.3201/eid1509.090442
- Hills, S. L., Russell, K., Hennessey, M., Williams, C., Oster, A. M., Fischer, M., et al. (2016). Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission - Continental United States, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 215–216. doi: 10.15585/mmwr.mm6508e2
- Hughes, B. W., Addanki, K. C., Sriskanda, A. N., McLean, E., Bagasra, O., Bearcroft, W. G., et al. (2016). Infectivity of immature neurons to Zika virus: a link to congenital Zika Syndrome. *EBiomedicine* 10, 442–448. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.026
- Kaddumukasa, A. M., Kayondo, K. J., Masiga, D., Akol, M. A., Lutwama, J. J., and Masebe, C. (2015). High proportion of mosquito vectors in Zika forest, Uganda, feeding on humans has implications for the spread of new arbovirus pathogens. *Afr. J. Biotechnol.* 14, 1418–1426. doi: 10.5897/AJB2015.14474
- Kenney, J. L., and Brault, A. C. (2014). The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod-borne viruses by mosquitoes. *Adv. Virus Res.* 89, 39–83. doi: 10.1016/B978-0-12-800172-1.00002-1
- Korhonen, E., Huhtamo, E., and Smura, T. (2016). Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. *Euro Surveill.* 21.
- Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., and Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* 72, 73–83.
- Kuno, G., and Chang, G.-J. J. (2005). Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 608–637. doi: 10.1128/CMR.18.4.608-637.2005
- Kuno, G., and Chang, G.-J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* 152, 687–696. doi: 10.1007/s00705-006-0903-z
- Ladhani, S. N., O'Connor, C., Kirkbride, H., Brooks, T., and Morgan, D. (2016). Outbreak of Zika virus disease in the Americas and the association with microcephaly, congenital malformations and Guillain-Barré syndrome. *Arch. Dis. Child.* 101, 600–602. doi: 10.1136/archdischild-2016-310590
- Lancioti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., et al. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1232–1239. doi: 10.3201/eid1408.080287
- Lazear, H. M., and Diamond, M. S. (2016). Zika virus: new clinical syndromes and its emergence in the western hemisphere. *J. Virol.* 90, 4864–4875. doi: 10.1128/JVI.00252-16
- Ledermann, J. P., Guillaumont, L., Yug, L., Saweyog, S. C., Tided, M., Machieng, P., et al. (2014). *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e3188. doi: 10.1371/journal.pntd.0003188
- Li, C., Xu, D., Ye, Q., Hong, S., Jiang, Y., Liu, X., et al. (2016). Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell* 19, 120–126. doi: 10.1016/j.stem.2016.04.017
- Lí, M. L., Wong, P. S. J., Ng, L. C., and Tan, C. H. (2012). Oral Susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1792. doi: 10.1371/journal.pntd.0001792
- Lord, J. S., Gurley, E. S., and Pulliam, J. R. C. (2015). Rethinking Japanese Encephalitis virus transmission: a framework for implicating host and vector species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:e0004074. doi: 10.1371/journal.pntd.0004074
- Macnamara, F. N. (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48, 139–145. doi: 10.1016/0035-9203(54)90006-1
- Malkinson, M., Banet, C., Weisman, Y., Pokamunski, S., King, R., Drouet, M.-T., et al. (2002). Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 392–397. doi: 10.3201/eid0804.010217
- Mansuy, J. M., Pasquier, C., Daudin, M., Chapuy-Regaud, S., Moinard, N., Chevreau, C., et al. (2016). Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area. *Lancet Infect. Dis.* 16, 894–895. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30153-0
- Marchette, N. J., Garcia, R., and Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18, 411–415.
- Martines, R. B., Bhatnagar, J., Keating, M. K., Silva-Flannery, L., Muehlenbachs, A., Gary, J., et al. (2016). Notes from the field: evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses—Brazil, 2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 159–160. doi: 10.15585/mmwr.mm6506e1
- McCrae, A. W., and Kirya, B. G. (1982). Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76, 552–562. doi: 10.1016/0035-9203(82)90161-4
- Meaney-Delman, D., Hills, S. L., Williams, C., Galang, R. R., Iyengar, P., Hennenfent, A. K., et al. (2016). Zika virus infection among U.S. *Pregnant Travelers-August 2015-February 2016*. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 211–214. doi: 10.15585/mmwr.mm6508e1
- Mécharles, S., Herrmann, C., Poullain, P., Tran, T.-H., Deschamps, N., Mathon, G., et al. (2016). Acute myelitis due to Zika virus infection. *Lancet* 387:1481. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00644-9
- Messer, W., Gubler, D., Harris, E., Sivananthan, K., and de Silva, A. M. (2003). Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 800–809.
- Malakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., et al. (2016). Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* 374, 951–958. doi: 10.1056/NEJMoa1600651
- Moudy, R. M., Meola, M. A., Morin, L.-L. L., Ebel, G. D., and Kramer, L. D. (2007). A newly emergent genotype of West Nile virus is transmitted earlier and more efficiently by *Culex* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 365–370.
- Musso, D., and Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 487–524. doi: 10.1128/CMR.00072-15
- Musso, D., Nilles, E. J., Cao-Lormeau, V.-M., Kirya, B., Duffy, M., Chen, T., et al. (2014). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O595–O596. doi: 10.1111/1469-0691.12707
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., and Cao-Lormeau, V.-M. (2015). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 359–361. doi: 10.3201/eid2102.141363
- Nguyen, H. N., Qian, X., Song, H., and Ming, G. (2016). Neural stem cells attacked by Zika virus. *Cell Res.* 26, 753–754. doi: 10.1038/cr.2016.68
- Nhan, T.-X., and Musso, D. (2015). Emergence of Zika virus. *Virologie* 19, 225–235. doi: 10.1684/VIR.2015.0622
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparc-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., et al. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome—case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 19.
- Oliveira Melo, A. S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves Sampaio, S., and Bispo de Filippis, A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 47, 6–7. doi: 10.1002/uog.15831
- Olson, J. G., Ksiazek, T. G., Suhandiman, and Triwibowo. (1981). Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 389–393. doi: 10.1016/0035-9203(81)90100-0
- PAHO (2016). *Zika - Actualización Epidemiológica Regional de la OPS (Américas) - 7 de julio de 2016*. Available at: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599:regional-zika-epidemiological-update-america&Itemid=41691&lang=es
- Paul, L. M., Carlin, E. R., Jenkins, M. M., Tan, A. L., Barcellona, C. M., Nicholson, C. O., et al. (2016). Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Cold Spring Harb. Labs J.* doi: 10.1101/050112

- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., and Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 374, 1552–1563. doi: 10.1056/NEJMra1602113
- Pond, W. L. (1963). Arthropod-borne virus antibodies in sera from residents of South-East Asia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 57, 364–371. doi: 10.1016/0035-9203(63)90100-7
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A., and Petersen, L. R. (2016). Zika virus and birth defects — reviewing the evidence for causality. *N. Engl. J. Med.* 374, 1981–1987. doi: 10.1056/NEJMsr1604338
- Rozé, B., Najioullah, F., Fergé, J.-L., Apetse, K., Brouste, Y., Cesaire, R., et al. (2016). Zika virus detection in urine from patients with Guillain-Barré syndrome on Martinique, January 2016. *Euro Surveill.* 21. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30154
- Russell, P. K. (2016). The Zika Pandemic - a perfect storm? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004589. doi: 10.1371/journal.pntd.0004589
- Sarno, M., Sacramento, G. A., Khouri, R., do Rosário, M. S., Costa, F., Archanjo, G., et al. (2016). Zika virus infection and stillbirths: a case of hydrops fetalis, hydranencephaly and fetal demise. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004517. doi: 10.1371/journal.pntd.0004517
- Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M. L., Horovitz, D. D. G., Cavalcanti, D. P., Pessoa, A., et al. (2016). Possible association between Zika virus infection and microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 59–62. doi: 10.15585/mmwr.mm6503e2
- Shen, S., Shi, J., Wang, J., Tang, S., Wang, H., Hu, Z., et al. (2016). Phylogenetic analysis revealed the central roles of two African countries in the evolution and worldwide spread of Zika virus. *Virology* 51, 118–130. doi: 10.1007/s12250-016-3774-9
- Simpson, D. I. (1964). Zika virus infection in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 58, 335–338. doi: 10.1016/0035-9203(64)90201-9
- Smithburn, K. C. (1952). Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. *J. Immunol.* 69, 223–234.
- Smithburn, K. C. (1954). Neutralizing antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of long-time residents of Malaya and Borneo. *Am. J. Hyg.* 59, 157–163.
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., et al. (2016). Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* 18, 587–590. doi: 10.1016/j.stem.2016.02.016
- Tappe, D., Rissland, J., Gabriel, M., Emmerich, P., Gunther, S., Held, G., et al. (2014). First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Euro Surveill.* 19.
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., and Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 3:e201. doi: 10.1371/journal.ppat.0030201
- Turmel, J. M., Abgueuen, P., Hubert, B., Vandamme, Y. M., Maquart, M., Le Guillou-Guillemette, H., et al. (2016). Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. *Lancet* 387:2501. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30775-9
- Vasilakis, N., Cardoso, J., Hanley, K. A., Holmes, E. C., and Weaver, S. C. (2011). Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 532–541. doi: 10.1038/nrmicro2595
- Ventura, C. V., Maia, M., Bravo-Filho, V., Góis, A. L., Belfort, R., Dick, G., et al. (2016). Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet* 387:228. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00006-4
- Venturi, G., Zammarchi, L., Fortuna, C., Remoli, M. E., Benedetti, E., Fiorentini, C., et al. (2016). An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. *Euro Surveill.* 21. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.8.30148
- Wang, L., Valderramos, S. G., Wu, A., Ouyang, S., Li, C., Brasil, P., et al. (2016). From mosquitos to humans: genetic evolution of Zika Virus. *Cell Host Microbe* 19, 561–565. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.006
- Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., et al. (2016). Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res.* 130, 69–80. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.03.010
- Wong, P.-S. J., Li, M. I., Chong, C.-S., Ng, L.-C., and Tan, C.-H. (2013). *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2348. doi: 10.1371/journal.pntd.0002348
- Yakob, L., Kucharski, A., Hue, S., and Edmunds, W. J. (2016). Low risk of a sexually-transmitted Zika virus outbreak. *Lancet. Infect. Dis.* 16, 1100–1102. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30324-3
- Zanluca, C., de Melo, V. C. A., Mosimann, A. L. P., dos Santos, G. I. V., dos Santos, C. N. D., and Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 569–572. doi: 10.1590/0074-02760150192
- Zhang, Y., Chen, W., Wong, G., Bi, Y., Yan, J., Sun, Y., et al. (2016). Highly diversified Zika viruses imported to China, 2016. *Protein Cell* 7, 461–464. doi: 10.1007/s13238-016-0274-5

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Fajardo, Cristina and Moreno. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO III: OTRAS PUBLICACIONES REALIZADAS
DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS



Short communication

Phylogenetic analyses of Norovirus strains detected in Uruguay reveal the circulation of the novel GII.P7/GII.6 recombinant variant



Álvaro Fajardo^a, Fernando López Tort^b, Matías Victoria^b, Tulio M. Fumian^c, Marize P. Miagostovich^c, José Paulo G. Leite^c, Juan Cristina^a, Rodney Colina^{b,*}

^aLaboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igua 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^bLaboratorio de Virología Molecular, Regional Norte, Universidad de la República, Gral. Rivera 1350, 50000 Salto, Uruguay

^cLaboratorio de Virología Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Ministerio da Saude, Avenida Brasil, 4365 – Pav. Helio & Peggy Pereira, 21040-360 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2014

Received in revised form 22 October 2014

Accepted 27 October 2014

Available online 4 November 2014

Keywords:

Norovirus
Recombination
Evolution

ABSTRACT

Noroviruses (NoV) are one of the major etiological agent of acute gastroenteritis (AGE) outbreaks worldwide. Distinct NoV genotypes have been associated with different transmission patterns and disease severity in humans. Therefore, it is important to identify genetically different NoV genotypes circulating in a particular region. However, genotyping has become a challenge due to recombination events occurring mainly nearby ORF1/ORF2 junction of NoV genome, leading to distinct genotypes with polymerase and capsid regions derived from parenteral strains. Taking this into account, ORF1/ORF2 sequences were obtained from NoV strains collected from patients with AGE in Uruguay. This study reveals *in silico* evidences of recombination events taking place in four out of six strains analyzed for which its polymerase gene and its capsid region correspond to GII.P7 and to GII.6 genotype, respectively. These results also reveal the circulation of a GII.P7/GII.6 recombinant variant in the natural populations of NoV strains in the northwestern region of Uruguay. As far as we know this is the first report about the circulation of a NoV GII.P7/GII.6 recombinant variant in the Americas.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Noroviruses (NoV), belonging to genus *Norovirus*, family *Caliciviridae*, are a group of related, single-stranded RNA, non-enveloped viruses that cause acute gastroenteritis (AGE) in humans (Green et al., 2000; Xi et al., 1990). NoV are responsible for 50% of all AGE outbreaks, especially in developing countries, were they cause annually one million hospitalizations and 200,000 deaths in children under 5 years old (Patel et al., 2008).

NoV genome is organized into three open reading frames (ORFs). ORF1 is translated as a large polyprotein, which is co and post-translationally cleaved to release at least six mature non-structural (NS) proteins, including the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Hyde et al., 2009; Hyde and Mackenzie, 2010). ORF2 and ORF3 are translated from a subgenomic RNA, and encode the major and minor capsid proteins, VP1 and VP2, respectively (Thorne and Goodfellow, 2014). Based on their nucleotide capsid VP1 and polymerase sequences, NoV are classified into seven genogroups (GI to GVII) of which GI, GII and GIV have been described in humans, and recently, GVI and GVII were detected in canine and feline species. (Kroneman et al., 2013).

NoV can be further classified into at least 32 different genotypes, which can differ in their ability to cause epidemics, their host range, incidence, virulence and stability in the environment (Fankhauser et al., 2002; Huhti et al., 2011; Kroneman et al., 2008, 2013; Vinjé et al., 2004).

Recombination is one of the main driving forces shaping evolution of viruses (Bull et al., 2007). It provides RNA viruses with an attractive mechanism to adapt to new environmental conditions and hosts, and therefore, to evade the immune system (Van der Walt et al., 2009). It has been experimentally demonstrated the occurrence of a homologous recombination event located at the ORF1/ORF2 overlap, in murine NoV (Mathijs et al., 2010). Several recombination events have been reported worldwide among NoV strains, leading to difficulties in genotyping and molecular epidemiologic studies. It has been well documented that a recombination hotspot is present around the ORF1/ORF2 junction of NoV genome, where a highly conserved sequence of 28 bp-long (5'-GTG AAT GAA GAT GGC GTC KAR YGA CGC Y-3') and 27 bp-long (5'-GYR AAT GAT GAT GGC GTC KAA RGA CGY-3') is present for NoV GII and NoV GI, respectively, that seems to play an important role (Bull et al., 2005; Han et al., 2004; Hansman et al., 2004; Hardy et al.,

* Corresponding author. Tel.: +598 473 34816; fax: +598 473 22154.

E-mail address: rodneycolina1@gmail.com (R. Colina).

1997; Jiang et al., 1999; Katayama et al., 2002, 2004; Oliver et al., 2004).

In order to determine the presence of putative recombination events among NoV populations circulating in Uruguay, three diarrheic stool samples and three vomit samples, which were previously diagnosed positive for NoV by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) of the B region (Fankhauser et al., 2002) were studied. These samples were obtained during a surveillance study conducted between May 2011 and May 2012 from Uruguayan patients with AGE in the city of Salto, North-Western Uruguay (for details see Table 1). Voluntary written informed consent were obtained from the parents or legal guardians at enrollment. The study has been accepted by the local health authorities.

Nucleic acids were extracted using the guanidine isothiocyanate-silica method from a 10% fecal suspension in pH 7.2 Tris-calcium buffer (Boom et al., 1990). Complementary DNA (cDNA) was obtained using hexanucleotide random primers (Amersham Bioscience, UK) and the *Superscript II™ reverse transcriptase* (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. In order to investigate the presence of putative recombination events within the analyzed strains, we performed a PCR targeting the overlapping region between ORF1 and ORF2 using primers (Mon431/432; G2SKR/G1SKR) and protocols previously described (Beuret et al., 2002; Fumian et al., 2012; Kojima et al., 2002). An amplicon of 564 bp was obtained and visualized by agarose gel electrophoresis. This amplicon include a 285 bp region present at the 3' end of ORF1, coding for the RNA polymerase, and 279 bp corresponding to the 5' end of ORF2, which codes for the capsid protein.

Amplicons were purified using *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN™), according to manufacturer's instructions. Bidirectional DNA sequencing was performed by the dideoxynucleotide chain termination method, using the *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1*, v. 3.1 and the *ABI Prism 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) by the Genomic Platform of DNA sequencing PDTIS/Fiocruz. The sequences obtained in this study were deposited in the GenBank database under accession numbers KJ577799–KJ577802 and KJ865752–KJ865753.

The obtained sequences were first analyzed with the Seqman program implemented in the *DNASTar 5.01 package* (DNASTAR, Madison, USA). Comparable sequences containing ORF1/ORF2 overlap of different NoV genotypes were retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Alignment of sequences was performed using the MUSCLE program (Edgar, 2004). Sequences were analyzed with the *Norovirus Genotyping Tool*, v1.0 (Kroneman et al., 2011) in order to determine their genotypes. Due to the possibility of recombination events in the analyzed region, two datasets were generated: one considering the region coding for the RdRp (partial ORF1) and the other including capsid coding region (partial ORF2). Phylogenetic analyses were performed for both datasets that included comparable sequences of different NoV genotypes. The program ModelGenerator (Keane et al., 2006) was used to identify the optimal evolutionary model for both datasets. Akaike Information Criteria and

Hierarchical Likelihood Ratio Test indicated that the GTR + Γ model fit the sequence data. Using this model, Maximum Likelihood (ML) trees were constructed using software from the PhyML program (Guindon et al., 2005). As a measure of the robustness of each node, we employed an approximate Likelihood Ratio Test (aLRT) to assesses that the branch being studied provides a significant likelihood gain, in comparison with the null hypothesis that involves collapsing that branch but leaving the rest of the tree topology identical (Anisimova and Gascuel, 2006).

Splits networks were created with SplitsTree 4.13.1 (Huson and Bryant, 2006) using the neighbor-net method (Bryant and Moulton, 2004). Neighbor-net depicts conflicting phylogenetic signals in the data that are caused by recombination as cycles within unrooted bifurcating trees. The presence of recombination events was statistically verified after visual identification using the pairwise homoplasy test (PHI). PHI has been shown to powerfully identify the presence/absence of recombination within a wide range of sequence samples with a low false positive rate (Bruen et al., 2006).

SimPlot version 3.5.1 (Lole et al., 1999) was used to perform the recombination breakpoint analyses. SimPlot analysis was performed by setting the window width and the step size to 200 bp and 20 bp, respectively. We also used different methods implemented in the Recombination Detection Program v.4.16 (RDP4) (Martin et al., 2010), such as Bootscan/ReScan (Martin et al., 2005), RDP (Martin and Rybicki, 2000), and MaxChi (Smith, 1992). Uruguayan sequences KJ577799 to KJ577802 were included as queries, while genotype GII.6 (AB039778) and GII.7 (AB258331) sequences were used as putative parental sequences.

The results of the analysis performed using the *Norovirus Genotyping Tool* suggests that two of the Uruguayan strains belong to genotypes GII.1 and GII.4 (KJ865752 and KJ865753, respectively). Surprisingly, the analysis of the other four Uruguayan strains (KJ577799–KJ577802) indicated incongruence between their genotype classification based on ORF1 and ORF2 regions, which grouped them into GII.P7 and GII.6, respectively (Supplementary Table 1).

In order to confirm the results obtained using the *Norovirus Genotyping Tool*, ML phylogenetic trees were constructed (Fig. 1). Again, a close genetic relation among Uruguayan KJ865752 and KJ865753 strains with previously described GII.1 and GII.4 genotypes, respectively, was found. The other four Uruguayan strains (KJ577799–KJ577802) were assigned to clusters composed of previously described GII.P7 genotype, respectively, for ORF1 (RdRp) sequences (see Fig. 1A). Nevertheless, when the same analysis was performed using ORF2 (VP1) sequences, a clear genetic relation among these four Uruguayan strains and GII.6 genotype was found (see Fig. 1B).

With the objective to analyze the possible recombination events occurring among the Uruguayan strains, the 564 bp alignment containing the ORF1/ORF2 junction was explored using neighbor-net method implemented in SplitsTree 4.13.1. A reticulate phylogenetic network was evident, due to the presence of conflicting phylogenetic signals within the sequences (Supplementary Fig. 1). We statistically verified the presence of recombination events identified visually in phylogenetic graphs using the PHI test,

Table 1
Characteristics of the samples analyzed.

Strain number	Type of sample	Sex	Age	Isolation date	Genotype	Accession number
70	Feces	F	NA	05/2011	GII.7/GII.6	KJ577799
93	Feces	M	NA	06/2011	GII.7/GII.6	KJ577800
234	Feces	M	6 years	04/2012	GII.7/GII.6	KJ577801
243	Vomit	F	25 years	05/2012	GII.7/GII.6	KJ577802
178	Vomit	F	9 years	03/2012	GII.4	KJ865752
229	Vomit	M	4 years	04/2012	GII.1	KJ865753

NA: not available.

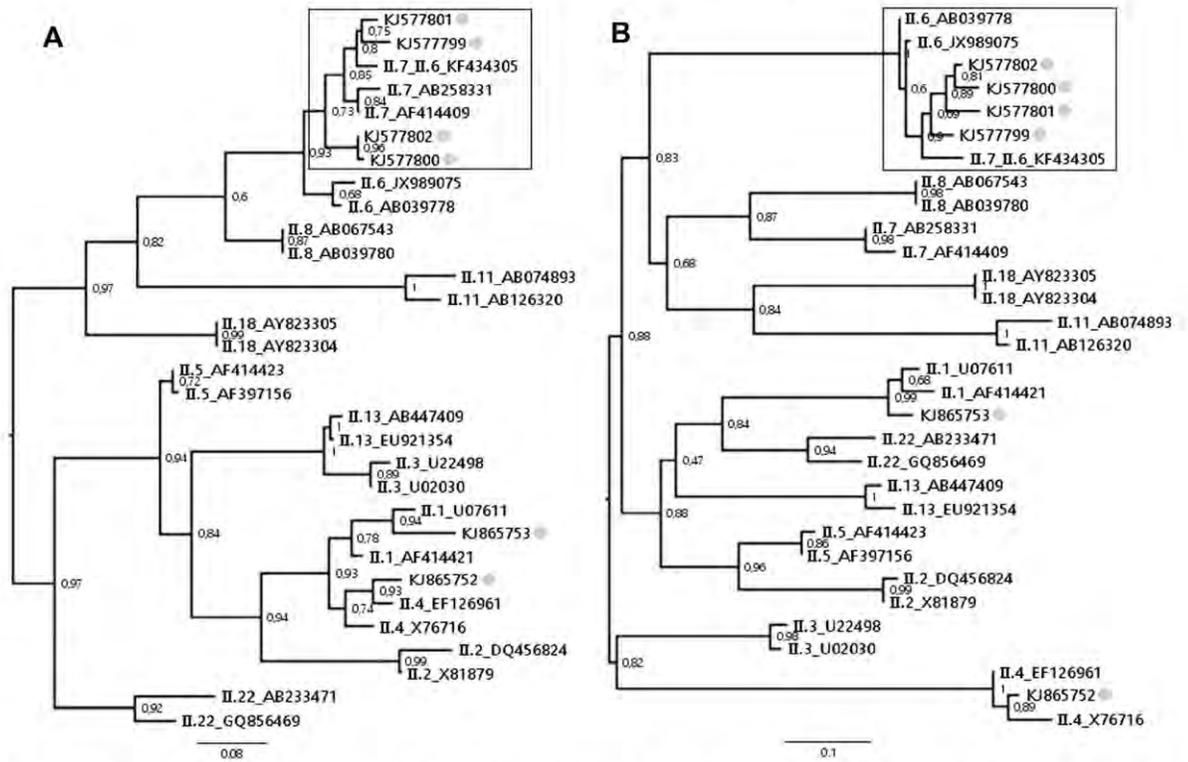


Fig. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree analysis of NoV strains isolated in Uruguay. Strains previously reported are shown by their genotype followed by their accession numbers. Strains isolated in Uruguay are shown by their accession numbers highlighted in grey. The clusters where Uruguayan strains have been assigned are indicated by a frame. Numbers at the branches show aLRT values. Bars at the bottom of the trees indicate nucleotide Distance. The results obtained using partial ORF1 and ORF2 regions are shown in (A) and (B), respectively.

which confirmed that these conflicting signals are due to recombination (statistic-value < 0.001).

In order to identify the precise location of the putative recombination breakpoint that were suggested by the results of the previous phylogenetic analyses, we employed different methods implemented in SimPlot and RDP4 programs to analyze the ORF1/ORF2 junction for the four potentially recombinant samples involved in this study. The results of these analyzes are shown in Fig. 2.

As expected, SimPlot analysis revealed the presence of recombination break-points at positions 208–214 of Uruguayan NoV KJ577799, KJ577800, KJ577801 and KJ577802 (see Fig. 2A). These positions correspond to nucleotides 5027–5033 relative to reference strain Lordsdale (accession number X86557).

Finally, to validate SimPlot results, Bootscan/Recscan analysis, implemented in RDP4 program, was employed. As it shown in Fig. 2B, similar results were found using both approaches; since recombination break-points were detected at positions 215 and 220 of the same four Uruguayan NoV strains (positions 5034–5039 relative to reference strain Lordsdale, accession number X86557). The recombination points determined by other methods implemented in RDP4 program (RDP and MaxChi), showed similar results (data not shown).

In this study, we explored the genetic variability of NoV strains circulating in the northwest region of Uruguay, through sequence analysis of their ORF1/ORF2 junction region. We could appreciate the presence of conflicting phylogenetic signals among four of the six strains analyzed, indicating that RdRp and capsid genes could have derived from different ancestral strains. This fact suggested that the strains analyzed may have emerged as a result of a recombination event between GII.7 and GII.6 strains. This hypothesis was further investigated through different approaches.

The results of these studies revealed recombination break-points between positions 5027–5039 of the NoV genome (relative to reference strain Lordsdale) in four out of six NoV strains collected in Uruguay. This is in agreement with previous reports describing NoV recombinant strains, where the recombination breakpoints were estimated between nucleotides 4981 and 5117 (Bull et al., 2005; Fumian et al., 2012; Hansman et al., 2004; Hardy et al., 1997; Jiang et al., 1999; Katayama et al., 2002).

The presence of a recombination hotspot around ORF1/ORF2 junction of NoV genome seems to be related with the presence of a highly conserved sequence in this region, which is also present at the 5' end of ORF1 (Bull et al., 2005). A conserved sequence of 28 bp (5'-GTG AAT GAA GAT GGC GTC GAA TGA CGC Y-3') was observed in all Uruguayan strains. This sequence has been suggested to form a stem loop structure that acts as a RNA promoter sequence, playing a significant role for the recombination events to occur (Bull et al., 2005; Kao et al., 2001; Miller et al., 1985; Morales et al., 2004; Pletneva et al., 2001).

The results of these studies highlight the importance of carrying out a deeper NoV surveillance studies in order to perform appropriate epidemiological analyses and constitute the first evidence about the circulation of this specific genetic variant in the Americas. More studies will be needed to address the extent and the role of recombination in NoV populations circulating in the South American region. The only GII.P7/GII.6 recombinant strain reported to date was recently detected in Burkina Faso (accession number KF434305) (Huynen et al., 2013). This strain was also analyzed in the present work and presented high similarity to Uruguayan strains, both in its phylogenetic signal and in its recombination pattern. However, taking into account the high frequency of recombination in this genomic region of NoV, as well as the

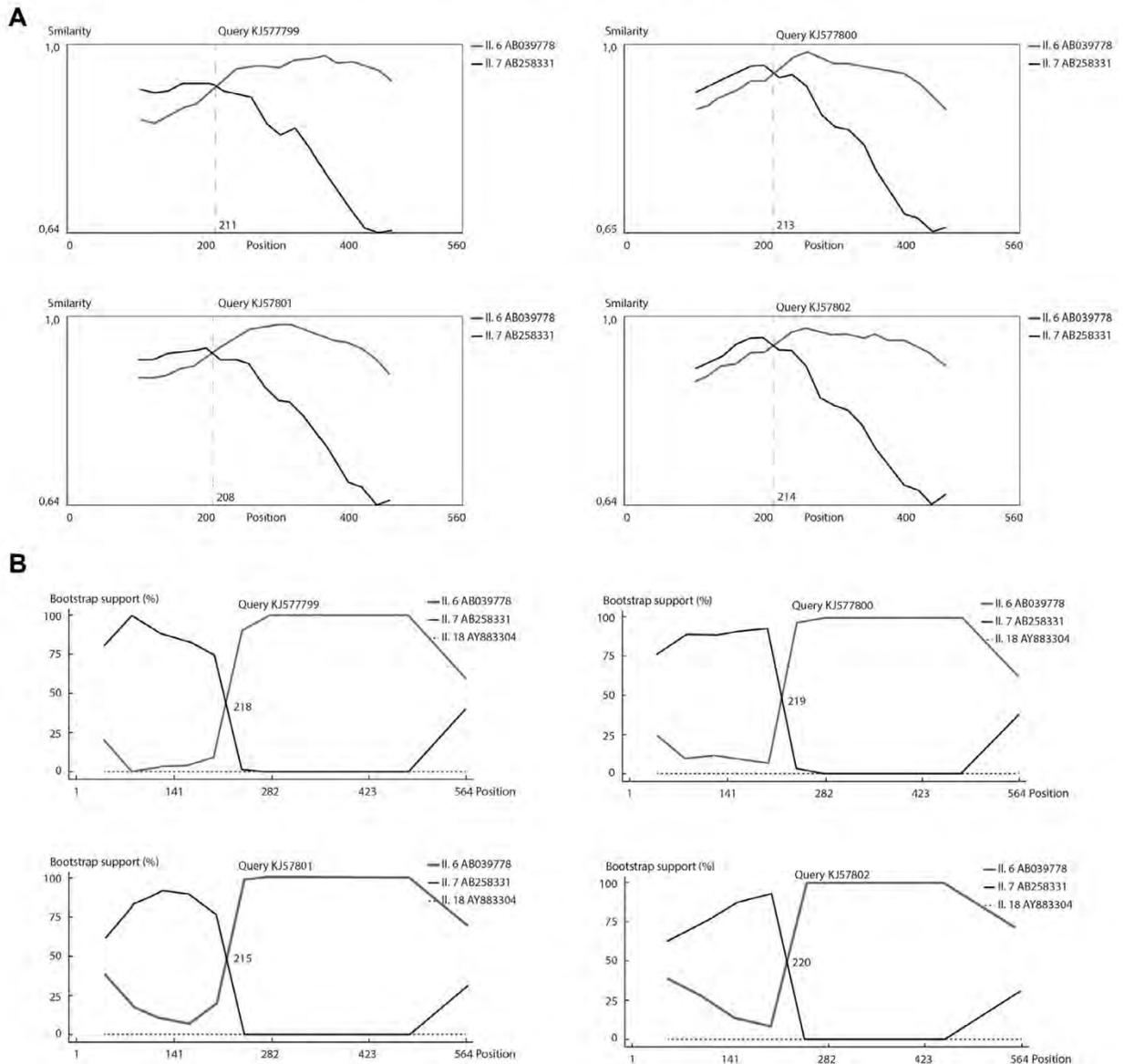


Fig. 2. Determination of recombination breakpoints. (A) SimPlot analysis results. The y-axis gives the percentage of identity within a sliding window of 200 bp wide, with a step size between plots of 20 bp. Comparison of the 4 Uruguayan strains with their putative parental NoV strains of genotypes GII.6 (AB039778) and GII.7 (AB258331) is indicated by gray and black lines, respectively. The vertical dashed lines indicate the recombination break-point site. (B) Bootscan/Recscan analysis results. The y-axis gives the percentage of bootstrap support values of permutated trees using a sliding window of 200 bp wide with a step size between plots of 20 bp. Uruguayan sequences were analyzed with strains genotype GII.6 (AB039778) and genotype GII.7 (AB258331), as putative parental strains, and a GII.18 strain (AY883304) as an outlier sequence, indicated in gray, black and dotted lines, respectively. The recombination break-point position for each case is indicated.

geographical distance between the strains considered, a direct relation between these recombinant events seems unlikely. A more feasible scenario could be a consequence of the circulation of both GII.6 and GII.7 genotypes in a particular area. Co-circulation of different NoV genotypes may lead to co-infection, increasing the possibility of recombination events and giving rise to the circulation of new recombinant strains (Jiang et al., 1999; Vidal et al., 2006). Therefore, deeper research concerning NoV genotypes circulating in northwestern region of Uruguay and surrounding areas, are essential in order to understand the origin and dynamics of the reported recombinants. Furthermore, we report the circulation of the globally detected GII.1 and GII.4, based on its identification in two of the analyzed strains. However, the relative distribution

of these genotypes and their prevalence will require more intensive molecular epidemiologic studies in Uruguay. This studies, together with reports of this nature in neighbor countries (Vidal et al., 2006; Fioretti et al., 2011, 2004; Gomes et al., 2008), will provide us a better understanding of the behavior and spread of NoV genotypes in the Latin American region.

Acknowledgments

This work was supported by projects from: Program “Polo de Desarrollo Universitario” (PDU), Universidad de República (UdelaR), Uruguay. Project CSIC I + D 2010, Universidad de la República (UdelaR) and project PCPP 023/2011 of “Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES-ANII, Brazil/Uruguay).

A.F. acknowledges financial support for Ph.D. studies from the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay. Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) – PPCP 023/2011. Program of Research Excellence (PROEP) – Brazilian National Council for Scientific and Technological Development and Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, and Carlos Chagas Filho Foundation for research support of the state of Rio de Janeiro (FAPERJ).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.026>.

References

- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552.
- Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A., Luthi, T.M., 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1925–1931.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., Van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.
- Bruen, T.C., Philippe, H., Bryant, D., 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172, 2665–2681.
- Bryant, D., Moulton, V., 2004. Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.* 21, 255–265.
- Bull, R.A., Hansman, G.S., Clancy, L.E., Tanaka, M.M., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2005. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1079–1085.
- Bull, R.A., Tanaka, M.M., White, P.A., 2007. Norovirus recombination. *J. Gen. Virol.* 88, 3347–3359.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Noel, J.S., Humphrey, C.D., Bresee, J.S., Parashar, U.D., Ando, T., Glass, R.I., 2002. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* 186, 1–7.
- Fioretti, J.M., Bello, G., Rocha, M.S., Victoria, M., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2004. Temporal dynamics of norovirus GI.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS ONE* 9, e92988.
- Fioretti, J.M., Ferreira, M.S., Victoria, M., Vieira, C.B., Xavier, M.P., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2011. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 942–947.
- Fumian, T.M., Aragao, G.C., Mascarenhas, J.D.P., Kaiano, J.H., Siqueira, J.A.M., Soares, L.S., Linhares, A.C., Gabbay, Y.B., 2012. Detection of a novel recombinant strain of norovirus in an African-descendant community from the Amazon region of Brazil in 2008. *Arch. Virol.* 157, 2389–2392.
- Gomes, K.A., Stupka, J.A., Diana, A., Parra, G.I., 2008. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis occurring in Argentina during 2005 and 2006. *Rev. Argent. Microbiol.* 40, 222–228.
- Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Berke, T., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J., Thiel, H.J., 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect. Dis.* 181, S322–S330.
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., Gascuel, O., 2005. PHYML Online – a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* 33, W557–W559.
- Han, M.G., Smiley, J.R., Thomas, C., Saif, L.J., 2004. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5214–5224.
- Hansman, G.S., Katayama, K., Peerakome, N., Khamrin, P., Tonusin, S., Okitsu, S., Nishio, O., Takeda, N., Ushijima, H., 2004. Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1305–1307.
- Hardy, M.E., Kramer, S.E., Treanor, J.J., Estes, M.K., 1997. Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype Snow Mountain agent. *Arch. Virol.* 142, 1469–1479.
- Huhti, I., Szakal, E.D., Puustinen, L., Salminen, M., Huhtala, H., Valve, O., Blazevic, V., Vesikari, T., 2011. Norovirus GI.4 causes a more severe gastroenteritis than other noroviruses in young children. *J. Infect. Dis.* 203, 1442–1444.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 254–267.
- Huynen, P., Mauroy, A., Martin, C., Savadogo, L.G., Boreux, R., Thiry, E., Melin, P., De Mol, P., 2013. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J. Clin. Virol.* 58, 515–521.
- Hyde, J.L., Mackenzie, J.M., 2010. Subcellular localization of the MNV-1 ORF1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex. *Virology* 406, 138–148.
- Hyde, J.L., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., Wobus, C., Virgin, H.W., Mackenzie, J.M., 2009. Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *J. Virol.* 83, 9709–9719.
- Jiang, X., Espul, C., Zhong, W.M., Cuello, H., Matson, D.O., 1999. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch. Virol.* 144, 2377–2387.
- Kao, C.C., Singh, P., Ecker, D.J., 2001. De novo initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. *Virology* 287, 251–260.
- Katayama, K., Shirato-Horikoshi, H., Kojima, S., Kageyama, T., Oka, T., Hoshino, F.B., Fukushi, S., Shinohara, M., Uchida, K., Suzuki, Y., Gojibori, T., Takeda, N., 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 299, 225–239.
- Katayama, K., Miyoshi, T., Uchino, K., Oka, T., Tanaka, T., Takeda, N., Hansman, G.S., 2004. Novel recombinant sapovirus. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1874–1876.
- Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J., McInerney, J.O., 2006. Assessment of methods of amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* 6, 29.
- Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K., 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* 100, 107–114.
- Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., Van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Böttiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., Von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Kuusi, M., Pothier, P., Gallay, A., Schreier, E., Höhne, M., Koch, J., Szűcs, G., Reuter, G., Krizstalovics, K., Lynch, M., McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Grom, A.H., Mijovski, J.Z., Bosch, A., Buesa, J., Fauquier, A.S., Hernández-Pezzi, G., Hedlund, K.O., Koopmans, M., 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2959–2965.
- Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., Avoort, H.V., Peñaranda, S., Oberste, M.S., Vinjé, J., Koopmans, M., 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J. Clin. Virol.* 51, 121–125.
- Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinje, J., White, P.A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., Koopmans, M., 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158, 2059–2068.
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gaddari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C., 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73, 152–160.
- Martin, D., Rybicki, E., 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16, 562–563.
- Martin, D.P., Posada, D., Crandall, K.A., Williamson, C., 2005. A modified Bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 98–102.
- Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., Lefeuve, P., 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462–2463.
- Mathijs, E., Muylkens, B., Mauroy, A., Ziant, D., Delwiche, T., Thiry, E., 2010. Experimental evidence of recombination in murine noroviruses. *J. Gen. Virol.* 91, 2723–2733.
- Miller, W.A., Dreher, T.W., Hall, T.C., 1985. Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA in vitro by internal initiation on (–) sense genomic RNA. *Nature* 313, 68–70.
- Morales, M., Barcena, J., Ramirez, M.A., Boga, J.A., Parra, F., Torres, J.M., 2004. Synthesis in vitro of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (–) sense genomic RNA. *J. Biol. Chem.* 279, 17013–17018.
- Oliver, S.L., Brown, D.W., Green, J., Bridger, J.C., 2004. A chimeric bovine enteric calicivirus: evidence for genomic recombination in genogroup III of the Norovirus genus of the Caliciviridae. *Virology* 326, 231–239.
- Patel, M.M., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinje, J., Parashar, U.D., 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1224–1231.
- Pletneva, M.A., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., 2001. The genome of Hawaii virus and its relationship with other members of the Caliciviridae. *Virus Genes* 23, 5–16.
- Smith, J.M., 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.* 34, 126–129.
- Thorne, L.G., Goodfellow, I.G., 2014. Norovirus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.* 95, 278–291.
- Van der Walt, E., Rybicki, E., Varsani, A., Polston, J.E., Billharz, R., Donaldson, L., Monjane, A.L., Martin, D.P., 2009. Rapid host adaptation by extensive recombination. *J. Gen. Virol.* 3, 734–746.
- Vidal, R., Roessler, P., Solari, V., Vollaire, J., Jiang, X., Matson, D.O., Mamani, N., Prado, V., O’Ryan, M.L., 2006. Novel recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2271–2275.
- Vinje, J., Hamidjaja, R.A., Sobsey, M.D., 2004. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J. Virol. Methods* 116, 109–117.
- Xi, J.N., Graham, D.Y., Wang, K.N., Estes, M.K., 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250, 1580–1583.

An evolutionary insight into Newcastle disease viruses isolated in Antarctica

Martin Soñora¹ · Pilar Moreno¹ · Natalia Echeverría¹ · Sabrina Fischer¹ · Victoria Comas¹ · Alvaro Fajardo¹ · Juan Cristina¹

Received: 9 December 2014 / Accepted: 17 April 2015 / Published online: 27 May 2015
© Springer-Verlag Wien 2015

Abstract The disease caused by Newcastle disease virus (NDV) is a severe threat to the poultry industry worldwide. Recently, NDV has been isolated in the Antarctic region. Detailed studies on the mode of evolution of NDV strains isolated worldwide are relevant for our understanding of the evolutionary history of NDV. For this reason, we have performed Bayesian coalescent analysis of NDV strains isolated in Antarctica to study evolutionary rates, population dynamics, and patterns of evolution. Analysis of F protein cleavage-site sequences of NDV isolates from Antarctica suggested that these strains are lentogenic. Strains isolated in Antarctica and genotype I reference strain Ulster/67 diverged from ancestors that existed around 1958. The time of the most recent common ancestor (MRCA) was established to be around 1883 for all class II viruses. A mean rate of evolution of 1.78×10^{-3} substitutions per site per year (s/s/y) was obtained for the F gene sequences of NDV strains examined in this study. A Bayesian skyline plot indicated a decline in NDV population size in the last 25 years. The results are discussed in terms of the possible role of Antarctica in emerging or re-emerging viruses and the evolution of NDV populations worldwide.

Introduction

The disease caused by Newcastle disease virus (NDV) is one of the most important diseases of poultry, affecting the poultry industry worldwide [1]. NDV belongs to the genus *Avulavirus* of the family *Paramyxoviridae*, and its genome is a non-segmented, single-stranded, negative-sense RNA molecule of approximately 15,186 nucleotides (nt) in length [2].

NDV isolates have been grouped by virulence phenotype, with lentogenic, mesogenic, and velogenic strains, in order of increasing virulence [3]. Lentogenic viruses typically cause subclinical infections or mild respiratory disease. Mesogens are of intermediate virulence, usually resulting in moderate respiratory disease with occasional nervous signs. Velogens are the most virulent viruses and may cause extensive hemorrhagic lesions, particularly in the gastrointestinal tract (viscerotropic), and/or a predominance of nervous signs (neurotropic) [4].

NDV infection is initiated by the action of two envelope glycoproteins. One of these mediates attachment of the virus to a host-cell receptor and is designated HN (hemagglutinin-neuraminidase). The other glycoprotein, designated as the fusion (F) protein, is responsible for virus penetration into the host cell and syncytium formation [5]. The F protein plays a key role in viral virulence and is a major target for the immune response [6]. The NDV F protein is a trimeric type I integral membrane protein that is synthesized as an inactive precursor, F0 (66 kDa), which is posttranslationally cleaved by host-cell proteases into two disulfide-linked subunits, the N-terminal F2 (12.5 kDa) and the C-terminal F1 (55 kDa) [7, 8]. The sequence of the F protein cleavage site is a major determinant of NDV pathogenicity. The cleavage sites of virulent NDV strains usually contain multiple basic residues, whereas avirulent strains have fewer basic residues [9].

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-015-2434-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Juan Cristina
cristina@cin.edu.uy

¹ Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Igua 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

The consensus sequence of the F protein cleavage site of velogenic and mesogenic strains is ¹¹²(R/K)RQ(R/K)RF¹¹⁷, while the consensus sequence of the lentogenic F cleavage site is ¹¹²(G/E)(K/R)Q(G/E)RL¹¹⁷ [10]. Most of the recent virulent NDV strains bear the virulence motif ¹¹²RRQKRF¹¹⁷ at the cleavage site of their F0 protein [11, 12]. Seven neutralizing epitopes have been mapped on the F protein of NDV [5, 13, 14]. Critical amino acids involved in neutralization sites are sites 72, 74, 75, 78, 79 and 343, as well as a stretch of amino acids from residues 157 to 171 [14, 15].

NDV strains are divided into two classes based on genetic analysis: class I strains, which are mainly isolated from wild birds and are generally avirulent, and class II strains, which are isolated from wild and domestic birds can be either virulent or avirulent [16]. Class I viruses comprise a single genotype, while class II viruses are divided into 18 or possibly 19 genotypes (I–XIX) [17–19]. Strains of genotypes V, VI and VII of class II are currently circulating in chickens throughout the world [20].

Since NDV was first reported in poultry in 1926, vaccination has been widely used for prevention and control of the disease caused by NDV [21]. The most commonly used live vaccines are LaSota and Clone-30, which belong to genotype II [22]. Characterization of NDV strains is important to evaluate field changes, anticipate new outbreaks, and develop adequate control measures [23]. Large gaps in our current knowledge in the areas of epidemiology and evolution limit the possibilities for controlling the disease [24, 25].

Three main panzootics have occurred in the last century. The first one (1926 to 1960) was caused by viruses belonging to genotypes II, III and IV, while the second (1960 to 1973) and third (1970–1980) were caused by viruses of genotypes V–VI [14]. Severe outbreaks in Western and Southern Europe [26, 27], South Africa [28] and Taiwan [29] in the 1990s were caused by genotype VII, the currently circulating genotype in Asia, Africa and Europe [14]. A recent outbreak of NDV in South America (Venezuela) has also been attributed to a genotype VII virus, suggesting that viruses of this genotype are spreading worldwide [30, 31].

In 2010, infection by virulent NDV was confirmed in 80 countries, including infections of wild birds in Canada, Germany, Israel, Italy, Kenya, Mongolia and the USA, and infections in domestic poultry in countries of North and South America, Europe, Africa, and Asia [32]. Moreover, recent studies revealed the isolation of NDV in penguins from King George Island in the Antarctic region [33]. Detailed studies on the mode of evolution of these new NDV strains are relevant for inferring the evolutionary history of NDV. In order to gain insight into these matters, Bayesian coalescent studies were performed to investigate

the evolutionary rates, population dynamics and patterns of evolution of NDV.

Materials and methods

Sequences

Nucleotide sequences from NDV strains were obtained using ARSA from the DDBJ database (available at: <http://arsa.ddbj.nig.ac.jp/>). Strain names and accession numbers can be found in Supplementary Material Table 1.

Sequence alignment and *in silico* translation of nucleotide sequence

Sequences were aligned using the MUSCLE program [34]. Nucleotide sequences were translated to amino acids *in silico* using software from the MEGA 5 program [35].

Bayesian coalescent Markov chain Monte Carlo (MCMC) analysis

In order to gain insight into the evolutionary rate and mode of evolution of NDV strains, we used a Bayesian Markov MCMC approach as implemented in the BEAST package v.1.7.5 [36]. For strains included in these analyses, see Supplementary Material Table 1. First, software from the Datamonkey server [37] was used to identify the optimal evolutionary model that best fitted our sequence dataset. Akaike information criteria and the hierarchical likelihood ratio test indicated that the HKY + Γ model was the most accurate. Using this model and 50 million steps of MCMC, different population models were tested (constant population size, exponential population growth, expansion population growth, logistic population growth and Bayesian Skyline). Statistical uncertainty in the data was reflected by the 95 % highest probability density (HPD) values. Results were examined using the TRACER v1.5 program (available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) from the BEAST package. Convergence was assessed with ESS (effective sample size) values after a burn-in of 2 million steps. Models were compared by calculating the Bayes factor (BF) [38] from the posterior output of each of the models using the TRACER v1.5 program as explained on the BEAST website ([http://beast.bio.ed.ac.uk/Model comparison](http://beast.bio.ed.ac.uk/Model%20comparison)). A log BF (natural log units) values greater than 2.3 indicates strong evidence against the null model. The Bayesian skyline model was the best fit to the data. Maximum clade credibility trees were generated using the Tree Annotator program from the BEAST package and the FigTree program v1.4.1 (available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>) was used for the visualization of the annotated trees.

Bayesian skyline plots (BSPs) were used to infer how the effective population size has changed over time [38, 39].

Results

Mapping of amino acid substitutions found in the fusion proteins of NDV strains isolated in Antarctica

Previous studies have identified NDV strains isolated in Antarctica as class II strains [33]. In order to gain insight into the virulence status of these strains, partial F gene sequences from NDV isolates from Antarctica (positions 4502 to 4995 relative to NDV reference strain LaSota, accession number AF077761) were aligned with the corresponding sequences of members of nine genotypes of class II strains for which complete genome sequences had been determined. For names and accession numbers of NDV strains included in this analysis, see Supplementary Material Table 1. Once aligned, they were translated *in silico* to amino acids using the MEGA 5 program [35], and the results are shown in Figure 1.

The F protein cleavage-site sequence of NDV isolated in Antarctica is ¹¹²GKQGRLLI¹¹⁸, suggesting that the NDV strains isolated in that region of the world and included in

these studies are lentogenic strains. Nevertheless, more studies will be needed to address this issue. Moreover, no amino acid substitutions were found at positions 72, 74, 75, 78 and 79 of the F2 protein, which were previously shown to be involved in neutralization [15]. An N-linked glycosylation acceptor site (N-X-S/T, where X corresponds to any amino acid except aspartic acid or proline) at position 85-87 of the F2 protein is also conserved [9, 40], as are the cysteine residues at positions 25 and 76 of the F2 protein [41].

Bayesian coalescent analysis of NDV strains isolated in Antarctica

In order to determine the evolutionary rate and mode of evolution of the NDV population, we used a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) approach as implemented in the BEAST package [36]. In this case, the same F gene sequences from NDV strains isolated in Antarctica were aligned with corresponding sequences from 74 NDV strains, representing class I and genotypes I to XIX of class II strains. Names and accession numbers of NDV strains included in these analyses can be found in Supplementary Material Table 1. After performing the alignment and determining that the optimal evolutionary model is HKY + Γ, different population dynamic models were

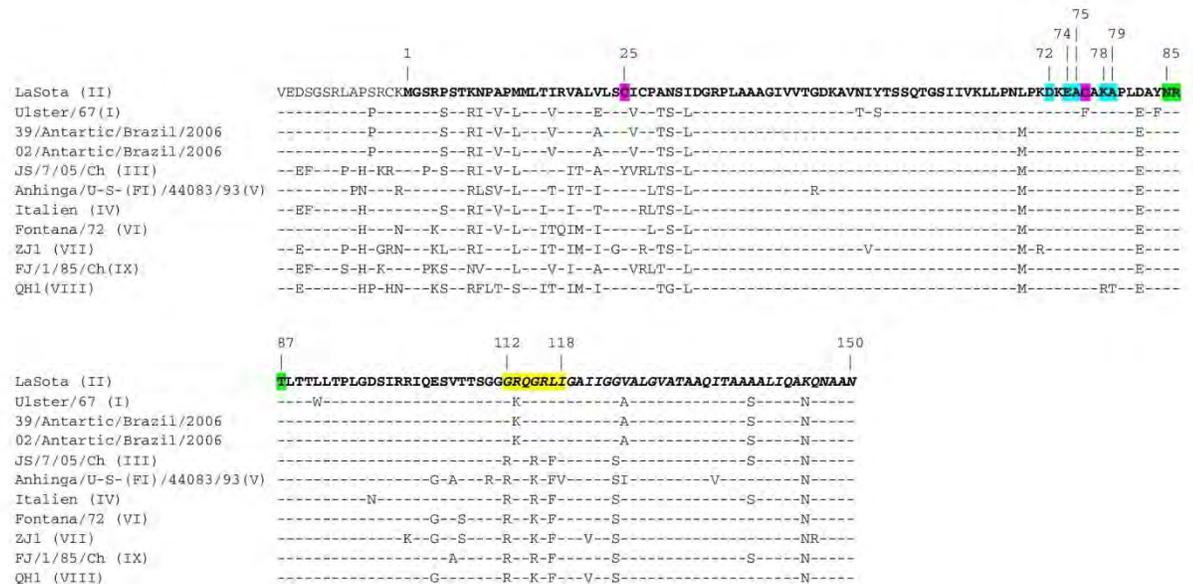


Fig. 1 Alignment of F amino acid sequences of NDV strains. Strain names are shown at the left side of the figure, and their class II genotype is indicated in parentheses. Identity to the LaSota strain (genotype II) is indicated by a dash. F2 sequences are shown in bold, and F1 sequences are shown in bold and italics. Numbers above the alignment indicate amino acid positions. The F protein cleavage site

is highlighted in yellow. Amino acid substitutions detected in antigenic sites in neutralization escape mutants are indicated in turquoise [5, 6, 13]. A potential acceptor site for N-linked glycosylation at residues 85-87 is highlighted in green [8]. Cysteine residues at positions 26 and 76, which are conserved among most NDV isolates, are highlighted in fuchsia [22]

tested. The results for 50 million steps of MCMC analysis, using the HKY + Γ model, a relaxed clock and the Bayesian skyline model [42] are shown in Table 1. A mean rate of 1.78×10^{-3} substitutions per site per year (s/s/y) was obtained for the F gene sequences of NDV strains used in these studies. A maximum clade credibility tree revealed that all class II genotype strains have evolved from ancestors that existed around 1883 (130 years before the most recent isolates included in these studies, see Fig. 2). Both classes of NDV strains evolved from ancestors that existed around 1819 (Table 1). Strains isolated in Antarctica and genotype I reference strain Ulster/67 diverged from ancestors around 1958 (Fig. 2). BSPs suggested that a constant effective population size was maintained until the late 1980s (Fig. 3), where a decline in the population is observed.

Discussion

NDV strains isolated from penguins in Antarctica were assigned to genotype I of class II (Fig. 2), in agreement with previous reports [33] and with antigenic studies of NDV isolated from penguins from Antarctica that showed a reaction against a monoclonal antibody raised against NDV Ulster/67 strain (genotype I) [43]. Viruses of this genotype have been associated with outbreaks in Australia that occurred between 1998 and 2000 [44]. Genotype I viruses from these same outbreaks were found to be velogenic, and previous reports have shown that the origin of these viruses can be traced back to low-virulence NDV strains circulating in waterfowl just prior to the outbreak [45].

NDV strains circulating in one particular avian species may have the ability to cause disease in other avian species. For example, NDV strains from pigeons have been reported to be responsible for outbreaks in chickens [46–48]. Moreover, virtually all domestic and wild bird species are susceptible to infection with NDV [49]. Therefore, although the possibility of direct contact between penguins and chickens seems unlikely, other wild birds may act as

carriers of different NDV strains through transmission routes that are not yet fully understood [19].

The presence of NDV strains in Antarctica, where other avian species live, indicates the importance of NDV strain characterization in all regions of the world. Genotypes V, VI, and VII of class II are currently circulating worldwide in chickens [20]. The role of Antarctica in maintaining other NDV genotypes not circulating at the moment also reinforces the relevance of in-depth NDV surveillance studies.

The F protein cleavage-site sequence has been shown to be a major determinant of NDV virulence [50]. The F protein cleavage sites of NDV strains isolated in Antarctica were found to have the consensus cleavage site of avirulent strains (Fig. 1). These cleavage sequences are insensitive to intracellular proteases and depend on extracellular secreted proteases for cleavage, limiting the replication of avirulent strains to the respiratory and enteric tracts [8–10]. More studies will be needed in order to confirm the avirulent (lentogenic) phenotype of NDV isolated from penguins in Antarctica.

Bayesian coalescent analysis revealed a rate of evolution of 1.78×10^{-3} s/s/y for NDV strains (see Table 1). This evolutionary rate is slightly higher than the rate estimated in a recent study for full-length NDV F gene sequences (1.35×10^{-3} s/s/y), although it lies within the confidence intervals of these estimations ($0.71 - 1.98 \times 10^{-3}$ s/s/y) [21]. This evolutionary rate is comparable to rates previously estimated for other fast-evolving RNA viruses such as human immunodeficiency virus type 1 (gp160env; 2.4×10^{-3} s/s/y) [51], human respiratory syncytial virus (G; 1.9×10^{-3} s/s/y) [52] and hepatitis C virus (E2; 3.4×10^{-3} s/s/y) [53].

The time of the most recent common ancestor (MRCA) was established to be around 1883 for all class II viruses (Fig. 2). This estimate is in agreement with previous reports that established the time of the MRCA for class II NDV strains to be around 1885 [21]. This finding is also in line with studies done by Macpherson in 1956, which suggest that a disease outbreak in domestic birds in

Table 1 Bayesian coalescent inference of Newcastle disease viruses

Group ^a	Parameter	Value ^b	HPD ^c	ESS ^d
F gene sequences	Log likelihood	-5576	-5595 to -5558	4010
	Posterior	-9101	-9055 to -9150	402
	Prior	-3525	-3573 to -3483	287
	Mean rate ^e	1.78×10^{-3}	9.22×10^{-4} to 2.56×10^{-3}	228
	Root age (years)	194	104 to 308	221
	MRCA ^f	1819	1705 to 1909	

^a See Supplementary Material Table 1 for strains included in this analysis. ^b In all cases, mean values are shown. ^c High probability density values. ^d Effective sample size. ^e Mean rate was calculated in substitutions/site/year. ^f Year of the most common recent ancestor

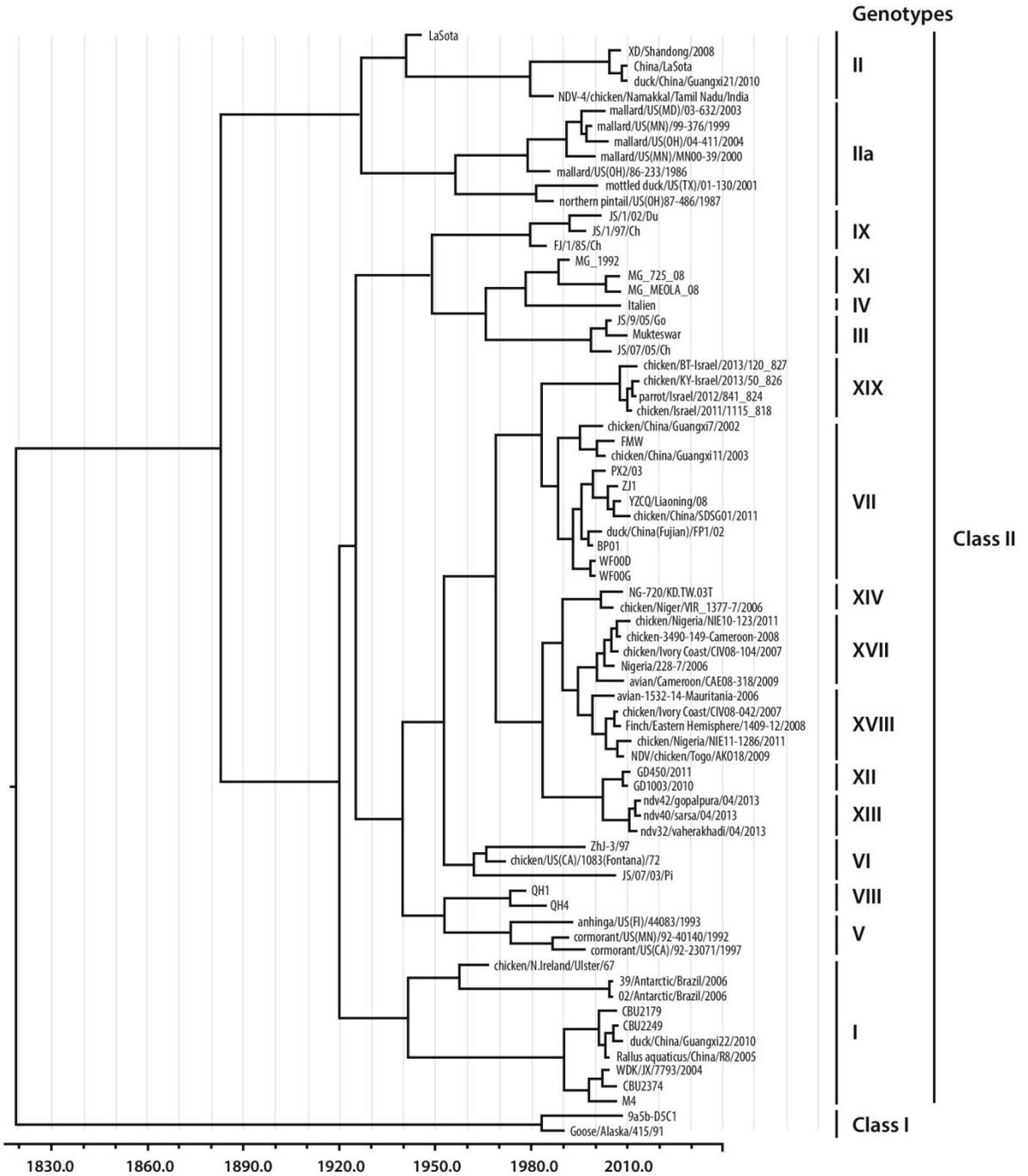


Fig. 2 Bayesian MCMC phylogenetic tree analysis of F genes of NDV strains. A maximum-credibility clade obtained using the HKY + Γ model, the Bayesian Skyline model and a relaxed clock (uncorrelated exponential) is shown. The tree is rooted to the MCRA.

Years are indicated on the x-axis. Strains are shown by name and their genotypes are indicated on the right side of the figure. Strains isolated in Antarctica are shown by black arrows

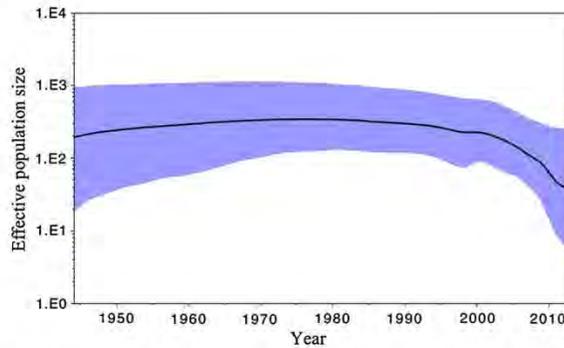


Fig. 3 Bayesian skyline plot depicting the population history of NDV strains. The *x*-axis indicates the year and the *y*-axis shows the product of effective population size and the generation length in years. The thick solid black line is the median estimate, and the blue area shows the 95 % highest probability density (HPD) values [38]

northwest Scotland between 1897 and 1898 was due to NDV [54].

In recent studies, Chong *et al.* have investigated the demographic history of NDV class II genotypes I–VII through Bayesian coalescent approaches, suggesting the maintenance of a constant effective population size until the late 1990s, when an abrupt decline with a posterior recovery (around 2000) was observed [21]. Roughly similar results were suggested by the analyses performed in the present study, which are summarized in a BSP supported by a narrow 95 % HPD (Fig. 3). Interestingly, the population dynamics observed in the last years of our analysis suggest a different behavior compared to what was reported previously, since a persistent continuous decrease in the effective population size was observed. This behavior can be explained by the larger number of class II genotypes considered in the present analysis (I–XIX), as distinct genotypes have been reported previously to exhibit different population dynamics [21]. Although the reasons for the observed decline are currently unknown, both climate change and avian influenza control measures have been suggested previously as possible factors [21]. More studies should be conducted in order to address these issues.

Considering that NDV seems to evolve rapidly towards higher virulence [55] and that several studies have reported not only increased pathogenicity but also outbreaks in vaccinated animals and increased host range [56, 57], it is becoming clear that it is important to conduct in-depth characterization of new strains isolated during the course of outbreaks worldwide to determine how these viruses are evolving. Additionally, studying viruses isolated from different wild birds and environments might contribute to our understanding of how NDV evolves and spreads around the world.

Acknowledgments We thank Instituto Antártico Uruguayo and Base Científica Antártica Artigas, Uruguay, for encouragement and support. We also thank Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) for support through project PE_ALI_2009_1_1603 and PEDECIBA, Uruguay.

References

- Samal SK (2011) Newcastle disease and related avian paramyxoviruses. In: Samal SK (ed) *The biology of paramyxoviruses*. Caister Academic Press, Norfolk, pp 69–114
- Lamb R, Parks G (2007) Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds) *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1449–1496
- Kim LM, King DJ, Curry PE et al (2007) Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle Disease Viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J Virol* 81:12641–12653
- Alexander DJ (2003) Newcastle disease virus, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (eds) *Disease of poultry*, 11edn. Iowa State University Press, Ames, pp 63–87
- Toyoda T, Gotoh B, Sakaguchi T, Kida H, Nagai Y (1988) Identification of amino acids relevant to three antigenic determinants on the fusion protein of Newcastle disease virus that are involved in fusion inhibition and neutralization. *J Virol* 62:4427–4430
- Neyt C, Geliebter J, Slaoui M, Morales D, Meulemans G, Burny A (1989) Mutations located on both F1 and F2 subunits of the Newcastle Disease virus fusion protein confer resistance to neutralization with monoclonal antibodies. *J Virol* 63:952–954
- Nagai Y, Hamaguchi M, Toyoda T (1989) Molecular biology of Newcastle disease virus. *Prog Vet Microbiol Immunol* 5:16–64
- Samal S, Khattar S, Kumar S, Collins PL, Samal SK (2012) Coordinate deletion of N-glycans from the heptad repeats of the fusion F protein of Newcastle Disease virus yields a hyperfusogenic virus with increased replication, virulence, and immunogenicity. *J Virol* 86:2501–2511
- Panda A, Huang Z, Elnankumaran S, Rockemann DD, Samal SK (2004) Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb Pathog* 36:1–10
- De Leeuw OS, Koch G, Hartog L, Ravenshorst N, Peeters BPH (2005) Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin–neuraminidase protein. *J Gen Virol* 86:1759–1769
- Choi KS, Lee EK, Jeon WJ, Kwon JH (2010) Antigenic and immunogenic investigation of the virulence motif of the Newcastle disease virus fusion protein. *J Vet Sci* 11:205–211
- Pedersen JC, Senne DA, Woolcock PR, Kinde H, King DJ, Wise MG, Panigrahy B, Seal BS (2004) Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002–2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J Clin Microbiol* 42:2329–2334
- Yusoff K, Nesbit M, McCartney H, Meulemans G, Alexander DJ, Collins MS, Emmerson PT, Samson AC (1989) Location of neutralizing epitopes on the fusion protein of Newcastle disease virus strain Beaudette C. *J Gen Virol* 70:3105–3109
- Maminaiina OF, Gil P, Briand FX et al (2010) Newcastle Disease Virus in Madagascar: identification of an original genotype

- possibly deriving from a died out ancestor of genotype IV. *PLoS ONE* 5:e13987
15. Mase M, Murayama K, Karino A, Inoue T (2010) Analysis of the fusion protein gene of Newcastle Disease viruses isolated in Japan. *J Vet Med Sci* 73:47–54
 16. Czeglédi A, Ujvári D, Somogyi E, Wehmann E, Werner O, Lomniczi B (2006) Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res* 120:36–48
 17. Diel DG, da Silva LH, Liu H, Wang Z, Miller PJ, Afonso CL (2012) Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect Genet Evol* 12:1770–1779
 18. Fernandes CC, Varanib AM, Lemos EGM, de Miranda VFO, Silva KR, Fernando FS, Montassiera MFS, Montassiera HJ (2014) Molecular and phylogenetic characterization based on the complete genome of a virulent pathotype of Newcastle disease virus isolated in the 1970s in Brazil. *Infect Genet Evol* 26:160–167
 19. Snoeck CJ, Owoade AA, Couacy-Hymann E, Alkali BR, Okwen MP, Adeyanju AT, Komoyo GF, Nakouné E, Le Faou A, Muller CP (2013) High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: cocirculation of genotype and newly defined genotypes XVII and XVIII. *J Clin Microbiol* 51:2250–2260
 20. Xiao S, Paldurai A, Nayak B, Mirande A, Collins PL, Samal SK (2013) Complete genome sequence of a highly virulent Newcastle disease virus currently circulating in Mexico. *Genome Announc*. doi:10.1128/genomeA.00177-12
 21. Chong YL, Padhi A, Hudson PJ, Poss M (2010) The effect of vaccination on the evolution and population dynamics of avian paramyxovirus-1. *PLoS Pathog* 6:e1000872
 22. Rui Z, Juan P, Jingliang S, Jixun Z, Xiaoting W, Shouping Z, Xiaojiao L, Guozhong Z (2010) Phylogenetic characterization of Newcastle disease virus isolated in the mainland of China during 2001–2009. *Vet Microbiol* 141:246–257
 23. Zhang S, Wang X, Zhao C, Liu D, Hu Y, Zhao J, Zhang G (2011) Phylogenetic and pathotypical analysis of two virulent Newcastle disease viruses isolated from domestic ducks in China. *PLoS ONE* 6:e25000
 24. Susta L, Miller PJ, Afonso CL, Brown CC (2011) Clinicopathological characterization in poultry of three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks. *Vet Pathol* 48:349–360
 25. Afonso CL, Miller PJ (2013) Newcastle disease: progress and gaps in the development of vaccines and diagnostic tools. *Dev Biol* 135:95–106
 26. Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J et al (1998) Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol* 143:49–64
 27. Herczeg J, Wehmann E, Bragg RR, Travassos-Dias PM, Hadjiev G, Werner O, Lomniczi B (1999) Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. *Arch Virol* 144:2087–2099
 28. Abolnik CHR, Bisschop SP, Parker ME, Romito M, Viljoen GJ (2004) A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggests epidemiological origins in the Far East. *Arch Virol* 149:603–619
 29. Yang CY, Shieh HK, Lin YL, Chang PC (1999) Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in western Europe. *Avian Dis* 43:125–130
 30. Perozo F, Marciano R, Afonso CL (2012) Biological and phylogenetic characterization of a genotype VII Newcastle disease virus from Venezuela: efficacy of field vaccination. *J Clin Microbiol* 50:1204–1208
 31. Diel DG, Susta L, Garcia SC, Killian ML, Brown C, Miller PJ, Afonso CL (2012) Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. *J Clin Microbiol* 50:378–387
 32. OIE (2011) World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. <http://web.oie.int>
 33. Thomazelli LM, Araujo J, Oliveira DB et al (2010) Newcastle disease virus in penguins from King George Island on the Antarctic region. *Vet Microbiol* 146:155–160
 34. Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinform* 5:113
 35. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
 36. Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214
 37. Delpont W, Poon AF, Frost SD, Kosakovsky-Pond SL (2010) Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26:2455–2457
 38. Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4:e88
 39. Suchard MA, Weiss RE, Sinsheimer JS (2001) Bayesian selection of continuous time Markov chain evolutionary models. *Mol Biol Evol* 18:1001–1013
 40. Paldurai A, Kumar S, Nayak B, Samal SK (2010) Complete genome sequence of highly virulent neurotropic Newcastle disease virus strain Texas GB. *Virus Genes* 41:67–72
 41. Seal BS (2004) Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. *Funct Integr Genomics* 4:246–257
 42. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22:1185–1192
 43. Alexander DJ, Manvell RJ, Collins MS, Brockman SJ, Westbury HA, Morgan I, Austin FJ (1989) Characterization of paramyxoviruses isolated from penguins in Antarctica and sub-Antarctica during 1976–1979. *Arch Virol* 109:135–143
 44. Gould AR, Kattenbelt JA, Selleck P, Hansson E, Della-Porta A, Westbury HA (2001) Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998–2000. *Virus Res* 77:51–60
 45. Kattenbelt JA, Stevens MP, Gould AR (2006) Sequence variation in the Newcastle disease virus genome. *Virus Res* 116:168–184
 46. Alexander DJ (1998) Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, pp 156–163
 47. Alexander DJ (1997) Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In: Calnek BW (ed) Diseases of poultry. Mosby-Wolfe Iowa State University Press, Ames, pp 541–569
 48. Werner O, Römer-Oberdörfer A, Köllner B, Manvell RJ, Alexander DJ (1999) Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996. *Avian Pathol* 28:79–88
 49. Alexander DJ, Senne DA (2008) Newcastle disease. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (eds) Diseases of poultry, 12th edn. Blackwell Publishing, Ames, pp 75–100
 50. Wakamatsu N, King DJ, Seal BS, Peeters BP, Brown CC (2006) The effect on pathogenesis of Newcastle disease virus LaSota

- strain from a mutation of the fusion cleavage site to a virulent sequence. *Avian Dis* 50:483–488
51. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BBH, Wolinsky S, Bhattacharya T (2000) Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288:1789–1796
 52. Zlateva KT, Lemey P, Moes E, Vandamme AM, Van Ranst M (2005) Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol* 79:9157–9167
 53. Allain JP, Dong Y, Vandamme AM, Moulton V, Salemi M (2000) Evolutionary rate and genetic drift of hepatitis C virus are not correlated with the host immune response: studies of infected donor–recipient clusters. *J Virol* 74:2541–2549
 54. Macpherson LW (1956) Some observations on the epizootiology of New Castle Disease. *Can J Comp Med Vet Sci* 20:155–168
 55. Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL (2009) Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect Genet Evol* 10:26–35
 56. Nakamura K, Ohtsu N, Nakamura T, Yamamoto Y, Yamada M, Mase M, Imai K (2008) Pathologic and immunohistochemical studies of Newcastle disease (ND) in broiler chickens vaccinated with ND: severe nonpurulent encephalitis and necrotizing pancreatitis. *Vet Pathol* 45:928–933
 57. Wan H, Chen L, Wu L, Liu X (2004) Newcastle disease in geese: natural occurrence and experimental infection. *Avian Pathol* 33:216–221



Naturally occurring NS3 resistance-associated variants in hepatitis C virus genotype 1: Their relevance for developing countries



Natalia Echeverría^{a,1}, Gabriela Betancour^{a,1}, Fabiana Gámbaro^a, Nelia Hernández^b, Pablo López^b, Daniela Chiodi^b, Adriana Sánchez^b, Susana Boschi^c, Alvaro Fajardo^a, Martín Söhnora^a, Gonzalo Moratorio^a, Juan Cristina^a, Pilar Moreno^{a,*}

^a Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay

^b Clínica de Gastroenterología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11600 Montevideo, Uruguay

^c Laboratorio de Biología Molecular, Asociación Española, Palmar 1465, Montevideo, Uruguay, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2016

Received in revised form 15 July 2016

Accepted 18 July 2016

Available online 19 July 2016

Keywords:

HCV variability

DAAs

Resistance-associated variants

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of global morbidity and mortality, with an estimated 130–150 million infected individuals worldwide. HCV is a leading cause of chronic liver diseases including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Current treatment options in developing countries involve pegylated interferon- α and ribavirin as dual therapy or in combination with one or more direct-acting antiviral agents (DAA). The emergence of resistance-associated variants (RAVs) after treatment reveals the great variability of this virus leading to a great difficulty in developing effective antiviral strategies. Baseline RAVs detected in DAA treatment-naïve HCV-infected patients could be of great importance for clinical management and outcome prediction. Although the frequency of naturally occurring HCV NS3 protease inhibitor mutations has been addressed in many countries, there are only a few reports on their prevalence in South America. In this study, we investigated the presence of RAVs in the HCV NS3 serine protease region by analysing a cohort of Uruguayan patients with chronic hepatitis C who had not been treated with any DAAs and compare them with the results found for other South American countries. The results of these studies revealed that naturally occurring mutations conferring resistance to NS3 inhibitors exist in a substantial proportion of Uruguayan treatment-naïve patients infected with HCV genotype 1 enrolled in these studies. The identification of these baseline RAVs could be of great importance for patients' management and outcome prediction in developing countries.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a significant human pathogen affecting nearly 3% of the world's population, and is a leading cause of chronic liver diseases including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Infections with HCV have become a major cause of liver cancer and one of the most common indications for liver transplantation (Hoofnagle, 2002; Martin et al., 2013; Pawlotsky, 2003; Simmonds, 2004; World Health Organization, 2015).

HCV belongs to the family *Flaviviridae* and has a single stranded positive sense RNA genome that is 9.6 kb in length. This genome

contains a single open-reading frame and encodes a unique polyprotein that is processed to yield ten structural (core, E1 and E2) and non-structural (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B) proteins (Scheel and Rice, 2013).

The high error rate of the viral RNA-dependent RNA-polymerase and the pressure exerted by the host immune system, have driven the evolution of HCV towards the development of a global diversity that reveals the existence of seven genetic lineages (genotypes 1–7) and more than 67 subtypes (Smith et al., 2014). Subtypes 1a, 1b and 3a are widely distributed and account for the vast majority of infections in Western countries including the South American region (World Health Organization, 2015).

HCV NS3 protein is responsible for processing the non-structural region of the viral polyprotein. NS3 is a bifunctional protein with an amino-terminal domain exhibiting a zinc-dependent serine protease activity, and a carboxyl-terminal one with helicase activity (Bartenschlager and Lohmann, 2000).

* Corresponding author at: Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Mataojo 2055, 11400 Montevideo, Uruguay.

E-mail address: pmoreno@cin.edu.uy (P. Moreno).

¹ both authors contributed equally to this work.

With the advent of direct antiviral agents (DAAs) for the treatment of HCV infections, there is a need to monitor the emergence of resistance-associated variants before and after treatment (Fonseca-Coronado et al., 2012). Although the most recent DAAs increase response rates and allow shortened and simplified regimens, the emergence of genetic variants that could induce changes in the drug binding properties of these compounds, and by doing so, generate resistant phenotypes, is a matter of concern and may jeopardize the effectiveness of DAAs (Wyles, 2013). These resistance-associated variants (RAVs) usually emerge after a few days of DAA treatment and have been accounted responsible for the failure or hyporesponsiveness to treatment. Moreover, they can also be detected in HCV-infected treatment-naïve patients (Applegate et al., 2015).

The circulation of DAAs resistance mutations in treatment-naïve patients has not been reported in depth in South America, with the exception of Brazil (de Carvalho et al., 2014; Lisboa-Neto et al., 2015; Peres-da-Silva et al., 2012; Zeminian et al., 2013) and Argentina (Sede et al., 2015).

It is extremely important for low income countries, like Uruguay and other South American countries, to determine the presence of naturally occurring RAVs prior to the incorporation of these expensive DAAs regimens to treat HCV-infected patients.

In this study, we investigated the presence of resistance variants to protease inhibitors (PIs) in the HCV NS3 serine protease region, by analysing a cohort of Uruguayan patients with chronic hepatitis C who had not been treated with any DAAs.

2. Materials and methods

2.1. Patients and clinical samples

Serum samples were obtained from 20 patients with serological markers for HCV which attended either the Hospital de Clínicas or the Asociación Española (Montevideo, Uruguay). All of the patients were DAA treatment-naïve at the time of blood extraction. Written informed consent was obtained from all patients. The studies have been performed according to the World Medical Association Declaration of Helsinki and approved by appropriate institutional boards.

2.2. RNA extraction, cDNA synthesis and NS3 amplification

Viral RNA was extracted from serum using the QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN). cDNA synthesis and PCR amplification of the complete NS3 genome region was carried out as previously described (Chusri et al., 2015; Vicenti et al., 2012). Amplicons were purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Lifescience).

2.3. NS3 sequencing

Full-length NS3 sequencing was performed by Macrogen, Korea, with previously described primers (Vicenti et al., 2012).

2.4. NS3 genotype determination and sequence analysis

HCV NS3 sequences obtained from Uruguayan patients were aligned with sequences from strains corresponding to representatives of all HCV genotypes, isolated in different geographic regions of the world. Sequences were obtained from Los Alamos HCV Sequence database (Kuiken et al., 2005). For strains enrolled in these studies, see Supplementary material Table S1. Sequences were aligned using the CLUSTAL W software (Thompson et al., 1994). Once aligned, the best evolutionary model that described our sequence data was assessed using Modelgenerator program (Keane et al., 2006). Using the T92 plus gamma plus invariant sites model,

Maximum Likelihood Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 5.0 software (Tamura et al., 2011). As a measure of the robustness of each node, we employed the bootstrapping method (500 pseudo-replicates).

In order to properly identify substitution changes in NS3 region from HCV strains circulating in Uruguayan patients, we generated consensus sequences for 1a and 1b subtypes using a wide range of NS3 sequences from HCV strains isolated from all regions of the world. For this purpose, we downloaded 110 genotype 1a and 100 genotype 1b NS3 sequences from Los Alamos HCV Sequence database (Kuiken et al., 2005) and aligned them using the CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994). Once aligned, we generated each genotype consensus sequence by using the Lasergene application SeqMan, Version 7.0.0 (DNASTAR, Madison, WI), and each NS3 sequence derived from Uruguayan patients was compared to the corresponding generated consensus sequence in order to determine the substitutions present.

2.5. Signature pattern analysis of HCV genotype 1a

Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis (VESPA) identifies particular sites in amino acid or nucleic acid alignments of a set of sequences that are distinctly represented between a query set and a background set (Korber and Myers, 1992). The query set included 26 sequences corresponding to HCV NS3 region subtype 1a isolated in South America (Brazil and Uruguay). The background set included 146 sequences corresponding to HCV NS3 region subtype 1a isolated elsewhere, which were downloaded from Los Alamos HCV Sequence Database (Kuiken et al., 2005).

2.6. Mapping amino acid substitutions in NS3 3D structure

The crystallographic structure of HCV NS3 protein was determined by Schiering, and co-workers (Schiering et al., 2011) and deposited in the Protein Data Bank (PDB) under accession ID: 4A92. In order to map amino acid substitutions found in Uruguayan strains, crystallographic data were imported from PDB database and amino acids substitutions found in HCV NS3 protein from Uruguayan patients were mapped using Pymol (Seeliger and De Groot, 2010).

3. Results

3.1. Genetic variability of NS3 genes from HCV circulating in uruguayan patients

To gain insight into the genetic variability of NS3 region of HCV strains circulating in Uruguayan patients, sequences of this region were aligned with corresponding sequences from 59 HCV strains isolated elsewhere, representing all genotypes and main subtypes. For strains included in these analyses, see Supplementary material Table S1. Once aligned, maximum likelihood phylogenetic trees were generated. The results of these studies are shown in Fig. 1.

All strains in the tree are assigned according with their genotype and each cluster is supported by very high Bootstrap values (see Fig. 1). All the strains isolated from Uruguayan patients (n = 20) were assigned to genotype 1 (15 are subtype 1a and 5 are subtype 1b, see Fig. 1).

3.2. NS3 substitution analysis

In order to study the amino acid substitutions in NS3 protein, NS3 sequences obtained from all patients enrolled in this study were aligned using the CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994) and amino acid substitutions at positions previously found to be potentially associated with resistance to both first and second

Table 1
Amino acids substitutions in HCV NS3 protein from DAA treatment-naïve patients.

Isolate	Subtype	Residue	Wild type	Variant	Resistance to DAA
002	1a	80	Q	K	Simeprevir
		122	S	G	Simeprevir
		334	P	S	Paritaprevir
003	1a	334	P	S	Paritaprevir
955	1a	55	V	A	Boceprevir/Telaprevir
996	1a	80	Q	K	Simeprevir
		122	S	G	Simeprevir
		334	P	S	Paritaprevir
1018	1a	80	Q	L	Simeprevir/Paritaprevir
1019	1a	334	P	S	Paritaprevir
4	1b	342	S	P	Paritaprevir
10	1b	122	S	R	Simeprevir

^a Emergent substitutions in some relapsers and non-responders to OBV, PTV and DSV with or without RBV.

generation protease inhibitors were identified. The results of these studies are shown in Table 1.

In general there was a notable conservation of the catalytic triad, which consists of histidine, aspartic acid and serine residues at positions 57, 81 and 139, respectively, as well as a high conservation in residues that make up the zinc binding site (residues 97, 99, 145 and 149). However, substitutions that confer resistance to both first and second generation protease inhibitors were observed (see Table 1).

RAVs to protease inhibitors were identified in HCV isolates from 5 patients (25% of the patients enrolled in these studies). Of these, 3 patients showed only one mutation associated to DAAs resistance, while the other two showed two different mutations (Q80 K and S122G) (see Table 1). The mutation Q80 K, conferring resistance to simeprevir (SMV), asunaprevir (ASV) and paritaprevir (PTV), as well as to grazoprevir (GZV), and faldaprevir (FDV) was found in two patients, and an additional one has the mutation Q80L which is associated to PTV and FDV intermediate resistance. Three patients had substitutions at position 122 (S122G/R), RAVs associated to SMV resistance, and only one showed the V55A substitution which confers resistance to both boceprevir (BOC) and telaprevir (TVR). Three patients also exhibited the substitutions P334S or S342P, which were reported to emerge in some relapsers and non-responder patients to therapy including PTV (Halfon and Locarnini, 2011; Wyles, 2013; Zhang, 2016) (see Table 1).

We also found several polymorphisms not associated, *a priori*, with resistance to DAAs (See Supplementary material Table S2). We found 49 amino acid substitutions in strains of subtype 1a and 42 substitutions in those of subtype 1b. To our knowledge, none of these changes have been previously associated with a resistant phenotype.

3.3. Viral epidemiology signature pattern analysis

In order to test if NS3 sequences from HCV strains isolated in South America have a particular sequence signature that could indicate the result of the local variation observed, a signature pattern analysis was performed to assess viral sequence relatedness.

We analysed a dataset of NS3 sequences from HCV strains circulating in South America (query dataset), and compared them to NS3 sequences from strains isolated elsewhere (background dataset). This study allowed us to identify particular sites in amino acid alignments that are distinctly represented between our query and background datasets. The results of these studies are shown in Fig. 2.

This analysis revealed four sites with significant different amino acid (AA) frequencies (positions 386, 418, 557 and 615), from which only AA position 418 showed a significant variation between HCV NS3 sequences from strains isolated in South America and strains isolated in the rest of the world ($p = 1.863 \times 10^{-6}$, Fisher's exact

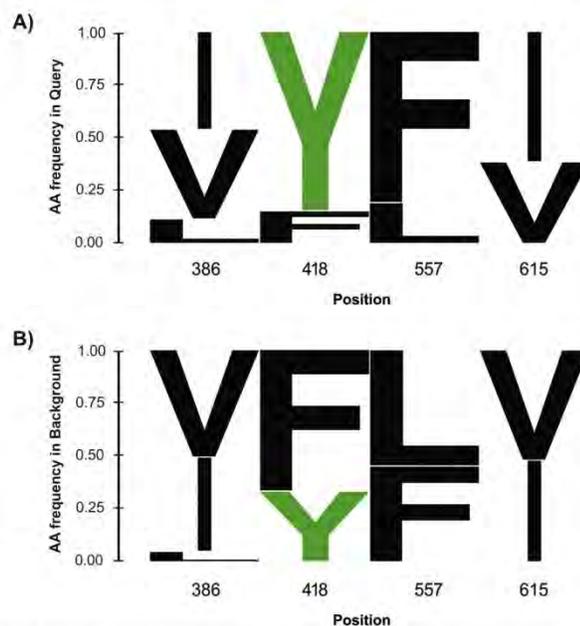


Fig. 2. Weblogo representation of the Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis (VESPA). The height of each amino acid in each position indicates its frequency. The four positions shown represent those NS3 amino acid positions for which a difference in frequencies was observed between the query (A) and the background datasets (B). The tyrosine in position 418 is shown in green. This schematic representation was generated using WebLogo 3 application (Crooks et al., 2004).

test) (see Fig. 2). In this position, 84% of the South American strain sequences have a tyrosine (Y), which is in contrast to the observed pattern within the background dataset, where only 32% exhibit a Y and the majority (66%) of the sequences included exhibits a phenylalanine (F) (Fig. 2).

3.4. Mapping amino acid substitutions found in NS3 HCV strains isolated in Uruguay

As an initial approach to identify if other AA substitutions with no known resistance activity found in HCV NS3 protease from Uruguayan strains could lead to possible structural changes in NS3 protein, we mapped those substitutions in the 3D structure model of the NS3 protein of HCV. The results of these studies are shown in Fig. 3.

Most of the substitutions found are located on the surface of the protein (Fig. 3A) and do not seem to interfere with the active site of the NS3 protein (H57/D81/S139 in NS3 numbering). Importantly, these substitutions do not appear to be close enough to affect the drug binding pocket (*i.e.* residues within 3 Å of the drug molecule that bind to the active site). Substitutions V58 G and H79D might represent an exception to this finding since both map in the vicinity of the catalytic triad (Fig. 3B).

Additionally, substitutions T98S, A150V and V151A map near residues involved in zinc-binding interactions (Supplementary material Fig. S1), so it could be possible that these mutations may affect this union.

Interestingly, substitution T550A, found in one Uruguayan strain, was recently related to APOBEC3G union. It would be interesting to evaluate in further studies, if changes in residues involved in APOBEC3G interaction could protect HCV from the replication inhibition exerted by this enzyme (Zhu et al., 2015).

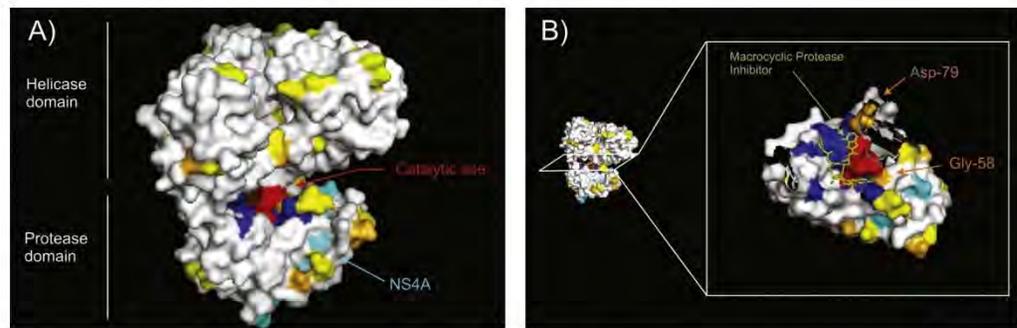


Fig. 3. Mapping of naturally occurring amino acid substitutions in NS3 protein from HCV strains isolated in Uruguay. The 3D structure model of the HCV NS3 protein shown in the figure was obtained by Schiering et al. (2011). Amino acids involved in the NS3 active site are shown in red and residues known to affect resistance to PI are shown in blue (including those found in this work). All other substitutions found in this study are shown in yellow for subtype 1a and in orange for subtype 1b strains. In A) the surface of the complete protein complexed with NS4A (in cyan) is shown indicating the catalytic site. In B) a cross-section of the protease domain complexed with a macrocyclic protease inhibitor (in lime) is shown. Sites that might interfere with the drug-binding properties given their proximity to the catalytic site are highlighted in orange.

4. Discussion

The introduction of protease inhibitors constitutes one of the major breakthroughs in HCV treatment. However, the emergence of resistance variants to those inhibitors constitutes an important challenge to the development of suitable anti-HCV therapies.

In this study, we established for the first time the genetic heterogeneity and the frequency of naturally occurring resistant mutations in full-length HCV NS3 protease sequences isolated from 20 Uruguayan patients, chronically infected with HCV, naïve to DAAs treatment (Fig. 1).

AA substitutions such as Q80K, Q80L, S122G, S122R and V55A associated with HCV genotype 1 PI resistance *in vivo* and *in vitro* were observed in 25% of our patients (5/20) (Table 1). To our knowledge this is the first report of circulation of RAVs in Uruguay. Recent studies, both analysing sequences retrieved from the Los Alamos databank as well as from GenBank, revealed that the overall prevalence of RAVs to NS3 protease inhibitors is high (40%), with most of the mutations being associated mainly to SMV resistance through the substitution Q80K, present in around 35–37% of genotype 1a strains (Alves et al., 2013; Chen et al., 2016). Opposite to these findings, RAVs to PI seem to be less frequent in genotype 1b strains (Chen et al., 2016; Costantino et al., 2015; Paolucci et al., 2012). Nevertheless, little is known about DAA RAVs circulation in the South American region. In Brazil, different studies have found that between 3.2% and 18.9% of DAA treatment-naïve patients harboured HCV isolates with baseline RAVs (de Carvalho et al., 2014; Lisboa-Neto et al., 2015; Peres-da-Silva et al., 2012; Zeminian et al., 2013). Studies carried out in Argentina revealed that only one RAV (Q80K/L/R) was predominant in two out of 18 patients (Sede et al., 2015). The results of this study indicate the presence of DAA RAVs in 25% of the DAA treatment-naïve patients analysed, which suggests that the frequency of such mutations seems to be high in our country (Table 1). In reference to Q80K, a mutation associated with resistance to SMV, it has been found at a high prevalence among treatment-naïve HCV carriers in the United States (46%) and in Europe (4–16%) (Nishiya et al., 2014; Vidal et al., 2016). In contrast, the frequency of Q80K seems to be a rare event in Brazil (Hoffmann et al., 2015; Lisboa-Neto et al., 2015; Nishiya et al., 2014; Peres-da-Silva et al., 2012; Zeminian et al., 2013). On the contrary, the results of the present work suggest that the presence of Q80K is high when compared to Brazil or Argentina (de Carvalho et al., 2014; Lisboa-Neto et al., 2015; Peres-da-Silva et al., 2012; Sede et al., 2015; Zeminian et al., 2013). More studies will be needed in order to address this important issue.

To date, the only drugs currently approved for triple therapy (in combination with IFN and RBV) in Uruguay are TVR and BOC, and even though their production has been worldwide discontinued, they are still available for Uruguayan patients. Although SMV and other macrocyclic drugs have not yet been approved in Uruguay, the data obtained here might prove useful if these drugs are eventually approved in this country. Recently, Uruguay approved a new therapy that involves three DAAs (with or without RBV): Ombitasvir (OBV), PTV and Dasabuvir (DSV), which target the NSSA, NS3 and NS5B, respectively. In the Uruguayan isolates analysed, the only RAV found conferring resistance to PTV was Q80L. However two emerging substitutions (P334S and S342P) were also detected (see Table 1). Considering these data, it is of uttermost importance to address the identification of RAVs in NSSA and NS5B regions in these patients, in order to provide comprehensive information to physicians and help in therapeutic decisions.

Moreover, several other polymorphisms not associated, *a priori*, with resistance to DAAs were observed (Supplementary material Table S2). Mapping these positions in the three-dimensional structure of NS3 showed that the vast majority of these substitutions would apparently affect neither the catalytic triad nor residues involved in the zinc-binding domain (Fig. 3). More studies will be needed to confirm the possible effects of these substitutions, in particular for substitutions V58G and H79D (Fig. 3B), which indeed map close to the catalytic triad, and since they involve changes in the physicochemical properties of the AA, they might affect the 3D structure of the binding pocket (Fig. 3).

The results of the Signature Pattern Analysis showed the presence of an AA signature in NS3 region of HCV subtype 1a strains circulating in the South American region. These substitutions may be characteristic of this geographic region, which in turn might indicate a local diversification of HCV (Fig. 2). A tyrosine (Y) was found in most of the South American isolates in position 418, whereas a leucine (L) was present in the majority of the background dataset sequences. These two amino acids have different physicochemical properties (Y is hydrophilic and L hydrophobic). More studies will be needed in order to address the possible effects of this substitution in the NS3 structure of these HCV genotype 1a strains.

In conclusion, the results of these studies revealed the presence of RAVs in the NS3 region of HCV patients who have not been treated with PI. It is worth mentioning that these results, concerning drug-resistant mutants pre-existing in HCV populations, follow the same pattern previously described for HIV-1 (Domingo et al., 2012), another RNA virus, for which it has long been recognized the existence of baseline mutations conferring decreased susceptibil-

ity to antivirals (Nájera et al., 1994), and even its association with reduced treatment efficacy (Johnson et al., 2008).

Thus, the incidence and persistence of protease resistance mutations occurring in HCV from chronically infected patients in Uruguay should be considered when using PI to treat HCV infection. Due to the fact that the use of DAAs is expensive for Latin American countries, and that they have only become recently available as therapeutic options, we believe that it is vital for our region to be aware of the baseline resistance levels found in each country's isolates. It is important to note that the results obtained in this study highlight the relevance of evaluating the situation in every country of the world in relation to RAVs to DAAs prior to treatment, since each country could have its own pattern of substitutions and frequencies, which might differ from other regions of the world and even from neighbouring countries

Acknowledgments

This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) [project FMV.1.2014.1.104171], PEDECIBA, Comisión Académica de Posgrados, Universidad de la República (UdelAR) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdelAR, Uruguay.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.07.008>.

References

- Alves, R., Queiroz, A.T.L., Pessoa, M.G., Da Silva, E.F., Mazo, D.F.C., Carrilho, F.J., Carvalho-Filho, R.J., De Carvalho, I.M.V.G., 2013. The presence of resistance mutations to protease and polymerase inhibitors in Hepatitis C virus sequences from the Los Alamos databank. *J. Viral Hepat.* 20, 414–421. <http://dx.doi.org/10.1111/jvh.12051>.
- Applegate, T.L., Gaudieri, S., Plauzollas, A., Chopra, A., Grebely, J., Lucas, M., Hellard, M., Luciani, F., Dore, G.J., Matthews, G.V., 2015. Naturally occurring dominant drug resistance mutations occur infrequently in the setting of recently acquired hepatitis C. *Antivir. Ther.* 20, 199–208. <http://dx.doi.org/10.3851/IMP2821>.
- Bartenschlager, R., Lohmann, V., 2000. Replication of the hepatitis C virus. *Baillière's Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 14, 241–254. <http://dx.doi.org/10.1053/bega.1999.0073>.
- Chen, Z., Li, H., Ren, H., Hu, P., 2016. Global prevalence of pre-existing HCV variants resistant to direct-acting antiviral agents (DAAs): mining the GenBank HCV genome data. *Sci. Rep.* 6, 20310. <http://dx.doi.org/10.1038/srep20310>.
- Chusri, P., Kumthip, K., Pantip, C., Thongsawat, S., O'Brien, A., Maneeekarn, N., 2015. Influence of amino acid variations in the NS3 NS4A and NS4B of HCV genotypes 1a, 1b, 3a, 3b and 6f on the response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy. *Virus Res.* 196, 37–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.003>.
- Costantino, A., Spada, E., Equestre, M., Bruni, R., Tritarelli, E., Coppola, N., Sagnelli, C., Sagnelli, E., Ciccaglione, A.R., 2015. Naturally occurring mutations associated with resistance to HCV NS5B polymerase and NS3 protease inhibitors in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Virology* 12, 186. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0414-1>.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., Brenner, S.E., 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.849004>.
- Domingo, E., Sheldon, J., Perales, C., 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 159–216. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.05023-11>.
- Fonseca-Coronado, S., Escobar-Gutiérrez, A., Ruiz-Tovar, K., Cruz-Rivera, M.Y., Rivera-Osorio, P., Vazquez-Pichardo, M., Carpio-Pedroza, J.C., Ruiz-Pacheco, J.A., Cazares, F., Vaughan, G., 2012. Specific detection of naturally occurring hepatitis C virus mutants with resistance to telaprevir and boceprevir (protease inhibitors) among treatment-naïve infected individuals. *J. Clin. Microbiol.* 50, 281–287. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05842-11>.
- Halfon, P., Locarnini, S., 2011. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J. Hepatol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.01.011>.
- Hoffmann, L., Faffe, D.S., Lima, J.F.C., Capitano, T.A., Cabral, B.C.A., Ürményi, T.P., Coelho, H.S.M., Rondinelli, E., Villela-Nogueira, C.A., Silva, R., 2015. No correspondence between resistance mutations in the HCV-NS3 protease at baseline and early telaprevir-based triple therapy. *BBA Clin.* 3, 146–151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.01.004>.
- Hoofnagle, J.H., 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, <http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2002.36227>.
- Johnson, J.A., Li, J.F., Wei, X., Lipscomb, J., Irlbeck, D., Craig, C., Smith, A., Bennett, D.E., Monsour, M., Sandstrom, P., Lanier, E.R., Heneine, W., 2008. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med.* 5, 1112–1122. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0050158>.
- Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J., McInerney, J.O., 2006. Assessment of methods of amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol. Biol.* 6, 29.
- Korber, B., Myers, G., 1992. Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8, 1549–1560. <http://dx.doi.org/10.1089/Aid.1992.8.1549>.
- Kuiken, C., Yusim, K., Boykin, L., Richardson, R., 2005. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* 21, 379–384. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bth485>.
- Lisboa-Neto, G., Noble, C.F., Rebello Pinho, J.R., Malta, F.M., Gomes-Gouveia, M.S., Alvarado-Mora, M.V., Da Silva, M.H., Leite, A.G.B., Piccoli, L.Z., Rodrigues, F.K., Carrilho, F.J., Mendes-Correa, M.C., 2015. Resistance mutations are rare among protease inhibitor treatment-naïve hepatitis C genotype-1 patients with or without HIV coinfection. *Antivir. Ther.* 20, 281–287. <http://dx.doi.org/10.3851/IMP2873>.
- Martin, P., DiMartini, A., Feng, S., Brown, R.J., Fallon, M., 2013. Evaluation for liver transplantation in adults: 2013 practice guideline by the AASLD and the American society of transplantation. *Am. Assoc. Study Liver Dis.*, 1–98. <http://dx.doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7-2>.
- Nájera, I., Richman, D.D., Olivares, I., Rojas, J.M., Peinado, M.A., Peruchó, M., Nájera, R., López-Galíndez, C., 1994. Natural occurrence of drug resistance mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1479–1488.
- Nishiya, A.S., de Almeida-Neto, C., Ferreira, S.C., Alencar, C.S., Di-Lorenzo-Oliveira, C., Levi, J.E., Salles, N.A., Mendrone, A., Sabino, E.C., 2014. HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in São Paulo, Brazil. *PLoS One* 9, e86413. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086413>.
- Paolucci, S., Fiorina, L., Piralla, A., Gulminetti, R., Novati, S., Barbarini, G., Sacchi, P., Gatti, M., Dossena, L., Baldanti, F., 2012. Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients. *Virology* 9, 245. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-9-245>.
- Pawlotsky, J.-M., 2003. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 587–592. <http://dx.doi.org/10.1097/01.qco.0000104300.87920.03>.
- Peres-da-Silva, A., de Almeida, A.J., Lampe, E., 2012. Genetic diversity of NS3 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 254–261.
- Scheel, T.K.H., Rice, C.M., 2013. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat. Med.* 19, 837–849. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3248>.
- Schiering, N., D'Arcy, A., Villard, F., Simic, O., Kamke, M., Monnet, G., Hassiepen, U., Svergun, D.I., Pulfer, R., Eder, J., Raman, P., Bodendorf, U., 2011. A macrocyclic HCV NS3/4A protease inhibitor interacts with protease and helicase residues in the complex with its full-length target. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 21052–21056. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1110534108>.
- Sede, M.M., Laufer, N.L., Quarleri, J., 2015. Previous failure of interferon-based therapy does not alter the frequency of HCV NS3 protease or NS5B polymerase inhibitor resistance-associated variants: longitudinal analysis in HCV/HIV co-infected patients. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 219–224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.011>.
- Seeliger, D., De Groot, B.L., 2010. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 24, 417–422. <http://dx.doi.org/10.1007/s10822-010-9352-6>.
- Simmonds, P., 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J. Gen. Virol.* <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.80401-0>.
- Smith, D.B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A.S., Rice, C.M., Stapleton, J.T., Simmonds, P., 2014. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 59, 318–327. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26744>.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Vicenti, I., Rosi, A., Saladini, F., Meini, G., Pippi, F., Rossetti, B., Sidella, L., Di giambenedetto, S., Almi, P., De Luca, A., Caudai, C., Zazzi, M., 2012. Naturally occurring hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease inhibitor resistance-related mutations in HCV genotype 1-infected subjects in Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 984–987. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr581>.
- Vidal, L.L., Soares, M.A., Santos, A.F., 2016. NS3 protease polymorphisms and genetic barrier to drug resistance of distinct hepatitis C virus genotypes from worldwide treatment-naïve subjects. *J. Viral Hepat.* n/a–n/a. <http://dx.doi.org/10.1111/jvh.12503>.

- World Health Organization, 2015. Hepatitis C, fact sheet n(164 [WWW document]. Hepat. C., [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62401-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62401-6).
- Wyles, D.L., 2013. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. *J. Infect. Dis.* <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis761>.
- Zeminian, L.B., Padovani, J.L., Corvino, S.M., Silva, G.F., Pardini, M.L.D.M.C., Grotto, R.M.T., 2013. Variability and resistance mutations in the hepatitis C virus NS3 protease in patients not treated with protease inhibitors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 13–17.
- Zhang, X., 2016. Direct anti-HCV agents. *Acta Pharm. Sin. B* 6, 26–31, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2015.09.008>.
- Zhu, Y.P., Peng, Z.G., Wu, Z.Y., Li, J.R., Huang, M.H., Si, S.Y., Jiang, J.D., 2015. Host APOBEC3 G protein inhibits HCV replication through direct binding at NS3. *PLoS One* 10, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121608>.
- de Carvalho, I.M.V.G., Alves, R., de Souza, P.A.V.M., da Silva, E.F., Mazo, D., Carrilho, F.J., Queiroz, A.T.L., Pessoa, M.G., 2014. Protease inhibitor resistance mutations in untreated Brazilian patients infected with HCV: novel insights about targeted genotyping approaches. *J. Med. Virol.* 86, 1714–1721, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24015>.